



Melanoma specifikus peptidkonjugátumok *kihívások, nehézségek, sikerek*

Szabó Ildikó¹, Bösze Szilvia¹, Ivan Randelović², Tóvári József²,
Mező Gábor¹

¹MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

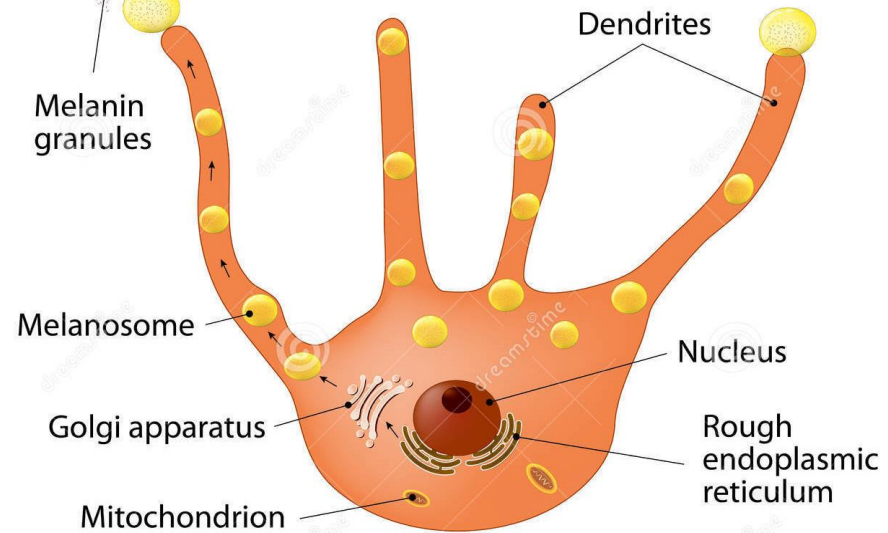
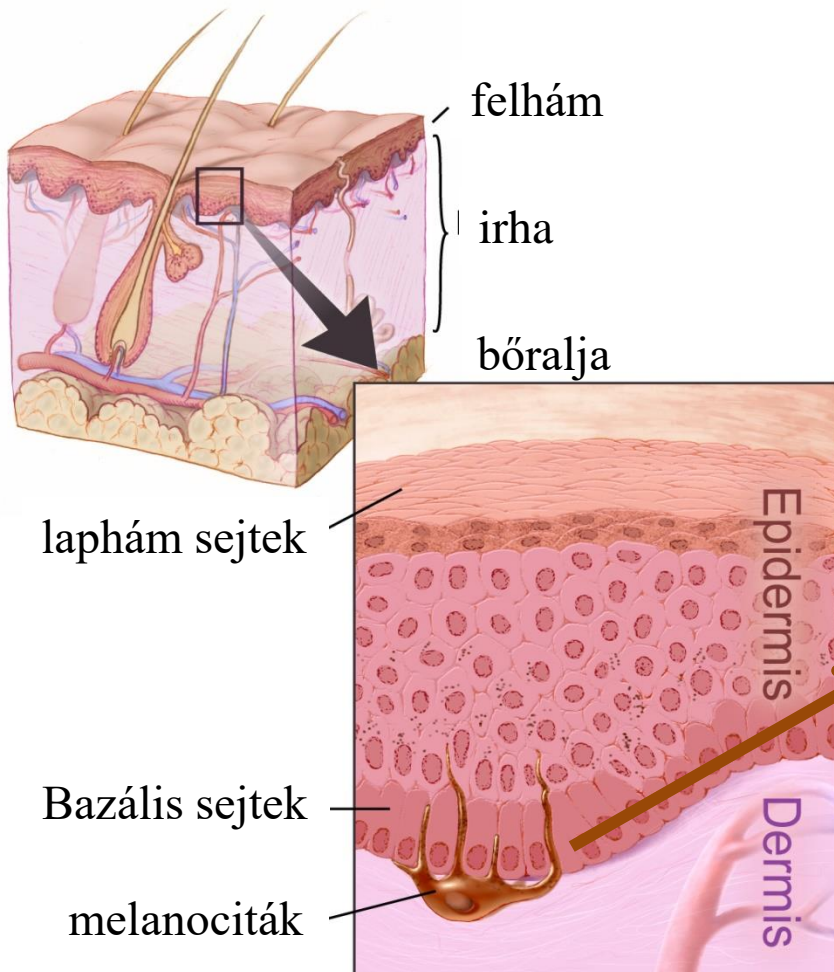
² Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály

Peptidkémiai Munkabizottság tudományos ülése

Balatonszemes

2019. 05. 28.

A bőr felépítése



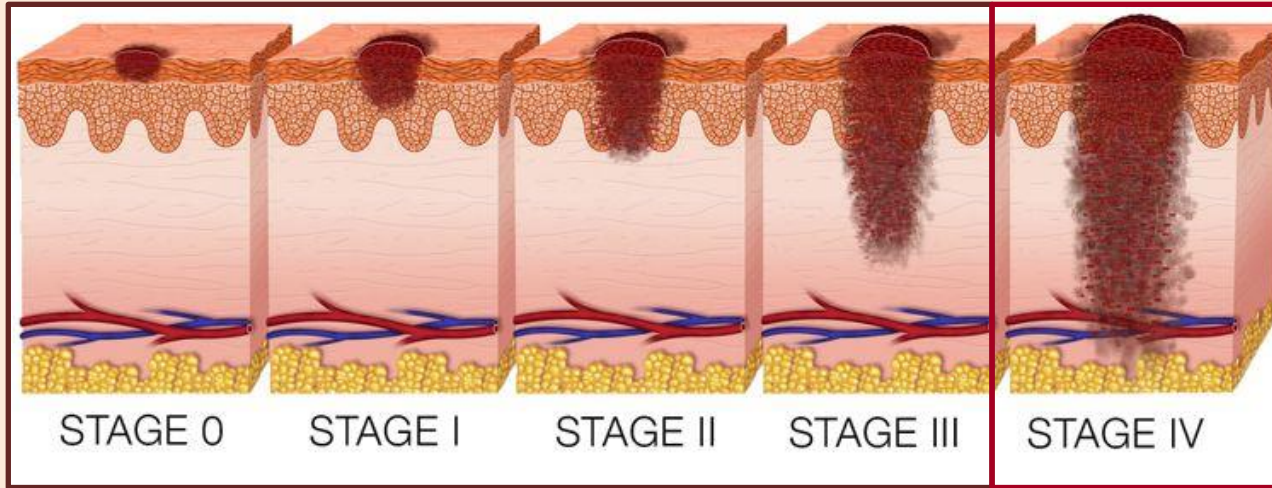
<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-melanocyte-melanin-melanogenesis-melanin-producing-cells-melanin-pigment-responsible-skin-color-image54608996>

National Cancer Institute

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Layers_of_the_skin.jpg










Melanoma

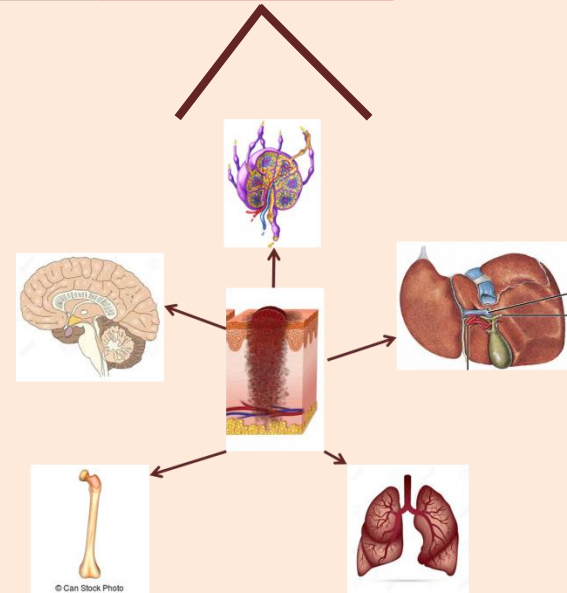
Jó prognózis



Metasztázis,
kezelés!!!

Forrás: <https://www.wellnesscommunitydc.org/skin-cancer-stages/>

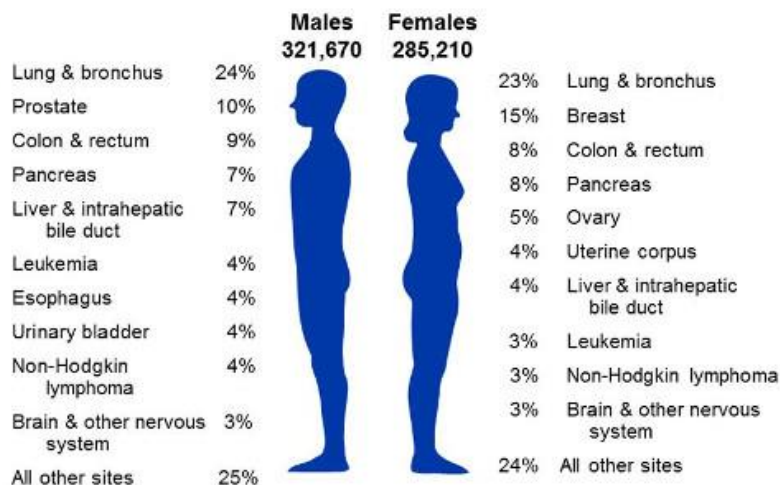
Jóindulatú		Roszzindulatú
	A symmetry: One side is different from the other	
	B order is irregular, notched, or blurred	
	C olor is mixed	
	D iameter is larger than 6 millimeters	
M ole E volves over time		
		



Forrás: <https://www.health.harvard.edu/cancer/melanoma-overview>

Melanoma a statisztikák tükrében

Estimated Cancer Deaths in the US in 2019



- Melanoma csupán 1%-a a bőrrák előfordulásának
- Arány egyre nő!!!
 - Napozás
 - öregedő társadalom

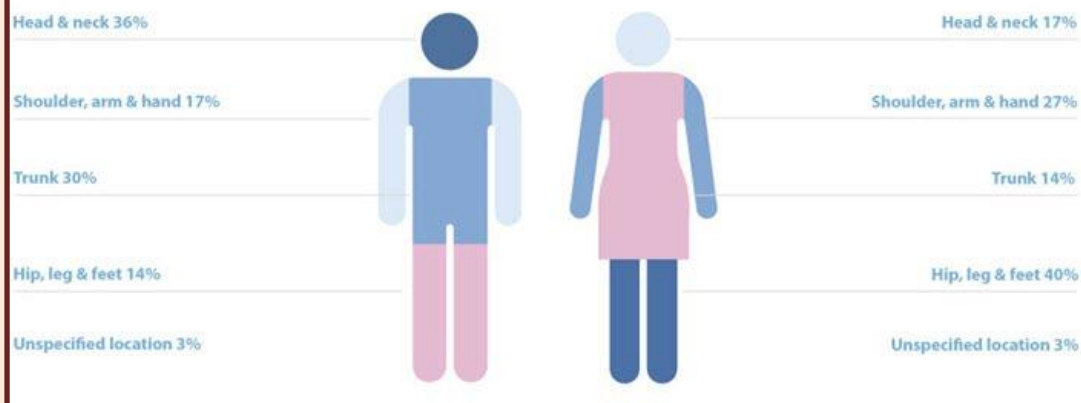
<https://www.mysocietysource.org/Pages/newsdetails.aspx?ItemID=1157>

Napozás jelentősége



UVB sugárzás:

- Leégés
- Bőrrák a direkt DNS károsító hatásán keresztül



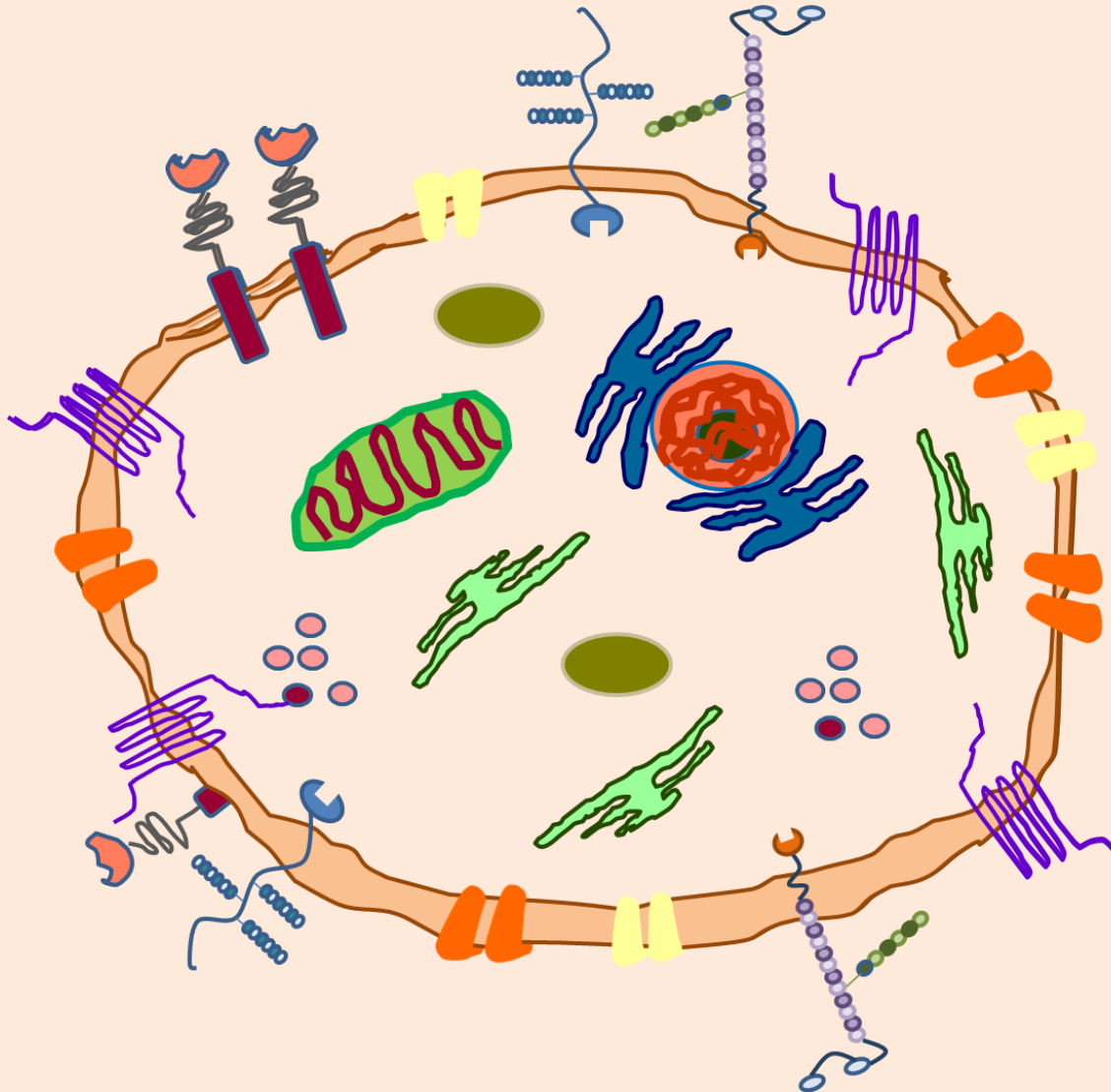
<https://careinthesun.org/skin-cancer/skin-cancer-statistics/>

Melanoma kezelési lehetőségei

- **Sebészeti beavatkozás:**
 - Szövetminta analízise (tumoros vagy nem az elváltozás; milyen mélyre hatolt a bőrszövetbe)
 - Korai stádiumok (stage 0-III; sentinel nyirokcsomó nem érintett) esetén hatékonyan gyógyítható
- **Metasztázis esetén (stage IV):**
 - Egy, vagy több nyirokcsomó érintett → gyors áttétképzés
 - Kemoterápia, immunterápia
 - DE a teljes gyógyulás esélye igen csekély

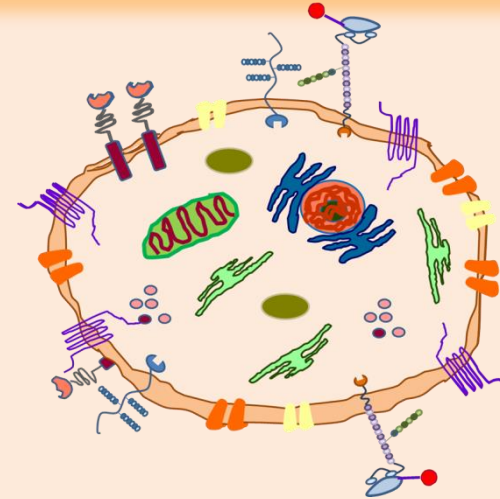
Melanoma specifikus célpontok

Milyen lehetőségeink vannak sejtszinten?



MCSP/CSPG4/NG2... proteoglikán

- Melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan (MCSP)
- I-es típusú transzmembrán proteoglikán
- Melanoma tumorantigén
- Számos fajban igazolták jelenlétét (pl. ember, egér, patkány)



Phage display peptid könyvtár

LTLRWVGLMS (peptid 1)

TAASGVRSMH (peptid 2)



Nagy affinitással és specificitással kötődik az NG2 proteoglikánhoz

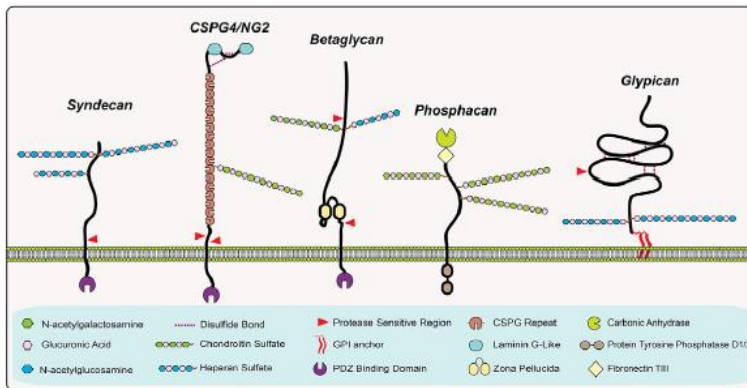
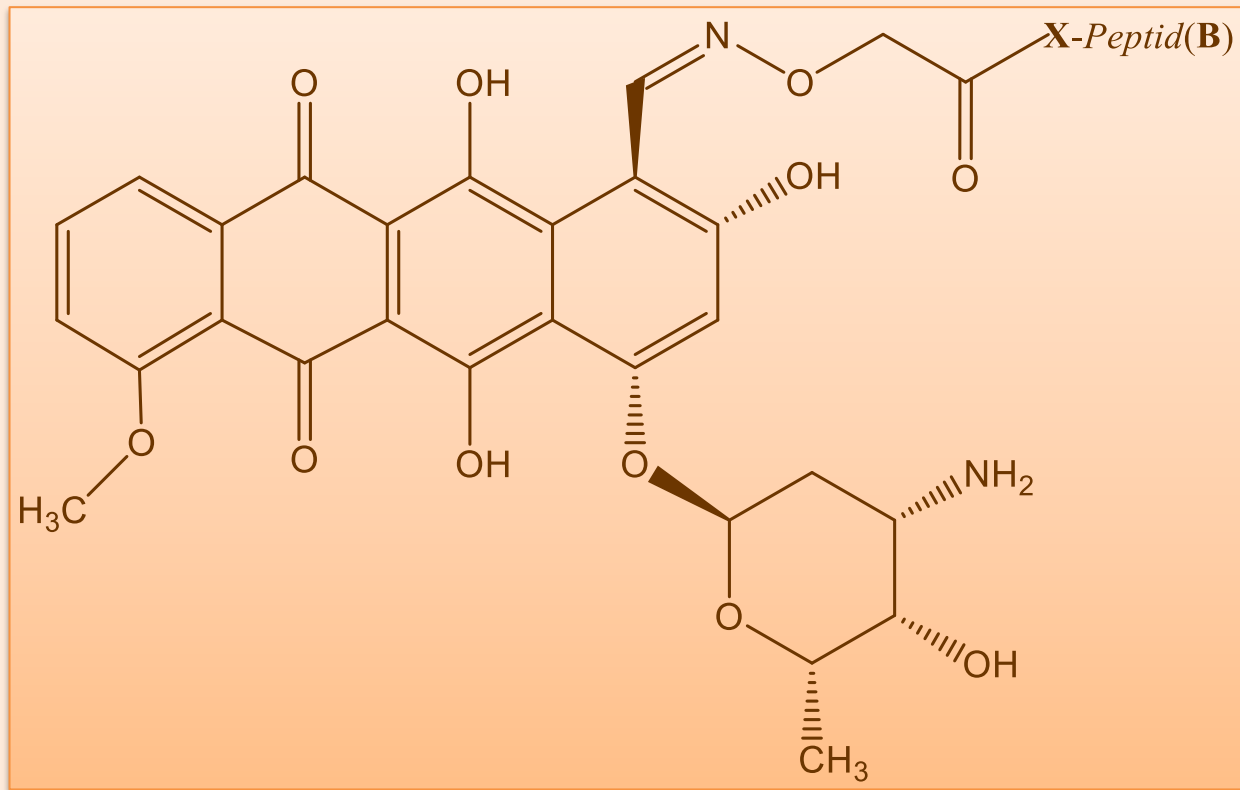


Fig. 2. Schematic representation of the cell surface proteoglycans, which comprise transmembrane type I (the N-terminus is outside of the plasma membrane) proteoglycans (four syndecans, CSPG4/NG2, betaglycan and phosphacan) and six GPI-anchored proteoglycans, glypicans 1–6. The type of GAG chain and the major protease sensitive sites are indicated. The key for the various modules is provided in the bottom panel.

Célkitűzés I.

NG2 specifikus peptidkonjugátumok



X: GFLG vagy ø

Peptid: LTLRWVGLMS vagy TAASGVRSMH

B: Met vagy Nle

NG2 specifikus peptidkonjugátumok analitikai jellemzése

	Konjugátumok	t_R (perc) ^a	M_{calc}	$M_{mért}^b$
Szl-1	Dau=Aoa-TAASGVRSMH-NH ₂	10,6	1596,6	1596,5
Szl-10	Dau=Aoa-GFLG-TAASGVRSMH-NH ₂	13,5	1970,5	1970,9
Szl-2	Dau=Aoa-LTLRWVGLMS-NH ₂	14,4	1756,1	1756,2
	Dau=Aoa-GFLG-LTLRWVGLMS-NH ₂	-	2130,8	-
Szl-3	Dau=Aoa-TAASGVRSNleH-NH ₂	13,9	1578,1	1578,8
Szl-4	Dau=Aoa-GFLG-TAASGVRSNleH-NH ₂	13,7	1952,5	1953,1
Szl-5	Dau=Aoa-LTLRWVGLNleS-NH ₂	15,1	1737,5	1737,2
Szl-6	Dau=Aoa-GFLG-LTLRWVGLNleS-NH ₂	18,1	2112,3	2112,4

^a Analitikai RP-HPLC, Agilent Eclipse XDB C8, 5 µm, 80Å, 4,6 x 150 mm, HPLC oszlop, gradiens: 5% B, 2 perc; 5-100% B, 20 perc.

^b Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ion csapda tömegspektrométer. Spectrumok felvétele: 50–2000 m/z tartományban

NG2 specifikus peptidkonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatása

		IC ₅₀ (μM) (μM)	
		A2058	A431
Szl-1	Dau=Aoa-TAASGVRSMH-NH ₂	62,8±22,1*	
Szl -2	Dau=Aoa-LTLRWVGLMS-NH ₂	4,3±1,9	14,0±0,0
Szl -3	Dau=Aoa- TAASGVRSNleH-NH ₂	22,1 és >100*	
Szl -4	Dau=Aoa- GFLG-TAASGVRSNleH-NH ₂	2,3±1,3	1,2±0,5
Szl -5	Dau=Aoa-LTLRWVGLNleS-NH ₂	17,5±3,3	
Szl -6	Dau=Aoa-GFLG-LTLRWVGLNleS-NH ₂	26,5±17,6*	
Szl -10	Dau=Aoa-GFLG-TAASGVRSMH-NH ₂	5,2±2,4	
Dau	Dau·HCl	<0,16	

Kezelési körülmények: ON kezelés, 37°C, MTT-teszt

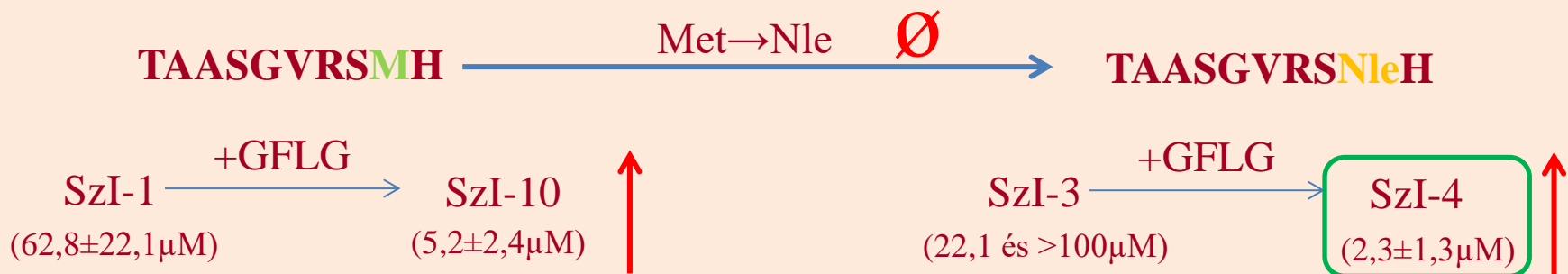
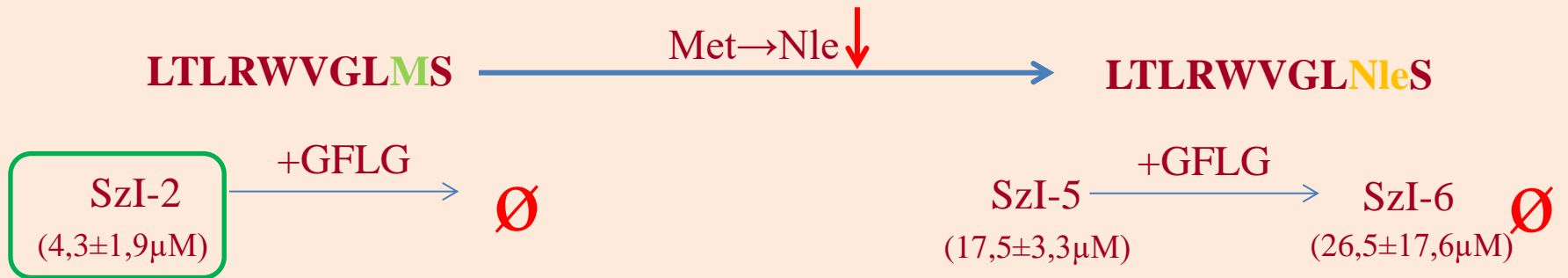
A2058 (ATCC CRL-11147) humán melanoma sejt kultúra

A431 (ATCC CRL-1555) humán epidermoid karcinóma

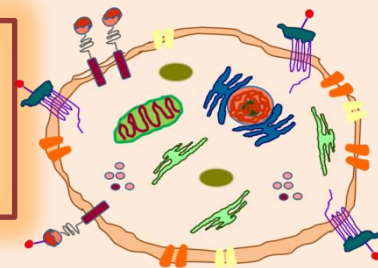
* Oldódási probléma

Konklúzió I.

Szerkezet-hatás összefüggés

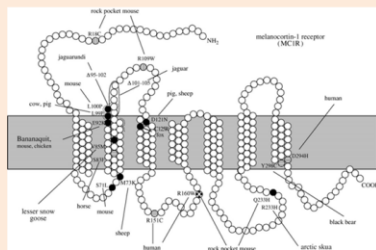


Melanoma specifikus célpontok sejtfelszíni receptorok



Melanocortin-1 receptor (MC1R)

- GPCR; 5 altípus
- MC1R: melanociták és melanoma
- *mc1r* génexpresszió primer és metasztatikus melanomában



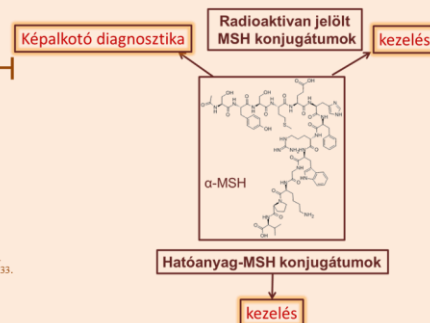
<http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/272/1573/1633>

Chhajlani, V. *et al* FEBS Lett. (1992) **309**,417-420
Gantz, I. *et al* J. Biol. Chem. (1993) **268**, 8246-8250
Schwahn, D.J. *et al* Pigment Cell Res (2001) **14**, 32-39

Roberts, D.W. *et al* Pigment Cell Res (2006) **19**, 76-89
Salazar-Onfray, F. *et al* Br. J. Cancer (1993) **87**, 414-422

α -Melanocita Stimuláló Hormon (α -MSH)

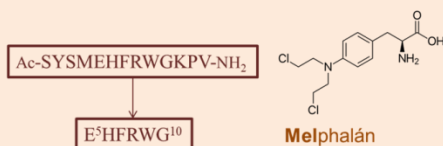
- Ac-SYSMEHFRWGKPV-NH₂
- melanoma tumor >80%-a α -MSH receptor pozitív
- [Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH:
 - fokozott stabilitás
 - receptor affinitás



Siegrist, W. *et al*. (1989) Cancer Res. **49**, 6352-6358. Sawyer, T.K. *et al*. (1986) PNAS. **77**, 5754-5758.
Tatro, J.D. *et al*. (1990) J Clin Invest. **85**, 1825-1832. Giblin, M.F. *et al*. (1995) PNAS. **95**, 12814-12818.
Cone, R.D. *et al*. Ann NY Acad Sci (1993) **680**, 342-363. Morandini, R. *et al*. (1994) Int J Cancer. **56**, 129-133.

α -MSH mint célbajuttató egység

H. Süli-Vargha; J. Botyánszky; K. Medzihradsky



α -MSH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂													
Pep1	Mel-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OMe												
Pep2	Nle-Glu-His-Mel-Arg-Trp-Gly-OMe												
Pep3					Mel-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂								
Pep4								Mel-Lys-Pro-Val-NH₂					

Pep 1 and 2 refer to central fragments of the hormone, while Pep 3 and 4 refer to the C-terminal ones.

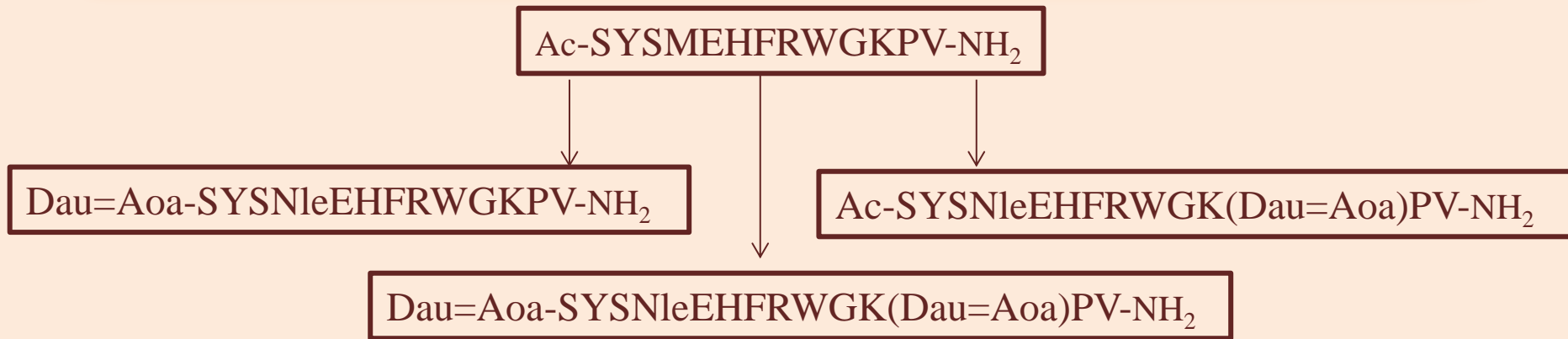
TABLE I - COMPARISON OF IC₅₀ EXPRESSED AS μ G/ML MELPHALAN EQUIVALENT FOR ALL THE CONJUGATES AND THE FREE DRUG ON 3 DIFFERENT CELL LINES

	IC ₅₀ μ g/ml		
	HBL melanoma	F-NBB fibroblasts	Me-180 carcinoma
Pep 1	0.9	6.0	5.2
Pep 2	21.3	> 125	> 125
Pep 3	4.8	45.0	4.6
Pep 4	2.2	45.0	5.2
Melph	0.40	0.9	1.5

- Konjugátum (melfalán-központi régió) szelektív és specifikus citotoxikus hatással bír
- MC1R közvetített hatás

Morandini, R. *et al* Int. J. Cancer (1994) **56**, 129-133

α -MSH konjugátumok és analitikai jellemzésük



Code	Conjugates	t_R (perc) ^a	M_{calc}	$M_{\text{mért}}^b$
Szl-7	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGKPV-NH ₂	12,8	2185,8	2186,1
Szl-8	Ac-SYSNleEHFRWGK(Dau=Aoa)PV-NH ₂	13,1	2228,0	2228,5
Szl-9	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGK(Dau=Aoa)PV-NH ₂	13,0	2768,0	2768,4

^a Analitikai RP-HPLC, Agilent Eclipse XDB C8, 5 μm , 80Å, 4,6 x 150 mm, HPLC oszlop, gradiens: 5% B, 2 perc; 5-100% B, 20 perc.

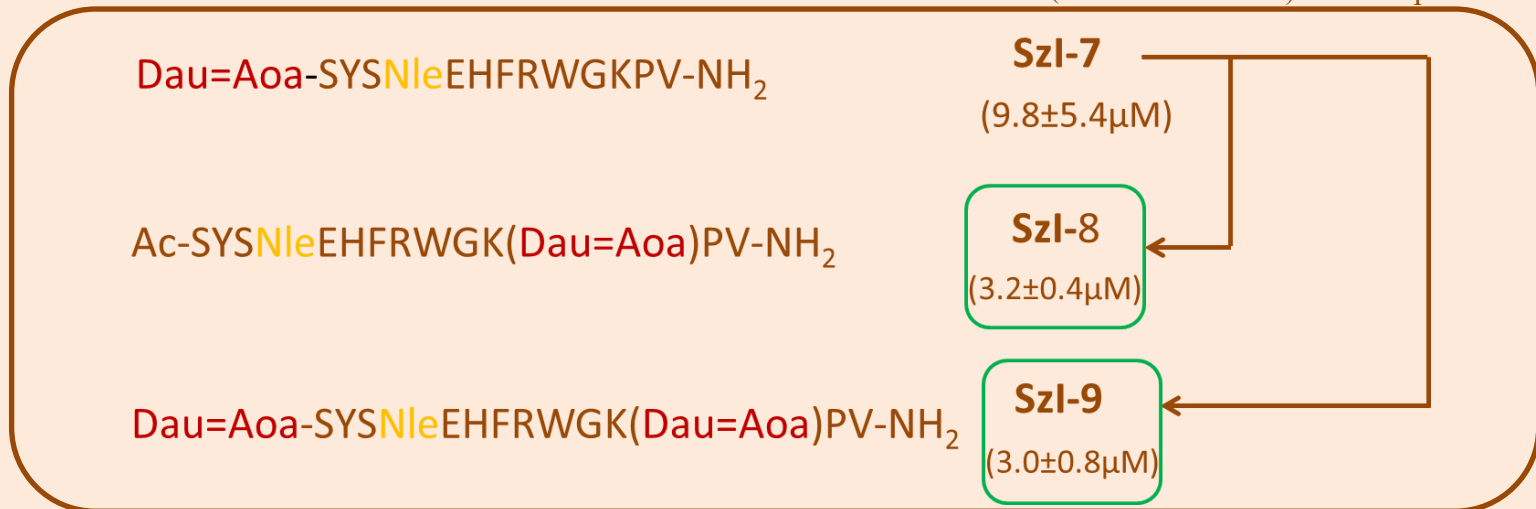
^b Bruker Daltonics Esquire 3000plus (Bremen, Germany) ion csapda tömegspektrométer. Spectrumok felvétele: 50–2000 m/z tartományban

α -MSH peptidkonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatása

		IC ₅₀ (μM)	
		A2058	A431
Szl -7	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGKPV-NH ₂	9,8±5,4	25,0±11,2
Szl -8	Ac-SYSNleEHFRWGK(Dau=Aoa)PV-NH ₂	3,2±0,4	8,8±5,9
Szl -9	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGK(Dau=Aoa)PV-NH ₂	3,0±0,8	16,5±1,6
Dau	Dau·HCl	<0,16	0,5±0,4

Kezelési körülmények: ON kezelés, 37°C, MTT-teszt

A2058 (ATCC CRL-11147) humán melanoma sejt kultúra
A431 (ATCC CRL-1555) humán epidermoid karcinóma



α -MSH peptidkonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatása

		IC ₅₀ (μM)	
		A2058	A431
Szl -7	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGKPV-NH ₂	9,8±5,4	25,0±11,2
Szl -8	Ac-SYSNleEHFRWGK(Dau=Aoa)PV-NH ₂	3,2±0,4	8,8±5,9
Szl -9	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGK(Dau=Aoa)PV-NH ₂	3,0±0,8	16,5±1,6
Dau	Dau·HCl	<0,16	0,5±0,4

Kezelési körülmények: ON kezelés, 37°C, MTT-teszt

A2058 (ATCC CRL-11147) humán melanoma sejt kultúra
A431 (ATCC CRL-1555) humán epidermoid karcinóma

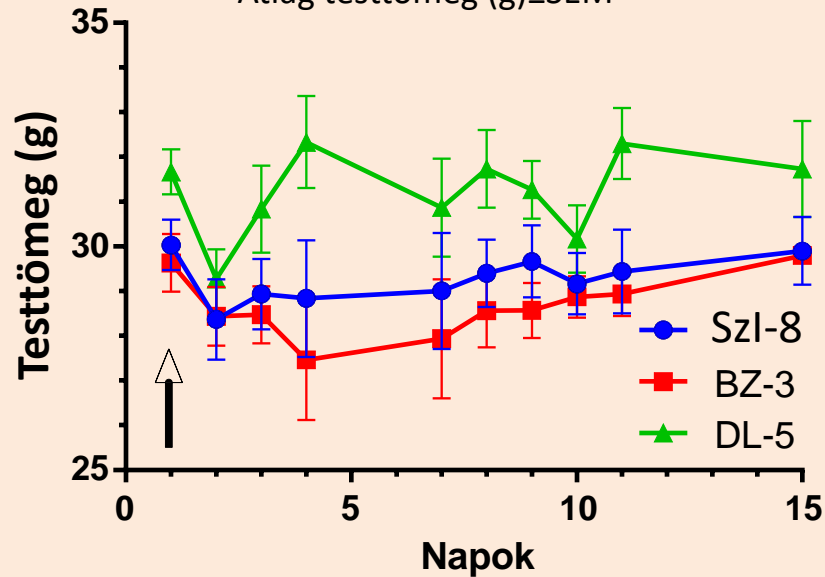
		IC ₅₀ (μM)		
		B16	M24	WM983b
Szl -7	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGKPV-NH ₂	2,9±0,6	12,8±1,6	9,9±1,5
Szl -8	Ac-SYSNleEHFRWGK(Dau=Aoa)PV-NH ₂	2,8±0,7	11,5±0,4	7,9±0,7
Szl -9	Dau=Aoa-SYSNleEHFRWGK(Dau=Aoa)PV-NH ₂	2,0±0,7	11,0±0,8	3,6±0,2

B16 (ATCC CRL-6322) egér melanoma sejt kultúra
M24 (ATCC CRL-12270) humán melanoma sejt kultúra
WM983b humán melanoma sejt kultúra

α -MSH konjugátumok *in vivo* tumorellenes hatása

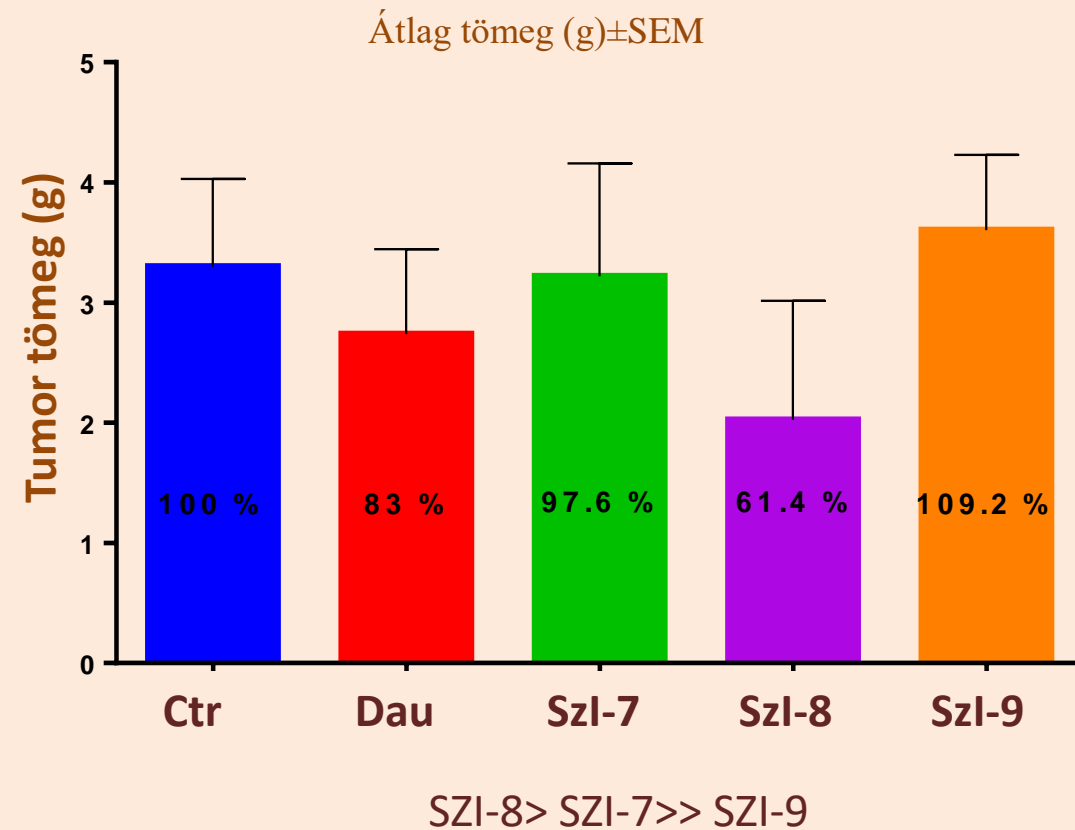
Acut toxicitás (25mg/kg)

Átlag testtömeg (g) \pm SEM



Körülmények:
BALB/c hím egerek (28-32g);
(i.p.) adagolás;
25 mg Dau tartalom/ttkg;
3 egér/ csoport

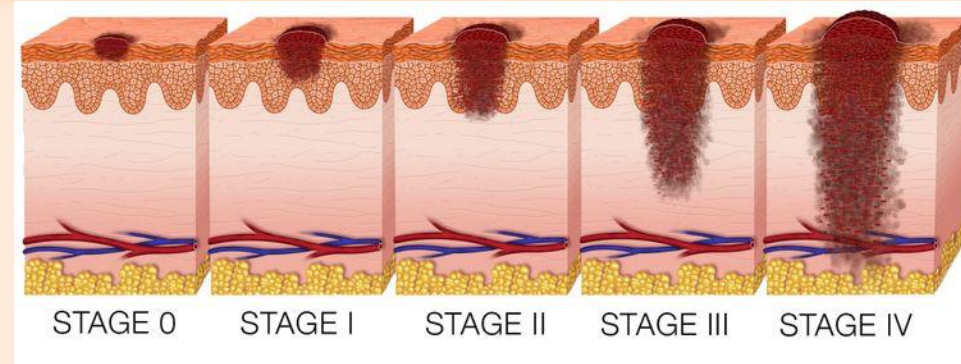
α -MSH konjugátumok *in vivo* tumorellenes hatása



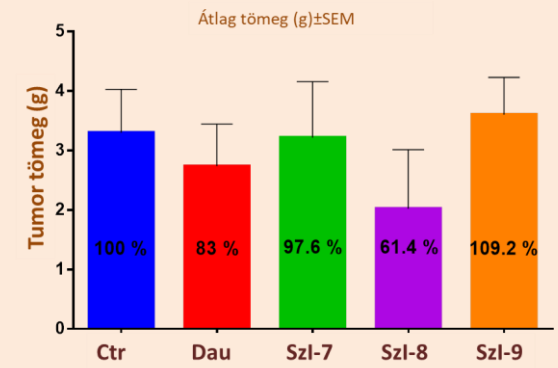
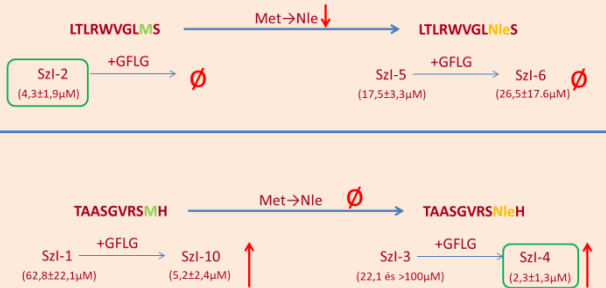
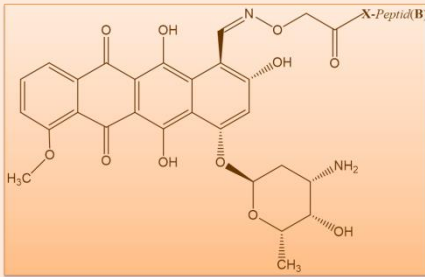
- B16 (s.c.) C57BL/6 hím egerek (20-28g), 7 állat/csoport
- i.p. adagolás
- dózis:
 - Kontrol csoport ;
 - szabad Dau csoport (1 mg/ttkg, 9. és 17. nap);
 - Szi-7, Szi-8 és Szi-9 csoportok (10 mg/kg Dau tartalom; 9., 13., 15. és 17 nap).
- Terminálás: sejtbeültetést követő 20. nap; állatok testtömege és a tumortérfogat, illetve tumortömeg meghatározása

Szi-8 konjugátum hatékonyabb volt, mint a szabad hatóanyag

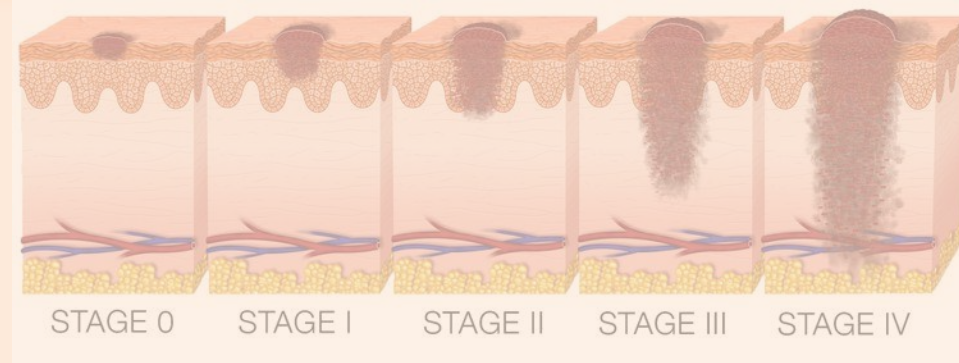
Összefoglalás



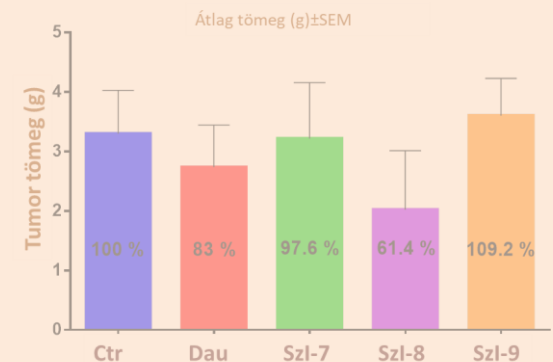
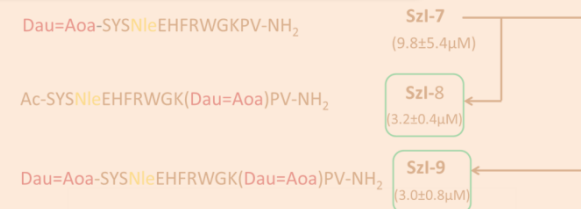
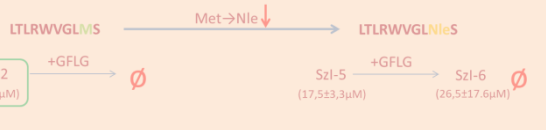
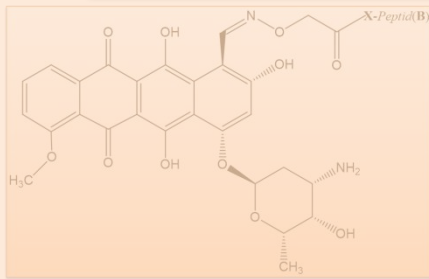
Melanoma



Összefoglalás



MEGELŐZÉS, ÖNVIZSGÁLAT, IDŐ



Köszönetnyilvánítás

Medzihradszky-Schweiger Hedvig

Kiskó Mária

Horváth Lilla



NVKP_16-1-2016-0036



K 119552



VEKOP-2.3.3-15-2017-00020

Köszönöm a figyelmet!