



Variációk egy témára: Gyógyszerek célba juttatása peptidekkel

Mező Gábor

ELTE TTK, Kémiai Intézet
ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport



Zemplén Géza Fődj
MTA, Budapest
2018. 12. 17.



Zemplén Géza



1883-1956

1908-1910 Emil Fischer laboratóriumában Berlinben dolgozik:

Synthese der beiden optisch aktiven Proline

1913 József Műegyetem pályázatot hirdet
organikus kémia tanszék megszervezésére.

"A mai kémia művelésére ő van a legalaposabban felkészítve és fiatalságának ellenére neki van a legnagyobb és legértékesebb munkássága. **A poliszaccharidok vizsgálata terén akkora gyakorlatra tett szert,** hogy tőle új kutatási irányok kijelölését, eddig ismeretlen, ipari termelésre alkalmas termékek felfedezését méltán várják....."

Természetben előforduló flavon-glikozidok;

növényekből való izolálás

szerkezet felderítés

szintézis

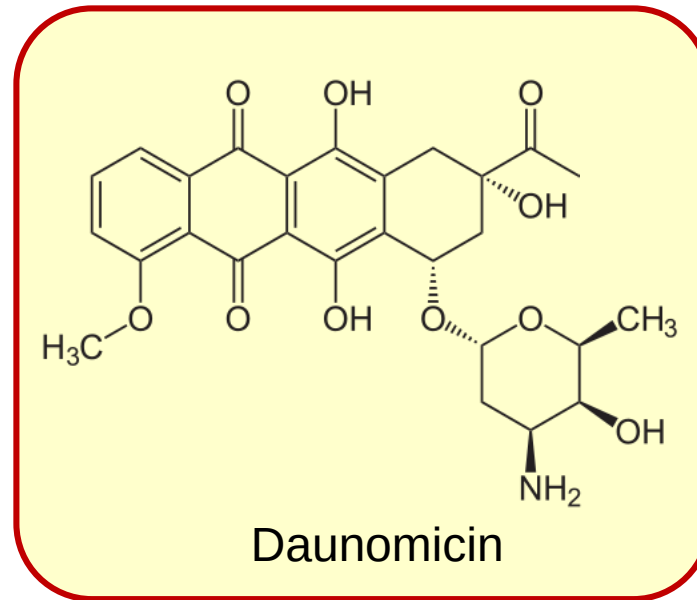


A mai főszereplő

Streptomyces peucetius baktérium



Aglikon rész:
tetraciklin váz



Cukor rész:
L-daunozamin



Tumorellenes hatású kemoterápiás szer

Célzott tumor kemoterápia szemben a hagyományos kemoterápiával

Hagyományos kemoterápia

- szelektivitás hiánya
- gyors kiürülés a szervezetből
- multidrog rezisztencia
- gyógyszer specifikus mellékhatások

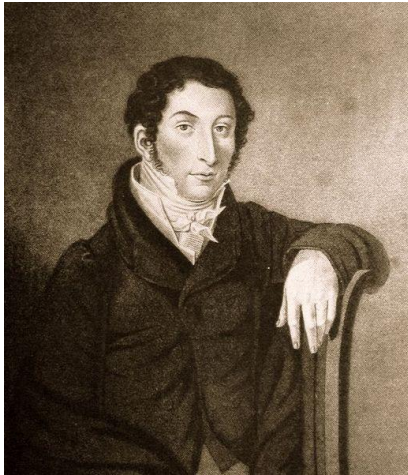
Célzott kemoterápia

- fokozott szelektivitás
- csökkent nem kívánatos toxicitás
- gyógyszer rezisztencia elkerülése



MAGIC BULLET

Egy kis kitérő az operák világába



Carl Maria von Weber
(1786-1826)



A bűvös vadász

Dalszöveg: Johann Friedrich Kind írta Johann August Apel és Franz Laun Kísértetkönyv című könyve alapján

Egy udvari másoderdészi cím és egy lány kezének biztos elnyeréséért, Max a sötét hatalmak erejét igénybe véve mágikus golyókat öntet, hogy minden lövése célba találjon (hat golyó, de van egy hetedik).

Mi is ilyen **mágikus golyót** szeretnénk készíteni a rák ellen,
de nem a sötét hatalmak, hanem a **tudomány segítségével**.

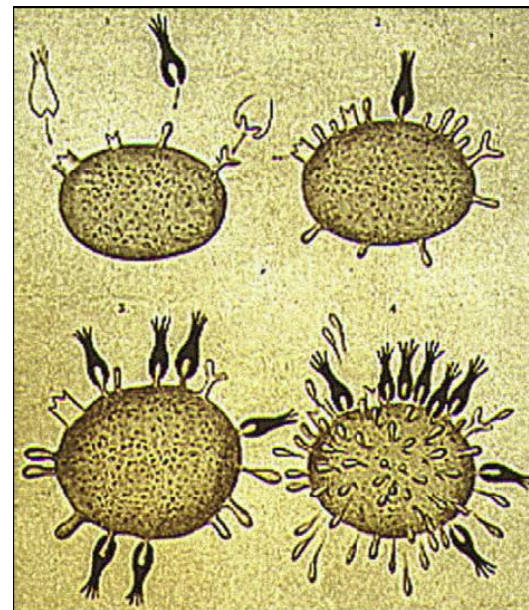
A mágikus golyó elmélete



Paul Ehrlich (1854-1915)

- 1908 Orvosi Nobel Díj : immunológiai kutatásokért
- 1909 Salvarsan felfedezése (szifilisz elleni gyógyszer)
- Kemoterápia elnevezés
- Mágikus golyó (Magic bullet, Zauberkugel)

Oldallánc elmélet



Oldallánc elmélet



Receptor elmélet

Oldallánc, ami csak a parazitákon található, de a megtámadott sejten vagy szervezen nem



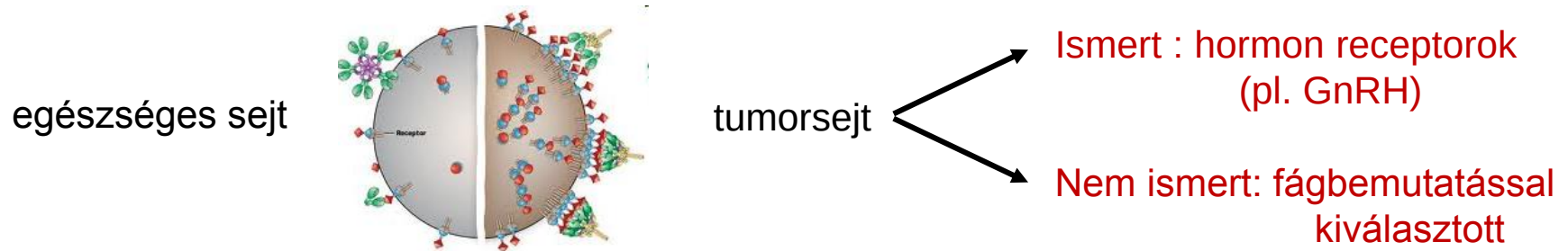
Hatóanyagok szelektív célbajuttatása ellenanyagok segítségével

Célpont

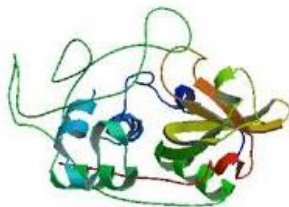
A terápia fokozott szelektivitásának lehetősége az egészséges sejtek és a tumorsejtek különbségén alapul

Néhány különbség az egészséges és tumorsejtek, szövetek között:

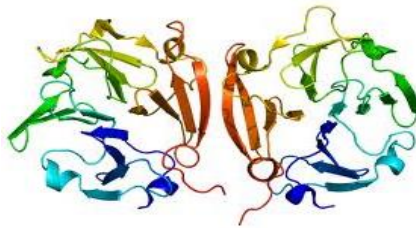
Sejtfelszíni (pl. tumorspecifikus vagy túltermelődött receptor)



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

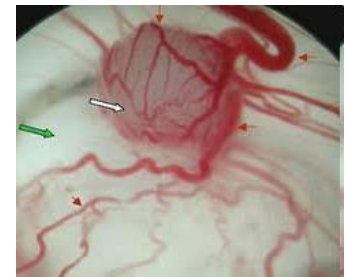


katepszin B

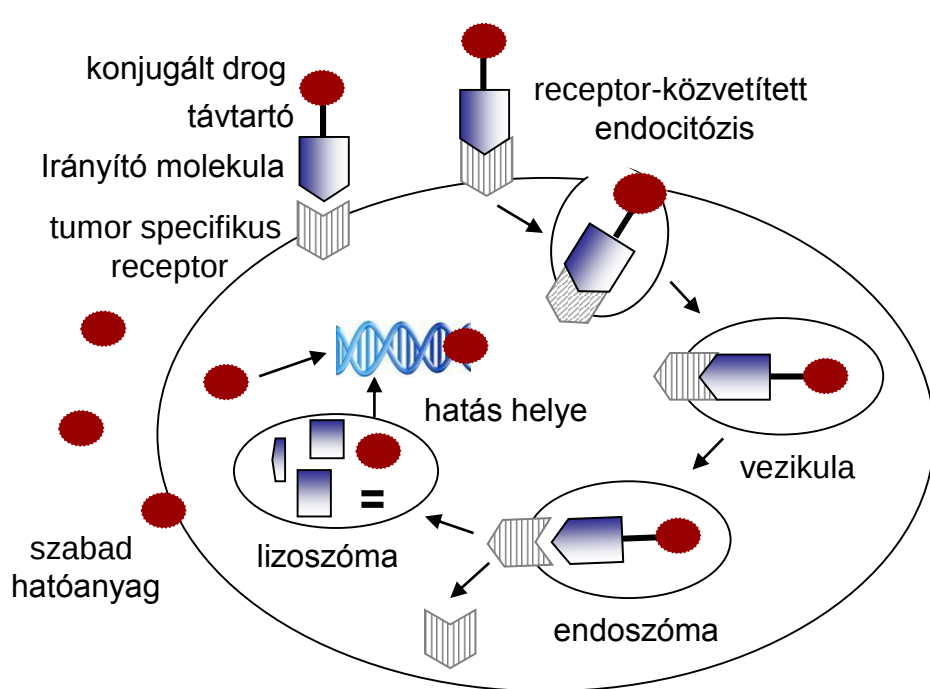


mátrix metallopeptidáz 9
(MMP9)

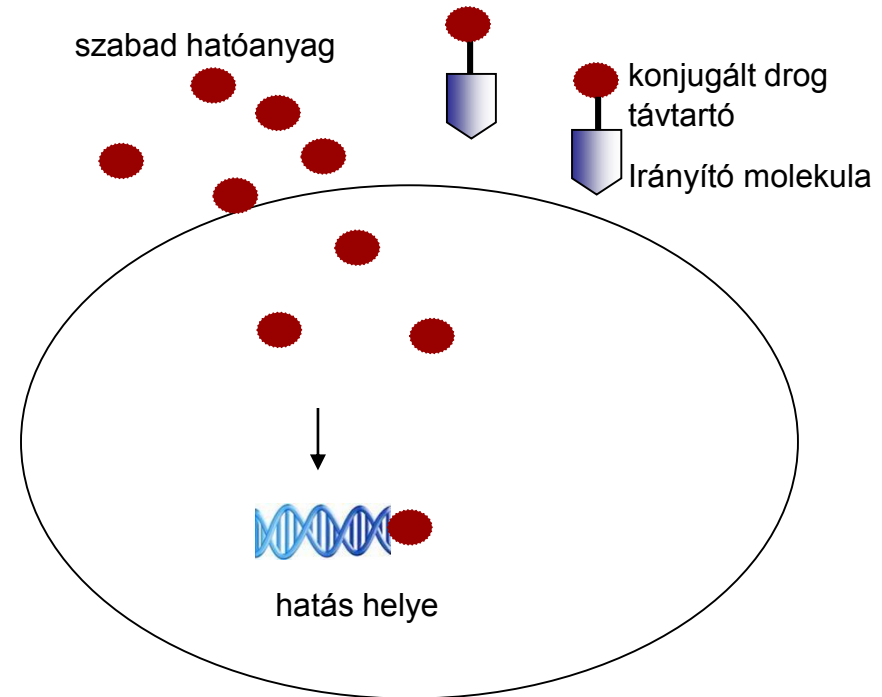
Lokalizálható „szilárd” tumorok (pl. újonnan kialakult vérerek)



Irányított/célzott tumorterápia



Receptor pozitív tumor sejt



Receptor negatív sejt

Előnyök:

- **szelektivitás növelése**
(pl, receptor-közvetített endocitózis)
- **retard hatás és csökkent toxicitás**
(lassú hatóanyag felszabadulás)

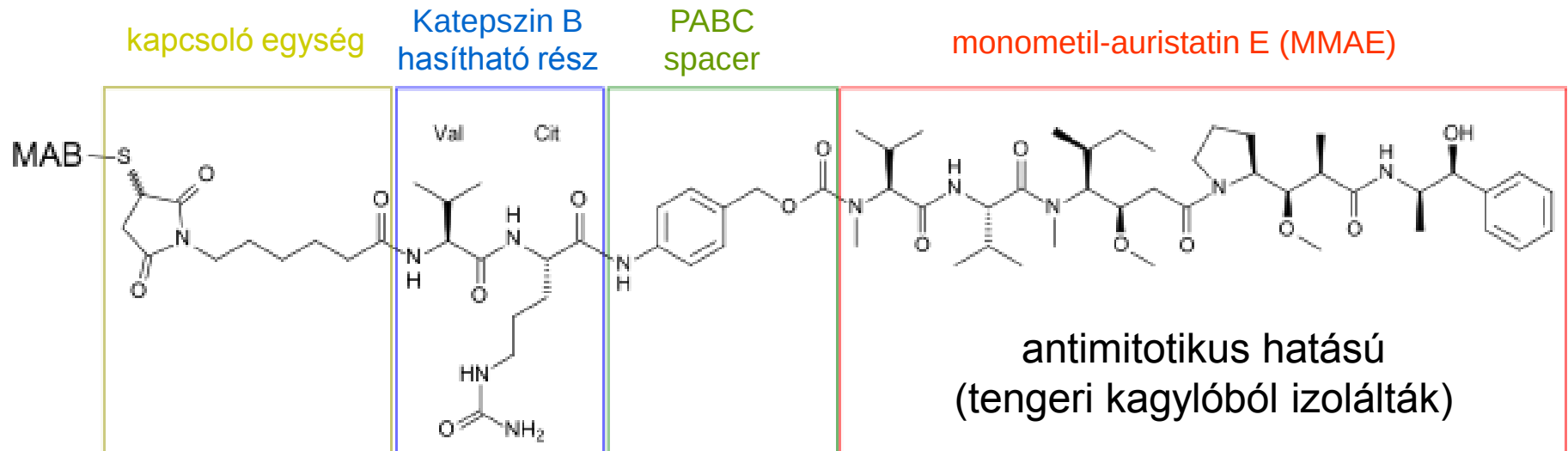
Irányító molekulák:

- cukrok
- lektinek
- ellenanyagok
- **receptor ligandumok** (pl. hormon peptidek)

Ellenanyag – hatóanyag konjugátumok (Antibody Drug Conjugates; ADCs)

Adcetris (Seattle Genetics, Bothell, WA)

brentuximab vedotin



Ciszteinhez kapcsolva 1-2 hatóanyag az ellenanyagon

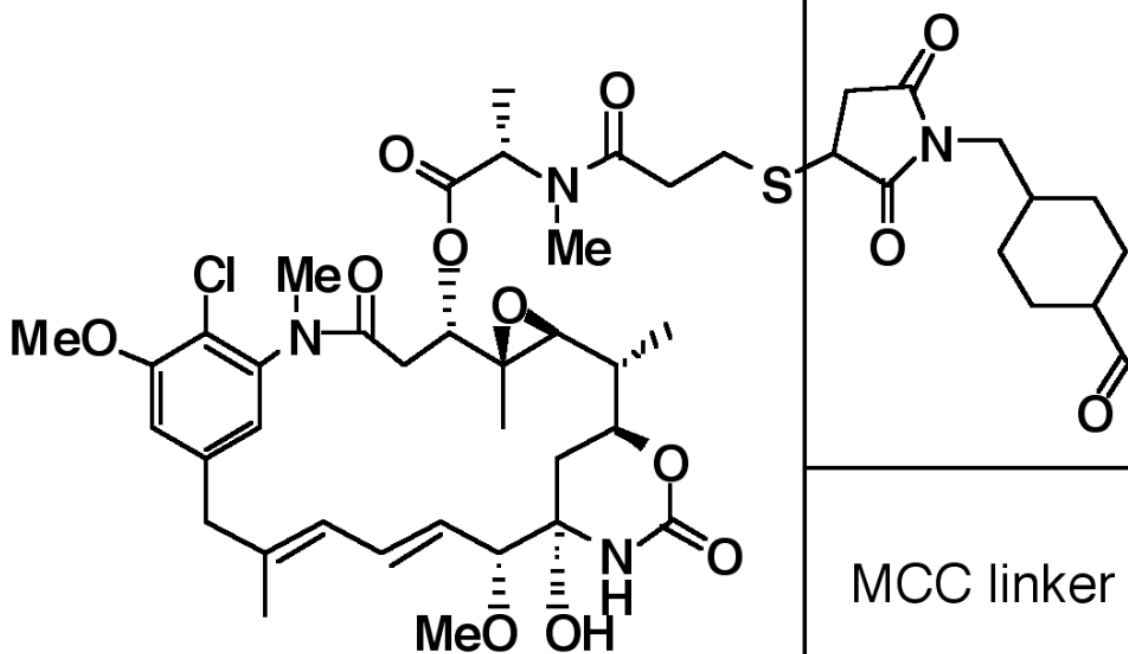
Alkalmazás: non-Hodgkin limfóma

Ellenanyag – hatóanyag konjugátumok (Antibody Drug Conjugates; ADCs)

Kadcyla (Genentech, South San Francisco, CA)

Mertansine (emtansine, tubulin inhibítor)

Trastuzumab
(HER2 receptor
ellenanyag)



DM1/Mab ~ 3,5

n

MCC: 4-(maleimidylmethyl) cyclohexane-1-carboxylate

Ellenanyag vagy kismolekula - hatóanyag konjugátumok (ADCs vs. SMDCs)

Előnyök

Hátrányok

ADCs:

nagy specifitás
hosszú élettartam
hatékony internalizáció

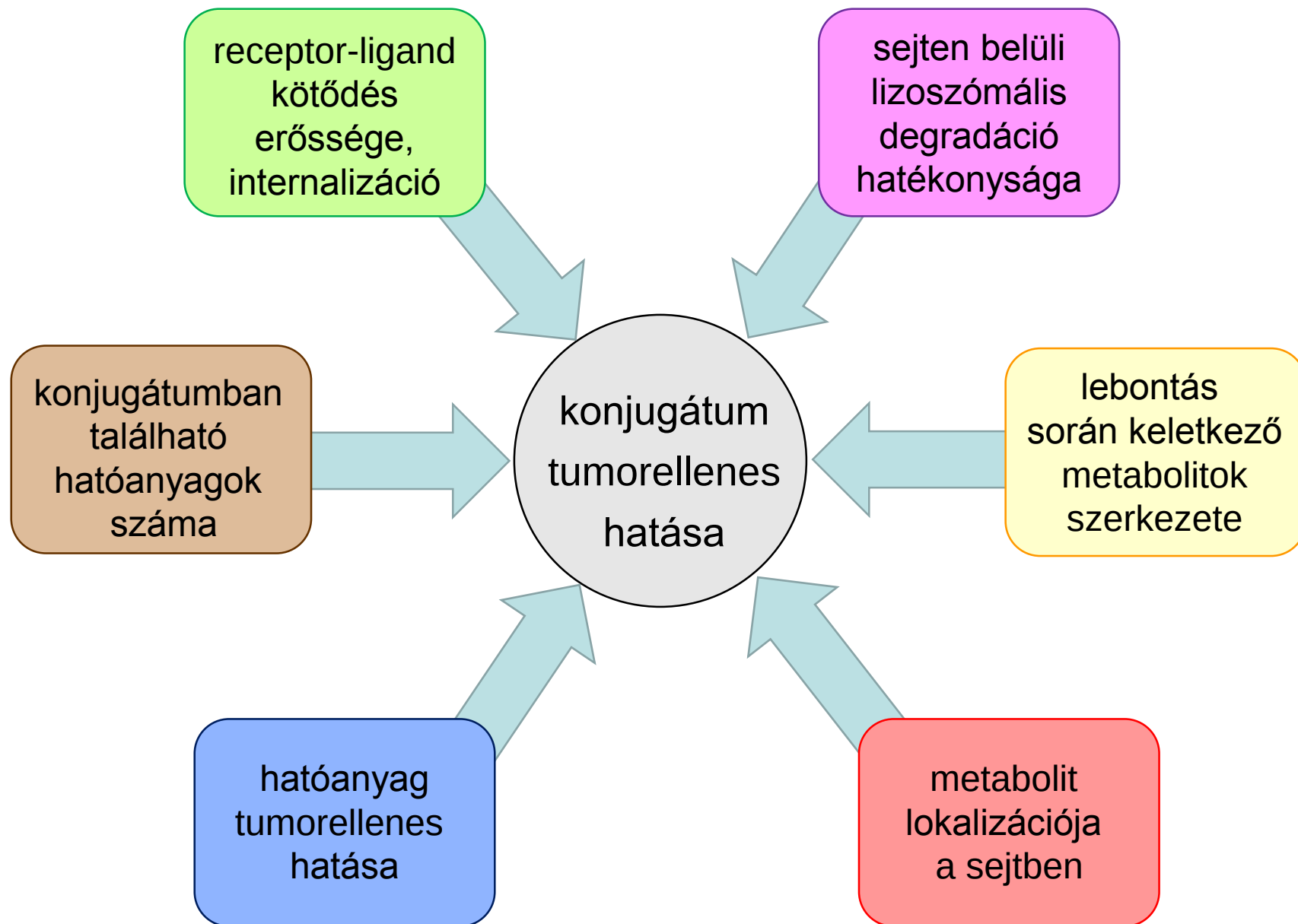
rossz permeabilitás
esetleges immunogenitás
kevés hatóanyag
alacsony terápiás index
magas költségek

SMDCs:

tumor szelektivitás
magas hatóanyag tartalom
nem immunogén
nagyobb szövet penetráció
olcsóbb

kisebb mint az ADCs
gyors metabolizmus
és kiürülés

A konjugátumok tumorellenes hatását befolyásoló tényezők



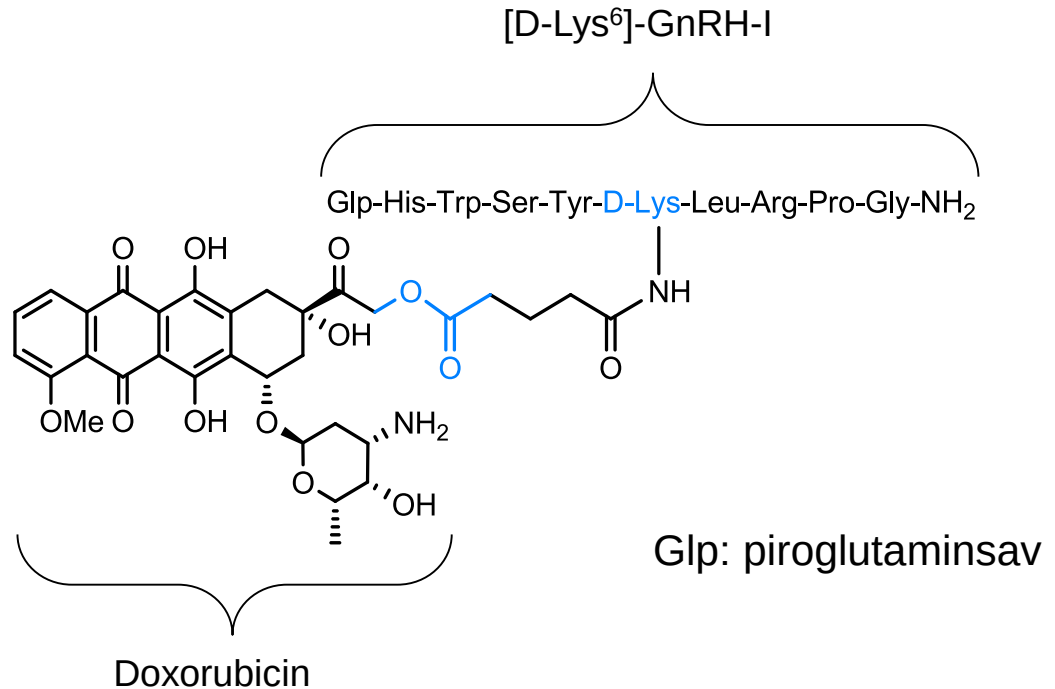
Doxorubicin-[D-Lys⁶]-GnRH-I (AEZS-108, AN-152)

Zoptarelin doxorubicin (AEterna Zentaris Inc.)



Andrew V. Schally

1977 Orvosi Nobel Díj



- [D-Lys⁶]-GnRH-I egy GnRH-I agonista analóg
- Észter-kötéssel kapcsolják a doxorubicinhez glutársav linkeren keresztül
- ***Klinikai Fázis III-ben elbukott***
- ***Észter-kötés gyors lebomlása humán szérumban ($t_{1/2} \sim 2$ óra)***
karboxil-észterázok hatására

GnRH-III a nagy tengeri ingolából izolált GnRH analóg



GnRH-I: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

GnRH-III: Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

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

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

Daunomicin-GnRH-III konjugátumok tervezése

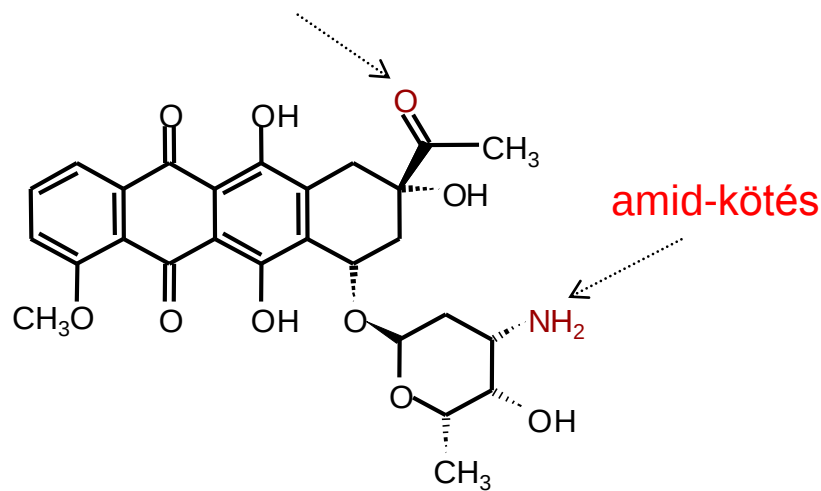


→ a Lys⁸ ε-aminocsoportja felhasználható konjugálásra

→ a Lys⁸ bázikus oldalláncának módosítása nem eredményezi a receptor kötődés és az antiproliferatív hatás elvesztését, de tovább csökken a hormon hatása

kemoszelektív ligáció:

oxim-, hidrazon-kötés



Toxikus mellékhatások:

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

Daunomicin konjugálása peptidhez oxim-kötés kialakításával

Glp-His(Trt)-Trp-Ser(^tBu)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(Mtt)-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

Aoa: aminooxiecetsav

Glp: piroglutaminsav

Mtt: metiltritil

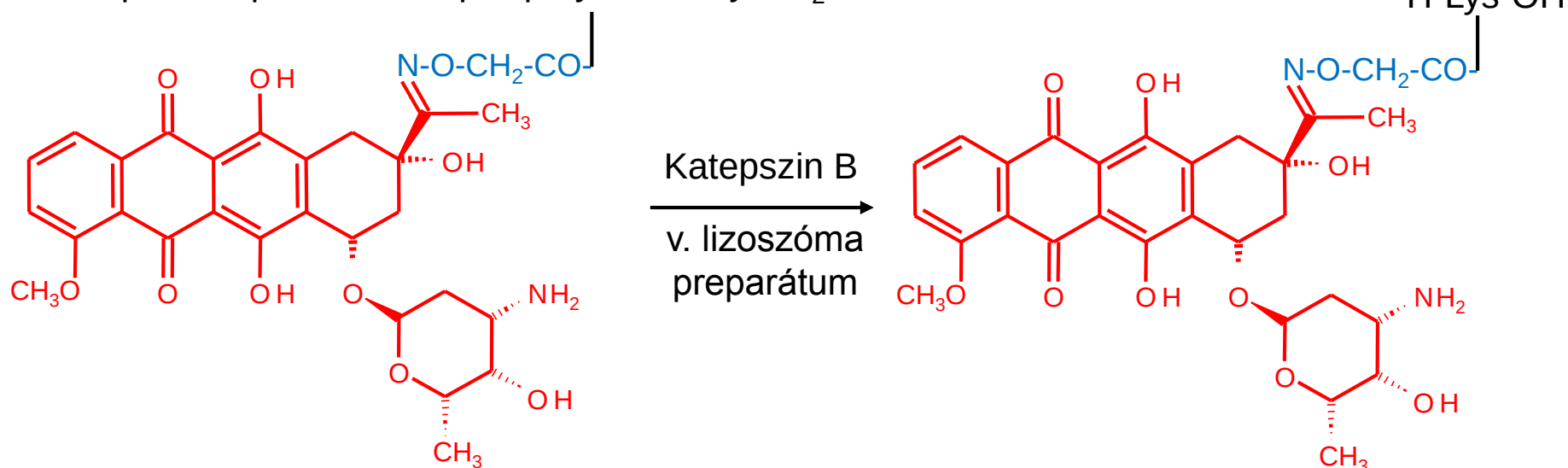
MBHA: 4-metilbenzhidrilamin

1. 2% TFA/DCM (6x5 perc)
2. 10% DIEA/DCM (4x1 perc)
3. 3 ekv. Boc-Aoa-OH-PyBOP-DIEA (3:3:6 ekv.)/DMF(40 perc)
4. 95% TFA, 2,5% TIS, 2,5% víz (2 óra)

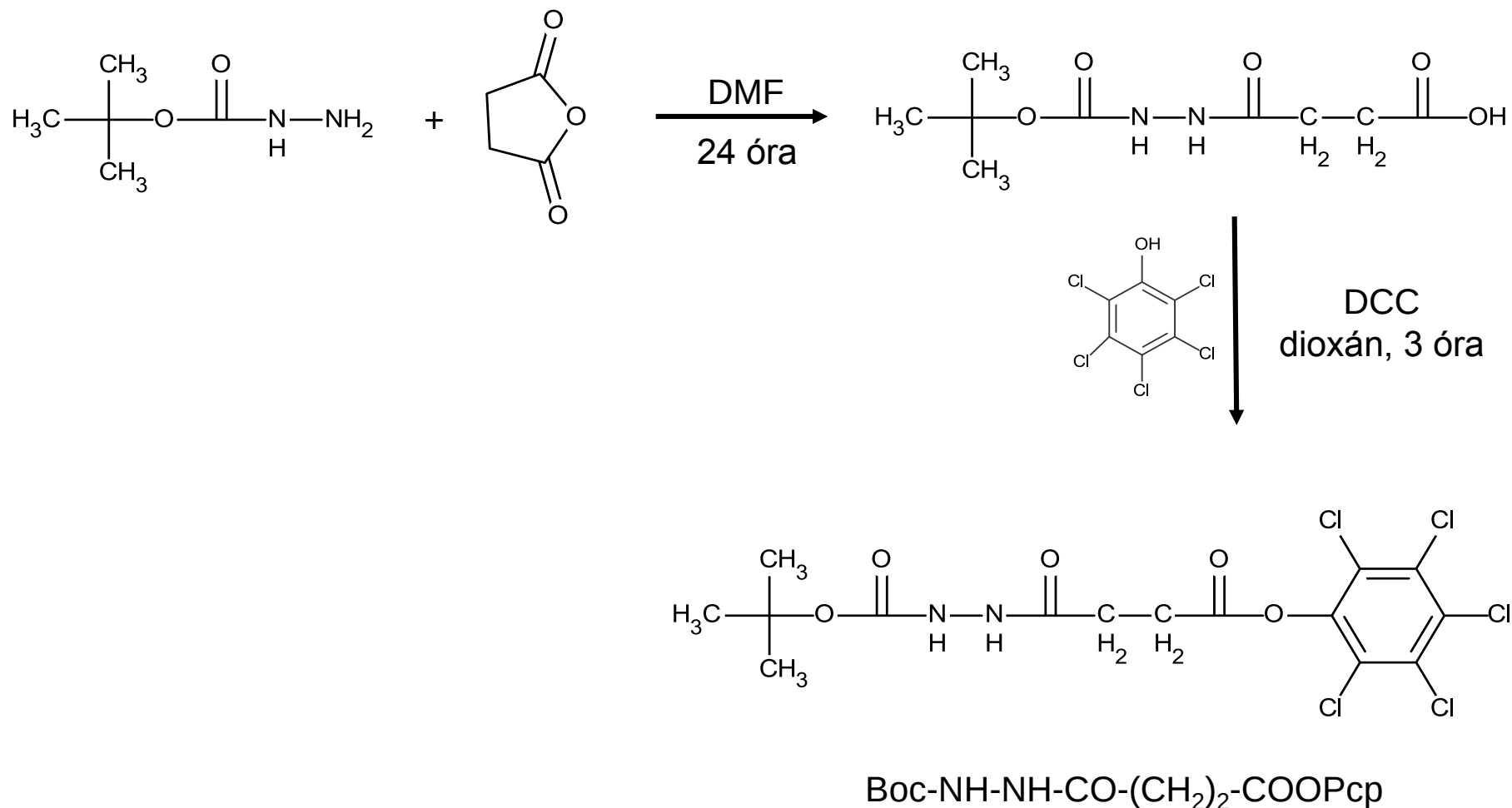
Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Aoa)-Pro-Gly-NH₂

1,2 ekv. Dau/ 0,2 M NaOAc (pH 5), 12 óra

Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



Reagens készítése hidrazon-kötés kialakításához

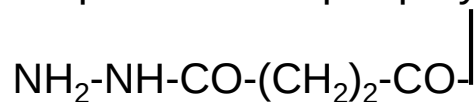


Daunomicin konjugálása peptidhez hidrazon-kötés kialakításával

Glp-His(Trt)-Trp-Ser(^tBu)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(**Mtt**)-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

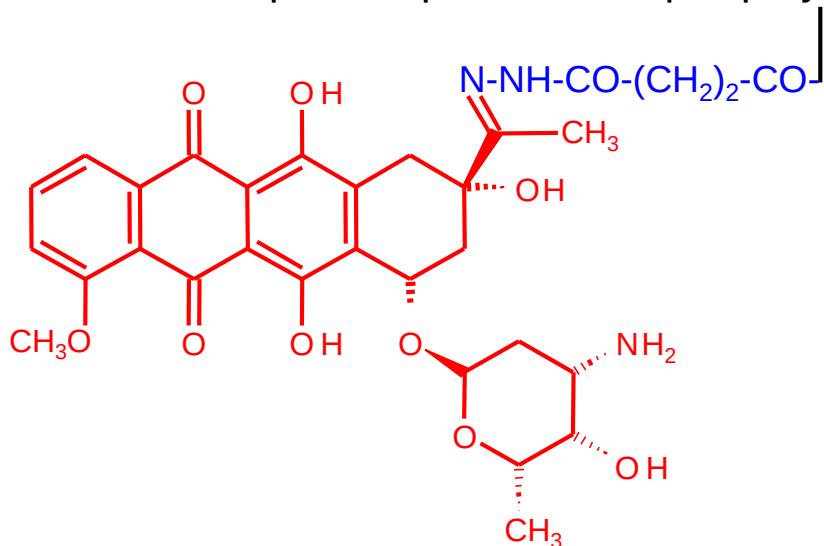
1. 2% TFA/DCM (6x5 perc)
2. 10% DIEA/DCM (4x1 perc)
3. 10 ekv. Boc-NH-NH-CO-(CH₂)₂-COOPcp/DMF (48 óra)
4. 95% TFA, 2,5% TIS, 2,5% víz (2 óra)

Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



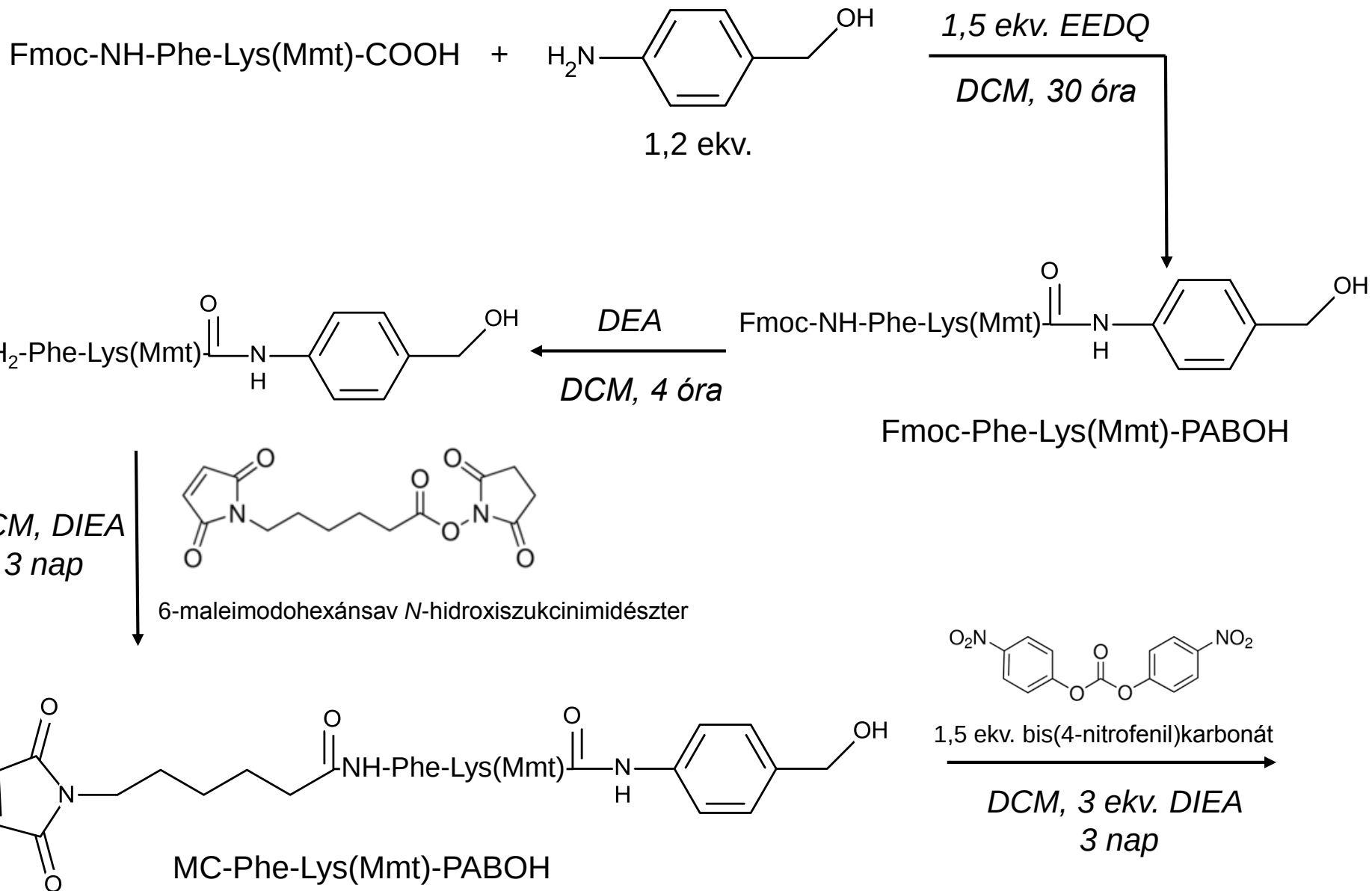
↓ 1,5 ekv. Dau/0,2M NaOAc (pH 5), 48 óra

Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



Tisztítás, analitika: HPLC (pH 7)

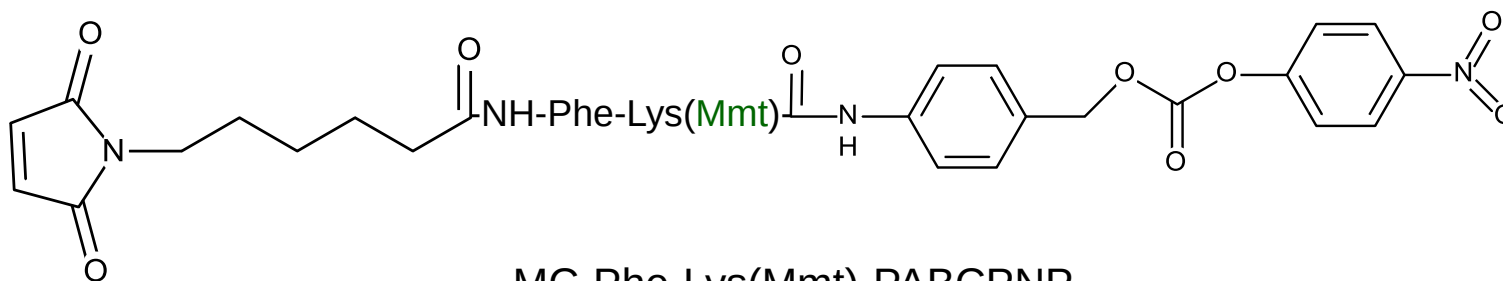
„Self imolativ” linker kiépítése



Mmt: metoxitritil

Schlage, P. et al. *J. Control. Release* **156**, 170–178 (2011)

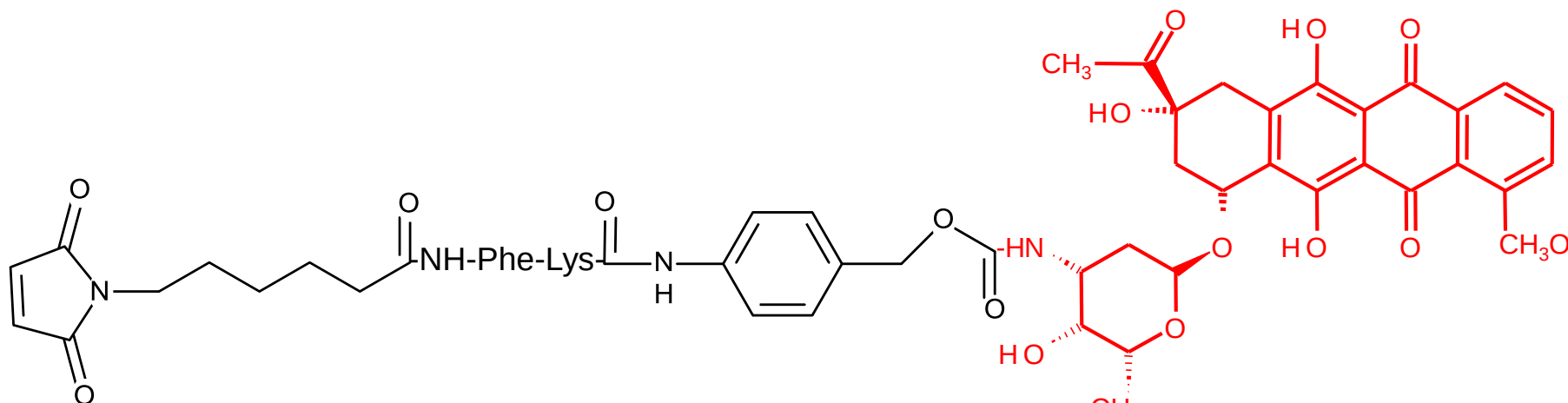
Daunomycin kapcsolása „self imolative” linkerhez



MC-Phe-Lys(Mmt)-PABCPNP



1. 1 ekv. *Dau*/NMP (ekv. DIEA), sötétben, 2 nap
2. 10 ekv. Cl_2CHCOOH /100 ekv. anizol/DCM, 1 óra



MC-Phe-Lys-PABC-Dau

Dau – SI-linker konjugálása Cys-módosított peptidhez

Glp-His(Trt)-Trp-Ser(^tBu)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(Mtt)-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

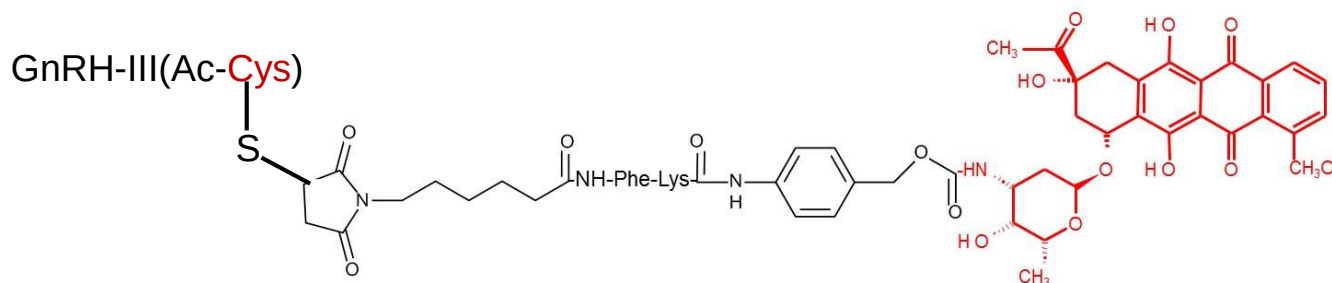
1. 2% TFA/DCM (6x5 perc)
2. 10% DIEA/DCM (4x1 perc)
3. 3 ekv. Fmoc-Cys(Trt)-OH/DIC/HOBt

Glp-His(Trt)-Trp-Ser(^tBu)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(Fmoc-Cys(Trt)-)-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

1. 20% piperidin/DMF (7 + 13 perc)
2. Ac₂O/DIEA/DMF (1:1:3 tf%) (30 perc)
3. 95% TFA, 2,5% TIS, 2,5% víz (2 óra)

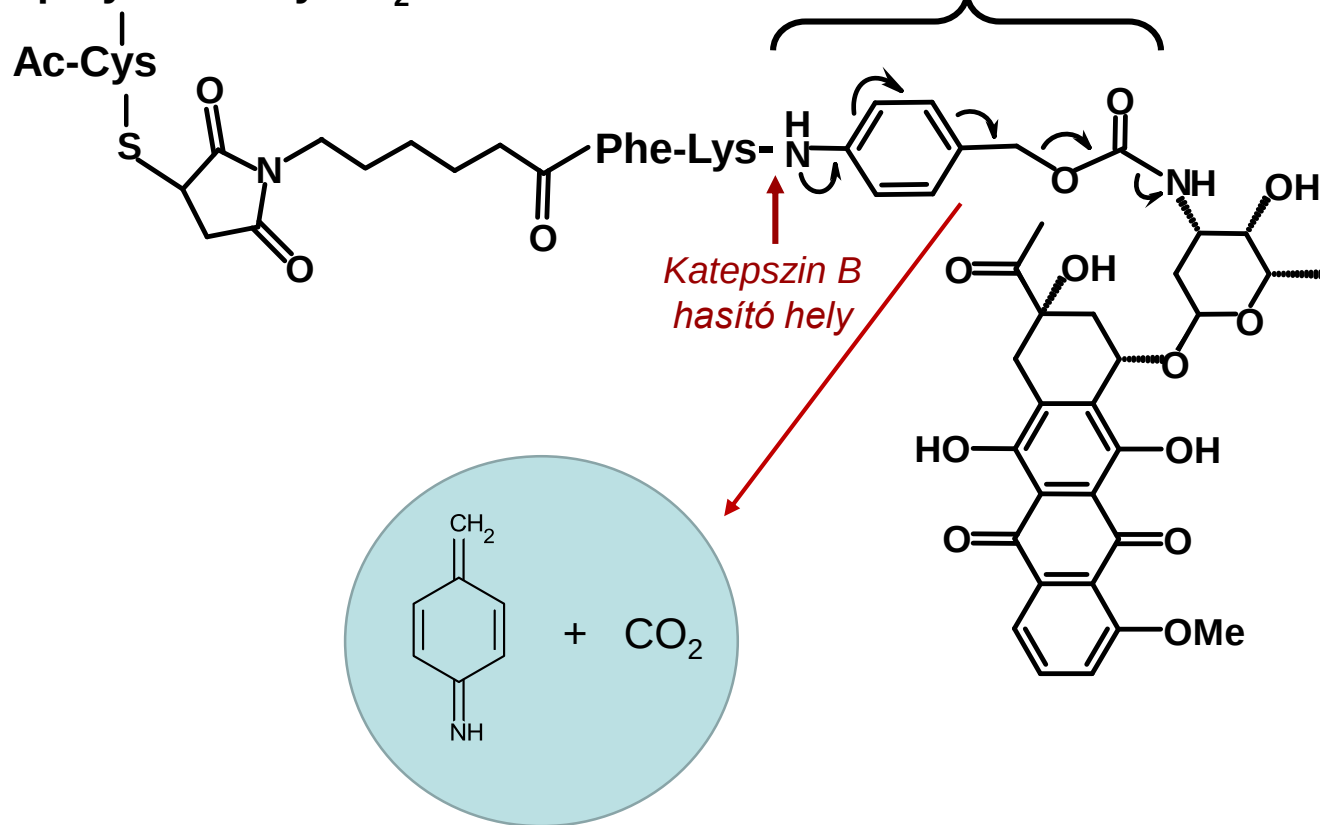
Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Ac-Cys-)-Pro-Gly-NH₂

MC-Phe-Lys-PABC-Dau/0,1 M NH₄OAc (12 óra)



A szabad hatóanyag felszabadulása PABC linkert tartalmazó konjugátumból

Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



A daunomicin és GnRH-III konjugátumainak in vitro citosztatikus hatása MCF-7 (emlő) és HT-29 (vastagbél) tumorsejteken

Konjugátum	Citosztázis (MCF-7) IC ₅₀ (μM)	Citosztázis (HT-29) IC ₅₀ (μM)
Daunomicin	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,2
Hidrazon Dau-GnRH-III	0,5 ± 0,2	2,4 ± 0,5
Dau-PABC-GnRH-III	0,4 ± 0,0	1,7 ± 0,2
Oxim Dau-GnRH-III	7,8 ± 2,1	17,9 ± 4,0
Oxim Dau-GFLG-GnRH-III	3,9 ± 1,2	22,5 ± 1,7
Amid Dau-GnRH-III	> 100	> 100

In vitro citosztatikus hatás (IC₅₀ érték) meghatározása MTT tesztel.

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

GFLG: -Gly-Phe-Leu-Gly- (Katepszin B által hasítható spacer)

GnRH-R mennyiség:

MCF-7 > HT-29

Mező, G. et al. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 2366-2379 (2008)

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

Orbán, E. et al. *Amino Acids*, **41**, 469-483 (2010)

Schlage, P. et al. *J. Control. Release* **156**, 170-178 (2011)

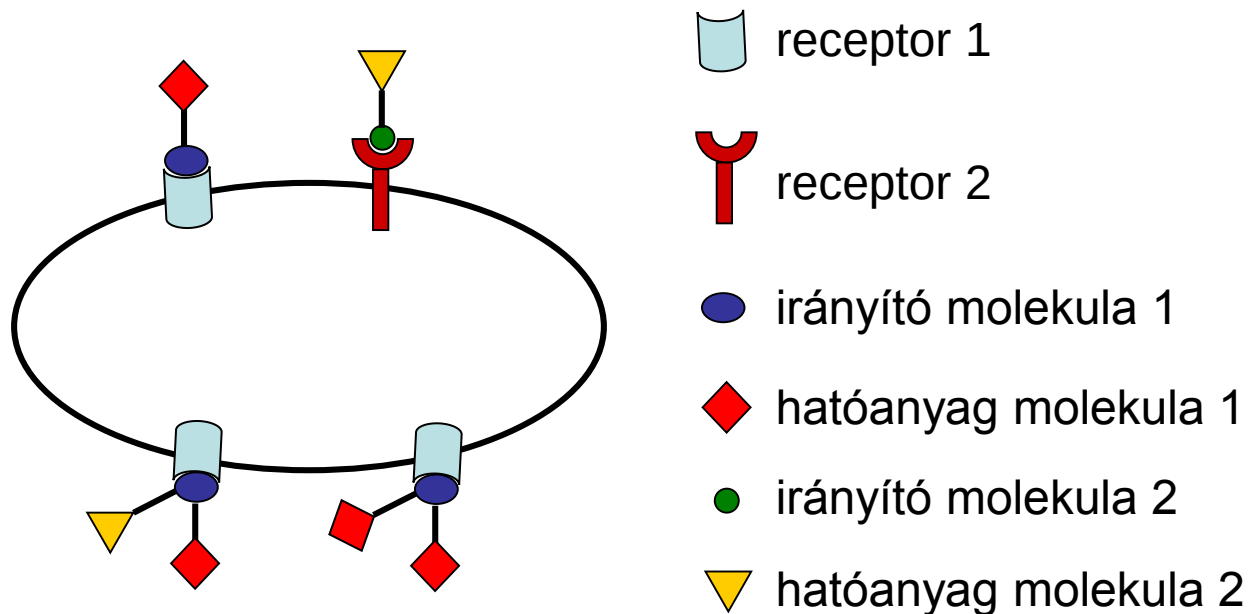
Hogyan növelhető a hatóanyag – peptid konjugátumok hatása?

Korlátok:

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

Lehetséges megoldások:

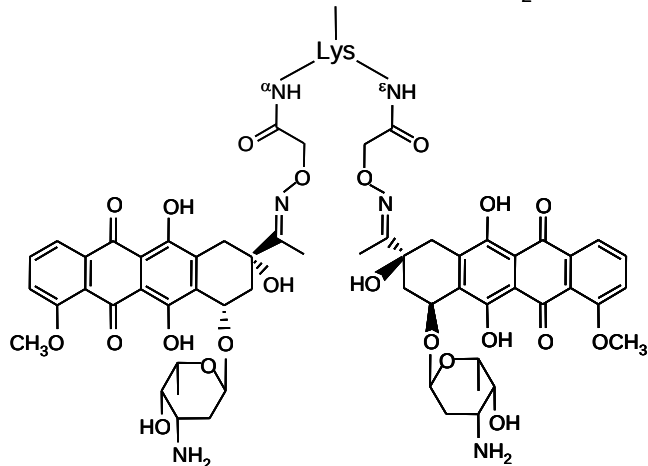
- Azonos vagy különböző hatóanyagok kapcsolása egy irányító molekulához.
- Több különböző receptoron keresztül történő sejtbe juttatás két vagy több hatóanyag – irányító molekula konstrukcióval.



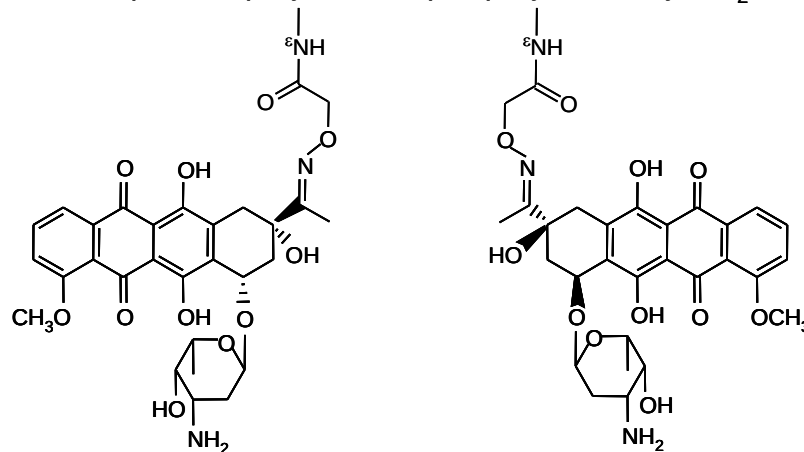
Biokonjugátum tervezés

- ➔ biokonjugátumok két azonos tumorellenes hatóanyaggal
- ➔ biokonjugátumok két különböző tumorellenes hatóanyaggal

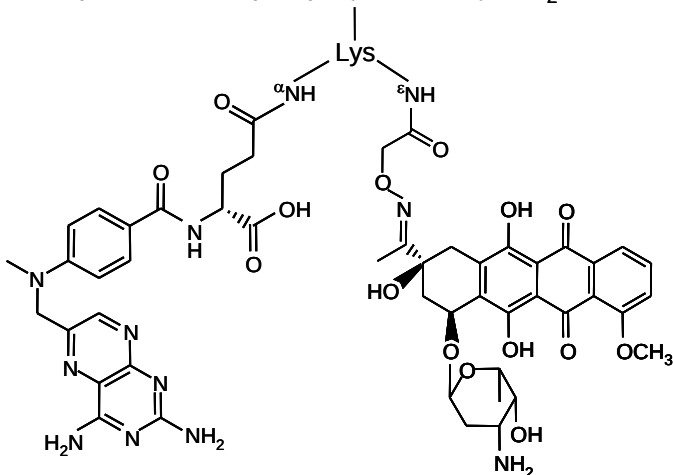
Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



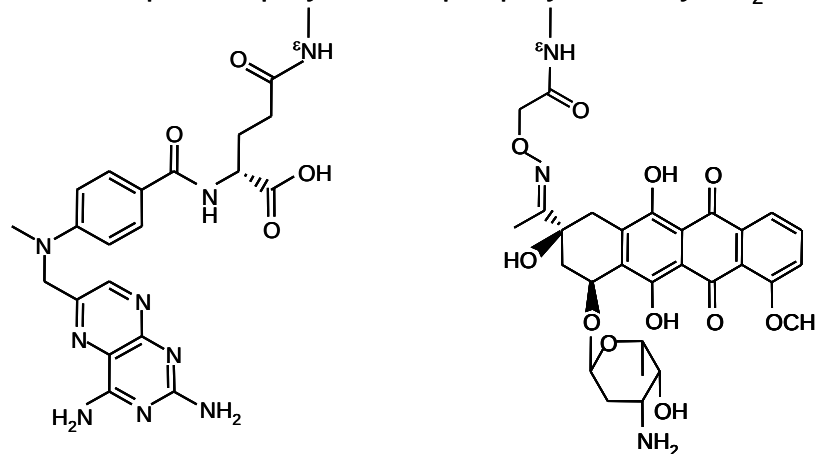
Glp-His-Trp-Lys-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



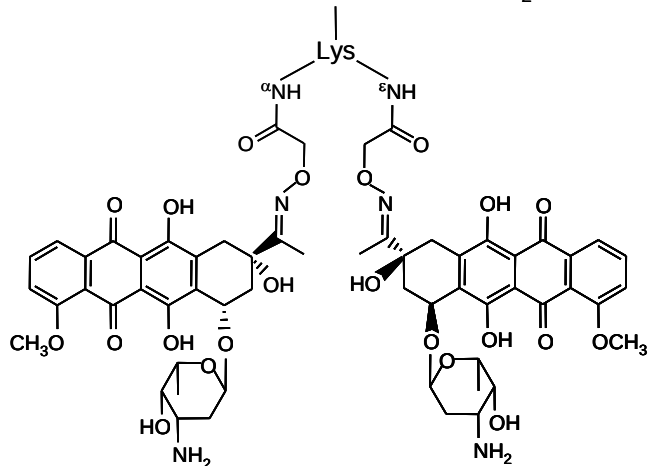
Glp-His-Trp-Lys-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



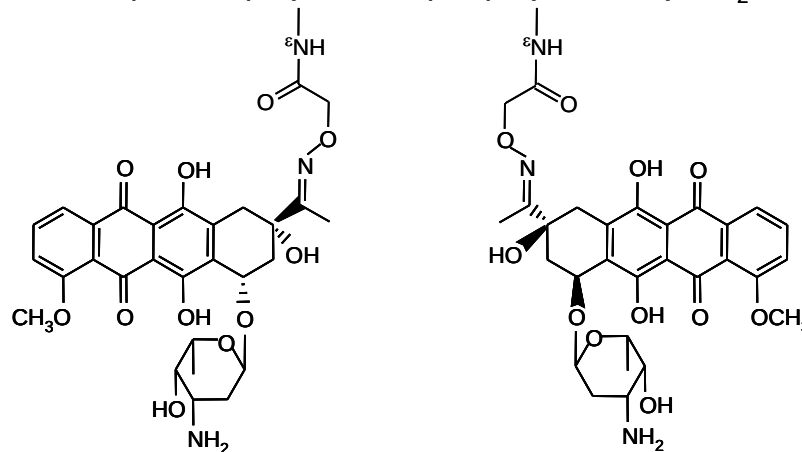
Biokonjugátum tervezés

- ➔ biokonjugátumok két azonos tumorellenes hatóanyaggal
- ➔ biokonjugátumok két különböző tumorellenes hatóanyaggal

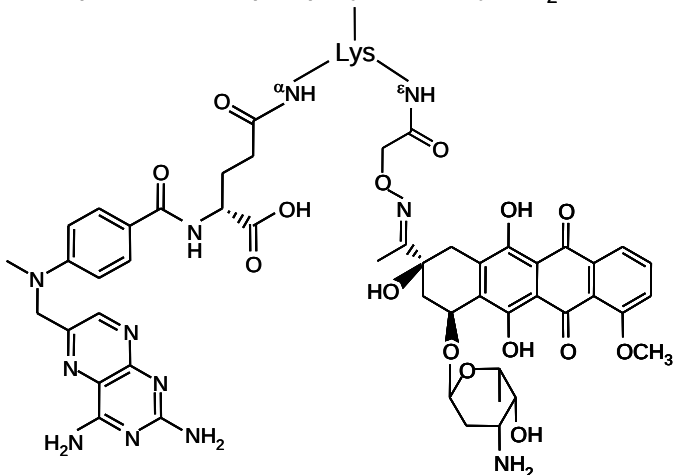
Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



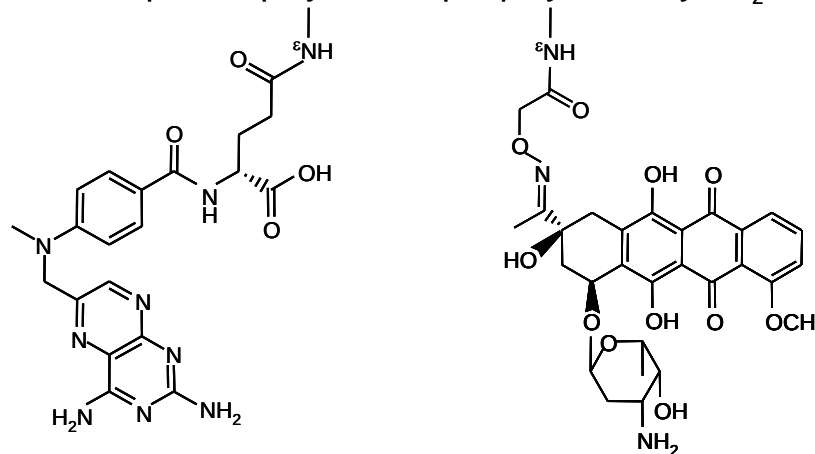
Glp-His-Trp-Lys-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



Glp-His-Trp-Lys-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



A GnRH-III(Mtx-8Lys(Dau=Aoa) konjugátum szintézise

Glp-His(Trt)-Trp-Ser(^tBu)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(Mtt)-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

- ↓
1. 2% TFA/DCM (6x5 perc)
 2. 10% DIEA/DCM (4x1 perc)
 3. 3 ekv. Fmoc-Lys(Mtt)-OH/DIC/HOBt

Glp-His(Trt)-Trp-Ser(^tBu)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(Fmoc-Lys(Mtt))-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

- ↓
1. 2% DBU-2% piperidin/DMF (2+2+5+10 perc)
 2. 2,5 ekv. MTX /PyBOP – HOBt – NMM(1:1:2)/DMF (60 perc)

Glp-His(Trt)-Trp-Ser(^tBu)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(MTX-Lys(Mtt))-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

- ↓
1. 2% TFA/DCM (6x5 perc)
 2. 10% DIEA/DCM (4x1 perc)
 3. 2,5 ekv. bis-Boc-Aoa-OH/PyBOP – HOBt – NMM(1:1:2)/DMF (60 perc)
 4. 95% TFA, 2,5% TIS, 2,5% víz (2 óra)

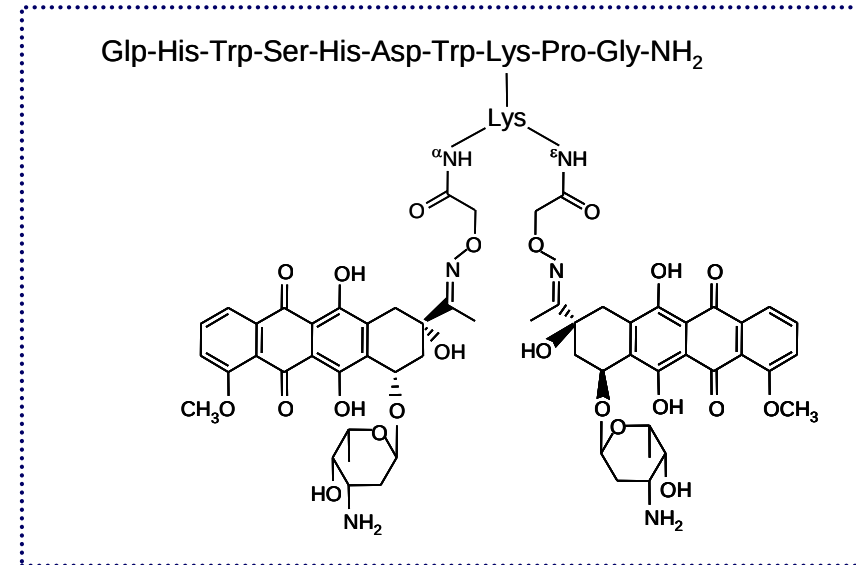
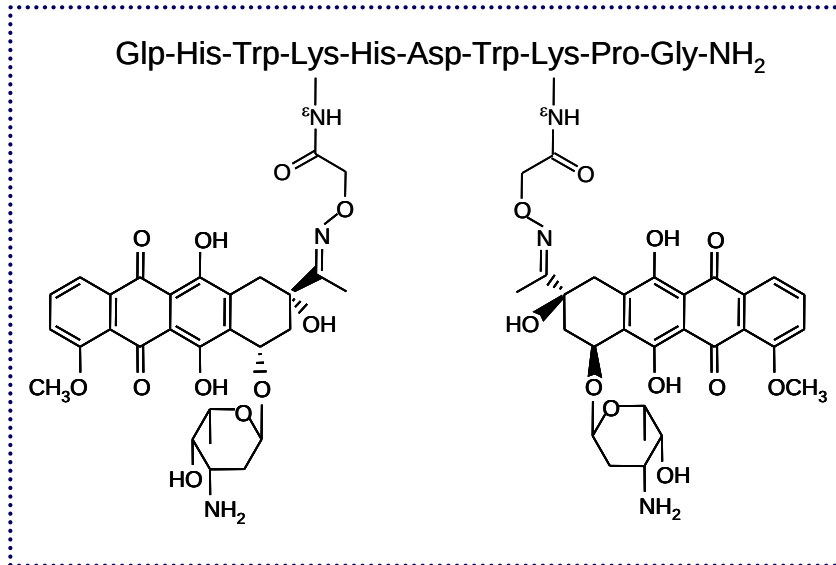
Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(MTX-Lys(Aoa))-Pro-Gly-NH₂

- ↓
- 1,2 ekv. Dau/ 0,2 M NaOAc (pH 5), 12 óra

Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(MTX-Lys(Dau=Aoa))-Pro-Gly-NH₂

Biokonjugátum in vitro citosztatikus hatása

→ biokonjugátumok két azonos tumorellenes hatóanyaggal

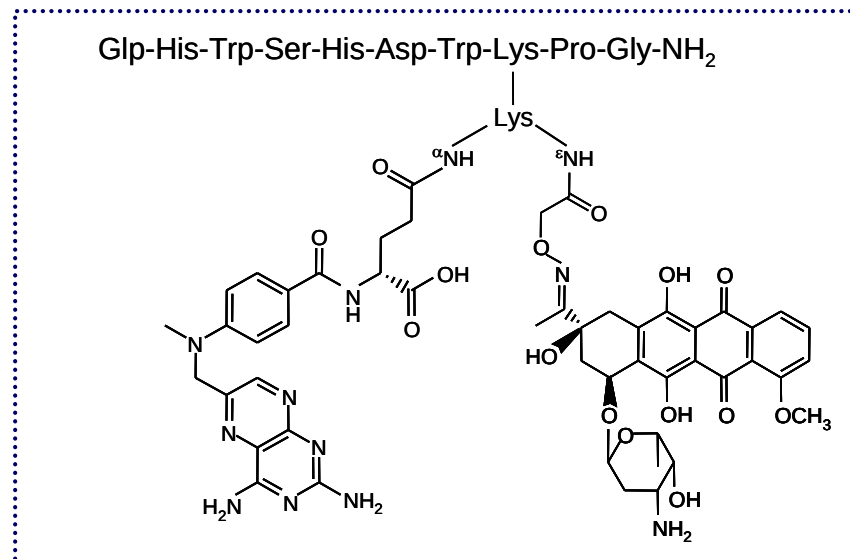
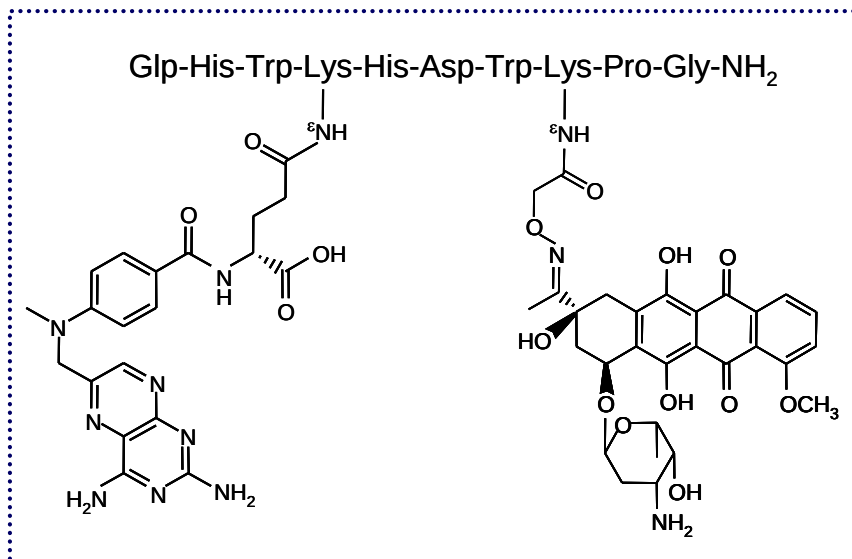


Anyagok	MCF-7 IC ₅₀ [μM]	HT-29 IC ₅₀ [μM]	LNCaP IC ₅₀ [μM]
Daunomicin	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1
GnRH-III[^{4,8} Lys(Dau=Aoa)]	2,9 ± 0,9	6,8 ± 1,0	4,9 ± 0,3
GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))]	3,0 ± 0,4	5,6 ± 2,0	3,8 ± 1,6
GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa)]	6,7 ± 1,9	29,9 ± 0,6	15,2 ± 2,4

LNCaP: humán prosztata tumorsejt vonal

Biokonjugátum cizosztatikus hatása

➔ biokonjugátumok két különböző tumorellenes hatóanyaggal



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

Rövidszénláncú zsírsavakkal módosított daunorubicin-GnRH-III konjugátumok szintézise

Glp-His(Trt)-Trp-Lys(ivDde)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(Mtt)-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

- ↓
1. 4% hidrazin/DMF (12x5 perc)
 2. 3 ekv. Savanhidrid-DIEA/DMF (1 óra)

Glp-His(Trt)-Trp-Lys(X)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(Mtt)-Pro-Gly--Rink-Amid MBHA

- ↓
1. 2% TFA , 2% TIS/DCM (6x5 perc)
 2. 10% DIEA/DCM (4x1 perc)
 3. 2,5 ekv. Boc-Aoa-OH – DIC – HOBt/DMF (2 óra)
 4. 95% TFA, 2,5% TIS, 2,5% víz (2 óra)

Glp-His-Trp-Lys(X)-His-Asp-Trp-Lys(Aoa)-Pro-Gly-NH₂

↓

1,2 ekv. Dau/ 0,2 M NaOAc (pH 5), 12 óra

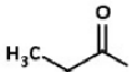
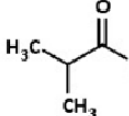
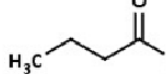
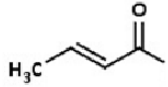
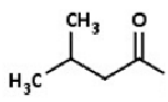
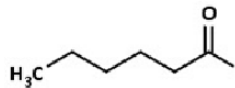
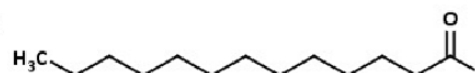
Glp-His-Trp-Lys(X)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂

Daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok rövidszénláncú zsírsavakkal

Glp-His-Trp-Lys(X)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂

Lizoszomális lebomlás:

H-Lys(Dau=Aoa)-OH legkisebb metabolit

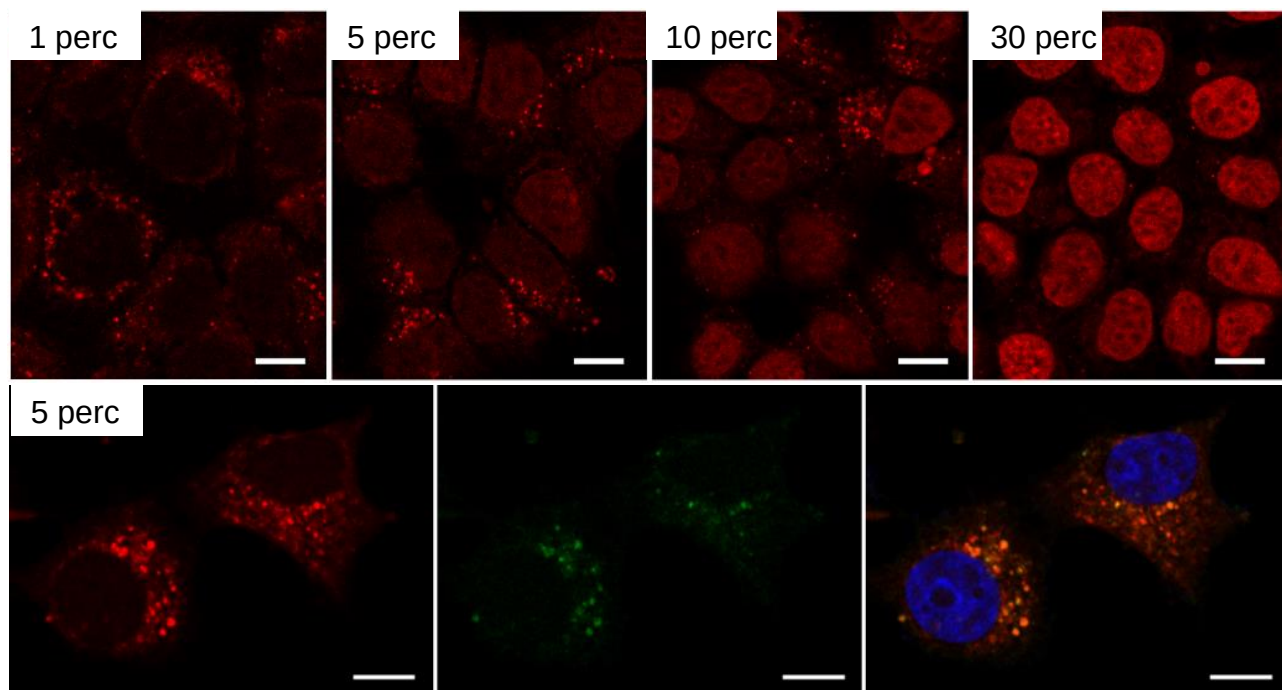
				Enzim stabilitás kimotripszin; 6 óra	Citosztázis (IC ₅₀) MCF-7 HT-29	
X=		Ac	acetil	44%	3,1±1,7	7,4 ±2,6
		Pr	propionil	55%	3,6±0,7	17,2±2,9
kimagasló sejtfelvétel		iBu	izo-butiril	10%	2,2±0,0	2,0±0,6
		nBu	butiril	64%	0,7±0,2	2,2±0,6
		CA	krotonil	50%	1,6±0,2	13,6±4,2
		iVA	izo-valeril	66%	2,5±0,5	16,4±4,5
		Hex	hexanoil	70%	1,5±0,4	20,1±4,2
		Myr	mirisztoil	n.a.	6,8±2,9	37,4±1,0

A GnRH-III(⁴Lys(Bu),⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátum sejtbejutásának vizsgálata és gátlása

K2: Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂

Triptorelin: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (szuper agonista)

Konfokális mikroszkópos vizsgálat

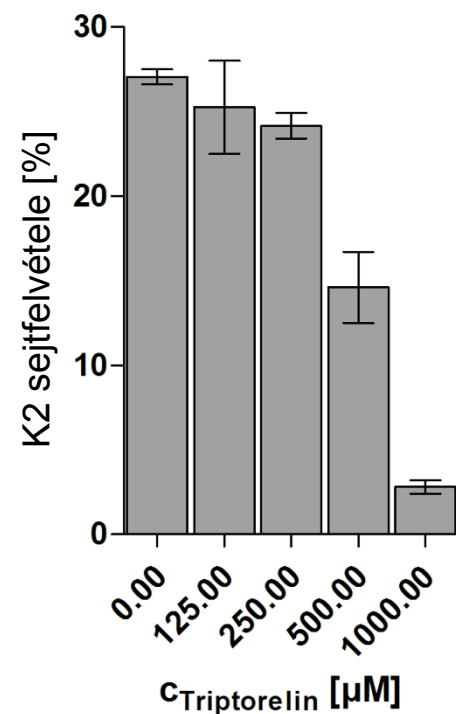


K2 konjugátum

lizoszóma festés

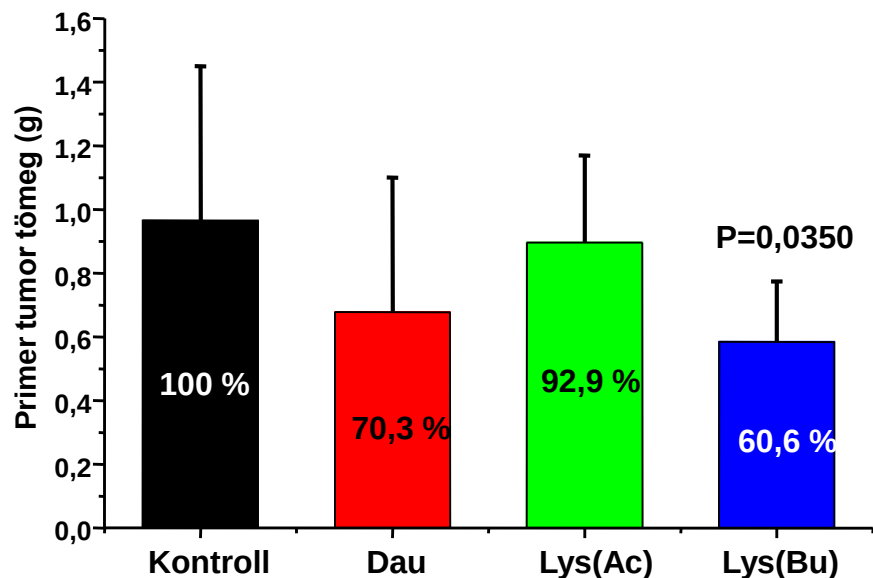
kolokalizáció
+ DAPI sejtmagfestés

Áramlási citometria

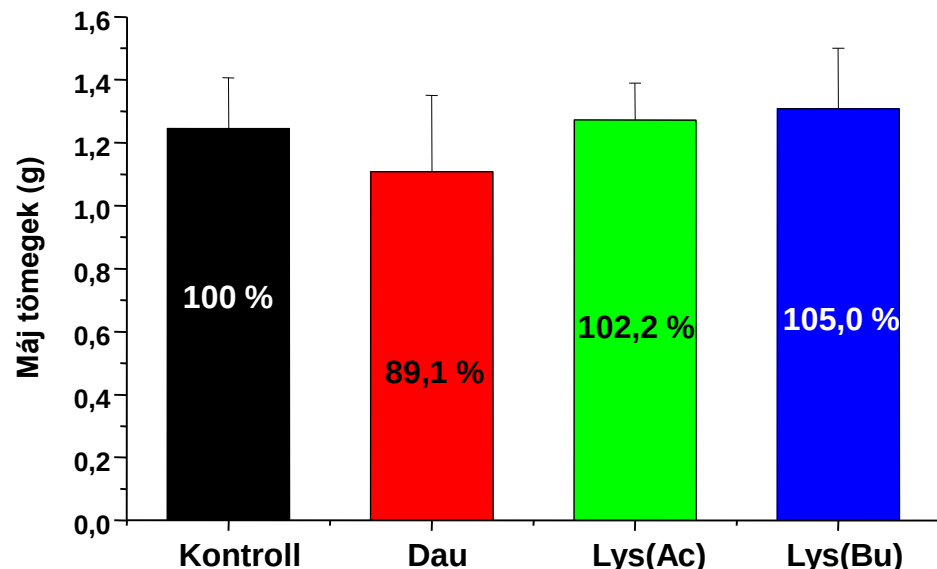


Dau-GnRH-III konjugátumok antitumor hatása orthotopikus HT-29 vastagbél modellen

Tumorok tömege a terminálás napján (50. nap)



Máj tömegek a terminálás napján (50. nap)



Daunomicin: 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)

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

Metasztázis gátlás: nincs

Nem természetes aminosavakat tartalmazó GnRH-III analóg – Dau konjugátumok

Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

3-as pozíció

D-Trp ⇌

D-Tic ↑

3-as és 7-es pozíció

³D-Tic and ⁷D-Trp ⇌

2-es és 3-as pozíció

²ΔHis and ³D-Tic

⁴Ser ↑ ⁴Lys(Bu) ↑

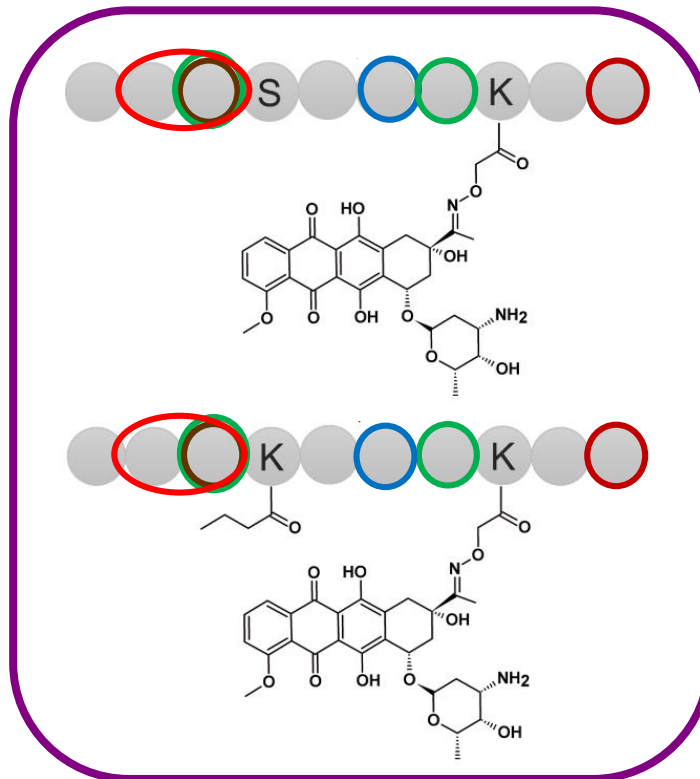
Tumorellenes hatás (MCF-7 és HT-29 sejteken):

↑ jelentős növekedés

↑ kis növekedés

⇌ nincs változás

↓ kis csökkenés



6-os pozíció

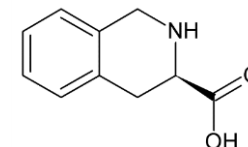
D-Asp, D-Glu or D-Trp



Asp(OMe) ⇌

C-terminális

⁹Pro¹⁰ΔGly-NHEt ⇌

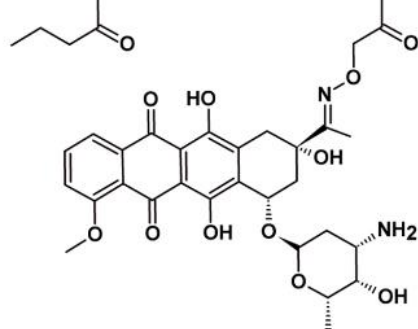


H-D-Tic-OH

(R)-1,2,3,4-tetrahydro
izokinolin-3-
karbonsav

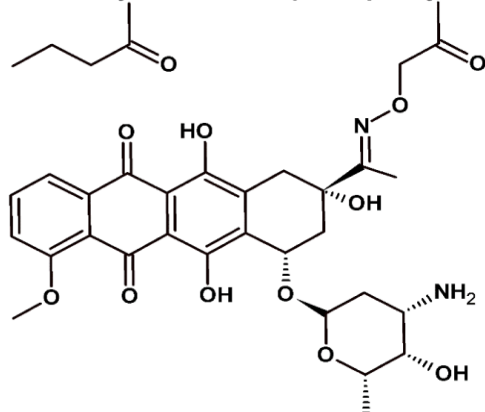
A régi és az új vezérmolekula sejtbejutásának és receptorkötődésének vizsgálata

Glp-His-Trp-Lys-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



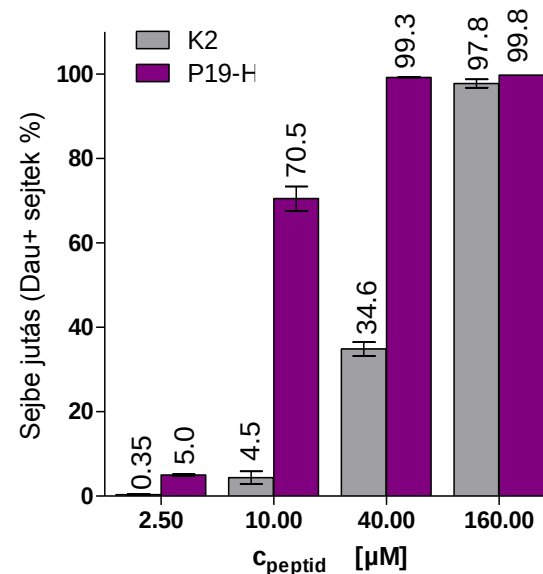
K2

Glp-**D-Tic**-Lys-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



P19-H

MCF-7 emlő tumorsejteken



¹²⁵I-triptorelin leszorítási kísérlet

konjugátum	humán hipofízis	humán prosztata tumorszövet
K2	3,59±2,17	3,43±2,01
P19-H	3,53±0,96	2,79±1,24

az értékek nM-ban kifejezve

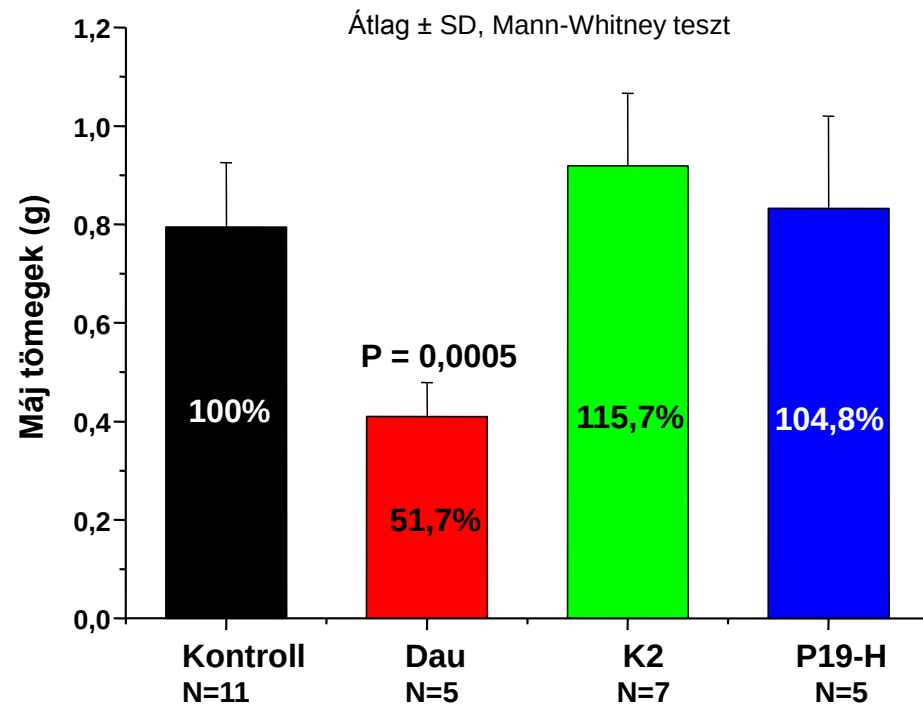
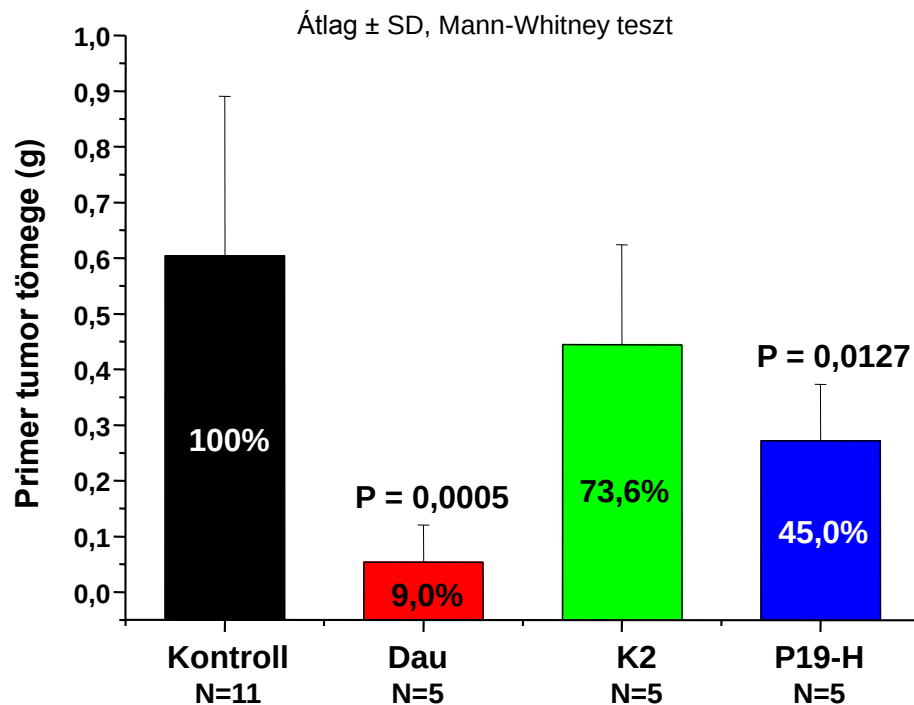
A konjugátumok hatása különböző tumor sejt típusokon

Tumor típus (sejtvonal)	Dau (IC ₅₀ ; nM)	K2 (IC ₅₀ ; µM)	K/2 / Dau	P19-H (IC ₅₀ ; µM)	P19-H/ Dau	K2 / P19-H
Petefészek (A2780)	10,4 ± 1,5	1,4 ± 1,1	132,0	2,1 ± 0,5	197,2	0,67
Melanoma (egér B16)	25,9 ± 8,0	3,2 ± 0,9	123,4	1,0 ± 0,2	39,0	3,20
Tüdő (H1975)	20,9 ± 2,7	4,1 ± 0,1	196,0	2,3 ± 0,7	109,2	1,41
Fej-nyaki (PE/CA PJ41)	45,6 ± 33,6	4,7 ± 0,8	104,0	1,7 ± 0,5	36,7	2,77
Prostata (DU145)	16,3 ± 4,6	5,3 ± 0,5	325,3	2,0 ± 0,2	125,9	2,65
Petefészek (OVCAR-8)	185,6 ± 99,8	5,6 ± 0,8	30,4	9,4 ± 0,8	50,9	0,60
Emlő (MDA-MB-231)	54,6 ± 7,4	5,8 ± 0,8	106,8	1,9 ± 0,2	34,2	3,05
Prostata (PC-3)	117,5 ± 8,6	6,3 ± 0,3	193,6	2,3 ± 0,6	71,8	2,74
Emlő (egér 4T1)	56,0 ± 14,7	6,3 ± 0,9	112,3	1,8 ± 0,1	31,3	3,50
Máj (HepG2)	22,9 ± 1,4	6,8 ± 0,3	296,2	2,2 ± 0,7	96,6	3,09
Fej-nyaki (PE/CA PJ15)	50,5 ± 38,7	7,4 ± 0,8	145,7	2,8 ± 0,6	56,3	2,64
Melanoma (A2058)	35,0 ± 14,9	8,4 ± 0,3	239,3	2,6 ± 0,5	73,3	3,23
Glioma (U87MG)	126,4 ± 53,7	9,0 ± 0,8	71,4	2,3 ± 0,1	18,2	3,91
Tüdő (A549)	69,3 ± 23,5	9,6 ± 0,6	138,8	4,3 ± 0,4	61,6	2,23
Tüdő (H1650)	50,3 ± 13,4	10,5 ± 1,1	208,5	4,0 ± 0,8	78,6	2,63
Vastagbél (egér C26)	117,5 ± 8,6	10,6 ± 0,2	89,8	2,6 ± 0,7	22,3	4,08
Melanoma (WM983b)	49,8 ± 22,9	12,6 ± 1,5	254,0	2,5 ± 0,6	51,0	5,04
Melanoma (M1/9)	27,5 ± 9,1	13,5 ± 1,1	491,5	2,9 ± 0,6	105,6	4,66
Vastagbél (HT-29)	52,6 ± 3,6	15,5 ± 1,7	294,5	7,3 ± 0,3	138,8	2,12
Melanoma (M24)	118,8 ± 25,0	16,1 ± 0,1	135,9	3,4 ± 0,7	28,9	4,74
Emlő (MCF-7)	63,8 ± 21,0	16,5 ± 1,3	257,7	3,9 ± 0,8	61,5	4,23
Petefészek (OVCAR-3)	404,0 ± 9,4	46,0 ± 1,3	113,8	8,2 ± 0,5	20,2	5,61
Hasnyálmirigy (PANC-1)	525,9 ± 24,7	> 100	>200	56,4 ± 4,5	107,3	>2
Fibroblaszt (MRC-5)	287,6 ± 35,1	41,9 ± 3,8	145,7	19,7 ± 1,2	68,4	2,13

Új hatékonyabb GnRH-III – daunomicin konjugátum

K2: Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂

P19-H: Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂



Terminálás a tumor transzplantációt követő 34. napon

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

Egy anyag két célpont

Problémák

Több hatóanyag kapcsolása gátolhatja az irányító molekula kötődési képességét.

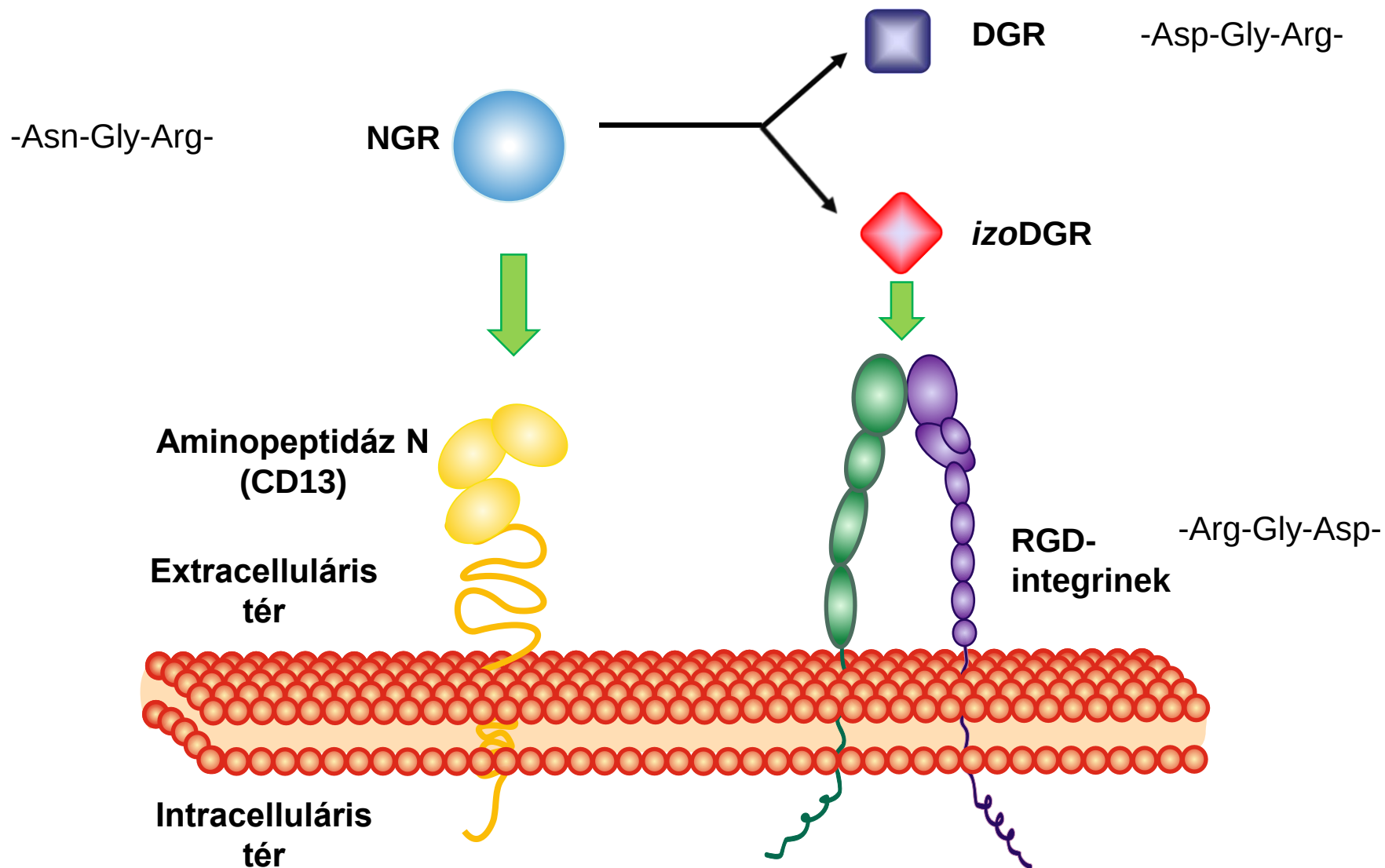
Több konjugátum alkalmazása kombinációban költségesebb.

Célkitűzés

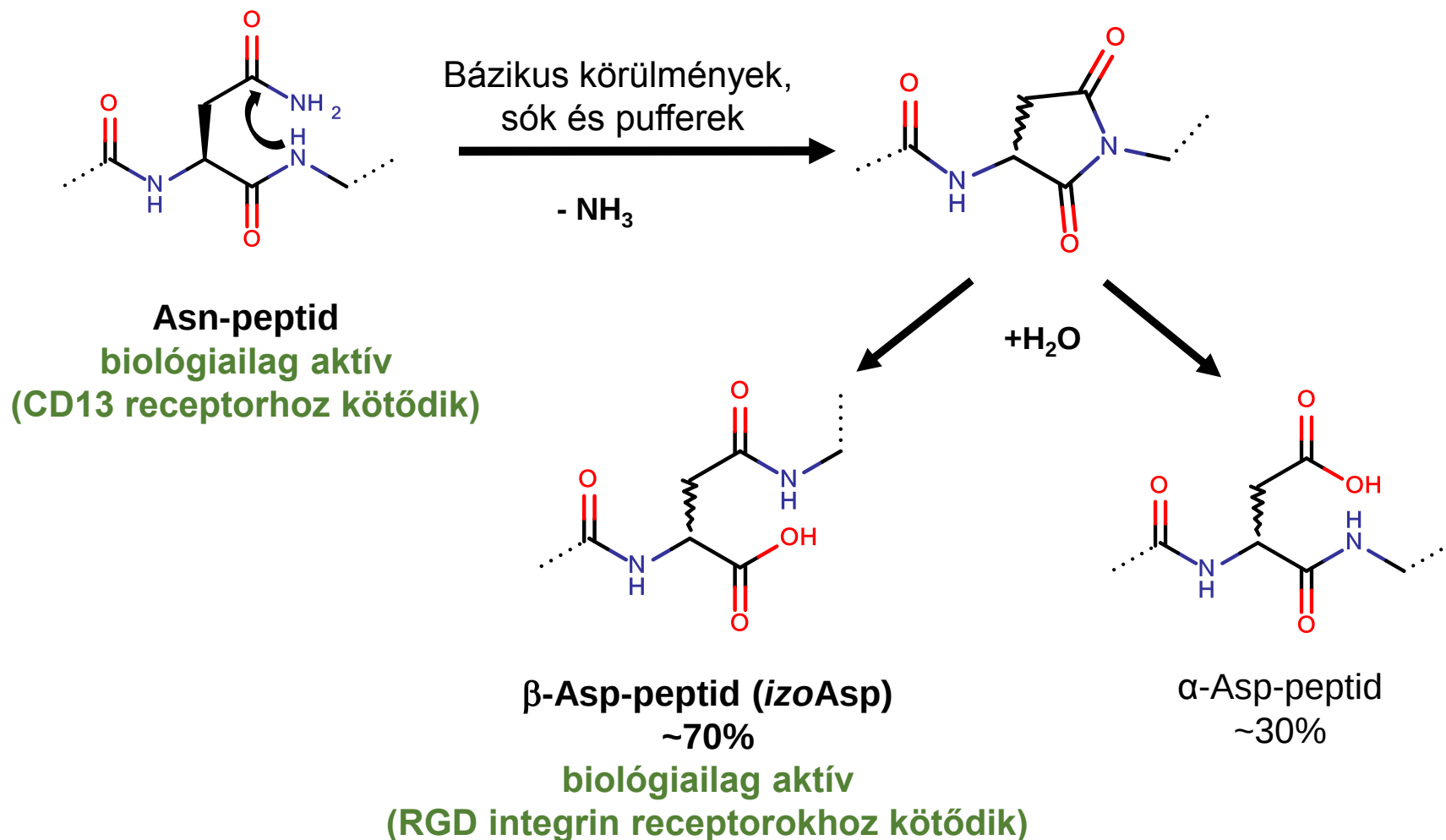
Olyan vegyületet találni és alkalmazni a célzott terápiára,
amely egyidejűleg képes több célpontot is támadni.

A természet a kezünkre játszik ?!

Egy vegyület két célpont (az NGR peptidek lehetséges célpontjai)



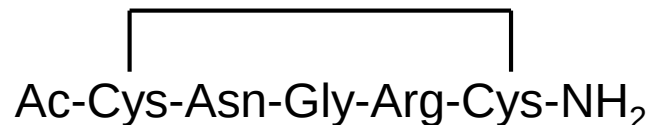
A természet nyújtotta lehetőség (NGR peptidek)



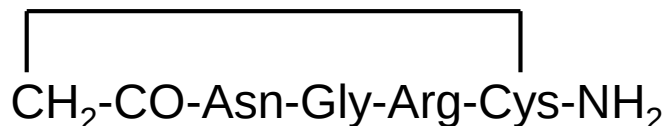
Mindkét receptor típus a neovaszkularizációban, sejt adhézióban, sejtek motilitásában, így a metasztázisban játszanak fontos szerepet

Előállított ciklikus NGR peptidek

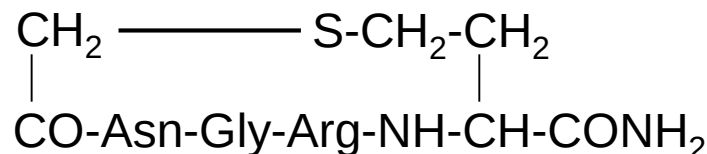
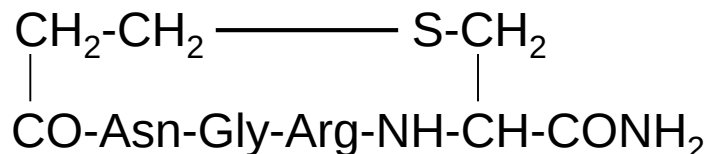
1. Ciklikus NGR peptidek az irodalomból (17 atom a ciklusban):



2. Ciklikus NGR peptidek tioéter-kötéssel (15 atom a ciklusban):



3. Ciklikus NGR peptidek tioéter-kötéssel (16 atom a ciklusban):



4. Ciklikus NGR peptidek tioéter-kötéssel (18 atom a ciklusban):



A ciklikus NGR peptidek stabilitása különböző puffer oldatokban és sejtenyésző médiumban

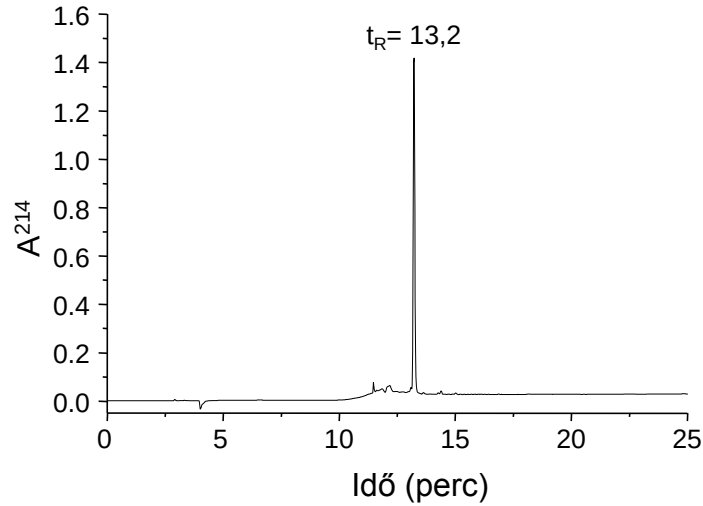
Ciklopeptidek	0.2 M NH ₄ OAc (pH 5.0) Asn/lizAsp/Asp	PBS oldat (pH 7.4) Asn/lizoAsp/Asp	0.1 M Tris (pH 8.1) Asn/lizoAsp/Asp	DMEM médium Asn/lizoAsp/Asp
c[KNGRE]-NH ₂	100/0/0	100/0/0	100/0/0	54/39/7 (92/7/1)
Ac-c[CNGRC]-NH ₂	100/0/0	93/5/2 (96/3/1)	71/21/8 (85/11/4)	0/72/28 (46/38/16)
c[CH ₂ CO-NGRC]-NH ₂	67/26/7 (85/12/3)	15/68/17 (36/51/13)	13/69/18 (19/57/24)	(0/68/32)
c[CH ₂ CO-KNGRC]-NH ₂	90/8/2 (100/0/0)	43/34/23 (58/23/19)	15/52/33 (36/41/23)	(0/64/36)
c[CH ₂ CO-PNGRC]-NH ₂	98/0/2 (100/0/0)	75/3/22 (86/2/12)	47/5/48 (67/3/30)	n.d.
c[CH ₂ CH ₂ CO-NGRC]-NH ₂	99/1/0 (100/0/0)	89/8/3 (94/5/1)	73/19/8 (86/10/4)	(0/70/30)
c[CH ₂ CO-NGR ^h C]-NH ₂	96/3/1 (100/0/0)	44/43/13 (64/28/8)	43/45/12 (66/27/7)	(0/73/27)

A zárójelbe tett adatok a 24 órás inkubálásra, míg a zárójel nélküliek a 48 órás inkubálásra vonatkoznak.

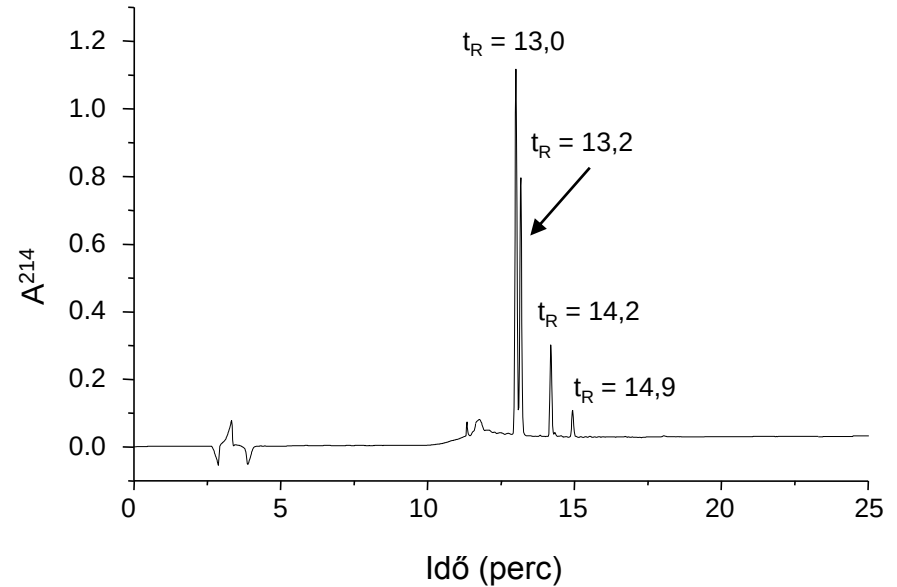
A c[CH₂-CO-NGRC]-NH₂ peptid stabilitása PBS pufferben

PBS oldat (pH 7,4), RT

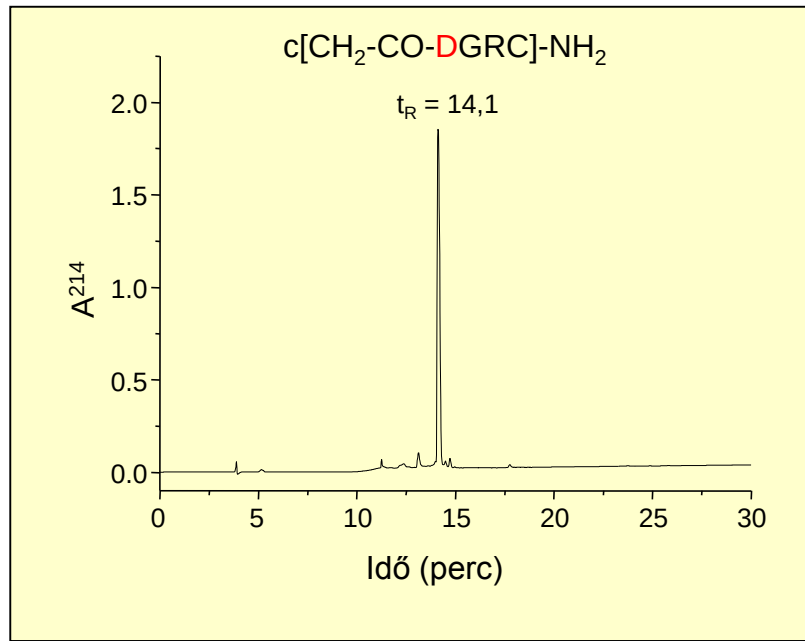
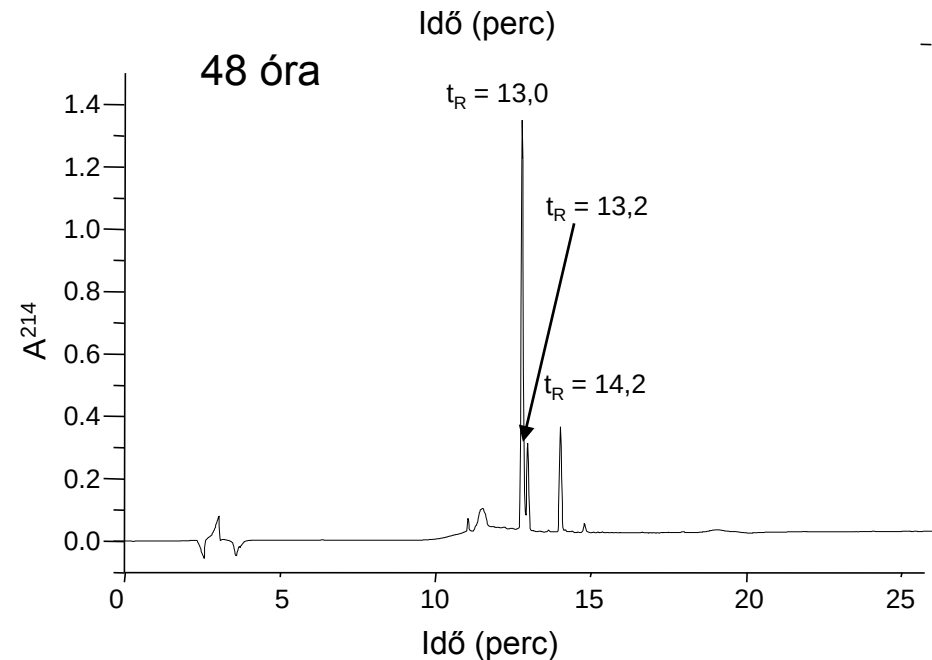
Tiszta ciklopeptid



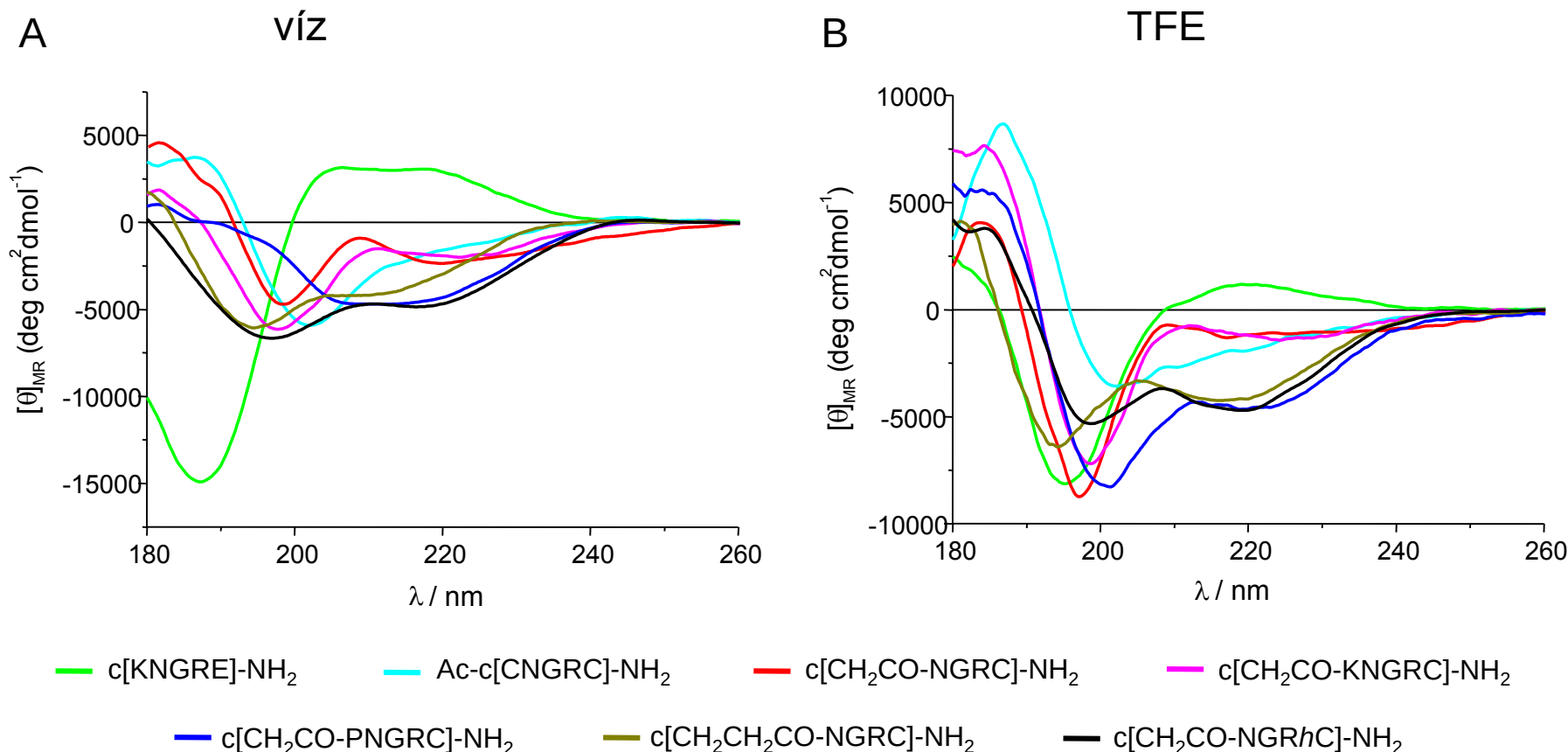
24 óra



48 óra



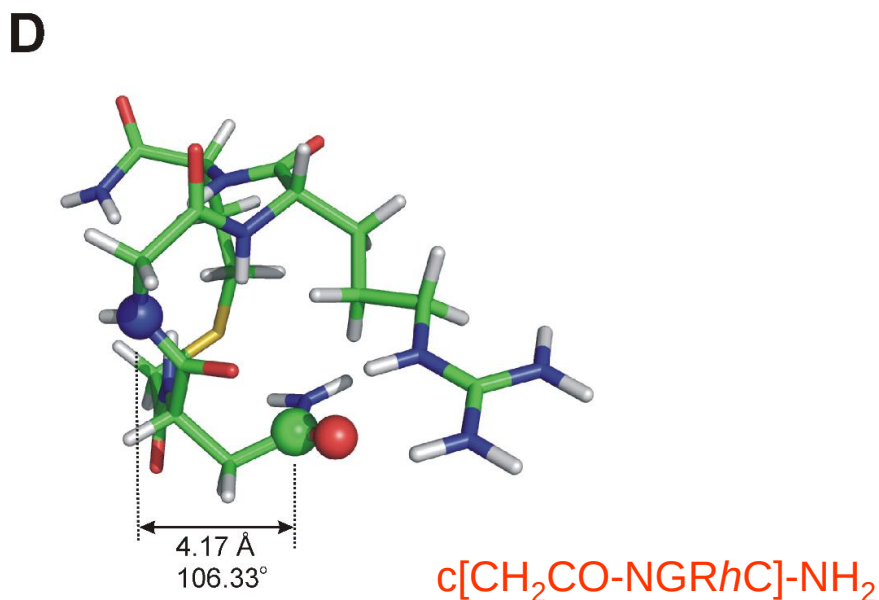
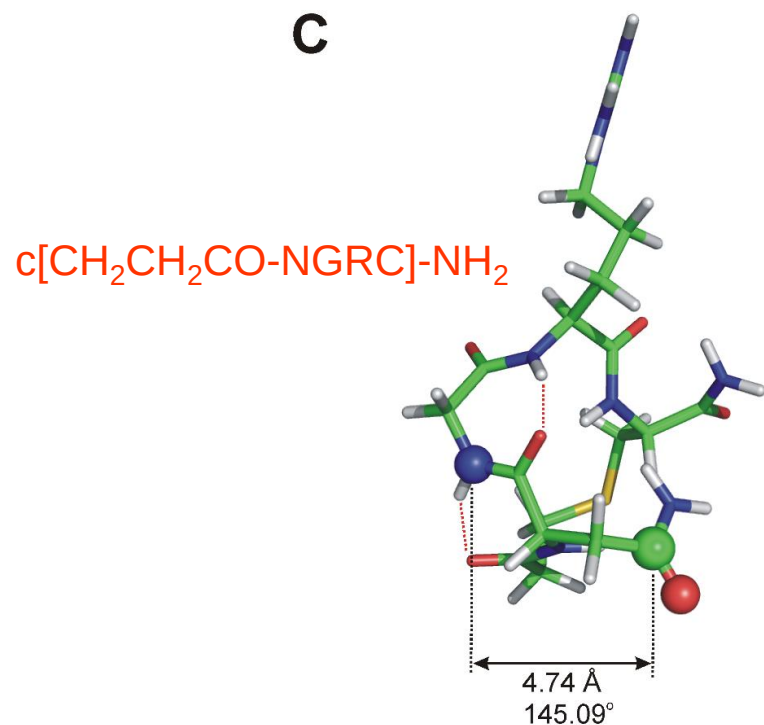
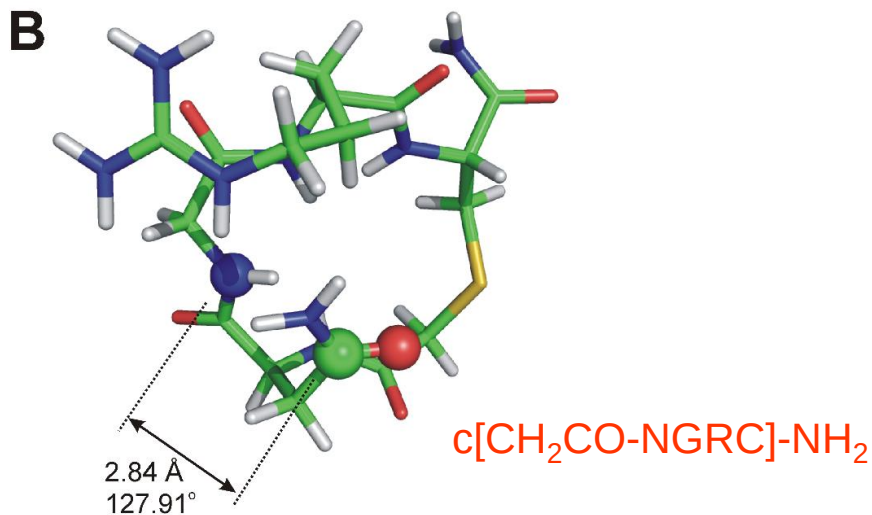
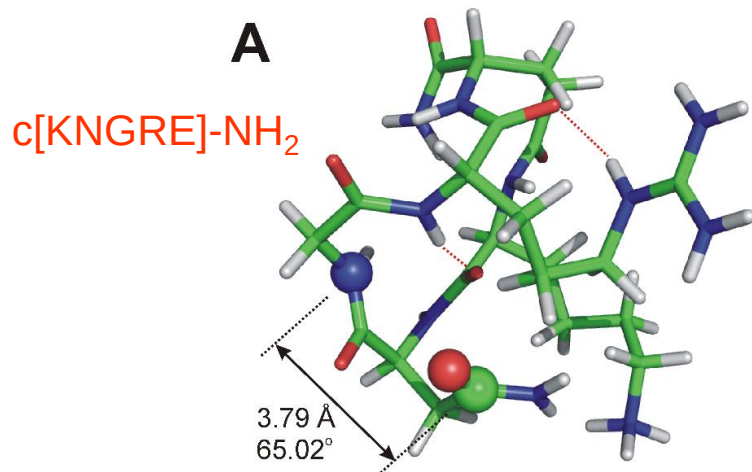
A ciklikus NGR peptidek szerkezetének tanulmányozása ECD spektroszkópiával



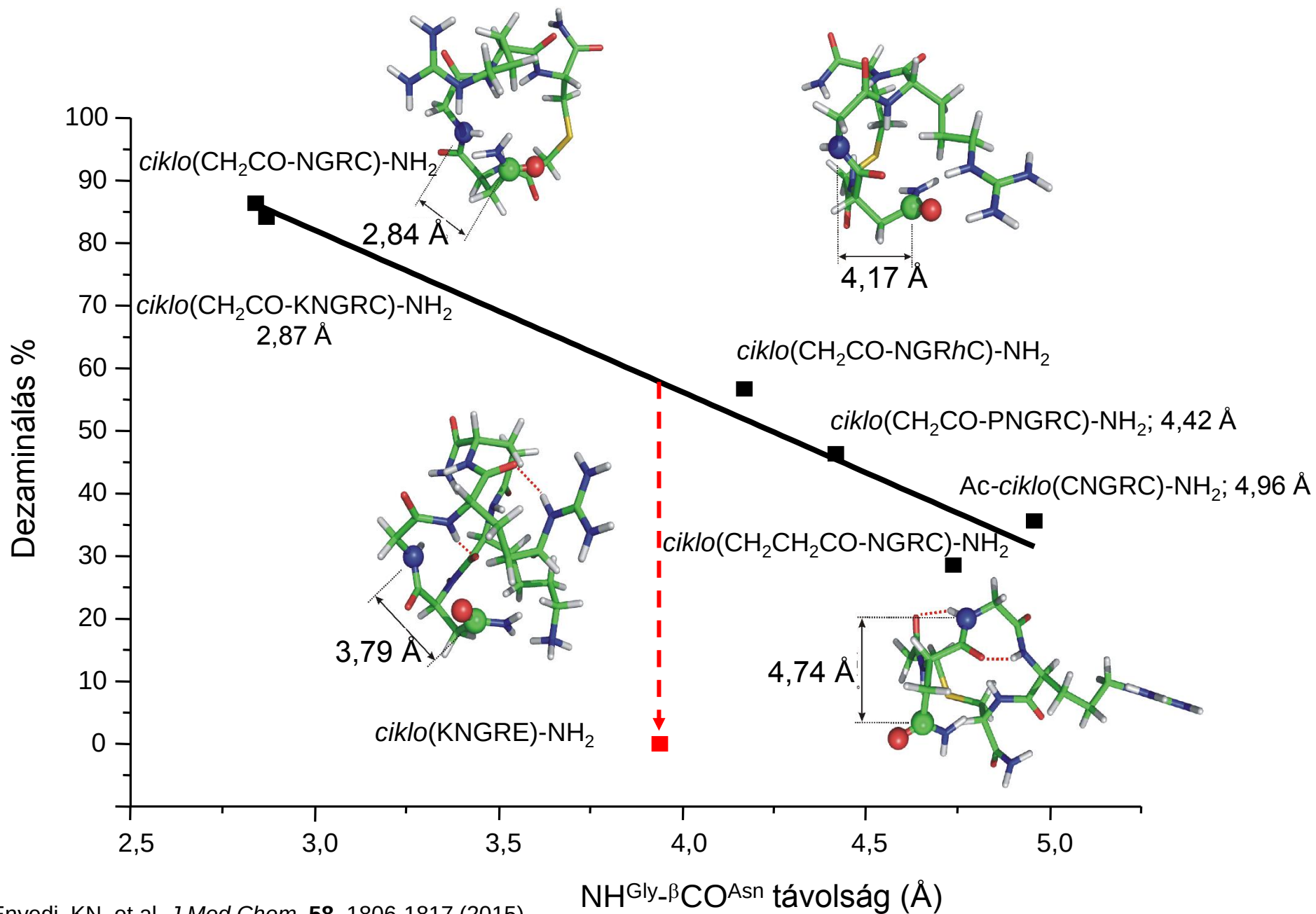
Meglehetősen merev: c[KNGRE]-NH₂, Ac-c[CNGRC]-NH₂

Flexibilis: c[CH₂CO-NGRC]-NH₂, c[CH₂CO-KNGRC]-NH₂

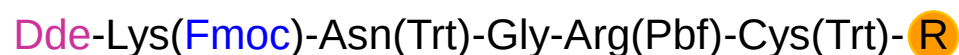
A Ciklikus NGR peptidek szerkezetének tanulmányozása NMR spektroszkópiával



Az $\text{NH}^{\text{Gly}}\text{-}\beta\text{CO}^{\text{Asn}}$ távolság és a ciklopeptidek stabilitásának összefüggése

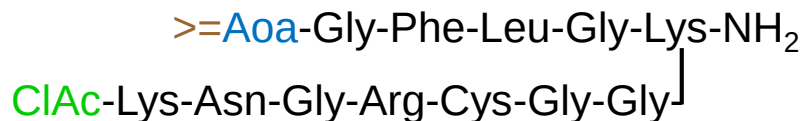


Ciklikus NGR peptid – daunomicin konjugátumok szintézise



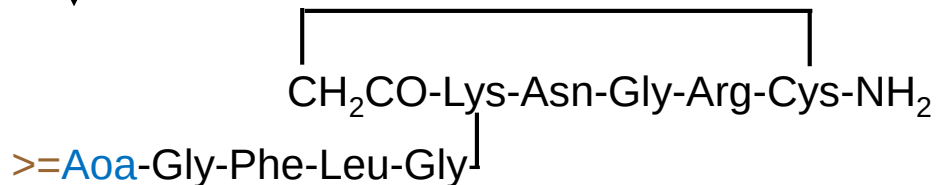
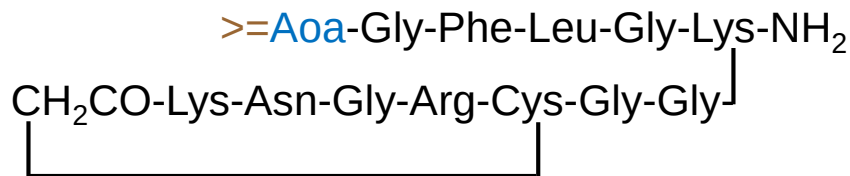
1. Dde hasítás: 2% $\text{NH}_2\text{-NH}_2/\text{DMF}$
2. Kapcsolás: Fmoc-Aaa(X)-OH-DIC-HOBt/DMF
3. Klóracetilezés: ClAc-OPcp/DMF
4. Hasítás: 95% TFA – 2,5% TIS – 2,5% H_2O

1. Fmoc hasítás: 2% DBU – 2% piperidin/DMF
2. Kapcsolás: Fmoc-Aaa(X)-OH-DIC-HOBt/DMF
3. Védett Aoa beépítés: >=Aoa-OH-DIC-HOBt/DMF
3. Dde hasítás: 2% $\text{NH}_2\text{-NH}_2/\text{DMF}$
4. Klóracetilezés: ClAc-OPcp/DMF
5. Hasítás: 95% TFA – 2,5% TIS – 2,5% H_2O

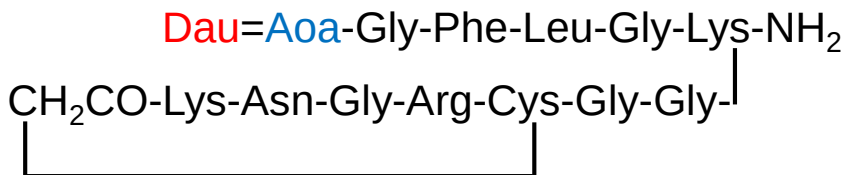


Ciklizálás: 0,1 M Tris puffer (pH 8,1), 1h

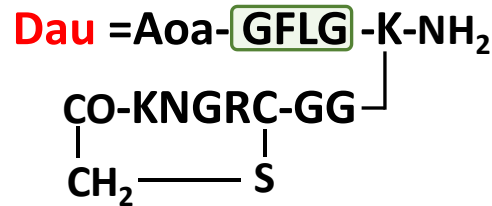
Ciklizálás: 0,1 M Tris puffer (pH 8,1), 1h



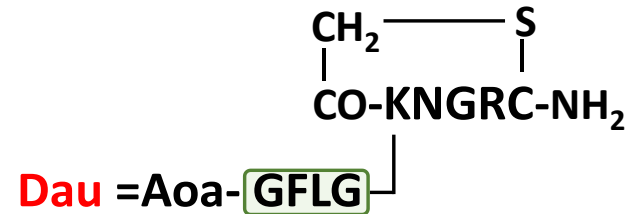
Izopropilidén hasítás: 1M $\text{NH}_2\text{-O-CH}_3/0,2\text{M NH}_4\text{OAc}$ (pH 5)
Daunomicin konjugálás: 1,1 ekv Dau/0,2M NH_4OAc (pH 5)



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



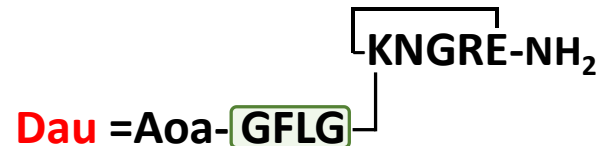
3,3 ± 0,6 μM (HT-1080)
5,7 ± 0,9 μM (HT-29)



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)

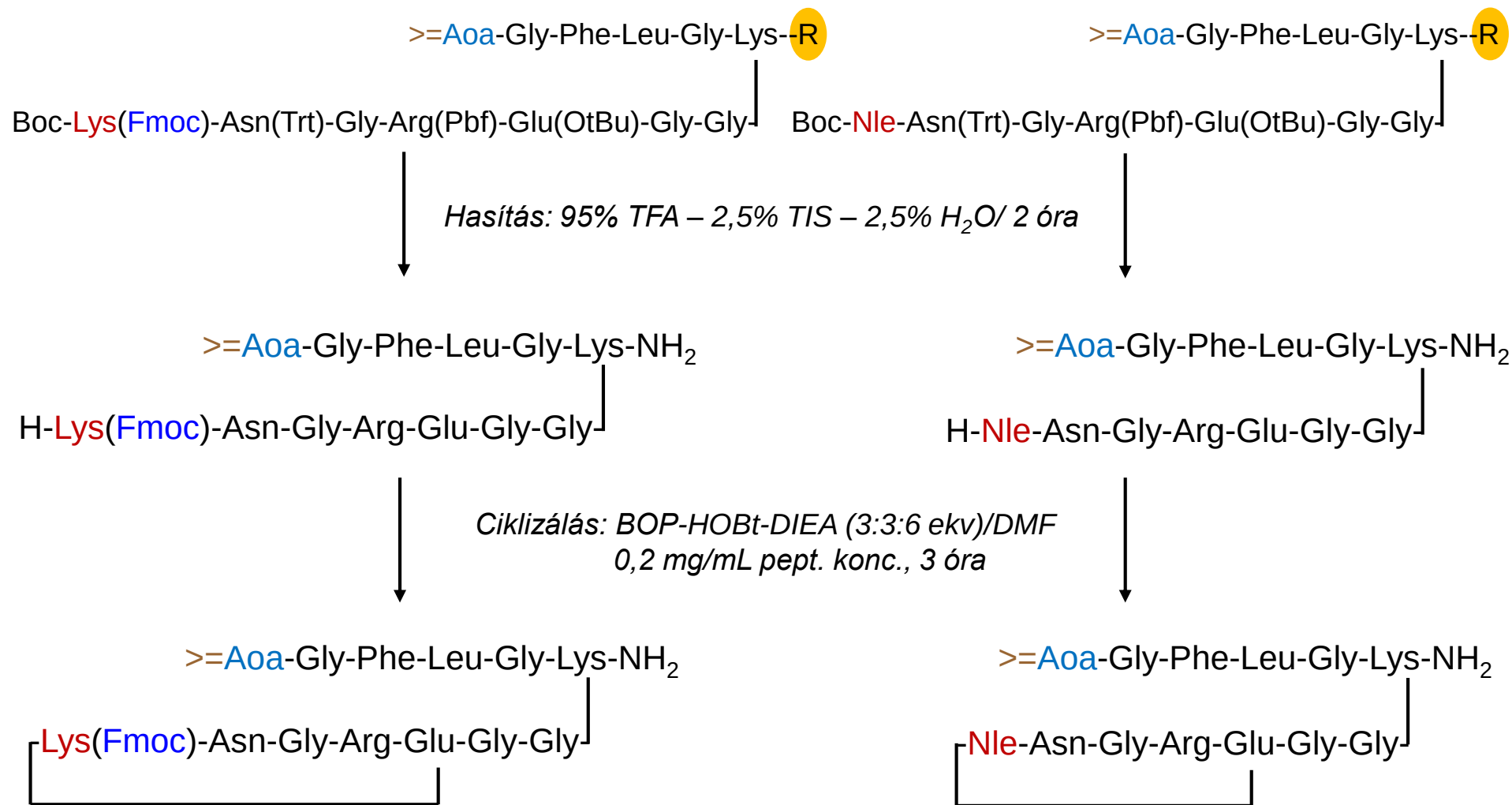


15,8 ± 4,4 μM (HT-1080)
>>50 μM (HT-29)

kettős (CD13 és integrin) hatású

CD13 specifikus

Amid-kötést tartalmazó ciklopeptid konjugátumok szintézise



A konjugátumok in vitro tumorellenes hatása

$\geq$ Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-NH₂

Lys(Fmoc)-Asn-Gly-Arg-Glu-Gly-Gly

1. 20% piperidin/DMF
2. 1M metoxilamin/0,2M NH₄OAc (pH 5), 1 óra
3. Dau/0,2M NH₄OAc (pH 5), 1 óra

Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-NH₂

Lys-Asn-Gly-Arg-Glu-Gly-Gly

$\geq$ Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-NH₂

Nle-Asn-Gly-Arg-Glu-Gly-Gly

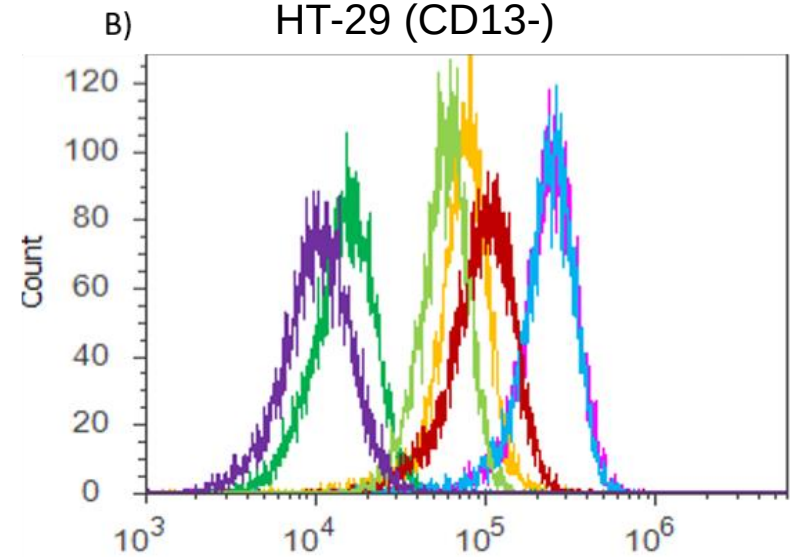
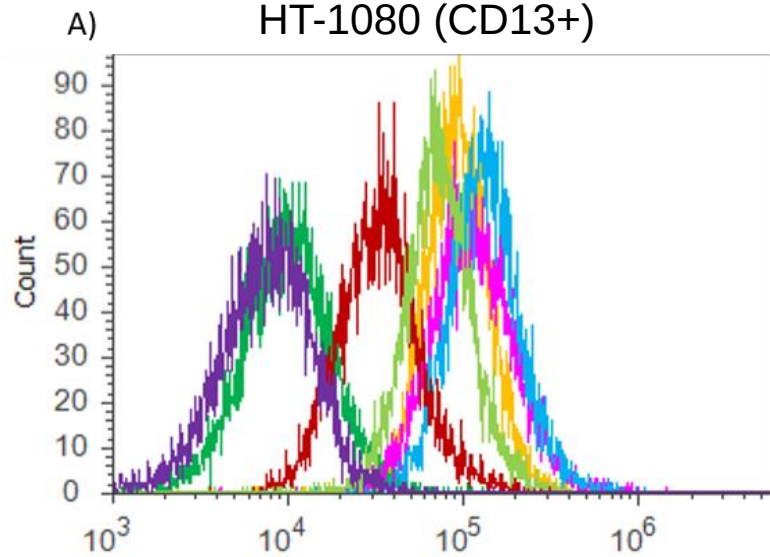
1. 1M metoxilamin/0,2M NH₄OAc (pH 5), 1 óra
2. Dau/0,2M NH₄OAc (pH 5), 1 óra

Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys-NH₂

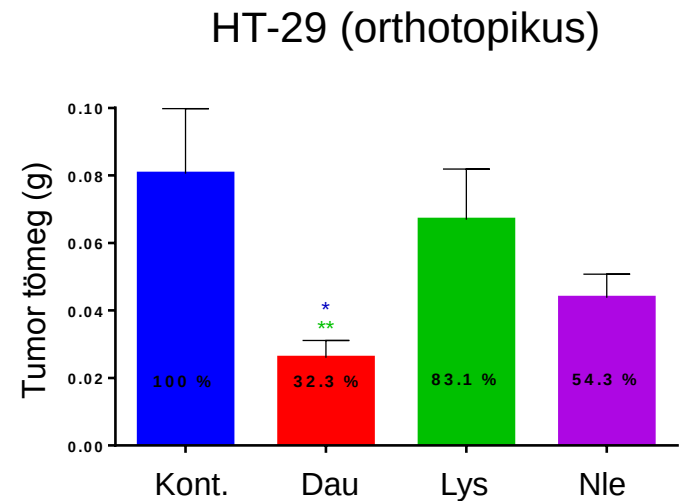
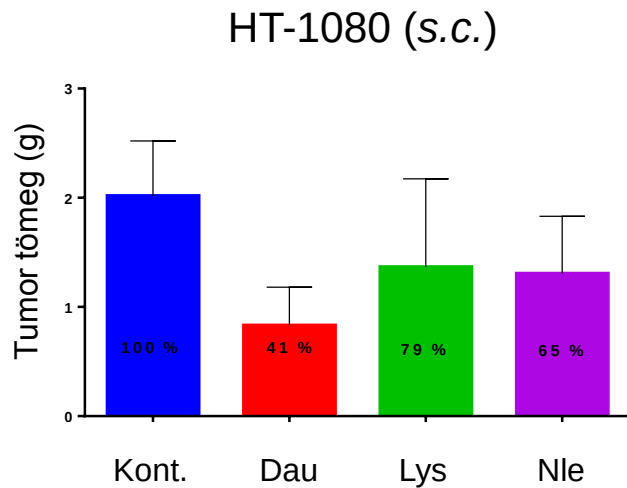
Nle-Asn-Gly-Arg-Glu-Gly-Gly

Konjugátum	HT-1080 (6 óra)	HT-29 (6 óra)	HT-1080 (72 óra)	HT-29 (72 óra)
Dau	1,4 ± 0,6	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1
Lys	5,7 ± 0,5	8,7 ± 1,2	1,4 ± 0,7	3,0 ± 0,5
Nle	5,5 ± 0,3	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,6	1,3 ± 0,2

A konjugátumok in vitro sejfelvétele és in vivo tumornövekedés gátlása



— Kontroll — Lys-konjugátum — Nle-konjugátum



Köszönetnyilvánítás

Semmelweis Egyetem

University of Konstanz, Germany

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Kőhidai László
Lajkó Eszter
Láng Orsolya
Polgár Livia
Murányi József
Csík Gabriella

Hegedüs Rózsa
Szabó Ildikó
Orbán Erika
Enyedi Kata Nóra

Marilena Manea
Ulrike Leurs
Pascal Schlage
Andreas Marquardt
Verena Natalie Schreier
Michael Przybylski

ELTE Szerves Kémiai Tanszék

Országos Onkológiai Intézet

Kapuvári Bence
Vincze Borbála
Tóvári József
Ivan Randelovic
Schulz Ákos
Gacs Alexandra
Miguel Tejeda
Gaál Dezső

Sabine Schuster
Andrea A.P. Tripodi
Kovácsné Biri Beáta
Bősze Szilvia
Vácziné Schlosser Gitta
Babos Fruzsina
Oláhné Szabó Rita
Pethő Lilla
Hudecz Ferenc

Perczel András
Czajlik András
Láng András
Majer Zsuzsa
Farkas Viktor
Knapp Krisztina
Kiss Éva

Debreceni Egyetem

MTA TTK

Tóth Szilárd
Szakács Gergely
Szeder Bálint
Buday László

Pécsi Tudományegyetem

Kovács Magdolna

Szegedi Tudományegyetem

Gardi János

Halmos Gábor
Szabó Zsuzsanna
Sipos Éva
Kertész István
Máté Gábor
Trencsényi György

Támogatók



NVKP_16-1-2016-0036



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



K 104045, K 119552



VEKOP-2.3.3-15-2017-00020

Köszönöm a megtisztelő figyelmüket!

Boldog ünnepeket kívánok

