

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

Kapuvári Bence¹, Schulcz Ákos^{2†}, Hegedüs Rózsa³, Szabó Ildikó³, Manea Marilena⁴, Vincze Borbála¹, Tóvári József², Gacs Alexandra², Tejada Miguel², Gaál Dezső², Mező Gábor³

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

Vizsgálatainkat 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 kérték fel.

Az irányított/célzott tumorterápia nagyon perspektivikus eljárás a daganatok szelektív elpusztítására, ezáltal kiküszöbölhetőek vagy visszaszoríthatók a tumorelleses gyógyszerek mellékhatásai. Erre az eljárásra használhatók olyan konjugátumok, ahol a tumorelleses szer irányító molekulához (pl. peptidhormonok) van kapcsolva, melynek receptorai szelektíven csak a daganatsejteken jelennek meg, vagy azokon jóval nagyobb mennyiségben fordulnak elő, mint az egészséges sejteken. Az in vitro citosztatikus/citotoxicitás vizsgálatok általában nem nyújtanak elég információt arra nézve, hogy az előállított konjugátum hatékonyabb-e a szabad hatóanyagánál, 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 variánsai 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-tumor-modellt alkalmazni az irányított daganatterápiára előállított vegyületek szűrésére. Magyar Onkológia 59:310–318, 2015

Kulcsszavak: célzott tumorterápia, ortotopikus tumormodell, GnRH, daunorubicin, vastagbél-daganat

Targeted tumor therapy is a perspective procedure to specifically destroy the cancer tissues with eliminating or at least decreasing the side effects of anticancer drugs. For this purpose the 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 in vivo studies are adequate 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

Levelezési cím: Kapuvári Bence, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György utca 7–9.,
telefon: (36-1) 224-8781, fax: (36-1) 224-8681, e-mail: kapuvári.bence@oncol.hu

Közlésre érkezett: 2015. szeptember 20. • Elfogadva: 2015. október 15.

developed tumors. The 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 of the antitumor activity of the conjugates prepared for targeted tumor therapy.

Kapuvári B, Schulcz Á[†], Hegedüs R, Szabó I, Manea M, Vincze B, Tóvári J, Gacs A, Tejada M, Gaál D, Mező G. Studying the tumor growth inhibitory effect of modified GnRH-III-anthracycline bioconjugates in subcutaneous vs. orthotopic models *in vivo*. *Hungarian Oncology* 59:310–318, 2015

Keywords: targeted tumor therapy, orthotopical, GnRH, daunorubicin, colon cancer

BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések gyógyításában a sebészeti beavatkozás és a sugárterápia mellett legfontosabb kezelési mód a kemoterápia. Közismert azonban, 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 azokkal, hogy a kemoterápiás szerek nem vagy nem eléggé szelektívek, így nemcsak 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 (EGFR)], amelyekhez a tumor növekedéséhez szükséges növekedési faktorok kötődni tudnak (2). Ez az eljárás egyre szélesebb körben nyer alkalmazást a klinikai onkológiában – pl. cetuximab (EGFR-blokkoló), trastuzumab és pertuzumab (HER2-blokkoló) emlődaganat esetén – és része az úgynevezett személyre szabott terápiának. Az újabb kísérletekben hatóanyagok célba juttatására is alkalmazzák ezeket az ellenanyagokat (3).

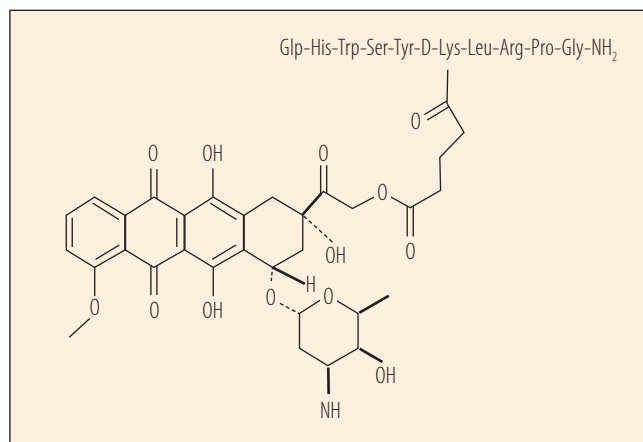
A másik lehetőség, hogy olyan tumorelles hatóanyagokat, melyek önmagukban nem szelektívek, és így kemoterápiás alkalmazásuk során számos mellékhatást váltanak

ki, irányító molekulákhoz kötnek a szelektivitás fokozása érdekében. Az irányító molekulák olyan vegyületek (pl. peptidhormonok), 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 receptorközvetített endocitózissal bejut a tumorsejtbe. A konjugátumból a szabad hatóanyag vagy annak aktív metabolitja a lizoszomális lebontó enzim 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 bővíthetik 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). A különféle tumorok (emlő, endometrium) esetén klinikai III-as fázisban lévő gyógyszerjelöltet, 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-NH₂, ahol a Glp = piroglutaminsav) egy glutársavvegyészen 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 peptidhormon 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 szig-

1. ábra. A zoptarelin doxorubicin sematikus szerkezeti ábrája



nifikáns mellékhatások nélkül (7). A vegyületnek azonban két gyenge pontja van. Az egyik, hogy az észterkötés 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 gyógyszerjelölthöz hasonló, de annak kedvezőtlen mellékhatásait kiküszöbölő GnRH-hatóanyag konjugátumokat állítson elő, és azok tumorelles 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-NH₂) peptidhormonra 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 proliferációgátló hatása van (11, 12). Ráadásul a molekula a 8-as helyzetben tartalmaz egy lizint (Lys), amelynek oldallánca felhasznál-

ható különböző módosításokra, így például dimerizációra és tumorelles hatóanyag kapcsolására (13, 14). Érdemes megjegyezni, hogy a lizin oldalláncaiban lévő aminosocport 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 oldalláncaiban 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 ún. oximkötés 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 aminosocporton keresztül a GnRH-analóghoz. Ez az eljárás a daunorubicin kapcsolására is módot ad, hiszen a daunorubicin pont az észterkötés kialakításához szükséges hidroxilcsoport hiányában tér el a doxorubicintól (19). Vizsgálataink azt mutatták, hogy az oximkötésből a szabad hatóanyag nem szabadul fel a lizoszómákban, hanem egy olyan kis metabolit képződik, amelyben a hatóanyag az aminosocport részletén keresztül ahhoz az aminosavhoz kapcsolódik, amely aminosocporttal 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* citosztázisvizsgálatok 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 (daunorubicin vagy metotrexát) konjugáltunk (22, 23). Érdemes 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 receptorkötődésre 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 toxicitási vizsgálat daunorubicinnel

Ivarérett, 26–30 g-os hím NSG egereket használtunk a krónikus toxicitási vizsgálatra.

A daunorubicint (Dau) desztillált vízben feloldottuk. Két különböző koncentrációt alkalmaztunk az előzetes tapasztal-

2. ábra. A kísérleteink során alkalmazott GnRH-III-daunorubicin konjugátum és származék molekulái

A konjugátumok alapszekvenciája:

Glp-His-Trp-AAA(X)-His-As-p-Trp-Lys(Y)-Pro-Gly-NH₂

A GnRH-III szekvenciája:

Glp-His-Trp-Ser-His-As-p-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

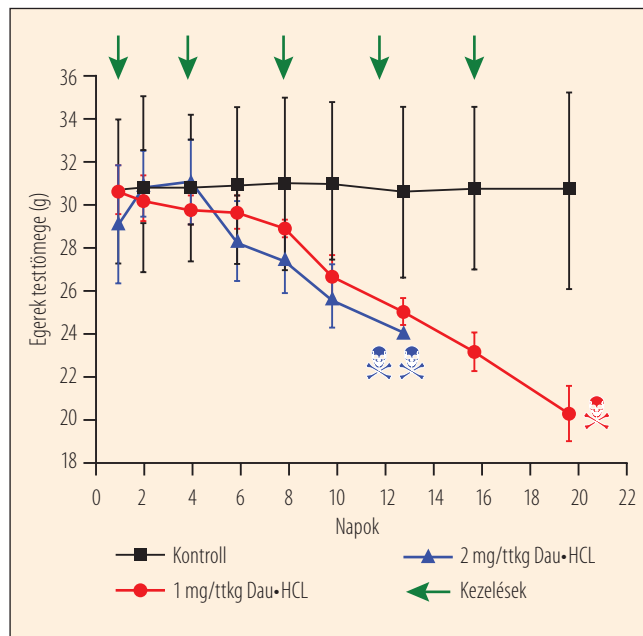
	GnRH-III(Dau=Aoa)	GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)	GnRH-III[² Lys(Dau=Aoa), ³ Lys(Dau=Aoa)]	GnRH-III[² Lys(Ac), ³ Lys(Dau=Aoa)]	GnRH-III[² Lys(Bu), ³ Lys(Dau=Aoa)]
AAA	Szerin (Ser)	Szerin (Ser)	Lizin (Lys)	Lizin (Lys)	Lizin (Lys)
X				CH ₂ -CO-	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CO-
Y					

talataink alapján: 1 mg/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 (*ip.*) 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/cBy): McDowell által 1923-ban kitenyésztett hagyományos egérmódel. Olcsó, teljes immunrendszerrel rendelkező egértörzs, mely nem igényel steril körülménye-

3. ábra. Daunorubicin hatása egészséges hím NSG egerek testtömegére és túlélésére (csoportonként 3-3 egér)



ket, ugyanakkor a humán xenograftok kilökődnek belőle. A besugárzásra érzékeny, ezért immunrendszere könnyen kiirtható. Legfőbb kísérleti előnye, hogy ebben az egértörzsben jelent meg a C26 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 II2rgtm1Wjl/SzJ): humán xenograftok beültetésére ideális egértörzs, az egyik legsokoldalúbb modellállat. Előnyei közé tartozik, hogy fenotípusa stabil, nincs funkcionális B- és T-sejtje, nincs NK-sejt- (természetes ölüsejt) aktivitása, humanizálható (érett emberi nyirok- és mieloid sejtek tarthatók benne).

Az immunhiányos NSG egereket CB-17 háttérrel tenyésztették ki. Specifikus, opportunisták és patogén kórokozóktól mentes (S.O.P.F = Specific and Opportunistic Pathogen Free) tenyésztőszobákban tartottuk az egereket. Az egerek gondozása, tartása és használata minden esetben a „Helsinki Nyilatkozat” vezérelve szerint és a helyi etikai bizottság jóváhagyásával történt. Állatkísérleti engedély száma: 22.1/722/3/2010.

Alkalmazott tumorok, xenograftok

C26 egér vastagbél-karcinóma: gyorsan növekvő invazív, metasztatizálásra hajlamos, GnRH-receptor-pozitív tumor. HT29 humán vastagbélrák-xenograft: GnRH-receptor-pozitív.

Szubkután (sc.) modell

A C26 tumordarabokat (SRI, Birmingham, AL) (3-4 mm³) 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” előállítása ortotopikus vastagbélmodellhez

Az ortotopikus modellhez szükséges anyatumort szintén szubkután állítottuk elő, mert így egy viszonylag homogén szövethalmazt kaptunk, amit sok azonos szöveti struktúrájú darabra vághattunk. C26 esetén már rendelkezünk kész tumorrall.

HT29 humán vastagbél tumor (GnRH-receptor-pozitív) esetén minden egerbe 100 μ l extracelluláris mátrix géllal (ECM-gél, matri-gél) elegyített 10^6 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 μ l tömény nembutál) és jódos lefertőtlenítését követően – kivágtuk. Az így kapott anyatumort fiziológiás sóoldatban áztatva 2–3 mm³-es darabokra vágtuk és beültettük az ortotopikus modellbe (25).

Ortotopikus vastagbélmodell és tumortranszplantáció

Az állatokat intraperitoneálisan (*ip.*) 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, mikrocsepes segítségével a vakbél fején a szerózaréteget kb. 1 mm-es hosszban feltéptük, ügyelve arra, hogy az alatta fekvő izomréteg ne sérüljön. Ezután 2 mm³-es (anyatumorból származó) C26, illetve HT29 tumordarabot 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 izom-bőr sebet 4/0-ás poliglikolsav fonál segítségével csomós öltéssel egy rétegben zártuk.

Az egerek a műtétet követően *sc.* 0,5 ml, 5% glükózt és 100 mg/kg algopirint tartalmazó Ringer-oldatot kaptak posztoperatív fájdalomcsillapítás, rehidratálás és energia-pótlás céljából. Másnap az állatok nem mutattak fájdalomra, szenvedésre, stresszre utaló jeleket. A műtét halálozás 2% volt.

Amikor a kontrollcsoport állatai az elhulláshoz közeli állapotot mutattak (apátia, minimális mozgás, evés, ivás hiánya, nem reagálnak a külső ingerekre stb.), befejeztük a kísérletet, és az összes egeret túlaltatással (300 μ l 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 C26 szubkután és ortotopikus modellben

Szubkután modell: Csoportonként 7–7 egeret alkalmaztunk. A konjugátumok esetén 1,36 μ mol/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 modell: 10 db kontrolleget és csoportonként 7–7 egeret használtunk. A konjugátumok esetén 0,68 μ mol/egér/injektálás (15, ill. 30 mg/ttkg Dau-tartalom), szabad daunorubicin esetén 2 mg/ttkg. A három plusz kontrolleget 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 tumortranszplantációt követő 4, 7. napon *ip.*, az oldószer desztillált víz volt (24, 25).

Dózis és kezelés HT29 ortotopikus modellben

Szabad daunorubicin esetén *iv.* 1 mg/ttkg hetente egyszer, összesen 7 alkalommal. Konjugátumok esetén: a tumortranszplantációt követő 5. naptól heti két alkalommal. Az első négy kezelést intravénásan (*iv.*) végeztük 15 mg/ttkg dózisban Dau-tartalomra vonatkoztatva. Az ötödik kezelés már *ip.* történt, 15 mg/ttkg dózisban Dau-tartalomra vonatkoztatva. Az első öt kezelés dózisbeállító beavatkozás, a többi már csak szinten tartó. Hatodik kezeléstől a 13.-ig: *ip.* 7,5 mg/ttkg Dau-tartalomra vonatkoztatva, plusz 5%-nak megfelelő glükóz hozzáadásával, a trifluor-ecetsav sói szövetromboló hatásának enyhítésére.

A terminálásra a transzplantációt követő 50. napon került sor.

Statisztikai elemzés

A kísérletek statisztikai analízisét a Medcalc® v. 12.1.3.0. (Mariakerke, Belgium) program felhasználásával végeztük. Az adatok normáeloszlását Chi²-próbával ellenőriztük. A kiszóró pontokat Gauss-féle g-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 szövetszövetmintákat etanol oldatsorozattal fokozatosan dehidratáltuk, majd xilollal átítattuk és paraffinba ágyasztuk. A szövettani metszeteket Harris-féle hematoxilin-eozinos 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 HT29 tumorszövetben

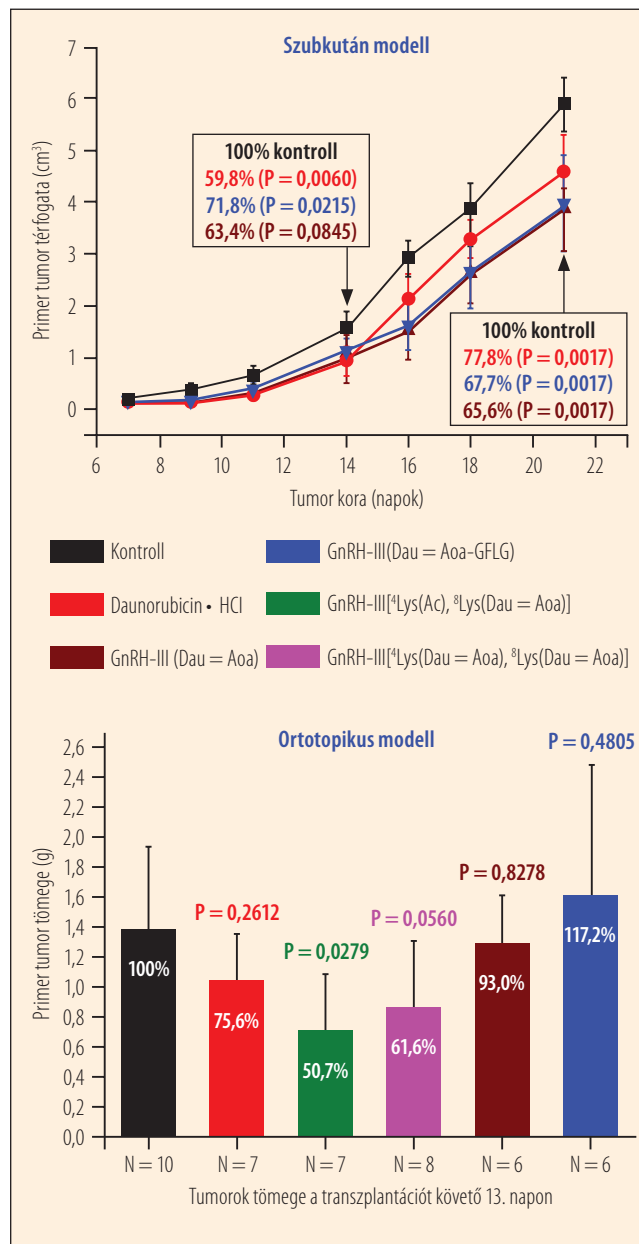
30 perccel az egerek terminálása előtt az állatoknak *ip.* 5-bróm-2'-dezoxi-uridint (BrdU, 200 mg/ttkg, Sigma-Aldrich Kft., Budapest) adtunk. 6 óra elteltével 5–7 μ m vastagságú metszeteket készítettünk a frissen fagyasztott tumorból, majd a szövet BrdU-pozitív sejtjeit anti-BrdU monoklonális antitesttel (Becton Dickinson Hungary Kft., Budapest) reagáltattuk a gyártó protokollja szerint. A pozitív sejtet TRITC-konjugált anti-egér IgG-vel (1:100, Sigma) tettük láthatóvá. A tumorsejtet az endoteliális sejtetektől úgy különítettük el, hogy a mintákat patkány anti-egér CD31 antitesttel kezeltük, majd biotinizált 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 HT29 sejtek számát és a CD31-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 endotéliuszövetek hány százalékot fednek le egy 10-szeres nagyítású látómezőben (25).

EREDMÉNYEK

Akut toxicitás és dózisok beállítása

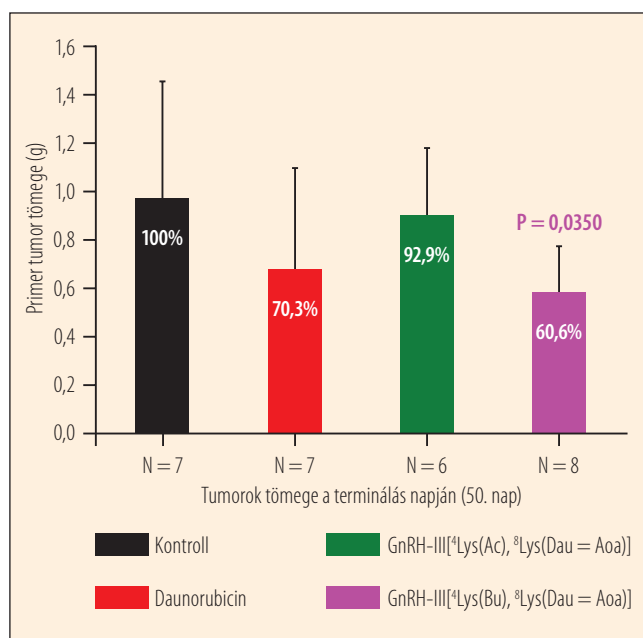
Az akut toxicitási vizsgálatok egészséges nőstény BDF-1 egereken azt mutatták, hogy a szabad daunorubicin (Dau) maximálisan tolerált dózisa többszöri kezelés esetén 2 mg/ttkg. Ugyanakkor az alkalmazott konjugátumok [GnRH-III(Dau=Aoa) és GnRH-III(Dau=Aoa-GFLG)] még 30 mg/ttkg Dau-t tartalmazó koncentrációban sem mutattak toxikus mellékhatást. Ez többszöröse az alkalmazni kívánt dózisonak, így az immunszupprimált NGS egereken már csak a Dau alkalmazható dózist 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 C26 tumorral transzplantált Balb/C egereken 2 mg/ttkg (a tumorbeültetést követő 4. és 7. napon), míg a HT29 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-t tartalmazó konjugátum esetén az ortotopikus kezeléskor) daunorubicint tartalmazó dó-

4. ábra. Dau-GnRH-III konjugátumok tumorellenes hatása C26 daganatos nőstény Balb/C egereken, a primer tumort vizsgálva. Átlag \pm SD, Mann-Whitney-teszt. A szubkután modellben csoportonként 7 egér volt



zist, 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.

5. ábra. Dau-GnRH-III konjugátumok tumorelles hatása ortotopikus HT29 humán vastagbélrákmodellben. Átlag±SD, Mann–Whitney-teszt



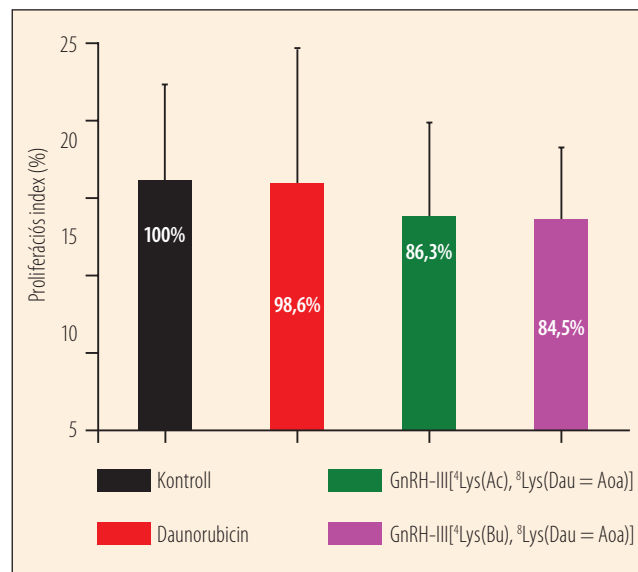
Tumornövekedést gátló hatás vizsgálata különböző modellekben

A GnRH-III[Dau=Aoa] és GnRH-III[Dau=Aoa-GFLG] bio-konjugátumok a kontrollhoz képest a szubkután C26 modellben 34,5%-kal ($P=0,0017$), illetve 32,3%-kal ($P=0,0017$) csökkentették a primer tumor térfogatát, két kezelést követően a 21. napon mérve. Ez jelentősen meghaladta a megengedett dózisban alkalmazott szabad Dau hatékonyságát (22,2%; $P=0,2612$). Ugyanakkor az ortotopikus C26-kísérletek során a konjugátumok nem mutattak primertumor-növekedést gátló hatást. Ezzel szemben a szabad hatóanyag ilyen körülmények között is 24,4% tumornövekedést gátló hatást mutatott a kontrollhoz képest. Az ortotopikus C26-kísérletekbe bevontunk két továbbfejlesztett konjugátumot is. Mindkét esetben a GnRH-III 4-es pozíciójában lévő szerint lizinre cseréltük, és az így létrejövő újabb aminosoport (konjugációs hely) acetilezésével vagy egy újabb molekula daunorubicin kapcsolásával alakítottunk ki új, hatékonyabb analógokat. A GnRH-III[⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)] és GnRH-III[⁴Lys(Dau=Aoa), ⁸Lys(Dau=Aoa)] származékok az ortotopikus C26 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).

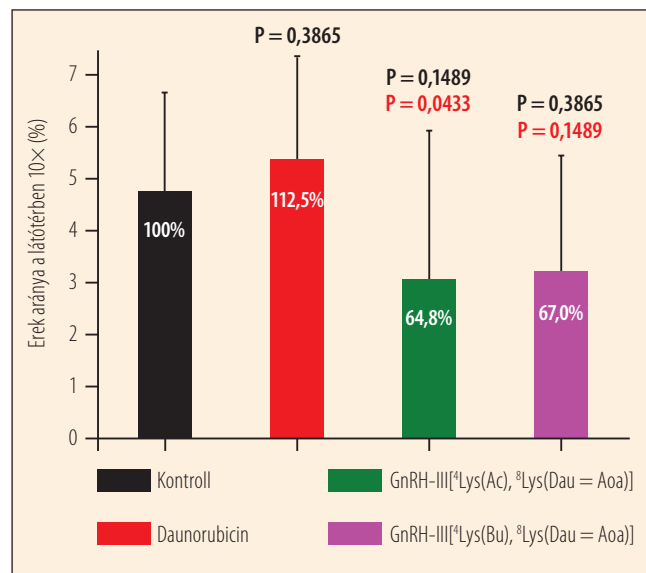
Ezeket az eredményeket figyelembe véve a leghatékonyabb konjugátumot (GnRH-III[⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)]) vittük tovább az ortotopikusan beültetett HT29 tumort tartalmazó NSG egereken végzett vizsgálatokra. Időközben az *in vitro* citosztázisvizsgálatok azt mutatták, hogy az acetilcsoport cseréje butirilcsoportra a 4-es pozícióban lévő lizinen tovább növeli a konjugátum tumorelles hatását. Így ezt a vegyületet is felvettük ebbe a kísérletbe. A GnRH-III[⁴Lys(Bu), ⁸Lys(Dau=Aoa)] szignifikánsan ($P=0,0350$), 39,4%-ban gátolta az ortotopikus HT29 primer daganatok növekedését nőstény NSG egerekben; ugyanakkor a GnRH-III[⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)] nem a várt eredményt produkálta: csak 7,1% gátlást eredményezett a kontrollhoz képest (4 iniciáló és 8 fenntartó kezelés után az 50. napon). A szabad Dau megengedett heti egyszeri 1 mg/ttkg dózisban végzett kezelésével a tumornövekedés gátlása csak 29,7%-os volt (5. ábra).

Az ortotopikus HT29 tumorok esetén az osztódási ráták (proliférációs 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 egy esetben szignifikáns) csökkenést tapasztaltunk mind a kontrollcsoporthoz, mind a daunorubicinnel kezelt csoporthoz képest (7. ábra). Ugyanakkor egyetlen anyag sem mutatott metasztázisgátlást egyik ortotopikus modell esetén sem.

6. ábra. Az ortotopikus HT29 primer daganatok osztódási rátája a kontrollcsoporthoz képest. A proliferációs indexeket 2 különböző élő tumorból származó, 6 független mikroszkópos terület elemzésével határoztuk meg



7. ábra. Az ortotopikus HT29 primer daganatok vaszkularizációs mértéke. Átlag \pm SD, Mann–Whitney-teszt. Szignifikanciaértékek 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 mikroszkopos terület elemzésével határoztuk meg



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 receptorközvetített 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 „multidrugrezisztens” 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 C26 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 érzékelődés gátlására, és az eredmények nem feltétlenül adaptálhatóak a lassan növekedő és/vagy ortotopikus módon beültetett daganatok kezelésére (8. ábra, 1. táblázat).

Kísérleteink során sikerült egy az eddigieknél valószínűbb (klinikailag releváns) ortotopikus tumor állatmodellt kialakítanunk vastagbélrák-xenograftok növesztése során, nőstény NSG 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 növekvő HT29 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[*Lys(Dau=Aoa),⁸Lys(Dau=Aoa)] konjugátum mellett szükséges lehet metasztázist gátló vegyületek alkalmazása, lehetőleg szintén célzott módon. E vizsgálataink folyamatban vannak.

8. ábra. Azonos korú C26 tumorok (a transzplantációt követő 13. napon). a) Szubkután transzplantált; b) ortotopikus (vakbélre varrt)



1. táblázat. Az alkalmazott transzplantációs stratégiák jellemzése

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

KÖVETKEZTETÉS

Vizsgálataink igazolták, hogy a GnRH-III peptidhormon – 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 oximkötésen keresztül kapcsolt GnRH-III-daunorubicin konjugátumok alacsony toxicitásuk miatt – bár nem daunorubicin, hanem annak származéka szabaddul 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 tumormodellek 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 az azokat bemutató közleményeket megfelelő óvatossággal kell kezelni.

IRODALOM

- Baudino TA. Targeted cancer therapy: The next generation of cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol* 12:3–20, 2015
- Adler MJ, Dimitrov DS. Therapeutic antibodies against cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 26:447–481, 2012
- 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
- Mező G, Manea M. Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones. *Expert Opin Drug Deliv* 7:79–96, 2010
- 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
- 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
- Emons G, Sindermann H, Engel J, et al. Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-targeted chemotherapy using AN-152. *Neuroendocrinology* 90:15–18, 2009
- 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
- Nagy A, Schally AV, Armatis P, et al. Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolino-doxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7269–7273, 1996
- Manea M, Mező G. lGnRH-III – a promising candidate for anticancer drug development. *Protein Pept Lett* 20:439–449, 2013
- Lovas S, Pályi I, Vincze B, et al. Direct anticancer activity of gonadotropin-releasing hormone-III. *J Pept Res* 52:384–389, 1998
- Herédi-Szabó K, Murphy RF, Lovas S. Is lGnRH-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
- 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
- Mező G, Manea M, Szabó I, et al. New derivatives of GnRH as potential anticancer therapeutic agents. *Curr Med Chem* 15:2366–2379, 2008
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Manea M, Leurs U, Orbán E, et al. Enhanced enzymatic stability and antitumor activity of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates modified in position 4. *Bioconjug Chem* 22:1320–1329, 2011
- Manea M, Tóvári J, Tejada M, et al. In-vivo antitumor effect of daunorubicin-GnRH-III derivative conjugates on colon carcinoma-bearing mice. *Anticancer Drugs* 23:90–97, 2012