Tumorellenes hatóanyagtartalmú peptidhormon származékok szintézise és vizsgálata

„Táplálékod legyen a gyógyszered, és gyógyszered a táplálékod”
Hippokratész

Doktori értekezés tézisei

Készítette: Hegedüs Rózsa
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Témavezető: Dr. Mező Gábor
ELTE TTK Kémia Doktori Iskola
Vezető: Dr. Inzelt György egyetemi tanár
Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program
Programvezető: Dr. Perczel András egyetemi tanár
Budapest, 2014

1. Bevezetés

A rák világszerte egyike a legfőbb halálozási okoknak. A statisztikák alapján a szív-, és érrendszeri betegségek után ez a második leggyakoribb halálok. A Központi Statisztikai Hivatal adatai alapján, Magyarországon a halálesetek egynegyedét a tumoros megbetegedések okozták 2011-ben, melyek között a leggyakoribbak a tüdő-, bőr-, prosztata-, vastagbél- és az emlőrák [1].

Mivel az egyik általánosan alkalmazott gyógymód a kemoterápia, számos mellékhatással rendelkezik, ezért a kutatások arra irányulnak, hogy az alkalmazott gyógyszermolekulák hatékonyságát, tumorszelektivitását növeljék, és az egészséges sejteket megkíméljék a káros mellékhatásoktól. Az irányított tumorterápia a kemoterápiának az a változata, ahol a hatóanyagot célbajuttató molekula (pl. peptid hormonok: gonadotropin-releasing hormon (GnRH), szomatosztatin, bombezin) segítségével célzottan a tumorsejtekbe juttatjuk be. A célbajuttató molekulához toxinok, radionuklidok vagy kemoterápiás hatóanyagok kapcsolódhatnak [2].A módszer alapja, hogy a tumorsejteken megjelenhetnek olyan sejtfelszíni struktúrák, például peptidhormon receptorok, amelyek az egészséges sejteken nem, vagy jóval kisebb mennyiségben fordulnak elő, ezért a peptid hormonok és hormon analógok közvetlenül a tumoros sejtekhez szállíthatják a hozzájuk kapcsolt citotoxikus hatóanyagot, megkímélve ezzel az egészséges sejteket a felesleges drog felvételtől.

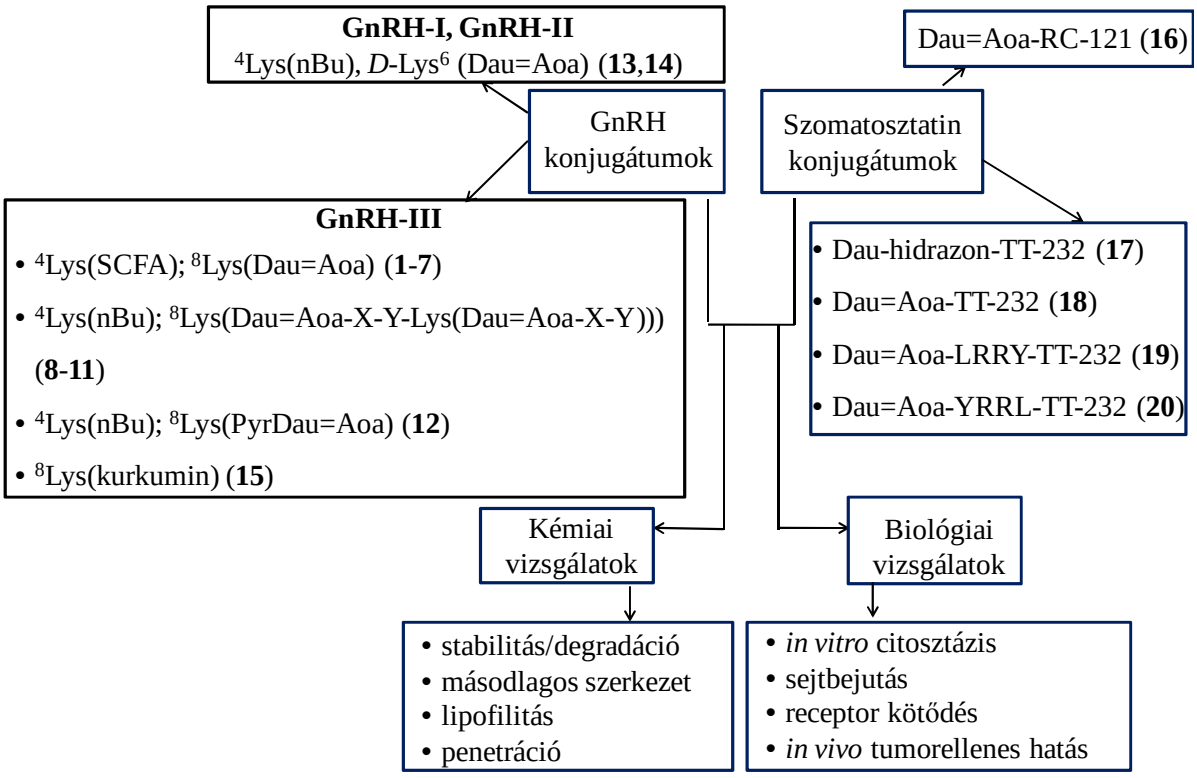
Doktori munkám során az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban folyó irányított tumorellenes konjugátumokkal kapcsolatos kutatásokba kapcsolódtam be. Feladatom különböző, GnRH és szomatosztatin származék tartalmú konjugátumok előállítása, kémiai- és biológiai vizsgálata volt.

2. Célok

Doktori munkám során célom volt irányított tumorterápiában alkalmazható új, hatásosabb, ugyanakkor kisebb mellékhatással rendelkező tumorellenes vegyületek előállítása. Irányító molekulaként - önmagukban is tumorellenes hatással rendelkező - GnRH (GnRH-I, GnRH-II, GnRH-III) és szomatosztatin (RC-121, TT-232) analógokat [3], hatóanyagként az antraciklinek családjába tartozó daunorubicint (Dau) [4], az abból előállított 2-pirrolino-daunorubicint (PyrDau) [5], valamint a fito-polifenol kurkumint terveztem alkalmazni [6]. Az irányító molekulákat rövid szénláncú zsírsavakkal (SCFA) módosítottam, melyek - különösen a vajsav - gátolják a tumorsejtek növekedését [7].

Munkám célja volt, hogy tanulmányozzam a különböző irányító molekulaként választott peptidhormon származékok, valamint a molekulákban végbevitt szerkezeti változtatások szerepét elsősorban a konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatására, továbbá a vegyületek térszerkezetére, sejtbejutási, penetrációs és receptorkötődési képességére, valamint oldhatósági tulajdonságára, és *in vivo* tumorellenes hatására. Egyes konjugátumok esetén azok lehetséges hatóanyagtartalmú metabolitjait is terveztem meghatározni.

A következő ábrán röviden összefoglalom a tervezett szintéziseket és vizsgálatokat.



1. *ábra:* Célkitűzések

3. Alkalmazott módszerek

Szilárdfázisú peptidszintézis: Az irányító molekulaként alkalmazott peptidhormon származékokat szilárdfázisú peptidszintézissel, Fmoc/^{t}Bu stratégiával állítottam elő részben manuálisan, részben automata peptidszintetizátor alkalmazásával. A peptideket és konjugátumokat analitikai RP-HPLC és ESI-MS módszerekkel jellemeztem.

***Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD)*:** A különböző lánchosszúságú zsírsavak GnRH-III-daunorubicin konjugátumok (**1**-**7**) másodlagos szerkezetére gyakorolt esetleges hatásait CD spektroszkópia módszerével vizsgáltam.

Langmuir mérleges mérések: A zsírsavakkal módosított biokonjugátumok penetrációját lipid Langmuir monoréteg membrán modell segítségével határoztuk meg.

Oldhatóság vizsgálatok: A **8-11** konjugátumok oldhatóságát egy tömegmérésen alapuló, illetve egy folyadékkromatográfiás módszerrel vizsgáltam. A mérések célja az etilén-glikol származékok oldhatóságot befolyásoló szerepének meghatározása volt.

Enzim lebomlási vizsgálatok: Az **1-7** konjugátumok enzimatikus stabilitását kimotripszin jelenlétében, illetve az **1-11** vegyületek lehetséges metabolitjait patkány máj lizoszóma preparátumban határoztam meg LC-MS módszer segítségével.

***MTT-teszt*:** a biokonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását sejtek életképességének megállapítására alkalmazható MTT-teszttel határoztam meg.

Áramlási citometria (FACS): Az **1-7** konjugátumok sejtbejutását áramlási citometria módszerével vizsgáltam.

Rádioligand kötődési vizsgálatok: A GnRH-III(^{4}Lys(nBu)),^{8}Lys(Dau=Aoa)) (**3**) GnRH receptor kötődését kompetitív ligand kötési assay-vel határoztuk meg.

In vivo tumorellenes hatás vizsgálat: A GnRH-III(^{4}Lys(nBu)),^{8}Lys(Dau=Aoa)) (**3**) konjugátum tumorellenes hatását NSG nőstény egerekben vizsgáltuk ortotopikusan beültetett vastagbéltumor modellen.

4. <u>Eredmények és következtetések:</u>

4.1. Négyes helyzetben zsírsav láncokkal módosított daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok ((GnRH-III(^{4}Lys(X), ^{8}Lys(Dau=Aoa)) (1-7))

Megnövekedett enzim stabilitású, sejtbejutási képességű, tumorellenes hatású, a 4-es helyzetben szerin helyett rövid szénláncú zsírsavakkal acilezett lizint tartalmazó GnRH-III analógokat állítottam elő. A biokonjugátumok lebomlása kimotripszin hatására nagymértékben függött a zsírsavlánc típusától. A lizoszómális emésztményekből szabad daunorubicint nem azonosítottam, a legkisebb hatóanyagtartalmú metabolit minden vegyület esetében a H-Lys(Dau=Aoa)-OH volt, amely bizonyítottan képes kötődni a DNS-hez. A zsírsavláncok lehasadását is azonosítottam.

A konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását és sejtbejutási képességét HT-29 és MCF-7 sejteken teszteltem. A zsírsavláncok típusa jelentősen befolyásolta a konjugátumok sejtfelvételét. A különbségekre szerkezetvizsgálati módszerekkel nem sikerült magyarázatot kapnom. Az *in vitro* tesztek alapján legígéretesebbnek mutatkozó GnRH-III(^{4}Lys(nBu), ^{8}Lys(Dau=Aoa)) (**3**) konjugátum *in vivo* antitumor hatását ortotopikus HT-29 xenografton vizsgáltuk meg. A vegyület szignifikánsan gátolta a HT-29 primer daganatok növekedését.

4.2. Négyes helyzetben vajsavval módosított két daunorubicint tartalmazó GnRH-III biokonjugátumok (8-11)

A tumorellenes hatás fokozása érdekében két molekula daunorubicint, valamint vajsavat tartalmazó GnRH-III származékokat állítottam elő (GnRH-III(^{4}Lys(nBu), ^{8}Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))), ahol X= Ø vagy GFLG, Y= Ø vagy O_2Oc). A HT-29 illetve MCF-7 sejteken elvégzett *in vitro* citosztázis vizsgálatokban a vegyületek alapjául szolgáló GnRH-III(^{4}Lys(nBu), ^{8}Lys(Dau=Aoa)) (**3**) vegyület hatását nem haladta meg egyik konjugátum sem. Azonban az etilén-glikol egységgel módosított vegyületek esetén javulást tapasztaltam az azt nem tartalmazókhoz képest. Ezt a különbséget alátámasztották az oldhatósági kísérletek eredményei is. Az emésztési vizsgálatok során a legkisebb azonosított daunorubicin tartalmú metabolit nagyban függött az egyes vegyület szerkezetétől. Az etilén-glikol származékot, vagy a GFLG távtartó egységet tartalmazó konjugátumok nagyobb mértékben degradálódtak.

4.3. Négyes helyzetben vajsavval módosított 2-pirrolino-daunorubicin-GnRH-III biokonjugátum (12)

Négyes pozícióban vajsavval acilezett lizint tartalamazó GnRH-III analógba oxim-kötésen keresztül 2-pirrolino-daunorubicint építettem be és megvizsgáltam *in vitro* citosztatikus hatását. A konjugátum mind HT-29, mind MCF-7 sejteken egy nagyságrenddel hatásosabb volt, mint a daunorubicint tartalmazó GnRH-III(^{4}Lys(nBu), ^{8}Lys(Dau=Aoa)) (**3**) származék.

4.4. Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin-GnRH-II biokonjugátumok (13-14)

A 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint és a 6-os helyzetben oxim-kötéssel daunorubicint tartalmazó [*D*-Lys^6]GnRH-I és [*D*-Lys^6]GnRH-II konjugátumokat állítottam elő, hogy megvizsgálhassam e vegyületek esetén is növeli-e a konjugátumok aktivitását a ^{4}Ser – ^{4}Lys(nBu) csere, mint ahogyan azt a GnRH-III analógnál tapasztaltam.

A GnRH-I(^{4}Lys(nBu), *D*-^{6}Lys(Dau=Aoa)) (**13**) esetén a vajsav beépítése minimális javulást eredményezett a citosztatikus hatásban, míg a GnRH-II esetében ez a módosítás a citosztatikus hatás szignifikáns növekedésével járt. Azonban a 4-es helyzetben vajsavval acilezett GnRH-III-daunorubicin konjugátum hatása mindkettőnél jobb volt.

4.5. Irányított tumorterápiában alkalmazható kurkumin tartalmú vegyület előállítása (15)

Klikk-reakcióval 8-as helyzetben kurkumin tartalmú GnRH-III konjugátumot állítottam elő. A reakció alacsony hozama miatt és a kurkumin biohasznosíthatóságát növelendő a jövőben olyan liposzómákba tervezem a hatóanyagot bezárni, amelyek GnRH-III irányító molekulákat tartalmaznak.

4.6. Daunorubicin tartalmú szomatosztatin analóg biokonjugátumok (16-20)

Önmagukban is jelentős tumorellenes hatással rendelkező szomatosztatin származékokat, mint irányító molekulákat (RC-121, TT-232) tartalmazó daunorubicin konjugátumokat állítottam elő. Az RC-121 esetén a daunorubicin oxim-kötéssel kapcsolódik a peptid N-terminálisához. A peptid az N-terminális módosítása ellenére megőrizte tumorellenes hatását a konjugátumban, bár az egy nagyságrenddel rosszabb volt, mint a szabad hatóanyagé.

A TT-232 konjugátumokban a hatóanyag hidrazon- illetve oxim-kötés kialakításával közvetlenül, vagy katepszin B enzimre érzékeny távtartó szekvencián (YRRL vagy LRRY) keresztül kapcsolódott: Dau=hidrazon-TT-232 (**17**) Dau=Aoa-TT-232 (**18**) Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (**19**) Dau=Aoa-YRRL-TT-232 (**20**). A konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 sejteken vizsgáltam. A vegyületekben a TT-232 megőrizte tumorellenes hatását N-terminálisának módosítása ellenére. Mind a négy konjugátum hatásosabb volt, mint az irányító molekula önmagában. A legnagyobb mértékben a Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (**19**) gátolta a tumorsejtek osztódását, továbbá ez a vegyület közelítette meg leginkább a daunorubicin hatását is.

4.7. Különböző célbajuttatóegységet tartalmazó konjugátumok alkalmazása kombinációs kezelésekben

A kombinált terápia során a kezelés különböző irányító molekulákat tartalmazó konjugátumok adagolásával történik. Így különböző célpontokon támadva egymást felerősítve fejthetik ki tumorellenes hatásukat. A kombinált kezelések során GnRH-III (GnRH-III(^{4}Lys(nBu), ^{8}Lys(Dau=Aoa)) (**3**), illetve szomatosztatin analógot tartalmazó konjugátumot (Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (**19**)) alkalmaztam együttesen.

A kombinált kezeléseket többféle konstrukcióban hajtottam végre. Általánosságban elmondhatom, hogy a TT-232 konjugátum sejtszaporodást gátló hatását egyik konstrukcióval sem sikerült felülmúlni, bár minden esetben jobb hatást értem el, mint a GnRH-III vegyület

önmagában mutatott antiproliferatív hatása.

5. Összegzés

Összességében elmondható, hogy új szintézis utak kidolgozásával, új hatékony, a rákos megbetegedések gyógyításában alkalmazható vegyületeket állítottam elő, amelyek közül a legígéretesebbek a GnRH-III(^{4}Lys(nBu), ^{8}Lys(PyrDau=Aoa)) (**12**), illetve a Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (**19**).

Irodalomjegyzék

1. Nemzeti Rákregiszter: http://www.oncol.hu/rakreg/stat/2011_orszagos.pdf (2014.03.18.)

2. Klein S., Levitzki A., Targeted cancer therapy: promise and reality, *Adv. Cancer Res.*, **2007**, 97, 295-319.

3. Mező G., Manea M., *Expert Opin. Drug Deliv*., **2010,** 7, 79-96.

4. Szabó I., Manea M., Orbán E., Csámpai A., Bősze Sz., Szabó R., Tejeda M., Gaál D., Kapuvári B., Przybylski M., Hudecz F., Mező G., *Bioconjug. Chem.*, **2009**, 20, 656-665.

5. Nagy A., Schally A.V., Armatis P., Szepeshazi K., Halmos G., Kovacs M, Zarandi M., Groot K., Miyazaki M., Jungwirth A., Horváth J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996,** 93, 7269-7273.

6. Jurenka J.S., *Altern. Med. Rev*., **2009**, 14, 141-153.

7. Beyer-Sehlmeyer G., Glei M., Hartmann E., Hughes R., Persin C., Böhm V., Rowland I., Schubert R., Jahreis G., Pool-Zobel B.L., *Br. J. Nutr.*, **2003**, 90, 1057-1070.

A tézisek alapjául szolgáló közlemények listája

Hegedüs R., Manea M., Orbán E., Szabó I., Sipos É., Halmos G., Mező G., Enhanced cellular uptake and *in vitro* antitumor activity of short-chain fatty acid acylated daunorubicin-GnRH-III bioconjugates, *Eur. J. Med. Chem*., **2012**, 56, 155-165.

Mező G., Szabó I., Kertész I., **Hegedüs R.**, Orbán E., Leurs U., Bősze Sz., Halmos G., Manea M., Efficient synthesis of an (aminooxy) acetylated-somatostatin derivative using (aminooxy)acetic acid as a 'carbonyl capture' reagent, *J . Pept. Sci*., **2011**, 17, 39-46.

Hegedüs R., Pauschert A., Orbán E. , Szabó I., Andreu D., Marquardt A., Mező G., Manea M., Modification of Daunorubicin-GnRH-III bioconjugates with oligoethylene glycol

derivatives to improve their solubility and bioavailability for targeted cancer chemotherapy, *Bioconjug. Chem.*, (beküldve)

A dolgozat témájában megjelent további publikációk jegyzéke

Mező G., Orbán E., Szabó I., **Hegedüs R**., Bősze Sz., Tejeda M., Gaál D., Kapuvári B., Manea M., GnRH based drug delivery systems for targeted tumor therapy, *Collection Symposium Series 11*, **2009**, 72-76.

Hegedüs R., Manea M., Orbán E., Szabó I., Sipos E., Halmos G., Kapuvári B., Schulcz A., Továri J., Mező G., Short-chain fatty acid acylated daunorubicin-GnRH-III bioconjugates with enhanced cellular uptake, in vitro and in vivo antitumor activity, *J. Pept. Sci*., **2012**, 18, 155.

Mező G., **Hegedüs R**., Szabó I., Célzott rákgyógyítás, *Természet Világa*, **2012**, 143, 448-452.