



Célzott tumorterápiában fontos receptor fehérjék és azok jelátviteli változásának vizsgálata peptid—hatóanyag—polimer nanorendszer segítségével

Dr. Mező Gábor¹, Dr. Iván Béla², Dr. Kőhidai László³

¹ *MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport,*

² *MTA TTK AKI Polimer Kémiai Kutatócsoport,*

³ *Semmelweis Egyetem, GSI, Kemotaxis Munkacsoport*

MEDInPROT Konferencia

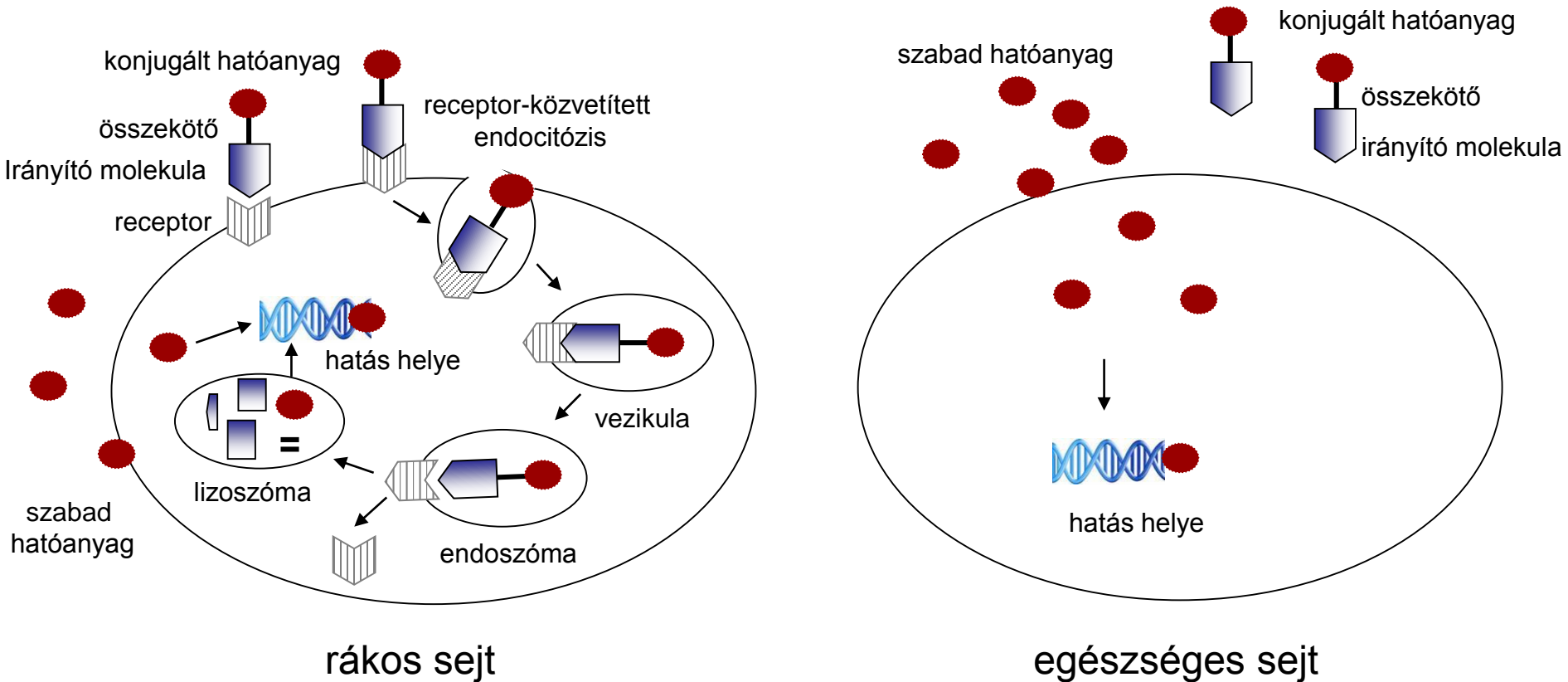
2016. 04. 09.

Budapest



MEDINPROT

Célzott tumorterápia: szelektív hatóanyag célbajuttatás peptidekkel



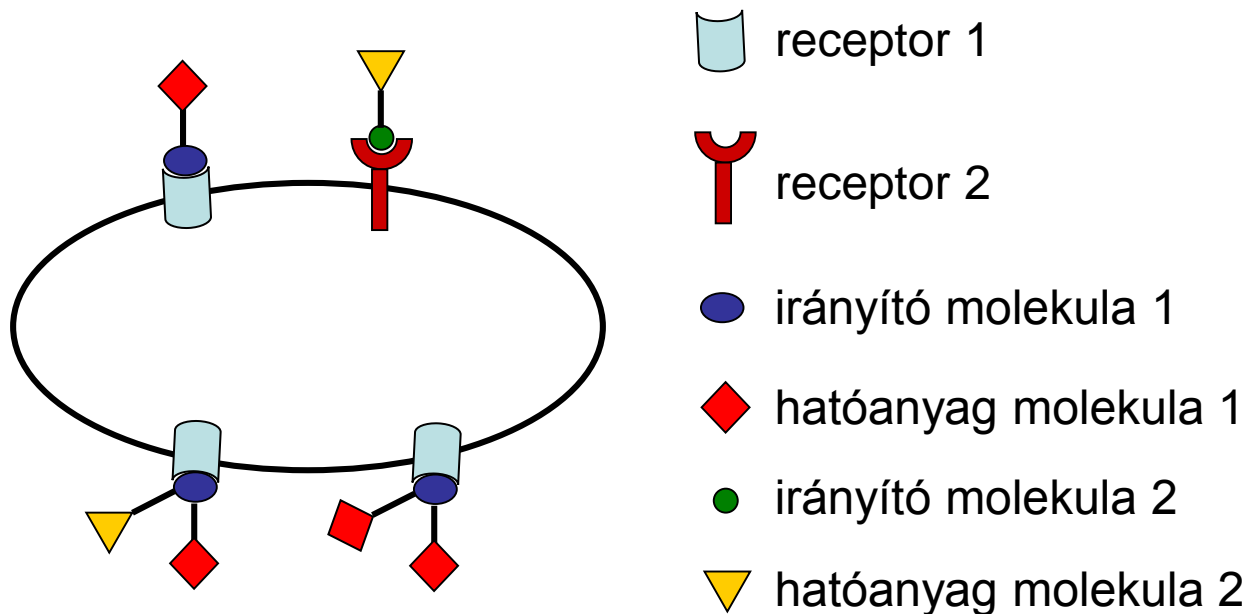
Hogyan növelhető a hatóanyag – peptid konjugátumok hatása?

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.

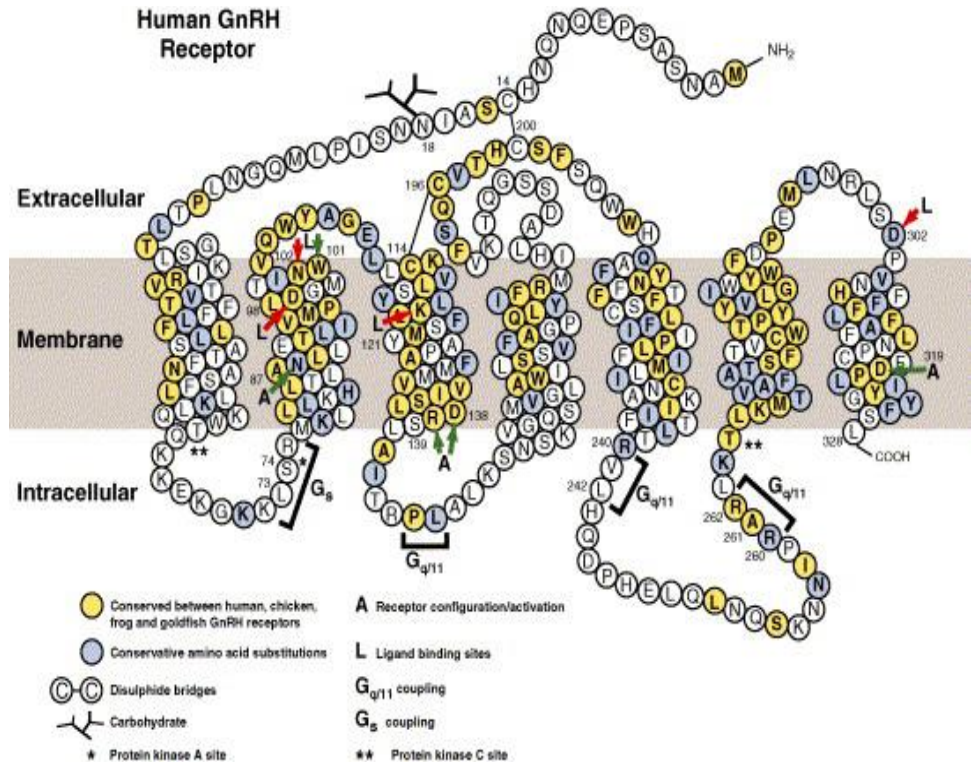


Tumor specifikus célbajuttatás GnRH (LHRH) receptoron keresztül

GnRH receptorok tumorsejteken:

- > 50% emlődaganat
- ~ 100% melanoma
- > 70% petefészekrák
- > 90% prosztatatarák
- > 75% méhtestrák
- > 80% vesedaganat
- > 40% agytumor
- > 90% non-Hodgkin limfóma

tartalmaz GnRH receptorokat.



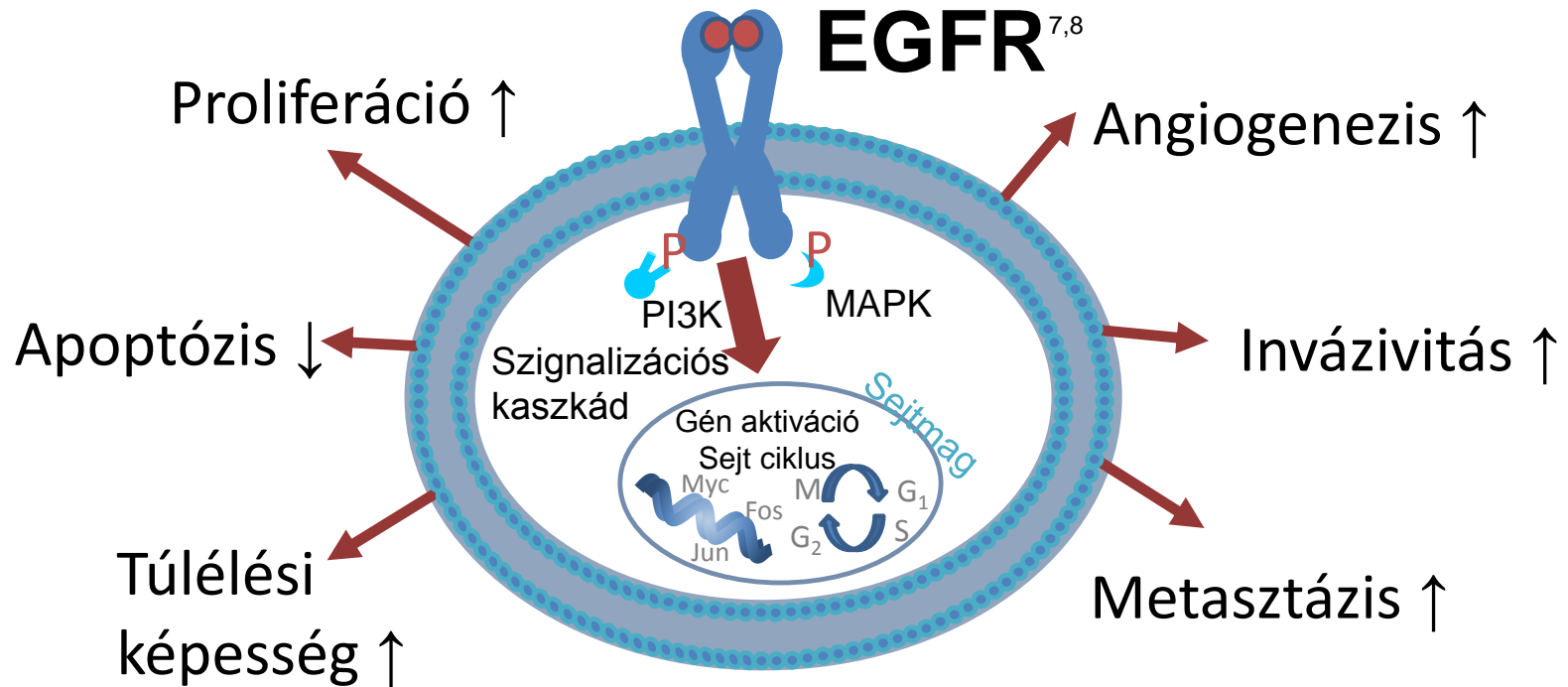
GPCR

GnRH receptorok megtalálhatók egészséges szövetekben is, különösen a szaporító szervekben, de sokkal kisebb mértékben, mint a tumorsejteken.

Ezért a GnRH receptorok alkalmasak a hatóanyag célba juttatására az irányított tumor terápiában.

Epidermális növekedési faktor (EGF) és receptora (EGFR)

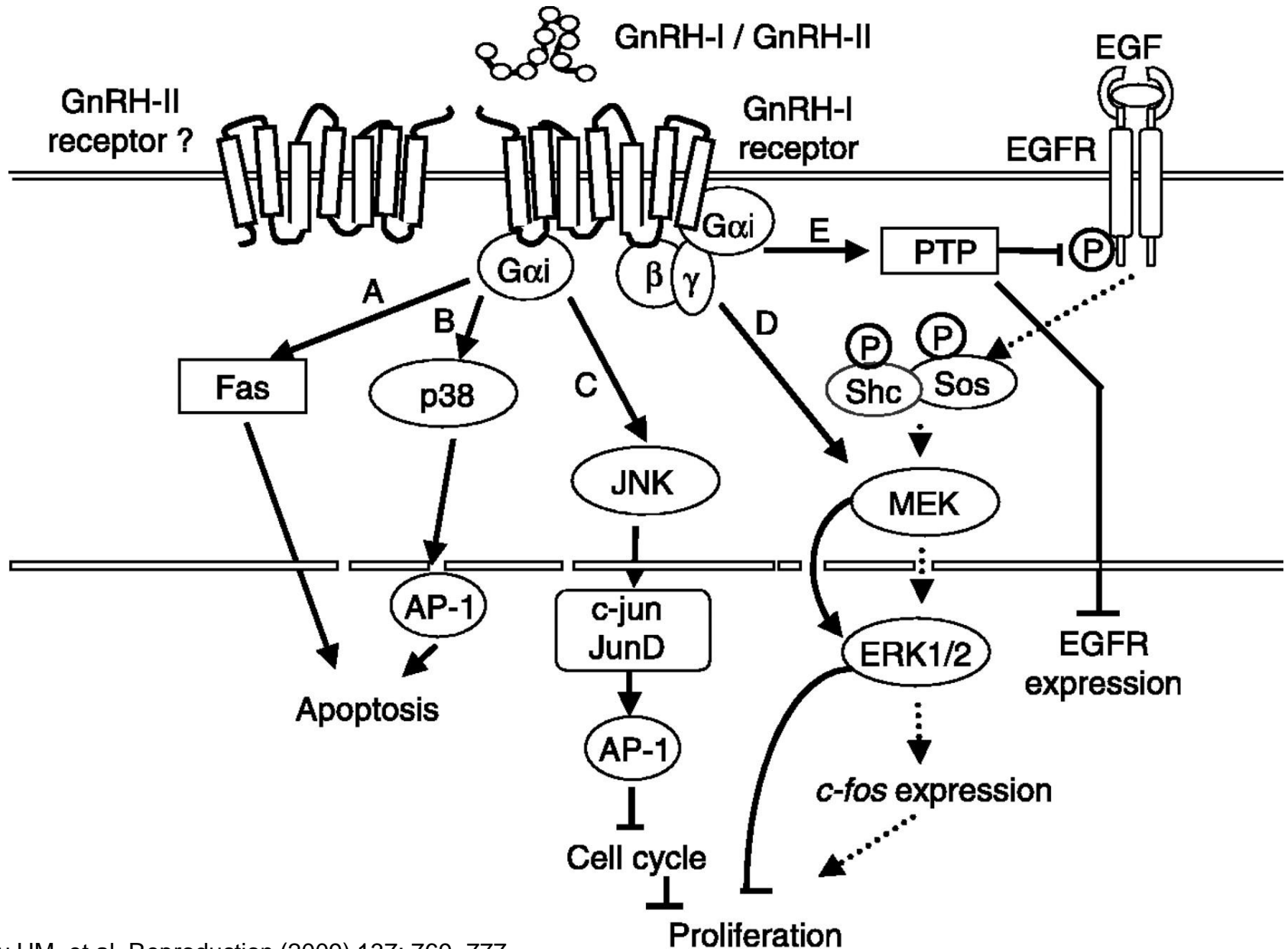
- Az EGFR a tirozin kináz receptorcsaládba tartozik
- Az EGFR számos daganatsejt felszínén megtalálható (pl. tüdő, vastagbél, emlő)



Tumorterápia:

Receptor gátlás (EGF bekötődés gátlása) ellenanyagokkal (extracelluláris)
Tirozin kináz gátlók (jelátviteli folyamatok gátlása, intracelluláris)

A GnRH és az EGF receptorok kölcsönhatása (párbeszéde)



EGF receptor célzása

- **GE11**

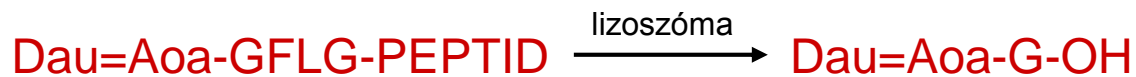
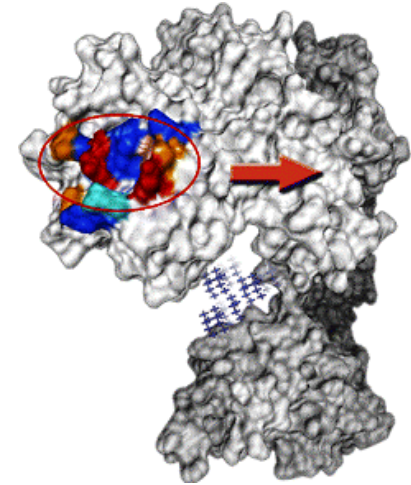
H-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-OH

- kisebb immunogenitás és mitogén hatás
- receptor mediált endocitózis a szignalizáció indukálása nélkül

- **D4**

H-Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr-NH₂

- tervezés számítógépes modellezéssel
- nem az EGF zsebhez kötődik



Dau = daunomicin Aoa = aminosav

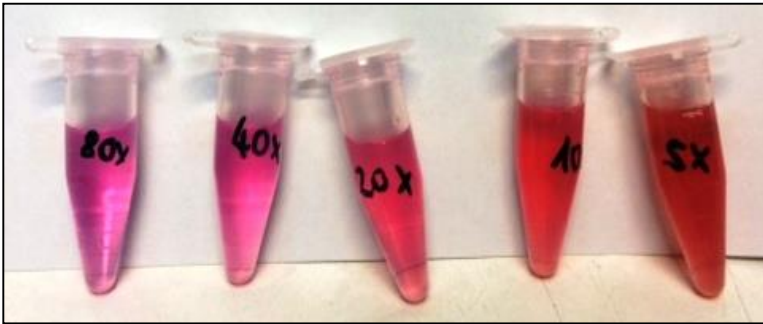
Li Z., Zhao R., Wu X., Sun Y., Yao M., Li J., Xu Y., Gu J., *FASEB J.*, **2005**; 19, 1978-1985.

Song S., Liu D., Peng J., Deng H., Guo Y., Xu L. X., Miller A. D., Xu Y., *FASEB J.*, **2009**; 23, 1396-1404..

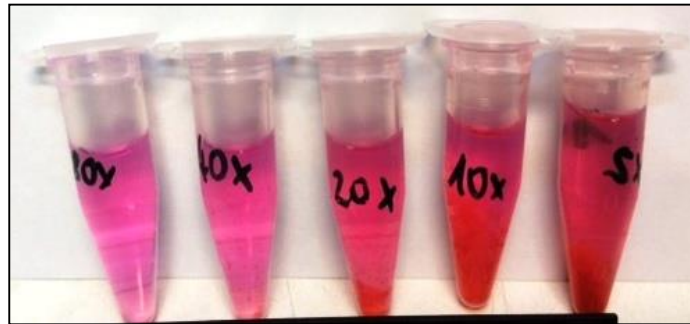
Orbán E., Mezo G., Schlage P., Csík G., Kulić Z., Ansorge P., Fellingner E., Möller HM, Manea M. *Amino Acids.* **2011**; 41, 469-483.

Oldás próba 1.

- szérum mentes RPMI-ben



5 perc



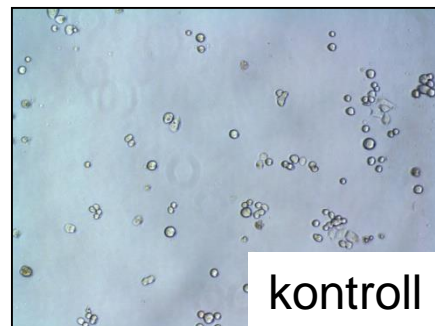
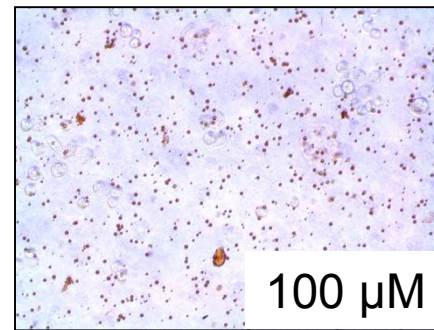
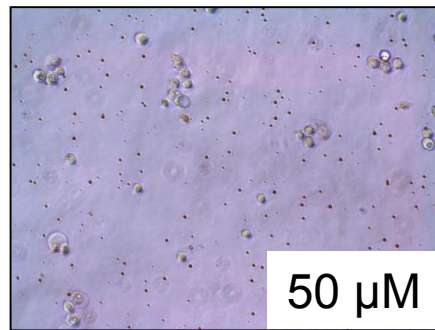
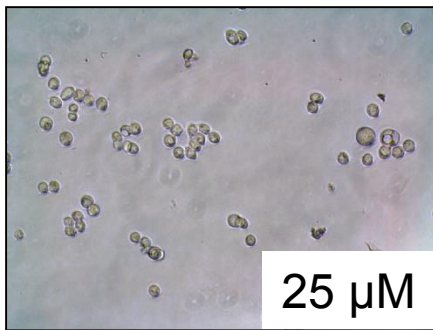
2 óra



Dau=Aoa-GFLG-GE11
10⁻³ M koncentrációjú
oldatból hígítva
(DMSO-ban oldva)

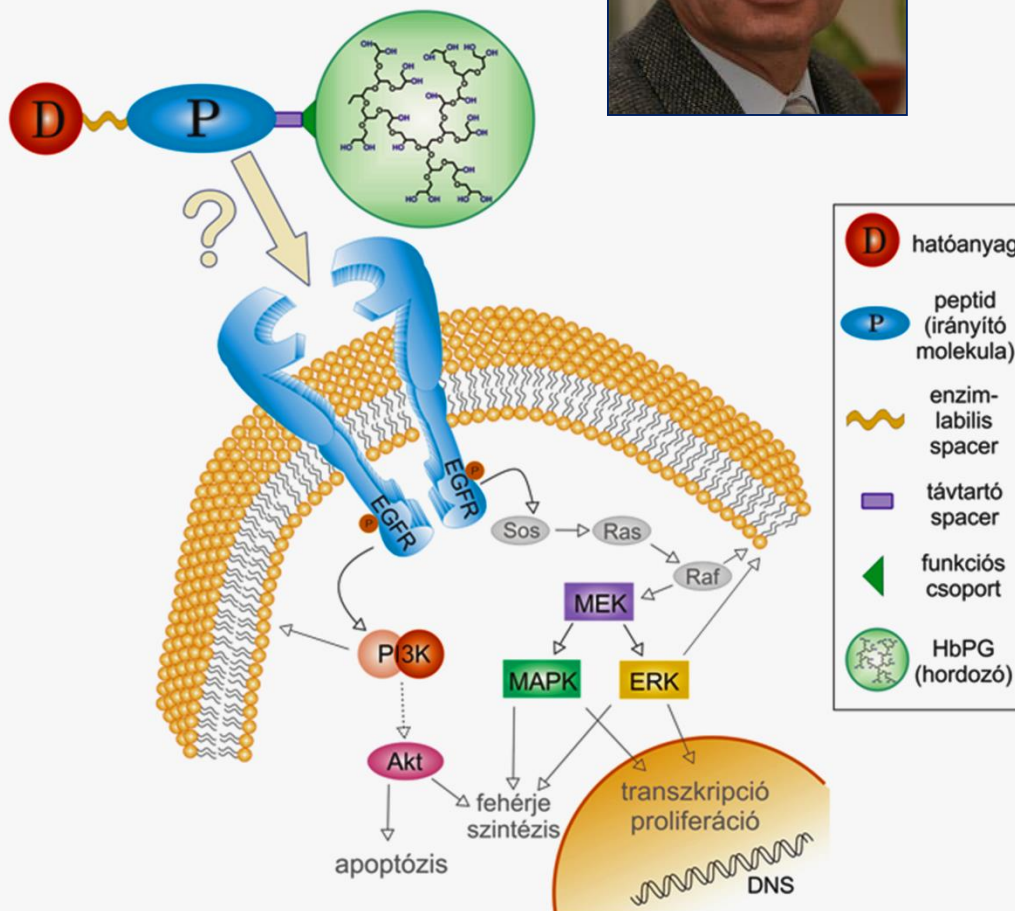
Oldás próba 2.

- RPMI-ben oldódnak
10⁻³ M koncentrációjú oldatból hígítva (DMSO-ban oldva)
- Dau=Aoa-GLFG-D4 kolloidális oldat



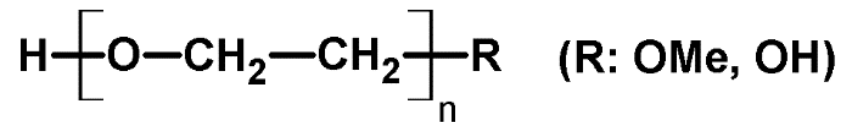
HT-29 colon carcinoma sejteken
Zeiss AxioVision 01 400x

Célkitűzés



PEG és HbPG

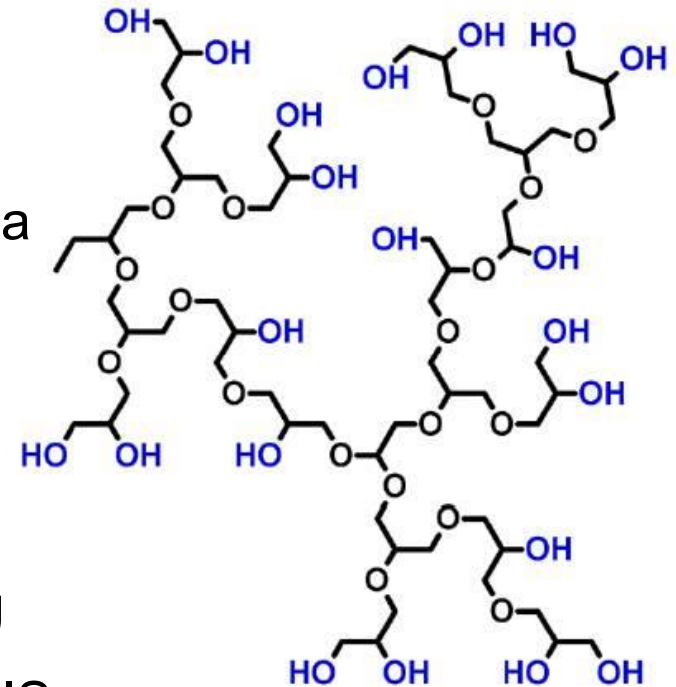
PEG



- ❑ Jól ismert, széles körben elterjedt és alkalmazott
- ❑ Kereskedelmi forgalomban kapható – Monofunciós változatai is
- ❑ Biokompatibilis

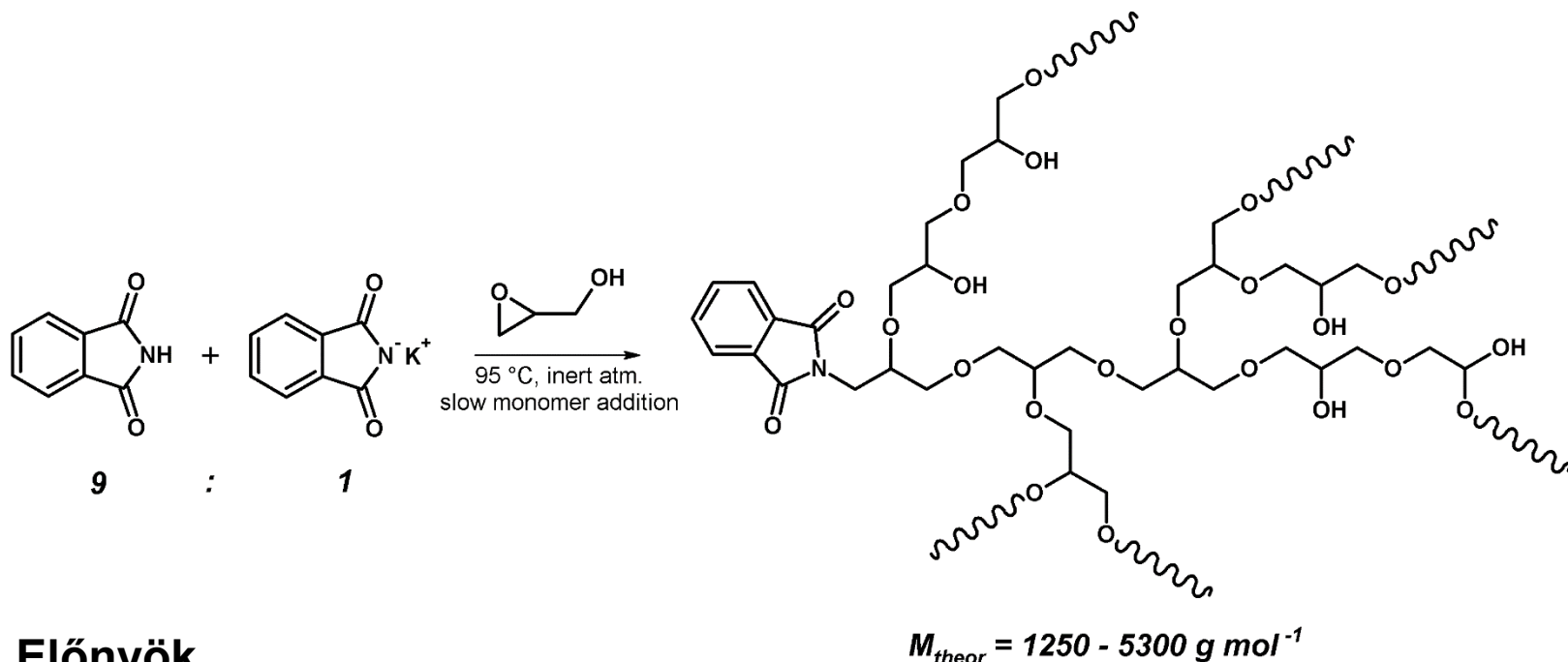
Hiperelágazásos poliglicidol

- ❑ Poliéter poliol; a PEG elágazó analógja
- ❑ Egyszerűen előállítható
- ❑ OH csoportok nagy száma
 - ❑ Kiemelkedő oldhatóság
 - ❑ Könnyű funkcionálizálhatóság
- ❑ PEG-hez hasonlóan **BIOKOMPATIBILIS**



Hiperelágazásos
PG (HbPG)

Konceptió – Ftálimid/ftálimid-K iniciátor alkalmazása



Előnyök

- Az iniciátor deprotonálása közvetlenül összeméréssel
- Ftalil csoport egyszerűen eltávolítható

Kísérleti körülmények

- Különböző molekulatömegű HbPG (1250, 1525, 2015, 2610, 5320 g/mol)
- 95 °C, inert atm., lassú monomer adagolás (2,5 mL/óra)

Analízis

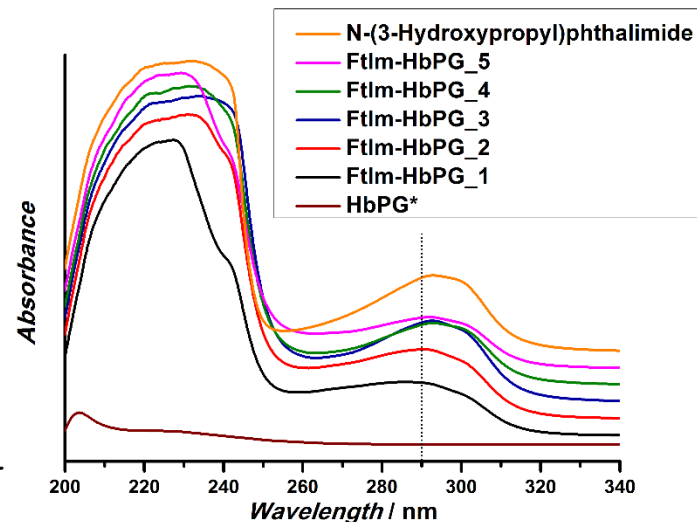
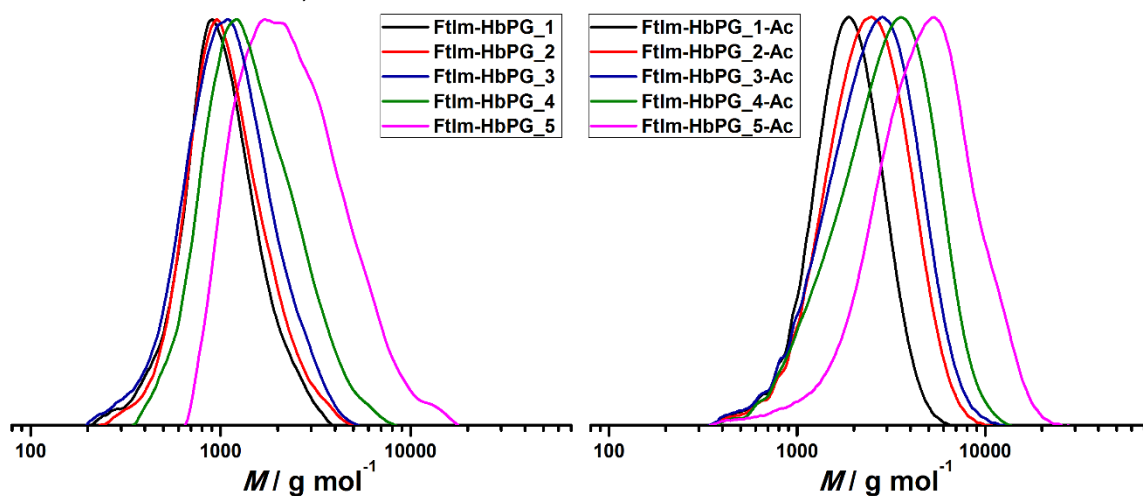
- GPC (víz, PEG kalib.; Acetilezést követően THF eluens, PSt kalib.)
- UV (hidroxipropil-ftálimid kalibrációval, 290 nm, EtOH)
- Gőznyomás ozmometria
- NMR

FtIm-HbPG analízis eredmények (1)

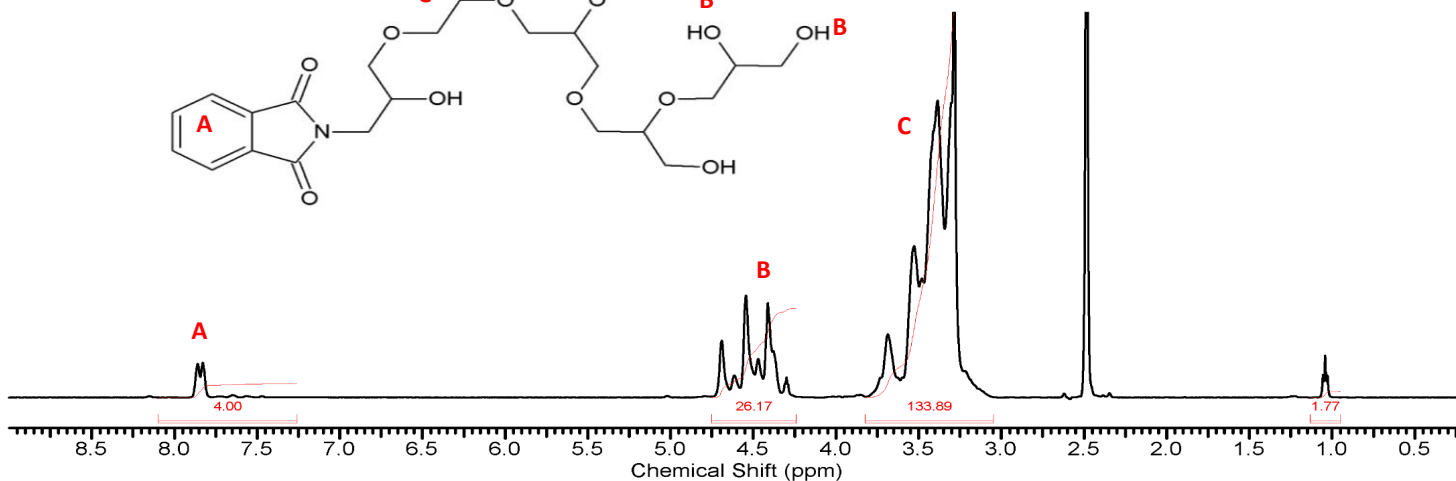
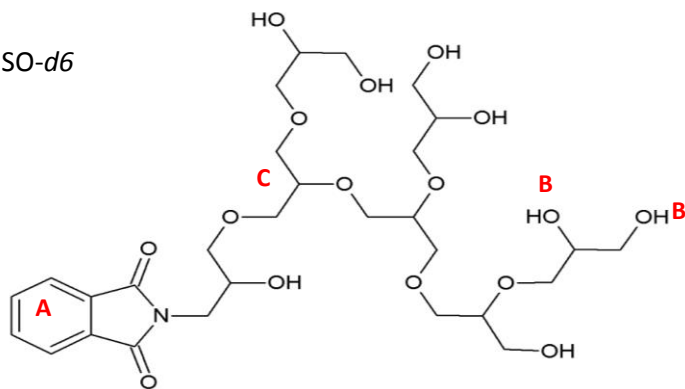
Molekulatömeg-eloszlás görbék

Víz eluens, PEG konv. kalib.

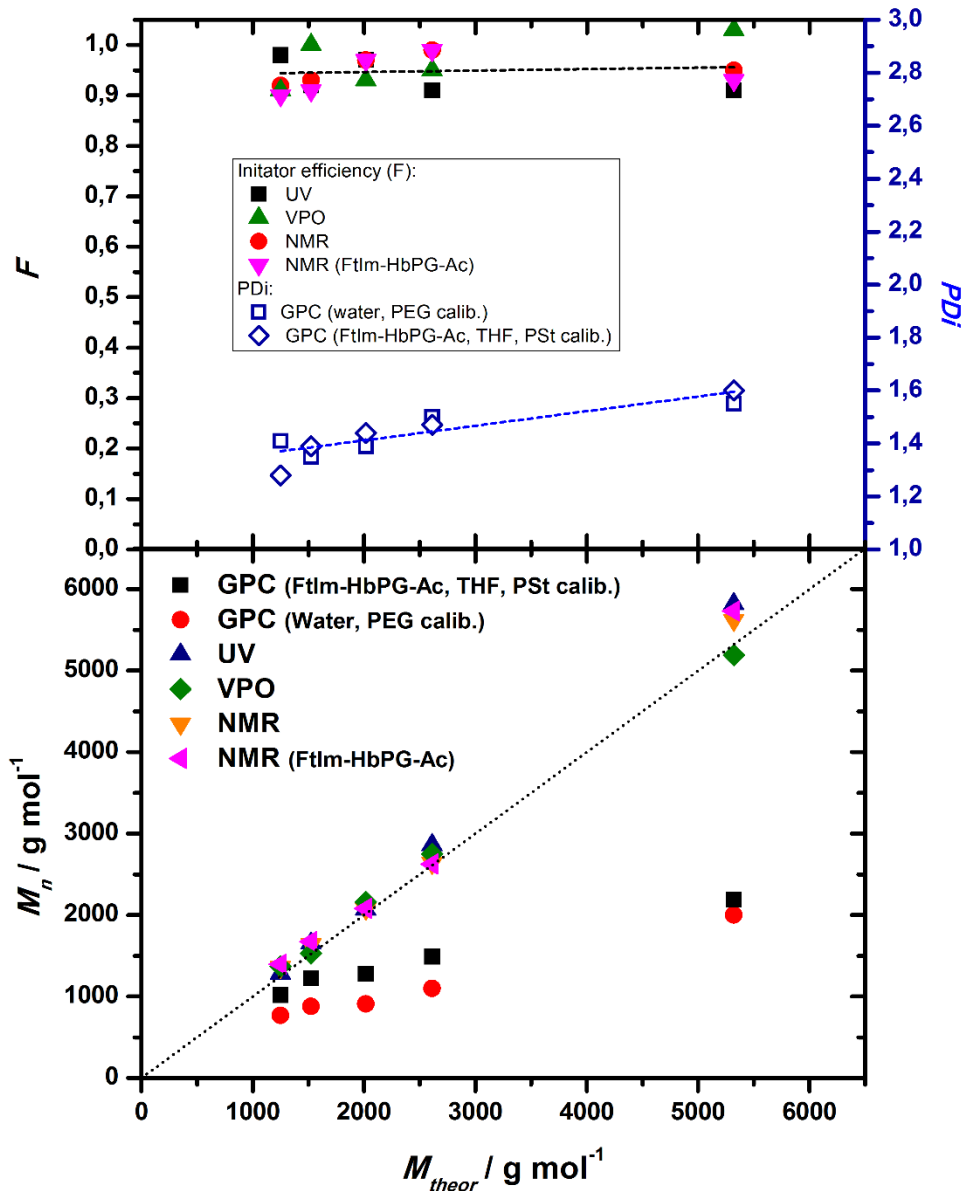
THF eluens, PSt konv. kalib.



FtIm-HbPG_3
500 MHz, DMSO-d6

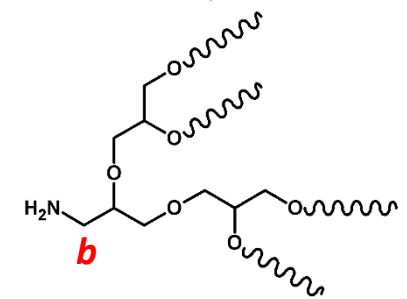
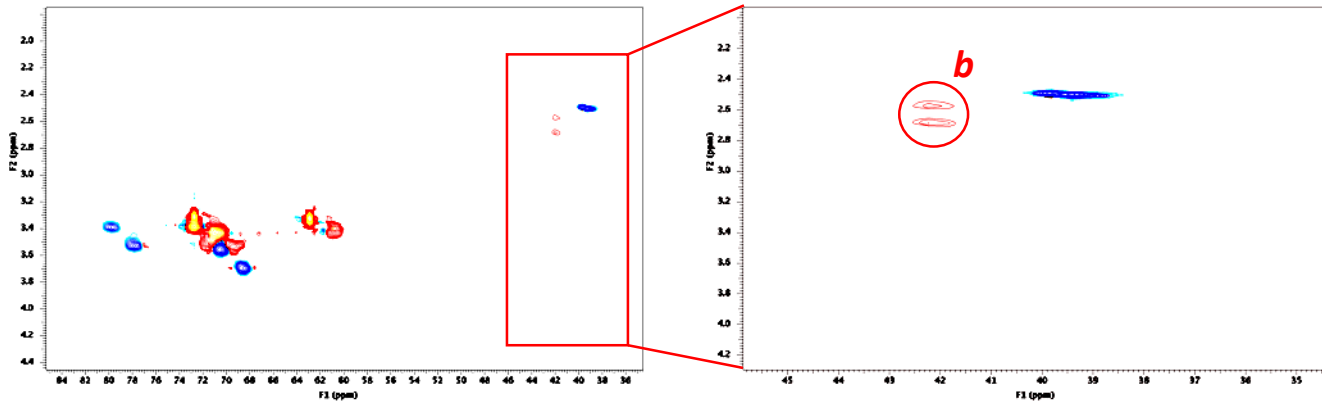
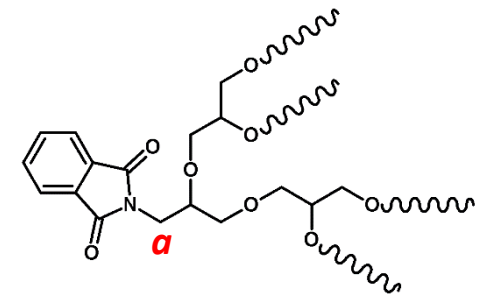
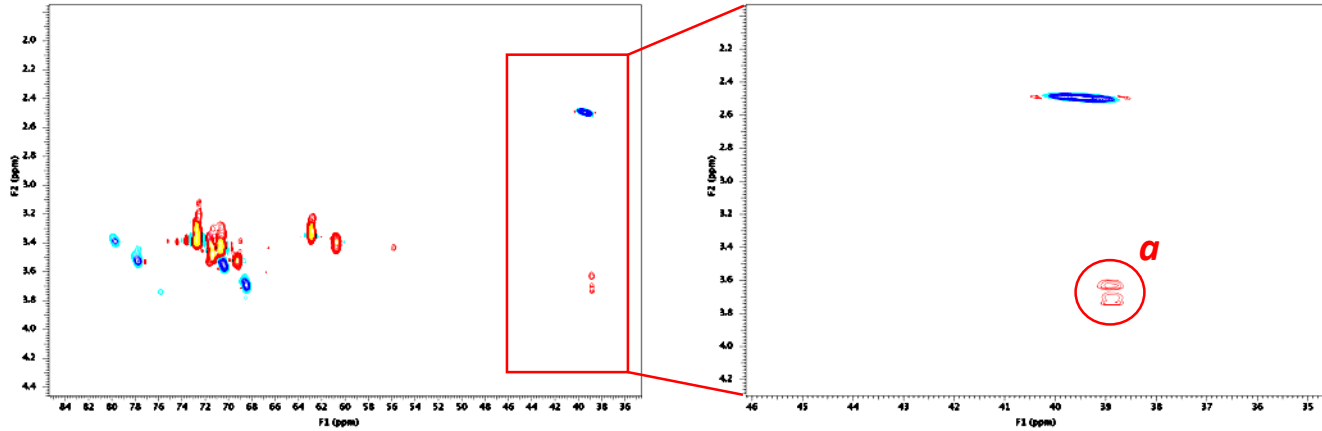


FtIm-HbPG analízis eredmények (2)



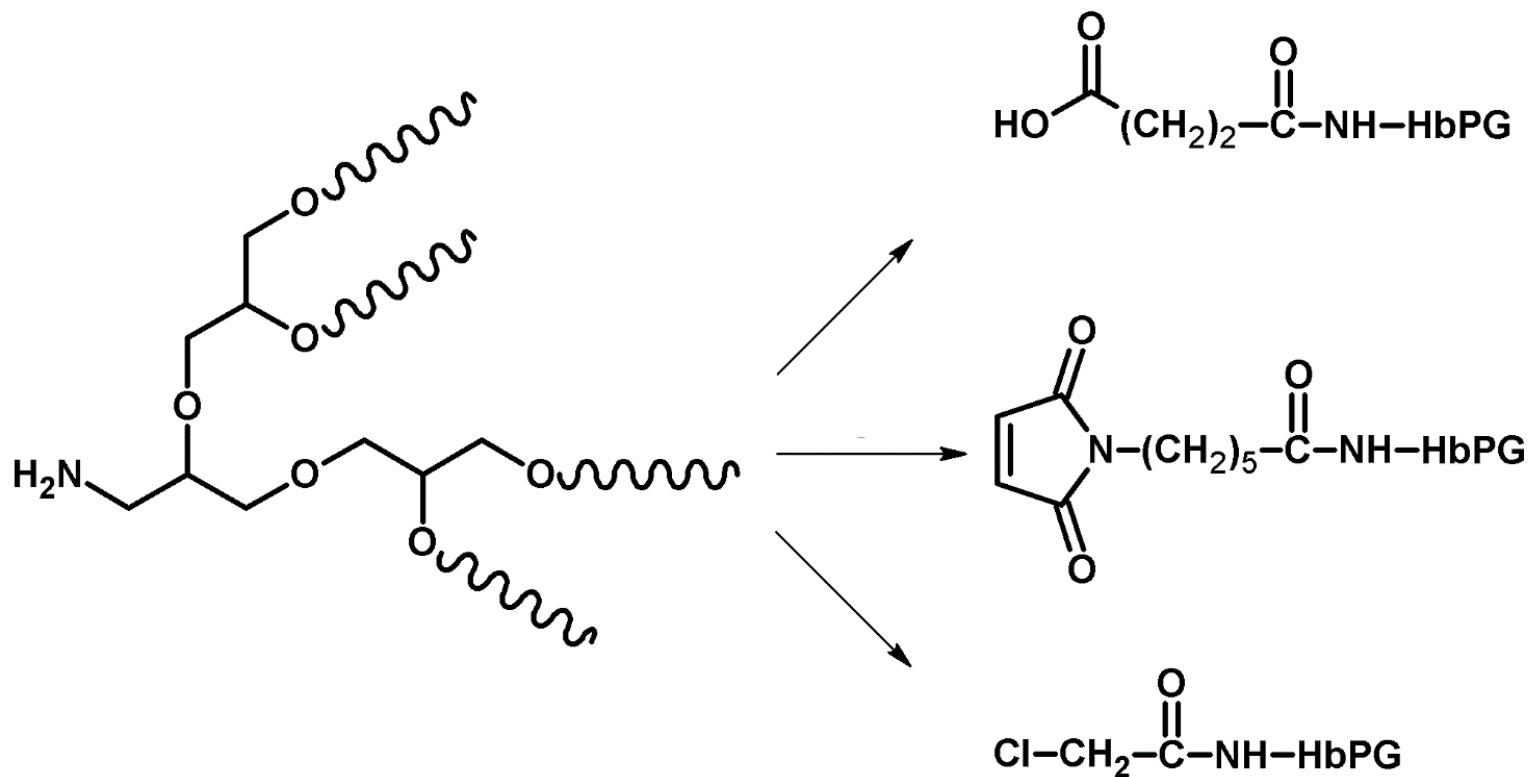
- A GPC alapján meghatározott molekulatömeg alacsonyabb – az elágazó szerkezet következménye
- A többi módszerrel meghatározott M közel megegyezik az elméletileg várttal
- Az iniciátor hatékonyság (F) minden esetben nagyobb mint 90%
- Polidiszperzitás index (PDI) 1,3-1,6 közötti és enyhén nő a tervezett molekulatömeggel

Monofunkcionalizálás igazolása HSQC spektrumok alapján



direkt C-H korrelációk

További terveink: észter és tioéter kötés kialakítására alkalmas HbPG-k



A továbbiakban kísérletet teszünk az amin csoport konjugációs reakciókban releváns funkciós csoportokká történő átalakítására.

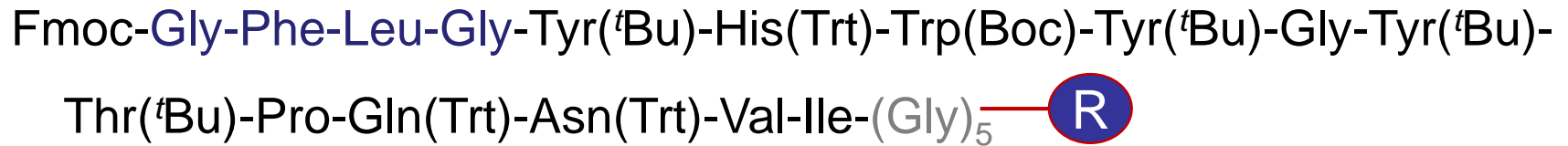
Peptidek szintézise a konjugátumokhoz

Wang gyanta

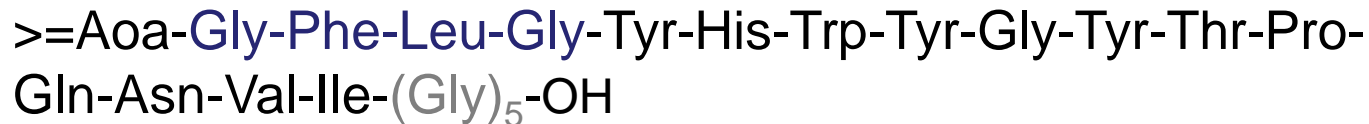
0,6 mmol/g



1. Fmoc-Gly-OH/Fmoc-Ile-OH, DIC, DMAP
2. Fmoc-Aaa-OH, DIC, HOBT

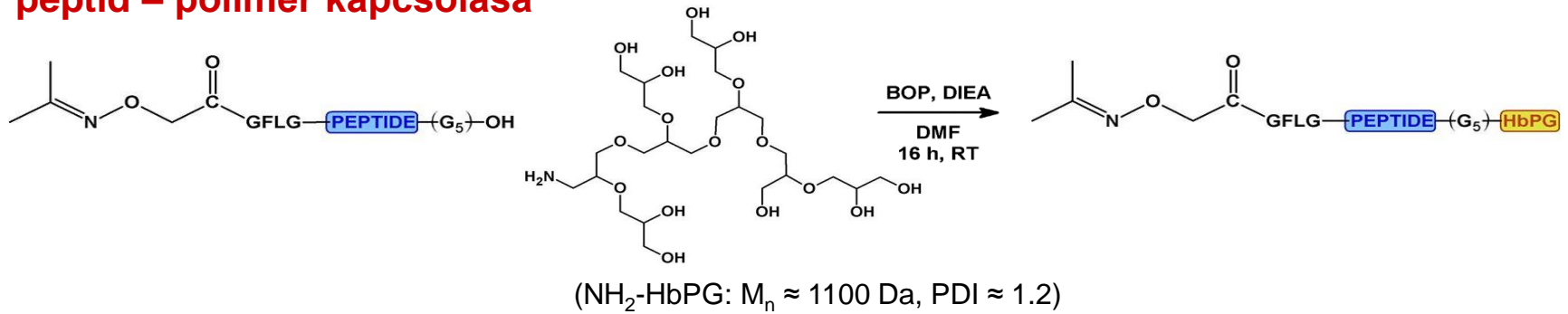


1. Fmoc hasítás
2. >=Aoa-OH
3. hasítás a gyantáról

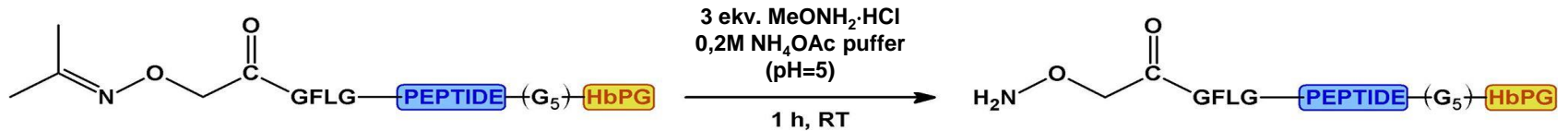


Konjugáció

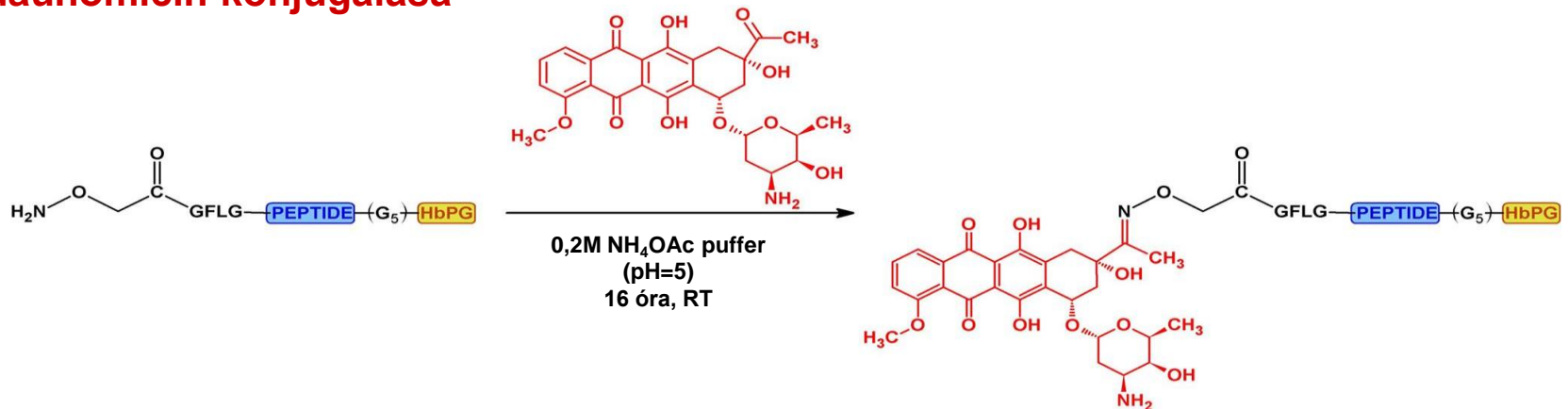
- peptid – polimer kapcsolása



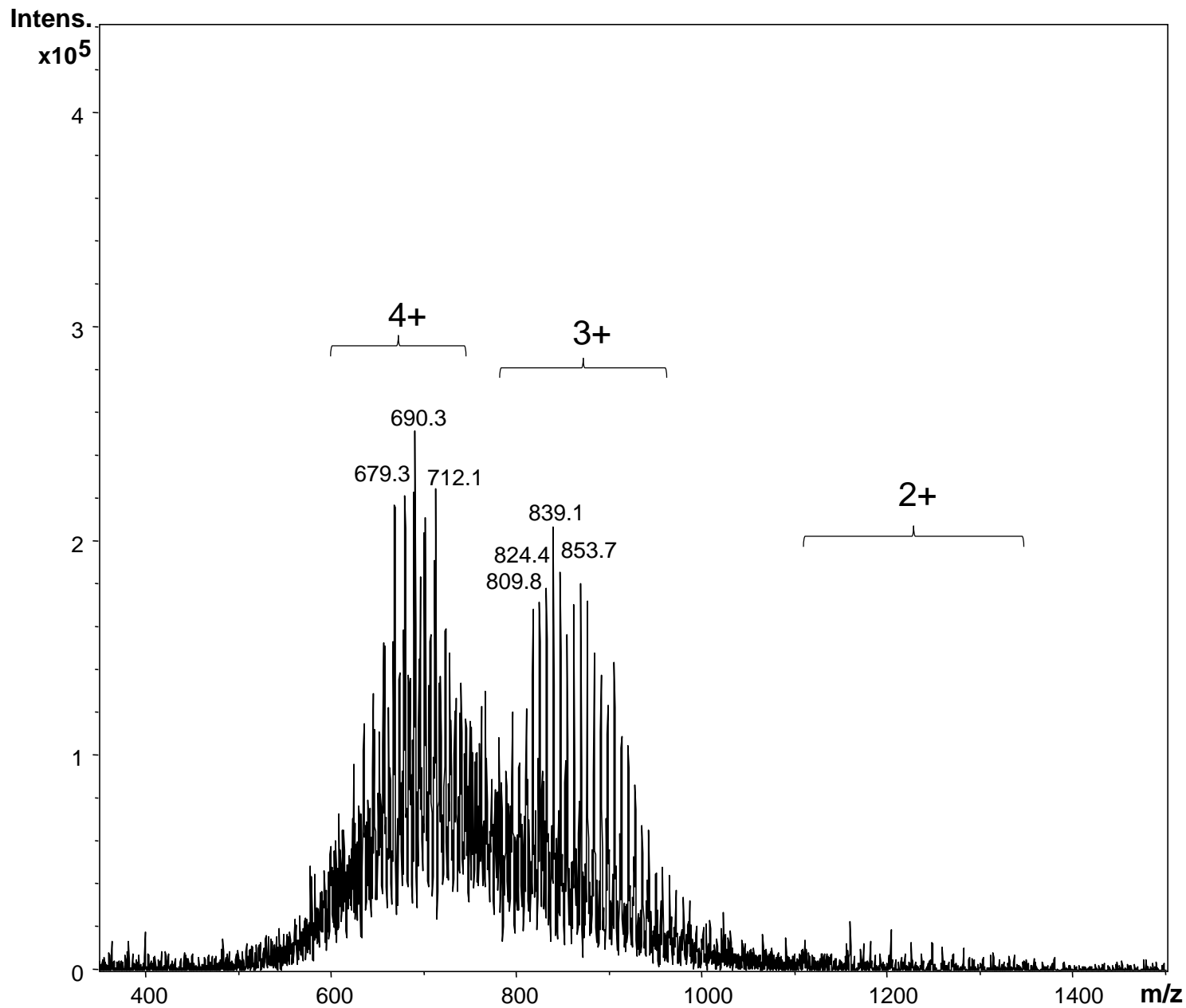
- izopropilidén védőcsoport eltávolítása



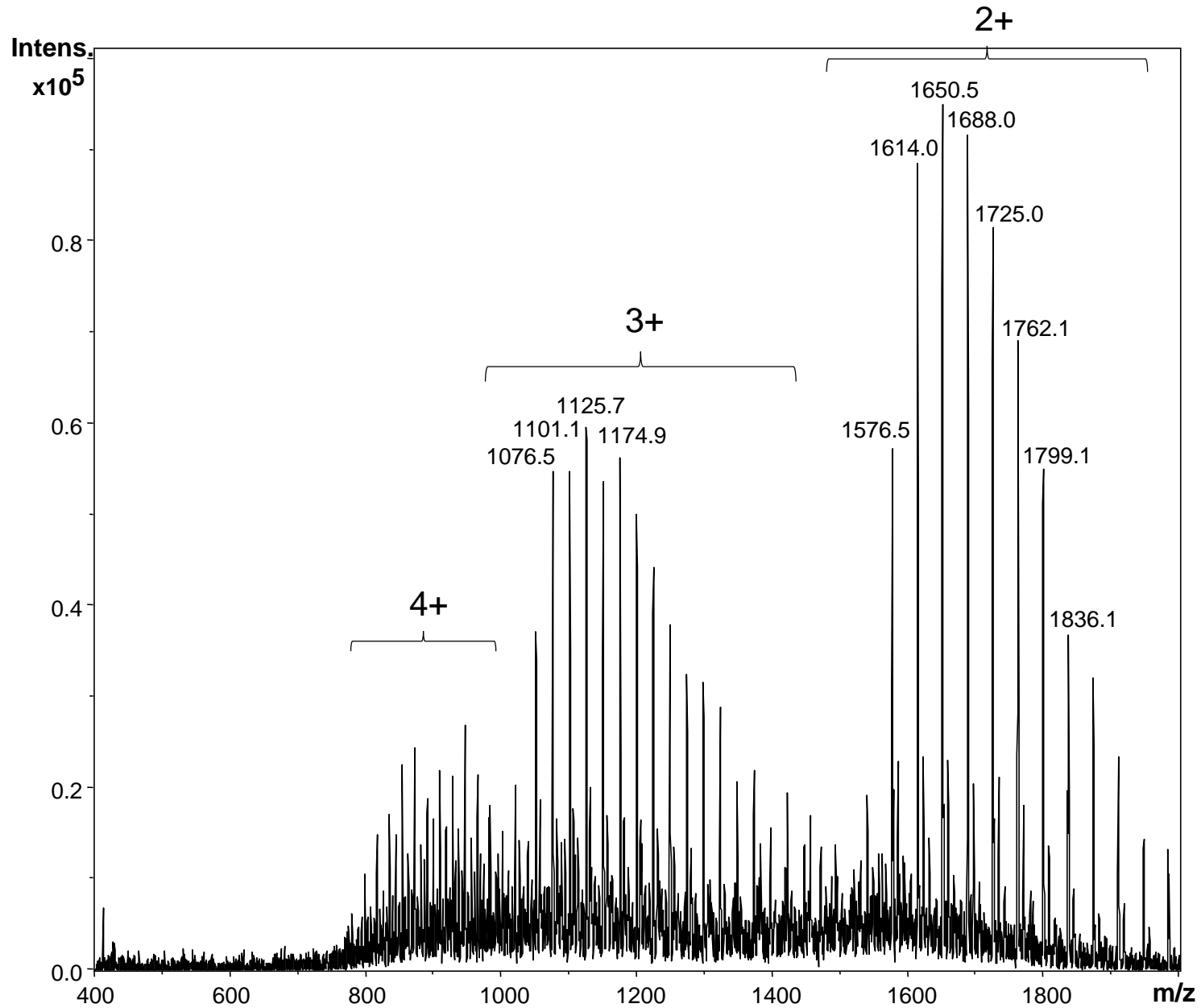
- daunomicin konjugálása



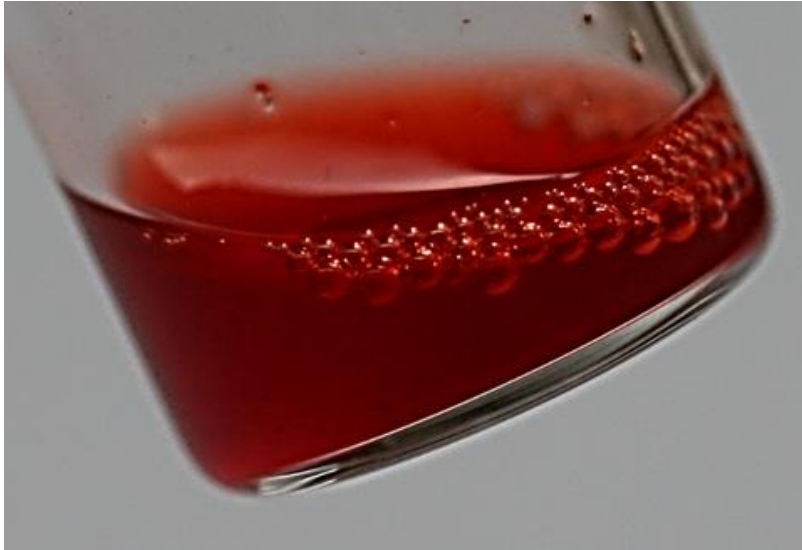
Dau=Aoa-GFLG-D4-PEG



Dau=Aoa-GFLG-GE11-G₅-HbPG



A PEG és a HbPG konjugátumok oldékonyságának összehasonlítása



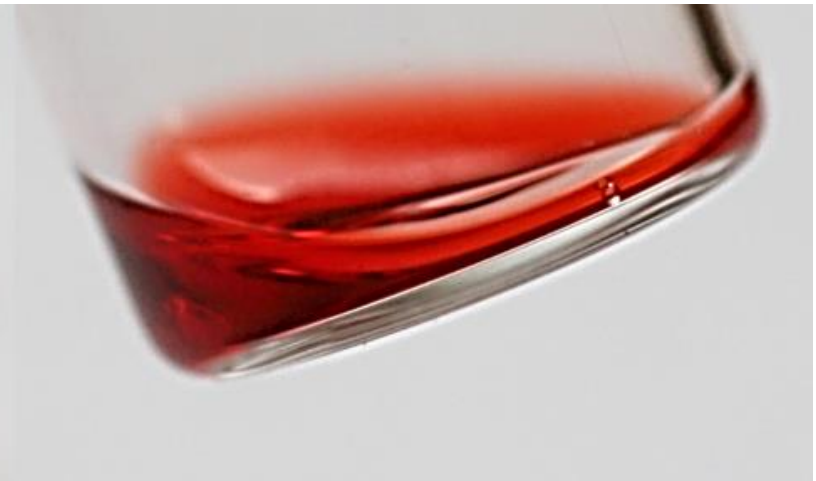
Dau=Aoa-GFLG-D4-PEG



Dau=Aoa-GFLG-D4-HbPG



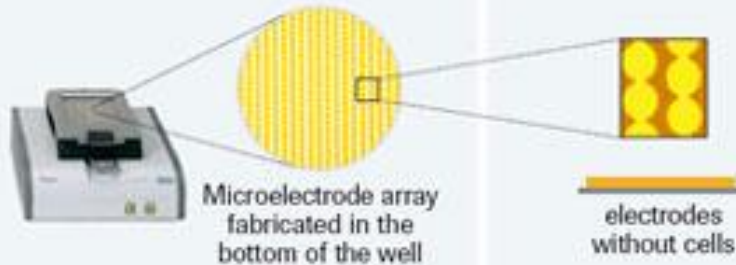
Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG



Dau=Aoa-GFLG-GE11-HbPG

$c = 0,005 \text{ mol / L}$

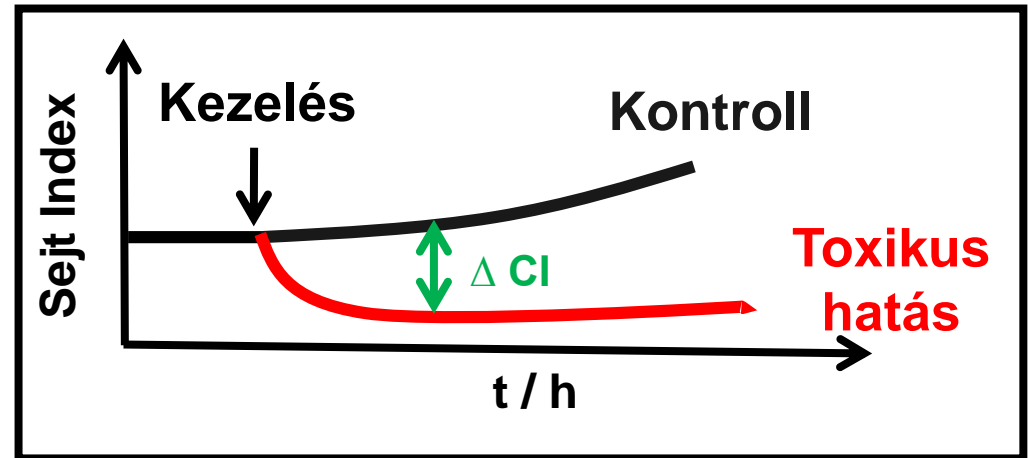
Impedimetria – xCELLigence SP (ACEA Biosciences)



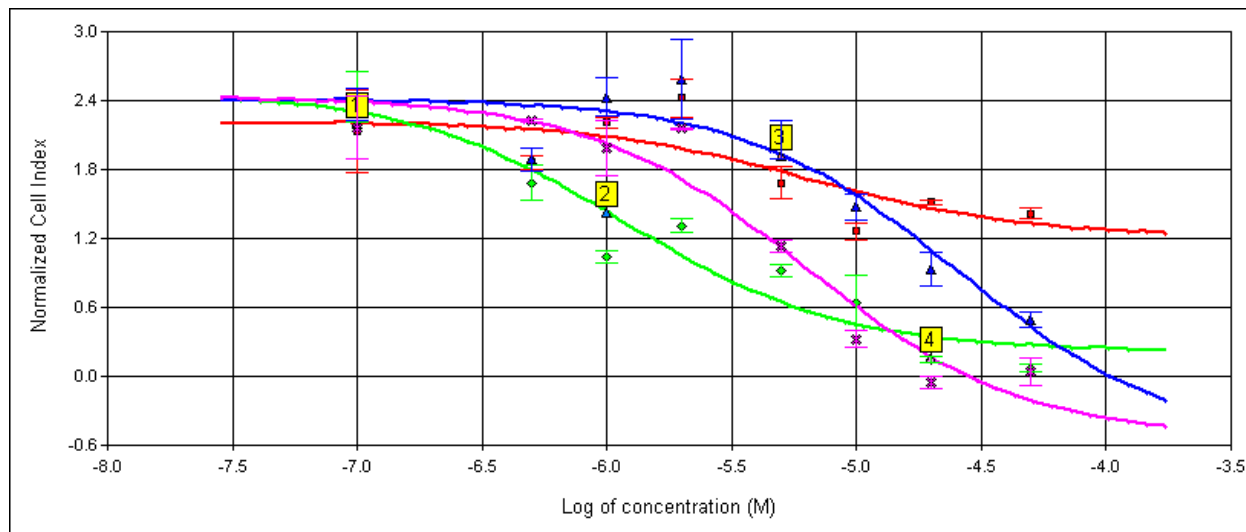
- ❖ A sejtdhézióval arányos impedancia változás (Z) valós idejű mérése arany elektródon (AC rendszer);
- ❖ A kvantitatív elemzések kiszámítását a sejtdhézió (CI) adta:

$$CI = \frac{(Z_i - Z_0)}{F}$$

- ❖ Alkalmazott sejtdenzitás – 10.000 sejt/well
- ❖ Alapvonal – 24 h + 24-72 h követés
- ❖ Statisztikai kiértékelés: RTCA 2.0, Origin Pro8.0 statisztikai rutinjai



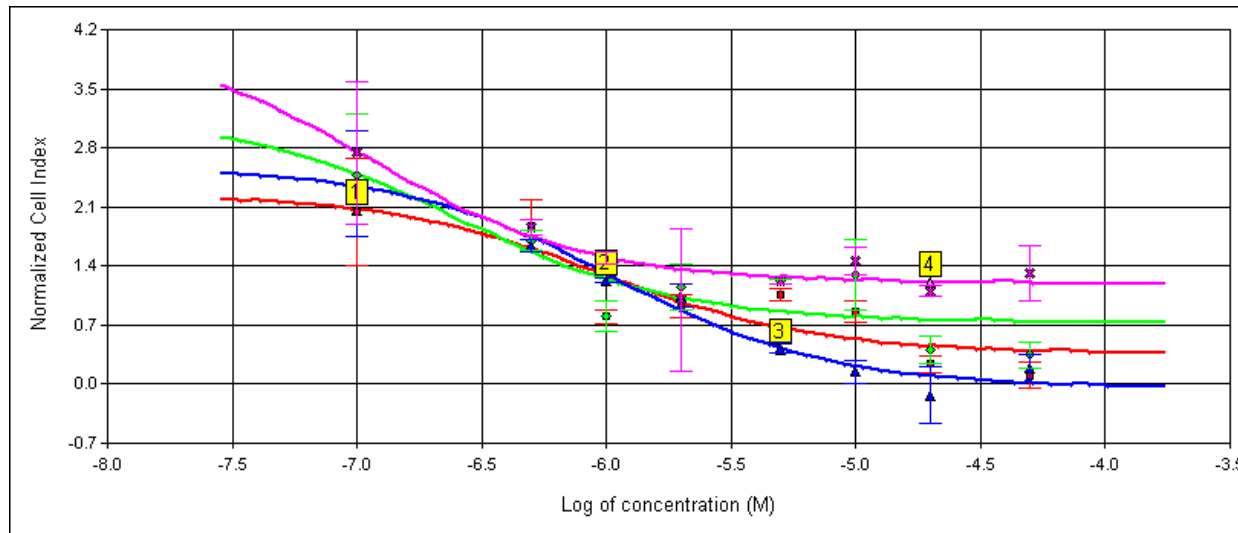
D4 konjugátumok IC₅₀ értéke 48 órás kezelés után



		IC ₅₀
1	Dau=Aoa-GFLG-D4-HbPG	6,47 μM
2	Dau=Aoa-GFLG-D4-G ₅ -HbPG	1,17 μM
4	Dau=Aoa-GFLG-D4-PEG	6,32 μM
3	Dau=Aoa-GFLG-D4-G ₅ -PEG	26,00 μM

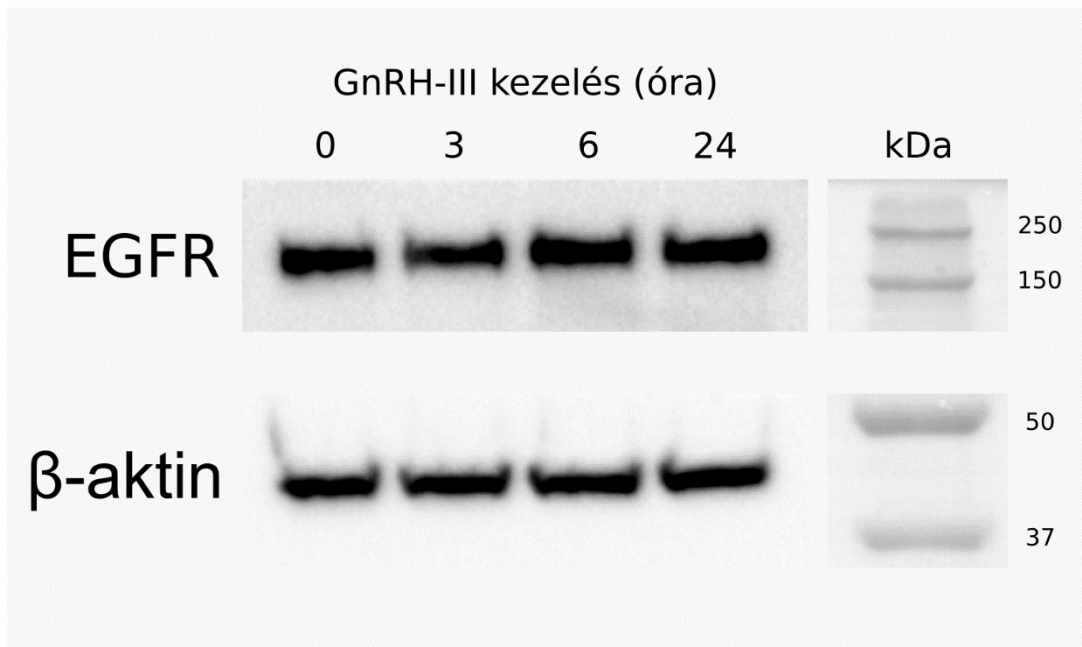
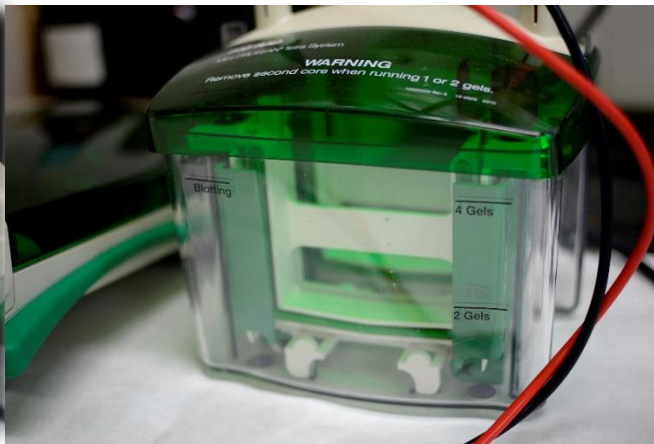
Formula: Sigmoidal dose-response -- $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(\text{Log IC}_{50} - X)})$

GE11 konjugátumok IC₅₀ értéke 48 órás kezelés után



		IC50
2	Dau=Aoa-GFLG-GE11-HbPG	0,26 μ M
1	Dau=Aoa-GFLG-GE11-G ₅ -HbPG	0,96 μ M
3	Dau=Aoa-GFLG-GE11-PEG	1,08 μ M
4	Dau=Aoa-GFLG-GE11-G ₅ -PEG	0,12 μ M

Gélelektroforézis – Western Blot fehérje analízis



HT-29 vastagbél tumorsejteken a GnRH-III kezelés nem befolyásolja szignifikánsan az EGFR szintet.



Köszönetnyilvánítás

Munkatársak:

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport:

Pethő Lilla

Biri Beáta

Orbán Erika

Semmelweis Egyetem, GSI, Kemetaxis Munkacsoport:

Láng Orsolya

Lajkó Eszter

MTA TTK AKI Polimer Kémiai Kutatócsoport:

Kasza György

Anyagiak:

MEDInPROT Szinergia és Műszer Pályázat

OTKA

HORIZON 2020 MAGICBULLET