

Glióma elleni hatóanyag-peptid konjugátumok *in vitro* biológiai aktivitása

**Baranyai Zsuzsa¹, Biri-Kovács Beáta^{1,2},
Martin Krátký³, Szeder Bálint⁴, Debreczeni Márta⁵,
Cervenak László⁵, Méhes Előd⁶, Buday László⁴,
Jarmila Vinšová³, Bősze Szilvia¹**

¹ MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

² ELTE TTK, Kémiai Intézet

³ Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Hradec Králové, Csehország

⁴ MTA TTK, Enzimológiai Intézet

⁵ SE III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriuma

⁶ ELTE TTK, Fizikai Intézet, Biológiai Fizika Tanszék

Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése
Balatonszemes, 2019. 05. 28.

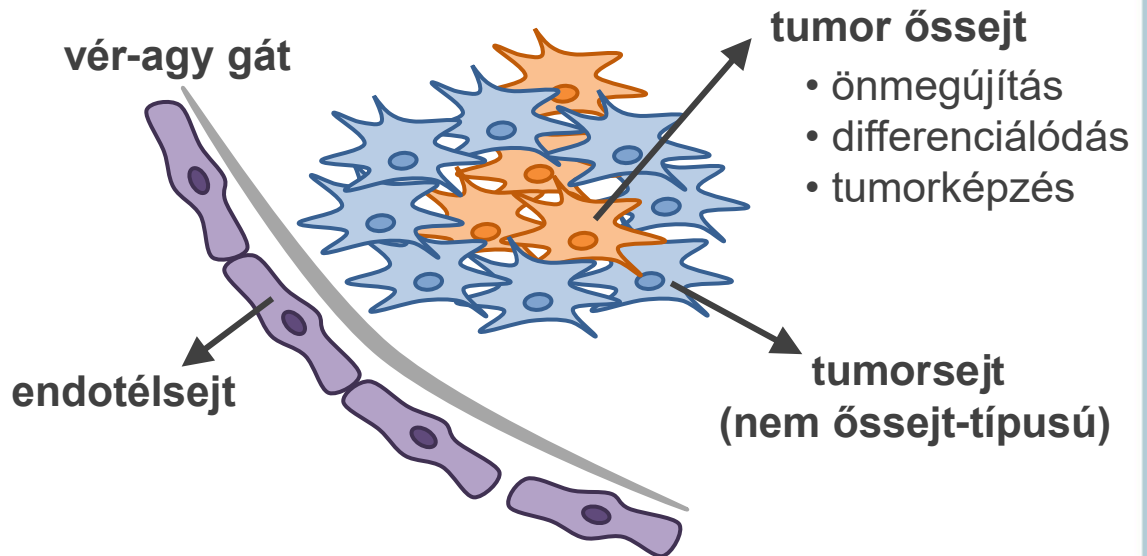
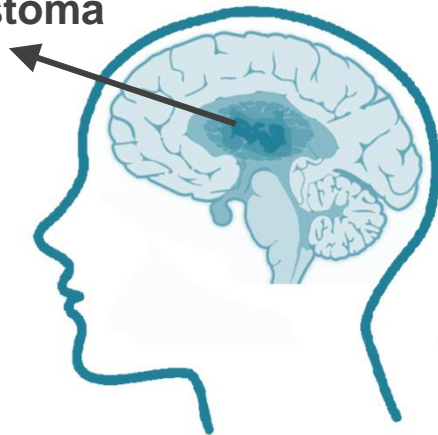


Bevezetés

► glióma, glioblastoma multiforme (GBM):

- az agyban, gerincvelőben található gliasejtek (támasztósejtek) tumoros elváltozása
- várható túlélés alacsony (~1,5 év)
- tumor őssejt: tumor kiújulása, ellenálló képesség
- vér-agy gát védővonal

glioblastoma



Hatóanyagok sejtbejutásának növelése

▶ sok esetben korlátozott sejtbejutás (diffúzió)

hatóanyag

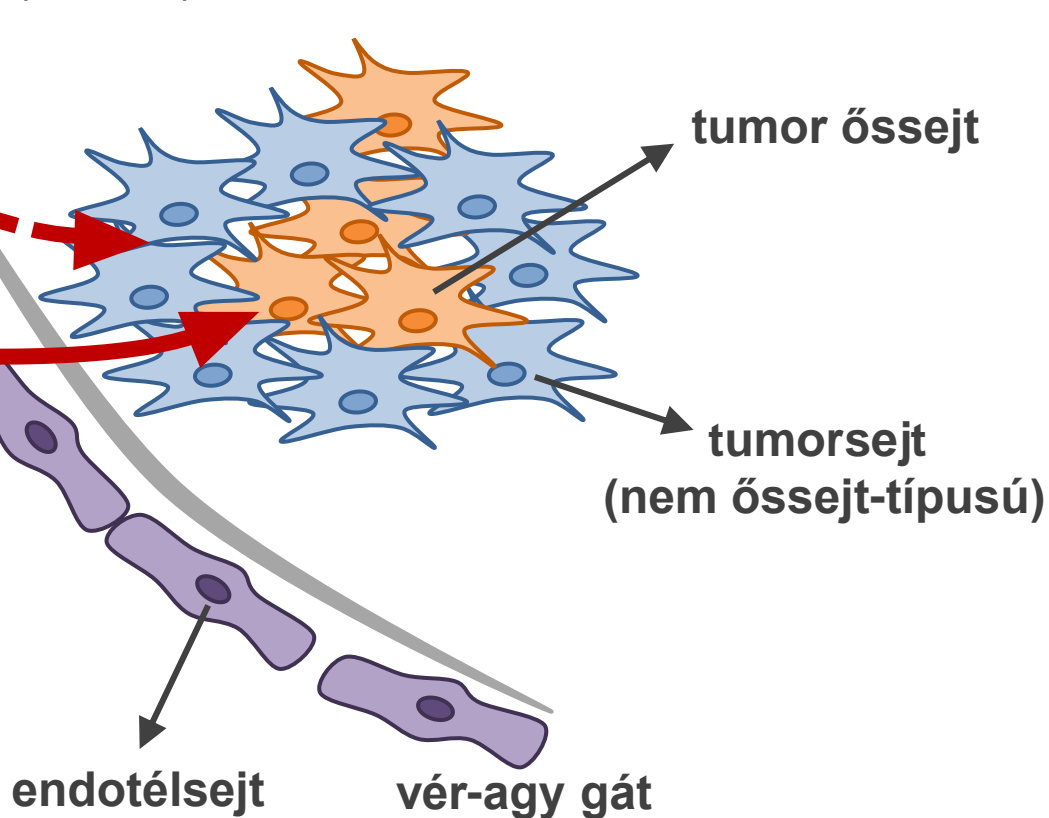


konjugátum



hordozó / irányító peptid

▶ megnövekedett sejtbejutás, szelektivitás (endocitózis, penetráció, stb.)



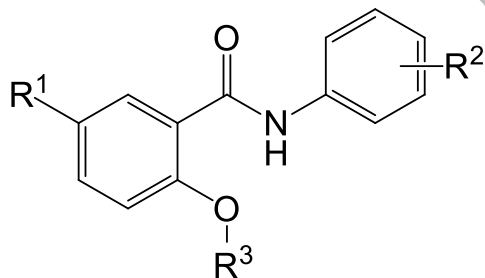
Célkitűzés

▶ tumoros sejtek és tumor őssejtek ellen kiemelkedő aktivitású hatóanyagok és konjugátumok fejlesztése

▶ új hatóanyagok

szalicilanilid
származékok

Sal



▶ hordozópeptidok

• receptor célzás:

tuftsinszármazékok

TKPPR

• sejtpenetráló peptidok:

SynB3-származékok

SynB3 = RRLSYSRRRF

▶ hatóanyag-peptid konjugátumok

szalicilanilidek

Sal

hordozópeptid

daunomicin

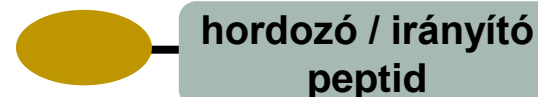
Dau

▶ kémiai és funkcionális jellemzés

- modell sejtek (2D, 3D)
- *in vitro* citosztatikus hatás, sejtbefutás, stb.

Hordozópeptidek

konjugátum



tuftsinszármazékok

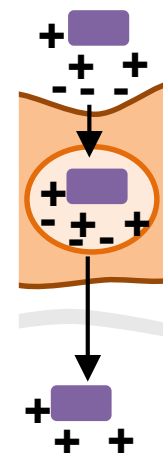
pl. H-TKPPR-OH (tuftsin antagonist)

- glióma sejteken túltermelődő neuropilin-1 receptorhoz kötődhetnek
- receptor mediált endocitózis (C-end rule, CendR: R/K X X R/K)

SynB3-származékok

SynB3 (10 aminosav) H-RRLSYSRRRF-NH₂

- **protegrin 1 peptid lineáris származéka**
(a protegrinek sertés leukocitákból izolált antimikrobiális peptidek)
- **sejtpenetráló peptid** (rövid, kationos, amfipatikus peptidek)
- **átjutás a vér-agy gáton**
- **adszorpció mediált transzcitózis**



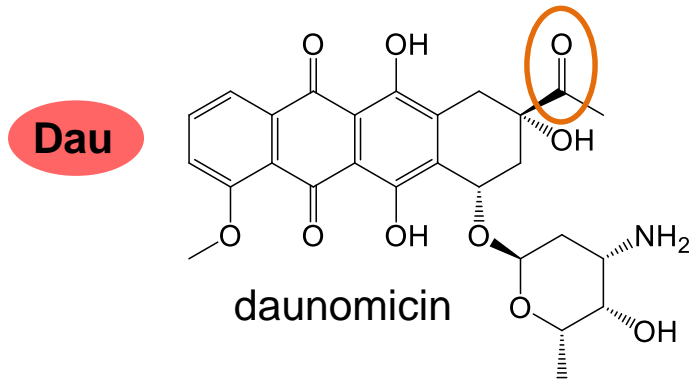
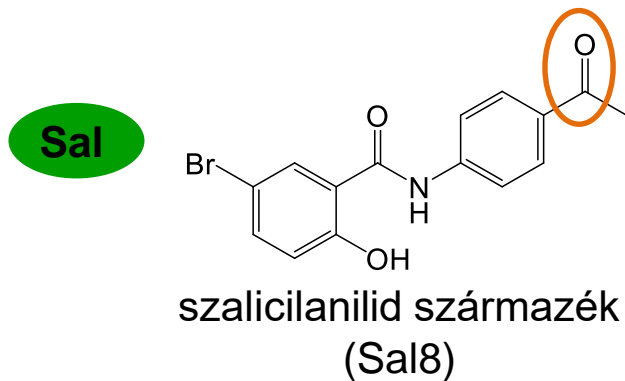
SynB3 - tuftsin

„tandem” konjugátumok

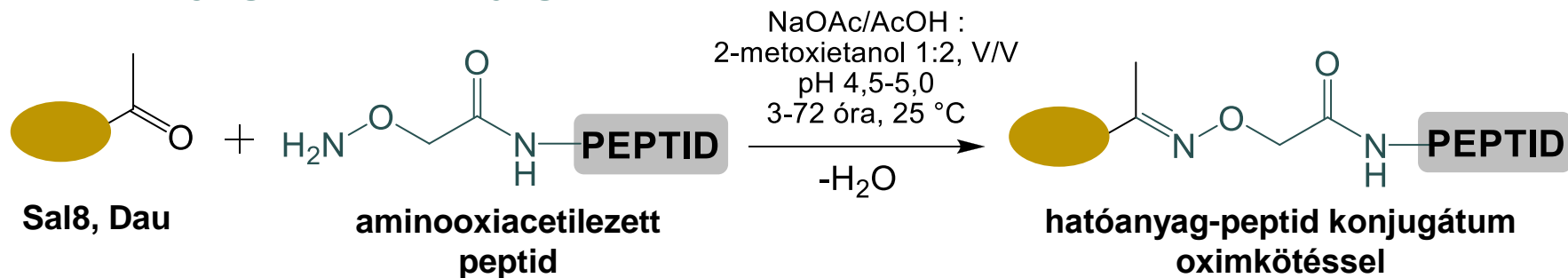
- **receptor célzás**
- **megnövekedett sejtbejutás**

Konjugátumok előállítása

▶ konjugálható hatóanyagok:



▶ hatóanyag-peptid konjugátumok:



▶ kémiai jellemzés:

- analitikai HPLC
- tömegspektrometria (ESI-MS)
- stabilitás vizsgálata *in vitro* mérések körülményei között
- fluoreszcens származékok fluoreszcencia tulajdonságainak vizsgálata

Vizsgált vegyületek

hatóanyagok



Sal1

Sal3

Sal8

Niklozamid

Dau

TMZ

lizoszomális fragmensek



Sal8-Aoa-Arg-OH

Sal8-Aoa-Gly-OH

Sal8-Aoa-Thr-OH

Dau-Aoa-Arg-OH

Dau-Aoa-Gly-OH

Dau-Aoa-Thr-OH

fluoreszcensen jelzett és kontroll peptidok



Cf / Ac- hordozó / irányító
peptid

Cf/Ac-SynB3

Cf/Ac-GFLG-SynB3

Cf/Ac-SynB3K

Cf/Ac-SynB3K(dec)

Cf/Ac-T5

Cf/Ac-GFLG-T5

Cf/Ac-T5(4-dec)

Cf/Ac-TKPPG-OT10

Cf/Ac-TKPPR-OH

Cf/Ac-SynB3-T5

Cf/Ac-SynB3-TKPPR-OH

konjugátumok



hordozó / irányító
peptid

Sal8-Aoa-SynB3

Sal8-Aoa-GFLG-SynB3

Sal8-Aoa-T5

Sal8-Aoa-GFLG-T5

Sal8-Aoa-T5(4-dec)

Sal8-Aoa-TKPPR-OH

Dau-Aoa-SynB3

Dau-Aoa-GFLG-SynB3

Dau-Aoa-SynB3K

Dau-Aoa-SynB3K(dec)

Dau-Aoa-T5

Dau-Aoa-GFLG-T5

Dau-Aoa-T5(4-dec)

Dau-Aoa-TKPPG-OT10

Dau-Aoa-TKPPR-OH

Dau-Aoa-SynB3-T5

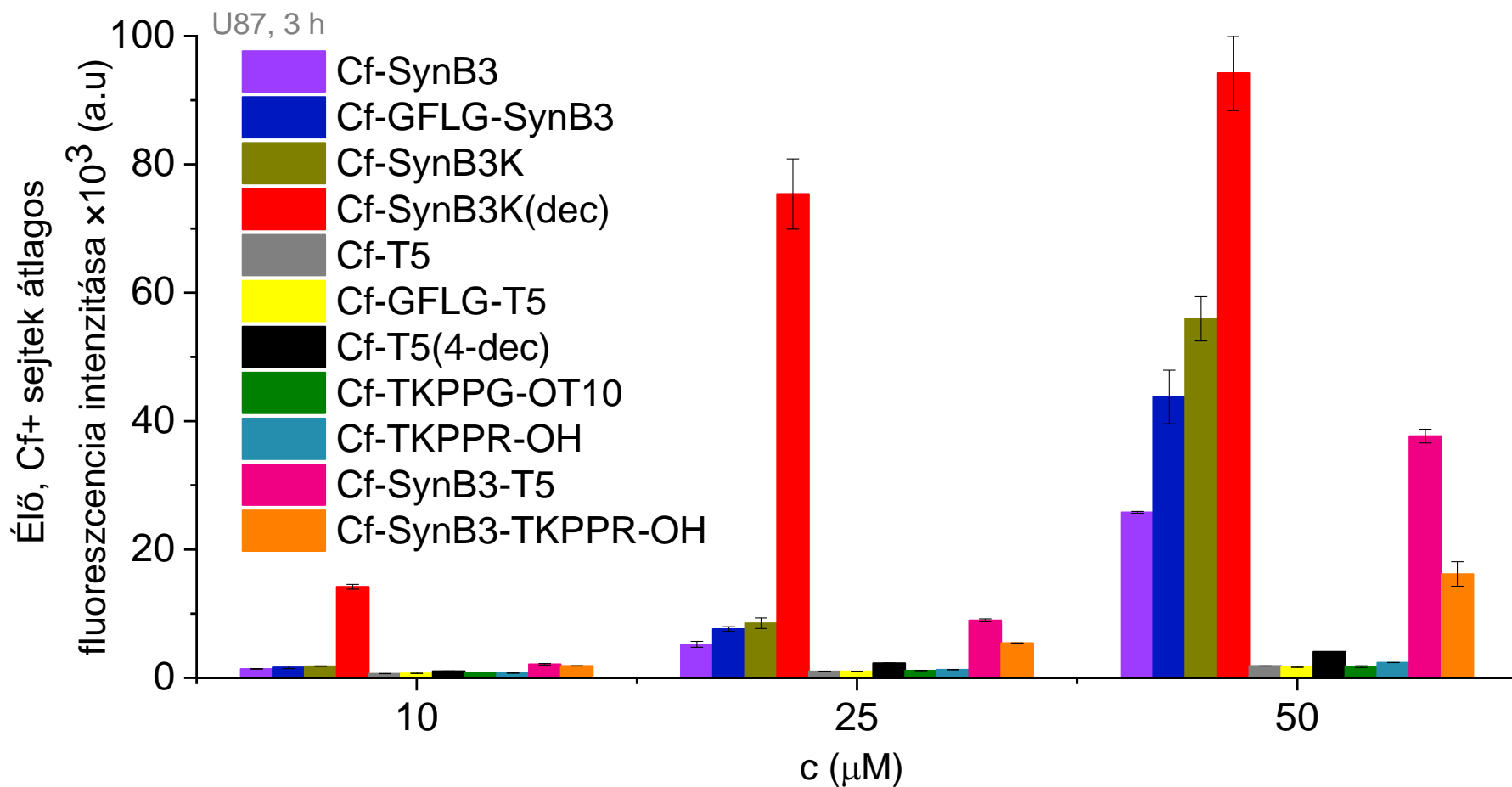
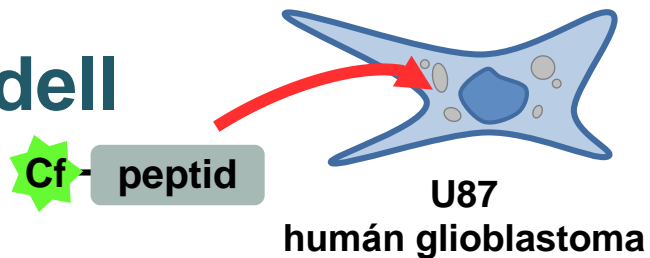
Dau-Aoa-SynB3-TKPPR-OH

TMZ-SynB3

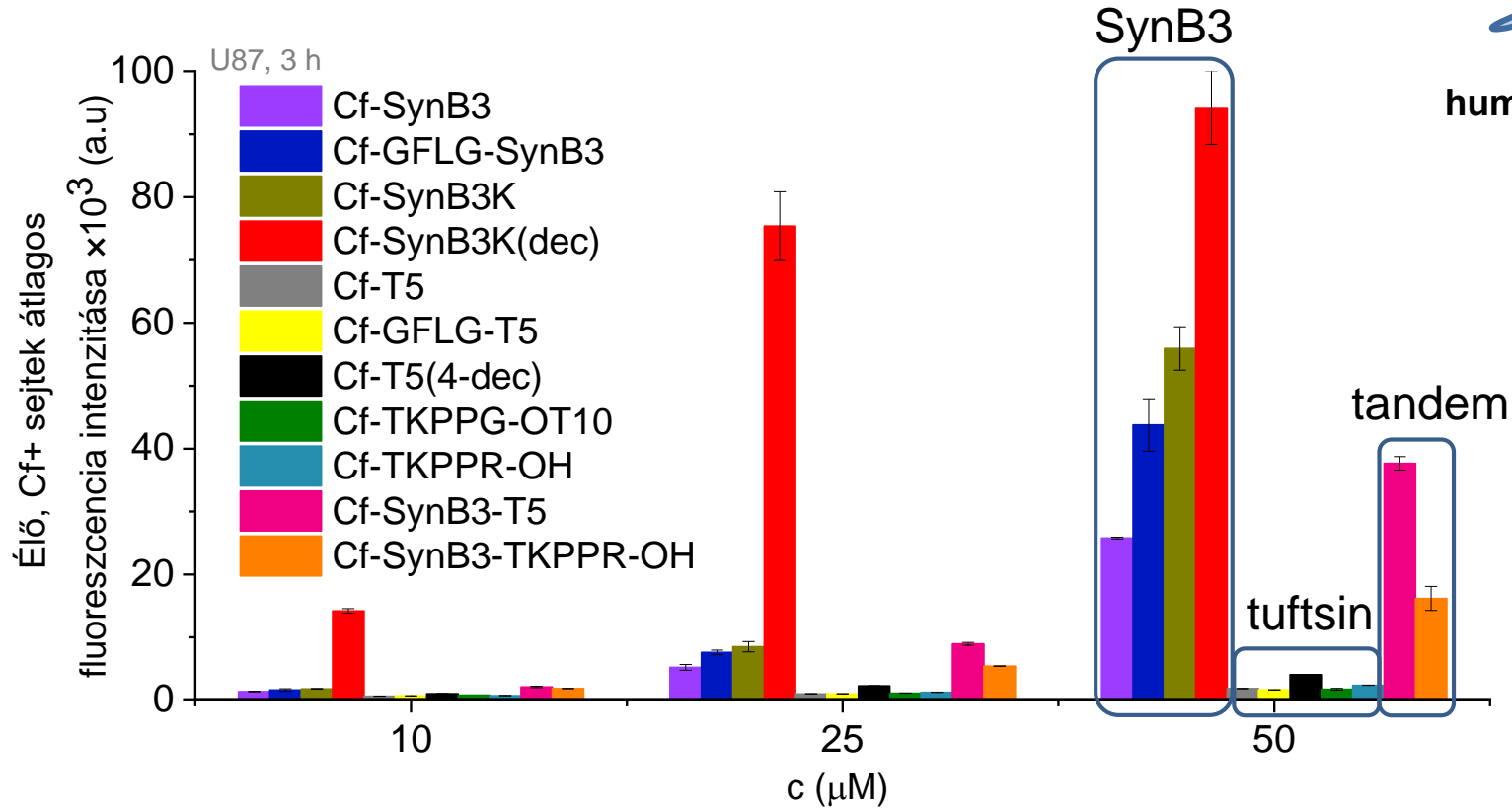
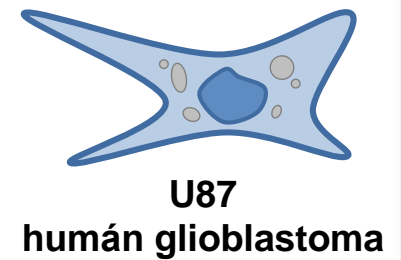
TMZ-GFLG-SynB3

In vitro sejtbejutás – glióma modell

- fluoreszcensen jelölt hordozópeptidek
- áramlási citometria (BD LSR II, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$)
- kezelés: 0,1-50 μM , 3 óra



In vitro sejtbejutás – glióma modell



► SynB3 származékok:

- hasonló sejtbejutási profil (koncentrációfüggés)
- Cf-SynB3K(dec) – dekanoil oldallánc hatása: jobb sejtbejutás, de citotoxikus hatás jelentkezik (IC_{50} : 34 μM)

► tuftsin származékok:

- kisebb mértékben jutnak be
- Cf-T5(4-dec) dekanoil oldalláncú peptid nem citotoxikus

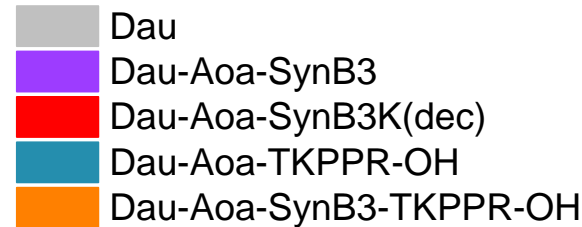
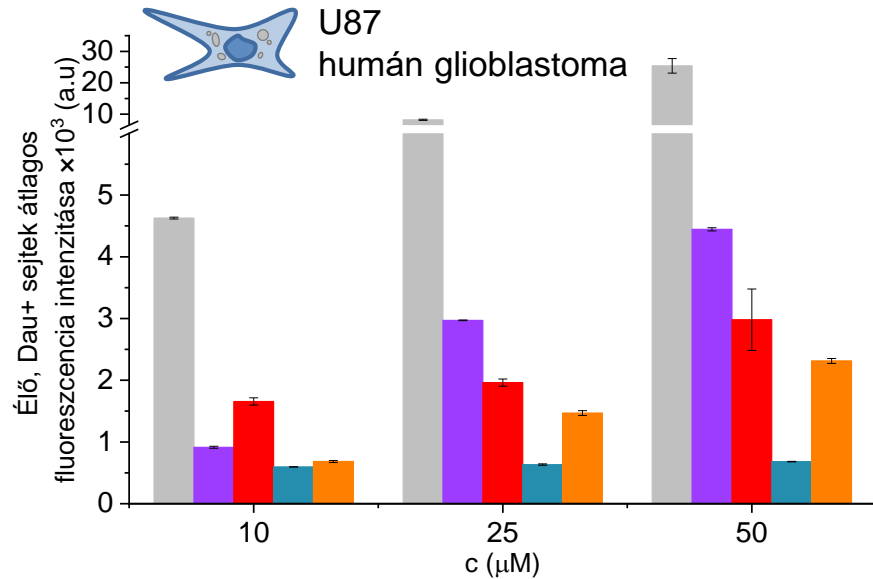
► tandem származékok:

- SynB3-hoz hasonló sejtbejutás

IC_{50} : 50%-os gátló koncentráció

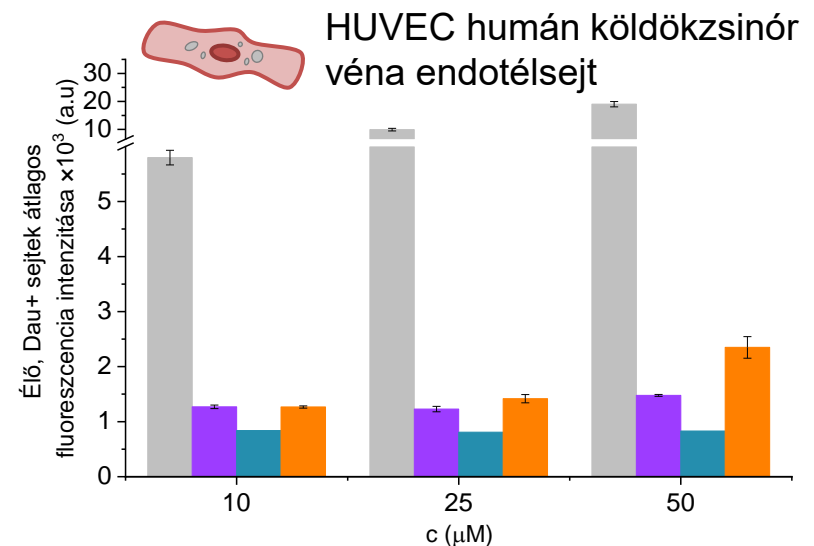
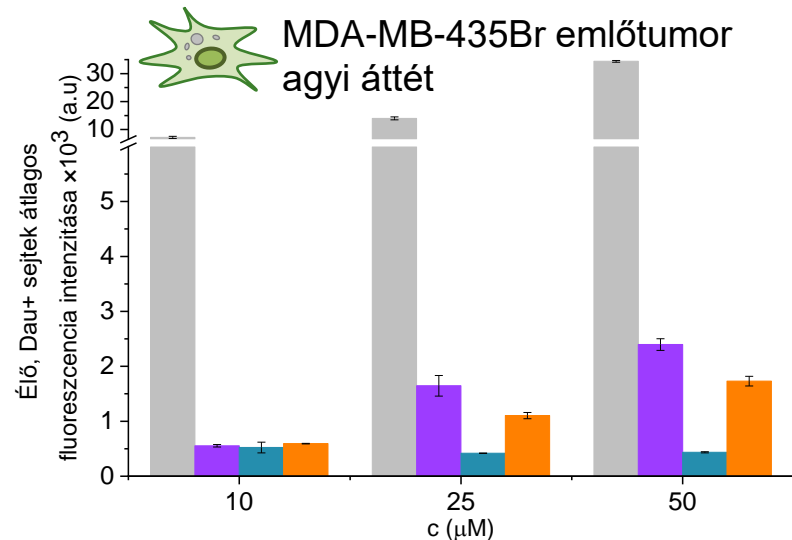
In vitro sejtbejutás – összehasonlítás

- Dau-konjugátumok
- áramlási citometria (BD LSR II, $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$)
- kezelés: 0,1-50 μM , 3 óra



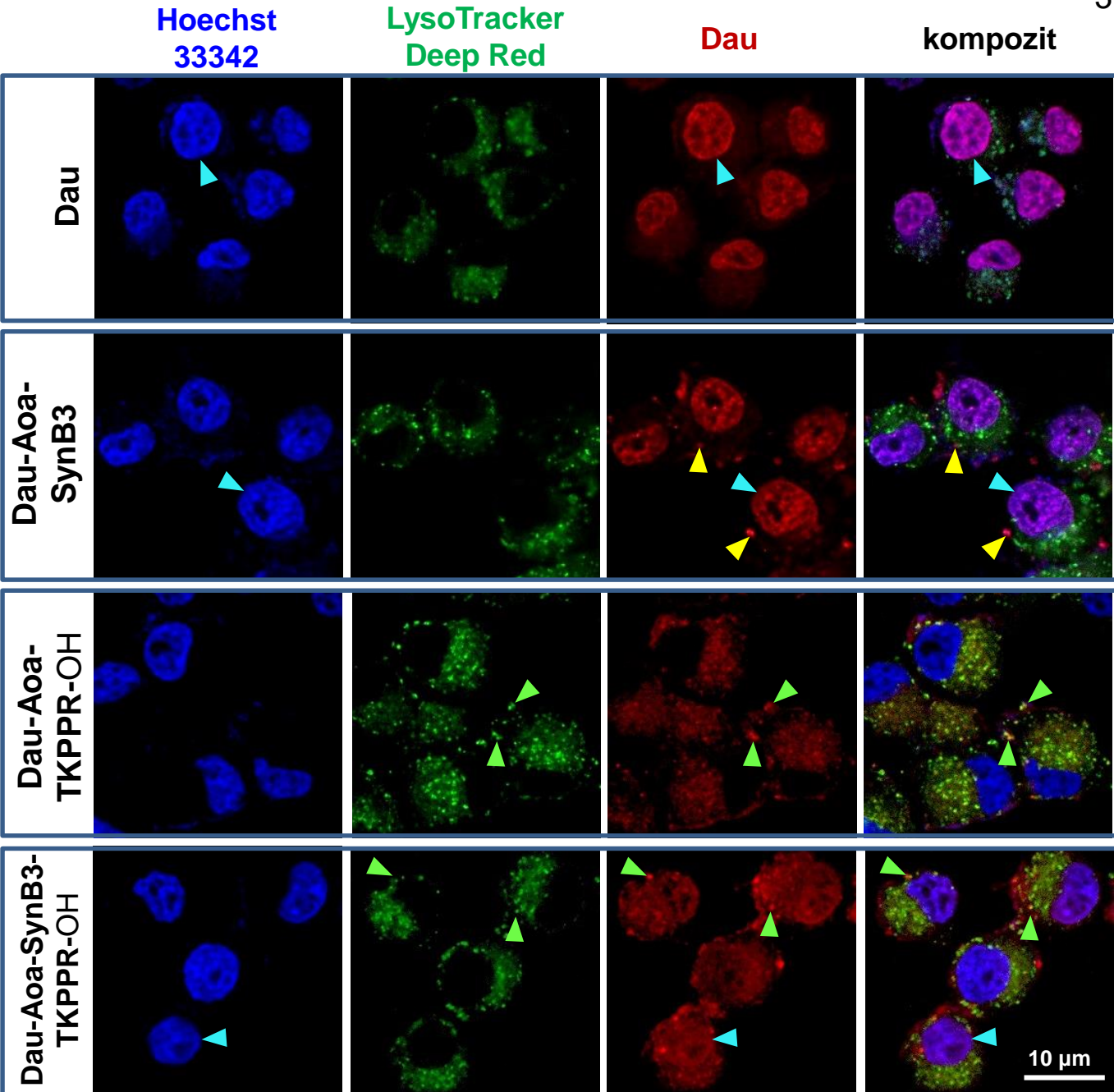
► **Dau:** a vegyületre jellemzően nagymértékű sejtbejutás

► **konjugátumok:** bejutnak a célsejtekbe
 Dau-Aoa-SynB3 > Dau-Aoa-SynB3-TKPPR-OH
 >>> Dau-Aoa-TKPPR-OH



Sejtbejutás, kolokalizáció vizsgálata

U87, Dau-konjugátumok, 25 μ M, 30 perc kezelés, fixált sejtek



Dau-csatornán különböző lézerintenzitást és detektorfeszültséget alkalmaztunk a különböző anyagoknál.

Dau sejtmagban

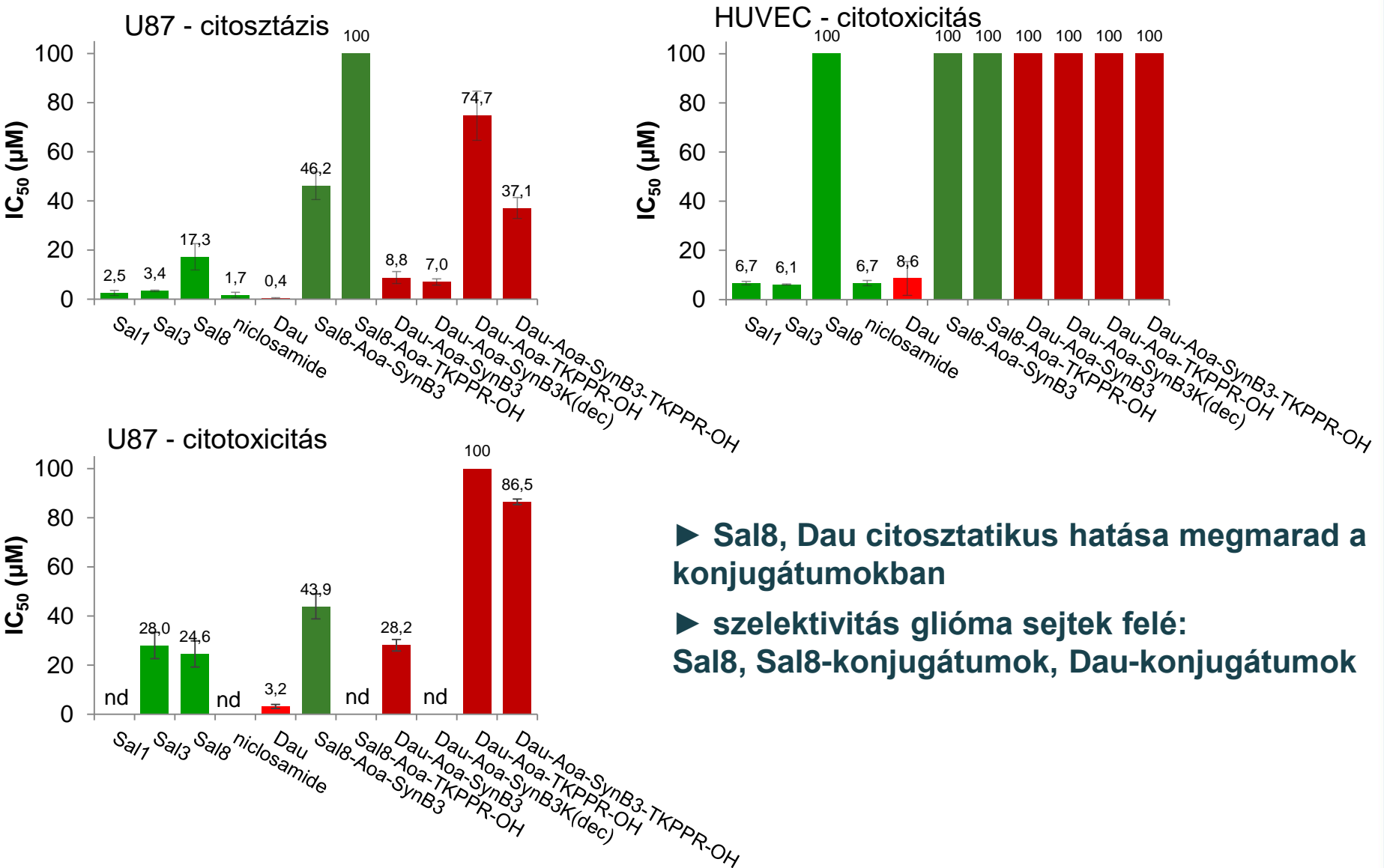
Dau sejtmagban főként, és vezikuláris lokalizáció, nincs jelentős lizoszomális lokalizáció

Dau főként lizoszómában

Dau sejtmagban és lizoszómában is

In vitro citosztatikus, citotoxikus hatás

- citosztatikus hatás: 24 óra kezelés, mosás, 72 óra továbbtenyésztés után MTT teszt
- citotoxikus hatás: 24 óra kezelés, mosás, MTT vagy SYBR-Green teszt



► Sal8, Dau citosztatikus hatása megmarad a konjugátumokban

► szelektivitás glióma sejtek felé:
Sal8, Sal8-konjugátumok, Dau-konjugátumok

3D sejt kultúrák (szferoidok)

► Szferoidok kialakítása

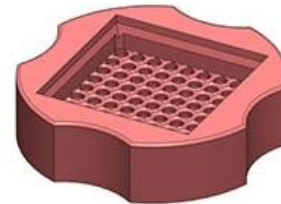
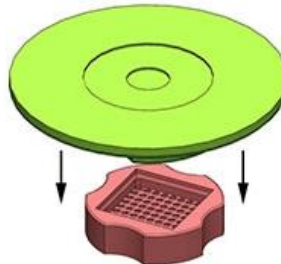
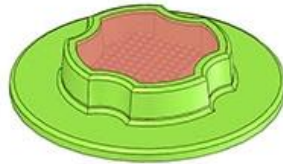
- 3D Petri Dish®, Microtissues®

► agaróz öntés

szilikon forma
9x9



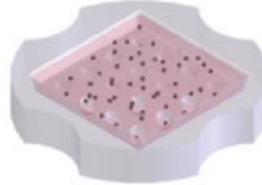
agaróz
(2 w/v%)



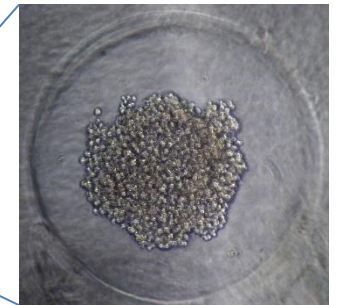
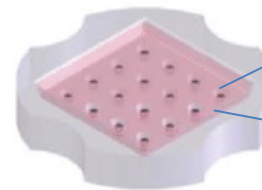
► sejtek betöltése (U87, MDA-MB-435Br)



10 000 sejt / μl



24-30 óra inkubálás
(37°C, 5% CO₂)

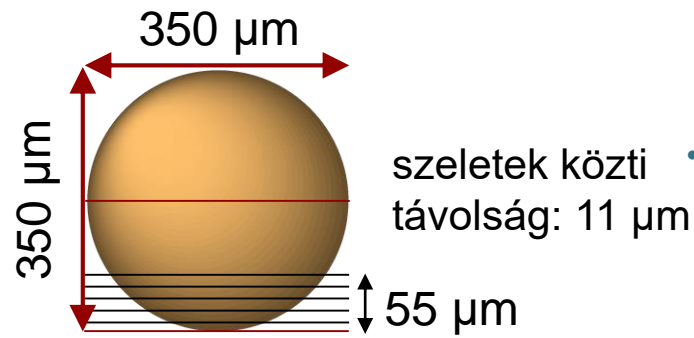
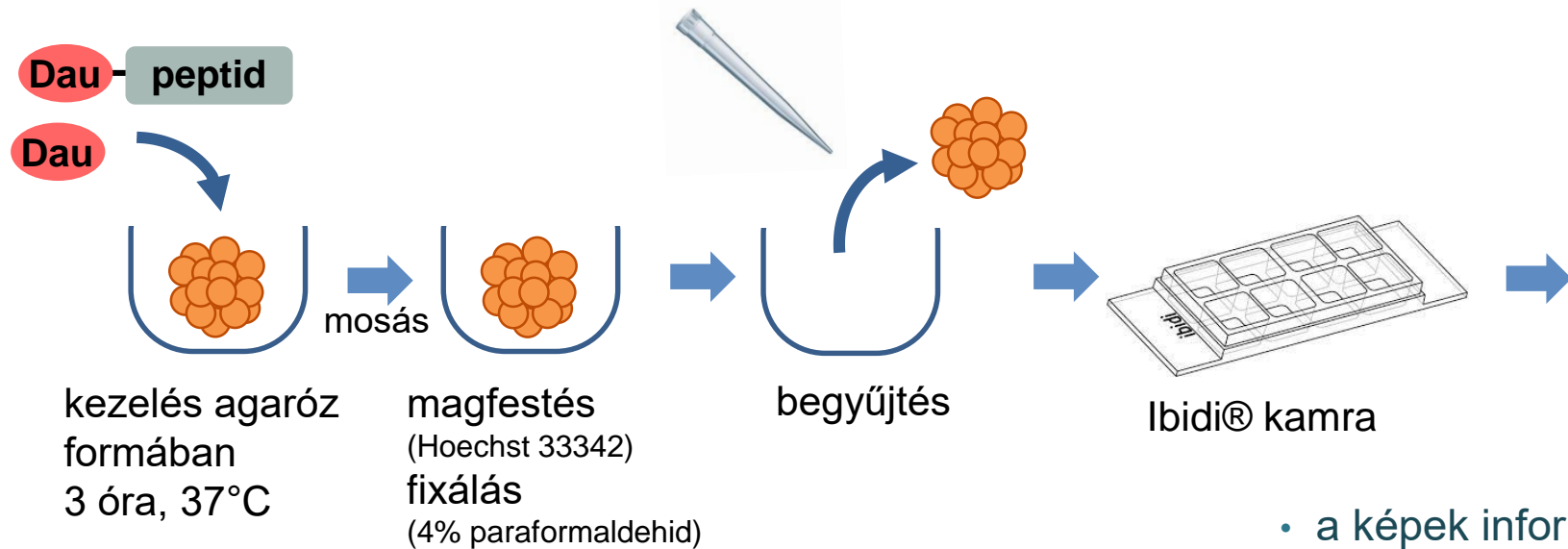


$d_{\text{well}} = 800 \mu\text{m}$
 $d_{\text{szferoid}} = 300-400 \mu\text{m}$

sztereomikroszkóp
(YJ-T3C, Ningbo Tianyu
Optoelectronic Technology Co., Ltd.)

3D sejtkultúrák (szferoidok)

► Szferoidok kezelése, vizsgálata



- a képek információ tartalmának kvalitatív, kvantitatív értékelése fejlesztés alatt
- előzetes eredmények

Szferoidok vizsgálata

Dau

- Dau bejutása U87 glióma szferoidokba

z: konfokális sík távolsága a szferoid felszínétől mérve

z: 11 μm

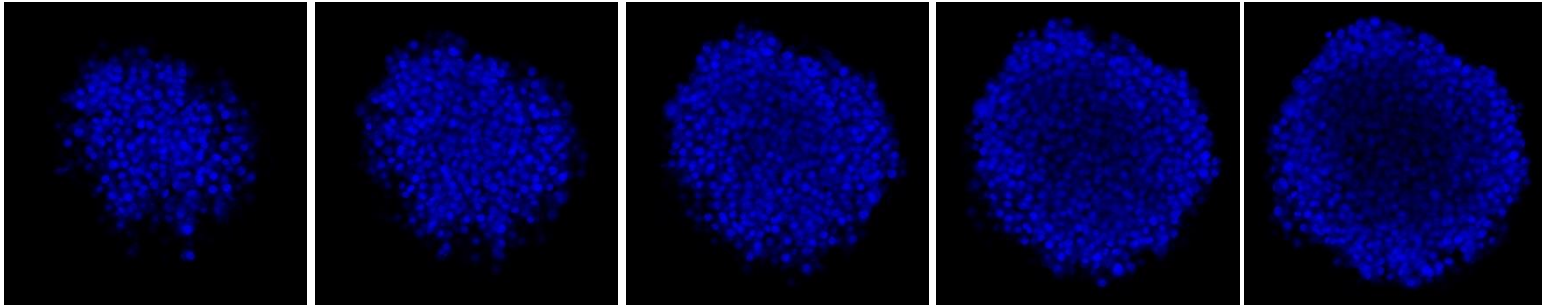
z: 22 μm

z: 33 μm

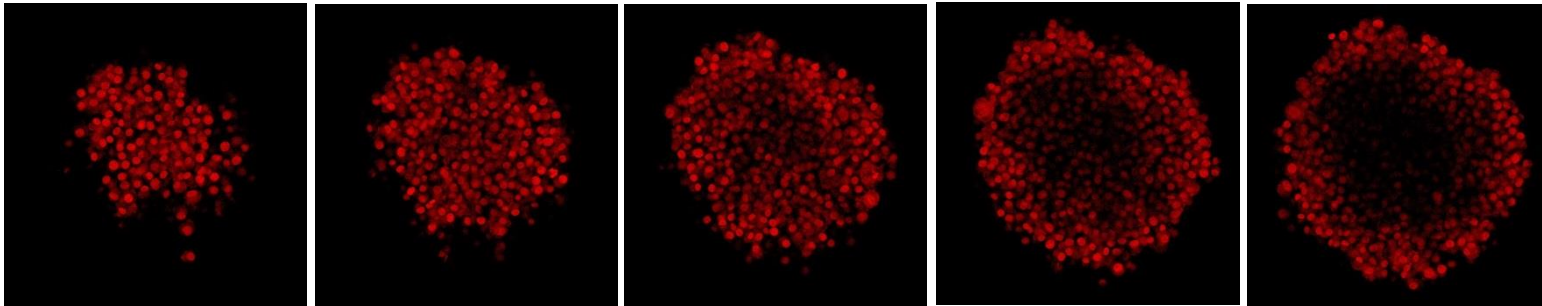
z: 44 μm

z: 55 μm

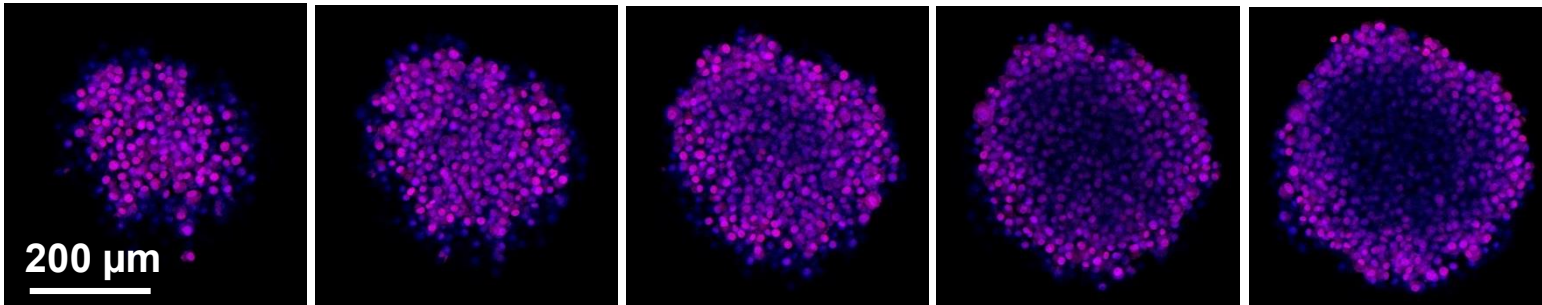
Hoechst
33342



Dau



kompozit



200 μm

Szferoidok vizsgálata

Dau – SynB3 – TKPPR-OH

- Dau-Aoa-SynB3-TKPPR-OH tandem konjugátum bejutása U87 glióma szferoidokba

z: konfokális sík távolsága a szferoid felszínétől mérve

z: 11 μm

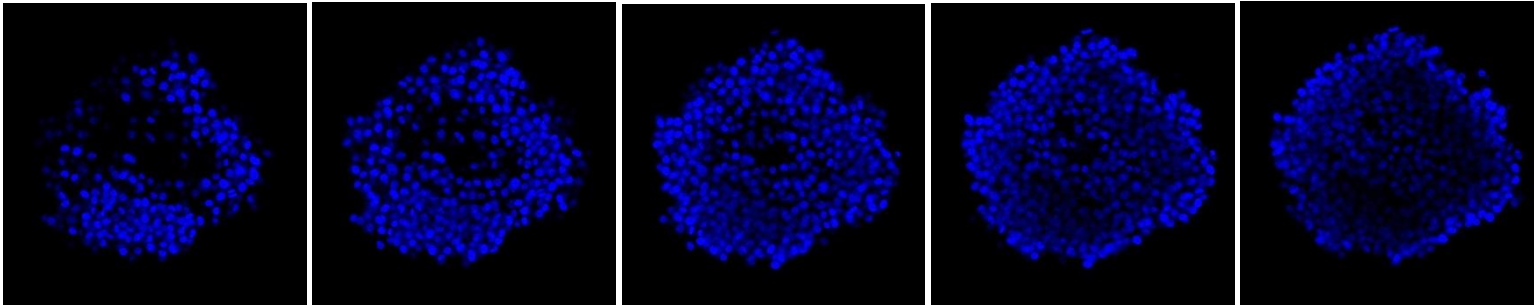
z: 22 μm

z: 33 μm

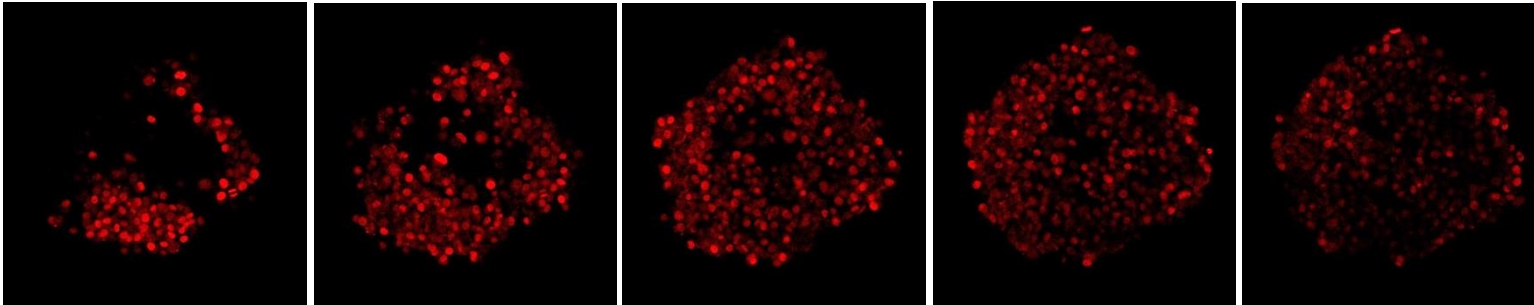
z: 44 μm

z: 55 μm

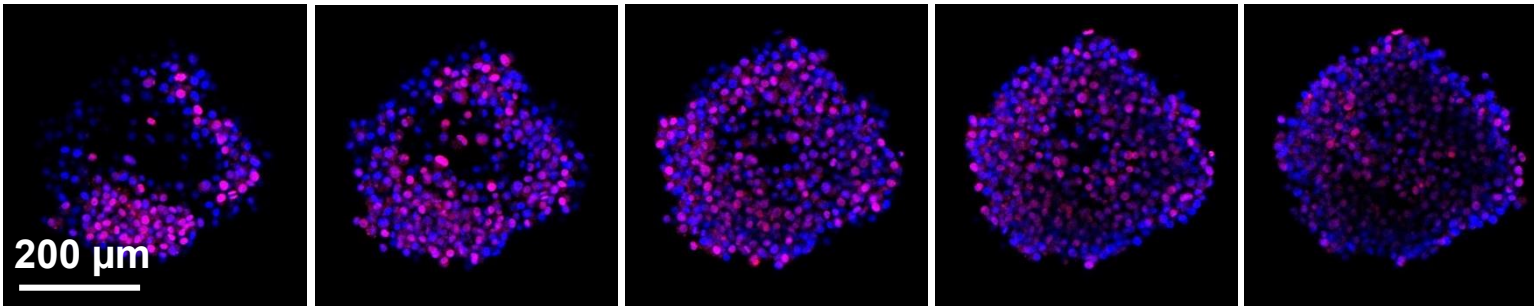
Hoechst
33342



Dau



kompozit



Szferoidok vizsgálata – összehasonlítás

U87 szferoid

MDA-MB-435Br szferoid

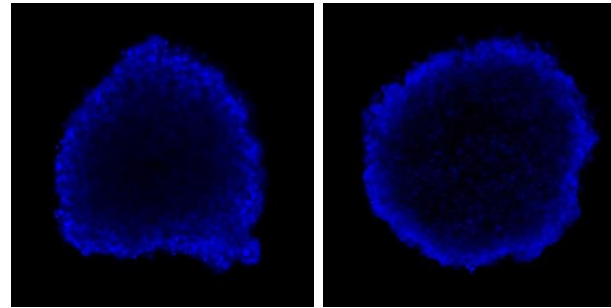
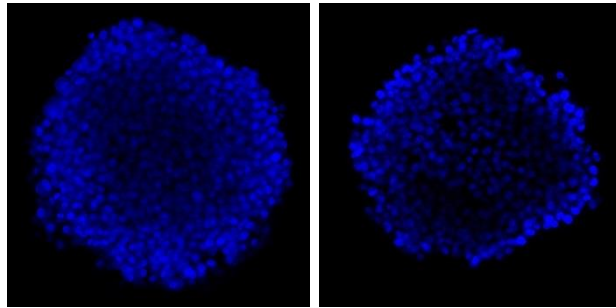
Dau

Dau-Aoa-SynB3-
TKPPR-OH

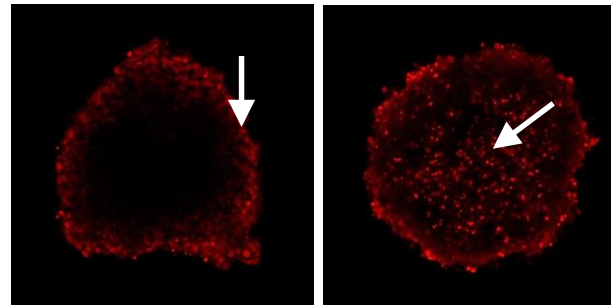
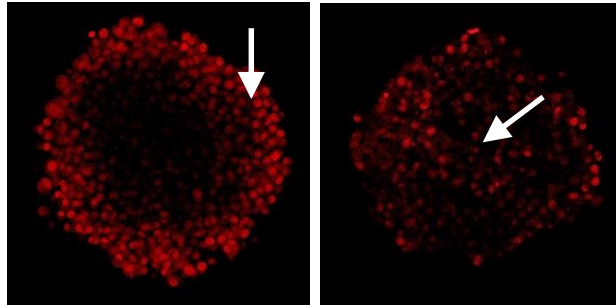
Dau

Dau-Aoa-SynB3-
TKPPR-OH

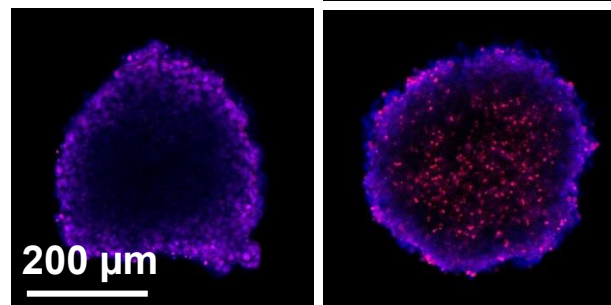
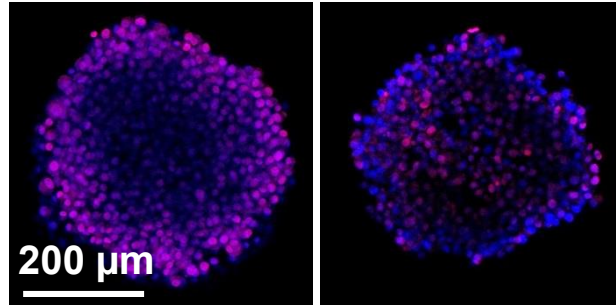
Hoechst
33342



Dau



kompozit



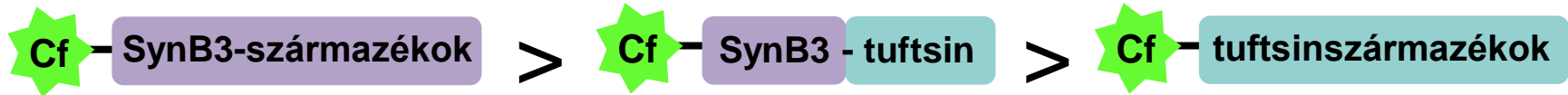
z: 55 µm

z: 55 µm

► szferoid penetrációs képesség: Dau-Aoa-SynB3-TKPPR-OH > Dau

Összefoglalás

▶ hordozópeptidek – *in vitro* sejtbejutás



▶ hatóanyag-peptid konjugátumok



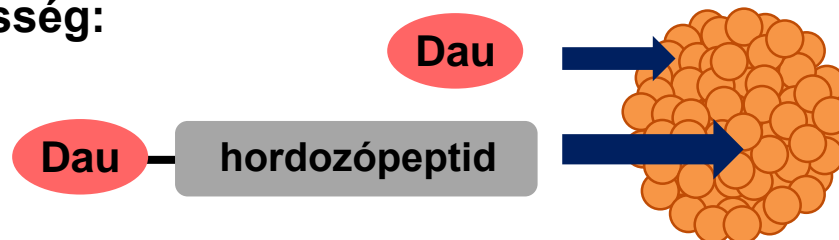
• *in vitro* antitumor aktivitás, szelektivitás



▶ szferoidok – *in vitro* tumorpenetráció modellezése

- a módszer optimalizálása folyamatban van
- előzetes eredmény

penetrációs képesség:



Köszönetnyilvánítás

Dr. Mező Gábor

Kiskó Mária

Budai Johanna (BME, MSc szakdolgozó)
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-17-3)

Nemzeti Versenyképességi és Kiválósági Program (NVKP_16-1-2016-0036)

Emberi Erőforrások Minisztériuma, FKIP, 1783 3/2018/ FEKUTSTRAT

Köszönöm a figyelmet!

