

# Tumorelles hatás fokozása peptid biokonjugátumokkal

MEZŐ Gábor,<sup>a</sup> SZABÓ Ildikó,<sup>a</sup> ORBÁN Erika,<sup>a</sup> SZABÓ Rita,<sup>a</sup> BÁNÓCZI Zoltán<sup>a</sup>  
és HUDECZ Ferenc<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Pázmány P. stny 1/A, 1117, Budapest, Magyarország

<sup>b</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Pázmány P. stny 1/A, 1117, Budapest, Magyarország

## 1. Bevezetés

A szív- és érrendszeri megbetegedések mellett a daganatos megbetegedések jelentik a legfőbb halálokat a fejlett országokban. Annak ellenére, hogy a betegség gyógyításában legáltalánosabban alkalmazott sebészeti módszerek, sugárkezelések és kemoterápiás gyógymódok jelentősen fejlődtek az utóbbi időben, a rák leküzdése mind a mai napig nagy kihívást jelent a kutatók és az orvosok számára. A jelenleg alkalmazott kemoterápiás kezelések hátrányai közé sorolhatók az alkalmazott gyógyszerek szelektivitásának hiánya, a szervezetből történő gyors kiürülésük és a hatóanyagok ellen kialakuló multidrog rezisztencia.

A modern gyógyszerkutatásnak két fő irányát figyelhetjük meg a tumor kemoterápia hatékonyságának növelésére. Az egyik még hatékonyabb és szelektívebb hatóanyagok kifejlesztését tűzi ki célként, míg a másik a már ismert hatású gyógyszermolekulák tumorsejt specifikitásának növelésére tesz kísérletet megfelelő biokonjugátumok előállításával. A hatóanyagok tumorspecifikitás növelésének alapfeltétele, hogy minél jobban megismerjük azokat a szerkezeti és funkcionális eltéréseket, amelyek megkülönböztetik a rákos sejteket az egészségesektől. Ezek ismeretében tudunk olyan kombinációkat kialakítani, amelyek nagy szelektivitással képesek a gyógyszermolekulákat a tumorsejtekbe szállítani. Így hatásukat csak a beteg sejteken fejtik ki, és ez által a normálisan működő sejtek megkímélhetők, vagyis a gyógyszerek mellékhatásai lényegesen csökkenthetők. Kutatócsoportunk olyan oligopeptid- és polipeptid-hatóanyag konjugátumok tervezésével, szintézisével és vizsgálatával foglalkozik, amelyek a fenti cél eléréséhez vezethetnek.

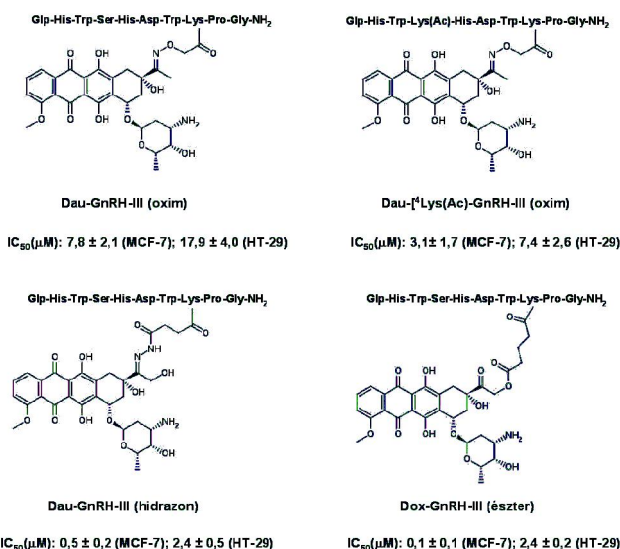
## 2. Hatóanyagok célba juttatása peptideket felismerő receptorokon keresztül

Az egyik jelentős különbség a tumoros és az egészséges sejtek, szövetek között, hogy a sejtek felszínén részben eltérő típusú receptorok/struktúrák találhatóak (tumorspecifikus receptorok/struktúrák), másrészt bizonyos receptorok jelentősen nagyobb számban jelenhetnek meg a tumorsejteken. Ez utóbbira példa több peptidhormon (gonadotropin-releasing hormon (GnRH), szomatostatatin, bombesin, stb) receptora, illetve az érzékelésben fontos szerepet játszó peptid receptorai (pl. VEGF-R, neuropilin-1, integrin receptorok, aminopeptidáz-N (CD13)). Amennyiben olyan peptidekhez kapcsolunk gyógyszermolekulát, amelyek nagy hatékonysággal felismerik ezeket a receptorokat, azokhoz nagy affinitással kötődnek, akkor elérhetjük, hogy a konjugátum receptor-közvetített endocitózissal a sejtbe juttassa a hatóanyagot,

\* Tel.: +36-1-372-2828 ; fax: +36-1-372-2620 ; e-mail: fhudecz@elte.hu

ahol a hatóanyag, vagy annak aktív metabolitja felszabadul és kifejezheti tumorelles hatását.<sup>1</sup>

Munkánk során olyan peptideket választottunk irányító molekuláknak, amelyek a receptorhoz kötődés után különböző szignál útvonalakon keresztül önmagukban is képesek a tumor növekedést gátolni. Így a hozzájuk kovalens kötéssel kapcsolt hatóanyaggal együtt felerősíthetik egymás hatását. Legrészletesebben a GnRH peptid analógokat vizsgáltuk, mint potenciális irányító molekulákat. Ezek közül is főleg a tengeri ingolából izolált GnRH-III (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, ahol a Glp piroglutaminsavat jelent) dekapeptidet tanulmányoztuk, mivel ennek az analógnak a hormonális mellékhatása emlősökben elhanyagolható, így szelektív tumorelles hatás érhető el az alkalmazásuk esetén (1. ábra).



**1. Ábra.** GnRH-III – antraciklin konjugátumok szerkezete és *in vitro* citosztatikus hatása MCF-7 humán emlő és HT-29 humán vastagbél tumorsejt vonalakon, ahol Dau = daunomicin, Dox = doxorubicin.

A szekvencia 8-as pozíciójában található lizin nem játszik fontos szerepet a receptorkötődésben és a biológiai aktivitásban. A lizin oldalláncának ε-aminocsoportja megfelelő konjugálási hely a hatóanyagok kapcsolására.<sup>2</sup> Hatóanyagként a klinikumban gyakran alkalmazott daunorubicint (daunomicin, Dau) vagy doxorubicint (adriamicin, Dox) alkalmaztuk, amelyeket különböző kovalens kémiai kötéssel (pl. oxim, hidrazon, észter) kapcsoltuk peptidekhez.<sup>3</sup> Vizsgáltuk, hogy a kötések milyensége hogyan befolyásolja a konjugátumok stabilitását humán szérumban, lizoszóma preparátumban és különböző enzimek jelenlétében, és hogy ez miként befolyásolja

a konjugátumok tumornövekedést gátló hatását humán emlő, vastagbél és prosztatata tumorsejtvonalakon. Az eredmények azt mutatták, hogy néhány vegyület mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között jelentősen gátolta a tumornövekedést. Azt figyeltük meg, hogy a konjugátumok perifériás toxicitása lényegesen kisebb volt a kísérleti állatokon, mint a szabad hatóanyagé a hatásos dózisban. Tovább lehetett fokozni a hatást, ha a GnRH-III oligopeptidben a 4-es helyzetben található szerint lizinre, vagy az oldalláncában acetilezett lizinre cseréltük.<sup>4</sup> A második lizin beépítése a szekvenciába módot adott arra is, hogy az oldalláncán keresztül egy második hatóanyag molekulát (Dau, vagy metotrexát) is kapcsoljunk a GnRH származékhoz.<sup>5</sup> Ez a megoldás fontos lehet, mivel a sejteken megjelenő receptorok száma korlátozott, így ha egy peptid segítségével több hatóanyagot tudunk a tumorsejtekbe juttatni, akkor a hatás növelhető. A hatás fokozott lehet akkor is, ha kétféle, különböző mechanizmus szerint működő hatóanyagot alkalmazunk. A két hatóanyagot tartalmazó vegyületek esetében saját vizsgálataink is a hatás szignifikáns javulását mutatták egyes tumorsejteken.

Kutatásaink azonban nem korlátozódnak a GnRH analóg – hatóanyag biokonjugátumok szintézisére és vizsgálatára. Irányító molekulaként alkalmaztunk más, tumorelles hatású hormon peptidokat (pl. szomatosztatin analógokat), integrin- és tirozinkináz receptorokat felismerő peptidszekvenciákat, valamint tuftsin és oligotuftsin származékokat, amelyek az irányításon kívül immunstimuláló hatással is rendelkeznek, így kompenzálhatják a gyógyszer-molekulák immunszuppresszív hatását<sup>6</sup>. Új, Erb2 receptor ligandum oligopeptidet és antraciklint (Dau) tartalmazó konjugátum hatásának összehasonlító tanulmányozása során megfigyeltük, hogy a receptort jelentős mértékben tartalmazó HL-60 humán leukémia sejtek protein expressziós profilja eltérő lehet. A proteomikai kísérletek világosan kimutatták, hogy a konjugátummal vagy szabad Dau-nel kezelt sejtek különböző fehérjéket más-más mennyiségben szintetizálnak. A kezelt sejtek fehérje mintázata nemcsak a kezeletlen sejtektől, de egymástól is jelentős mértékben különbözik. Ez a megfigyelés lehetőséget ad új fehérje célpontok, valamint új bioszintetikus utak, mechanizmusok feldezésére.<sup>7</sup>

### 3. Hatóanyagok célba juttatása elágazó láncú polimer polipeptidekkel

A tumorsejtek egy másik, az egészséges sejtektől eltérő tulajdonsága, hogy fokozottan képesek endocitózissal felvenni makromolekulákat, még akkor is, ha azok nem tartalmaznak felismerő egységet. Kutatócsoportunkban régóta foglalkozunk polilizin gerincű elágazó láncú polimer polipeptidek szintézisével, kémiai és biológiai jellemzésével, és különböző területeken – makromolekuláris hordozóként – történő felhasználásával. Ezek a vegyületek egy átlagosan 100-150 lizin egységből álló polimer gerincet tartalmaznak, amelyek a lizin egységek  $\epsilon$ -aminocsoportján egy rövid, 3-4 aminosavat tartalmazó oligo-DL-alanin láncot és egy optikailag aktív aminosavat foglal magában (poli[Lys(X-DL-Ala<sub>m</sub>)], ahol  $m = 3-4$ ). Az általunk előállított polimerek többsége polikationos karakterű, mivel az elágazások végén szabad aminosocsoport található.

Azonban, ha az X aminosav glutaminsav, akkor amfoter polimerhez juthatunk, ha pedig ennek a glutaminsavnak az aminosocsoportját acetilezzük vagy szukcinilezzük, akkor polianionos vegyületeket kapunk. Az elágazások végén található X aminosav jelentősen befolyásolja a polimer biológiai viselkedését, például a szerkezetbeni eloszlását és kiürülésének sebességét. Megállapításaink szerint az amfoter és polianionos polimerek (poli[Lys(Y-Glu-DL-Ala<sub>m</sub>)], ahol  $Y = H$  (EAK) vagy  $Ac$  (Ac-EAK)) ürülnek ki leglassabban a vérből. A polikationos polimerek közül a szerint tartalmazó polihidroxiol-típusú polimer (poli[Lys(Ser-DL-Ala<sub>m</sub>)], SAK) tartózkodik legtovább a véráramban. A hosszabb jelenlét a vérkeringésben, a szerkezetben közrejátszik abban is, hogy ezek a polimerek – szerkezetüktől függő mértékben – képesek leginkább feldúsulni a szilárd („solid”) tumorokban. Ezért ezeket a polimereket alkalmaztuk – többek között – daunorubicinnel (Dau) készült konjugátumok előállítására. A hatóanyag cisz-akonitsavval képzett származékát (cAD) kapcsoltuk az amfoter (EAK) illetve polikationos (SAK) polimer hordozóhoz. Ez a kapcsoló egység a sejtbe kerülve a lizoszóma savas körülményei között úgy bomlik el, hogy szabad hatóanyag (Dau) szabadul fel. Megállapítottuk, hogy a polikationos konjugátummal szemben (cAD-SAK), az amfoter polipeptidet tartalmazó konjugátum (cAD-EAK) leukémiás egerek teljes gyógyulását eredményezte.<sup>8</sup>

Az elágazó láncú polimer polipeptidek sejtbe jutásának mechanizmusát tanulmányozva az is világossá vált, hogy az oldallánconként két negatív töltést hordozó polianionos szukcinilezett EAK (Succ-EAK) polimer azért ürül ki gyorsabban a véráramból, mint az amfoter EAK vagy az oldallánconként csupán egy negatív töltést hordozó, ezért „kevésbé” polianionos Ac-EAK polimer, mert a makrofágok különösen nagymértékben veszik fel. Elsőként írtuk le az irodalomban, hogy e polimer polipeptidek felvétele a „scavenger A” receptoron keresztül történik, és a sejtbejutás mértéke függ a sejt típusától is.<sup>9</sup> Ez a megfigyelés hozzájárult ahhoz, hogy hatóanyagokat nagy selektivitással juttassunk makrofágokba, amelynek nemcsak a tumor terápiában lehet jelentősége, hanem más a makrofágokban túlélő kórokozók (pl. *Leishmania donovani*, *M. tuberculosis*) elpusztításában is.<sup>10</sup>

Nagy érdeklődésre tarthat számot az a polimer vegyület is, amelyben a polilizin gerinc  $\epsilon$ -aminocsoportjaihoz közvetlenül kapcsolódik leucin, majd ehhez kötődik az oligo-DL-Ala lánc (poli[Lys(DL-Ala<sub>m</sub>-Leu)] (ALK). Megfigyeltük, hogy ez a polimer polipeptid a lépben akkumulálódik, tehát alkalmas olyan biokonjugátumok előállítására, amelyek a lépben előforduló tumorok vagy a lépben megtelepedő kórokozók<sup>10</sup> kemoterápiával történő kezelését teszik lehetővé.

### 4. Hatóanyag célba juttatása sejtpenetráló peptidekkel

Az utóbbi időben előtérbe kerültek a sejtpenetráló oligopeptidek új gyógyszer-molekula konjugátumok előállítására, hatóanyagok szállítására. A természetes eredetű (pl. HIV Tat-fehérjéje, penetratin) és a *de novo* szintetikus (pl. oligoarginin) sejtpenetráló peptidok még nem teljesen tisztázott módon (pl. makropinocitózis) könnyen jutnak át a sejtmembránon, esetenként a hozzájuk kovalens kötéssel kapcsolt molekulával együtt. Segítségükkel ezáltal növelhető

a diffúzióra sem képes vegyületek célsejtbe juttatása. Így új, eddig a terápiában nem alkalmazott vegyületek is bevonhatók a tumorok terápiájába.

Kutatásaink során különböző hosszúságú oligoarginin – tumorelles szer (pl. Dau, vinblasztin, pemetrexed, ferrocén származék) konjugátumokat állítottunk elő. Vizsgáltuk a szerkezet – hatás összefüggéseket, különös tekintettel az oligoarginin lánc hosszára és a hatóanyag és a hordozó közötti kémiai kötés típusára. A különböző kovalens kötést (oxim, hidrazon, szukcinil vagy négyszögsavdiamid) tartalmazó daunomicin-konjugátumcsalád segítségével megállapítottuk, hogy e vegyületek stabilitása, *in vitro* citotoxicitása illetve a sejtfelvétel kinetikája a kötés savérzékenységtől, az oligoarginin lánc hosszától és jelentős mértékben a sejt típusától függ.<sup>11</sup>

Megfigyeltük, hogy az új vinblasztin származék (16-os pozícióban Trp) oligoarginin peptiddel történő kapcsolása során két izomer konjugátum keletkezik. Az NMR spektroszkópiai módszerekkel azonosított izomerek között lényeges különbség volt a tubulin polimerizációra, valamint a mitotikus orsóra gyakorolt *in vitro* és *in vivo* hatásban. Az L-Trp tartalmú konjugátum kiemelkedő szelektivitást mutatott.<sup>12</sup>

Előállítottunk olyan új antimetabolit típusú tumorelles szer (pemetrexed) peptid konjugátumokat is, amelyekben egyidejűleg van jelen – tandem topográfia szerint – sejtpenetráló sajátságú oktaarginin és bizonyos metasztázisok kialakulásban szerepet játszó E/P-selectin specifikus oligopeptid. Megállapítottuk, hogy a „hibrid” peptidhordozót tartalmazó konjugátum *in vitro* körülmények között jelentős citotoxikus hatást mutat NCI-H358 humán tüdőcarcinóma sejteken. Ez a stratégia illetve kombináció lehetőséget adhat a sejtpenetráló peptidek tumorsejt specifikitásának növelésére is.<sup>13</sup>

## Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat az OTKA (T 49814; T 68258; NK 77485; K 81596), az ETT (202/2006; 459/2006; 03-044/2009), a T&T (ES-20/2008), és a GVOP-3.2.1-2004-04 0005/3.0; GVOP-3.2.1-2004-04-0352/3.0. támogatta.

## Hivatkozások

1. Mező, G.; Manea, M. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7*, 79-96.
2. Orbán, E.; Mező, G.; Schlage, P.; Csík, G.; Kulić, Z.; Ansorge, P.; Fellingner, E.; Möller, H.M.; Manea, M. *Amino Acids* **2011**, *41*, 469-483.
3. Schlage, P.; Mező, G.; Orbán, E.; Bősze, S.; Manea, M. *J. Control. Release* **2011**, *156*, 170-178.
4. Manea, M.; Leurs, U.; Orbán, E.; Baranyai, Zs.; Ohlschlager, P.; Marquardt, A.; Schulcz, Á.; Tejada, M.; Kapuvári, B.; Tóvári, J.; Mező, G. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1320-1329.
5. Leurs, U.; Lajkó, E.; Mező, G.; Orbán, E.; Ohlschlager, P.; Marquardt, A.; Kóhidai, L.; Manea, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 173-183.
6. Bai, K.B.; Láng, O.; Orbán, E.; Szabó, R.; Kóhidai, L.; Hudecz, F.; Mező, G. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2260-2269.
7. Orbán, E.; Manea, M.; Marquardt, A.; Bánóczy, Z.; Csík, G.; Fellingner, E.; Bősze, Sz.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2154-2165.
8. Hudecz, F.; Reményi, J.; Szabó, R.; Kóczán, G.; Mező, G.; Kovács, P.; Gaál, D. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 288-298.
9. Szabó, R.; Bánóczy, Z.; Mező, G.; Láng, O.; Kóhidai, L.; Hudecz, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 2209-2216.
10. Kóczán, Gy.; Ghose, A.C.; Mookerjee, A.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 518-524.
11. Miklán, Z.; Orbán, E.; Csík, G.; Schlosser, G.; Magyar, A.; Hudecz, F. *Biopolymers* **2009**, *92*, 489-501.
12. Bánóczy, Z.; Gorka-Kereskényi, Á.; Reményi, J.; Orbán, E.; Hazai, L.; Tikési, N.; Oláh, J.; Ovádi, J.; Béni, Z.; Háda, V.; Szántay Jr., Cs.; Hudecz, F.; Kalas, Gy.; Szántay, Cs. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1948-1955.
13. Miklán, Zs.; Orbán, E.; Bánóczy, Z.; Hudecz, F. *J. Peptide Sci.* **2011**, *17*, 805-811.