



Hatóanyag-peptid konjugátumok szintézise, jellemzése és biológiai aktivitásának vizsgálata glióma kultúrákon

Baranyai Zsuzsa¹, Martin Krátký², Jarmila Vinšová²,
Matkó János³, Bősze Szilvia¹

¹ MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

² Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Csehország

³ ELTE, Immunológiai Tanszék

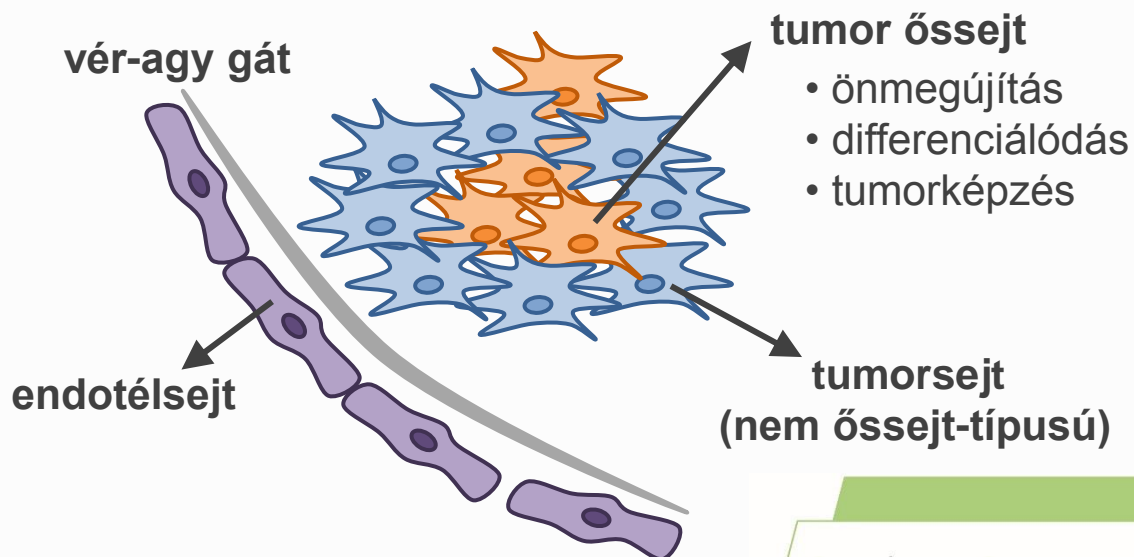
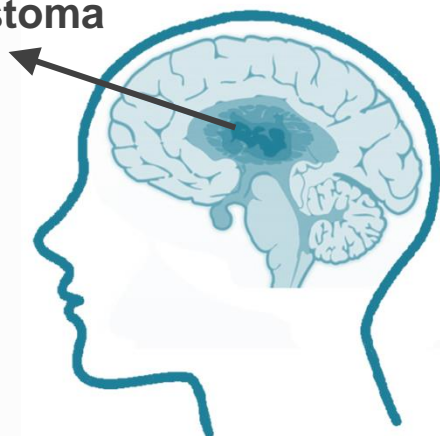
2018. 05. 29.
Balatonszemes

Bevezetés

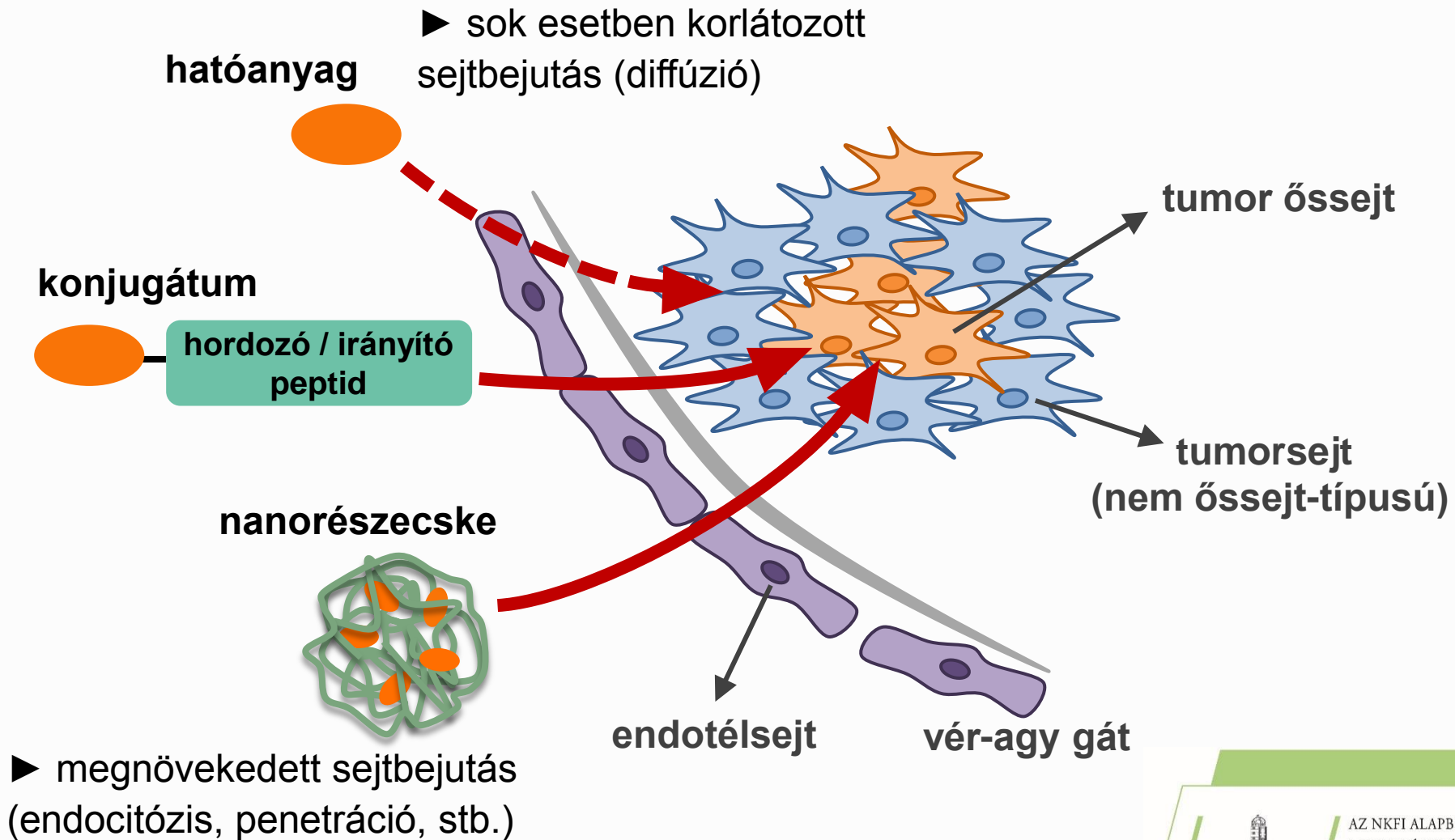
o glioblastoma multiforme (GBM):

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

glioblastoma



Hatóanyagok sejtbejutásának és biohasznosíthatóságának növelése



Hordozópeptidek

konjugátum



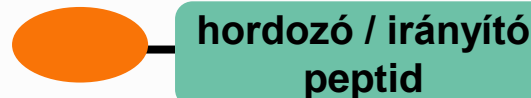
tuftsinszármazékok

pI. T5 = H-TKPKG-NH₂

- glioma sejteken túltermelődő neuropilin-1 receptorhoz kötődhetnek
- receptor mediált endocitózis

Hordozópeptidek

konjugátum

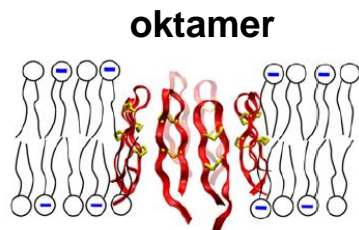
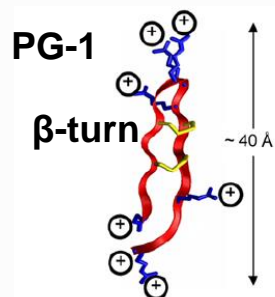


tuftsinszármazékok

pl. T5 = H-TKPKG-NH₂

SynB3-származékok

- **protegrin 1 (PG-1) peptid lineáris származéka**
(a protegrinek sertés leukocitákból izolált antimikrobiális peptidek)

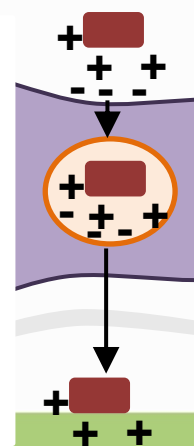


pórus formálás ► sejtlízis

PG-1 (18 aminosav) H-RGGRLC**Y**CRRRF**C**V**C**VGR-NH₂

SynB3 (10 aminosav) H-RRL**S****S**RRRF-NH₂

- **sejtpenetráló peptid** (rövid, kationos, amfipatikus peptidek)
- **átjutás a vér-agy gáton**
- **adszorpció mediált transzcitózis**



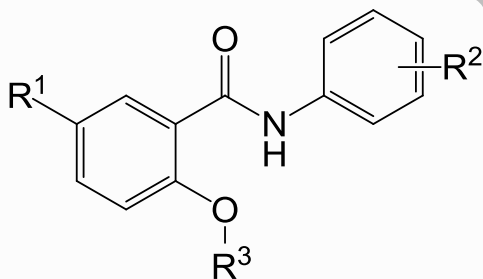
Célkitűzés

▶ tumoros sejtek és tumor őssejtek ellen kiemelkedő aktivitású hatóanyagok, biokonjugátumok és nanokonstrukciók fejlesztése

▶ új hatóanyagok

szalicilanilid
származékok

Sal



▶ hordozópeptidok

• receptor célzás:

tuftsinszármazékok

T5 = TKPKG

• sejtpenetráló peptidok:

SynB3-származékok

SynB3 = RRLSYSRRRF

▶ hatóanyag-peptid konjugátumok

szalicilanilidek

Sal

hordozópeptid

daunomicin

Dau

temozolomid

TMZ

▶ kémiai és funkcionális jellemzés

- modell sejtek
- *in vitro* citosztatikus hatás, sejtbefutás, stb.

Peptidek, konjugátumok előállítása

▶ peptidszármazékok:

aminooxiacetil

▶ konjugálás

szabad N-terminális
vagy acetil

▶ kontroll

fluoreszcens jelzés

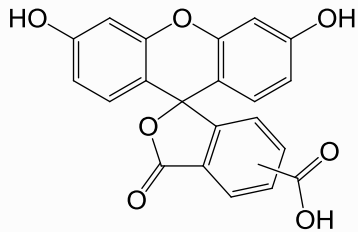
▶ sejtbejutás vizsgálata

← Aoa

← H/Ac

← Cf

Cf: 5(6)-karboxifluoreszcein



enzimlabilis

linker

hordozópeptid:

SynB3- vagy tuftsinszármazék

GFLG-RRLSYSRRRFK-NH₂

HN

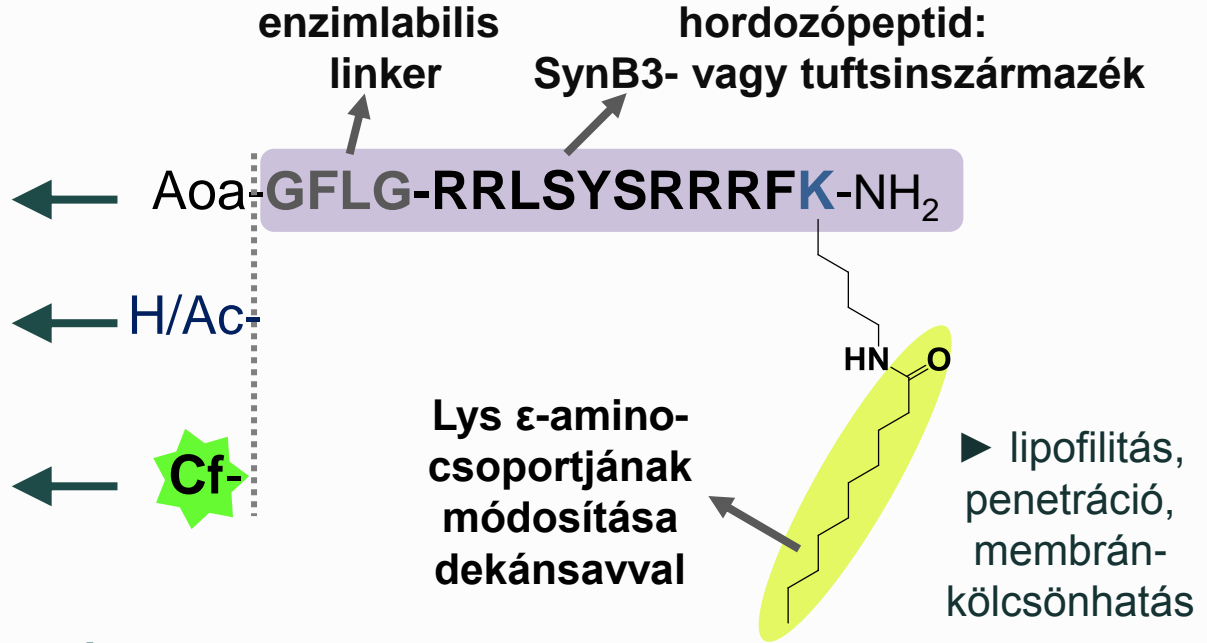
Lys ε-amino-
csoportjának
módosítása
dekánsavval

▶ lipofilitás,
penetráció,
membrán-
kölsönhatás

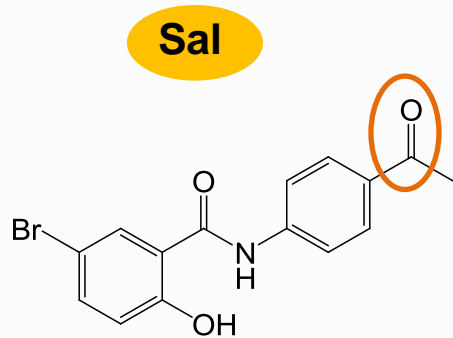
Peptidek, konjugátumok előállítása

▶ peptidszármazékok:

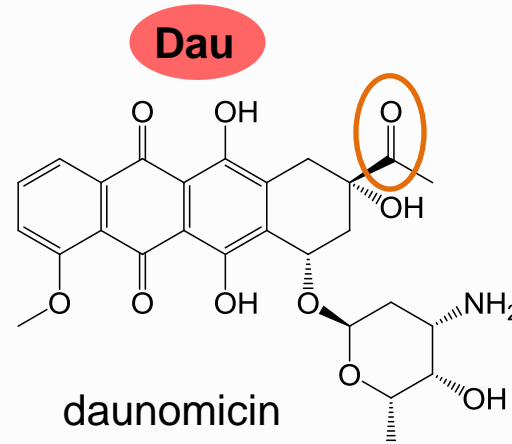
- aminooxiacetil
▶ konjugálás
- szabad N-terminális
vagy acetil
▶ kontroll
- fluoreszcens jelzés
▶ sejtbejutás vizsgálata



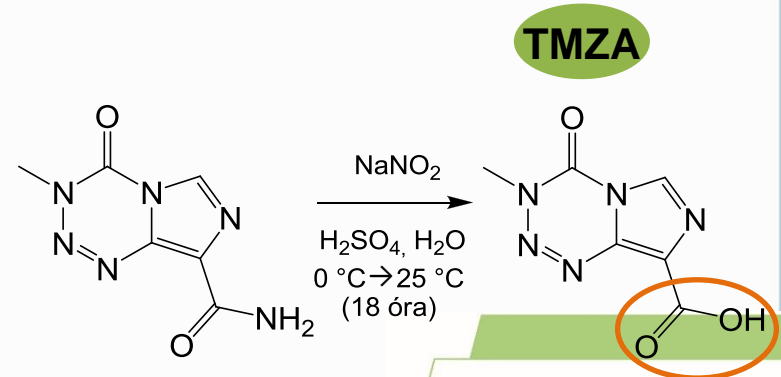
▶ konjugálható hatóanyagok:



szalicilanilid származék
(Sal8)



daunomicin

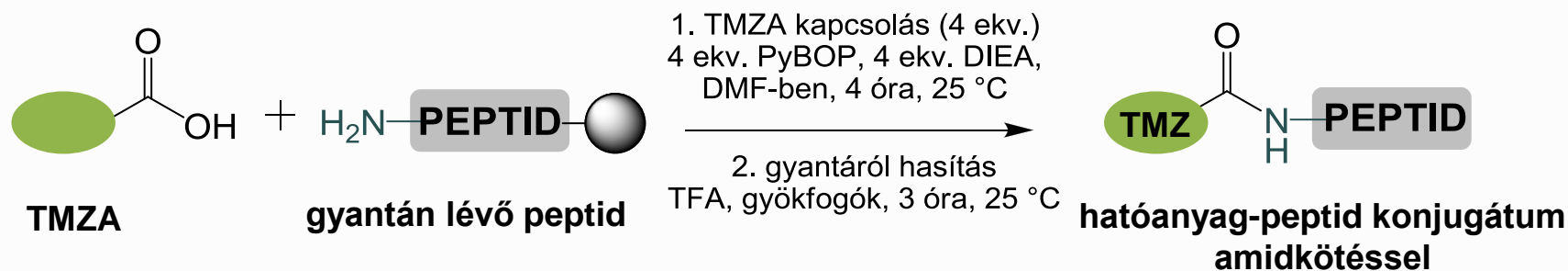
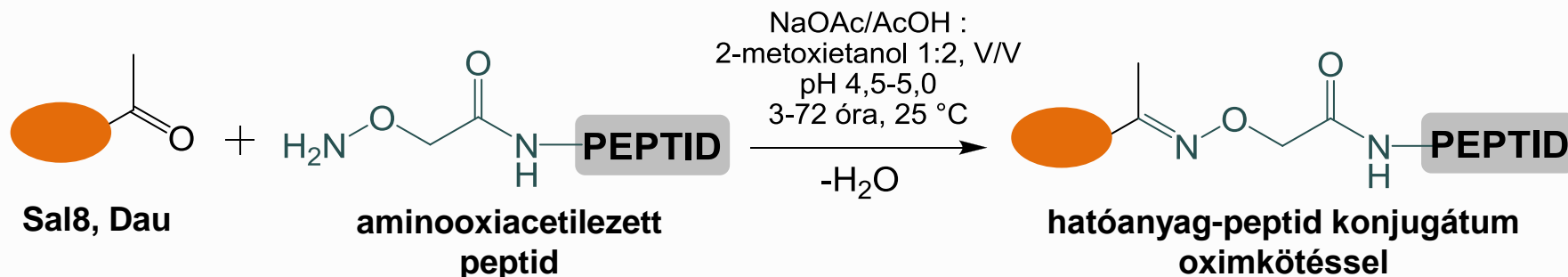


temozolomid

temozolomid-karbonsav

Peptidek, konjugátumok előállítása

▶ hatóanyag-peptid konjugátumok:



▶ kémiai jellemzés:

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

Peptidek, konjugátumok előállítása

► kémiai jellemzés:

kód	M számolt ^b	M mért ^b	Rt / perc ^c	stabilitás, t _{1/2} / óra ^d
Sal8	333,0	333,1	20,5	>24
Dau	527,2	527,0	15,6	>24
TMZ	194,1	194,1	nd ^e	nd
TMZA	195,0	195,1	nd	nd
Sal8-Aoa-SynB3	1784,8	1784,4	14,7	>24
Sal8-Aoa-GFLG-SynB3	2159,3	2158,9	16,0	>24
Sal8-Aoa-T5	917,9	918,4	15,6	>24
Sal8-Aoa-T5(4-dek)	1072,1	1072,6	19,8	>24
Dau-Aoa-SynB3	1978,2	1977,5	13,3	>24
Dau-Aoa-GFLG-SynB3	2352,6	2351,9	14,4	>24
TMZ-SynB3	1572,7	1572,5	12,3	0,12
TMZ-GFLG-SynB3	1947,2	1947,0	13,7	0,11

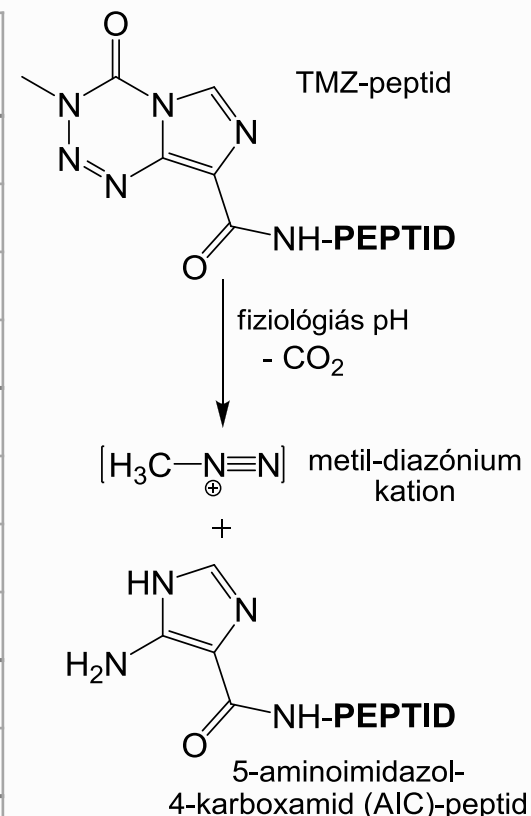
^a Aoa = aminosziáccetil, SynB3 = RRLSYSRRRF, T5 = TKPKG

^b számolt és mért átlagos (M>600) vagy monoizotópos (M<600) molekulatömeg (Bruker Esquire 3000+ ESI-MS)

^c retenciós idő (Exformma HPLC; Waters C18 (5 µm, 100 Å, 4,6 mm x 150 mm); gradiens: 0-5 perc 0% B, 5-15 perc 0-60% B, 15-25 perc 60-100% B; eluensek: A: 0,1% TFA, víz (V/V), B: 0,1% TFA, acetonitril/víz 80:20 (V/V); folyássebesség: 1 mL/perc; detektálás: 220 nm)

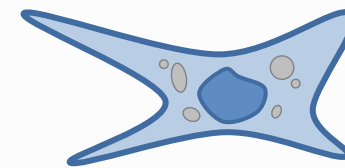
^d stabilitás szérumban RPMI-1640 médiumban, analitikai RP-HPLC, ESI-MS segítségével

^e nd: nincs meghatározva



In vitro sejtbejutás – glioma modell





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





U87
humán glioblastoma

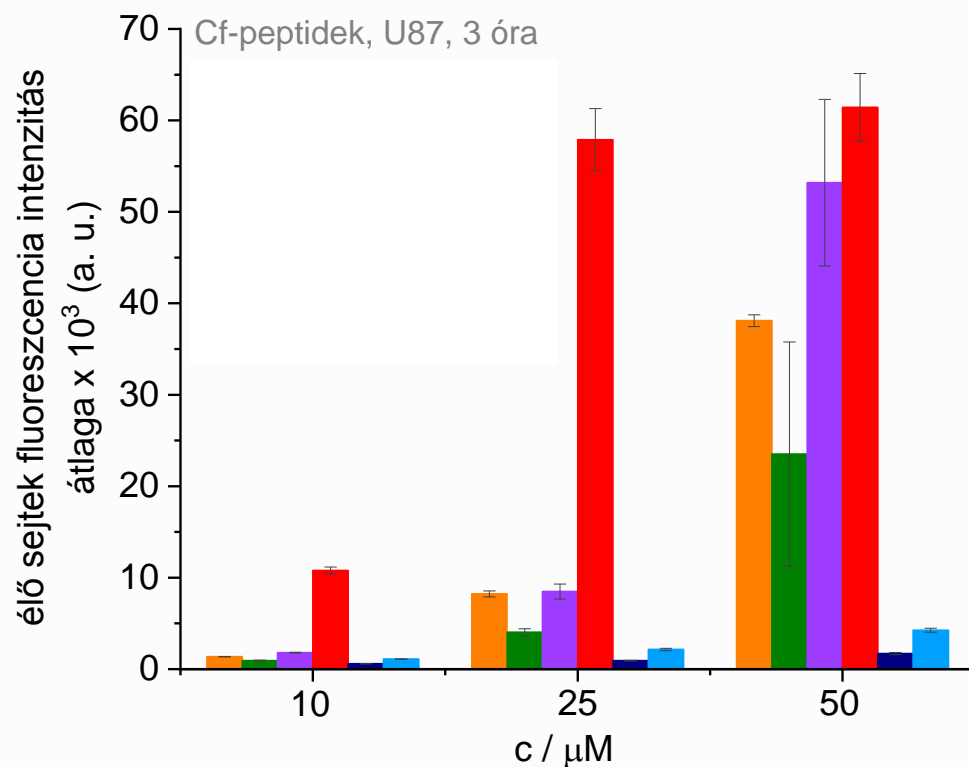
kód szekvencia

SynB3 származékok

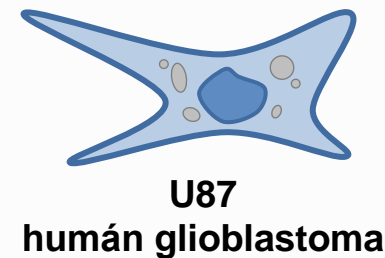
	Cf-SynB3	Cf-RRLSYSRRRF
	Cf-GFLG-SynB3	Cf-GFLG RRLSYSRRRF
	Cf-SynB3K	Cf-RRLSYSRRRFK
	Cf-SynB3K(dek)	Cf-RRLSYSRRRFK(dekanoil)

tuftsin származékok

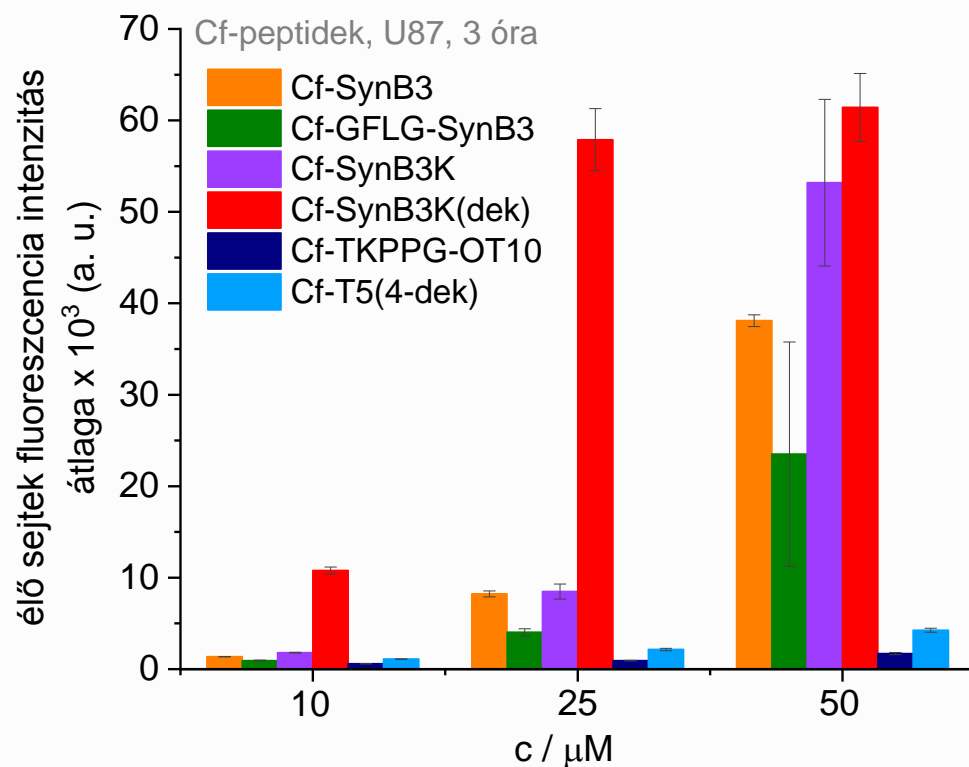
	Cf-TKPPG-OT10	Cf-TKPPG TKPKG TKPKG
	Cf-T5(4-dek)	Cf-TKPK(dekanoil)G



In vitro sejtbejutás – glioma modell



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



► SynB3 származékok:

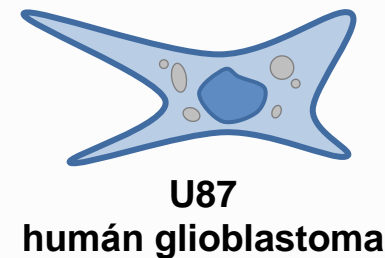
- hasonló sejtbejutási profil (koncentrációfüggés)
- Cf-SynB3K(dek) – dekanoil oldallánc hatása: jobb sejtbejutás, de citotoxikus hatás jelentkezik (IC_{50} : 34,8 μM)

► tuftsin származékok:

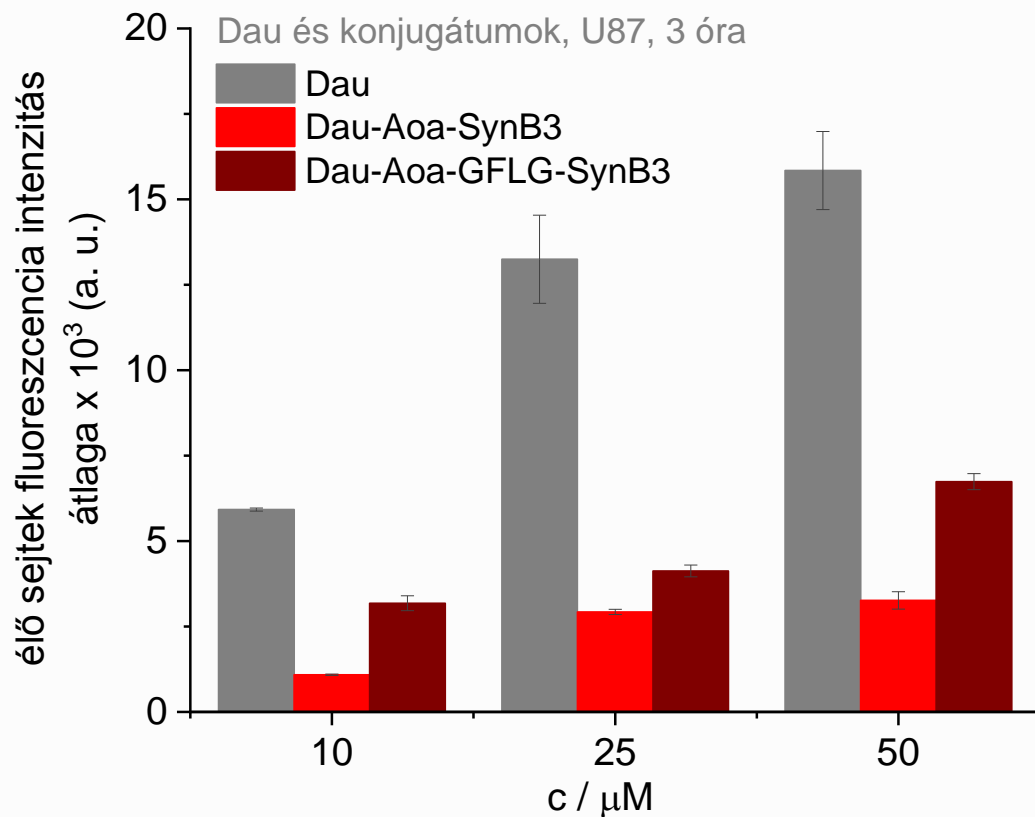
- kisebb mértékben jutnak be
- Cf-T5(4-dek) dekanoil oldalláncú peptid nem citotoxikus

IC_{50} : 50%-os gátló koncentráció

In vitro sejtbejutás – glioma modell



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



IC_{50} : 50%-os gátló koncentráció

kód	citotoxicitás IC_{50} (μM)
Dau	37,1
Dau-Aoa-SynB3	42,9
Dau-Aoa-GFLG-SynB3	19,6

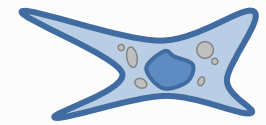
► Dau:

- a vegyületre jellemzően nagymértékű sejtbejutás, azonban nem szelektív

► konjugátumok:

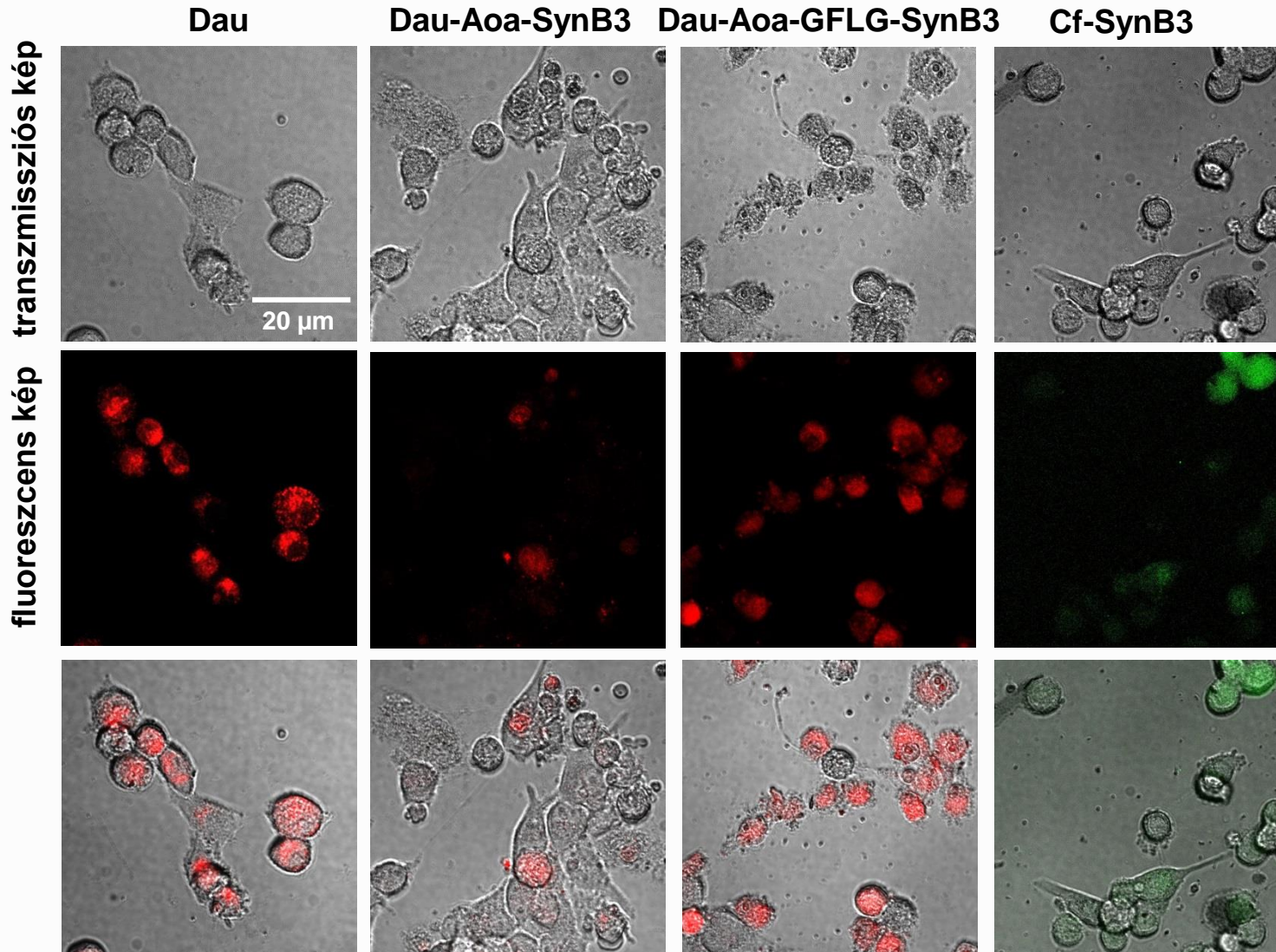
- bejutnak a célsejtekbe, és kifejtik gátló hatásukat
- enzimlabilis GFLG linker szerepe

In vitro sejtbejutás – glioma modell

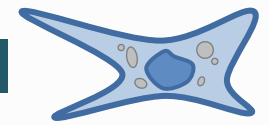


U87
humán glioblastoma

- konfokális mikroszkóp (Olympus FluoView 500, λ_{ex} = 543 nm; 488 nm, 40X)
- kezelés: 25 μ M, 30 perc

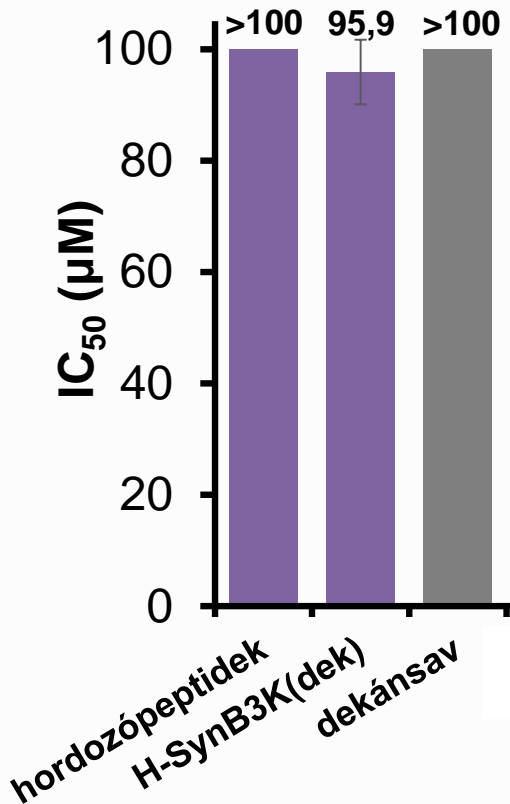


In vitro citosztatikus hatás – glioma modell



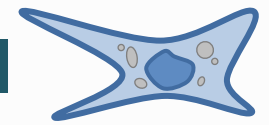
U87
humán glioblastoma

- 3 óra kezelés, mosás, 72 óra továbbtenyésztés után MTT teszt



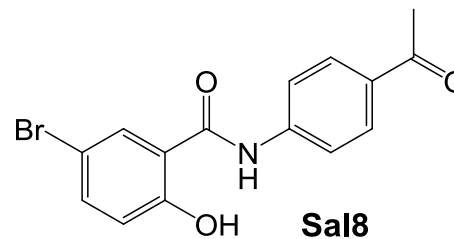
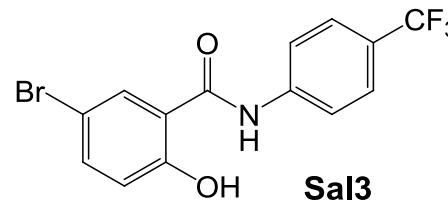
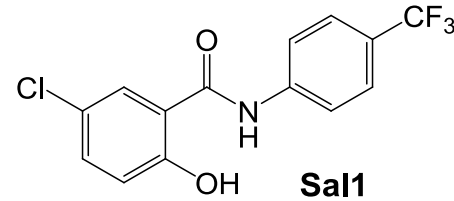
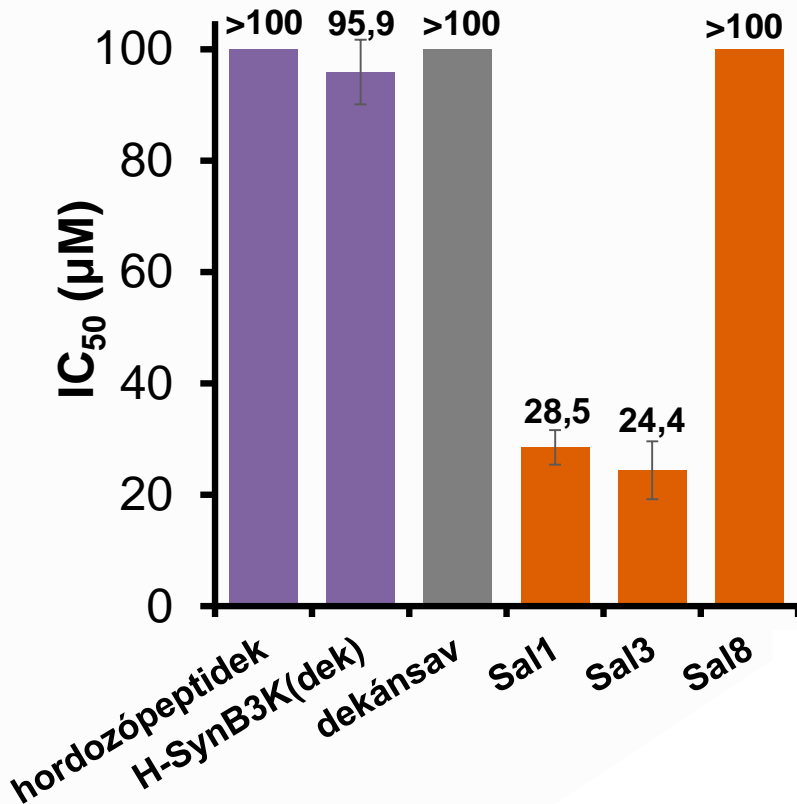
IC₅₀: 50%-os gátló koncentráció

In vitro citosztatikus hatás – glioma modell



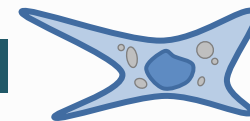
U87
humán glioblastoma

- 3 óra kezelés, mosás, 72 óra továbbtenyésztés után MTT teszt



IC₅₀: 50%-os gátló koncentráció

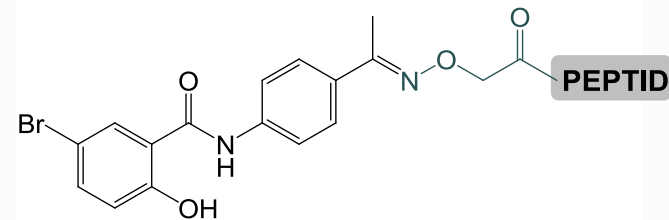
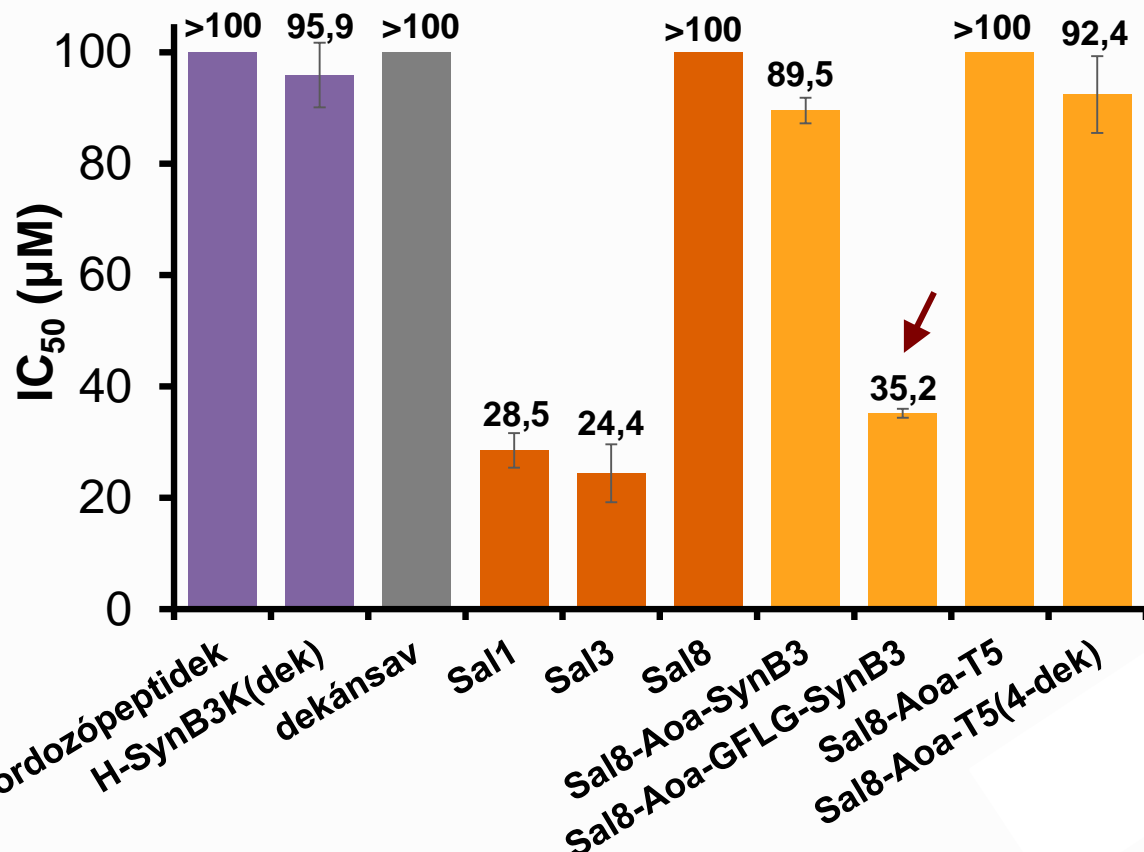
In vitro citosztatikus hatás – glioma modell



U87

humán glioblastoma

- 3 óra kezelés, mosás, 72 óra továbbtenyésztés után MTT teszt

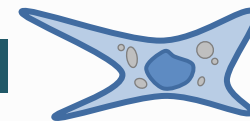


szalicilanilid-konjugátumok

► Sal8 konjugátumok többsége citosztatikus hatású

IC₅₀: 50%-os gátló koncentráció

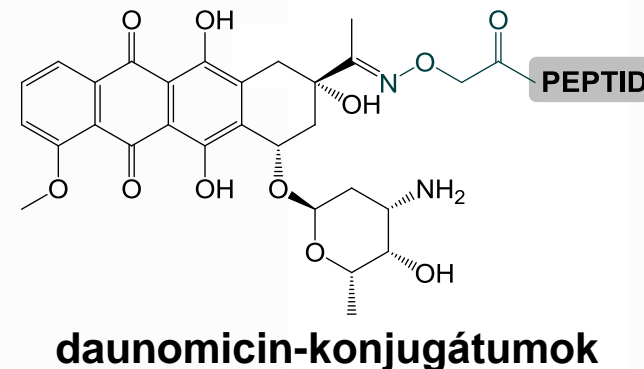
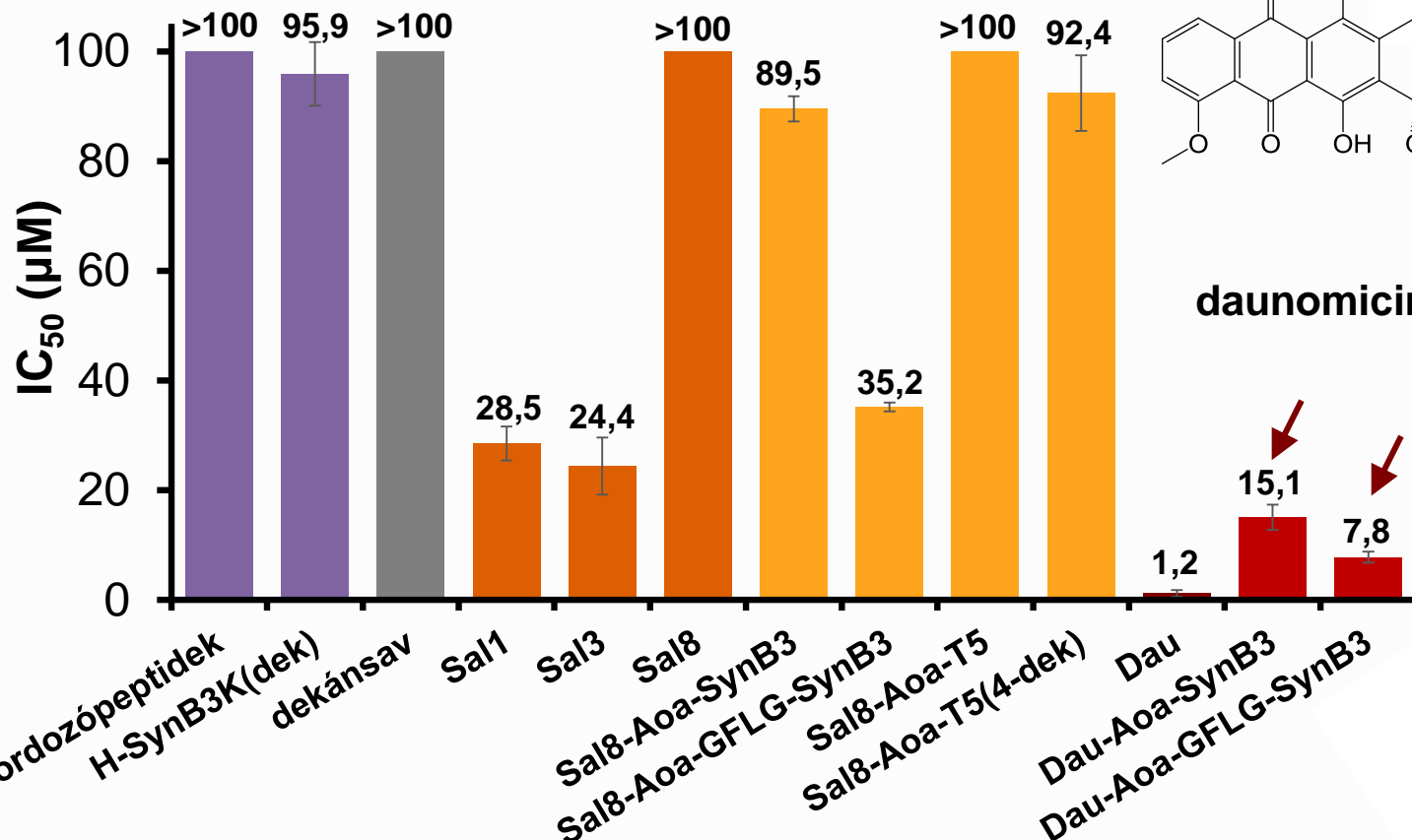
In vitro citosztatikus hatás – glioma modell



U87

humán glioblastoma

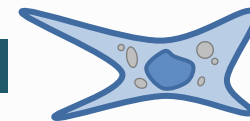
- 3 óra kezelés, mosás, 72 óra továbbtenyésztés után MTT teszt



- ▶ Sal8 konjugátumok többsége citosztatikus hatású
- ▶ Dau citosztatikus hatása megmarad a konjugátumban

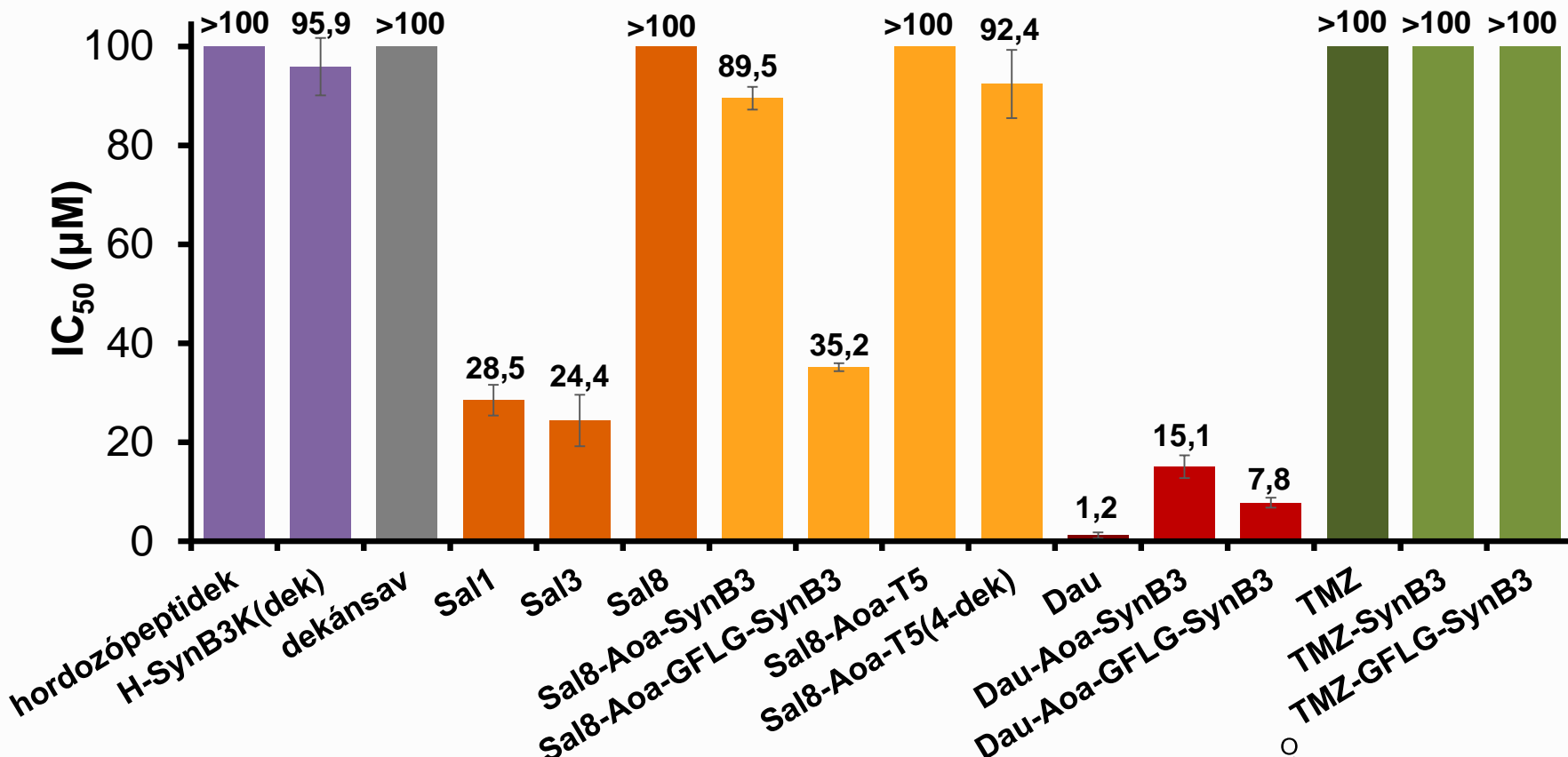
IC₅₀: 50%-os gátló koncentráció

In vitro citosztatikus hatás – glioma modell



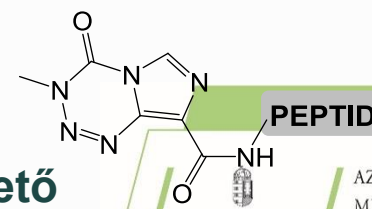
U87
humán glioblastoma

- 3 óra kezelés, mosás, 72 óra továbbtenyésztés után MTT teszt



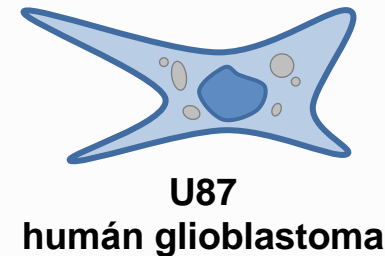
- ▶ Sal8 konjugátumok többsége citosztatikus hatású
- ▶ Dau citosztatikus hatása megmarad a konjugátumban
- ▶ TMZ konjugátumok nem stabilak, *in vitro* hatás nem mérhető

IC₅₀: 50%-os gátló koncentráció

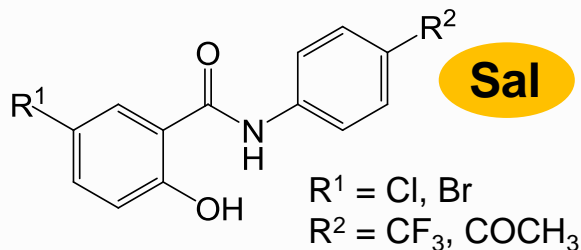


temozolomid-konjugátumok

Összefoglalás



► szalicilanilid származékok



- *in vitro* antitumor aktivitás
halogén szubsztituens szerepe

► hordozópeptidek

Cf — tuftsinszármazékok

Cf — SynB3-származékok

- *in vitro* sejtbejutás
hatékonyabb: SynB3-származékok

► hatóanyag-peptid konjugátumok

Sal — hordozópeptid

Dau — hordozópeptid

TMZ — hordozópeptid

- *in vitro* antitumor aktivitás:
Sal8 önmagában nem, konjugátuma citosztatikus hatású
Dau hatása megmarad a konjugátumban,
sikeres sejtbejutás

- *in vitro* antitumor aktivitás nincs a kísérleti körülményeknél
nem stabil molekulák

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 (NKVP_16-1-2016-0036)

MedInProt Mentor-növendék program

Köszönöm a figyelmet!

