

# Hasnyálmirigy tumort célzó terápiás irányítópeptidek összehasonlítása

MEZŐ GÁBOR<sup>1,2</sup>, DÓKUS LEVENTE<sup>2</sup>, SCHLOSSER GITTA<sup>1,2</sup>, LAJKÓ ESZTER<sup>3</sup>, SZÁSZ ZSÓFIA<sup>3</sup>, IVAN RANDELÓVIĆ<sup>4</sup>, BIRI-KOVÁCS BEÁTA<sup>1,2</sup>, TÓVÁRI JÓZSEF<sup>4</sup>, KŐHIDAI LÁSZLÓ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Eötvös Loránd Tudományegyetem, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, <sup>2</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, <sup>3</sup>Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, <sup>4</sup>Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály, Budapest

Pályázati forrás: A kutatást a Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Hivatal támogatta a „Nemzeti versenyképességi és kiválósági program” keretében (NVKP\_16-1-2016-0036). A VEKOP-2.3.3-15-2017-00020 projekt keretében folyó kutatásokat az Európai Unió és Magyarország kormánya támogatta az Európai Regionális Fejlesztési Alap hozzájárulásával.

## Levelezési cím:

Dr. Mező Gábor, Magyar Tudományos Akadémia, Eötvös Loránd Tudományegyetem, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A., tel.: +3613722500, e-mail: gmezo@caesar.elte.hu

## Közlésre érkezett:

2019. szeptember 23.

## Elfogadva:

2019. október 21.

A hasnyálmirigy tumor, a kis esetszám ellenére is, az egyik legnagyobb kihívás a tumorterápia területén, mivel a gyógyítása jelenleg nem megoldott, és az öt éven túli túlélés kevesebb mint 5%. Ezért új, innovatív megoldások kutatása különös jelentőséggel bír ezen a területen. A célzott tumorterápia új lehetőséget nyújthat a hasnyálmirigy tumor hatékony gyógyításában. Munkánk során arra törekedtünk, hogy olyan peptidalapú irányító molekulákat keressünk, és ezek szerkezetét úgy módosítsuk, hogy azok alkalmasak legyenek tumorelles hatóanyagok célba juttatására. Több olyan peptidet hasonlítottunk össze, amelyek hatékonyan ismerik fel a hasnyálmirigy tumor-sejteken megjelenő specifikus vagy túltermelő receptorokat. Szerkezet-hatás összefüggéseket állapítottunk meg, amelyek a későbbi gyógyszertervezésekben is hasznosak lehetnek. Az *in vitro* leghatékonyabb konjugátum [Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH] tumornövekedést gátló hatását *in vivo* is vizsgáltuk nőstény SCID egereken. Az elért 30% körüli gátlás mellett, hogy a konjugátum nem mutatott toxikus mellékhatást szemben a szabad daunorubicinnel, jó kiindulás lehet a további, még hatékonyabb konjugátumok előállítására. *Magy Onkol* 63:301-308, 2019

**Kulcsszavak:** gyógyszer célba juttatása, célzott molekula-terápia, peptidkötőanyag, hasnyálmirigy tumor, daunorubicin

*Despite the small number of cases, pancreatic cancer is one of the biggest challenges in tumor therapy as its treatment is not yet resolved and the expected 5-year survival rate is only 5%. Therefore, innovative solutions for pancreatic cancer are of great importance. Targeted tumor therapy might provide new possibilities in this field. In our research, we focused on finding peptide-based homing molecules and modified their structure to achieve better targeting properties. We compared several peptides that efficiently recognize receptors that are specific for or overexpressed by pancreatic cancer cells. Their structure-effect relationship was determined that can be useful during drug designing in the future. The antitumor effect of Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH conjugate, which turned out to be the most efficient one during *in vitro* studies, were analyzed *in vivo* in female SCID mice. The obtained 30% inhibition, beside the low toxic side effects, might be a good starting point to develop further, more powerful conjugates.*

*Mező G, Dókus L, Schlosser G, Lajkó E, Szász Z, Randelović I, Biri-Kovács B, Tóvári J, Kőhidai L. Comparison of therapeutic peptides targeting pancreatic cancer. *Magy Onkol* 63:301-308, 2019*

**Keywords:** drug delivery systems, molecular targeted therapy, peptide library, pancreatic neoplasms, daunorubicin

## BEVEZETÉS

A hasnyálmirigy-tumor az egyik legagresszívabb és legveszélyesebb tumortípus. Bár a daganatos megbetegedések között előfordulása viszonylag csekély (3-4%), azonban az esetek ~80%-a a felismerést követő egy évben halálhoz vezet, és az 5 éven túli túlélés is csak 5%-os (1). A magas mortalitásnak az egyik fő oka a betegség lassú kialakulása és az atipikus tünetek miatti nehéz felismerés, ami ahhoz vezet, hogy a betegséget csak akkor diagnosztizálják, amikor az már nem operálható és gyógyítható. Ráadásul az alkalmazott kemoterápiás szerek szelektivitásának hiánya miatt számos mellékhatás léphet fel, továbbá gyorsan kialakul ellenük a tumorsejtek rezisztenciája is (2). További probléma a hasnyálmirigy-tumorok alacsony vaszkularizációja és a tumort körülvevő desmoplastikus stróma, amely gátolja a gyógyszer tumorszövetbe jutását (3). Ezért a duktális hasnyálmirigy-adenokarcinóma (PADC) gyógyítása továbbra is egy nagy kihívás a kutatók és orvosok számára. Reményeink szerint e tumortípus gyógyítása terén is áttörést hozhat az ún. célzott tumorterápia (4). A fent leírtak miatt, a célzott tumorterápiára kifejlesztett anyagok közül a kismolekulás hatóanyag-konjugátumok (SMDCs) jobb gyógyszerjelöltek lehetnek, mint a tumorszövetekbe rosszul penetráló ellenanyag-drog konjugátumok (ADC-k) (5). Az NVKP\_16-1-2016-0036 pályázat keretében olyan hasnyálmirigy-tumorokat felismerő irányítópeptideket kerestünk, amelyek alkalmasak lehetnek olyan konjugátumok előállítására, amelyek nagy szelektivitással és hatékonysággal be tudnak jutni e tumorsejtekbe. Az irodalomban leírtak néhány PADC-t felismerő peptidszekvenciát (neurotenszinreceptor-specifikus [RRPYIL], plektin-1 fehérjét felismerő [KTLPT, TMAPSIK] vagy Frizzled-receptor-specifikus [CKAANK] irányítópeptidek), amelyeket elsősorban liposzómák célzott tumorsejtbe juttatására alkalmaztak, de ezek összehasonlítására és szerkezetük optimalizálására nem került sor. Az itt bemutatott szisztematikus kísérletsorozatunkban erre tettünk kísérletet.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### A sejtfelszíni kötődés és az internalizáció áramlási citometriai vizsgálata

Az áramlási citometriás vizsgálatok során PANC-1 (humán duktális hasnyálmirigy-tumor) sejteket alkalmaztunk (szármasítás: European Collection of Authenticated Cell Cultures [ECACC], Salisbury, UK), melyeket DMEM médiumban (Lonza, Basel, Svájc) tenyésztettünk, 10% hőinaktivált FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco®/Invitrogen Corporation, New York, NY, USA), 2 mmol/L glutamin (Lonza) és 1% Penicillin/Streptomycin antibiotikum (Gibco®/Invitrogen Corporation) mellett. A sejteket T25-ös tenyésztőedényben növesztettük, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú inkubátorban.

A konjugátumok sejtfelszíni kötődésének és internalizációjának vizsgálatát áramlási citométerrel végeztük (FACS-Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), kihasználva

a peptidekhez kapcsolt daunorubicin (Dau) fluoreszcens aktivitását ( $\lambda_{\text{excitáció}}=488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{emisszó}}=585 \text{ nm}$ ).

A sejtek kiültetését huszonnégy órával a konjugátumokkal és a szabad daunorubicinnel történő kezelés előtt végeztük (12 kamrás lemezek,  $2,5 \times 10^5$  sejt/ml koncentráció, 900  $\mu\text{l}$ /kamra). A konjugátumok sejtfelszíni kötődésének és internalizációjának elkülönítése céljából a sejtek kezelése két hőmérsékleten történt párhuzamosan (37 °C és 4 °C), a konjugátumok  $10^{-5}$  M végkoncentrációjú oldataival. A 30 perces inkubációs idő letelte után, egy PBS-es mosási lépést követően a sejtek lemezről eltávolítása TrypLE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) reagens alkalmazásával történt, elkerülve ezáltal a sejtfelszíni fehérjék degradációját. Az enzimatis disszociáltság (3-5 perc) leállításához 500  $\mu\text{l}$  friss médiumot adtunk a kamrákhoz. A sejtuszuspenzió centrifugálását követően a sejteket 400  $\mu\text{l}$ /cső PBS-ben szuszpendáltuk és a mintákat áramlási citométer felhasználásával mértük, amely a sejtek fluoreszcenciaintenzitásának detektálásán alapul. Az eredmények kiértékeléséhez CellQuest Pro (Becton-Dickinson) és Flowing 2.5.1. (Turku Centre of Biotechnology, Turku, Finnország) programokat használtunk. A mérés során mintánként 2-2 párhuzamost alkalmaztunk, a kísérletet kétszer végeztük el. A csak friss médiummal, 37 °C-on és 4 °C-on kezelt sejteket tartalmazó mintákat használtuk kontrollként.

A 4 °C-os és 37 °C-os minták fluoreszcenciaintenzitásait (amiket a készülék által meghatározott geometric mean channel [GeoMean] értékkel definiálhatunk) korrigáltuk a kontrollminták autofluoreszcenciáját jellemző GeoMean értékekkel. A 4 °C-on kezelt sejtek fluoreszcenciaintenzitása a sejtfelszínen kötődött konjugátumok mennyiségével arányos, míg a 37 °C-on kezelt sejtek fluoreszcenciaintenzitása egyrészt a felszínhez kötődött, másrészt a sejtek által felvett konjugátumok jeléből tevődik össze. A 37 °C-on inkubált sejtek GeoMean-értékéből a 4 °C-on inkubált sejtek GeoMean-értékeinek kivonásával számítottuk ki az internalizálódott konjugátumok mennyiségével arányos fluoreszcenciaintenzitás értékét.

### *In vitro* életképesség/citotoxicitás meghatározása

A vizsgált PANC-1 tumorsejtvonal laboratóriumi körülmények között adherens tulajdonságokat mutat, ezért a vizsgálatainkban elemzésre került új, potenciálisan tumorellenes anyagok viabilitásra/citotoxicitásra kifejtett hatásainak elemzésére a sejtkitapadást valós idejű rendszerben követő, impedimetriai kiértékelést alkalmaztunk. A mérési technika a váltóáramú térben mérhető elektromos ellenállás (impedancia, Z) regisztrálásán alapul. Az arany mérőelektrodokra kiültetett élő sejteket az őket borító foszfolipid kettős réteg fizikai értelemben szigetelővé teszi. Ez a műszeresen is jól mérhető tulajdonság változik (csökken) a sejtekre ható, citotoxikus anyagok hatására. Méréseinket a sejtes minták impedimetriai vizsgálatára kialakított xCELLigence SP (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) berendezéssel végeztük, 37 °C-on és 5% CO<sub>2</sub>-koncentráció mellett.

A kísérletek előkészítő szakaszában – alapvonal felvétele – a mérőelektrodokkal ellátott, 96 kamrát tartalmazó speciális tenyésztőlemez, E-plate (ACEA Biosciences) előkezelése frissen készített sejtenyészítő médiummal történt (60 perc; mintavételi gyakoriság: percenként). Ezt követően a PANC-1 sejtek kamrákba ültetése történt,  $10^4$  sejt/kamra denzitásban. A 24 órás inkubáció során a sejtek egyenletesen befedik az E-plate-en található mérőkamrák alján elhelyezkedő elektrodokat. Az így kialakult konfluens sejtenyészeteket ezután kezeltük meg a vizsgált anyagokkal a következő koncentrációkban:  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  M. A kezelés teljes időtartama 72 óra, a mintavételi gyakoriság 1 perc (0–24 óra); illetve 15 perc (48–72 óra) volt. Méréseink során 3 párhuzamost alkalmaztunk, kontrollként a hatóanyagmentes tápoldat szolgált.

A készülék az impedanciaváltozást Cell index (CI) formában jeleníti meg, ami egy relatív (kiindulási időpontra vonatkoztatott), mértékegység nélküli mutatószám. A kapott CI-eredmények elemzését az xCELLigence kiértékelő RTCA 2.0 programjával, valamint Origin Pro 8.0 program segítségével végeztük. A konjugátumok hatásának jellemzésére a kontroll százalékában kifejezett, normalizált CI-értékeket használtuk.

### A konjugátumok degradációja patkánymáj lizoszóma-homogenátumban

A konjugátumok lebomlását patkánymáj lizoszómapreparátum felhasználásával vizsgáltuk és a keletkező fragmentumokat LC-MS technikával határoztuk meg (6). A lizoszóma-homogenátum fehérjetartalma  $16,6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  volt. A homogenátumból  $12,5 \mu\text{g}$  fehérjetartalom mennyiséget adtunk  $0,2 \text{ M}$  nátrium-acetát pufferben ( $\text{pH}=5,03$ ) oldott  $12,5 \mu\text{g}$  peptidhez. A reakcióelegyet  $600 \text{ rpm}$  fordulatszám keverés mellett inkubáltuk  $37^\circ\text{C}$ -on, és  $50 \mu\text{l}$  térfogatú mintákat vettünk a következő időpontokban: 0, 5, 15, 30 perc, illetve 1, 2, 6, 24 és 72 óra. Az enzimaktivitást  $5 \mu\text{l}$  hangyasav hozzáadásával állítottuk le. A mintákat  $-25^\circ\text{C}$ -ra lehűtve a felhasználásig fagyasztott állapotban tároltuk.

Az LC-MS-analízist Q Exactive Focus, nagy felbontású és nagy pontosságú, hibrid kvadrupol-orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Scientific, Bremen, Németország) végeztük, HPLC-oszlopon történő elválasztás után. Az HPLC-elválasztást Dionex 3000 UHPLC-rendszeren Supelco Ascentis C18 oszlop ( $2,1 \times 150 \text{ mm}$ ,  $3 \mu\text{m}$ ) használatával végeztük. Lineáris gradiens elúciót (0 perc 2% B, 1 perc 2% B, 17 perc 90% B) alkalmaztunk, ahol az A eluens  $0,1\%$  HCOOH/víz (V/V), a B eluens  $0,1\%$  HCOOH/acetonitril-víz (80:20) (V/V) volt  $0,2 \text{ ml/perc}$  folyási sebesség mellett  $40^\circ\text{C}$ -on temperálva. A nagy felbontású tömegspektrumot  $m/z$  200–2000 tartományban vettük fel. Az LC-MS adatokat Xcalibur szoftver (Thermo Scientific) segítségével analizáltuk.

### In vivo vizsgálatok

Az egerek gondozása, tartása és használata minden esetben a „Helsinki Nyilatkozat Guiding Principles for the Care and Use of Animals” vezérelve szerint és a helyi etikai bizottság

jóváhagyásával történt. Állatkísérleti engedélyek száma: PEI/001/1738-3/2015 és PEI/001/2574-6/2015.

A hasnyálmirigy-tumor kísérleti állatokban történő kialakításához PANC-1 humán pankreász-tumor-sejteket alkalmaztunk.

Az *in vivo* antitumor hatás meghatározása előtt akut és krónikus toxicitási tesztek végeztünk a 15-ös számú Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH konjugátummal. A kísérlethez egészséges hím Balb/c egereket használtunk (3 egér/csoport, melyek tömege  $29\text{--}33 \text{ g}$  volt). A konjugátumot vízben oldottuk és  $0,1 \text{ ml}/10 \text{ g}$  testtömegtér-fogatban injektáltuk a megfelelő koncentrációkban. Az akut toxicitás mérése során intraperitoneális (ip.) injektálás történt 4 koncentrációban: 3, 12,5, 6,25, 12,5, és  $25 \text{ mg}/\text{ttkg}$  Dau-tartalom szerint. A krónikus toxicitás vizsgálata során az egereket 5 alkalommal kezeltük  $10 \text{ mg}/\text{ttkg}$  Dau-tartalmú anyaggal a következő napokon: 1., 3., 7., 9. és 11. nap. A toxicitás értékelése a következő szempontok szerint történt: élettartam, viselkedés, fizikai megjelenés és testtömeg. A paramétereket 14 napon át regisztráltuk.

A PANC-1 sejteket szubkután (sc.) injektáltuk nőstény SCID egerekbe ( $22\text{--}34 \text{ g}$ ), állatonként  $3 \times 10^6$  sejtet  $200 \mu\text{l}$  térfogatú M199 médiumban. Az intraperitoneális (ip.) módon folytatott kezelést a sejtek injektálását követő 10. napon kezdtük, amikor az átlagos tumorméret  $36 \text{ mm}^3$  volt. Négy kezelési csoportot alakítottunk ki, csoportonként 7 állattal, amelyeket a következőképpen kezeltünk: a kontrollcsoportot a konjugátumok oldószerével (M199 médium,  $200 \mu\text{l}$ ) kezeltük, a szabad Dau-val kezelt csoport injektálása a (PANC-1 sejtek bejuttatását követő) 10., 19. és 24. napokon történt  $1 \text{ mg}/\text{ttkg}$  Dau-val. A konjugátum tesztelése két csoportban történt: az egyik csoportot  $10 \text{ mg}/\text{ttkg}$  Dau-tartalmú anyaggal ( $21,6 \text{ mg}/\text{kg}$  konjugátum) kezeltük, a másikat  $2 \text{ mg}/\text{ttkg}$ -mal ( $4,3 \text{ mg}/\text{kg}$  konjugátum) a következő napokon: 10., 13., 19., 21., 24., 28., 31., 34., 39., 42., 46., 49., 53., 56., 60., 63., 67. és 70. napok. A kísérletet a 74. napon termináltuk (a kezelés kezdetétől számított 65. napon). A szabad Dau-val kezelt csoportot már 3 kezelés után, a 28. napon (kezelés 19. napja) terminálni kellett az állatok jelentős súlyvesztése miatt.

A statisztikai analízishez Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk.

## EREDMÉNYEK

### Neurotenzinreceptor-specifikus konjugátumok

A 2010-es évek elején mutatták ki, hogy a neurotenzinreceptor 1 (NTR) egy ígéretes biomarker a célzott tumor-terápia szempontjából. A hasnyálmirigy-tumorok 75%-a nagy mennyiségben expresszálja ezt a receptortípust, míg az egészséges hasnyálmirigy-sejtek felszínén nem jelenik meg (7, 8). A neurotenzin (NT) egy 13 aminosavból álló neuropeptid (<ELYENKPRRPYIL-OH, ahol <E = piroglutaminsav), amelyről kimutatták, hogy elsősorban a szekvencia 8–13. aminosavig tartó szakasza felelős a re-

**1. TÁBLÁZAT.** PADC-specifikus peptidok daunorubicin-konjugátumai és PANC-1 sejtekre gyakorolt tumorelles hatásuk

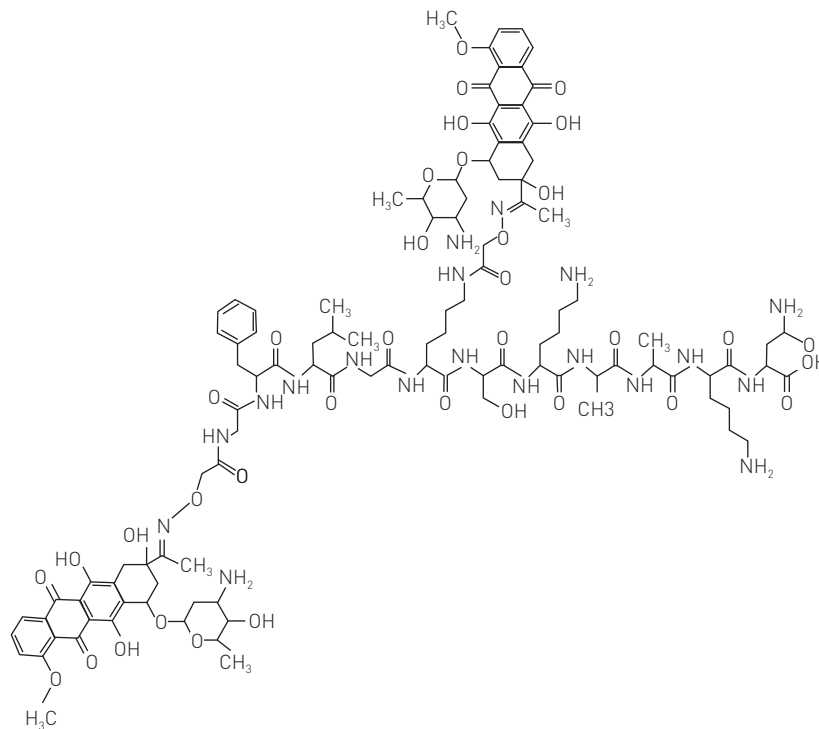
Kód	Konjugátum	Sejtéletképesség [% , 10 <sup>-5</sup> M, 72 óra]
<i>Neurotensinanalóg konjugátumok</i>		
1	Dau=Aoa-RRPYIL-OH	75,3%
2	Dau=Aoa-KRRPYIL-OH	4,7%
3	Dau=Aoa-KPRRPYIL-OH	124,4%
4	Dau=Aoa-GFLG-KRRPYIL-OH	13,0%
5	Dau=Aoa-GFLG-KPRRPYIL-OH	11,0%
<i>Plektin-1-receptor-specifikus konjugátumok</i>		
6	Dau=Aoa-KTLLPTP-NH <sub>2</sub>	4,8%
7	Dau=Aoa-GFLG-KTLLPTP-NH <sub>2</sub>	197,9%
8	Dau=Aoa-TNleAPSIK-NH <sub>2</sub>	31,5%
9	Dau=Aoa-KTNleAPSIK-NH <sub>2</sub>	120,3%
10	Dau=Aoa-GFLG-KTNleAPSIK-NH <sub>2</sub>	37,5%
<i>Frizzled-receptor-specifikus konjugátumok</i>		
11	Dau=Aoa-SKAAKN-OH	112,5%
12	Dau=Aoa-KSKAAKN-OH	154,2%
13	Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH	105,1%
14	Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa-GFLG)SKAAKN-OH	31,3%
15	Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH	0,1 %

ceptorkötődésért és a biológiai aktivitásért (9). Ezért az RRPYIL szekvenciát vettük alapul konjugátumaink megtervezésénél. Vizsgáltuk, hogy mi az optimális peptidlánc-hosszúság a konjugátumban, illetve hogy szükséges-e a tumorelles hatás kifejeződéséhez a daunorubicin és az irányítópeptid közé katepszin B labilis tetrapeptid spacer (GFLG) beépítése, ami bizonyos esetekben segíthet a tumorsejtekben a megfelelő hatóanyagot tartalmazó metabolit felszabadulásában. A Dau-t oximkötéssel kapcsoltuk a peptidokhoz (10). Impedimetrián alapuló sejtéletképesség- (viabilitás) méréssel megállapítottuk, hogy az optimális szerkezetű konjugátum a Dau=Aoa-KRRPYIL-OH [Dau=Aoa-K-NT(8-13) (2)], ahol Aoa = aminosav-acetil-csoport) volt. A PANC-1 sejteken mért viabilitási értékeket 72 órás kezelés után a 10<sup>-5</sup> M koncentrációnál mért adatok szerint adjuk meg, a kontrollra vonatkoztatott százalékos értékben (1. táblázat), amely e konjugátum esetében 4,7% volt. A Lys elhagyása [Dau=Aoa-NT8-13, Dau=Aoa-RRPYIL-OH (1)], vagy Pro beépítése a Lys és Arg közé [Dau=Aoa-NT6-13, Dau=Aoa-KPRRPYIL-OH (3)], jelentősen csökkentette a tumorelles hatást. A GFLG spacer beépítésével nem tudtunk hatásvégetedést elérni [Dau=Aoa-GFLG-K-NT(8-13), Dau=Aoa-GFLG-KRRPYIL-OH (4); 13,0%], bár a hosszabb neurotensin 6–13 szekvencia

esetén a spacer nélküli variánshoz (3) képest jelentős javulás volt megfigyelhető (3: 124,4% helyett Dau=Aoa-GFLG-KPRRPYIL-OH (5): 11,0%).

#### Plektin-1 fehérjét felismerő peptidok

2008-ban Kelly és munkatársai mutatták ki, hogy a plektin-1 fehérje (Plec-1) egy lehetséges biomarker a primer és metasztatizált PADC korai stádiumban való kimutatására (11). A Plec-1 mennyisége a betegség előrehaladtával jelentősen növekszik a tumorsejteken, így jó célpontja lehet az irányított tumorterápiának, mivel a normális sejteken a megjelenése elhanyagolható. Két, az irodalomban leírt peptidet vontunk be a vizsgálatokba, amelyeket fágbemutató technikával szelektáltak Plec-1 fehérjére. Az egyik a KTLLPTP, a másik a TMAPSIK szekvenciát tartalmazó heptapeptid volt (11, 12). A KTLLPTP peptidből előállítottuk a peptidhez közvetlenül oximkötéssel kapcsolt Dau-tartalmú konjugátumot [Dau=Aoa-KTLLPTP-NH<sub>2</sub> (6)] és a GFLG spacerrel hosszabbított variánsát [Dau=Aoa-GFLG-KTLLPTP-NH<sub>2</sub> (7)]. A sejtéletképességi vizsgálatok (1. táblázat) azt mutatták, hogy a spacer beépítése teljesen lerontotta a rövidebb peptidet tartalmazó konjugátum ígéretnes tumorelles hatását (6: 4,8% és 7: 197,9%). A második peptid esetében az oxidációra érzékeny metionint kicseréltük norleucinra (az oldalláncban kétatom



1. ÁBRA. A Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH konjugátum [15] szerkezete

helyett  $\text{CH}_2$ -csoportot tartalmazó aminosav), ami általában megengedett csere, ha a metioninhoz nem kapcsolható speciális biológiai funkció. A Dau=Aoa-TNleAPSIK-NH<sub>2</sub> [8] konjugátum közepes hatást gyakorolt a sejtelétképeségre (31,5%) az adott koncentrációban és időintervallumban. Mivel a másik Plec-1-et felismerő peptid (KTLTP) N-terminálisa KTL tripeptid szekvenciával kezdődik, kipróbáltuk, hogy növelhető-e az utóbbi konjugátum tumorelles hatása (Dau=Aoa-TNleAPSIK-NH<sub>2</sub>) egy lizin beépítésével. Azonban az új konjugátum (Dau=Aoa-KT-

NleAPSIK-NH<sub>2</sub> [9]) egyáltalán nem csökkentette a PANC-1 sejtek életképeségét (120,3%). Ha azonban beépítettünk még egy GFLG spacer is (Dau=Aoa-GFLG-KTNleAPSIK-NH<sub>2</sub> [10]), a tumorelles hatás visszatért (37,5%).

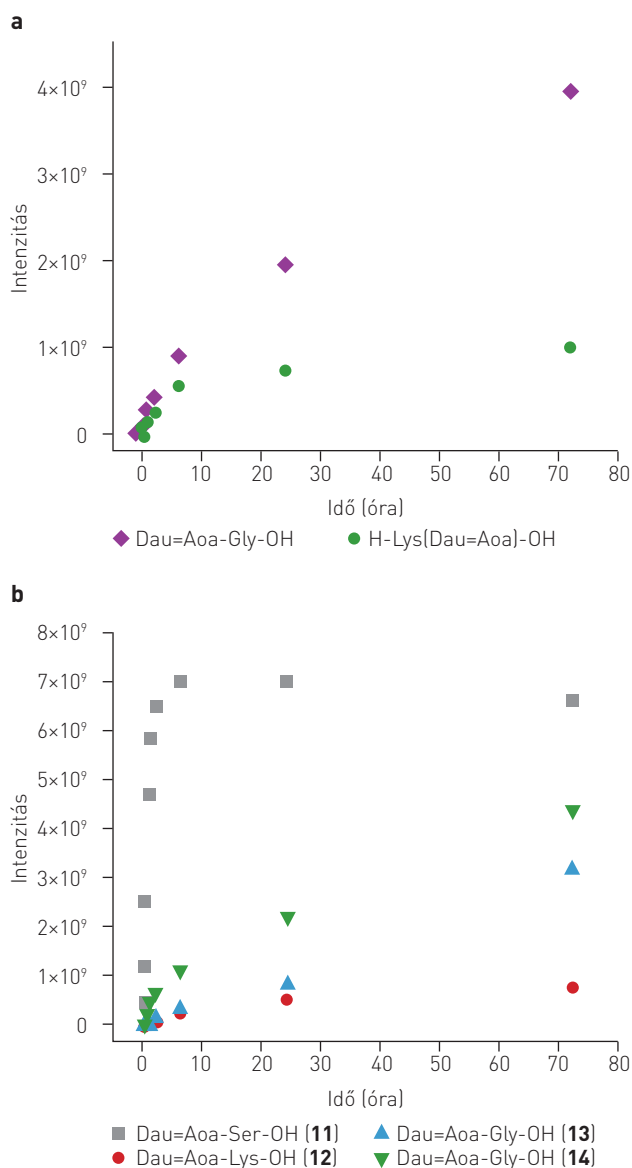
### Frizzled-receptor-specifikus irányítópeptid

A CKAANK szekvenciát kombinált *in vitro* és *in vivo* fágbe-mutatásos eljárással szelektálták, és ez a peptid igen jó kötődést mutatott Frizzled-5 (FZD-5) receptort túlexpresszáló

2. TÁBLÁZAT. Az SKAAKN peptidalapú konjugátumok kötődése és sejtfelvétele PANC-1 sejteken áramlási citometriai vizsgálat során mért relatív fluoreszcenciaintenzitás alapján

Kód	Konjugátum	Kötődés	Sejtfelvétel
11	Dau=Aoa-SKAAKN-OH	0,09±0,17	1,63±0,36
12	Dau=Aoa-KSKAAKN-OH	0,83±0,16	5,23±0,26
13	Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH	0,01±0,01	0,46±0,24
14	Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa-GFLG)SKAAKN-OH	0,07±0,08	2,78±0,57
15	Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH	0,46±0,15	7,67±1,15

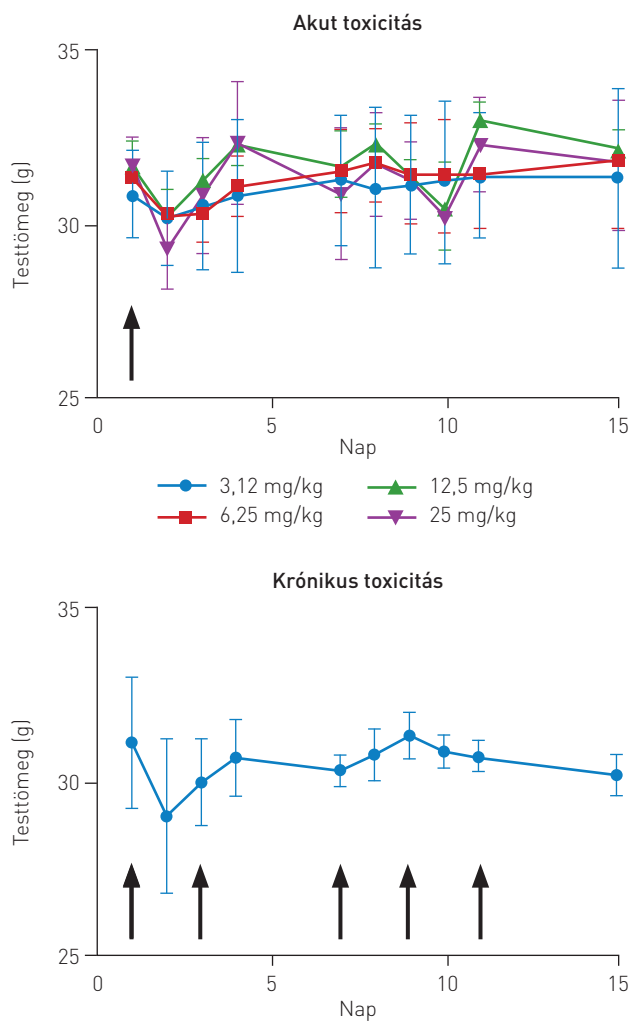
A készülék által mért GeoMean (geometric mean channel) értékekből a kontroll esetén mért autofluoreszcencia levonásával kaptuk a táblázatban megadott értékeket, a kötődési értékek a sejtfel-színhez kötődött konjugátumok összehasonlítására szolgálnak, a sejtfelvételei értékek az internati-zálódás mértékét mutatják



**2. ÁBRA.** Az SKAAKN irányítópeptidet tartalmazó konjugátumok lizoszomális emésztése során keletkezett legkisebb, hatóanyagot tartalmazó metabolitok mennyisége az idő függvényében; (a 15-ös, (b 11-14-es konjugátumok

pankreáztumorsejtekhez (13, 14). A FZD-5 egy Wnt-kötő, 7 transzmembrán domént tartalmazó G-protein-kapcsolt receptor, amely kulcsszerepet játszik a Wnt/ $\beta$ -katenin szignálút vonal aktiválásában és így a hasnyálmirigy tumor sejteinek fokozott proliferációjában (15). A CKAAKN peptidet, mint irányítómolekulát a cisztein tiolcsoportján keresztül kapcsolták egy módosított gemcitabinszármazékhoz. Az előállított konjugátum hatásosabb volt a szabad hatóanyag-nál MIA PaCa-2 humán hasnyálmirigy tumor-sejteken (16).

Kísérleteinkben továbbra is oximkötést tartalmazó Dau-t alkalmaztunk a konjugátumok előállítására, elsősorban azért, hogy az irányítómolekulák szerepét össze tudjuk hasonlítani. Mivel e konjugálási eljárásához nincs szükség a cisztein tiolcsoportjára, ezért azt szerinre cseréltük, így elkerülhető a nem kívánt oxidációs mellékreakció. Három lineáris konjugátumot állítottunk elő (Dau=Aoa-SKAAKN-OH (11), Dau=Aoa-KSKAAKN-OH (12) és Dau=Aoa-GFLG-KSKAAKN-OH (13)), azonban egyik vegyület sem mutatott tumorelles hatást PANC-1 sejteken. Azonban, ha a beépített extra lizin oldalláncán elágazást építettünk ki és oda még egy daunorubicint kapcsoltunk, akkor ugrásszerűen megnőtt a konjugátumok gátló hatása. Amennyiben az oldalláncan is kiépítettük a GFLG enzim labilis spacert



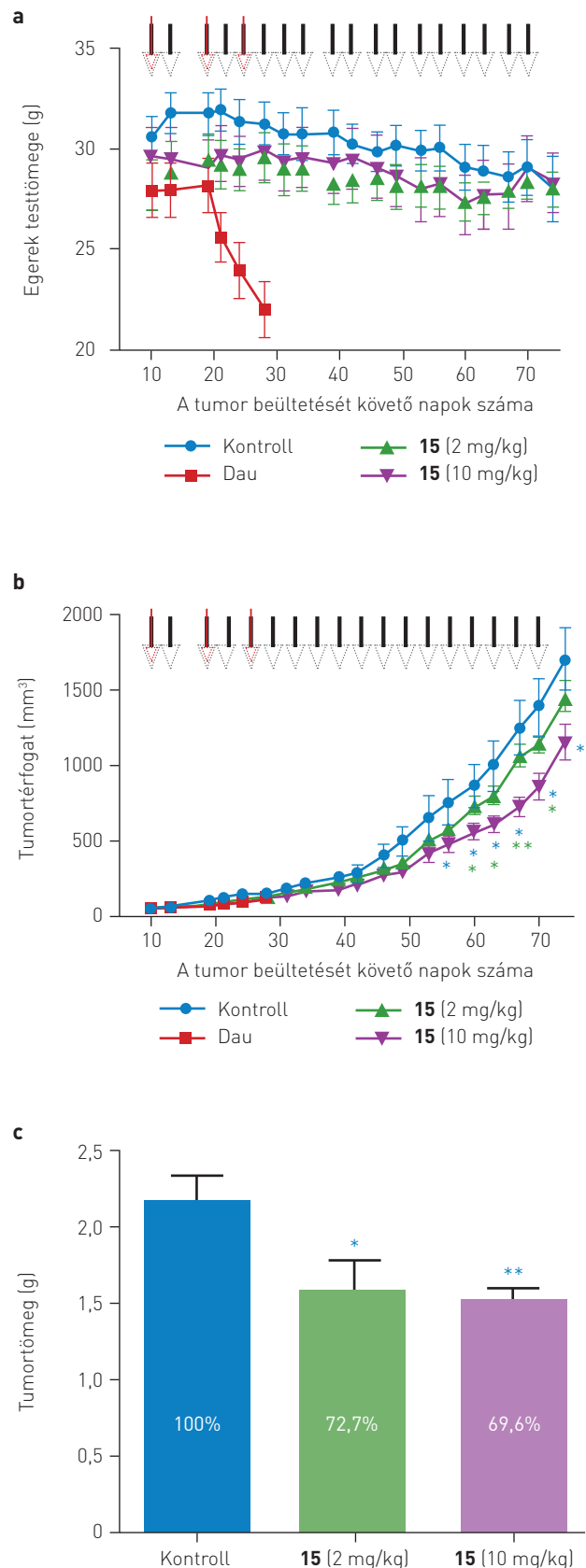
**3. ÁBRA.** Az egerek ( $n=3$ /csoport) testtömegének alakulása a Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH konjugátummal (15) végzett akut és krónikus (10 mg/ttkg Dau-tartalmú konjugátum) toxicitási teszt során. A fekete nyilak az injektálások időpontjait jelzik

(Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa-GFLG)SKAAKN-OH [14]), akkor  $10^{-5}$  M koncentrációban 72 órás kezelést követően a sejtéletképesség 31,3%-a volt a kontrollnak (1. táblázat). Ha az oldalláncban elhagytuk a spacer, akkor drámaian nőtt a Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH (15) (1. ábra) konjugátum tumorellenes hatása (sejtéletképesség: 0,1%) (1. táblázat). Mivel az eddig vizsgált konjugátumok közül ez a vegyület bizonyult a leghatékonyabbnak, ezen a molekulacsaládon végeztünk további részletesebb vizsgálatokat.

A két, elágazást tartalmazó konjugátum hatásbeli különbsége magyarázható azzal, hogy az oldalláncban is spacer tartalmazó 14-es konjugátum kötődése és sejtbejutása is kisebb volt, mint az oldalláncban spacer nem tartalmazó 15-ös konjugátum esetén (2. táblázat). Továbbá kimutattuk, hogy a 14-es konjugátum patkány máj liszozóma preparátumban való degradálódása is lassabb és a keletkező aktív metabolit (Dau=Aoa-Gly-OH) mennyisége is kevesebb, mivel még 72 óra elteltével is kimutathatók a hatóanyagot tartalmazó nagyobb fragmensek, amelyek kisebb biológiai aktivitással rendelkeznek (2. ábra). A lineáris konjugátumok, amelyek csak egy hatóanyagot tartalmaztak, részben a lassabb degradálódással, részben a rosszabb sejtbejutási képességük, vagy a keletkező metabolit szerkezete miatt nem mutattak tumorellenes hatást. A Dau=Aoa-KSKAAKN-OH (12) konjugátum esetében jó kötődés és sejtbejutás volt megfigyelhető, de az aktív metabolit (Dau=Aoa-Lys-OH) képződése lassú. Ezzel szemben a Dau=Aoa-SKAAKN-OH (11) konjugátum esetében a Dau=Aoa-Ser-OH metabolit keletkezése gyors, de a konjugátum kötődése és internalizációja alacsonynak bizonyult. A hatásbeli különbségek okainak részletesebb vizsgálata a további konjugátumok tervezése szempontjából lehet majd hasznos. Itt azonban a lineáris konjugátumok esetén tapasztalt tumorellenes hatás hiánya miatt ezeknek az okoknak további vizsgálata nem folytatódott.

Mindezek után a leghatékonyabb konjugátumot (Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH [15]) *in vivo* kísérletekben vizsgáltuk. A konjugátum hím Balb/c egereken nem mutatott sem akut toxicitást a vizsgált 25 mg Dau-tartalom/ttkg dózisban, sem krónikus toxicitást  $5 \times 10$  mg Dau-tartalom/ttkg dózisban (3. ábra). A tumornövekedés-gátlást nőstény SCID egerekbe sc. beültetett PANC-1 tumormoddellen vizsgáltuk. A konjugátumot 2 mg Dau-tartalom/ttkg, illetve 10 mg Dau-tartalom/ttkg dózisokban alkalmaztuk. A 74 napig tartó követés során az első kezelés a tumorbeültetés utáni 10. napon történt és az állatok összesen 18

**4. ÁBRA.** A Dau=Aoa-GFLG-K(Dau=Aoa)SKAAKN-OH konjugátum (15) hatása SCID egerekben (n=7/csoport) kialakított hasnyálmirigy-tumorra. A fekete és a piros nyilak a konjugátum, illetve a szabad Dau injekciós időpontjait jelzik. Az egerek testtömegét és a tumortérfogatát a 74. napig monitoroztuk (a, b). A tumor tömegének leérésére a kísérlet terminálása után került sor (c). A Dau-val kezelt csoportot a 28. napon terminálni kellett. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (Mann-Whitney-teszt)



kezelést kaptak (3-4 naponta). A kontrollként alkalmazott szabad Dau-t csak 3-szor tudtuk adni, mert az 1 mg/ttkg dózis ellenére a 2. kezelést követően (19. nap) az egerek rohamosan vesztek a súlyukból, így a 3. kezelést követően ebben a csoportban a kísérletet abba kellett hagyni. Mivel a PANC-1 tumor nagyon lassan nőtt az egerekben, így a Dau-kezelte állatok tumornövekedése irreleváns a kísérlet szempontjából, mert a termináció időpontjáig nem volt jelentős különbség a tumorok méretében az egyes csoportok között. A konjugátummal kezelt állatok esetén nem volt jelentős súlycsökkenés (0,8% és 4%, dózistól függően) az állatokban, és ez nem tért el szignifikánsan a kontrollcsoport (8,5%) egyedeitől (4.a ábra).

A tumortérfogat-változást (-gátlást) követve, a vizsgálat során megállapítható volt, hogy a 10 mg/ttkg dózissal kezelt állatok esetén a 67. napon volt a legnagyobb különbség a kontrollhoz képest (43% gátlás), míg a 70. napon a különbség enyhén csökkent (39,3% gátlás). A kisebb dózis esetén ezek az értékek 67. nap: 14,5% és 70. nap: 17,5% voltak (4.b ábra).

A kísérlet 74. napon történő befejezése után, a tumorok kioperálását követően, a tumortömegek nem mutattak ilyen különbséget a két alkalmazott dózis esetén. A tumortömegek szerinti növekedésgátlás 2 mg/ttkg dózis: 27,3% és 10 mg/ttkg dózis: 30,4% volt a kontrollhoz képest (4.c ábra).

## KONKLÚZIÓ

Munkánk során előállítottunk több mint 50 peptid-daunorubicin konjugátumot, ahol olyan peptidszekvenciákat alkalmaztunk, amelyek igazoltan képesek a hasnyálmirigy-tumorok felismerésére. Először tettünk kísérletet arra, hogy ezeket az irányítómolekulákat összehasonlítsuk és szerkezetüket optimalizáljuk. Az itt bemutatott néhány konjugátum segítségével kívánjuk szemléltetni, hogy milyen kis szerkezeti változtatások is milyen drasztikus változást okoznak a tumorelles hatásban *in vitro* körülmények között. Ezek a hatásbeli különbségek visszavezethetők a konjugátumok receptorkötődési és sejtbejutási képességére, valamint metabolizmusára. Természetesen még szélesebb spektrumú hatásmechanizmus-vizsgálatok szükségesek a további, még hatékonyabb vegyületek tervezése érdekében. Ugyanakkor az eddigi leghatékonyabb vegyület segítségével igazoltuk, hogy ezek a konjugátumok amellet, hogy nem mutatnak jelentős toxikus mellékhatást szemben a szabad hatóanyaggal, jelentős tumornövekedést gátló hatással rendelkezhetnek *in vivo* is. Mindazonáltal további fejlesztések szükségesek ahhoz, hogy olyan konjugátumokhoz jussunk, amelyek akár önmagukban, akár egy kiegészítő vagy kombinált kezelés részeként sikerrel alkalmazhatóak lehetnek az egyik legnehezebben gyógyítható rákos megbetegedés, a hasnyálmirigy-tumor ellen.

## IRODALOM

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68:7-30, 2018
2. Diab M, Azmi A, Mohammad R, Philip PA. Pharmacotherapeutic strategies for treating pancreatic cancer: advances and challenges. *Expert Opin Pharmacother* 20:535-546, 2019
3. Xie D, Xie K. Pancreatic cancer stromal biology and therapy. *Genes Dis* 2:133-143, 2015
4. Szepeshazi K, Schally AV, Block NL, et al. Powerful inhibition of experimental human pancreatic cancers by receptor targeted cytotoxic LH-RH analog AEZS-108. *Oncotarget* 4:751-760, 2013
5. Chari RV, Miller ML, Widdison WC. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl* 53:3796-3827, 2014
6. Orban E, Mezo G, Schlage P, et al. In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino Acids* 41:469-483, 2011
7. Reubi JC, Waser B, Friess H, et al. Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut* 42:546-550, 1998
8. Dupouy S, Mourra N, Doan VK, et al. The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as

9. Goedert M, Pittaway K, Williams BJ, Emson PC. Specific binding of tritiated neurotensin to rat brain membranes: characterization and regional distribution. *Brain Res* 304:71-81, 1984
10. Schuster S, Biri-Kovacs B, Szeder B, et al. Synthesis and in vitro biochemical evaluation of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III conjugates developed for targeted drug delivery. *Beilstein J Org Chem* 14:756-771, 2018
11. Kelly KA, Bardeesy N, Anbazhagan R, et al. Targeted nanoparticles for imaging incipient pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS Med* 5:e85, 2008
12. Bausch D, Thomas S, Mino-Kenudson M, et al. Plectin-1 as a novel biomarker for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 17:302-309, 2011
13. Joyce JA, Laakkonen P, Bernasconi M, et al. Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis. *Cancer Cell* 4:393-403, 2003
14. Valetti S, Mura S, Noiray M, et al. Peptide conjugation: before or after nanoparticle formation? *Bioconjug Chem* 25:1971-1983, 2014
15. Zhou W, Li Y, Gou S, et al. MiR-744 increases tumorigenicity of pancreatic cancer by activating Wnt/beta-catenin pathway. *Oncotarget* 6:37557-37569, 2015
16. Valetti S, Maione F, Mura S, et al. Peptide-functionalized nanoparticles for selective targeting of pancreatic tumor. *J Control Release* 192:29-39, 2014