

# Asn-Gly-Arg szekvenciát tartalmazó ciklopeptidek alkalmazása a célzott tumorterápiában

MEZŐ GÁBOR<sup>1,2\*</sup>, ANDREA ANGELO PIERLUIGI TRIPODI<sup>1</sup>, IVAN RANĐELOVIČ<sup>3,4</sup>, ENYEDI KATA NÓRA<sup>1</sup>, BIRI-KOVÁCS BEÁTA<sup>1</sup>, TÓVÁRI JÓZSEF<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, <sup>2</sup>Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Peptidkémiai Kutatócsoport, <sup>3</sup>Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály, <sup>4</sup>KINETO Lab. Kft., Budapest

Pályázati forrás: A kutatást a Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Hivatal a „Nemzeti versenyképességi és kiválósági program” keretében (NVKP\_16-1-2016-0036), valamint az EU Horizon 2020 Research and Innovation Program (MSCA-ITN Grant No. 642004) támogatta.

## Levelezési cím:

Dr. Mező Gábor, Eötvös Loránd Tudományegyetem,  
Kémiai Intézet, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A,  
e-mail: gabor.mezo@ttk.elte.hu; tel.: +3613722500

## Közlésre érkezett:

2021. április 14.

## Elfogadva:

2021. május 15.

Két NGR szekvenciát tartalmazó peptid-daunomicin konjugátum *in vivo* tumorelles hatását vizsgáltuk CD13+ Kaposi-szarkóma (KS) sc. tumort hordozó SCID egereken, illetve ortotopikusan beültetett CD13- HT-29 humán vastagbél-adenokarcinómát hordozó SCID egereken. Mindkét tumortípus integrinpozitív volt. Jelentős tumornövekedés-gátlás volt kimutatható a két konjugátum (Dau=Aoa-GFLGK(ciklo[KNGRE]-GG)-NH<sub>2</sub> (**1**) és Dau=Aoa-GFLGK(ciklo[NleNGRE]-GG)-NH<sub>2</sub> (**2**)) hatásában a két tumormodell esetében. A KS tumor esetén nagyobb mértékű gátlás volt megfigyelhető a stabil szerkezetű **1** konjugátum esetén, amely így az NGR szekvenciára jellemző CD13 receptor felismerésére vezethető vissza. Ellenben a **2** konjugátum, amely hajlamos az NGR-*izo*DGR átalakulásra, a CD13-negatív, de integrinpozitív HT-29 modell esetén mutatott szignifikánsan jobb gátló hatást, ami az *izo*DGR szekvenciára jellemző integrinfelismeréssel kapcsolható össze. A konjugátumok pozitív hatása volt megfigyelhető az elhanyagolható toxikus mellékhatásokban, a szabad hatóanyagénál kifejezettebb proliferációgátlásban és az érképződés gátlásában is. *Magy Onkol* 65:113-120, 2021

**Kulcsszavak:** célzott tumorterápia, NGR peptidek, daunomicin, CD13 receptor, integrinek, Kaposi-szarkóma, HT-29 vastagbél-adenokarcinóma

*The in vivo antitumor effect of two NGR sequence containing peptide-daunomycin conjugates was studied on CD13+ Kaposi's sarcoma s.c. tumor model on SCID mice, and on orthotopically developed CD13- HT-29 colon adenocarcinoma SCID mouse model. Both tumor types were positive for integrins. Significant tumor growth inhibition was observed on both tumor types by the treatment with the conjugates [Dau=Aoa-GFLGK(cyclo[KNGRE]-GG)-NH<sub>2</sub> (**1**) and Dau=Aoa-GFLGK(cyclo[NleNGRE]-GG)-NH<sub>2</sub> (**2**)]. KS conjugate **1** with rather stable construct was more potent in tumor growth inhibition that might be explained by the CD13 receptor recognition of NGR sequence. In contrast, conjugate **2** that has propensity to rearrange isoAsp derivative showed significantly higher inhibition on CD13- HT-29 tumor model that is related to the integrin binding of isoDGR sequence. Next to the low toxic side effect of the conjugates in comparison with the free daunomycin, the positive efficiency of the conjugates was detected by the lower proliferation index and lower neovascularization of the tumor tissue.*

*Mező G, Tripodi AAP, Randelovič I, Enyedi KN, Biri-Kovács B, Tóvári J. Application of Asn-Gly-Arg sequence based cyclic peptides for targeted tumor therapy. *Magy Onkol* 65:113-120, 2021*

**Keywords:** targeted tumor therapy, NGR peptides, daunomycin, CD13 receptor, integrins, Kaposi's sarcoma, HT-29 colon cancer

## BEVEZETÉS

A daganatok gyógyításában egyre nagyobb szerepet kapnak a célzott terápiára alkalmas vegyületek (1). Ezek közül a monoklonális ellenanyag (pl. Herceptin; trasztuzumab) terápia egyre szélesebb körben kerül alkalmazásra a klinikumban, de már az ellenanyag-gyógyszer konjugátumokból (ADCs; Kadcyła, Adcertis stb.) is több bekerült a terápiás palettába (2, 3). Ezek hatása azon alapul, hogy az ellenanyagok a tumorsejteken megjelenő specifikus vagy túltermelődött receptorokhoz kötődnek, így gátolják annak funkcióját (pl. növekedési faktorok kötődését), vagy az ADC-k esetében a hatóanyagot receptor-közvetített úton a tumorsejtbe juttatják, amely ott kifejtheti hatását. Így az egészséges sejtek/szövetek nem károsodnak és a mellékhatások csökkenése miatt a páciensek életminősége nem romlik a kezelés során. Azonban az ellenanyag-alapú készítmények előnyei mellett (pl. hosszú félélettudó a véráramban, nagy szelektivitás) több hátrányuk is van, így például az alacsony tumorszövet-penetráció és a magas előállítás költsége (4). Ezért egyre több kutatás irányul az egyszerűbb és olcsóbb peptidalapú konjugátumok felé, amelyek szintén nagy specifitással rendelkezhetnek, bár a szervezetből történő kiürülésük lényegesen gyorsabb. E kutatások legfontosabb eleme, hogy olyan irányítópeptideket találjanak, amelyek hatékonyan és szelektíven tudnak kötődni a tumorsejtek felszíni receptoraihoz, hogy a kapcsolt gyógyszermolekulát nagy mennyiségben tudják a sejtekbe juttatni (4, 5). Kutatásaink során számos irányítópeptid (pl. GnRH-analógok, fágkönyvtárból kiválasztott és optimalizált szerkezetű peptidek) segítségével értünk el kimagasló *in vivo* tumornövekedés-gátlást egerekben (6, 7). Legújabban Asn-Gly-Arg tripeptid szekvenciát tartalmazó vegyületekkel (úgynevezett NGR peptidek) is kísérletezünk (8). A vegyületcsalád felé akkor fordult a figyelem, amikor nem RGD (Arg-Gly-Asp) szekvenciát tartalmazó, integrineket felismerő peptideket kerestek irányítópeptideknek (9). Ennek oka, hogy az integrinek túlexpresszálódnak a tumorsejteken és a vérellátásukat segítő új erek falán, és fontos szerepük van tumorsejtek túlélésében és a metasztázisban. A fágbemutató technikával történt vizsgálatok során a leggyakrabban olyan peptideket azonosítottak, amelyek az NGR szekvenciát tartalmazzák (10). Később azonban kiderült, hogy nem az NGR szekvencia kötődik az integrinekhez, hanem a peptidrész átalakulása során keletkező *izo*Asp-Gly-Arg (*izo*DGR) egység (11). Ez az átalakulás az NGR peptidek többségénél könnyen bekövetkezik egy szukcinimidgyűrű záródása, majd annak hidrolízise folytán. Ezekben a vegyületekben az  $\alpha$ - helyett az Asp  $\beta$ -karboxilcsoportjához kapcsolódik a peptid további része (12). Végül azt is megállapították, hogy az NGR szekvenciát felismerő receptor egy membránkötött aminosavpeptidáz N fehérje (APN, CD13), amelynek izomer formája szintén nagy mennyiségben jelen van a tumorsejteken és különösen az újonnan keletkező erek falán (13). Így az NGR peptidek is alkalmas irányítómolekulák lehetnek a célzott tumorterápiában. Jelenleg klinikai III-as fázisban van egy olyan gyógyszerjelölt, amelyben TNF- $\alpha$  fehérjét fuzionáltattak egy CNGRC pentapeptid egységhez, amelyet

aztán a ciszteinek közötti diszulfidhíd kialakításával stabilizáltak (14). Ugyanakkor felmerül az a kérdés, hogy nem lehet-e kihasználni az NGR-*izo*DGR átalakulást arra, hogy akár egy vegyülettel két különböző célpontot is támadjunk (az integrint és a CD13 receptorokat), így fokozva a peptid-hatóanyag konjugátumok tumorelles hatását (8). Ennek érdekében azonban fel kell térképezni, hogy mely NGR peptidek hajlamosak erre az átalakulásra. Az elmúlt 5 évben számos ciklikus NGR peptidet állítottunk elő és vizsgáltuk azok stabilitását különböző körülmények között (15). Fontos megállapításokat tettünk arra vonatkozóan, hogy milyen szerkezeti feltételei vannak az NGR-*izo*DGR átalakulás sebességének. Végül különböző stabilitású NGR-analógokból daunomicint (Dau) tartalmazó konjugátumokat készítettünk és vizsgáltuk ezek stabilitását is, valamint sejtbe jutásukat CD13+ (HT-1080 fibroszarkóma) és CD13- (HT-29 vastagbél-tumor) sejteken, továbbá az adott sejteken a konjugátumok citosztatikus és citotoxikus hatását is (8). Meg kell jegyezni, hogy mindkét sejtípus integrinre pozitív volt. Megállapítható volt, hogy a stabil szerkezetű NGR peptidek elsősorban a HT-1080 sejteken mutattak kiemelkedő aktivitást, míg a könnyebben átalakuló hatása jobban nőtt a HT-29 sejteken a HT-1080 sejtekhez képest, mint a stabil variánsok esetében. Azonban a leghatékonyabb NGR-konjugátumnak mindkét sejtípuson a legstabilabb szerkezetű vegyület (Dau=Aoa-GFLGK[ciklo[KNGRE]-GG]-NH<sub>2</sub> (1), ahol Dau=Aoa egy aminosav-acetil-linkeren keresztül oximkötéssel kapcsolt daunomicint jelent) bizonyult, aminek a hatékony sejtbejutás mellett az aktív metabolit (Dau=Aoa-Gly-COOH) könnyű felszabadulása is az oka (8). Így ezzel a konjugátummal terveztük folytatni a további kísérleteinket. Szintetikus szempontból a ciklusban jelen lévő lizin problémát jelent, mert szelektív védelemmel kell ellátni az  $\epsilon$ -aminocsoportját, amelyet a végén egy külön lépésben kell eltávolítani, ez pedig rontja a kitermelést, amely nem előnyös egy gyógyszerfejlesztésre kijelölt molekula esetén. Ráadásul korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a szabad aminocsoport ebben a pozícióban nem szükséges a biológiai aktivitáshoz (16). Ezért az *in vivo* vizsgálatok megkezdése előtt meg akartuk vizsgálni, hogy a lizin helyettesítése a ciklusban különböző aminosavakkal hogyan befolyásolja a konjugátum stabilitását és biológiai tumorelles hatását (17). Az eredmények azt mutatták, hogy ha a lizint egy nem természetes aminosavra, norleucinra cseréljük, amely csak abban tér el a lizintől, hogy a lineáris oldallánc  $^{\circ}$ C-atomjához nem kapcsolódik aminocsoport, jó megoldás lehet. Jelentősen lehetett az új vegyület kitermelését javítani (5-szörös javulás) és alacsony IC<sub>50</sub>-értékeket mutatott az *in vitro* citosztatikus/citotoxicitási vizsgálatokban. CD13+ HT-1080 sejteken hasonló értékeket mértünk, mint a lizin variáns esetén (Lys: 5,7 $\pm$ 0,5  $\mu$ M (6 óra kezelés + 66 óra inkubálás) és 1,4 $\pm$ 0,7  $\mu$ M (72 óra kezelés); Nle: 5,5 $\pm$ 0,3  $\mu$ M, illetve 2,3 $\pm$ 0,6  $\mu$ M), míg CD13- HT-29 sejteken a Nle-tartalmú konjugátum bizonyult hatékonyabbnak (Lys: 8,7 $\pm$ 1,2  $\mu$ M, illetve 3,0 $\pm$ 0,6  $\mu$ M; Nle: 2,2 $\pm$ 0,2  $\mu$ M, illetve 1,3 $\pm$ 0,2  $\mu$ M). Ezeket az értékeket alá lehetett támasztani azzal a megfigyeléssel,

hogy az új, norleucint tartalmazó konjugátum stabilitása kisebb volt a lizint tartalmazóhoz képest és jelentős mennyiségben átalakult időben *izo*Asp-származékká. Vagyis a Dau=Aoa-GFLGK(*ciklo*[NleNGRE]-GG)-NH<sub>2</sub> (**2**) hatékonyabbnak mutatkozott a CD13<sup>-</sup> sejteken, amelyek integrineket tartalmaztak, míg CD13<sup>+</sup> sejteken, amelyek szintén tartalmaztak integrineket, a két konjugátum hatásbeli különbsége nem volt szignifikáns (17). Ezért az *in vivo* vizsgálatokat, amely a cikkek is a témája, ezzel a két vegyülettel végeztük.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Az NGR-Dau konjugátumok stabilitása egérplazmában

A konjugátumokat kétszer desztillált vízben oldottuk, majd annyi egérplazmát adtunk az oldathoz, hogy a konjugátum végkoncentrációja 10 µM legyen. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk, majd mintát vettünk 0,5, 1, 2, 4 és 8 óra elteltével. A reakciót 10 µl tömény ecetsav hozzáadásával állítottuk le. A nagy molekulatömegű plazmafehérjéket 10 kDa-os szűrő segítségével választottuk el a kis molekulatömegű komponensektől ultracentrifugával. Az utóbbiakat LC-MS segítségével analizáltuk, és az adatokat összehasonlítottuk a plazmamentes körülmények között inkubált kontrollmintákkal.

### CD13 sejtfelszíni expressziójának meghatározása

A KS (Kaposi-szarkómából származó) és HT-29 (humán kolo-rektális adenokarcinóma, származás: ATCC) sejteket RPMI 1640 médiumban (Roswell Park Memorial Institute Medium, Lonza, Basel, Svájc) tenyésztettük, glutamin hozzáadásával. A médium 10% hőinaktivált szérumot tartalmazott (FBS: fetal bovine serum, Euroclone, Milánó, Olaszország) és 1% penicillin/sztreptomycin keveréket (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország). A sejt kultúrákkal történő kísérletek lamináris fülke alatt, steril körülmények között zajlottak, a sejteket 5% CO<sub>2</sub> mellett, 37 °C-on tenyésztettük.

A CD13-expresszió meghatározásához KS és HT-29 sejteket ültettünk fedőlemezt tartalmazó (Assistant, Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim/Rhön, Németország) 24 lyukú sejtenyészítő lemezekre (10<sup>5</sup> sejt/lyuk, Sarstedt, Nümbrecht, Németország) egy nappal az immunfestés előtt. A sejtmagot Hoechst 33342 festékkel (0,2 µg/ml, 10 perc, 37 °C, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tettük láthatóvá. A sejtek mosása után 4% paraformaldehiddel fixáltuk azokat 20 percig 37 °C-on, majd PBS-ben oldott 3%-os BSA-oldattal blokkoltuk szobahőmérsékleten egy órán át. Anti-CD13 ellenanyagot (FITC-konjugált, klón: WM-15, 1:100, 1% BSA/PBS oldatban hígítva, eBioscience, San Diego, CA, USA) adtunk a lyukakhoz és egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Ezután a sejteket háromszor mostuk PBS-oldattal, és Mowiol 4-88 oldattal (Sigma-Aldrich) rögzítettük őket a tárgylemezekre. A detektálást ZEISS LSM-710 konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Németország) 40×/1.4 Plan-Apochromat olajimmersion objektívvel végeztük. A képeket a ZEN program (Carl Zeiss Microscopy GmbH) segítségével dolgoztuk fel.

### A kísérleti állatok

Az egerek gondozása, tartása és használata minden esetben a „Helsinki Nyilatkozat Guiding Principles for the Care and Use of Animals” vezérelve szerint és a helyi etikai bizottság jóváhagyásával történt. Állatkísérleti engedélyk száma: PEI/001/1738-3/2015 és PEI/001/2574-6/2015. Speciális patogénmentes, steril körülmények között (Makrolon® ketrec, 22–24 °C, 40–50% páratartalom, 12/12 óra megvilágítás/sötét) tartott egészséges BALB/c felnőtt hím egereket használtunk az akut és krónikus toxicitási vizsgálatokhoz. A tumornövekedés vizsgálatához immundeficiens C.B.-17 háttérű SCID egereket használtunk, amelyek speciális patogénmentes izolált tartó szobában voltak elhelyezve, és csak a tumorbeültetés idejére voltak onnan eltávolítva. A tumorok beültetése lamináris fülkében történt, az előírásoknak megfelelően.

### Az NGR-Dau konjugátumok akut és krónikus toxicitásának vizsgálata

Az akut toxicitás meghatározása esetén egészséges felnőtt hím BALB/c egereket (26–32 g) kezeltünk egyszer *ip.* injektálással 4 különböző dózisban 3,125, 6,25, 12,5 és 25 mg daunomicint tartalmazó konjugátummennyiséggel/ttkg. Minden koncentráció esetén 3-3 egér volt egy csoportban. A kísérletet 14 napig folytattuk és az egerek tömegét minden nap ellenőriztük. A krónikus toxicitási kísérletekhez szintén a hím BALB/c egyedeket használtuk (25–31 g). A konjugátumokat 10 mg Dau-tartalom/ttkg mennyiségben alkalmaztuk egy-egy kezelés alkalmával. Összesen 5 kezelést hajtottunk végre az 1., 3., 7., 9. és a 11. napokon. Szintén 3-3 egér alkototta a csoportokat. A kísérletet ebben az esetben is 14 napig folytattuk. A toxicitást minden esetben a testtömeg meghatározása mellett az egerek életminősége, kinézete és viselkedése alapján határoztuk meg. A változásokat a kezeletlen kontrollcsoportokhoz viszonyítottuk.

### Tumornövekedés-gátlás vizsgálata Kaposi-szarkóma tumormodellben

Kaposi-szarkóma (KS) sejteket (200 µl M199 médiumban felvett 3×10<sup>6</sup> sejt/állat) szubkután injektáltunk nőstény SCID egerekbe (19–24 g). Az *ip.* kezeléseket a sejtek beültetése utáni 35. napon kezdtük el, amikor a tumorok átlagos mérete elérte a 66 mm<sup>3</sup>-t. Mind a 4 csoportban 5-5 állattal végeztük a kísérleteket. A kontrollcsoportot csak steril vízzel (Pharmagist Kft., Budapest, Magyarország) kezeltük, mivel a szabad Dau és a konjugátumok jobban oldódtak a tiszta vízben, mint fiziológiás sóoldatban. A szabad hatóanyagot 1 mg Dau-tartalom/ttkg dózisban adagoltuk az egereknek a sejtbeültetés utáni 35., 42., 49., 56., és 63. napokon. A konjugátumokat 10 mg Dau-tartalom/ttkg dózisban (amely 33,8 mg/ttkg **1** és 33,5 mg/ttkg **2** konjugátumnak felelt meg) alkalmaztuk. A kezeléseket ebben az esetben a 35., 37., 39., 42., 45., 49., 52., 56., 59., 63. és a 66. napokon végeztük. A kezeléseket során az állatok 0,2 ml térfogatban kapták a megfelelő dózisokat. A kísérlet során az egerek testtömegének változását és a kialakult

tumor méretének változását követtük. A tumor térfogatát azok hosszának és szélességének digitális tolmérővel történő megmérése után a  $V=ab^2 \times \pi/6$  (ahol „a” hosszabb, míg „b” a rövidebb átmérőnek megfelelő érték) formula szerint számoltuk ki. A kezeléseket a 70. napig követtük (a kezelések megkezdését követő 36. nap). Az egereket ezután termináltuk. Az elsődleges tumorokat és a májat eltávolítottuk és tömegüket megmértük.

### Tumornövekedés-gátlás vizsgálata ortotopikusan beültetett HT-29 humán vastagbél-tumor-modellben

HT-29 humán vastagbél-adenokarcinóma sejteket (200  $\mu$ l M199 médiumban felvett  $3 \times 10^6$  sejt/állat) injektáltunk sc. az egerekbe. Két hét elteltével a kifejlődött tumorokat tartalmazó egereket termináltuk és a tumorokat steril körülmények között kimetszettük, majd 2 mm<sup>3</sup>-es darabokra vágva, ezeket a darabokat ortotopikusan beültettük steril körülmények között, altatott (narkotikumeleg: tiletamin, zolazepam, xilazin, butorfanol) nőstény SCID egerekbe (19–25 g). Az operáció körülményeit egy korábbi cikkünkben leírtuk (19). Az ip. kezeléseket a tumorbeültetést követő 6. napon kezdtük. Az egyes csoportokban 8-8 állatot kezeltünk. A kontrollcsoport tagjait itt is csak 0,2 ml steril vízzel kezeltük. Hasonlóan a KS tumort hordozó egerekhez, a szabad hatóanyagot 1 mg/ttkg dózisban, míg a konjugátumokat 10 mg Dau-tartalomra számolt konjugátummal/ttkg kezeltük 0,2 ml desztillált vízben oldva. A szabad hatóanyaggal a tumorbeültetést követő 6., 13. és 20. napon kezeltünk, míg a konjugátumokkal a 6., 8., 10., 13., 17., 20. és a 24. napon. A kísérletet az első kezelést követő 22. napon fejeztük be, azonban a szabad daunomicinnel kezelt csoportot az állatok jelentős testtömegvesztése miatt a 19. napon kellett terminálni. Ezután az állatokból eltávolítottuk a tumorokat és a májat, és lemértük azok tömegét. Szintén vizsgáltuk a metasztázisok számát a különböző szerveken.

### A proliferációs index és a vaszkularizáció meghatározása a tumorszövetekben

A formalinban fixált tumorokat etanolsorral dehidráltuk, xilénoldattal infiltráltuk és paraffinba ágyaztuk 60 °C-on. 2  $\mu$ m vastagságú szeleteket Superfrost tárgylemezekre (Thermo Sandon, Runcorn, UK) rögzítettünk és manuálisan depa-  
raffinizáltuk őket. Az endogén peroxidázaktivitás gátlására 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó metanolt használtunk (20 perc, szobahőmérsékleten). A lemezeket 6%-os citrátoldatba áztattuk (pH=6) és 98 °C-os vízfürdőben inkubáltuk őket 40 percig. Ezután a lemezeket az elsődleges antitestet tartalmazó oldatba áztattuk (Ki-67, 1:40, Dako, Glostrup, Dánia; endotélmarker CD31, 1:20, Dianova, Hamburg, Németország) egy órára szobahőmérsékleten. A mosást követően a Ki-67-mintáknál biotinilált másodlagos antitestet alkalmaztunk (10 perc, szobahőmérséklet, Dako), a CD31-minták esetében pedig nyúl anti-patkány IgG-t használtunk (1 óra, szobahőmérséklet, Novus Biologicals, Centennial, CO, USA). A Ki-67-minták vizualizációja szuperérzékeny „one step polymer HRP” (Biogenex,

Fremont, CA, USA) segítségével történt, ahol a kromogén 3-amino-9-etilkarbazol (AEC), a CD31-minták esetében nyúl HRP-AEC (Vectorlabs, Burlingame, CA, USA) volt alkalmazva.

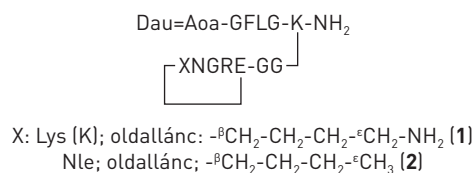
Az elsődleges ellenanyag nélküli festés szolgált negatív kontrollként. A Ki-67-pozitív sejteket fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk (400-szoros nagyításban) és az adott vizsgálati területen lévő számukat határoztuk meg. Három független tumorterületet vizsgáltunk és a kapott számadatokat átlagoltuk. A proliferációs indexet a Ki-67-pozitív sejtek és az összes sejt százalékos arányában adtuk meg. A CD31-pozitív ereket fénymikroszkóp segítségével határoztuk meg (200-szoros nagyítás mellett). Három független terület elemzését végeztük el tumoronként, és az érsűrűséget a mm<sup>2</sup>-enkénti erek számának a meghatározásából számoltuk.

### Statisztikai analízis

A statisztikai analíziseket GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) segítségével, nem parametrikus Mann-Whitney- (független minta) teszt alkalmazásával végeztük, szignifikánsnak tekintettük a különbséget, ha  $p < 0,05$  érték volt.

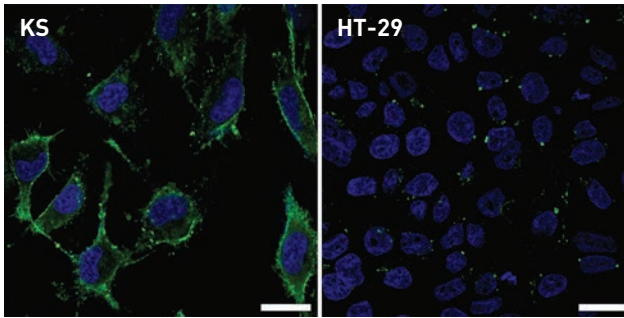
### EREDMÉNYEK

A két kiválasztott NGR-Dau konjugátum [Dau=Aoa-GFLGK [ciklo[KNGRE]-GG]-NH<sub>2</sub> (1) és Dau=Aoa-GFLGK [ciklo [NleNGRE]-GG]-NH<sub>2</sub> (2); 1. ábra] *in vivo* vizsgálatához egy



1. **ÁBRA.** Az alkalmazott konjugátumok sematikus szerkezete (az aminosavakat egybetűs kódjukkal jelöltük, a Dau=Aoa- részlet az aminosavacetyl linker keresztül kapcsolt daunomicint jelent, míg a ciklopeptidrészetben az N-terminális aminocsoportja kapcsolódik a glutaminsav oldalláncának karboxilcsoportjához)

olyan sejtvonalat kellett keresni, amely nagy mennyiségben expresszálja a CD13 fehérjét, mivel a HT-1080 tumor alkalmazása többek között a nagyon gyors növekedés miatt nem bizonyult megfelelően követhető modellnek. Ugyanakkor a Kaposi-sarkóma (KS) sejtvonal (CD13+) esetén igazoltuk, hogy jelentős mennyiségben tartalmazza a sejtek felszínén a kívánt célfehérjét (2. ábra) (18). A KS sejteket sc. ültettük nőstény SCID egerekbe és a tumortérfogat növekedését követtük. Ezzel szemben a HT-29 humán vastagbél-tumorokat (CD13-) ortotopikusan ültettük be az egerekbe, így ezekben az esetekben a tumortömegeket vizsgáltuk és hasonlítottuk össze az egerek terminálása után. A tumornövekedés gátlásának vizsgálata előtt elvégeztük a konjugátumok stabilitásának



**2. ÁBRA.** KS és HT-29 sejtek CD13-expressziójának vizsgálata immunfestést követően, konfokális mikroszkóppal (zöld: CD13 antitest, kék: sejtmagok, vonalas mérték: 20  $\mu\text{m}$ )

meghatározását egérplazmában és *in vivo* akut és krónikus toxicitási vizsgálatokat végeztünk az alkalmazható koncentráció beállítása érdekében. Megállapítottuk, hogy mindkét konjugátum legalább 8 óráig stabil a szérumban 37 °C-on.

### Akut és krónikus toxicitási vizsgálatok

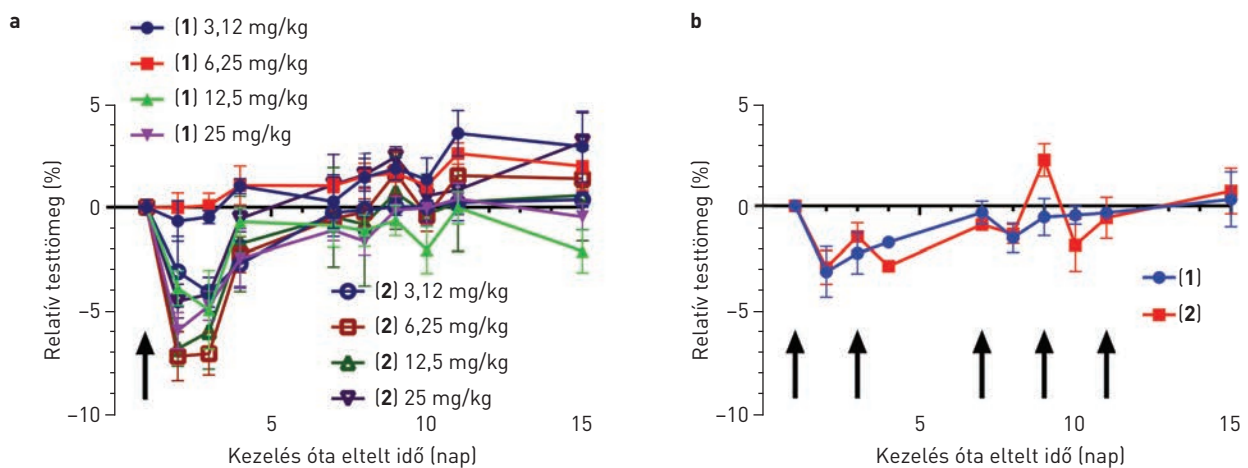
A toxicitási vizsgálatokat hím BALB/c egereken végeztük 14 napon keresztül. Az akut toxicitási kísérletekben a konjugátumokat négy különböző koncentrációban (3, 12,5, 25 és 12,5 mg/ttkg, ahol az értékek a konjugátum Dau-tartalmára vonatkoznak) vizsgáltuk. Egyszeri kezelést követően egyik koncentrációban sem tapasztaltuk az egerek testtömegének a szignifikáns változását a vizsgált időintervallumban (3.a ábra). Tehát a legmagasabb koncentrációban sem voltak a konjugátumok toxikusak. A krónikus toxicitási vizsgálathoz 10 mg/ttkg Dau-koncentrációban alkalmaztuk a konjugátumokat és 5 kezelést végeztünk az 1., 3., 7., 9. és 11. napokon. Szintén azt tapasztaltuk, hogy egyik konjugátum sem mutatott

toxikus mellékhatást, mivel az egerek testtömege ez esetben sem változott (3.b ábra). Ezek alapján úgy döntöttünk, hogy ezt a 10 mg/ttkg koncentrációt alkalmazzuk a tumornövekedés-gátlási vizsgálatokban.

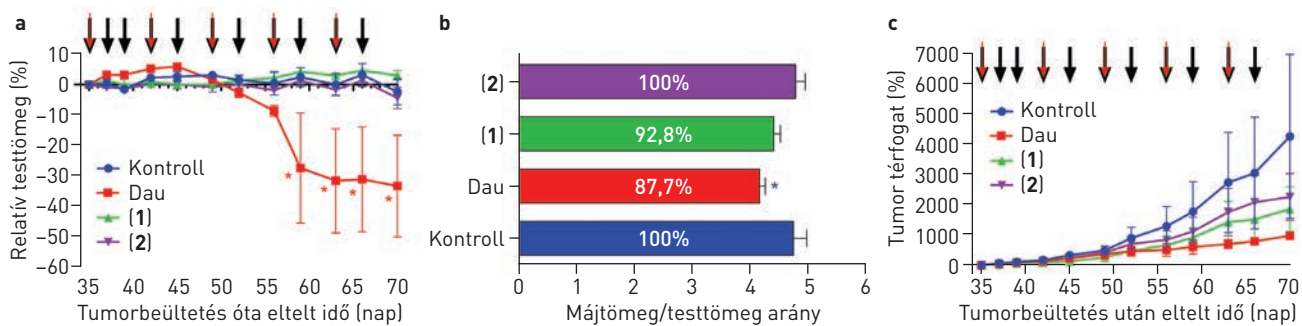
### Az NGR-Dau konjugátumok és a szabad Dau hatása Kaposi-szarkómát hordozó egereken

A tumoros egerek kezelését a beültetést követő 35. napon kezdtük, amikor a tumorok átlagos mérete elérte a 66  $\text{mm}^3$ -t. A konjugátumokat 11 alkalommal a 35. és 66. nap között (2–3 naponta) *ip.* adtuk az egereknek. A szabad daunomicint a korábban meghatározott maximálisan tolerálható dózisban (1 mg/ttkg) adtuk 5 alkalommal a 35., 42., 49., 56. és 63. napon. A kísérletet a 70. napon fejeztük be, a szabad daunomicinnel kezelt egerek állapotromlása miatt (4.a ábra). A konjugátumokkal kezelt egerek esetében nem tapasztaltunk testtömegcsökkenést a kezelés során, ami szintén igazolja, hogy a konjugátumok még ilyen dózisban sem okoznak toxikus mellékhatást. Szintén vizsgáltuk a toxicitásra jellemző májtömegváltozást a kísérlet során. A konjugátumok nem, vagy kisebb mértékben csökkentették az egerek májának tömegét a kontrollhoz képest, mint a szabad hatóanyag (Dau: 12,3% [szignifikáns], 1: 7,2% és 2: 0% csökkenés a kontrollhoz képest) (4.b ábra).

A tumortérfogat-vizsgálatok alapján megállapítható volt, hogy az idő előrehaladtával a kezelt és a nem kezelt állatok tumorméretének a különbsége nő. A kísérlet végén a szabad daunomicinnel és a 2 konjugátummal kezelt csoport esetében közel azonos, kb. 20%-os gátlás volt megfigyelhető (4.c ábra). Ezzel szemben a lizint tartalmazó konjugátum (1) szignifikáns, 45% körüli átlagos inhibíciót mutatott. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a stabil szerkezetű NGR-Dau konjugátum hatékonyabb a CD13+ sejteken, mint az, amelyik átalakul az integrineket felismerő *izo*Asp származékká.



**3. ÁBRA.** Kísérleti állatok relatív testtömege (átlag $\pm$ SE), 3 állat/csoport. a) Akut toxicitási vizsgálat, a jelölt koncentráció a konjugátum Dau-tartalmát jelzi. b) Krónikus toxicitási vizsgálat, 10 mg/ttkg Dau-tartalmú konjugátumokkal, a fekete nyilakkal jelzett időpontokban



**4. ÁBRA.** NGR-Dau konjugátumok (1 és 2, 10 mg/ttkg Dau-tartalom, 11 kezelés: fekete nyilak) és szabad Dau (1 mg/ttkg, 5 kezelés: piros nyilak) hatása KS-beültetett egerekre. a) Az állatok relatív testtömege (átlag±SE), b) májtömeg/testtömeg arány (átlag±SE) a kísérlet terminálása után, a beültetést követő 70. napon, c) relatív tumortérfogat (átlag±SE). 5 állat/csoport, Mann-Whitney-teszt, \* $p < 0,05$

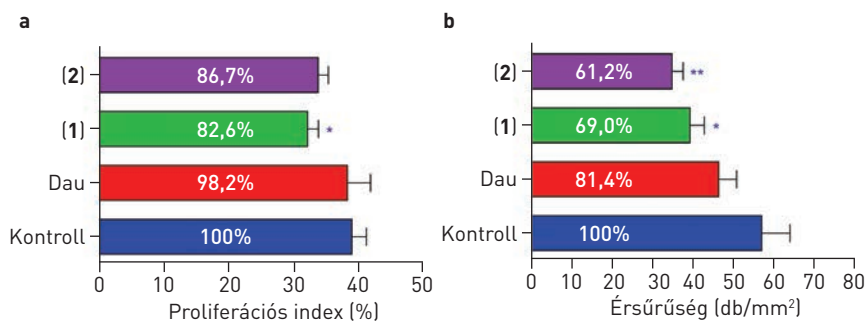
Vizsgáltuk továbbá a tumorszövetben lévő osztódó sejtek számát (proliferációs index a Ki-67-pozitív sejtek száma alapján) és a primer tumorok érékzódését (érhálózat-sűrűség CD31 marker alapján). Megállapítható volt, hogy amíg a Dau nem csökkentette érdemben (1,8%) az osztódó sejtek számát a kontrollhoz képest, addig a konjugátumokkal kezelt csoportok 17,4% (1) és 13,3% (2) csökkenést mutattak (5.a ábra). Az előbbi szignifikáns csökkenésnek tekinthető. Az érhálózat sűrűsége minden kezelt tumor esetén csökkent a kontrollhoz képest, de legkisebb mértékben a szabad hatóanyaggal kezelt állatokban (18,6%). A konjugátumok esetén a csökkenés szignifikáns volt, 31% (1) és 38,8% (2) (5.b ábra). Ezek az eredmények szintén alátámasztják a konjugátumok előnyös tulajdonságát a szabad hatóanyaggal szemben.

#### Az NGR-Dau konjugátumok

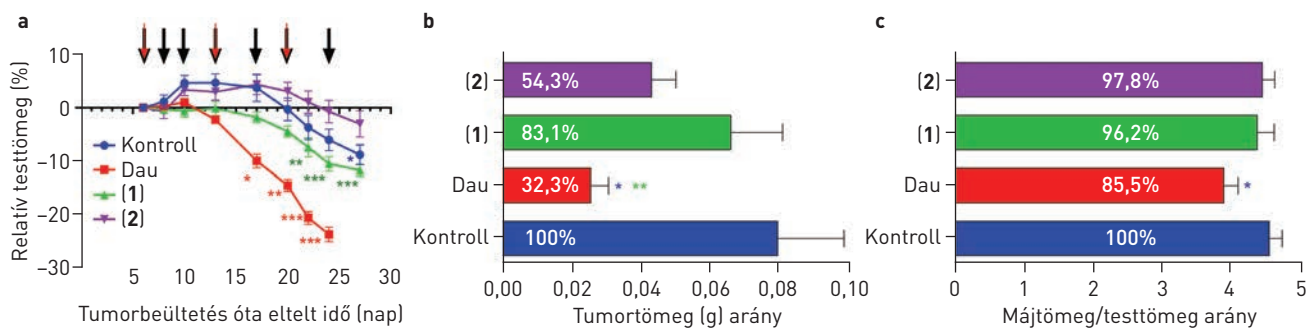
##### és a szabad Dau hatása HT-29 tumort hordozó egereken

Az ortotopikusan beültetett HT-29 tumoros egereken a kezeléseket a beültetést követő 6. napon kezdtük el az előző kísérletekkel azonos vegyületkoncentrációkat alkalmazva.

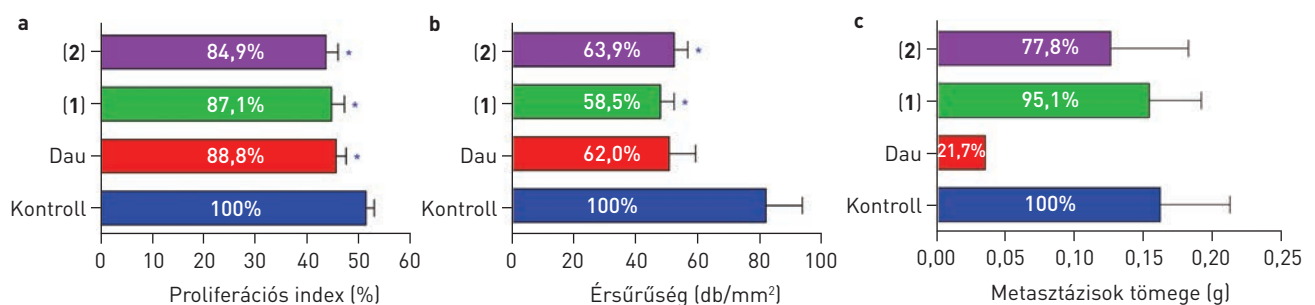
Daunomicinnel a beültetést követő 6., 13. és 20. napon végeztünk kezelést. Az ebbe a csoportba tartozó állatokat terminálni kellett a 24. napon a jelentős testtömegvesztés (>20%) miatt (6.a ábra). A konjugátumokkal 7 kezelést végeztünk a 6., 8., 10., 13., 17., 20. és 24. napokon. A kísérletet a 27. napon fejeztük be a kontrollcsoport és az 1 konjugátummal kezelt csoport jelentősebb testtömeg-csökkenése miatt. A 2 konjugátummal kezelt csoportban nem tapasztaltunk szignifikáns testtömegcsökkenést (6.a ábra). A tumorokat kioperálva megállapítható volt, hogy a kontrollhoz képest nem volt szignifikáns a gátlás az 1 konjugátummal kezelt csoportban (16,9%) (6.b ábra). Ezzel szemben a 2 konjugátummal kezelt csoportban lényegesen nagyobb tumornövekedés-gátlást tudtunk detektálni (45,7%). A legnagyobb gátlást a szabad daunomicinnel kezelt csoportban mértük (67,7%), azonban ez az eredmény nem teljesen összehasonlítható a többi csoporttal, mert azok 3 nappal később lettek terminálva. Mivel a kísérlet előrehaladtával a tumorok egyre gyorsabban növekednek, így nagy valószínűséggel a toxikus mellékhatás mellett a szabad hatóanyag hatékonysága sem jobb, mint a Nle-t tartalmazó konjugátumé.



**5. ÁBRA.** NGR-Dau konjugátumok hatása KS-beültetett egerekben történő a) proliferációra és b) érékzódásra. A diagramok átlag±SE értékeket ábrázolnak. Mann-Whitney-teszt, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$



**6. ÁBRA.** NGR-Dau konjugátumok (1 és 2, 10 mg/ttkg Dau-tartalom, 11 kezelés: fekete nyilak) és szabad Dau (1 mg/ttkg, 5 kezelés: piros nyilak) hatása HT-29 tumorral transzplantált egerekre. a) Az állatok relatív testtömege (átlag±SE), b) tumortömeg (g, átlag±SE), c) májtömeg/testtömeg arány (átlag±SE) a kísérlet terminálása után, a transzplantációt követő 27. napon (konjugátumok és kontrollcsoport esetén) vagy a 24. napon (Dau-csoport esetén). 8 állat/csoport, Mann-Whitney-teszt, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$



**7. ÁBRA.** NGR-Dau konjugátumok hatása HT-29 tumorral ortotopikusan beültetett egerekben történő a) proliferációra, b) érképződésre és c) a metasztázisok mennyiségére. A diagramok átlag±SE értékeket ábrázolnak. Mann-Whitney-teszt, \* $p < 0,05$

Az eredményekből az olvasható ki, hogy a CD13-negatív, de integrinpozitív tumortípuson az a konjugátum hatékonyabb, amely könnyen át tud alakulni *izo*Asp származékká, amely így hatékonyan felismeri a tumorsejteken lévő integrineket. A májtotoxicitási vizsgálatok ebben az esetben is a szabad Dau nagyobb toxicitását mutatták (a rövidebb kezelési idő ellenére 14,5% tömegcsökkenés a kontrollhoz képest), míg a konjugátumok esetében elhanyagolható volt a változás (3,8% [1] és 2,2% [2]) (6.c ábra).

Ebben az esetben is megvizsgáltuk a tumorsejtek osztódási képességét, illetve az érképződés gátlását (7.a és 7.b ábra). A proliferációs index csökkenése a kontrollhoz képest 11,2% (Dau), 12,9% (1) és 15,1% (2) volt, valamennyi szignifikáns a kontrollhoz képest. Az érképződésgátlás pedig egyenként 38%, nem szignifikáns (Dau) és 41,5% (1) valamint 36,1% (2), amely értékek szignifikánsnak adódtak.

Az ortotopikus tumormodell miatt ebben az esetben mód volt arra, hogy vizsgáljuk a Dau és a konjugátumok áttétképzésre gyakorolt hatását is. Az 1 konjugátum esetében nem tapasztaltunk jelentős metasztázisgátlást (4,9%) a kontrollhoz képest (7.c ábra). A Nle-t tartalmazó konjugátum (2) ebben

a tesztben is hatékonyabbnak bizonyult (22,2%). A Dau itt kimagasló hatást mutatott (közel 80%), de figyelembe kell venni, hogy a kezelés hamarabb véget ért ebben a csoportban.

### KONKLÚZIÓ

A peptidekkel irányított hatóanyagok egyre nagyobb figyelmet kapnak a célzott tumorterápiában. Ennek a kutatási irányynak a legfontosabb feladata, hogy megfelelő irányítópeptideket találjon, amelyek alkalmasak a tumorsejtek hatékony és szelektív felismerésére, és így a hatóanyagok célzott tumorsejtbe juttatására. Ez jelentősen növelheti a személyre szabott terápia tárházát, és ezáltal megvalósítható, hogy a beteg életminősége ne romoljon a kezelés során. Jelen munkánkban két NGR szekvenciát tartalmazó peptid (Dau=Aoa-GFLGK[ciklo[KNGRE]-GG]-NH<sub>2</sub> (1) és Dau=Aoa-GFLGK[ciklo[NleNGRE]-GG]-NH<sub>2</sub> (2)) konjugátumot vizsgáltunk. Az NGR peptidek jellemzője, hogy szukcinimidgyűrű-záródáson keresztül *izo*DGR-származékká tudnak alakulni. Mindkét peptid típus olyan receptorokhoz tud kötődni (az előző a CD13 receptorhoz, míg az utóbbi az integrinekhez), amelyeknek szerepük van a tumorszövetet ellátó új erek képződésében és

a metasztázisban. Ezért az NGR peptidek stabilitása fontos faktor abból a szempontból, hogy mely receptorokon tudja kifejteni a hatását. Ugyanakkor felvetődik olyan származékok előállítására is, amelyek az átalakulás folytán mindkét receptoron keresztül hathatnak (kettős célzás). Az alkalmazott két peptid között egyetlen különbség, hogy a ciklusban az NGR szekvenciát megelőzően Lys, illetve Nle található. Ez jelentős stabilitásbeli különbséget jelent. Míg a Lys-tartalmú konjugátum (1) stabil, addig a Nle-t tartalmazó (2) képes az NGR-*izo*DGR átalakulásra. Ezért ezt a két konjugátumot vizsgáltuk Kaposi-szarkóma CD13-negatív és integrinpozitív), illetve HT-29 vastagbél-adenokarcinóma (CD13-negatív, de integrinpozitív) tumorokon *in vivo*. Az eredményeink azt mutatták, hogy a CD13+ KS tumoros egereken a stabil szerkezetű, tehát a CD13 receptort felismerő 1 konjugátum

bizonyult hatékonyabbnak, míg a CD13 receptort csak nagyon kis mennyiségben tartalmazó, de integrinpozitív HT-29 tumoros egereken az átalakulásra képes 2 konjugátum mutatott szignifikánsan jobb hatást, mutatva a különböző szerkezetek eltérő receptorfelismerését. Fontos megjegyezni, hogy a konjugátumok lényegesen kisebb toxikus mellékhatást mutattak, mint a szabad hatóanyag, ami e konjugátumok pozitív tulajdonsága gyógyszerré fejlesztés esetén. A konjugátumok pozitív hatása az osztódó sejtek és az újonnan képződő erek számának csökkenésében is tetten érhető volt. Mindezek azt bizonyítják, hogy az NGR peptidszekvenciát tartalmazó konjugátumok megfelelő fejlesztésre és a szerkezetük megválasztásával befolyásolni lehet a tumorspecifitásukat is.

## IRODALOM

- Baudino TA. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol* 12:3–20, 2015
- Parakh S, King D, Gan HK, Scott AM. Current development of monoclonal antibodies in cancer therapy. *Recent Results Cancer Res* 214:1–70, 2020
- Khongorzul P, Ling CJ, Khan FU, et al. Antibody-drug conjugates: a comprehensive review. *Mol Cancer Res* 18:3–19, 2020
- Gilad Y, Firer M, Gellerman G. Recent innovations in peptide based targeted drug delivery to cancer cells. *Biomedicines* 4:p11:E11, 2016
- Vrettos E, Mező G, Tzakos AG. On the design principles of peptide-drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site. *Beilstein J Org Chem* 14:930–954, 2018
- Schuster S, Biri-Kovács B, Szeder B, et al. Enhanced in vitro antitumor activity of GnRH-III-daunorubicin bioconjugates influenced by sequence modification. *Pharmaceutics* 10:223, 2018
- Kiss K, Biri-Kovács B, Szabó R, et al. Sequence modification of heptapeptide selected by phage display as homing device for HT-29 colon cancer cells to improve the anti-tumour activity of drug delivery systems. *Eur J Med Chem* 176:105–116, 2019.
- Enyedi KN, Tóth S, Szakács G, Mező G. NGR-peptide-drug conjugates with dual targeting properties. *PLoS One* 12:e0178632, 2017
- Koivunen E, Gay DA, Ruoslahti E. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. *J Biol Chem* 268:20205–20210, 1993
- Healy JM, Murayama O, Maeda T, et al. Peptide ligands for integrin alpha v beta 3 selected from random phage display libraries. *Biochemistry* 34:3948–3955, 1995
- Curnis F, Arrigoni G, Sacchi A, et al. Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res* 62:867–874, 2002
- Curnis F, Longhi R, Crippa L, et al. Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibronectin. *J Biol Chem* 281:36466–36476, 2006
- Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, et al. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60:722–727, 2000
- Corti A, Curnis F, Rossoni G, et al. Peptide-mediated targeting of cytokines to tumor vasculature: the NGR-hTNF example. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther* 27:591–603, 2013
- Enyedi KN, Czajlik A, Knapp K, et al. Development of cyclic NGR peptides with thioether linkage: structure and dynamics determining deamidation and bioactivity. *J Med Chem* 58:1806–1817, 2015
- Negussie AH, Miller JL, Reddy G, et al. Synthesis and in vitro evaluation of cyclic NGR peptide targeted thermally sensitive liposome. *J Control Release* 143:265–273, 2010
- Tripodi AAP, Tóth S, Enyedi KN, et al. Development of novel cyclic NGR peptide-daunomycin conjugates with dual targeting property. *Beilstein J Org Chem* 14:911–918, 2018
- Tripodi AAP, Randelović I, Biri-Kovács B, et al. In vivo tumor growth inhibition and antiangiogenic effect of cyclic NGR peptide-daunorubicin conjugates developed for targeted drug delivery. *Pathol Oncol Res* 26:1879–1892, 2020
- Kapuvári B, Schulcz Á, Hegedüs R, et al. Módosított GnRH-III-antraciklin biokonjugátumok daganatnövekedést gátló hatásának tanulmányozása in vivo szubkutatán vs. ortotopikus rendszerekben *Magy Onkol* 59:310–318, 2015