

# Hasnyálmirigy tumor célzott kezelésére alkalmas daunomicin-peptid konjugátumok

Dókus Endre Levente\*<sup>1</sup>, Lajkó Eszter<sup>2</sup>, Takács Angéla<sup>2</sup>, Szász Zsófia<sup>2</sup>, Kalabay Márton<sup>2</sup>, Láng Orsolya<sup>2</sup>, Mező Diána<sup>2</sup>, Köhidai László<sup>2</sup>, Ivan Randelovic<sup>3</sup>, Tóvári József<sup>3</sup>, Mező Gábor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

<sup>2</sup>SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

<sup>3</sup>Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály

## *A hasnyálmirigy rák*

### **PDAC (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma)**

- Viszonylag kis esetszámmal fordul elő más ráktípusokhoz képest.
- Gyógyítása jelenleg nem megoldott.
- A betegek 80%-a meghal az első évben és az 5 éves túlélés 5%-os.

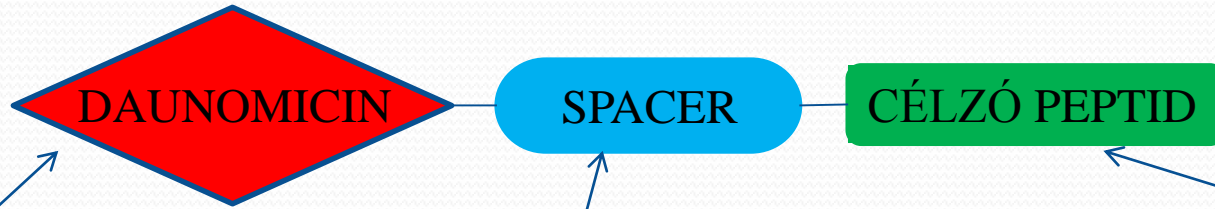
**Stratégia:** *PDAC sejteken szelektíven előforduló sejtfelszíni receptorok/fehérjék célzása*



### ***CÉLZÓ KONJUGÁTUM INTERNALIZÁCIÓJA***

- *A szakirodalomból ismert irányító peptidek felhasználásával azok daunomicin-konjugátumait állítjuk elő.*
- *Vizsgáljuk citotoxicitásukat és szelektivitásukat hasnyálmirigy tumorsejteken (PANC-1) és további tumorsejt típusokon.*

# A KONUGÁTUMOK FELÉPÍTÉSE



Daunomicin: interkaláció a két DNS szál között

**GFLG**: katepszin B -labilis spacer\*

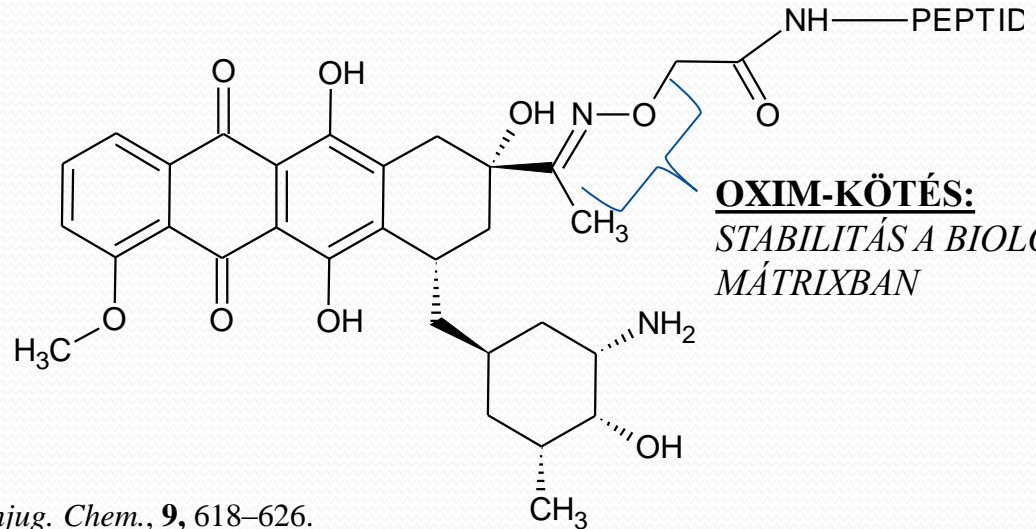
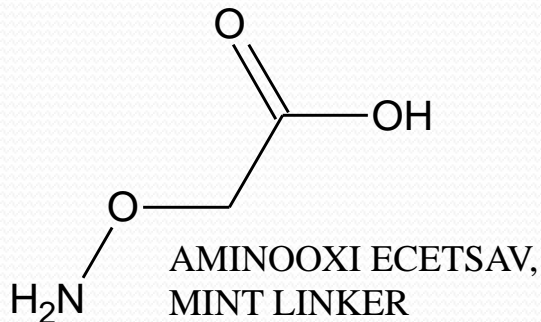
Célzó peptid:

- I. Neurotenzin szekvencia
- II. Plektin célzása
- III. Fág-bemutatós technikával azonosított szekvenciák

Lizoszómális degradáció

Szabad hatóanyag/aktív metabolitok

## A HATÓANYAG KAPCSOLÁSA OXIM-KÖTÉSSEL:



**OXIM-KÖTÉS:**  
STABILITÁS A BIOLÓGIAI MÁTRIXBAN

\*Peterson, J.J., Meares, C.F. (1998) *Bioconj. Chem.*, **9**, 618–626.

# Célzó molekularészletek (peptid típusú vegyületek)

**I. Neurotenzin** szekvenciája: (PDAC sejtek felületén nagy mennyiségű neurotenzin receptor)

**E<sup>1</sup>LYENK<sup>6</sup>PR<sup>8</sup>RPYIL<sup>13</sup>**

Tervezett konjugátumok:

**DL1: *Dau=Aoa-RRPYIL-OH***

NEUROTENZIN<sup>8-13</sup>



**DL2: *Dau=Aoa-KPRRRPYIL-OH***

NEUROTENZIN<sup>6-13</sup>:

NAGYOBB AFFINITÁS?

LIZIN ELÁGAZÁS LEHETŐSÉGE



**DL13: *Dau=Aoa-GFLG-KPRRRPYIL-OH***

+ SPACER

-Neurotenzin 8-13 részlet: RRPYIL  
a receptor kötődésért felelős szakasz\*  
-Használják PDAC sejtek célzására\*\*

**DL9: *Dau=Aoa-KRRPYIL-OH***

Pro<sup>7</sup> ELHAGYÁSA NAGYOBB FLEXIBILITÁS?



**DL14: *Dau=Aoa-GFLG-KRRPYIL-OH***

Pro<sup>7</sup> ELHAGYÁSA NAGYOBB FLEXIBILITÁS?

+SPACER

\*Gilbert, J. A. et al. (1989) *Biochem. Pharm.* **38**( 19), 3377-3382.

\*\*Xiaoqin, Y. et al. (2017) *Amino Acids* **49**(8), 1325–1335.

# BIOLÓGIAI JELLEMZÉS

**In vitro citotoxicitás vizsgálat:** 72h kezelési idő,  $10^{-5}\text{M}$  koncentráció

● PANC-1 sejtvonal: xCELLigence system

● Colo-205 (vastagbél tumor):

● A2058 (melanoma):

● EBC-1 (nem kissejtes tüdő tumor):

**Alamar Blue-teszt**

JEL	KONJUGÁTUM	VIABILITÁS % $10^{-5}\text{M}$ ; 72h			
		PANC-1	Colo-205	A2058	EBC-1
DL1	<i>Dau=Aoa-RRPYIL-OH</i>	75,3 ± 9,1	50,6 ± 3,6	56,4 ± 4,6	44,1 ± 3,1
DL9	<i>Dau=Aoa-KRRPYIL-OH</i>	4,7 ± 1,8	32,4 ± 0,5	19,5 ± 0,6	62,7 ± 1,0
DL2	<i>Dau=Aoa-KPRRPYIL-OH</i>	114,8 ± 18,2	N.D.	N.D.	N.D.
DL14	<i>Dau=Aoa-GFLG-KRRPYIL-OH</i>	13,0 ± 1,5	31,3 ± 0,6	27,2 ± 2,3	37,0 ± 1,3
DL13	<i>Dau=Aoa-GFLG-KPRRPYIL-OH</i>	11,0 ± 1,7	30,4 ± 0,9	28,7 ± 2,5	36,9 ± 0,6

50% < VIABILITÁS < 80%

20% < VIABILITÁS < 50%

VIABILITÁS < 20%

**II.: Plektin:** PDAC sejtek felületén nagy mennyiségben kifejezett fehérje

Plektinhez specifikusan kötődő peptid szekvencia: **KTLLPTP\***

*Tervezett konjugátumok:*

**DL11:** *Dau=Aoa-KTLLPTP-NH<sub>2</sub>*      **DL8:** *Dau=Aoa-GFLG-KTLLPTP-NH<sub>2</sub>*

JEL	KONJUGÁTUM	VIABILITÁS % 10 <sup>-5</sup> M; 72h			
		PANC-1	Colo-205	A2058	EBC-1
DL11	<i>Dau=Aoa-KTLLPTP-NH<sub>2</sub></i>	4,8 ± 1,3	31,8 ± 1,8	27,4 ± 0,9	61,2 ± 2,5
DL8	<i>Dau=Aoa-GFLG-KTLLPTP-NH<sub>2</sub></i>	197,9 ± 3,9	42,1 ± 1,7	60,4 ± 2,3	85,2 ± 3,3

50%<VIABILITÁS<80%

20%<VIABILITÁS<50%

VIABILITÁS<20%

### III. Fág-bemutató technikával azonosított szekvenciák:

*A cisztein cseréje  
szerinre*

**III: CKAAKN\***

**DL12: *Dau=Aoa-SKAAKN-OH***

DAUNOMICIN

CÉLZÓ PEPTID

*Lizin beépítése az N-terminálisra → ELÁGAZÁS*  
*Az N-terminális lizin hatása a citotoxicitásra*

**DL10: *Dau=Aoa-KSKAAKN-OH***

DAUNOMICIN

K

CÉLZÓ PEPTID

*Dau=Aoa-G-OH citotoxikus aktív metabolit\*\**

**DL7: *Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH***

DAUNOMICIN

SPACER

K

CÉLZÓ PEPTID

**DL5: *Dau=Aoa-GFLG-K(Dau-Aoa-)SKAAKN-OH***

DAUNOMICIN

SPACER

K

CÉLZÓ PEPTID

DAUNOMICIN

*H-K(Aoa=Dau)-OH citotoxikus  
aktív metabolit\*\* keletkezése?*

\*Joyce, J. A. et al. (2003) *Cancer Cell*, **4**, 393-403

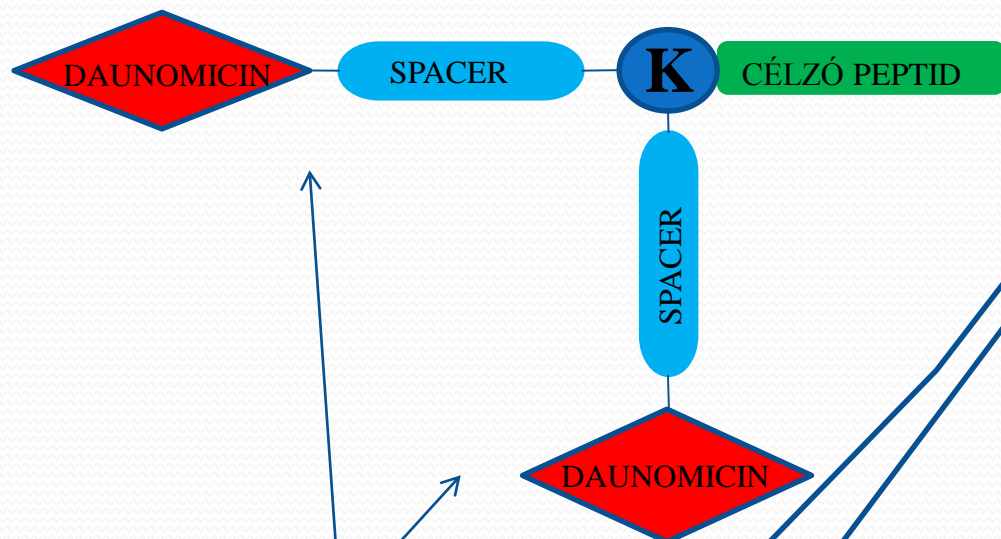
\*\*Orbán, E. et al. (2011) *Amino Acids*. **41**, 469-483.0



### III: CKAAKN\*

*A cisztein cseréje szerinre*

**DL6: *Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa-GFLG)SKAAKN-OH***



**DL5 HATÉKONYSÁGA**

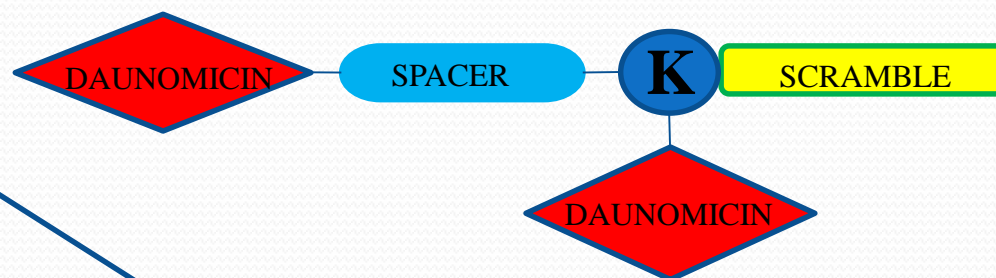
**IRÁNYÍTÓ RÉSZLET HATÁSA?**

**A SKAAKN irányító részlet**

**„scramble” változata:**

**SAKNKA**

**DL40: *Dau=Aoa-GFLG-K(Dau-Aoa-)SAKNKA-OH***



***Bifunkciós, 2 spacer-Dau:  
Dau=Aoa-G-OH citotoxikus  
aktív metabolit\*\* mennyisége***



# BIOLÓGIAI JELLEMZÉS

JEL	KONJUGÁTUM	VIABILITÁS % 10 <sup>-5</sup> M; 72h			
		PANC-1	Colo-205	A2058	EBC-1
DL12	<i>Dau=Aoa-SKAAKN-OH</i>	112,5 ± 5,1	50,7 ± 1,6	61,5 ± 2,7	77,8 ± 1,0
DL10	<i>Dau=Aoa-KSKAAKN-OH</i>	154,2 ± 7,1	51,0 ± 2,5	63,5 ± 4,6	90,2 ± 3,0
DL7	<i>Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH</i>	105,1 ± 1,9	59,3 ± 3,6	79,4 ± 17,6	76,2 ± 13,7
DL5	<i>Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa-)SKAAKN-OH</i>	0,1 ± 0,089	19,8 ± 0,5	29,8 ± 4,5	32,2 ± 4,2
DL6	<i>Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa-GFLG)SKAAKN-OH</i>	31,3 ± 1,8	45,8 ± 2,6	61,9 ± 11,6	57,6 ± 11,1
DL40	<i>Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SAKNKA-OH</i> /SCRAMBLE/	128,9 ± 7,6	29,7 ± 2,2	69,1 ± 7,7	42,8 ± 3,4

50% < VIABILITÁS < 80%

20% < VIABILITÁS < 50%

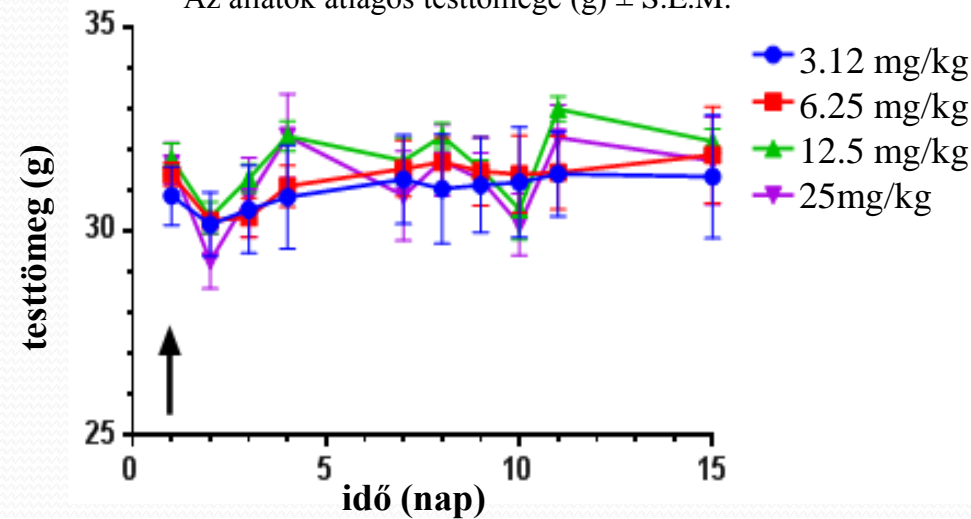
VIABILITÁS < 20%

# DL5: *In vivo* vizsgálatok

**BALB/c hím egerek (29-32g)**

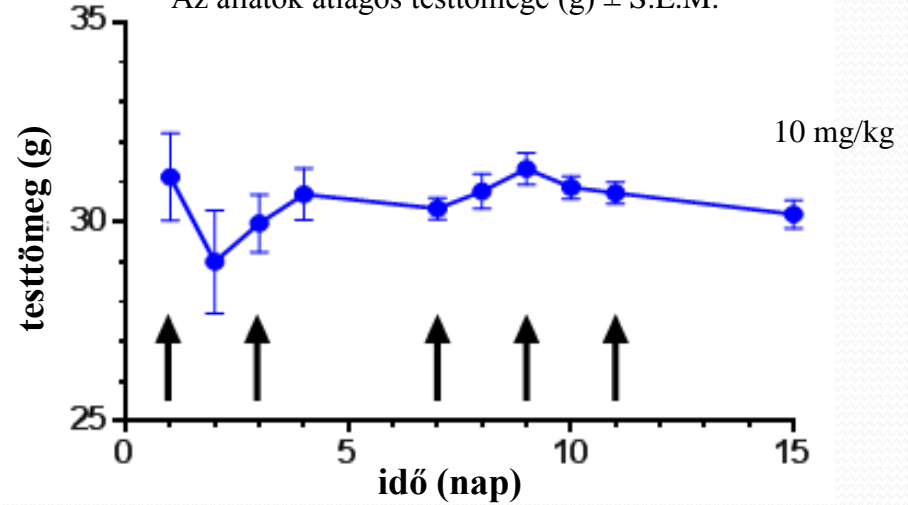
## Akut toxicitás (DL5)

Az állatok átlagos testtömege (g) ± S.E.M.



## Krónikus toxicitás (DL5)

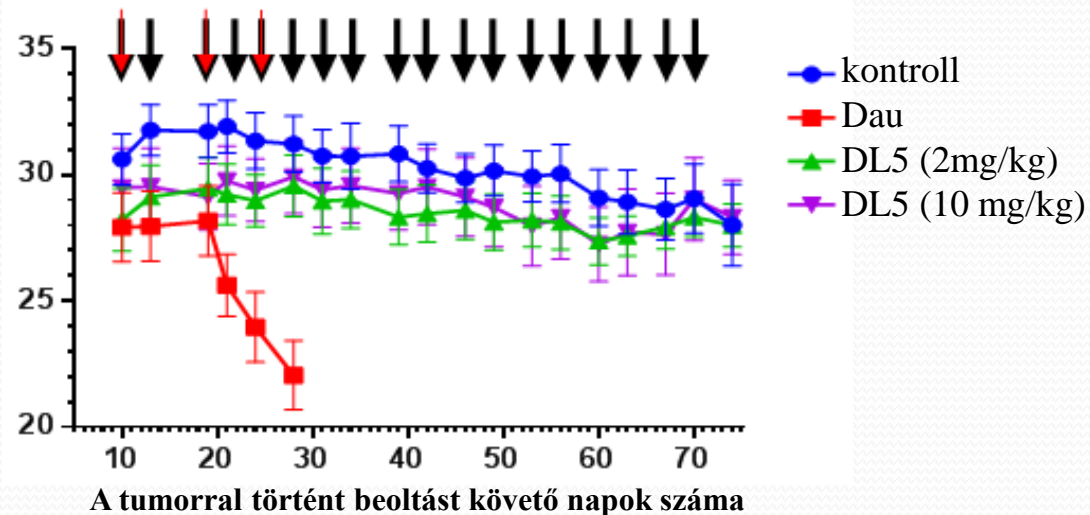
Az állatok átlagos testtömege (g) ± S.E.M.



A DL5 konjugátum hatása az állatok testtömegére szubkután PANC-1 humán Hasnyálmirigy rák modell esetén

*A konjugátum sem az egészséges, sem a tumort hordozó állatok szignifikáns testtömeg csökkenését nem okozza, így*  
**NEM TEKINTENDŐ TOXIKUS HATÁSÚNAK**

Az állatok átlagos testtömege (g) ± S.E.M.



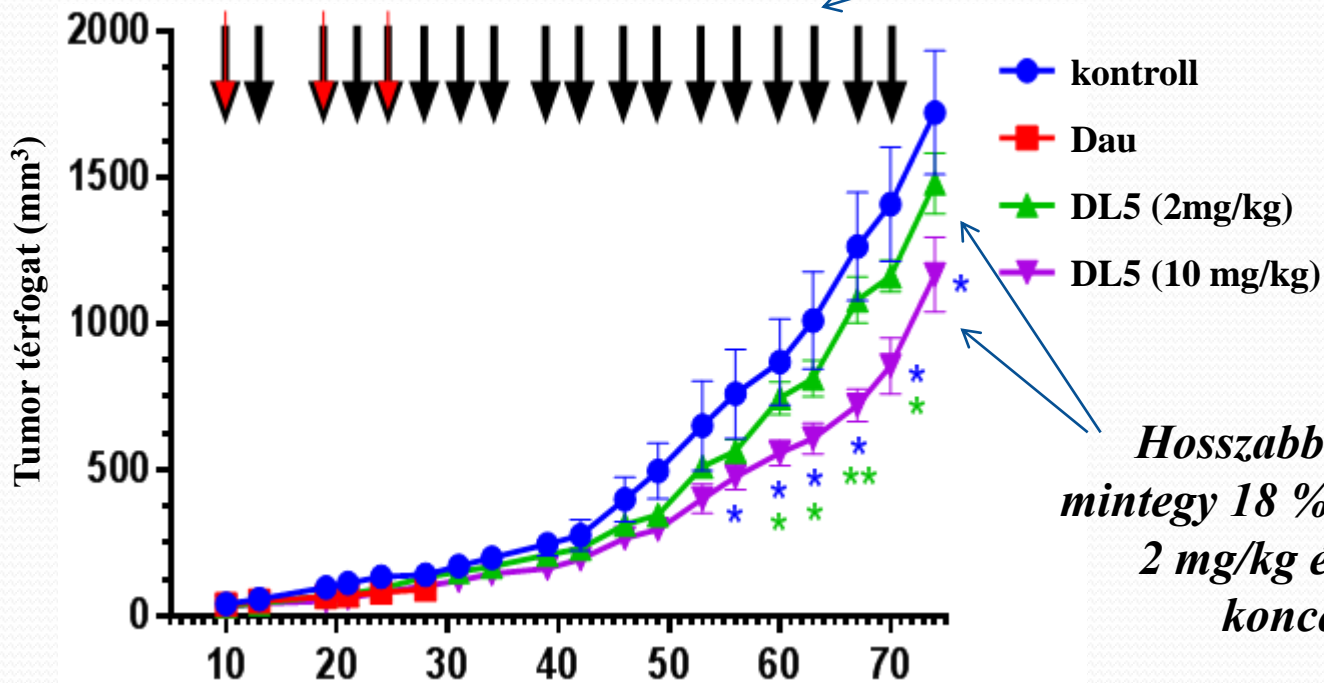
# A bőr alá ültetett tumor méretének időbeli változása

SCID hím egerek (22-34g)

A DL5 konjugátum hatása a tumor térfogatra szubkután PANC-1 human hasnyálmirigy rák modell esetén

Átlagos tumor térfogat ( $\text{mm}^3$ )  $\pm$  S.E.M.

A kezelések időpontjai: 10., 13., 19., 21., 24., 28., 31., 34., 39., 42., 46., 49., 53., 56., 60., 63., 67., 70. napokon



A tumorral történt beoltást követő napok száma

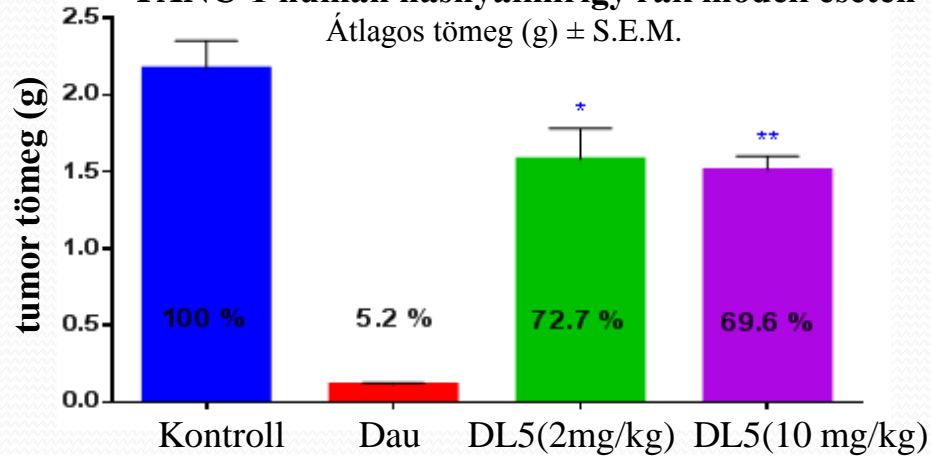
Szignifikancia: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ .

*Hosszabb kezelési idő elteltével mintegy 18 % különbség mutatkozik a 2 mg/kg és a 10 mg/kg kezelési koncentráció esetében.*

SCID hím egerek (22-34g)

### A DL5 konjugátum antitumor hatása szubkután PANC-1 humán hasnyálmirigy rák modell esetén

Átlagos tömeg (g) ± S.E.M.

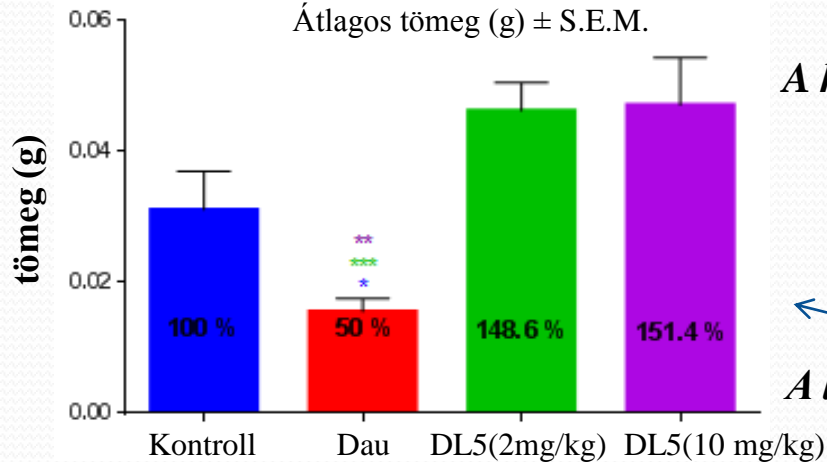


A daunomicinre vonatkozó adatok a 28., míg a DL5 konjugátumra vonatkozó eredmények a 76. napon végzett terminálás során kerültek megállapításra.

*A két kezelési koncentráció eredményei közel azonosak.*

### A DL5 konjugátum hatása a lép tömegére szubkután PANC-1 humán hasnyálmirigy rák modell esetén

Átlagos tömeg (g) ± S.E.M.

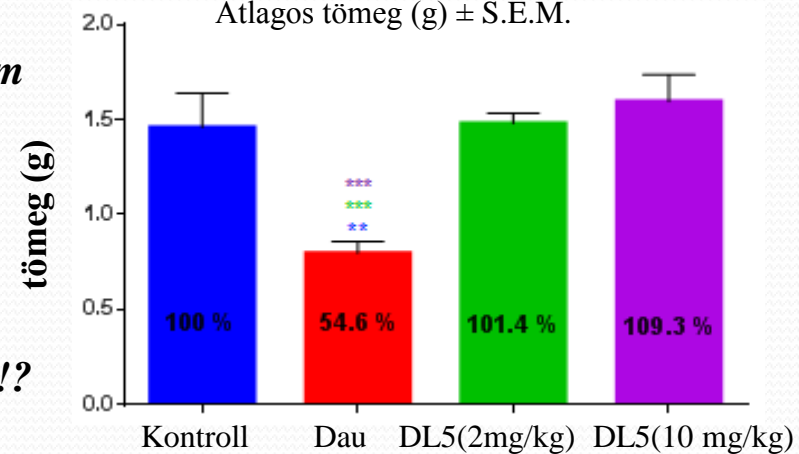


*A konjugátum nem toxikus a májra nézve.*

*A lép tömege nőtt!?*

### A DL5 konjugátum hatása a máj tömegére szubkután PANC-1 humán hasnyálmirigy rák modell esetén

Átlagos tömeg (g) ± S.E.M.



Szignifikancia: \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*  $P \leq 0.001$

# ÖSSZEFOGLALÁS

- PDAC sejtek célzott elpusztítására alkalmas peptid-daunomicin konjugátumok  
Tervezése és előállítása sejtfelszíni receptorok, fehérjék célzása útján.

- Irányító peptid-részletek:



*neurotenzin alapú*



*plektint célzó*



*fág-bemutató módszerrel azonosított*

- Szerkezet optimalizálása citotoxicitás növelése

- 5 Hatékony citotoxikumként viselkedő konjugátum azonosítása:

*DL 9*

*DL13*

*DL14*

*DL11*

*DL5*

- DL5: Leghatékonyabb konjugátum:

*In vitro*: 0.1 viabilitás%

*In vivo*:



Alacsony toxicitás



Hozzávetőleg 30%-os tumor növekedés-gátlás

# TÁMOGATÓK



NVKP\_16-1-2016-0036



K 104045, K 119552



VEKOP-2.3.3-15-2017-00020



**KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!**