



# Célzott tumorterápiára alkalmas hatóanyag – peptid konjugátumok fejlesztése

**Mező Gábor**

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Remedicon

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság  
Gyógyszerinnovációs Kongresszusa

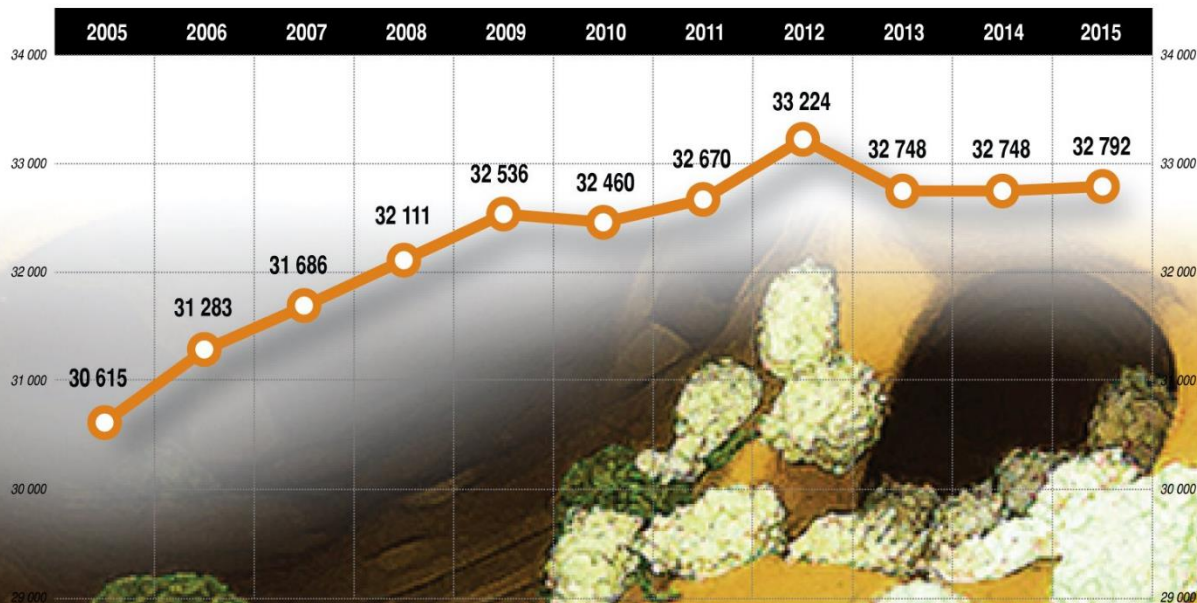
2017. 05. 09.

Velence

# Miért foglalkozunk a daganatos megbetegedésekkel?

## Daganatos megbetegedések okozta halálozások Magyarországon (2005–2015)

Rosszindulatú daganatos megbetegedések által okozott halálozások száma összesen:



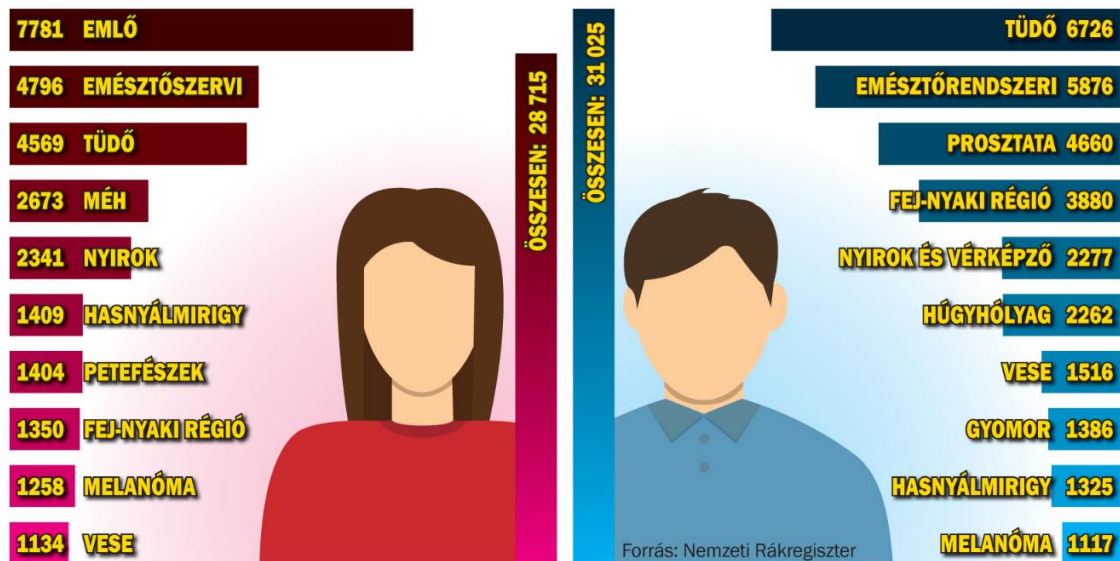
Halálokok:

1. Szív és érrendszeri megbetegedések
2. Daganatos megbetegedések

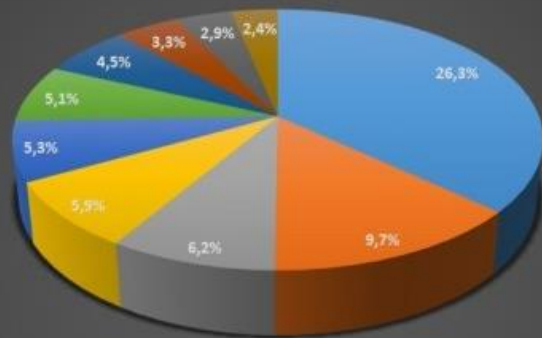
65 év alattiak között vezető halálok; az összes beteg 40%-a

# A tíz leggyakoribb daganatos megbetegedés és leggyakoribb halált okozó rák típus

## Top 10 daganatos megbetegedés Magyarországon (2013)



## Tíz leggyakoribb halált okozó rák



- Légcső, hörgő, tüdő rosszindulatú daganata
- Női emlő rosszindulatú daganata
- Végbél, sigmabél, végbélnyílás rosszindulatú daganata
- Ajak, szájüreg, garat, rosszindulatú daganata
- A húgyhólyag rosszindulatú daganata
- Vastagbél rosszindulatú daganata
- Hasnyálmirigy rosszindulatú daganata
- Gyomor rosszindulatú daganata
- Proszтата rosszindulatú daganata
- Máj rosszindulatú daganata

Nagy esetszám – elég jól gyógyítható:

emlőrák (~66%-os túlélés)

Nagy esetszám – rosszul gyógyítható:

tüdőrák (~16%-os túlélés)

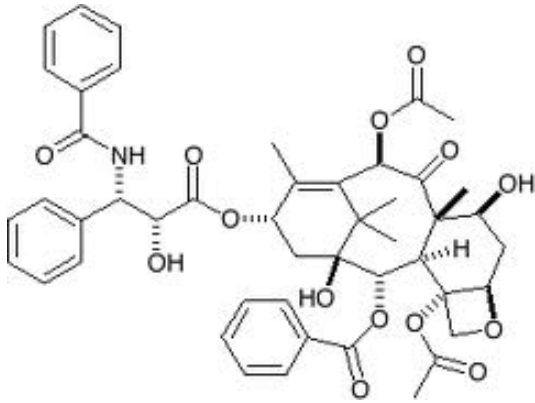
Nagy esetszám – viszonylag jól gyógyítható:

vastagbélrák (~47%-os túlélés)

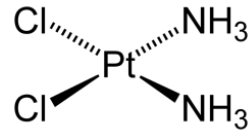
Kis esetszám – rosszul gyógyítható:

hasnyálmirigyrák (~5%-os túlélés)

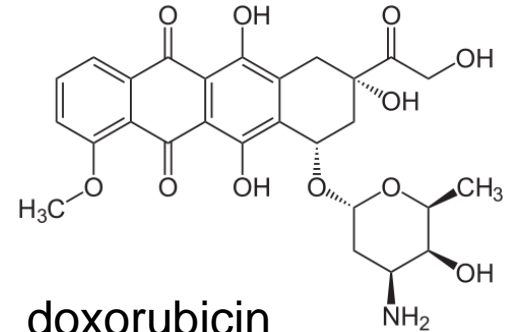
# Kemoterápia



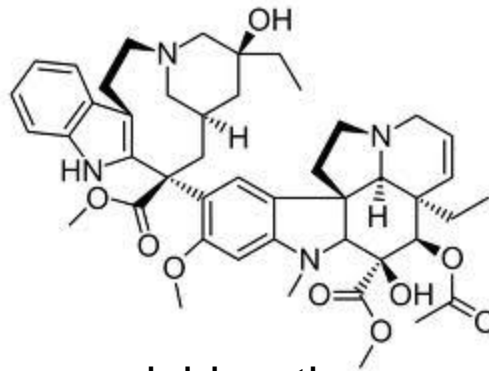
taxol



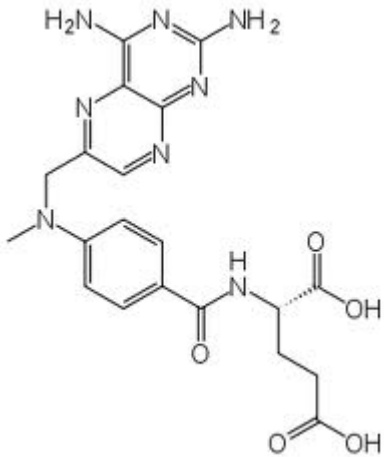
cisplatin



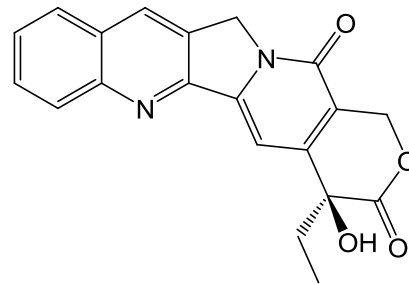
doxorubicin



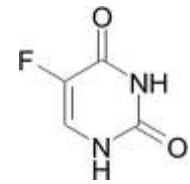
vinblasztin



metotrexát



kamptotecin



5-fluoruracil

# ***A kemoterápia mellékhatásai***

## ***Kemoterápiás szerek:***

- a gyorsan osztódó sejtekre hatnak (tumorsejtek)***
- de hatnak a normális körülmények között gyorsan osztódó sejtekre is és károsítják azokat***

*pl. csontvelő (vérképző szerv) sejtjei,  
emésztőszervek  
hajhagymákat tartalmazó tüsző*

## ***A kemoterápia legáltalánosabb mellékhatásai:***

- mieloszuppresszió (vérsejtek képződésének csökkenése)*
- immunszuppresszió (érzékenység fertőző betegségekre)*
- mukozitisz (bél és emésztő rendszer gyulladása, hányás)*
- alopecia (foltos hajhullás)*



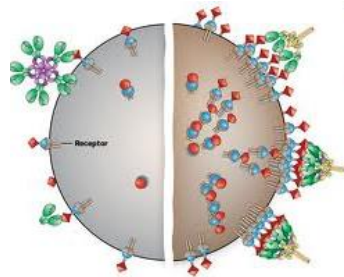
***Egyedi toxikus hatások:*** *kardiotoxicitás, veseelégtelenség, ödémásodás, májfunkció zavarai, terratogén (magzatkárosító) hatás*

# ***A terápia fokozott szelektívásának lehetősége az egészséges sejtek és a tumorsejtek különbségén alapul***

Néhány különbség az egészséges és tumorsejtek, szövetek között:

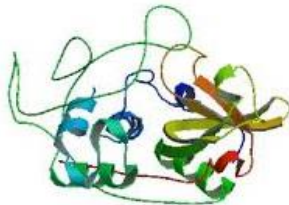
Sejtfelszíni (pl. tumorspecifikus vagy túltermelődött receptor)

egészséges sejt

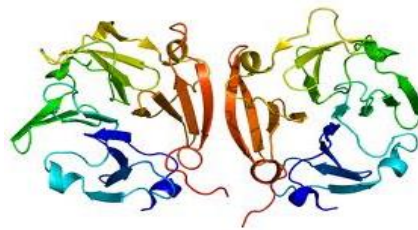


tumorsejt

Sejtbeni (pl. enzimek, egyéb fehérjék eltérő mennyiségben, minőségben)



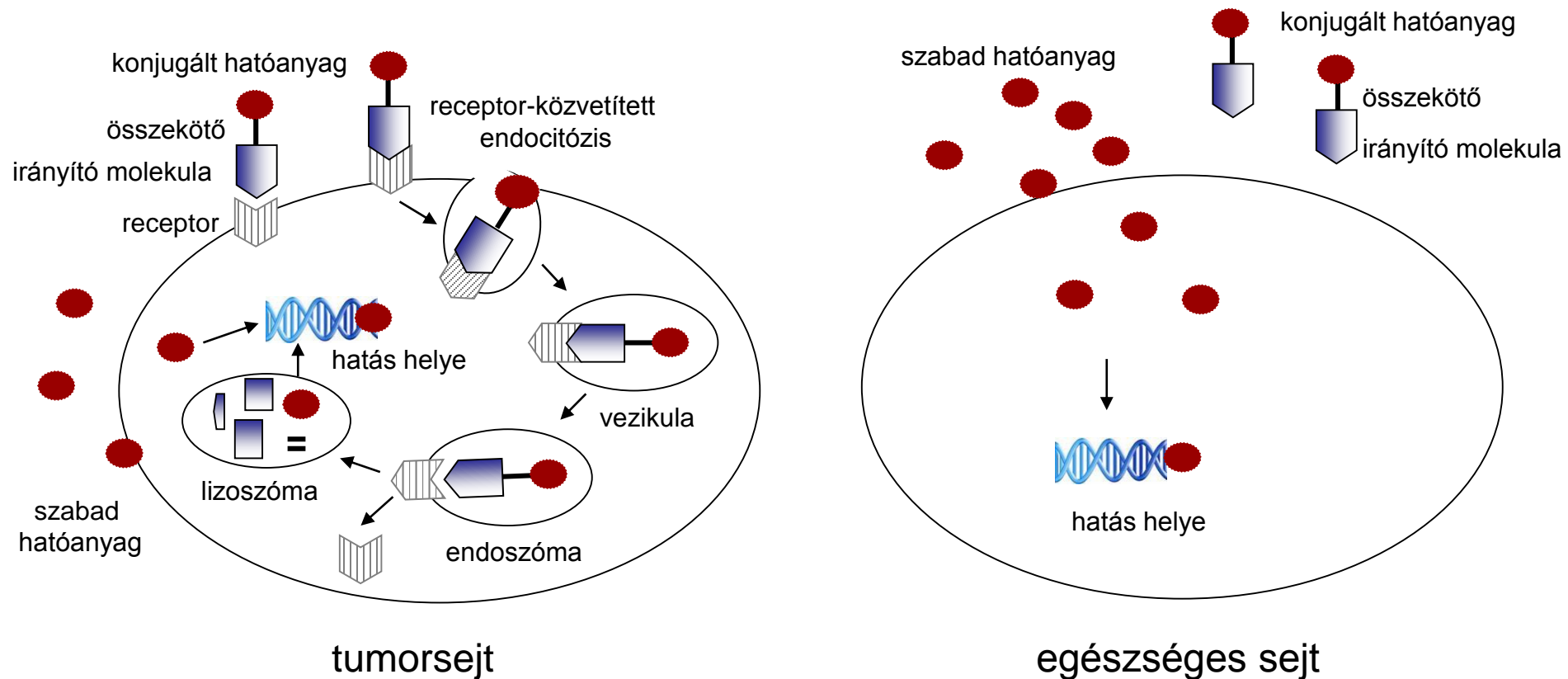
katepszin B



mátrix metallopeptidáz 9  
(MMP9)

Lokalizálható „szilárd” tumorok (pl. újonnan kialakult vérerek)

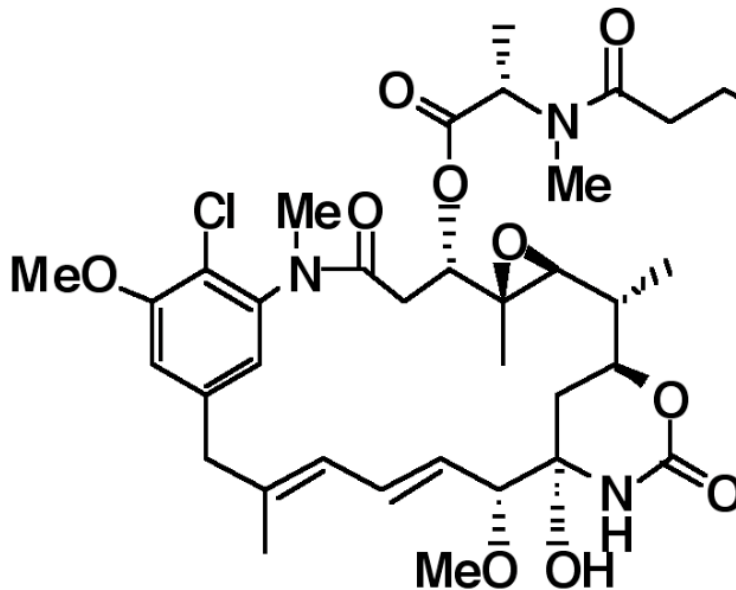
# Célzott tumorterápia: szelektív hatóanyag célba juttatás irányító molekulákkal



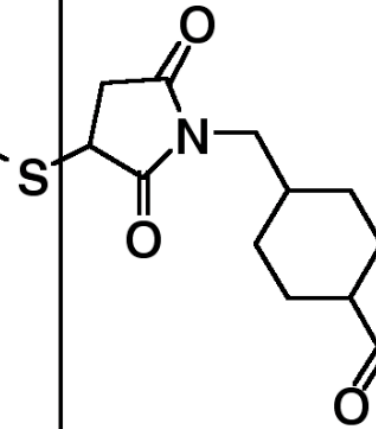
# Antibody Drug Conjugates (ADCs)

Kadcyla (Genentech, South San Francisco, CA)

Mertansine (emtansine, tubulin inhibítor)

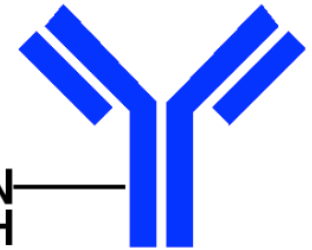


DM1



MCC linker

Trastuzumab  
(HER2 receptor  
ellenanyag)



DM1/Mab ~ 3,5

n

4-(maleimidylmethyl) cyclohexane-1-carboxylate

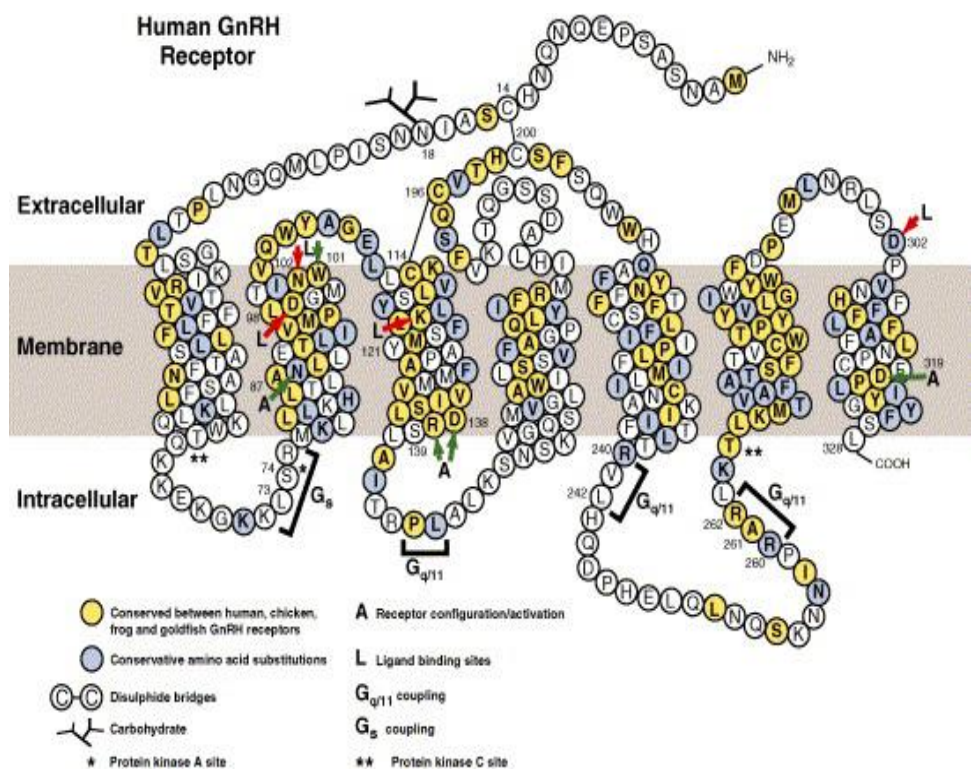


# Tumorspecifikus célbajuttatás GnRH (LHRH) receptoron keresztül

## GnRH receptorok tumorsejteken:

- > 50% emlődaganat
- ~ 100% melanoma
- > 70% petefészekrák
- > 90% prosztatatarák
- > 75% méhtestrák
- > 80% vesedaganat
- > 40% agytumor
- > 90% non-Hodgkin limfóma

tartalmaz GnRH receptorokat.

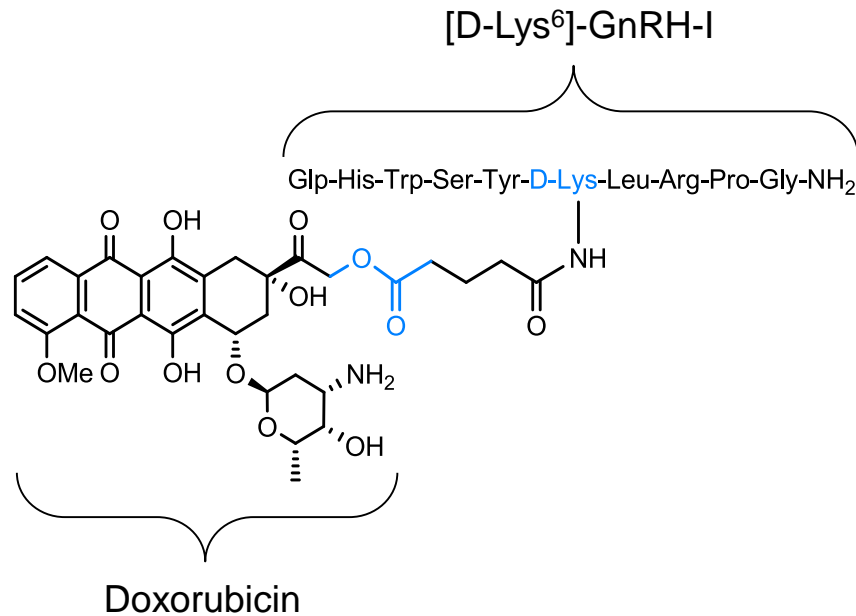


## GPCR

GnRH receptorok megtalálhatók egészséges szövetekben is, különösen a szaporító szervekben, de sokkal kisebb mértékben, mint a tumorsejteken.

# Doxorubicin-[D-Lys<sup>6</sup>]-GnRH-I (AEZS-108, AN-152)

Zoptarelin doxorubicin (AEterna Zentaris Inc.)



- [D-Lys<sup>6</sup>]-GnRH-I egy GnRH-I agonist analog
- Észter-kötéssel kapcsolják a Doxorubicinhez
- **Klinikai Fázis II-ben vizsgálják, emlő, petefészek és méh daganatokra**
- **Észter-kötés gyors lebomlása humán szérumban ( $t_{1/2} \sim 2$  óra) karboxil-észterázok hatására**

# ***GnRH-III a nagy tengeri ingolából izolált GnRH analog***



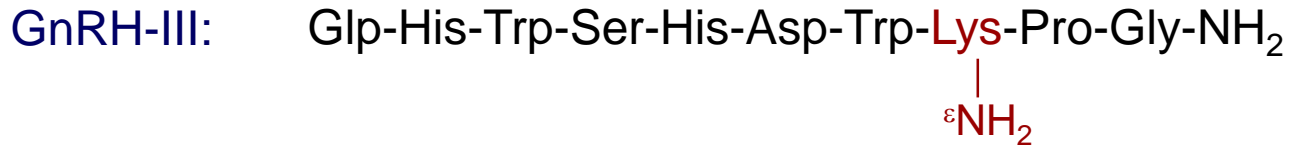
***GnRH-I: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>***

***GnRH-III: Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>***

- *A GnRH receptor(ok)hoz kötődik a tumor sejteken*
- *500 – 1000-szor kisebb az endokrin hatása emlősökön, mint a humán GnRH-I*
- *Tumorelles hatását kimutatták emlő, prosztatata, méh, hasnyálmirigy, vastagbél daganat sejteken*

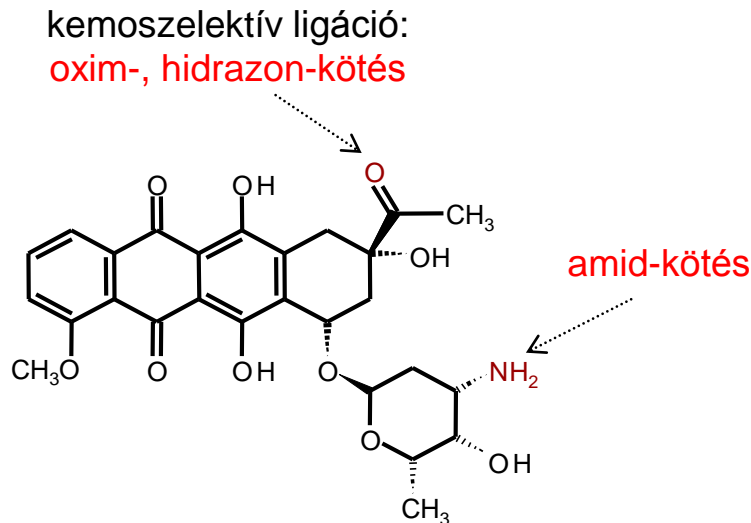
***GnRH-III: Hatásos szállító molekula lehet az irányított  
tumorterápiában***

# Daunorubicin-GnRH-III konjugátumok tervezése



→ a Lys<sup>8</sup> ε-aminocsoportja felhasználható konjugálásra

→ a Lys<sup>8</sup> bázikus oldalláncának módosítása nem eredményezi a receptor kötődés és az antiproliferatív hatás elvesztését, de tovább csökken a hormon hatása



Kovács M., et al. Peptides 28, 821-829 (2007)

Mező, G., Manea M.: Prot. Pept. Lett. 24, 479-488 (2013)

## Daunorubicin (Daunomicin)

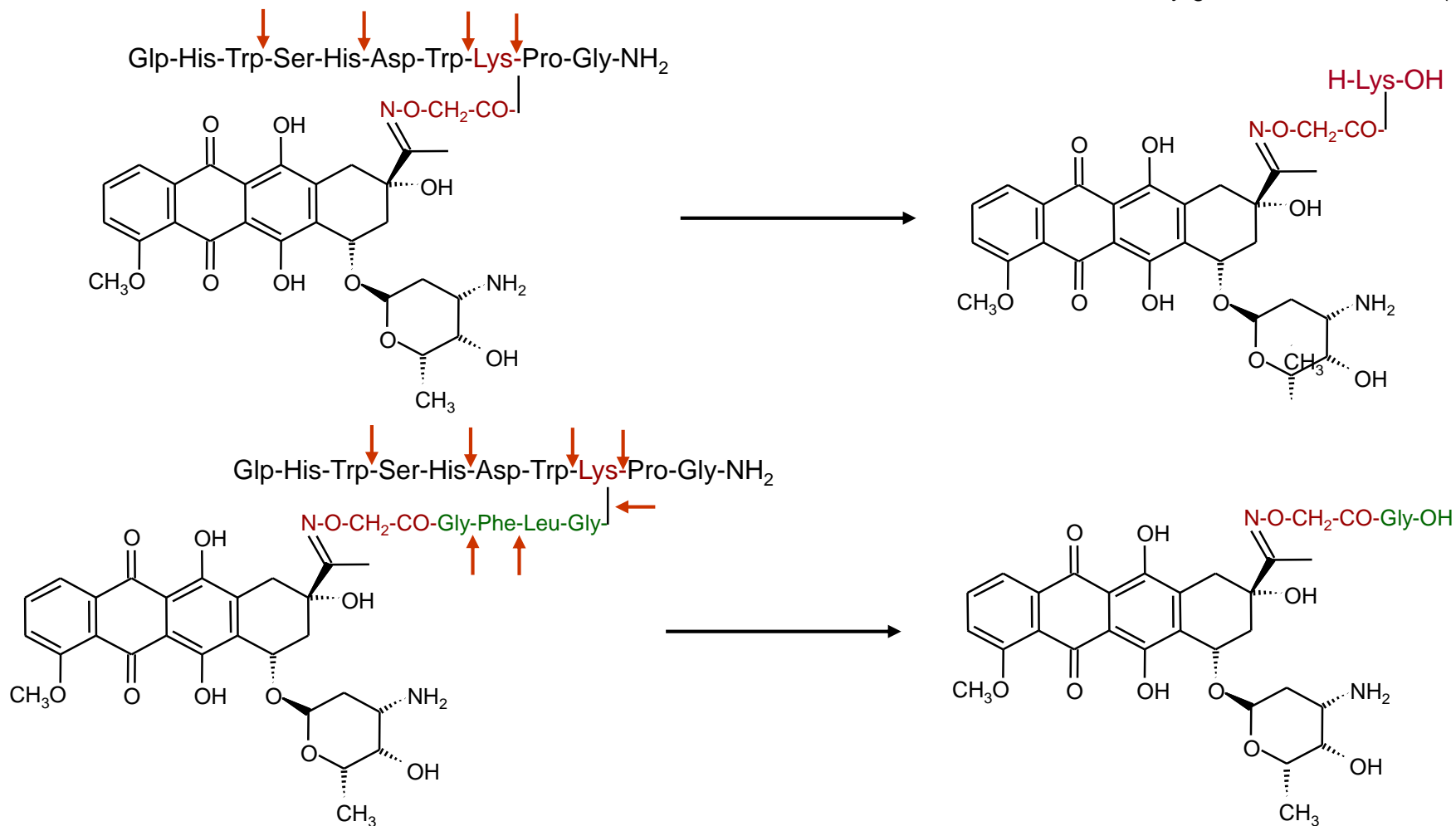
- antraciklin antibiotikum, a rák gyógyításában alkalmazott szer (e.g., leukémia, neuroblastoma)
- DNA interkaláció; topoizomeráz II inhibitor

## Toxikus mellékhatások:

- emésztőrendszer, vese, máj, bőr toxicitás, stb.
- immunszupresszió, mieloszupresszió
- kardiotoxicitás

# Az oxim-kötést tartalmazó Dau-GnRH-III konjugátumok lebomlása Katepszin B enzim hatására

Szabó, I., et al. Bioconjug. Chem., 20, 656-665 (2009)



Citosztatikus hatás (IC<sub>50</sub> μM)

MCF-7 (humán emlő):

7,8 ± 2,1

MCF-7 (humán emlő):

3,9 ± 1,2

HT-29 (humán vastagbél):

17,9 ± 4,0

HT-29 (humán vastagbél):

22,5 ± 1,7

# ***Daunorubicin és daunorubicint tartalmazó metabolitok kötődése csirke eritrocita DNS-hez***

<b>Anyag</b>	<b>K (x 10<sup>5</sup>) (M<sup>-1</sup>)</b>	<b>n</b>
<b>Dau</b>	<b>11,70</b>	<b>2,5</b>
<b>Dau=Aoa-OH</b>	<b>2,21</b>	<b>3,8</b>
<b>H-Lys(Dau=Aoa)-OH</b>	<b>6,80</b>	<b>3,0</b>
<b>Dau=Aoa-Gly-OH</b>	<b>6,74</b>	<b>3,5</b>
<b>Dau=Aoa-Arg-OH</b>	<b>6,78</b>	<b>3,2</b>
<b>Dau=Aoa-Tyr-OH</b>	<b>4,40</b>	<b>3,5</b>
<b>Dau=Aoa-Leu-OH</b>	<b>3,23</b>	<b>3,6</b>
<b>GnRH-III(Dau=Aoa)</b>	<b>0,83</b>	<b>4,2</b>

K: kötődési állandó; n: kizárési paraméter

Dau – COOH közelsége gátolja a kötődést

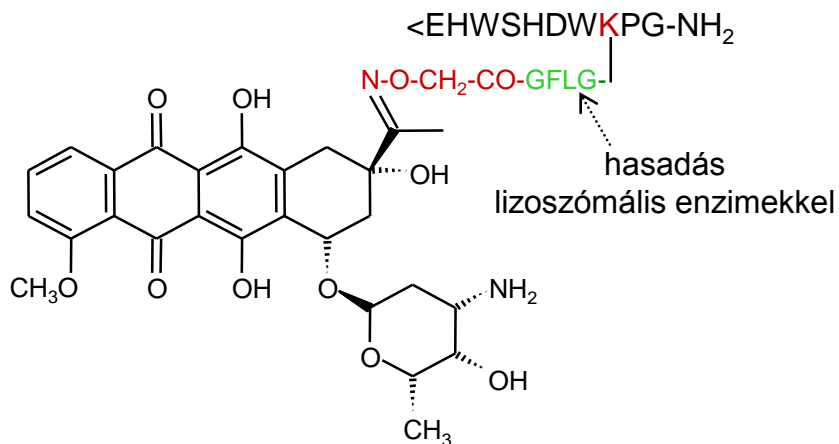
Bázisos aminosav (esetleg ikerionos szerkezet miatt) segíti a kötődést

Nagy térkitöltésű oldalláncot tartalmazó aminosav gátolja a kötődést

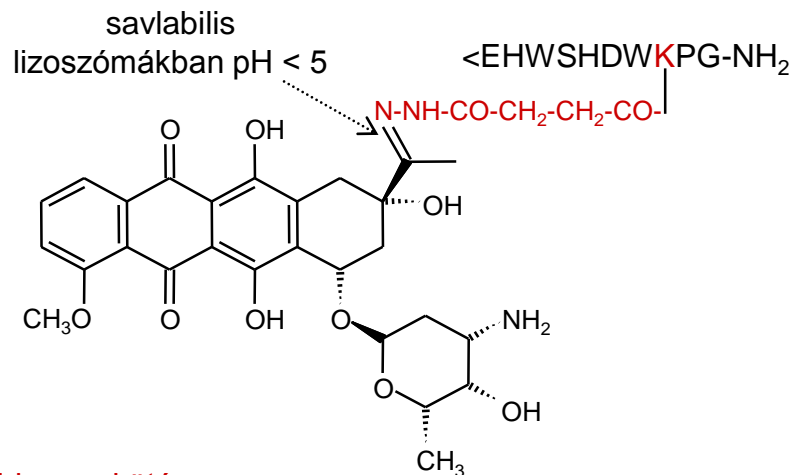
Orbán E., et al. Amino Acids 41(2): 469-483 (2011)

Orbán E., et al. Bioconjugate Chemistry 22(10): 2154-2165 (2011)

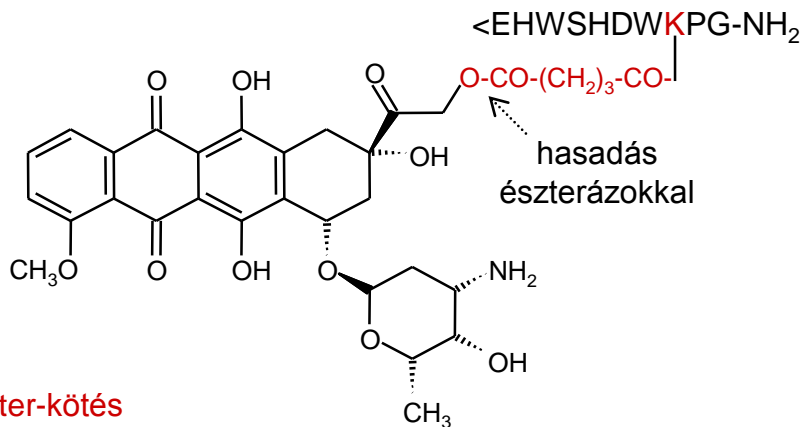
# Antraciklinek konjugálása GnRH-III hormon peptidhez



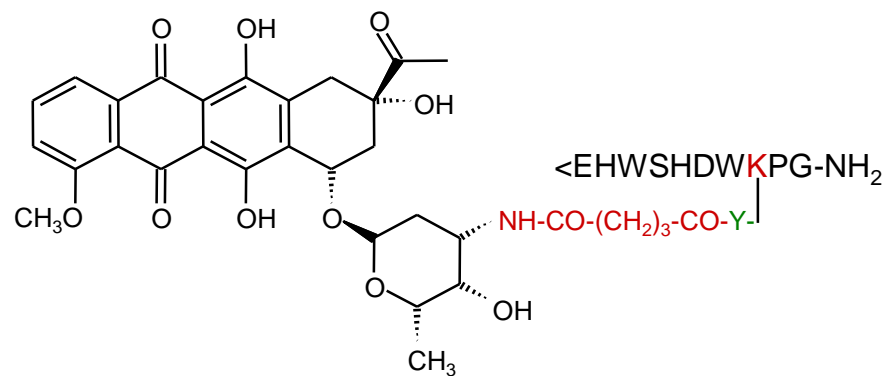
oxim-kötés



hidrazon-kötés

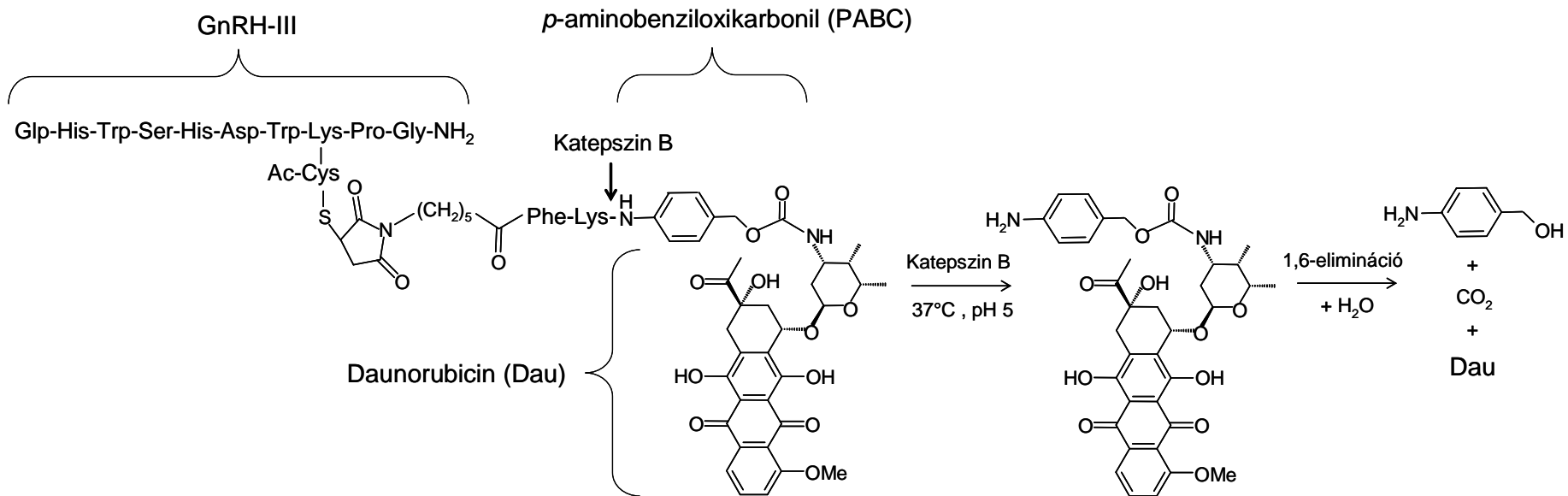


észter-kötés



amid-kötés

# PABC spacer tartalmazó konjugátum lebomlása Katepszin B enzim hatására





# ***A szabad Dau és hatóanyag - GnRH-III konjugátumok in vitro citosztatikus hatása MCF-7 and HT-29 tumorsejtvonalakon***

<b>Vegyület</b>	<b>Citosztázis (MCF-7) IC<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>Citosztázis (HT-29) IC<sub>50</sub> (µM)</b>
<b>Daunorubicin</b>	<b>0,4 ± 0,1</b>	<b>0,3 ± 0,2</b>
<b>Dau-GnRH-III (hidrazon)</b>	<b>0,5 ± 0,2</b>	<b>2,4 ± 0,5</b>
<b>Dau-PABC-GnRH-III</b>	<b>0,4 ± 0,0</b>	<b>1,7 ± 0,2</b>
<b>Dox-GnRH-III (észter)</b>	<b>0,1 ± 0,1</b>	<b>2,4 ± 0,2</b>
<b>Dox-[D-<sup>6</sup>Lys]-GnRH-I (észter)</b>	<b>0,2 ± 0,1</b>	<b>1,9 ± 0,3</b>
<b>Dau-GnRH-III (amid)</b>	<b>&gt; 100</b>	<b>&gt; 100</b>

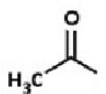
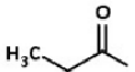
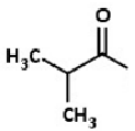
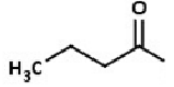
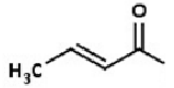
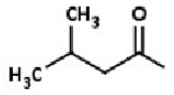
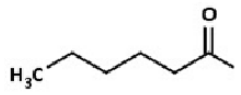
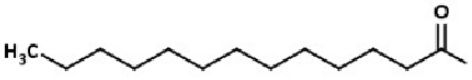
Az *in vitro* citosztatikus hatást (IC<sub>50</sub> értékek) MTT teszttel mértük.

MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

Mező, G. et al. (2008) Curr. Med. Chem., 15(23):2366-2379;  
Szabó, I et al. (2009) Bioconjug. Chem., 20(4):656-665;  
Orbán, E. et al. (2010), Amino Acids, 41(2), 469-483;  
Schlage, P. et al. (2011) J. Control. Release 156(2), 170–178.

# Daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok rövidszénláncú zsírsavakkal



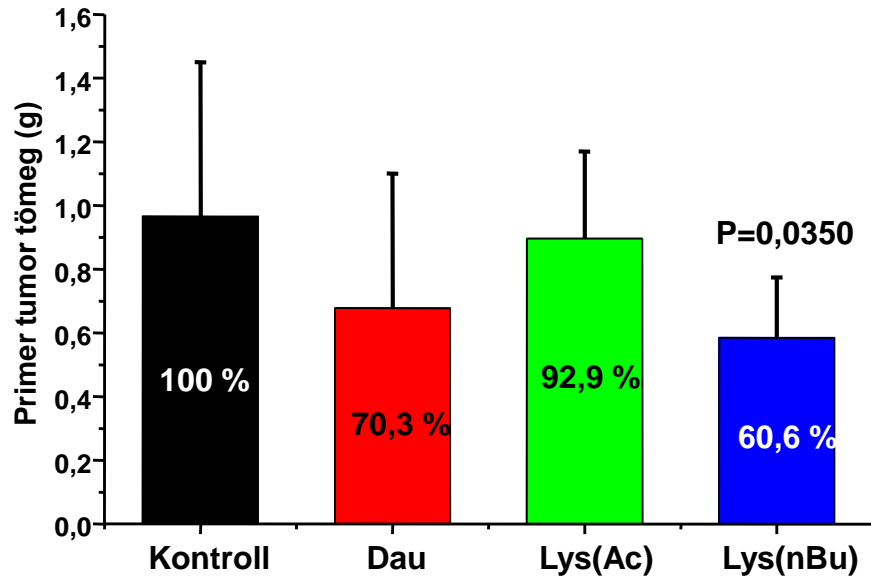
X=	Chemical structure	Abbreviation	Name	Enzim stabilitás kimotripszin; 6 óra	Citosztázis (IC <sub>50</sub> )		
					MCF-7	HT-29	
		Ac	acetil	44%	3,1±1,7	7,4 ±2,6	
		Pr	propionil	55%	3,6±0,7	17,2±2,9	
kimagasló sejtfelvétel	{		<i>i</i> Bu	<i>izo</i> -butiril	10%	2,2±0,0	2,0±0,6
			<i>n</i> Bu	butiril	64%	0,7±0,2	2,2±0,6
		CA	krotonil	50%	1,6±0,2	13,6±4,2	
		<i>i</i> VA	<i>izo</i> -valeril	66%	2,5±0,5	16,4±4,5	
		Hex	hexanoil	70%	1,5±0,4	20,1±4,2	
		Myr	mirisztoil	n.a.	6,8±2,9	37,4±1,0	

Manea, M. et al. (2011) *Bioconjug. Chem.* 22(7):1320-1329

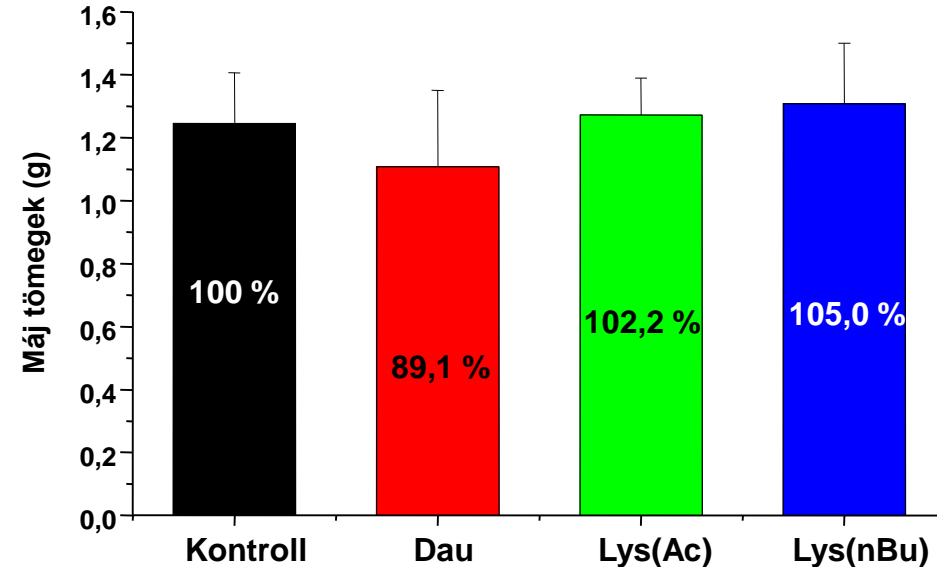
Hegedüs, R. et al. (2012) *Eur. J. Med. Chem.* 56(10):155-165

# Dau-GnRH-III konjugátumok antitumor hatása orthotopikus HT-29 vastagbél modellen

Tumorok tömege a terminálás napján (50. nap)



Máj tömegek a terminálás napján (50. nap)



Daunorubicin: heti egy alkalommal (7x1 mg/ttkg)

Konjugátumok: heti két alkalommal (5x15 mg Dau-tartalom/ttkg, 8x 7,5 mg/ttkg)

**Proliferációs index: konjugátumok (15%-kal csökken), Dau (nincs változás)**

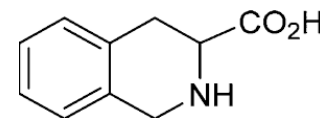
**Vaskularizáció: konjugátumok (30-40%-kal csökken), Dau (12%-kal nő)**

**Metasztázis gátlás: nincs**

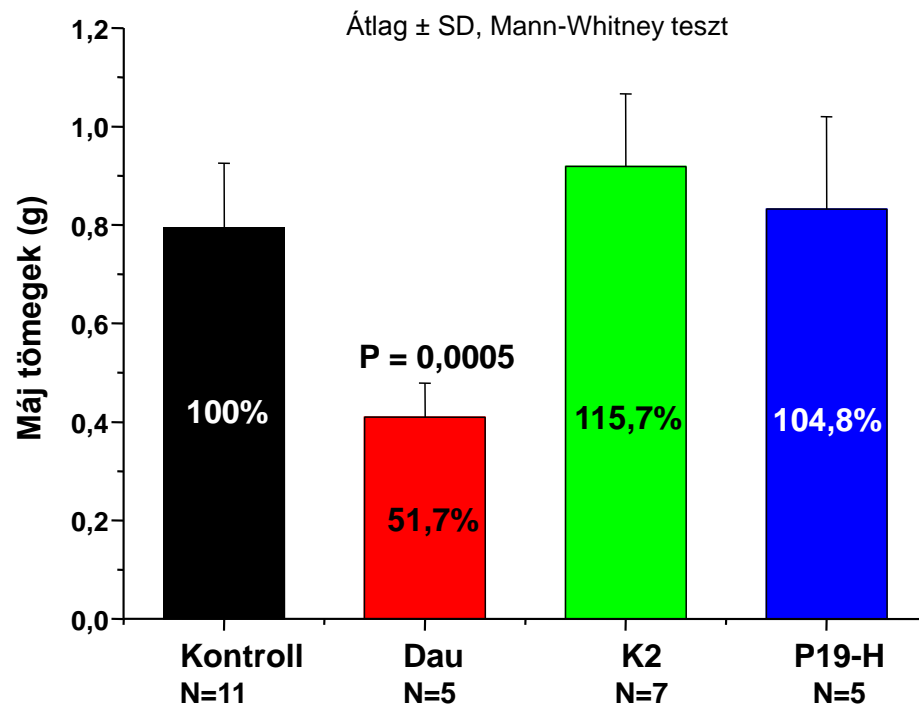
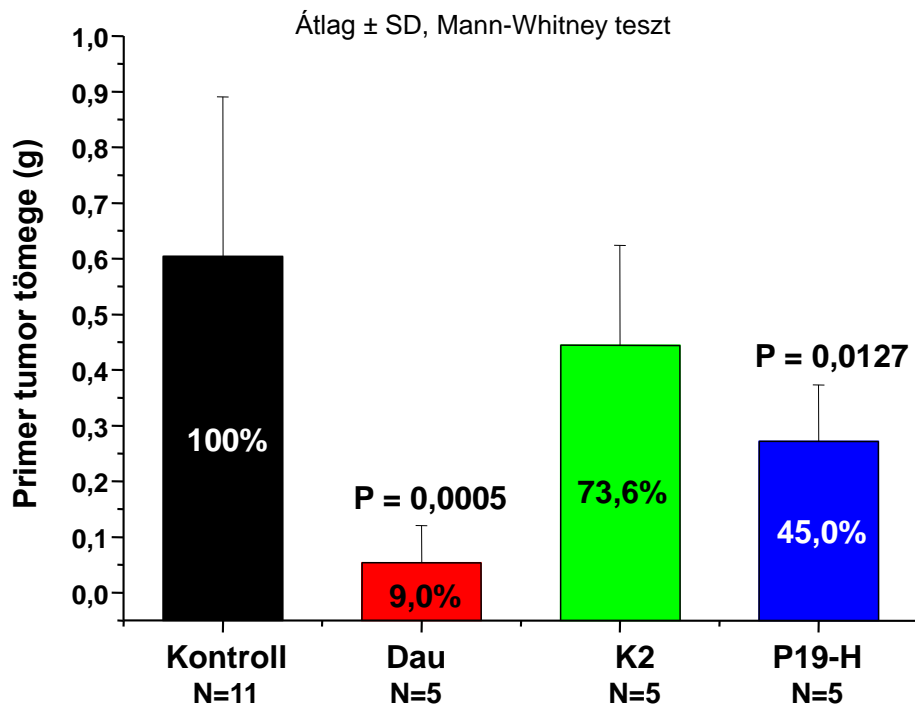
# Új hatékonyabb GnRH-III – daunomicin konjugátum

K2: Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

P19-H: Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>



1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-3-karbonsav (Tic)



Terminálás a tumor transzplantációt követő 34. napon

A Dau csoportot előbb - a 30. napon - kellett terminálni

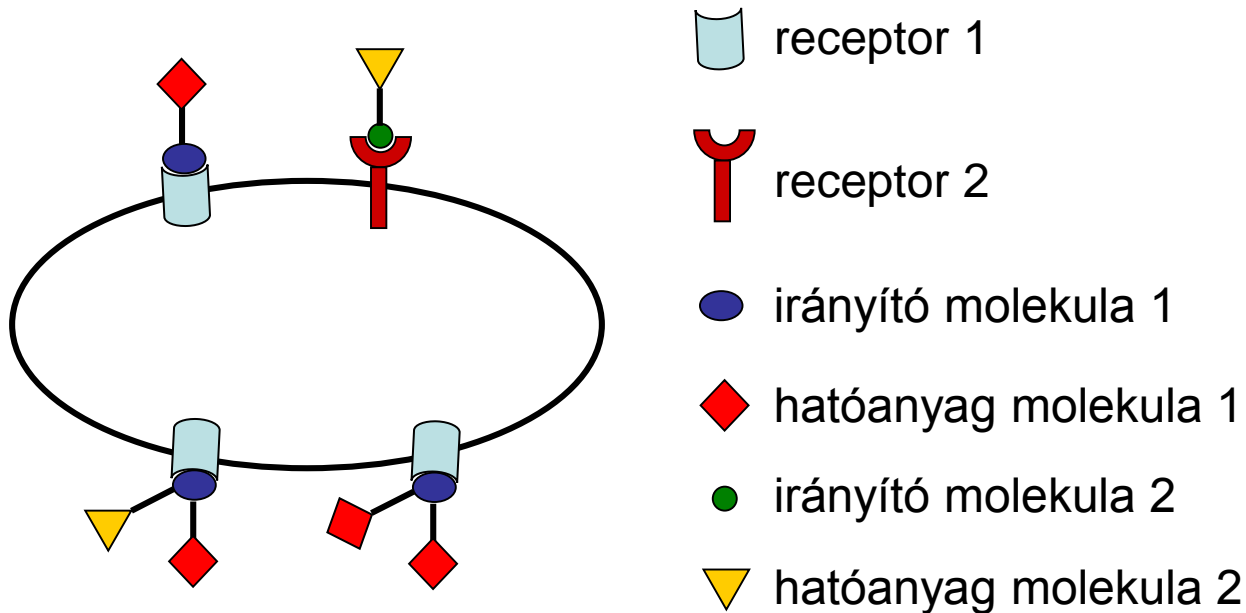
# Hogyan növelhető a hatóanyag – peptid konjugátumok hatása?

## **Korlátok:**

- A receptorok száma a tumorsejteken limitált.
- Ezért a biokonjugátumok mennyiségének növelése önmagában nem megoldás.

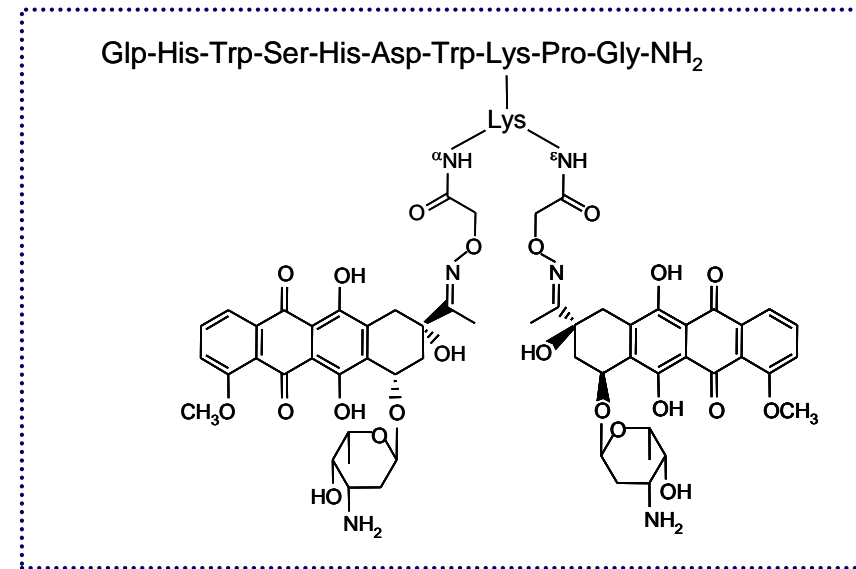
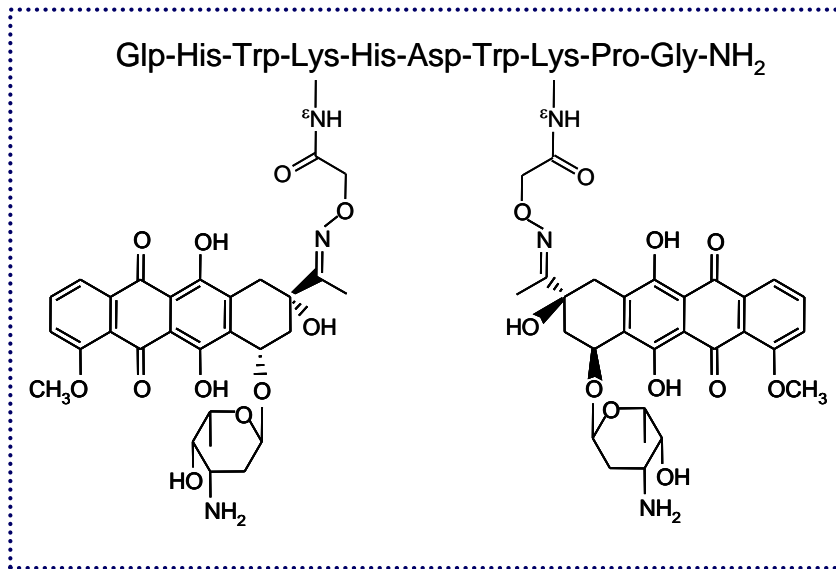
## **Lehetséges megoldások:**

- Azonos vagy különböző hatóanyagok kapcsolása egy irányító molekulához.
- Több különböző receptoron keresztül történő sejtbe juttatás két vagy több hatóanyag – irányító molekula konstrukcióval.



# Biokonjugátum tervezés

➔ biokonjugátumok két azonos tumorellenes hatóanyaggal

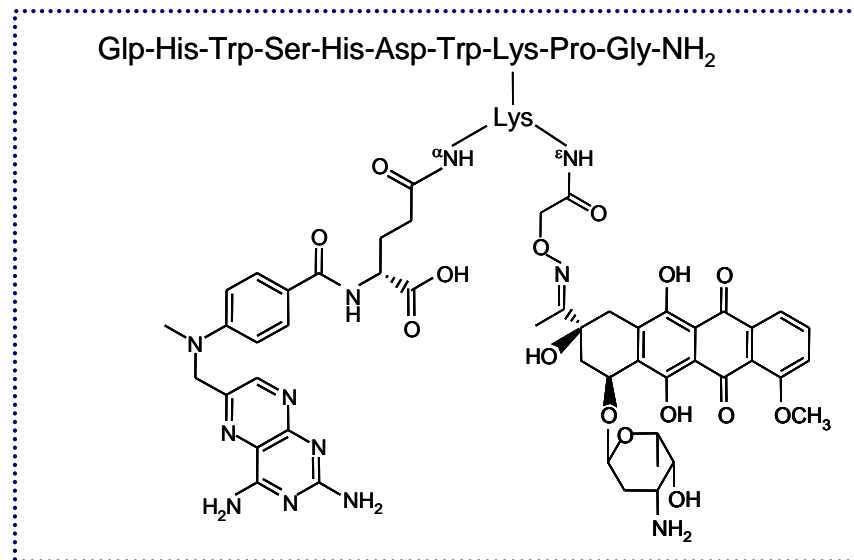
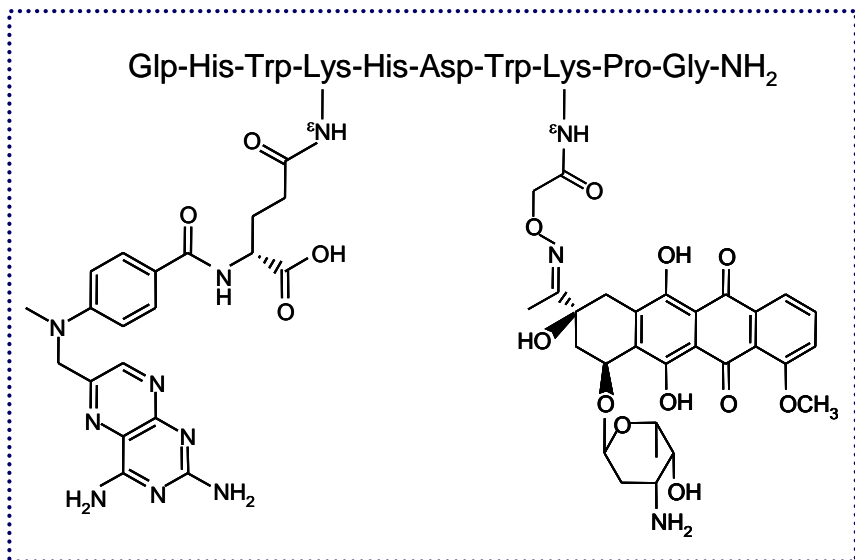


Anyagok	MCF-7 IC <sub>50</sub> [μM]	HT-29 IC <sub>50</sub> [μM]	LNCaP IC <sub>50</sub> [μM]
Daunorubicin	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1
GnRH-III[ <sup>4,8</sup> Lys(Dau=Aoa)]	2,9 ± 0,9	6,8 ± 1,0	4,9 ± 0,3
GnRH-III[ <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))]	3,0 ± 0,4	5,6 ± 2,0	3,8 ± 1,6
GnRH-III[ <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa)]	6,7 ± 1,9	29,9 ± 0,6	15,2 ± 2,4

Leurs, U. et al. (2012) Biopolymers Pept. Sci. 98:1–10

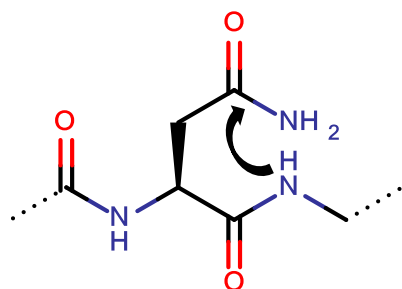
# Biokonjugátum tervezés

➔ biokonjugátumok két különböző tumorellenes hatóanyaggal



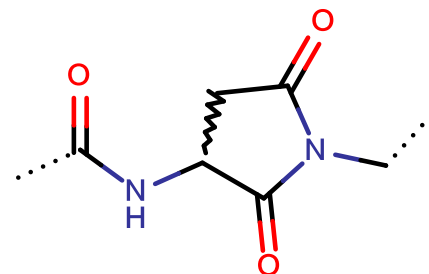
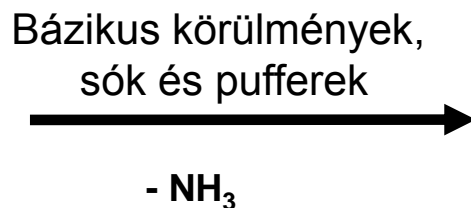
Anyagok	MCF-7 IC <sub>50</sub> [μM]	LNCaP IC <sub>50</sub> [μM]	HT-29 IC <sub>50</sub> [μM]
Daunorubicin	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2
Methotrexate	n,d,	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,6
GnRH-III[ <sup>4</sup> Lys(MTX), <sup>8</sup> Lys(Ac)]	> 50	> 50	> 50
GnRH-III[ <sup>4</sup> Lys(MTX), <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa)]	5,8 ± 1,1	28,8 ± 4,7	3,6 ± 1,5
GnRH-III[ <sup>8</sup> Lys(MTX-Lys(Dau=Aoa))]	5,4 ± 0,7	11,3 ± 0,5	5,6 ± 3,0
GnRH-III[ <sup>8</sup> Lys(Dau=Aoa)]	6,7 ± 1,9	15,2 ± 2,4	29,9 ± 0,6

# A természet nyújtotta lehetőség (NGR peptidek)

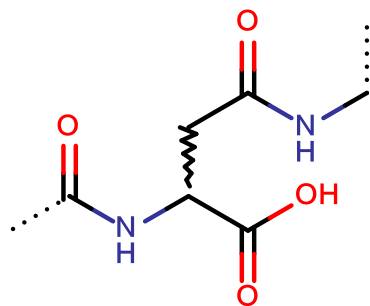


**NGR peptid**  
biológiailag aktív

(CD13 receptorokhoz kötődik)

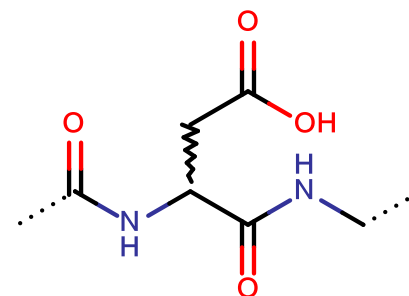


$+ \text{H}_2\text{O}$



**$\beta$ -Asp-peptid (izoAsp)**  
~70%

biológiailag aktív  
(RGD integrin receptorokhoz kötődik)

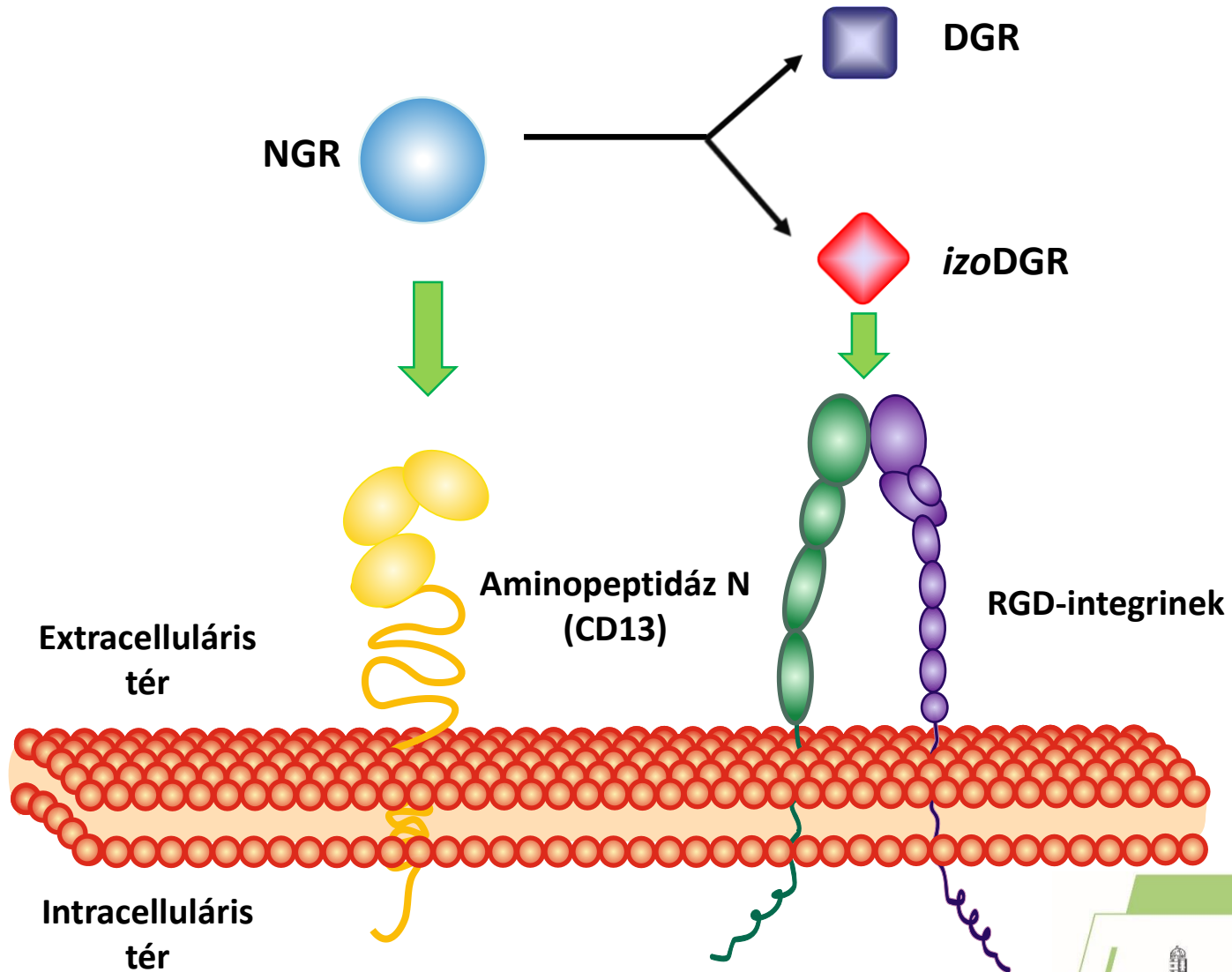


**$\alpha$ -Asp-peptid**  
~30%

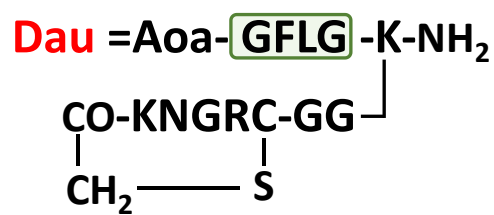
Mindkét receptor típus a neovaszkularizációban, sejt adhézióban, sejt motilitásában, így a metasztázisban játszanak fontos szerepet



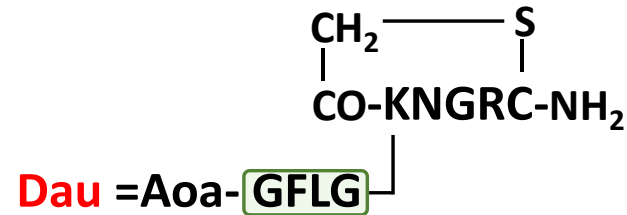
# Egy vegyület két célpont (az NGR peptidek lehetséges célpontjai)



# ***Ciklikus NGR peptid – daunomicin konjugátumok in vitro citotoxikus hatása HT-1080 (CD13 +) fibroszarkoma és HT-29 (CD13 -) vastagbél tumorsejteken***



3,3 ± 0,6 μM (HT-1080)  
5,7 ± 0,9 μM (HT-29)



14,5 ± 2,0 μM (HT-1080)  
>>50 μM (HT-29)



1,4 ± 0,1 μM (HT-1080)  
3,0 ± 0,6 μM (HT-29)



15,8 ± 4,4 μM (HT-1080)  
>>50 μM (HT-29)

**kettős (CD13 és integrin) hatású**

**CD13 specifikus**

# PÁLYÁZATI FELHÍVÁS

## NEMZETI VERSENYKÉPESSÉGI ÉS KIVÁLÓSÁGI PROGRAM

**KÓDSZÁM: NVKP\_16**

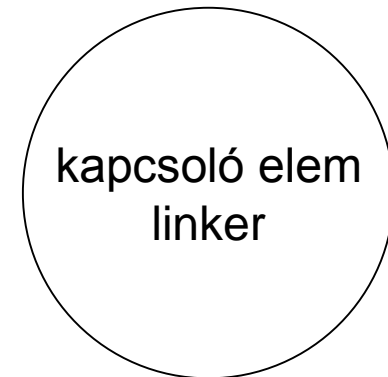
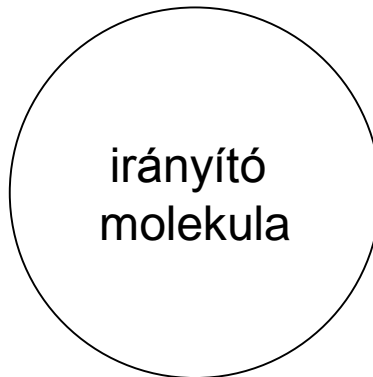
„A” alprogram (Kiemelkedő halálozási kockázattal járó betegségek gyógyításának eredményességét lényegesen javító nemzeti program)

„B” alprogram (Anyagtudományi, technológia nemzeti program)

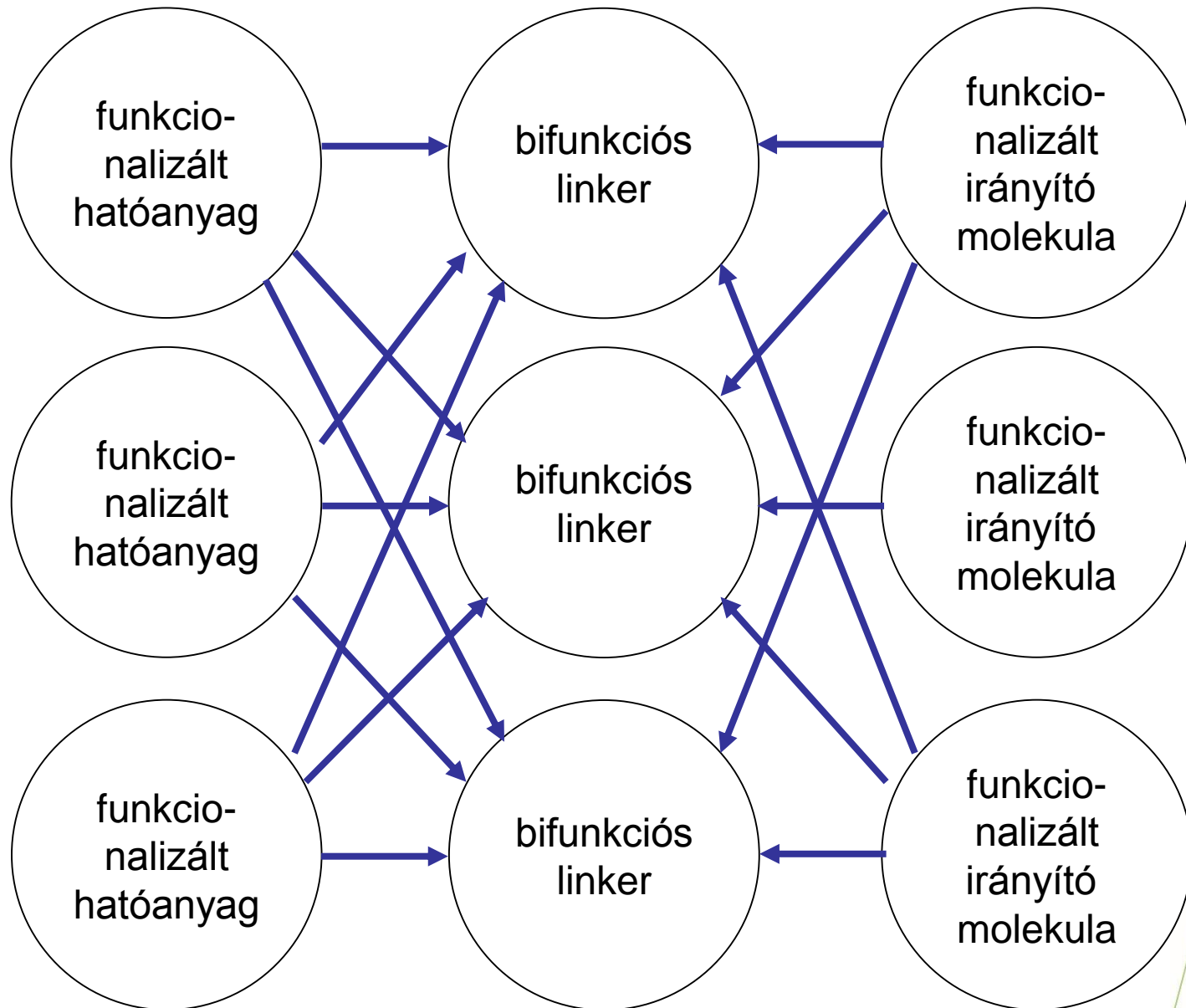
„C” alprogram (Víz-egészség-élelmiszer nemzeti program)

# A projekt célja

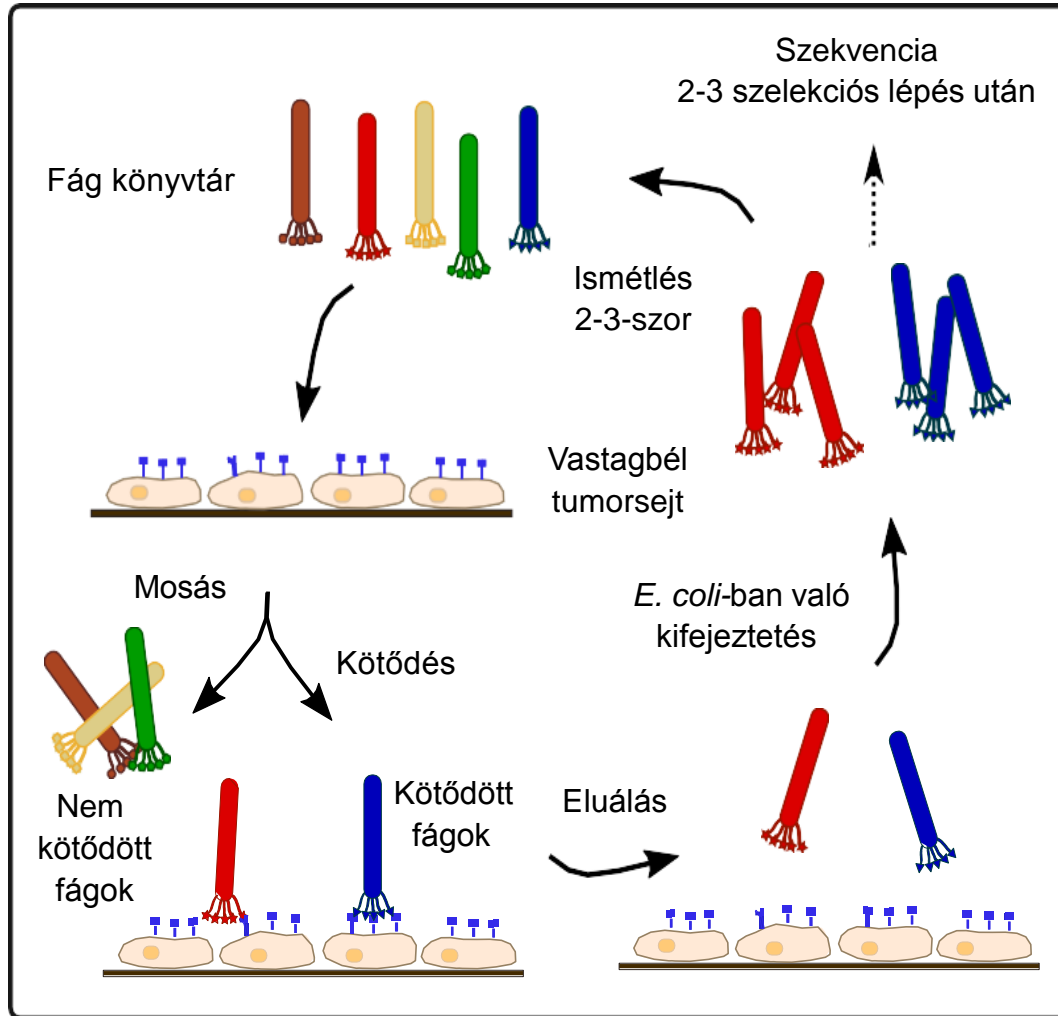
- Kiemelkedő halálozási kockázattal járó betegségek gyógyításának eredményességét lényegesen javító nemzeti program
- Hazánk versenyképességének szempontjából *stratégiai jelentőségű kutatás-fejlesztési és innovációs* tevékenységeket, illetve az azok keretében *jelentős szellemi hozzáadott értéket tartalmazó piacképes termékek, szolgáltatások, technológiák létrehozását* támogatja
- Célzott tumorterápia



Vegyülettárak, amelyek számos, nagy variációs lehetőséget tartalmazó modult tartalmaznak és alkalmasak személyre szabott, illetve kombinációs célzott tumorterápiára



# Vastagbél tumorsejthez (HT-29) kötődő peptidek kiválasztása fág-bemutató technikával



VHLGYAT  
kiválasztott peptid

Dau=Aoa-VHLGYAT-NH<sub>2</sub>

Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH<sub>2</sub>

Dau=Aoa-GFLG-VHLGYAT-NH<sub>2</sub>

Dau: daunomicin

Aoa: aminooxiacetil

GFLG, LRRY:

Katepszin B enzim által hasítható szekvenciák

10<sup>11</sup> fág klón felhasználásával, 50 kiválasztott, amelyek kevés és csak dipeptid szakasz homológiát mutattak

Zhang Y., et al. (2007) *J. Biomol. Screen.* **12**, 429-435

# Hatékonyabb konjugátum kiválasztása Ala-szken majd pozíciós szkennelés segítségével

	V	H	L	G	Y	A	T	50,5 ± 5,5	<p>IC<sub>50</sub> értékek 24 + 48 óra kezelés MTT teszt</p>
	A	H	L	G	Y	A	T	>100	
	V	A	L	G	Y	A	T	26,8 ± 0,4	
Dau=Aoa-LRRY-	V	H	A	G	Y	A	T	>100	
	V	H	L	A	Y	A	T	14,0 ± 1,5	
	V	H	L	G	A	A	T	>100	
	V	H	L	G	Y	A	A	60,9 ± 3,1	
	V	H	L	A	Y	A	T	27,9 ± 6,4	
	V	H	L	K	Y	A	T	50,3 ± 3,0	
	V	H	L	E	Y	A	T	29,5 ± 6,2	
	V	H	L	L	Y	A	T	7,5 ± 3,5	
Dau=Aoa-LRRY-	V	H	L	F	Y	A	T	6,6 ± 2,9	
	V	H	L	S	Y	A	T	24,8 ± 7,4	
	V	H	L	T	Y	A	T	21,7 ± 6,5	
	V	H	L	N	Y	A	T	28,0 ± 19,4	
	V	H	L	P	Y	A	T	>50	

# Konjugátumok sejt felvételének vizsgálata fluoreszcens mikroszkóppal

Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH<sub>2</sub>

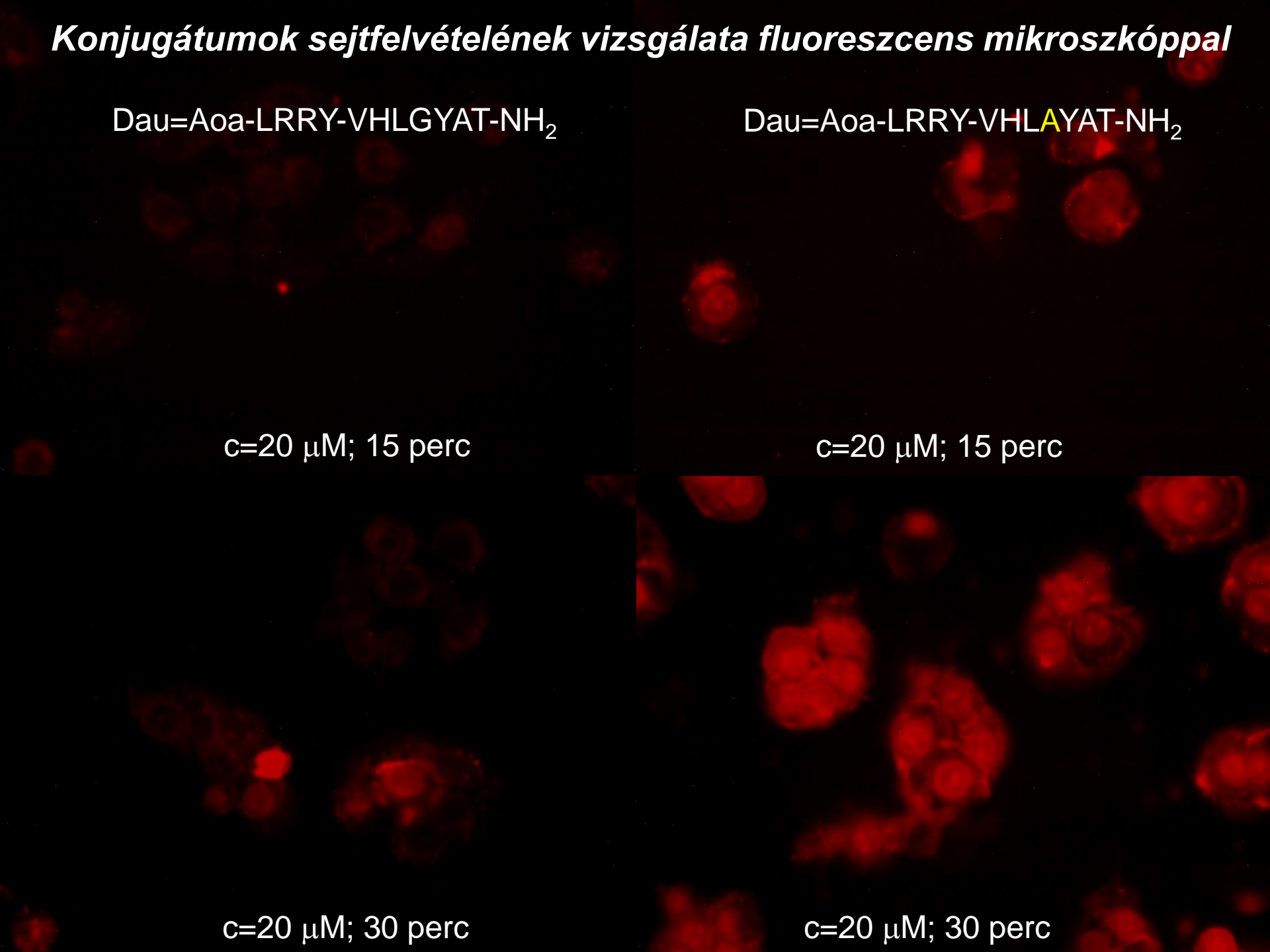
Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH<sub>2</sub>

c=20 μM; 15 perc

c=20 μM; 15 perc

c=20 μM; 30 perc

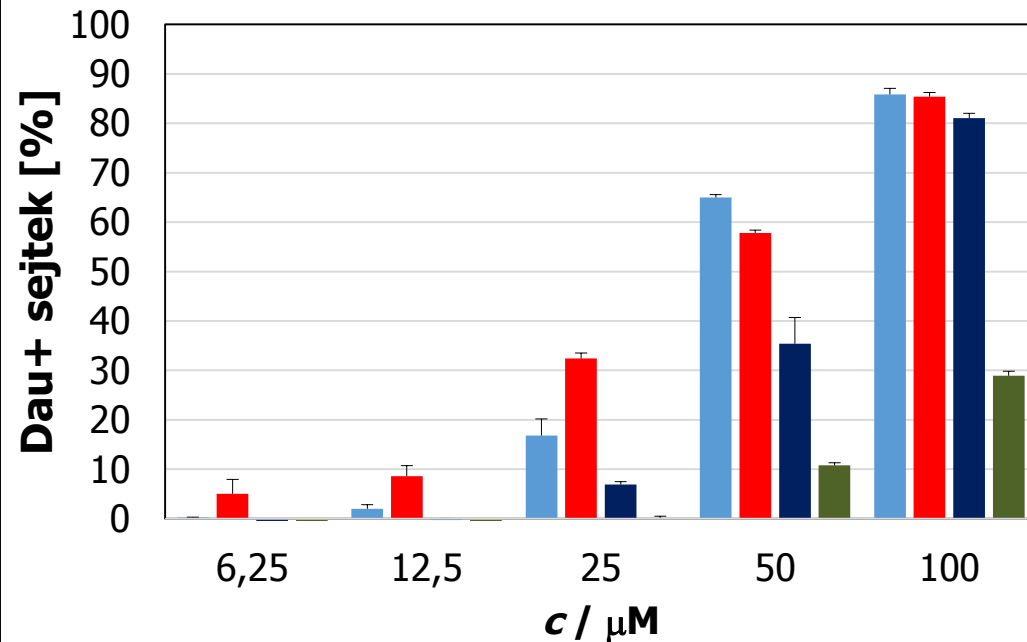
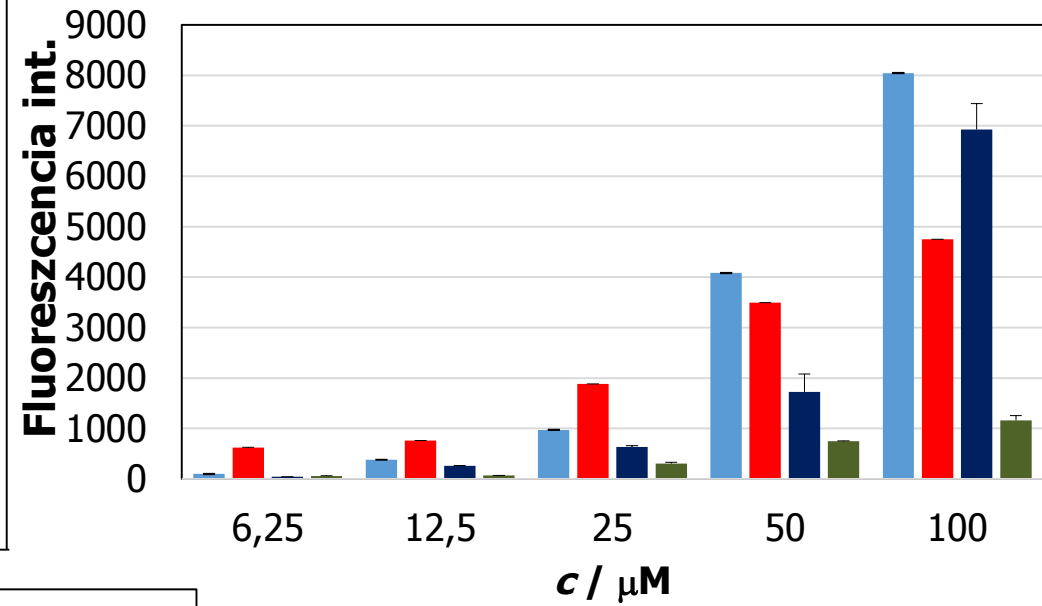
c=20 μM; 30 perc



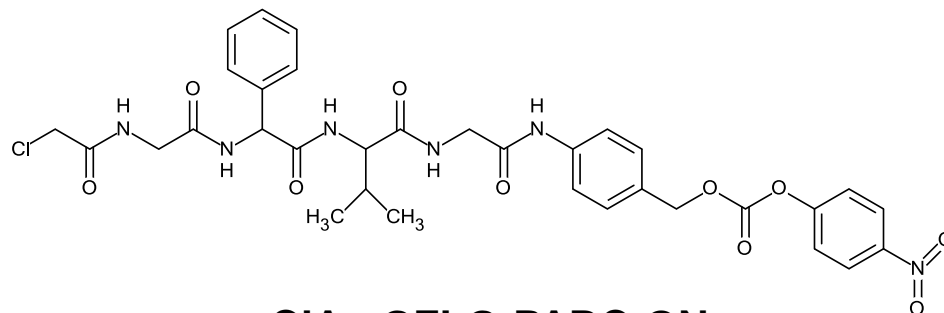


# *In vitro* sejtbejutási vizsgálatok áramlási citométerrel

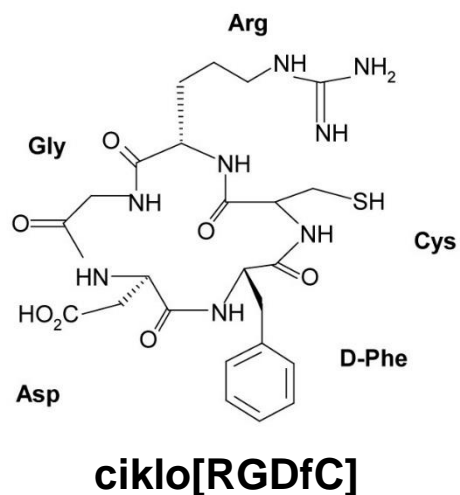
- Dau=Aoa-LRRY-VHLA<sub>Y</sub>AT-NH<sub>2</sub>
- Dau=Aoa-LRRY-VHLY<sub>F</sub>AT-NH<sub>2</sub>
- Dau=Aoa-LRRY-VHLS<sub>Y</sub>AT-NH<sub>2</sub>
- Dau=Aoa-LRRY-VHLP<sub>Y</sub>AT-NH<sub>2</sub>



# „Egy üst” reakcióban kialakított konjugátum

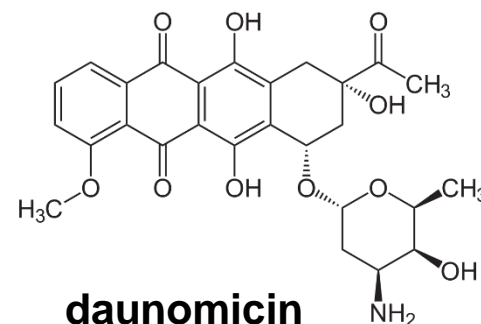


**CIAC-GFLG-PABC-ONp**

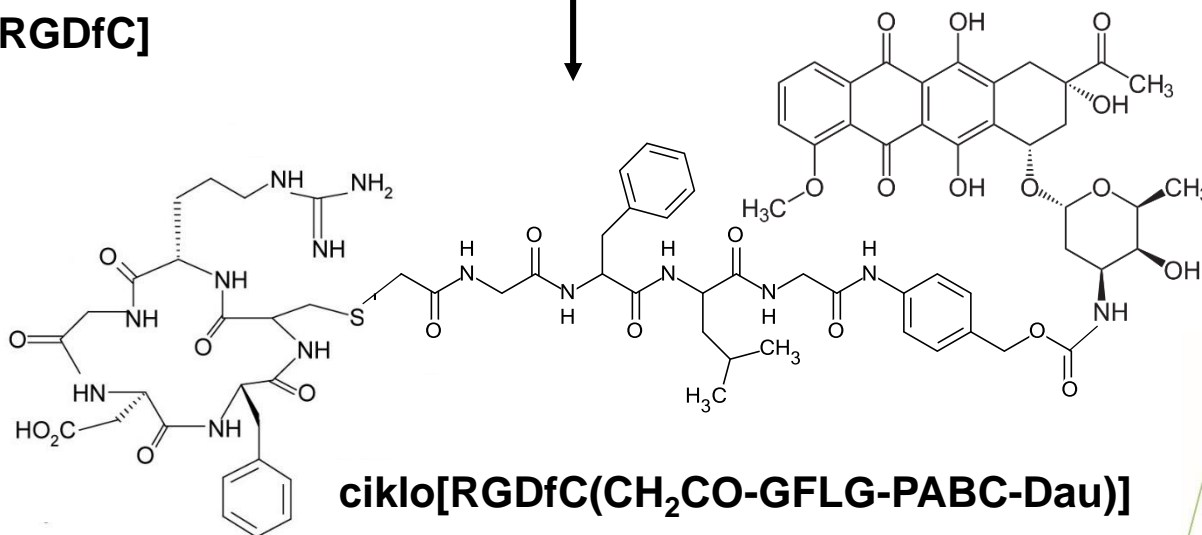


**ciklo[RGDfC]**

DMF - 0,1 M Tris puffer  
8:2 (V/V)  
pH 8, szobahő, 5 óra



**daunomicin**



**ciklo[RGDfC(CH<sub>2</sub>CO-GFLG-PABC-Dau)]**

# Támogatók



NK 77485

K 104045

K 119552



MSCA-ITN-2014-ETN:  
Marie Skłodowska-Curie  
Innovative Training Networks (ITN-ETN)



NVKP\_16-1-2016-0036



**MEDINPROT**

Szinergia program  
Műszer pályázat



***Köszönöm a figyelmet!***