

# **Módosított GnRH-III-antraciklin biokonjugátumok daganat növekedést gátló hatásának tanulmányozása *in vivo* szubkután vs. ortotopikus rendszerekben**

Kapuvári Bence<sup>1</sup>, Schulcz Ákos<sup>2</sup> Hegedüs Rózsa<sup>3</sup>, Szabó Ildikó<sup>3</sup>, Manea Marilena<sup>4</sup>, Vincze Borbála<sup>1</sup>, Tóvári József<sup>2</sup>, Gacs Alexandra<sup>2</sup>, Tejeda Miguel<sup>2</sup>, Gaál Dezső<sup>2</sup>, Mező Gábor<sup>3</sup>

- 1) Országos Onkológiai Intézet, Biokémiai Osztály
- 2) Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály
- 3) ELTE-MTA, Peptidkémiai Kutatócsoport
- 4) Department of Chemistry, Zukunftscolleg, University of Konstanz, 78457 Konstanz, Germany

Futócím:

GnRH-antraciklin konjugátumok *in vivo* modellekben

Levelezési cím:

Kapuvári Bence,

Országos Onkológiai Intézet, 1122. Budapest, Ráth György utca 7-9.,

Telefon: (36-1) 224-87-81, Fax: (36-1) 224-86-81,

E-mail cím: kapuvari.bence@oncol.hu

Vizsgálatinkat az OTKA (NK 77845 és K 104045) támogatta. Eredményeink alapján az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport és az Onkológiai Intézet kutatóit (Prof. Dr. Mező Gábor és Dr. Tóvári József vezetésével) a 2015 januárjában indult HORIZON 2020 EU-s pályázat (MAGICBULLET) résztvevőinek felkérték.

## ABSZTRAKT

Az irányított/célzott tumorterápia nagyon perspektivikus eljárás a daganatok szelektív elpusztítására, ezáltal kiküszöbölhető, vagy visszaszorítható a tumorelles gyógyszerek mellékhatásai. Erre az eljárásra használható olyan konjugátumok, ahol a tumorelles szer irányító molekulához (pl. peptid hormonok) van kapcsolva, melyeknek receptorai szelektíven csak a daganatsejteken jelennek meg, vagy azokon jóval nagyobb mennyiségben fordulnak elő, mint az egészséges sejteken. Az *in vitro* citosztázis/citotoxicitás vizsgálatok általában nem nyújtanak elég információt arra nézve, hogy az előállított konjugátum hatékonyabb-e a szabad hatóanyagnál, erre csak az *in vivo* vizsgálatokból lehet következtetni. Nagyon fontos azonban a hamis pozitív eredmények kiszűrése érdekében a megfelelő tumormodell megválasztása. Munkánk során egy gonadotropin-releasing hormon analóg a GnRH-III variánsok daunorubicin konjugátumainak daganatnövekedést gátló hatását vizsgáltuk egerekbe szubkután, illetve ortotopikusan beültetett tumorokon. A környezetétől izolált szubkután tumormodell a valóságtól eltérő eredményeket adhat a molekulák tumornövekedést gátló hatásának vizsgálatára. Az ortotopikus rendszerrel jobban modellezhető az anatómiailag és klinikailag megfelelő állapot. Ezért célszerű a későbbiekben az általunk kialakított ortotopikus vastagbél tumormodell alkalmazni az irányított daganatterápiára előállított vegyületek szűrésére.

### Kulcsszavak:

célzott tumor terápia, ortotopikus tumor modell, GnRH, dauniorubicin, vastagbél daganat

## ABSTRACT

Targeted tumor therapy is a perspective procedure to destroy specifically the cancer tissues with the elimination or at least decrease the side effects of anticancer drugs. For this purpose drug molecule is attached to a targeting moiety (e.g. peptide hormones) that recognizes tumor specific or overexpressed receptors on cancer cells. The *in vitro* cytostatic or cytotoxic assays do not give proper information whether the tumor growth inhibitory effect of the conjugate is better than the activity of the free drug. Only the *in vivo* studies are adequate procedure to answer this question. However, the selection of the appropriate tumor model is important to eliminate the false positive results. In our studies a gonadotropin-releasing hormone analog (GnRH-III) was applied as targeting moiety in drug conjugates. The *in vivo* antitumor activity of these conjugates was investigated on mice bearing subcutaneously or orthotopically developed tumors. Subcutaneously implanted tumor model which is isolated from its surroundings may provide false results in tumor growth inhibition. In contrast, the orthotopically developed tumor is a better model representing appropriate anatomical and clinical status of cancer. Therefore, the orthotopical colon cancer developed in our laboratory is a suitable model for the study the antitumor activity of the conjugates prepared for targeted tumor therapy.

### Title:

Studying the tumor growth inhibition effect of modified-GnRH-III-anthracycline bioconjugates in subcutaneous vs. orthotopic models, *in vivo*

### Keywords:

Targeted tumor therapy, orthotopically, GnRH, dauniorubicin, colon cancer.

## BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések gyógyításában a sebészeti beavatkozás és a sugárterápia mellett legfontosabb kezelési mód a kemoterápia. Azonban közismert, hogy az alkalmazott kemoterápiás szerek számos mellékhatással rendelkeznek, így pl. hajhullás, emésztési zavarok, hányás, továbbá az immunrendszer legyengülése folytán nő a fertőzésekkel szembeni érzékenység. A mellékhatások összefüggnek azzal, hogy a kemoterápiás szerek nem, vagy nem eléggé szelektívek, így nem csak a tumorsejtekre, hanem más gyorsan osztódó egészséges sejtekre is proliferációt gátló hatást fejtenek ki. Ezek mellé társulnak a szervspecifikus mellékhatások, mint például a kardiotoxicitás a doxorubicin esetén. Az irányított vagy célzott tumorterápia elsődleges célja, hogy úgy gátolja a tumor növekedését, vagy érje el a tumorsejtek pusztulását, hogy közben megkímélje az egészséges szöveteket (1). A célzott tumorterápia sikerességéhez ismerni kell az adott tumoron azokat a sejtfelszíni struktúrákat, amelyek támadhatóak a tumor elpusztításának reményében. Ezeket a molekulákat a daganat eltávolítása vagy biopszia során végzett mintavétel után speciális vizsgálatokkal lehet meghatározni. Az egyik lehetséges kezelés során tumorspecifikus monoklonális ellenanyagot juttatnak a szervezetbe, mely tumorsejteken megjelenő antigénekhez kötődve aktiválja az immunrendszert a tumor elpusztítására, és/vagy blokkolja azokat a receptorokat (pl. epidermális növekedési faktor receptor (EGF-R)), amelyekhez a tumor növekedéséhez szükséges növekedési faktorok kötődni tudnak (2). Ez az eljárás egyre szélesebb körben nyer alkalmazást a klinikai onkológiában – pl. Cetuximab (EGF-R blokkoló), Trastuzumab és Pertuzumab (HER-2 blokkoló) emlődaganat esetén – és része az úgynevezett személyre szabott terápiának. Az újabb kísérletekben hatóanyagok célba juttatására is alkalmazzák ezeket az ellenanyagokat (3).

A másik lehetőség, hogy olyan tumorelleses hatóanyagokat, melyek önmagukban nem szelektívek és így kemoterápiás alkalmazásuk során számos mellékhatást váltanak ki, irányító molekulákhoz kötnek a szelektivitás fokozása érdekében. Az irányító molekulák olyan vegyületek (pl. peptid hormonok), amelyek hatékonyan tudnak kötődni olyan sejtfelszíni molekulákhoz (pl. receptorokhoz), amelyek szelektíven vagy az egészséges szövetekhez képest jóval nagyobb mennyiségben fejeződnek ki a tumorsejteken (4). A receptorhoz kötődött hatóanyag –irányító molekula konjugátum ezután receptor közvetített endocitózissal bejut a

tumorsejtbe. A konjugátumból a szabad hatóanyag, vagy annak aktív metabolitja a lizoszomális lebontó enzimek hatására a tumorsejtben felszabadul és így kifejtheti tumornövekedést gátló hatását. Ez a módszer lényegesen olcsóbb terápiát eredményezne szemben a monoklonális ellenanyagok alkalmazásával. Az ebbe a csoportba sorolható vegyületek közül néhány már a klinikai kipróbálás fázisában van, és remélhetőleg hamarosan bővítheti a klinikai onkológia eszköztárát.

A célzott tumorterápiára az egyik legígéretesebb hatóanyag-peptid konjugátum egy olyan vegyület, amelyben egy gonadotropin-releasing hormon (GnRH) agonistához kapcsolódik egy doxorubicin molekula (5). Különböző tumorok (emlő, endometrium) esetén Klinika III fázisban lévő gyógyszer jelöltet, a Zoptarelin Doxorubicin (AEZS-108, AN-152) molekulát a Nobel-díjas Andrew Schally laboratóriumában fejlesztették ki több magyar kutató részvételével (6). Ebben a vegyületben a humán GnRH-I 6-os pozícióban D-lizinnel (D-Lys) módosított variánsához (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, ahol a Glp = piroglutaminsav) egy glutársav egységen keresztül kapcsolódik a doxorubicin észterkötéssel (1. ábra).

A GnRH-I D-Lys módosítása kettős célt szolgál. Egyrészt a GnRH-I 6-os pozíciójában glicin (Gly) cseréje D-aminosavakra (különösen nagy térkitöltésű oldallánccal rendelkező aminosavak esetén) növeli a peptid hormon receptorkötődési affinitását. Másrészt a lizin oldalláncában lévő aminocsoport alkalmas arra, hogy rajta keresztül hatóanyagot konjugáljanak a peptidhez. Ez a konjugátum számos tumorsejten mutatott kiváló *in vitro* és *in vivo* tumornövekedés gátlást szignifikáns mellékhatások nélkül (7). A vegyületnek azonban két gyenge pontja van. Az egyik, hogy az észter kötés nagyon könnyen bomlik karboxilészterázok hatására, és a hatóanyag részben felszabadulhat a célba jutás előtt (ez jelentős problémát okozott az állatkísérletekben és karboxilészteráz gátlókkal együtt kellett adni az egereknek) (8). Ez gátja volt annak is, hogy az irányító molekulához a doxorubicinnál 500-1000-szer hatékonyabb hatóanyagot a 2-pirrolino-doxorubicint kapcsolják, mert a korán felszabaduló hatóanyag igen toxikus volt a kísérleti állatokban (9). Így ez a módosulat nagy hatékonysága ellenére sem volt alkalmas a klinikai vizsgálatokra. A másik, a klinikai vizsgálatok során megfigyelt mellékhatás a GnRH-I szuperagonista hormonhatásához köthető (5). Ezt azonban nem tekintik jelentős problémának, mivel a szert többnyire a beteg szaporítószervének/szerveinek eltávolítása után kívánják alkalmazni.

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport az Országos Onkológiai Intézettel együttműködve közel egy évtizede foglalkozik azzal, hogy a Zoptarelin Doxorubicin gyógyszer jelölthöz hasonló, de annak kedvezőtlen mellékhatásait kiküszöbölő GnRH – hatóanyag konjugátumokat állítson elő, és azok tumorellenes hatását vizsgálja (10). Az első megfontolás azt volt, hogy a GnRH-I szuperagonista irányító molekulához képest kisebb endokrin hatást mutató peptidet használjunk. Ezért választásunk a tengeri ingolából (*Petromyzon marinus*) izolált GnRH-III (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) peptid hormonra esett. A GnRH-III, amely mind a GnRH-I, mind a GnRH-II receptorhoz tud kötődni, bár kisebb affinitással, mint az adott receptorok alapligandumai, elhanyagolható endokrin aktivitással rendelkezik emlősökben, ugyanakkor a természetes GnRH analógok közül a legnagyobb proliferáció-gátló hatása van (11–12). Ráadásul a molekula a 8-as helyzetben tartalmaz egy lizint (Lys), amelynek oldallánca felhasználható különböző módosításokra, így például dimerizációra és tumorellenes hatóanyag kapcsolására (13–14). Érdeemes megjegyezni, hogy a lizin oldalláncában lévő aminocsoport blokkolása az endokrin hatás további csökkenéséhez vezet (15). A molekulában lévő aminosavak közül csak nagyon kevés cserélhető ki az antiproliferációs hatás elvesztése nélkül (16–17). Az egyik megengedett csere a 4-es pozícióban található szerin (Ser) cseréje lizinre, vagy az oldalláncában acetilezett lizinre (Lys(Ac)). Egy újabb lizin beépítése lehetőséget biztosít további módosításokra, amit munkánkban ki is használtunk. A második megoldandó probléma a hatóanyag (doxorubicin) idő előtti, vagyis a tumorsejtbe jutás előtti felszabadulásának megakadályozása volt. Ezért a hatóanyag konjugálására egy stabilabb kötés az un. oxim-kötés kialakítását választottuk (17). Ebben az esetben nem a doxorubicin primer hidroxilcsoportján keresztül kapcsoljuk a hatóanyagot az irányító peptidhez, hanem annak a 13-as C-atomján lévő oxocsoportot kötjük egy aminosav-aminocsoporton keresztül a GnRH analóghoz. Ez az eljárás a daunorubicin kapcsolására is módot ad, hiszen a daunorubicin pont az észter-kötés kialakításához szükséges hidroxilcsoport hiányában tér el a doxorubicintól (19). Vizsgálataink azt mutatták, hogy az oxim-kötésből a szabad hatóanyag nem szabadul fel a lizoszómákban, hanem egy olyan kis metabolit képződik, amelyben a hatóanyag az aminosav-aminocsoport részletein keresztül ahhoz az aminosavhoz kapcsolódik, amely aminosav-aminocsoport volt (20). Ugyanakkor azt is sikerült igazolni, hogy ezek a metabolitok képesek kötődni a DNS lánchoz, bár kisebb affinitással, mint a szabad hatóanyag. Az *in vitro* citosztázis vizsgálatok

alapján folyamatosan fejlesztettük a molekulát. Így például a 4-es pozícióban Ser – Lys cserével újabb konjugációs helyet hoztunk létre, amelyhez a vastagbél tumorokon apoptózist indukáló rövid szénláncú zsírsavakat (21), vagy további hatóanyag molekulát (daunomicin vagy metotrexát) konjugáltunk (22–23). Érdeemes megjegyezni, hogy ezek a módosítások az irányító molekulaként szolgáló peptid enzimrezisztenciáját is növelik. Ezért a receptorkötődésben fontos N-terminális rész lassabban hasad a GnRH analógról, így a konjugátum hosszabb ideig maradhat receptor kötődésre alkalmas formában. Ebben a publikációban a helyes vizsgálati módszerek kiválasztását, valamint néhány ígéretes vegyület *in vivo* vizsgálatát kívánjuk bemutatni (18, 24–25) (2. ábra).

## ANYAG ÉS MÓDSZEREK

### *Krónikus toxicitás vizsgálat daunorubicinnel*

Ivarérett, 26-30 g-os NSG hím egereket használtunk a krónikus toxicitás vizsgálatra. A daunorubicint (Dau) desztillált vízben feloldottuk. Két különböző koncentrációt alkalmaztunk az előzetes tapasztalataink alapján: 1mg/ttkg, és 2 mg/ttkg Dau tartalomra vonatkoztatva. Minden egér 0,1 mL/ 10 g testtömeg mennyiségű oldatot kapott. Ebben a kísérletben csoportonként 3 egér volt. A kezelést intraperitoneálisan (*i.p.*) kapták az 1., 4., 8., 12., és 16. napokon. Mértük az egerek testtömegét és élettartamát. A túlélési időt 20 napig követtük. (3. ábra)

### *Alkalmazott kísérleti egerek:*

Balb/C (BALB/cByJ): McDowell által 1923-ban kitenyésztett hagyományos egérmodell. Olcsó, teljes immunrendszerrel rendelkező egértörzs, mely nem igényel steril körülményeket, ugyanakkor a humán xenograftok kilökődnek belőle. A besugárzásra érzékeny, ezért immunrendszere könnyen kiirtható. Legfőbb kísérleti előnye, hogy ebben az egértörzsben jelent meg a C-26 tumor, uretán/metil-nitrozo-urea intrarektális applikációt követően, ezért nincs kilökődési reakció. Sajnos szívhibákra és bal kamrai spontán szívizom elváltozásra hajlamos, ami hátrány a kardiotoxikus antraciklinekkel történő kezelése során.

NOD scid gamma (NSG: Non Obese Diabetic Severe Combined ImmunoDeficient interleukine Gamma receptor chain knock-out) egér (NOD.Cg-Prkdcscid

Il2rgtm1Wjl/SzJ): humán xenograftok beültetésére ideális egértörzs, az egyik legsokoldalúbb modell állat. Előnyei közé tartozik, hogy fenotípusa stabil, nincs funkcionális B- és T-sejtje, nincs NK-sejt (természetes ölősejt) aktivitása, humanizálható (érett emberi nyirok- és mieloid sejtek tarthatók benne).

Az immunhiányos NSG egereket CB-17 háttérrel tenyésztették ki. Specifikus, opportunistá és patogén korokozóktól mentes (S.O.P.F = Specified Opportunistic and Pathogen Free) tenyésztő szobákban tartottuk az egereket. Az egerek gondozása, tartása és használata minden esetben a „Helsinki Nyilatkozat” vezérelve szerint és a helyi etikai bizottság jóváhagyásával történt.

#### *Alkalmazott tumorok, xenograftok*

C-26 egér vastagbél karcinóma: gyorsan növe invazív, metasztázis képzésre hajlamos, GnRH-receptor pozitív tumor. HT-29 humán vastagbél xenograft (GnRH receptor pozitív)

#### *Szubkután (s.c.) modell*

A C-26 tumor darabokat (SRI, Birmingham, AL) (3-4 mm<sup>3</sup>) a hátbőr alá transzplantáltuk. A tumorok térfogatát minden második illetve harmadik napon mértük, amíg a kontroll csoportban az első állat el nem hullott. A tumor térfogatát az alábbi képlettel határoztuk meg:  $V = A^2 \times \pi / 6 \times B$  (ahol „A” a rövidebb, „B” pedig a hosszabb átmérő értéke.) (25)

#### *„Anyatumor” előállítás ortotopikus vastagbél modellhez*

Az ortotopikus modellhez szükséges anyatumort szintén szubkután állítottuk elő, mert így egy viszonylag homogén szövethalmazt kaptunk, amit sok azonos szöveti struktúrájú darabra vághattunk. C-26 esetén már rendelkezünk kész tumorról.

HT-29 humán vastagbél tumor (GnRH receptor pozitív) esetén minden egérbe 100 µL extra-celluláris mátrix géllal (ECM-gél, matri-gél) elegyített 10<sup>6</sup> darab sejtet injektáltunk szubkután. A standard előírásoknak megfelelő sejt kultúra az ATCC-től származott. 24-28 g-os (6-8 hetes) ivarérett nőstény NSG egereket használtunk fel. A már tapintható tumorokat — az állatok túlaltatását (300 µL tömény nembutál) és jódos lefertőtlenítését követően — kivágtuk. Az így kapott anyatumort fiziológiás sóoldatban áztatva 2-3 mm<sup>3</sup>-es darabokra vágtuk és beültettük az ortotopikus modellbe. (25)



### *Ortotopikus vastagbél modell és tumor transzplantáció*

Az állatokat intraperitoneálisan (*i.p.*) adott kombinált, balanszírozott altatókeverékkel narkotizáltuk. Összetevői: tiletamin, zolazepam, xilazin, butorfanol. Beadás után 5 perccel kialakul a sebészi narkózis, ami kb. 1 órán keresztül áll fenn. Az összetevők további kb. 6 órán át tartó erős fájdalomcsillapító hatást biztosítanak. A vakbél felett kb. 0,5 cm-es metszéssel átvágtuk a bőrt és a hasizmokat, majd a vakbelet kiemeltük a hasüregből. Mikroszkóp alatt, mikroczipesz segítségével a vakbél fején a szerózaréteget kb. 1 mm-es hosszban feltéptük, ügyelve arra, hogy az alatta fekvő izomréteg ne sérüljön. Ezután 2 mm<sup>3</sup>-es (anyatumorból származó) C-26 illetve HT-29 varrtunk fel 8/0-ás polipropilén fonállal oly módon, hogy a tumor fedje a szerózától megfosztott területet. Végül a vakbelet a hasüregbe visszahelyeztük, és az izombőrsebet 4/0-ás poliglikolsav fonál segítségével csomós öltéssel egy rétegben zártuk. Az egerek a műtétet követően s.c. 0,5 mL 5 % glükózt és 100 mg/kg algopirint tartalmazó Ringer-oldatot kaptak posztoperatív fájdalomcsillapítás, rehidratálás és energiapótlás céljából. Másnap az állatok nem mutattak fájdalomra, szenvedésre, stresszre utaló jeleket. Műtéti halálozás 2 % volt.

Amikor a kontroll csoport állatai az elhullás közeli állapotot mutatták (apátia, minimális mozgás, evés, ivás hiánya, nem reagálnak a külső ingerekre, stb.), befejeztük a kísérletet és az összes egeret túllaltatással (300 µL tömény nembutál) termináltuk. Ezek után az állatokat felboncoltuk, a primer tumorokat, és a májakat eltávolítottuk, tömegüket lemértük, majd formalinban archiváltuk a tüdő, vese és lép kíséretében (24)

### *Dózis és kezelés C-26 szubkután és ortotopikus modellen*

Szubkután: Csoportonként 7-7 egeret alkalmaztunk. A konjugátumok esetén 1,36 µmol/egér/injektálás (30 mg/ttkg Dau tartalom), a szabad daunorubicin esetén 2 mg/ttkg dózist adagoltunk. A terminálás a transzplantációt követő 21. napon történt.

Ortotopikus: 10 db kontroll egeret és csoportonként 7-7 egeret használtunk. A konjugátumok esetén 0,68 µmol/egér/injektálás (15 ill. 30 mg/ttkg Dau tartalom) szabad daunorubicin esetén 2 mg/ttkg. A három plusz kontroll egeret a kísérlet követése érdekében bizonyos időközönként felboncoltuk és ellenőriztük a tumor fejlődését. A terminálásra a transzplantációt követő 13. napon volt szükség.

Kezelések: Mindkét modellben a tumor transzplantációt követő 4, 7. napon; *i.p.*. Az oldószer desztillált víz volt. (24-25)

#### *Dózis és kezelés HT-29 orthotopikus modellen*

Szabad daunorubicin esetén *i.v.* 1 mg/ttkg hetente egyszer, összesen 7 alkalommal. Konjugátumok esetén: a tumor transzplantációt követő 5. naptól heti két alkalommal. Az első négy kezelést intravénásan (*i.v.*) végeztük 15 mg/ttkg Dau tartalomra vonatkoztatva. Ötödik kezelés már *i.p.* történt, 15 mg/ttkg Dau tartalomra vonatkoztatva. Az első öt kezelés dózis beállító beavatkozás, a többi már csak szinten tartó. Hatodik kezeléstől a 13-ig: *i.p.* 7,5 mg/ttkg Dau tartalomra vonatkoztatva, plusz 5%-nak megfelelő glükóz hozzáadásával, a tfa-sók szövetromboló hatásának enyhítésére.

A terminálásra a transzplantációt követő 50. napon került sor.

#### *Statisztikai elemzés:*

A kísérletek statisztikai analízisét Medcalc<sup>®</sup> v. 12.1.3.0. (Broekstraat 52, B-9030 Mariakerke, Belgium) program felhasználásával végeztük. Az adatok normál eloszlását Chi<sup>2</sup>-próbával ellenőriztük. A kiszóró pontokat Gauss-féle  $\sigma$  statisztikával vizsgáltuk felül. Az egyes csoportok adatainak összehasonlítását Mann-Whitney (független minták) teszttel végeztük. Szignifikáns különbségnek a  $P \leq 0,05$  értéket tekintettük.

#### *Rutin szövettani vizsgálatok*

A boncolások során eltávolított és rögzített szövetmintákat etanol oldatsorozattal fokozatosan dehidratáltuk, majd xilollal átítattuk, és paraffinba ágyasztuk. A szövettani metszeteket Harris féle hematoxin-eozin módszerrel festettük meg (10: 1, v: v, 1% oldatok) 70 %-os savanyított etanolban. A megfestett mintákat fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk. (Olympus CH30, Olympus Optical, Japán). (25)

#### *Az osztódási ráta és a vaszkularizáció mértékének meghatározása ortotopikus HT-29 tumor szövetben*

30 perccel az egerek terminálása előtt, az állatoknak *i.p.* 5-bróm-2V-dezoxi-uridint (BrdU, 200 mg / kg, Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) adtunk.

6 óra elteltével 5-7 µm vastagságú metszeteket készítettünk a frissen fagyasztott tumorból, majd a szövet BrdU-pozitív sejtjeit anti-BrdU monoklonális antitesttel (Becton Dickinson Hungary Kft., Budapest, Magyarország) reagáltattuk a gyártó protokollja szerint. A pozitív sejteket TRITC-konjugált anti-egér IgG-vel (1:100, Sigma) tettük láthatóvá. A tumorsejteket az endoteliális sejtektől úgy különítettük el, hogy a mintákat patkány anti-egér CD31 antitesttel kezeltük, majd biotinilált anti-patkány IgG-vel és sztreptavidin-FITC reagenssel (Vector Laboratories, Burlingame, CA) jelöltük. A sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel (Molecular Probes, Eugene, OR) festettük meg. A megjelölt HT-29 sejtek számát és a CD-31 pozitív minták mennyiségét két különböző élő tumorból származó, 6 független mikroszkópos terület elemzésével határoztuk meg

A primer tumorok vaszkularizációs mértékét két különböző élő tumorból származó, 4 független mikroszkópos terület elemzésével határoztuk meg úgy, hogy az elkülönített endotél szövetek hány százalékot fednek le egy 10x-es nagyítású látómezőben. (25)

## EREDMÉNYEK

### *Akut toxicitás és dózisok beállítása*

Az akut toxicitási vizsgálatok egészséges nőstény BDF-1 egereken azt mutatták, hogy a szabad daunorubicin (Dau) maximálisan tolerált dózisa többszöri kezelés esetén 2 mg/ttkg. Ugyanakkor az alkalmazott konjugátumok (GnRH-III(Dau=Aoa) és GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)) még 30 mg/ttkg Dau-t tartalmazó koncentrációban sem mutattak toxikus mellékhatást. Ez többszöröse az alkalmazni kívánt dózishoz, így az immunszupprimált NGS egereken, már csak a Dau alkalmazható dózisát vizsgáltuk. Ebben az esetben a 2 mg/ttkg dózis négyszeri kezelés után a 12. napon az állatok pusztulását eredményezte. Ugyanakkor 1 mg/ttkg dózis alkalmazása esetén, bár az egerek testtömege folyamatosan csökkent, csak az 5. kezelést követően a 20. nap elteltével történt az első elhullás. Ennek megfelelően a C-26 tumorral transzfektált Balb/C egereken 2 mg/ttkg (a tumor beültetést követő 4. és 7. napon), míg a HT-29 tumort hordozó NGS egerek esetében heti egyszer 1 mg/ttkg daunorubicint alkalmaztunk. A konjugátumokból az első esetben 15 illetve 30 mg/ttkg (a szubkután beültetett tumor illetve a két Dau-tartalmazó konjugátum esetén az ortotopikus kezeléskor) daunorubicint tartalmazó dózist, míg a második esetben 15 mg/ttkg iniciáló dózis után 7,5 mg/ttkg daunorubicint tartalmazó fenntartó dózist alkalmaztunk

heti két kezelésben. Az alkalmazott dózisokban a szabad és konjugált Dau kardiotoxikus hatását vizsgálva a mikroszkópi metszeteken szívizom és egyéb szöveti károsodást nem tapasztaltunk egyik kísérlet egyetlen csoportjában sem.

#### *Tumornövekedést gátló hatás vizsgálata különböző modelleken*

A GnRH-III[Dau=Aoa] és GnRH-III[Dau=Aoa-GFLG] biokonjugátumok a kontrollhoz képest a szubkután C-26 modellen 34,5 % (P=0,0017) -, illetve 32,3 % (P=0,0017) - kal csökkentették a primer tumor térfogatát, két kezelést követően a 21. napon mérve. Ez jelentősen meghaladta a megengedett dózisban alkalmazott a szabad Dau hatékonyságát (22,2 %; P = 0,2612). Ugyanakkor az ortotopikus C-26 kísérletek során a konjugátumok nem mutattak primer tumor növekedés gátló hatást. Ezzel szemben a szabad hatóanyag ilyen körülmények között is 24,4 % tumornövekedést gátló hatást mutatott a kontrollhoz képest. Az ortotopikus C-26 kísérletekbe bevontunk két továbbfejlesztett konjugátumot is. Mindkét esetben a GnRH-III 4-es pozíciójában lévő szerint lizinre cseréltük, és az így létrejövő újabb aminocsoport (konjugációs hely) acetilezésével vagy egy újabb molekula daunorubicin kapcsolásával alakítottunk ki új, hatékonyabb analógokat. A GnRH-III[<sup>4</sup>Lys(Ac),<sup>8</sup>Lys(Dau=Aoa)] és GnRH-III[<sup>4</sup>Lys(Dau=Aoa),<sup>8</sup>Lys(Dau=Aoa)] származékok az ortotopikus C-26 tumorok gátlásában hatásosnak bizonyultak. A konjugátumokkal kezelt csoportok esetén a mért tumortömegek 49,3%-kal (P=0,0279), illetve 38,4%-kal (P=0,0560) voltak kisebbek a kontrollhoz képest, amelyek meghaladták a szabad Dau aktivitását (4. ábra).

Ezeket az eredményeket figyelembe véve a leghatékonyabb konjugátumot (GnRH-III[<sup>4</sup>Lys(Ac),<sup>8</sup>Lys(Dau=Aoa)]) vittük tovább az ortotopikusan beültetett HT-29 tumort tartalmazó NSG egereken végzett vizsgálatokra. Időközben az *in vitro* citosztázis vizsgálatok azt mutatták, hogy az acetyl-csoport cseréje butiril-csoportra a 4-es pozícióban lévő lizinen, tovább növeli a konjugátum tumorelles hatását. Így ezt a vegyületet is felvettük ebbe a kísérletbe. A GnRH-III[<sup>4</sup>Lys(Bu),<sup>8</sup>Lys(Dau=Aoa)] szignifikánsan (P=0,0350) 39,4 %-ban gátolja az ortotopikus HT-29 primer daganatok növekedését NSG nőstény egerekben; ugyanakkor a GnRH-III[<sup>4</sup>Lys(Ac),<sup>8</sup>Lys(Dau=Aoa)] nem a várt eredményt produkálta: csak 7,1 %-ot gátolt a kontrollhoz képest (4 iniciáló és 8 fenntartó kezelés után az 50. napon). A szabad Dau a megengedett heti egyszeri 1 mg/ttkg dózisban végzett kezelésével a tumornövekedés gátlása csak 29,7 %-os volt (5. ábra).

Az ortotopikus HT-29 tumorok esetén az osztódási ráták (proliferációs index) vizsgálata során minimális (~15 %), nem szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mindkét konjugátumnál a kontrollhoz viszonyítva, míg a szabad Dau nem mutatott ilyen hatást (6. ábra). A vaszkularizáció mértékében viszont jelentős és szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mind a kontroll csoportokhoz, mint pedig a daunorubicinnel kezelt csoportokhoz képest (7. ábra). Ugyanakkor egyetlen anyag sem mutatott metasztázis gátlást egyik ortotopikus modell esetén sem.

## MEGBESZÉLÉS

Az *in vitro* citosztázis vagy citotoxicitás meghatározásokból csak nagyon óvatos következtetéseket tehetünk az irányított tumorterápiára alkalmazható konjugátumok tumornövekedést gátló hatékonyságára. Figyelembe kell venni, hogy a szabad hatóanyag aktivitását – különösen, ha az diffúzióval képes bejutni a sejtekbe – a belőle képzett konjugátum – amely receptor közvetített endocitózissal jut be a tumorsejtekbe – nem fogja meghaladni. Ez különösen akkor igaz, ha a konjugátumból nem a szabad hatóanyag, hanem annak csak egy aktív metabolitja szabadul fel. A konjugátum előnyös tulajdonságára utalhat, ha proliferációgátló hatása a „multidrug rezisztens” daganatsejteken jobb, mint a szabad hatóanyagé. Kísérleteink azt mutatják, hogy a konjugátumok *in vitro* tumorelles hatása jól korrelál az *in vivo* mérések adataival. Az *in vivo* toxicitás, valamint daganatnövekedést gátló hatás és különösen ezek egymáshoz viszonyított aránya (a terápiás ablak meghatározása) alkalmas az adott konjugátum hatékonyságának minősítésére. Kísérleteink arra is rámutattak, hogy az alkalmazott tumormodell jelentősen befolyásolhatja az eredményt. Egy gyorsan növekedő szubkután beültetett tumor (pl. a C-26 egér vastagbél tumor) alkalmas arra, hogy gyors, egyszerűen kiértékelhető eredményt kapjunk vegyületünk daganatnövekedést gátló hatásáról. Azonban így nem kaphatunk megfelelő információkat a metasztázis vagy az érképződés gátlására, és az eredmények nem feltétlenül adaptálhatóak a lassan növekedő és/vagy ortotopikus módon beültetett daganatok kezelésére. (1. kép, 1. táblázat)

Kísérleteink során sikerült egy az eddigieknél valóságosabb (klinikailag releváns) ortotopikus tumor állatmodellt kialakítanunk vastagbél xenograftok növesztése során, NSG nőtény egerekben. A sikeres műtéti eljárás és a megfelelő tumorok körüli

vaszkularizáció eredménye egy jól fejlődő, agresszív, metasztázisképzésre kifejezetten hajlamos ortotopikus tumor kialakulása, még a lassan növvő HT-29 humán vastagbél tumor esetén is. E modell segítségével sikerült valóban hatékony, az irányított tumorterápiában megfelelően alkalmazható hatóanyag-peptid konjugátumot kiválasztani.

Hasonlóan a klasszikus kemoterápiához, az irányított tumorterápiában is nagy valószínűséggel a kombinált kezelésekkel lehet majd jelentős áttörést elérni. Így például az általunk kifejlesztett GnRH-III[<sup>4</sup>Lys(Dau=Aoa),<sup>8</sup>Lys(Dau=Aoa)] konjugátum mellett szükséges lehet metasztázist gátló vegyületek alkalmazása, lehetőleg szintén célzott módon. Ezen vizsgálataink folyamatban vannak.

## KÖVETKEZTETÉS

Vizsgálataink igazolták, hogy a GnRH-III hormon peptid, – amely az emlősökben elhanyagolható mértékű endokrin aktivitással rendelkezik – alkalmas lehet a humán GnRH-I kiváltására az irányított tumorterápiában. Ez előnyös lehet a nem hormonfüggő tumorok, így a vastagbélrák célzott kezelésében is. Az oxim-kötésen keresztül kapcsolt GnRH-III-daunorubicin konjugátumok alacsony toxicitásuk miatt – bár nem daunorubicin, hanem annak származéka szabadul fel – a szabad daunorubicinnél alkalmasabb vegyületek lehetnek a daganatok gyógyítására. Az *in vitro* citosztázis/citotoxicitás vizsgálatok eredményei jól korrelálnak az *in vivo* mérések adataival, így azok alkalmasak a megfelelő hatékonyságú anyagok kiválasztására. Az irodalomban egyszerűsége miatt általánosan alkalmazott szubkután beültetett tumor modellek számos olyan anyagról is pozitív eredményt adnak, amelyek egy a természetes állapotot jobban közelítő ortotopikus modell esetén teljesen hatástalannak bizonyulnak. Ezért ezeket az eredményeket és azokat bemutató közleményeket megfelelő óvatossággal kell kezelni.

## IRODALOM

1. Baudino TA. Targeted cancer therapy: The next generation of cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol* 12:3–20, 2015
2. Adler MJ, Dimitrov DS. Therapeutic antibodies against cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 26:447–481, 2012
3. Sun GC, Yang XU, Yu Y, et al. The Applications of Targeting Anti-Cancer Agents in Cancer Therapeutic. *Anticancer Agents Med Chem* 15:869–880, 2015.

4. Mező G, Manea M. Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones. *Expert Opin Drug Deliv* 7:79–96, 2010
5. Engel J, Emons G, Pinski J, et al. AEZS-108: a targeted cytotoxic analog of LHRH for the treatment of cancers positive for LHRH receptors. *Expert Opin Investig Drugs* 21:891–899, 2012
6. Rékási Z, Szöke B, Nagy A, et al. Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs containing cytotoxic radicals on the function of rat pituitary cells: tests in a long term superfusion system. *Endocrinology* 132:1991–2000, 1993
7. Emons G, Sindermann H, Engel J, et al.. Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-targeted chemotherapy using AN-152. *Neuroendocrinology* 90:15–18, 2009
8. Nagy A, Plonowski A, Schally AV. Stability of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugate (AN-152) containing doxorubicin 14-O-hemiglutarate in mouse and human serum in vitro: implications for the design of preclinical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:829–834, 2000
9. Nagy A, Schally AV, Armatis P, et al. Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7269–7273, 1996
10. Manea M, Mező G. IGnRH-III -- a promising candidate for anticancer drug development. *Protein Pept Lett* 20:439–449, 2013
11. Lovas S, Pályi I, Vincze B, et al. Direct anticancer activity of gonadotropin-releasing hormone-III. *J Pept Res* 52:384–389, 1998
12. Herédi-Szabó K, Murphy RF, Lovas S. Is IGnRH-III the most potent GnRH analog containing only natural amino acids that specifically inhibits the growth of human breast cancer cells? *J Pept Sci*. 12:714–720, 2006
13. Mező G, Czajlik A, Manea M, et al. Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives. *Peptides* 28:806–820, 2007
14. Mező G, Manea M, Szabó I, et al. New derivatives of GnRH as potential anticancer therapeutic agents. *Curr Med Chem* 15:2366–2379, 2008
15. Kovács M, Vincze B, Horváth JE, et al. Structure-activity study on the LH- and FSH-releasing and anticancer effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-III analogs. *Peptides* 28:821–829, 2007
16. Mező I, Lovas S, Pályi I, et al. Synthesis of gonadotropin-releasing hormone III analogs. Structure-antitumor activity relationships. *J Med Chem* 40:3353–3358, 1997
17. Herédi-Szabó K, Lubke J, Toth G, et al. Importance of the central region of lamprey gonadotropin-releasing hormone III in the inhibition of breast cancer cell growth. *Peptides* 26:419–422, 2005.
18. Szabó I, Manea M, Orbán E, et al. Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing hormone-III conjugate as a potential anticancer drug. *Bioconjug Chem* 20:656–665, 2009
19. Schlage P, Mező G, Orbán E, et al. Anthracycline-GnRH derivative bioconjugates with different linkages: synthesis, in vitro drug release and cytostatic effect. *J Control Release* 156:170–178, 2011
20. Orbán E, Mező G, Schlage P, et al. In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino Acids* 41:469–483, 2011

- 21.** Hegedüs R, Manea M, Orbán E, et al. Enhanced cellular uptake and in vitro antitumor activity of short-chain fatty acid acylated daunorubicin-GnRH-III bioconjugates. *Eur J Med Chem* 56:155–165, 2012
- 22.** Leurs U, Mező G, Orbán E, et al. Design, synthesis, in vitro stability and cytostatic effect of multifunctional anticancer drug-bioconjugates containing GnRH-III as a targeting moiety. *Biopolymers* 98:1–10, 2012
- 23.** Leurs U, Lajkó E, Mező G, et al. GnRH-III based multifunctional drug delivery systems containing daunorubicin and methotrexate. *Eur J Med Chem* 52:173–183, 2012
- 24.** Manea M, Leurs U, Orbán E, et al. Enhanced enzymatic stability and antitumor activity of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates modified in position 4. *Bioconj Chem* 22:1320–1329, 2011
- 25.** Manea M, Tóvári J, Tejeda M, et al. In-vivo antitumour effect of daunorubicin-GnRH-III derivative conjugates on colon carcinoma-bearing mice. *Anticancer Drugs* 23:90–97, 2012



1. kép:

Azonos korú C-26 tumorok (a transzplantációt követő 13. napon). A) Szubkután transzplantált; B) Ortotopikus (vakbélre varrt)

1. táblázat

Az alkalmazott transzplantációs stratégiák jellemzése.

1. ábra:

A Zoptarelin Doxorubicin sematikus szerkezeti ábrája

2. ábra:

A kísérleteink során alkalmazott GnRH-III-Daunorubicin konjugátum és származék molekulái.

3. ábra:

Daunorubicin hatása egészséges NSG ♂ egerek testtömegére és túlélésére. Csoportonként 3-3 egér

4. ábra:

Dau-GnRH-III konjugátumok antitumor hatása C-26 daganatos Balb/C nőstény egereken, a primer tumort vizsgálva. Átlag  $\pm$  SD, Mann-Whitney teszt. A subcutan modellben csoportonként 7 egér volt.

5. ábra:

Dau-GnRH-III konjugátumok antitumor hatása orthotopikus HT-29 humán vastagbél modellen. Átlag  $\pm$  SD, Mann-Whitney teszt.

6. ábra

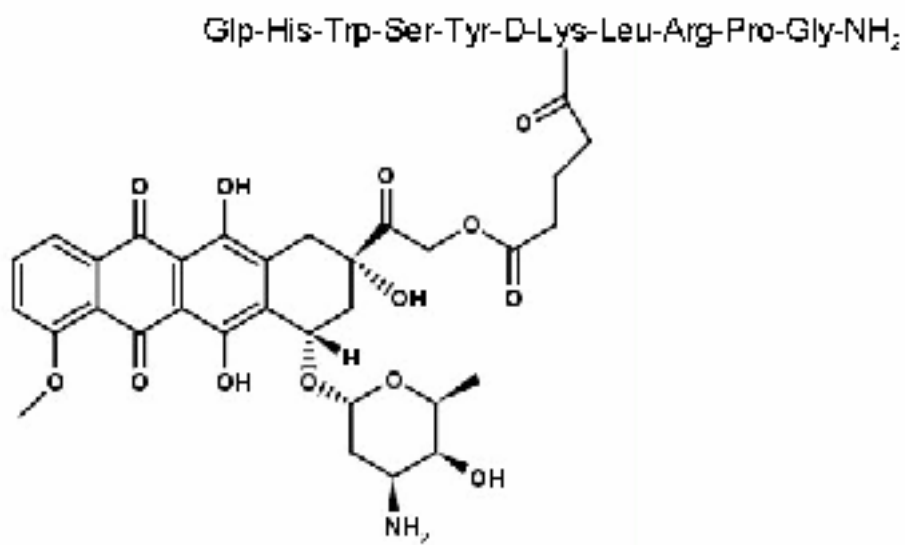
A HT-29 orthotopikus, primer daganatok osztódási rátái a kontroll csoporthoz képest. A proliferációs indexeket 2 különböző élő tumorból származó, 6 független mikroszkópos terület elemzésével határoztuk meg

7. ábra:

A HT-29 orthotopikus, primer daganatok vaszkularizációs mértéke. Átlag  $\pm$  SD, Mann-Whitney teszt. Szignifikancia értékek esetén a fekete a kontrollhoz képest, a piros a daunorubicinnel kezelt csoporthoz képest van megadva. A proliferációs indexeket 2 különböző élő tumorból származó, 4 független mikroszkópos terület elemzésével határoztuk meg



1. kép.



1. ábra

1. táblázat

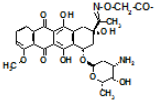
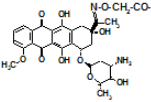
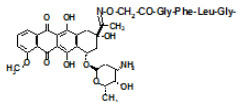
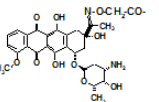
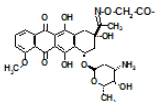
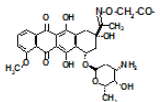
<b><i>In vivo</i> vastagbél tumor modellek összehasonlítása</b>		
<b>Tulajdonságok</b>	<b>Szubkután</b>	<b>Ortotopikus</b>
Mikrosebészeti képzettséget igényel	NEM	IGEN
Kapszula hatás: a tumor csak a kötőszövetes tokon belül fejlődik → <i>in situ carcinoma</i>	IGEN	NEM
Vaszkuarizáció	GYENGÉN	JÓL
Metasztázis	NEM	IGEN
Tolómérővel könnyen mérhető	IGEN	NEM

A konjugátumok alap szekvenciája:

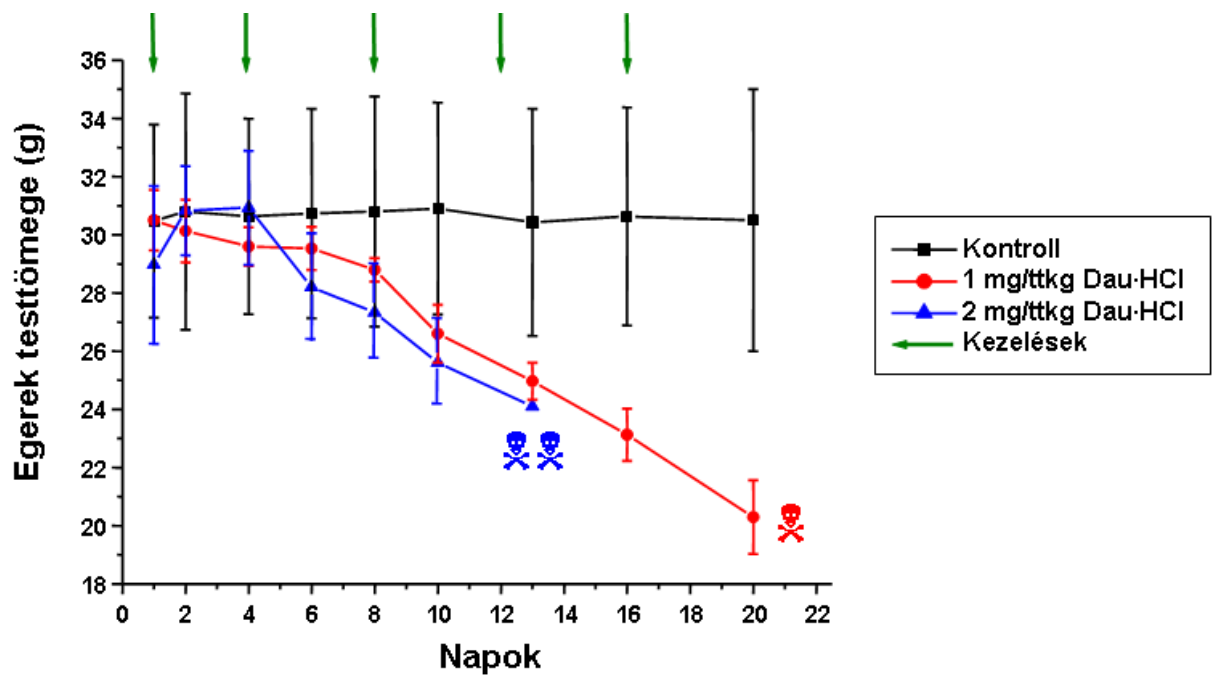
Glp-His-Trp-**AAA(X)**-His-Asp-Trp-Lys(**Y**)-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

A GnRH-III szekvenciája:

Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

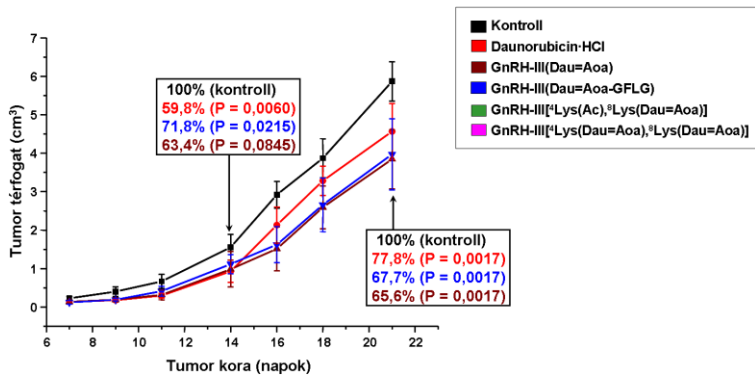
	GnRH-III(Dau=Aoa)	GnRH-II(Dau=Aoa-GFLG)	GnRH-III[*Lys(Dau=Aoa), <sup>3</sup> Lys(Dau=Aoa)]	GnRH-II[*Lys(Ac), <sup>2</sup> Lys(Dau=Aoa)]	GnRH-II[( <sup>4</sup> Lys(nBu), <sup>3</sup> Lys(Dau=Aoa)]
<b>AAA</b>	Szerin (Ser)	Szerin (Ser)	Lizin (Lys)	Lizin (Lys)	Lizin (Lys)
<b>X</b>				CH <sub>2</sub> -CO-	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-
<b>Y</b>					

2. ábra

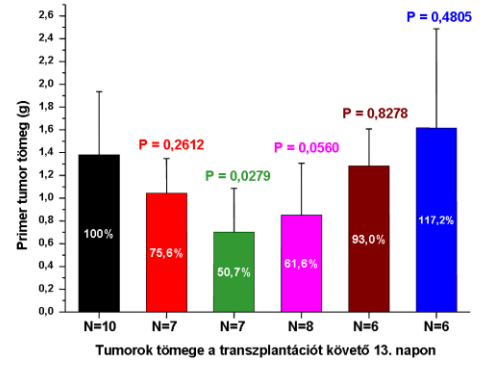


3. ábra

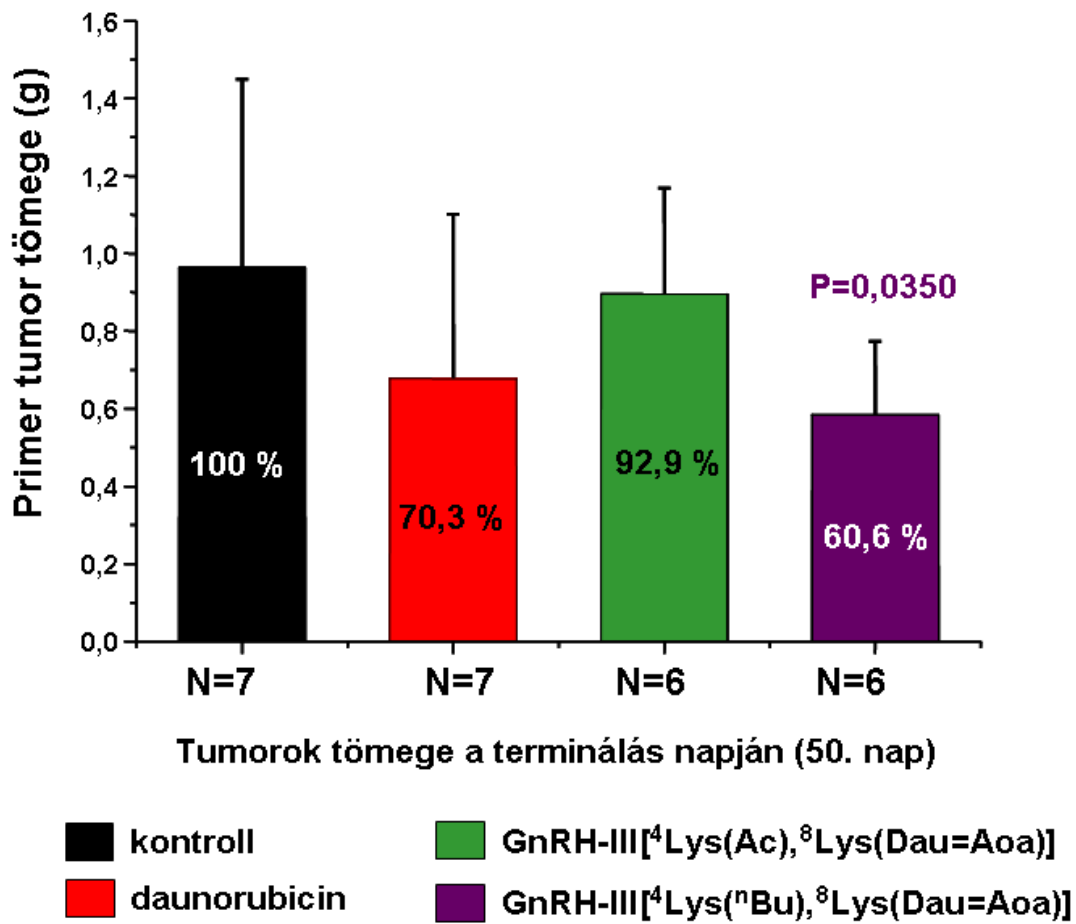
SZUBKUTÁN MODELL



ORTOTOPIKUS MODELL

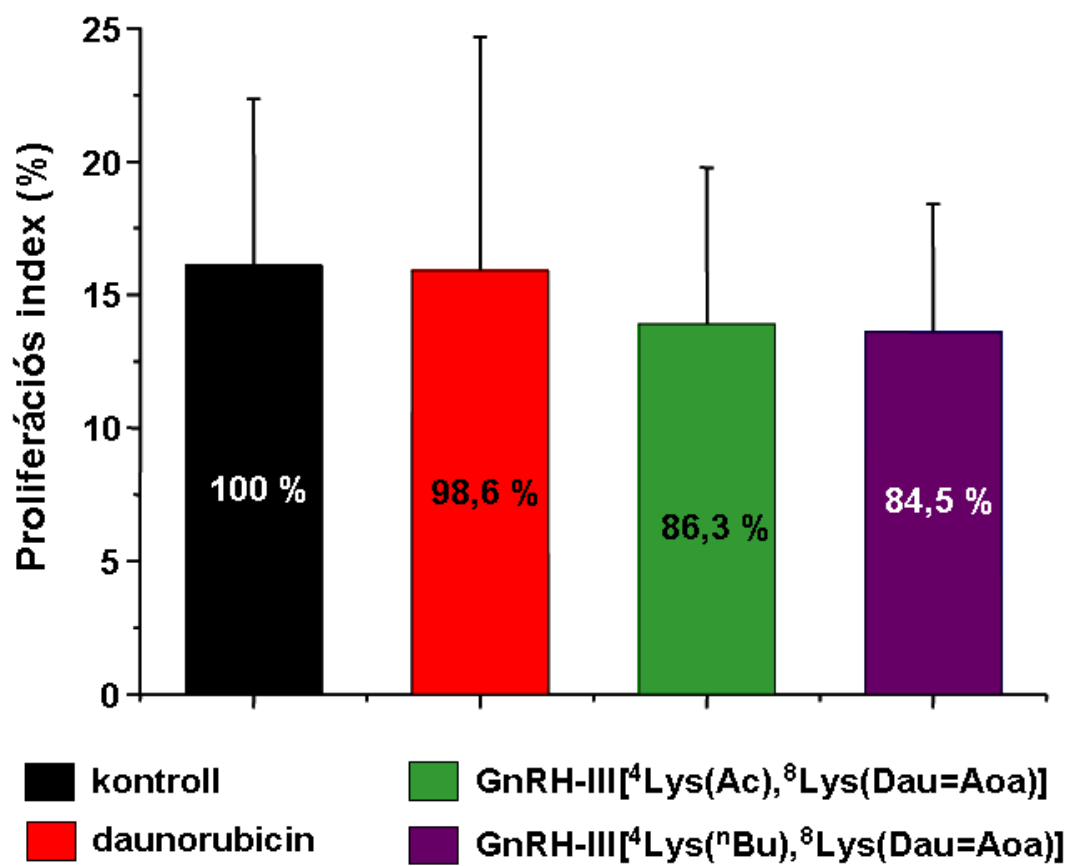


4. ábra

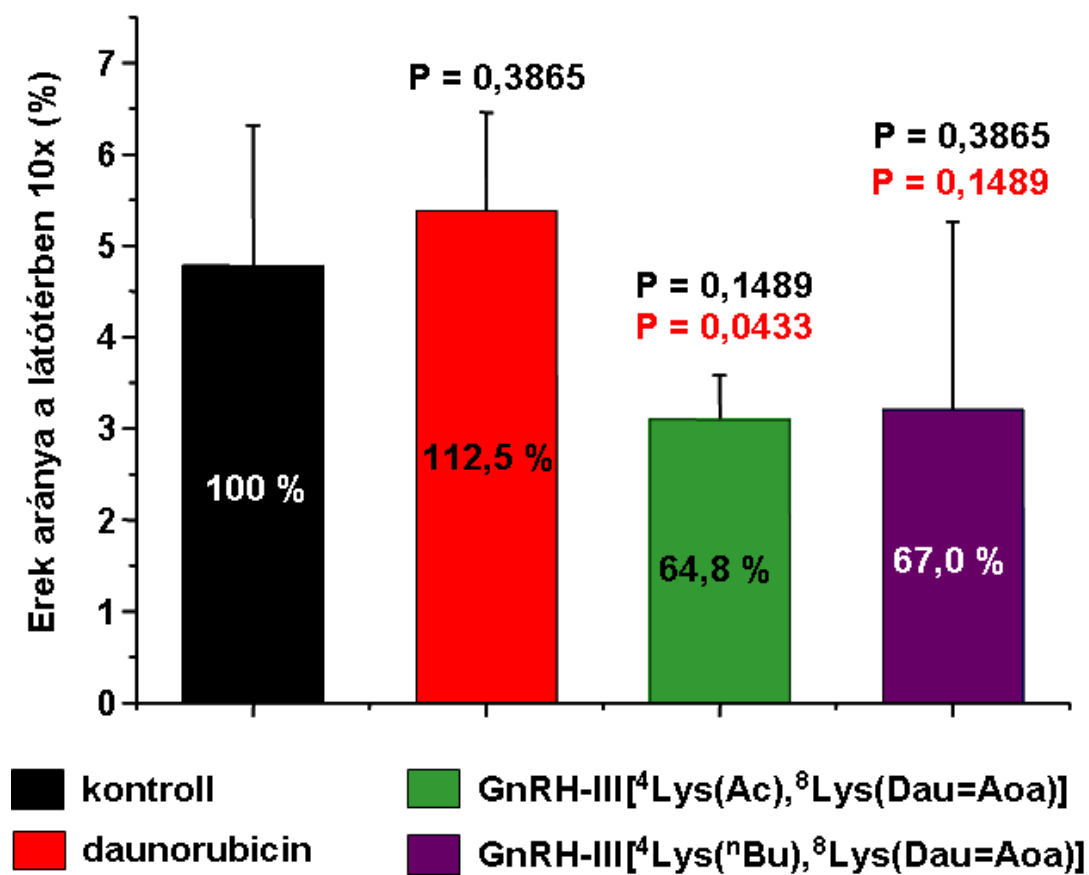


5. ábra





6. ábra



7. ábra