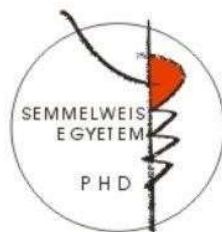


FITC-el jelölt és crizotinibbel konjugált GnRH analógok
előállítás, vizsgálata és jelentősége a célzott
daganatterápiában

Doktori tézisek

Murányi József

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Vántus Tibor, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Kéri György[†], D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Mészáros György, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szabó Ildikó, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság

elnöke: Dr. Török Tamás, D.Sc., professor emeritus
tagjai: Dr. Klebovics Imre, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Bánóczy Zoltán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2018

1. Bevezetés

A daganatok gyógyszeres kezelésének intenzíven fejlődő ága a személyre szabott jelátviteli terápia. Az engedélyezett kismolekulás kináz inhibitorok több szempontból előnyösebbek, mint a hagyományos kemoterápiás szerek, azonban továbbra is általános problémát jelent korlátozott szelektivitásuk, az ezzel összefüggő súlyos mellékhatásaik, és a hatásmechanizmusukból adódó gyorsabban kialakuló rezisztencia.

A crizotinib a jelátviteli terápiában alkalmazott daganatellenes hatóanyag. Eredetileg c-Met gátlónak lett kifejlesztve, azonban több támadáspontú inhibitoroként történő alkalmazása jelenleg az ALK, vagy a ROS-1 pozitív, előrehaladott tüdőrákokra korlátozódik. A crizotinib daganatsejt-célzott bejuttatását elsősorban a súlyos mellékhatásai teszik indokolttá, de szelektivitásának növelése a jövőbeli kombinációs terápiában történő alkalmazását is elősegítheti.

A daganatterápiás-célú hatóanyag-szállító rendszerek között a GnRH analógok jelentősége kimagasló, ugyanis egyszerre lehetnek hatóanyag-hordozó és irányító vegyületek. Célzott bejuttatásukat a daganatsejtek esetén gyakran előforduló, fokozott GnRH-R expresszió teszi lehetővé. A GnRH-R expresszáló daganatok esetén a szintetikus GnRH analógok közvetlen daganatellenes hatása további terápiás előnyt biztosít.

Meglepő azonban, hogy a GnRH analógok által a különféle tumorsejt-típusokba bejuttatható hatóanyagok mennyiségére fókuszáló kísérletek alig találhatóak a szakirodalomban. A GnRH analógok fluoreszcens jelölése racionális lehetőséget nyújt a GnRH-R-célzott hatóanyag-bejuttatás vizsgálatára, eredményességének predikciójára *in vitro*. Ennek ellenére, az erősen citotoxikus hatású antraciklin-származékokat tartalmazó GnRH konjugátumokon kívül, további fluoreszcensen detektálható GnRH analógokról nem találtam irodalmi adatot.

Ezzel összefüggésben, a kutatómunkámban bemutatott daganatellenes célú crizotinib-GnRH konjugátumok megtervezése és vizsgálata során komoly kihívást jelentett, hogy még számos megválaszolatlan kérdés jellemzi a GnRH-R-célzott hatóanyag-bejuttatást. A lehetséges buktatókra hívja fel a figyelmet, hogy az ígéretes preklinikai eredmények ellenére még egyetlen daganatellenes GnRH konjugátum sem kapott klinikai engedélyt. A GnRH-alapú hatóanyag-szállító rendszerekre jellemző korlátozott szakirodalmi háttér és az ebből adódó bizonytalanságok a disszertációmban bemutatott kutatómunka felépítésében is stratégiai jelentőséggel bírtak.

2. Célkitűzések

Kutatómunkám során a GnRH-R-célzott daganatterápia alkalmazásának lehetőségeit tanulmányoztam. A fluoreszcensen jelölt GnRH analógok előállítása és vizsgálata elsősorban a GnRH-R célzott terápiás hatékonyság predikciójára irányult *in vitro* daganatmodelleken.

Kutatómunkám során kitűzött célok:

1. **A hatóanyag-szállító vegyületeként alkalmazható D-Lys⁶-GnRH-I, D-Lys⁶-GnRH-II és GnRH-III analógok jelölése fluoreszcein-izotiocianáttal.**
2. **Az előállított FITC-GnRH konjugátumok fizikai-kémiai paramétereinek karakterizálása.**
3. **A FITC-GnRH konjugátumok lokalizációjának és mennyiségének vizsgálata *in vitro* daganatmodelleken.**

A crizotinib daganatellenes hatásmechanizmusának és a GnRH-irányított hatóanyag-bejuttatás terápiás előnyének az ötvözése érdekében, további kutatómunkám során crizotinib-GnRH konjugátumok előállításával és *in vitro* vizsgálatával foglalkoztam.

Kutatómunkám során kitűzött további célok:

4. **GnRH konjugátumok előállítására alkalmas crizotinib analógok előállítása.**
5. **Az előállított crizotinib analógok fizikai-kémiai paramétereinek karakterizálása és vizsgálata *in vitro* daganatmodellen.**
6. **A legígéretesebb crizotinib analógokból daganatellenes GnRH konjugátumok előállítása, különféle összekötő-egységek és kötéstípusok alkalmazásával.**
7. **Az előállított crizotinib-GnRH konjugátumok fizikai-kémiai paramétereinek karakterizálása, vizsgálata *in vitro* daganatmodellen, és hatékonyságának értékelése a FITC-GnRH konjugátumok eredményeivel összevetve.**

3. Módszerek

Analitikai módszerek

A szerves kémiai szintézisek követésére, a termékek tisztaságának mérésére és esetleges tisztítására, valamint oldhatósági-, stabilitási- és permeabilitási vizsgálatok céljából nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmaztam. Az analitikai célú HPLC vizsgálatokra 3 különböző elválasztási módszert fejlesztettem ki. A minták koncentrációjának meghatározása külső standard módszerrel történt.

Egyes reakciók, illetve oszlopkromatográfiás tisztítások követésére vékonyréteg-kromatográfiás elválasztást alkalmaztam.

A szerkezetigazolásra tömegspektrometriát, illetve NMR spektrometriát alkalmaztunk. A szerkezetigazolási vizsgálatok az ELTE Analitikai Kémiai Tanszék, az SE Gyógyszerészeti Intézet és a Vichem Chemie Kutató Kft. közreműködésével történtek.

Szintézisek

A crizotinib és crizotinib analógok előállítása során klasszikus szerves kémiai módszerekkel dolgoztam. A crizotinib totálszintézis egyes lépéseit szakirodalmi források alapján reprodukáltam, a további lépéseket a GnRH-val történő konjugálás érdekében módosítottam. A totálszintézis módosítása új, szelektíven Boc-védett crizotinib analógok előállítását is lehetővé tette. A szintézismódszerek leírását terjedelmi okokból a tézisfüzet nem tartalmazza.

A D-Lys⁶-GnRH-I, D-Lys⁶-GnRH-II és GnRH-III analógok előállítását szilárd fázisú peptidszintézissel, manuálisan, Fmoc-módszerrel végeztem. Az aminosav-származékok megfelelő kapcsolódását Kaiser-teszttel ellenőriztem.

A GnRH analógok fluoreszcens jelölését, illetve a crizotinib analógok konjugálását a peptidlánc felépítése, majd a Lys és a D-Lys oldalláncán található ivDde, illetve alloc védőcsoportok szelektív eltávolítása után végeztem el. A fluoreszcens jelölésre FITC-et (fluorescein-izotiocianát) alkalmaztam. A crizotinib-GnRH konjugátumok előállítása során, az adott crizotinib analóg szelektíven Boc-védett és összekötőegységgel ellátott származékát használtam fel.

A GnRH analógok és konjugátumok feldolgozása során trifluoecetsav-alapú hasítóelegyet alkalmaztam, mely a gyantáról történő hasítás mellett a további védőcsoportokat is eltávolította. A nyerstermékeket preparatív HPLC-vel tisztítottam, végül liofilizáltam.

Sejtkultúrák

A kísérletek során használt sejtvonalakat a JRCB, illetve az ATCC által ajánlott, 10% FBS-el és antibiotikummal kiegészített sejtenyészítő médiumban, párasított inkubátorban, 5% CO₂ atmoszféra alatt, 37°C-on tartottuk fent.

ADME-Tox vizsgálatok

Az oldhatóságot PBS-ben 25°C-on, vagy szérumentes RPMI sejtenyészítő médiumban 37°C-on mértem. 10 mM koncentrációjú DMSO törzsoldatokból 200 µM elméleti koncentrációjú oldatokat készítettem, majd 2 óra inkubálást követően a mintákat kétszer centrifugáltam (13000 g, 10 perc). A felülúszóból kivett mintákat HPLC-vel mértem.

A membrán-permeabilitás vizsgálatára PAMPA és MDCK módszereket alkalmaztam. A PAMPA mérés során mesterséges membrán-alapú rendszert (BD Gentest™) használtam. 40 µM elméleti koncentrációjú PBS oldatokkal (pH=7,4) dolgoztam. A rendszert enyhe kevertetés mellett, 25°C-on, 5 órán keresztül inkubáltam. A pH-függő permeabilitás vizsgálata esetén 4,8; 6,0; 7,4 és 8,5 pH értékekre beállított pufferoldatokat alkalmaztam. A detektálás UV-Vis spektrofotométerrel történt.

Az MDCK módszer esetén a permeabilitást MDCK (kutya vese epitél) sejtekből növesztett sejtrétegen mértem. A sejteket Corning® Transwell® lemezen a teljes konfluenciaszint eléréséig növesztettük. A konfluens sejtréteg kialakulását impedancia méréssel ellenőriztem. 10 µM elméleti koncentrációjú HBSS oldatokkal (pH=7,4) dolgoztam. A rendszert enyhe kevertetés mellett, 25°C-on, 1 órán keresztül inkubáltam. Az MDCK mérés esetén mind az apikális-bazális, mind pedig a bazális-apikális irányú transzport vizsgáltam. A detektálásra HPLC-t alkalmaztam.

A stabilitást 10% FBS-t tartalmazó RPMI sejtenyészítő médiumban mértem. A DMSO törzsoldatokból 10 µM koncentrációjú oldatokat készítettem. A mintákat 37°C-on, 2, 6 és 24 órán keresztül inkubáltam. Az inkubálás lejártával a mintákhoz

a médium térfogatával megegyező mennyiségű acetonitrilt adtam. A mintákat kémcsőrázóval homogenizáltam, majd kétszer centrifugáltam (13000 g, 10 perc). A felülúszóból kivett mintákat HPLC-vel analizáltam.

A patkány májsejtek lizoszóma preparátumában elvégezett stabilitás vizsgálat az ELTE Analitikai Kémiai Tanszék közreműködésével történt.

A c-Met fehérje *in vitro* gátlásának vizsgálata a ProQinase GmbH (Freiburg, Németország) és a Vichem Chemie Kft. (Budapest, Magyarország) közreműködésével történt.

Western blot

A GnRH-R-kötődés vizsgálat esetén a GnRH konjugátumokkal 1 μM koncentrációban 15 percig kezelt sejteket, a GnRH-R fehérje kimutatása esetén pedig a kezeletlen sejtek lizáltuk. A fehérjekoncentrációt Bradford-módszerrel határoztuk meg. A 20-40 μg fehérjét tartalmazó mintákat SDS-tartalmú poliakrilamid gélen gélelektroforézissel futtatunk, majd PVDF membránokra transzferáltuk. A vizsgált fehérjék: hGnRH-I-R, α -tubulin, foszfo-ERK1/2 és ERK1/2. A detektálásra tormaperoxidáz-alapú kemilumineszcens (ECL) módszert alkalmaztunk.

Sejt-életképesség meghatározás

Az előállított vegyületek EBC-1 és NIH/3T3 sejtek életképességére kifejtett hatását MTT és CellTiter-Glo[®] módszerekkel mértük. A sejteket 96 lyukú lemezre helyeztük (MTT: 10^4 sejt/lyuk, CellTiter-Glo[®]: 10^3 sejt/lyuk). A letapadt sejteket az MTT-teszt esetén 40 μM koncentrációban 24 órán keresztül inkubáltuk. A CellTiter-Glo[®] esetén 10 μM koncentrációból kiinduló, nyolc pontos, negyedelő hígítási sort alkalmaztunk, a sejteket 72 órán keresztül inkubáltuk. A sejtek életképességét az MTT esetén az 570 nm és a 635 nm-en mért abszorbancia értékekből számítottuk ki. A CellTiter-Glo[®] esetén a sejtek életképességének meghatározására lumineszcens detektálást alkalmaztunk. Az adatok kiértékeléshez Microsoft Excel 2013 szoftvert használtam. Az IC_{50} értékek számítását GraphPad Prism szoftverrel végeztem el.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkóp

A sejteket 8 lyukú lemezre helyeztük (10^4 sejt/lyuk), majd 48 órán keresztül inkubáltuk.

A GnRH-R vizsgálata immuncitokémiai módszerrel történt. A letapadt sejteket 4% paraformaldehid metanolos oldatával 10 percig fixáltam. (A sejtek esetleges permeabilizálására ezt követően került sor, erre a célra 0,1% Triton X-100 PBS oldatát alkalmaztam.) A sejteket hGnRH-I-R elsődleges, majd Alexa Fluor 546 másodlagos antitesttel, végül Draq5™ sejtmagfestékkel kezeltem.

A FITC-GnRH konjugátumok vizsgálata során a tárgylemezre letapadt sejteket FITC-GnRH analógokkal előre meghatározott koncentrációban és időtartamban kezeltem. (A lizoszómák esetleges megfestésére ezt követően került sor, ebben az esetben LysoTracker™ Red DND-99-el is kezeltem a sejteket.) A kezelés után 4% paraformaldehid metanolos oldatával 10 percig fixáltam, végül Draq5™ sejtmagfestékkel kezeltem a sejteket.

A felvételeket az adott kezelési módszert követően, inverz konfokális lézer pásztázós mikroszkóppal (Zeiss Confocal LSM 710), 63x olaj immerziós objektív alatt készítettem. A felvételek kiértékeléséhez és a képek elkészítéséhez a Zen 2.3 szoftvert (Carl Zeiss Microscopy GmbH) használtam.

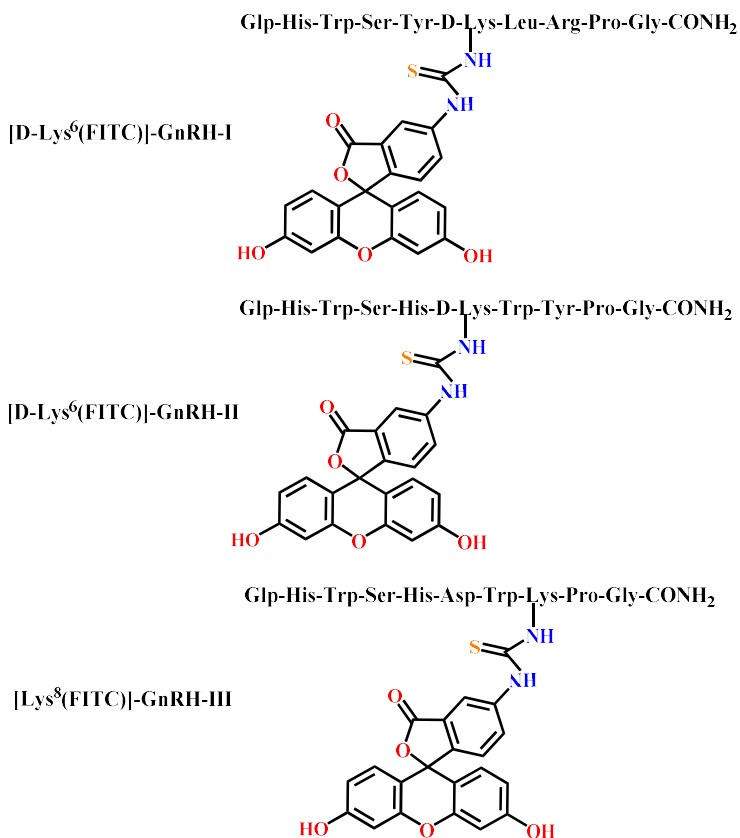
Áramlási citométer

A sejteket 12 lyukú lemezre helyeztük ($4 \cdot 10^4$ sejt/lyuk), majd 48 órán keresztül inkubáltuk. A letapadt sejteket $1 \mu\text{M}$ és $10 \mu\text{M}$ koncentrációban alkalmazott FITC-GnRH konjugátumokkal, 1 órán és 5 órán keresztül kezeltem. A tripszin-EDTA elegy segítségével felúszott sejtekről a médiumot centrifugálással eltávolítottam, majd a sejteket jéghideg PBS-ben szuszpendáltam és a sejteket tartalmazó szuszpenziót az áramlási citométerrel (BD FACSCalibur™) történő mérés végéig jégre helyeztem. Az adatok kiértékeléshez CellQuest Pro szoftvert (BD Biosciences) és Microsoft Excel 2013 szoftvert használtam.

4. Eredmények

FITC-GnRH konjugátumok előállítása és karakterizálása

Összesen három, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) szelektíven jelölt GnRH analógot állítottam elő (1. ábra). A FITC-GnRH konjugátumok PBS-ben jól oldódnak és sejt kultúra médiumban stabilak. Passzív membrántranszportra nem képesek, ami szelektív GnRH-R-mediált transzportjuk egyik feltétele. NIH/3T3 eger fibroblaszt sejteken magasabb (40 μM) koncentráció esetén sincs szignifikáns citotoxikus hatásuk.



1. ábra: A FITC-GnRH konjugátumok szerkezete.

FITC-GnRH konjugátumok vizsgálata daganatsejteken

A FITC-GnRH konjugátumokat a szakirodalomban gyakran alkalmazott, GnRH-R expresszáló LNCaP, MCF-7, BxPC-3 és HT-29 sejtvonalakon, valamint a GnRH-R expresszióra vonatkozó irodalmi adattal nem rendelkező Detroit-562, EBC-1, H-1993, H-2228 és MDCK sejtvonalakon vizsgáltuk. Az eredményeket az I. táblázat foglalja össze.

I. táblázat: A FITC-jelölt GnRH analógokkal kezelt sejtvonalak fontosabb eredményei.

sejtvonal	szöveti eredet	GnRH-R vizsgálata*		FITC-GnRH mennyisége**
		fehérje expresszió	membrán lokalizáció	(1 μ M, 5 óra)
LNCaP	prosztatarák	van	++	++
MCF-7	mellrák	van	++	++
BxPC-3	hasnyálmirigyák	van	-	-
HT-29	vastagbélrák	van	+	+
Detroit-562	garatrák	van	+	++
EBC-1	tüdőrák	van	+	+
H-1993	tüdőrák	van	n.a.	+
H-2228	tüdőrák	van	n.a.	+
MDCK	kutya vese epitél	nincs	-	-
*: A fehérje expresszió vizsgálat western blottal, a membrán lokalizáció vizsgálat konfokális mikroszkóppal történt.				
**: A FITC-jelölt GnRH analógokkal kezelt sejteket vizsgálata áramlási citométerrel történt.				
<u>jelmagyarázat:</u>				
++: jelentős; +: mérsékelt, -: negatív; n.a.: nincs adat				

A western blot analízis mindegyik vizsgált humán daganat-sejtvonal esetén igazolta a GnRH-R expressziót. Az immuncitokémiai módszerrel jelölt sejtfelszíni GnRH-R mennyiségében azonban jelentős eltérés mutatkozott a különböző sejtvonalak között.

10 μM FITC-GnRH-val kezelt sejtek esetén, eltérő mennyiségben, de az összes vizsgált sejtvonalban kimutatható a konjugátumok jelenléte. A konjugátumokat leghatékonyabban az LNCaP, MCF-7 és Detroit-562 sejtek veszik fel. A három konjugátum hatékonysága között nincsen jelentős különbség.

1 μM FITC-GnRH-val kezelt sejtek esetén mind a sejtvonalak, mind pedig a konjugátumok közötti különbségek jelentősebbek. A GnRH analógok terápiásan releváns célpontjaként számon tartott LNCaP, MCF-7 és HT-29 sejtekhez viszonyítva az újonnan vizsgált Detroit-562, EBC-1, H-1993 és H-2228 sejtek egyaránt ígéretes célpontnak bizonyultak. A humán GnRH-R-t nem expresszáló MDCK sejtek, illetve a receptort a sejtfelszínen nem tartalmazó BxPC-3 sejtek esetén, az 1 μM koncentrációban alkalmazott FITC-GnRH konjugátumok nem dúsultak.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a GnRH analógok transzportja 1 μM esetén szelektív és GnRH-R-függő. 10 μM koncentráció felett azonban GnRH-R-független transzportmechanizmus szerepe is feltételezhető. A FITC-GnRH konjugátumok lokalizációjának vizsgálata igazolta, hogy a receptor-közvetített endocitózis következtében a konjugátumok elsősorban a lizoszómákban dúsulnak. Mivel sejtvonalanként eltérő, hogy melyik konjugátum a leghatékonyabb, ezért daganatsejt-függő, hogy melyik GnRH analóg a legalkalmasabb hatóanyag-szállító peptid.

A BxPC-3 hasnyálmirigyrák sejtek vizsgálata hívta fel a figyelmet arra a problémára, hogy elsősorban GnRH-R mRNS, illetve expresszió vizsgálat alapján kategorizálnak egyes ráksejt-típusokat, mint potenciális GnRH célpontokat. A BxPC-3 sejtek fokozott GnRH-R expresszióját a szakirodalmi adatokkal megegyező módon western blotolattal kimutattuk. A permeabilizálatlan BxPC-3 sejteken elvégzett immuncitokémiai jelölés azonban nem talált sejtfelszíni GnRH receptort. A permeabilizált sejteken megismételt jelölés igazolta, hogy a GnRH-R jelentős mennyiségben van jelen a BxPC-3 sejtekben, azonban a receptor ezekben a sejtekben nem transzlokálódik a sejtmembránba. A membrán GnRH-R permanens hiányát megerősíti, hogy a BxPC-3 sejtekben az FITC-GnRH konjugátumok sem dúsulnak. Ez arra enged következtetni, hogy a GnRH-R expresszió vizsgálata önmagában nem biztos prediktív biomarkere az eredményes GnRH-R-céltartó hatóanyag-bejuttatásnak. A többi vizsgált sejtvonal eredményei alapján pedig feltételezhető, hogy a GnRH-R anterográdt transzportját a GnRH analógok is indukálhatják, amelynek intenzitása sejttípus-függő.

Crizotinib-GnRH konjugátumok megtervezése

A crizotinib-GnRH konjugátumok hatékonyságának az egyik feltétele a GnRH-R fokozott jelenléte a megcélzott daganatsejtek membránjában. A másik alapvető feltétel, hogy a daganatsejtek érzékenyek legyenek a crizotinibbal szemben. A crizotinib ismert molekuláris célpontjai közül a molekuláris patológia fejlődésével párhuzamosan egyre nagyobb jelentőséggel bíró c-Met receptor tirozin kináza fókuszáltam. Ennek következtében a FITC-GnRH konjugátumokkal vizsgált sejtvonalak közül a *c-Met* amplifikált és ennek következtében c-Met fehérjét overexpresszáló EBC-1 nem-kissejtes tüdőrák sejtvonalat választottam ki a crizotinib analógok és konjugátumaik hatékonyságának vizsgálatára.

A crizotinib-GnRH konjugátumok megtervezése során a crizotinib c-Met fehérjével alkotott komplexének egyedi szerkezetét vettem figyelembe. A crizotinib fehérjéhez történő kötődéséért a 2-aminopiridin struktúra a felelős. A crizotinib tartalmaz továbbá egy farmakokinetikai szempontból lényeges piperidin részt, amely a c-Met fehérje ATP-kötőzsebéből kifelé áll. Ezen szerkezeti jellemzők alapján a crizotinib piperidin gyűrűjében található aminocsoportját jelöltem ki a GnRH hordozóhoz történő kapcsolásra. A GnRH és a crizotinib közötti összekötő-egység beépítése érdekében azonban a crizotinib 2-aminopiridin gyűrűjének aminocsoportját szelektíven védeni kellett.

Crizotinib analógok előállítás és vizsgálata

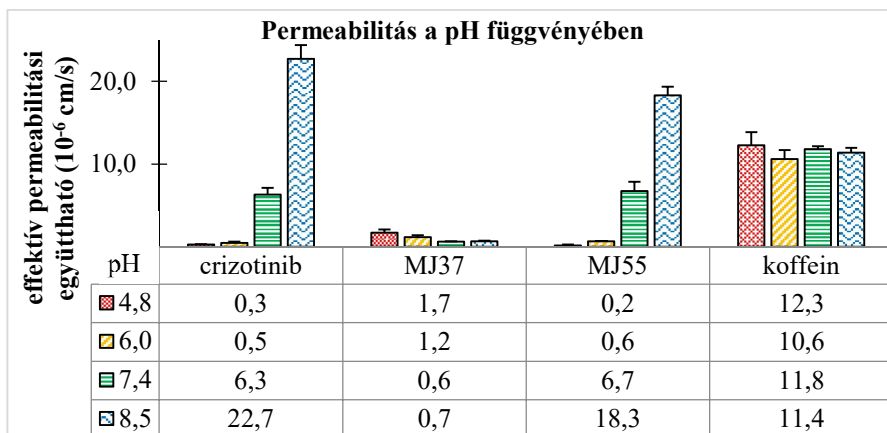
A crizotinib analógok előállítása során a 2-aminopiridin alapváz szelektív Boc véde mellett, egy további szempont a piperidin gyűrű módosításával észter- vagy karbamát kötés létesítésére alkalmas funkciós csoportok kialakítása volt. Összesen hat konjugálható crizotinib analógot állítottam elő. Az előállított vegyületekről a Boc védőcsoportot eltávolítva, először szabad hatóanyagként vizsgáltam meg fontosabb jellemzőiket.

Az EBC-1 sejteken mért IC_{50} érték és az egyedi szerkezeti jellemzők alapján a 2. ábrán látható crizotinibet, MJ55, MJ37 és MJ95 vegyületeket jelöltem ki GnRH konjugátumok előállítására. Mind a négy kiválasztott vegyület sejtenyésző médiumban stabil. Az MJ37 PBS-ben jól oldódik, a crizotinib és az MJ55 mérsékelten oldódik, az MJ95 pedig gyakorlatilag oldhatatlan.

	crizotinib	MJ37	MJ55	MJ95
IC ₅₀ (EBC-1 sejtvonala)	28 nM	569 nM	27 nM	312 nM
stabilitás (FBS+RPMI)	stabil	stabil	stabil	stabil
oldhatóság (PBS)	14 μM	99 μM	11 μM	<1 μM
(R)-konfigurációjú vegyületek esetén:				
IC ₅₀ (EBC-1 sejtvonala)	8 nM	761 nM	8 nM	nincs adat
IC ₅₀ (c-Met gátlás)	26 nM	7 nM	22 nM	nincs adat

2. ábra: A GnRH konjugátumok előállítására kiválasztott crizotinib analógok.

A crizotinib, MJ37 és MJ55 vegyületeknek előállítottam az enantiomer-tiszta (R)-konfigurációjú változatát is. Az EBC-1 sejteken az crizotinib és az MJ55 egyaránt igen alacsony IC₅₀ értékkel rendelkezik. Az c-Met fehérje *in vitro* gátlásban az MJ37 bizonyult a leghatékonyabbnak, azonban az EBC-1 sejteken mégis jelentősen kisebb hatással rendelkezik, melyre a 3. ábrán látható, gyengébb membrán permeabilitása ad magyarázatot.



3. ábra: A crizotinib, MJ37, MJ55 és a koffein PAMPA módszerrel mért, pH-függő membrán permeabilitása.

Crizotinib-GnRH konjugátumok előállítása és vizsgálata

A Boc-védett crizotinib származékok felhasználásával öt crizotinib-GnRH konjugátumot állítottam elő (II. táblázat). A konjugátumok PBS-ben rosszul oldódnak, sejtenyésző médiumban az oldhatóságuk kedvezőbb. A GnRH-I-nél hidrofílebb karakterű GnRH-III peptidnek köszönhetően a [Lys⁸((R)-MJ55)]-GnRH-III oldódik a legjobban.

A hatóanyaggal létesített kémiai kötés stabilitása döntő módon befolyásolja a konjugátumok szelektivitását és hatékonyságát. A savamid és a karbamát kötést tartalmazó crizotinib-GnRH-I, illetve MJ95-GnRH-I konjugátumok sejtenyésző médiumban stabilak, szabad hatóanyag 24 óra elteltével sem detektálható. Az aromás észterkötésű MJ37-GnRH-I, illetve az alifás észterkötésű MJ55-GnRH-I és (R)-MJ55-GnRH-III konjugátumok azonban gyorsan bomlanak. 24 óra elteltével gyakorlatilag a konjugált hatóanyag teljes mennyisége felszabadul.

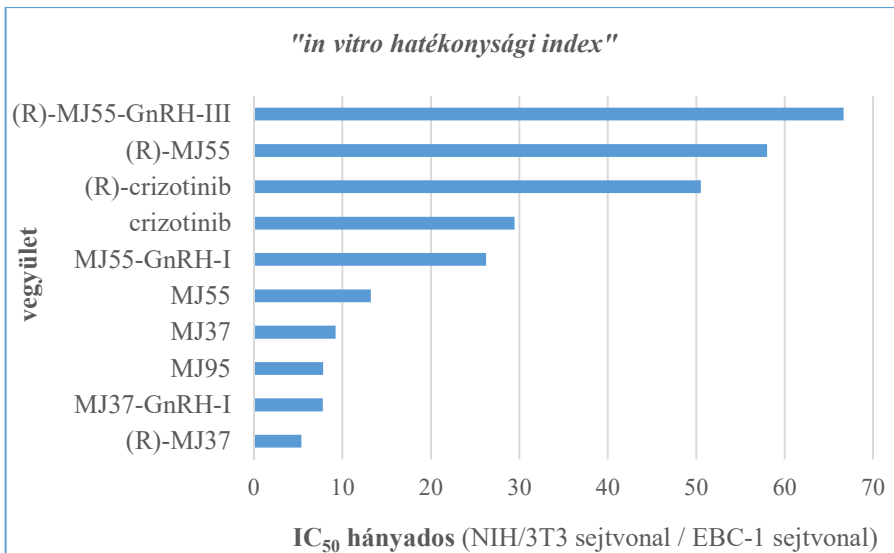
II. táblázat: Az előállított crizotinib-GnRH konjugátumok fontosabb jellemzői.

Konjugátum	A hatóanyaggal létesített kémiai kötés*		IC ₅₀ (μM)**	
	kötéstípus	stabilitás	EBC-1	NIH/3T3
D-Lys ⁶ (crizotinib)]-GnRH-I	savamid	stabil	5,5	>>10
[D-Lys ⁶ (MJ37)]-GnRH-I	aromás észter	t _{1/2} =5 óra	4,5	>10
[D-Lys ⁶ (MJ55)]-GnRH-I	alifás észter	t _{1/2} =4 óra	6,1*10 ⁻²	1,6
[Lys ⁸ ((R)-MJ55)]-GnRH-III	alifás észter	t _{1/2} =3 óra	1,2*10 ⁻²	0,8
[D-Lys ⁶ (MJ95)]-GnRH-I	karbamát	stabil	>10	>>10

*: Stabilitás vizsgálat 10% FBS tartalmú RPMI médiumban, 37°C-on.
**:A sejtek Cell Titer-Glo[®] módszerrel mért életképességének 50%-os gátlása.

A további összehasonlítás érdekében kiszámítottam a szabad crizotinib analógok és a GnRH konjugátumaik NIH/3T3 eger fibroblaszt és EBC-1 tüdőrák sejteken mért IC₅₀ értékeinek (CellTiter-Glo[®] módszer) a hányadosát. Az így kapott értékek a nem specifikus „sejt-életképesség gátló” hatás és a specifikus „daganatellenes” hatás

közötti arányt számszerűsítik, amit disszertációmban, mint „*in vitro* hatékonysági index” (továbbiakban: hatékonysági index) definiáltam (4. ábra). A hatékonysági index a statisztikai valószínűséget nem veszi figyelembe.



4. ábra: A konjugált és a szabad crizotinib analógok „*in vitro* hatékonysági indexe”.

A crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I esetén a magas IC₅₀ értékek és oldhatósági korlátok miatt a hatékonysági index nem határozható meg. Az MJ37 vegyület hatékonysági indexe a GnRH-I konjugálás következtében érdemben nem változott. Az MJ55 GnRH-I konjugálása és (R)-MJ55 GnRH-III konjugálása esetén a hatékonysági index kis mértékben nőtt. Az összehasonlítás alapján az (R)-MJ55, mind szabad, mind pedig GnRH-III konjugált formában a klinikumban alkalmazott (R)-crizotinibnél jobb eredményt ért el. A (R)-MJ55-GnRH-III konjugátum esetén azonban az észterkötés gyors hidrolízise miatt a daganatsejt-céltartó hatóanyag-bejuttatás terápiás előnye megkérdőjelezhető. A további *in vivo* vizsgálatok létjogosultsága megfontolandó.

Lizoszóma-csapda-teória

A crizotinib-GnRH konjugátumok vizsgálata a GnRH-R-célzott hatóanyag-bejuttatás során fellépő és a szakirodalomban korábban nem leírt problémára hívta fel a figyelmet. A kutatómunkám során feltárt problémát, mint „*lizoszóma-csapda-teória*” nevesítettem.

A lizoszóma-csapda-teóriát a crizotinib-GnRH konjugátumok vizsgálata során tapasztalt alábbi eredmények támasztják alá:

- A crizotinib-GnRH konjugátumok kötődnek a GnRH receptorhoz, amit GnRH-R által közvetett módon indukált ERK1/2 foszforiláció western blot vizsgálata igazolt.
- A crizotinib-GnRH konjugátumok az EBC-1 sejteken magasabb koncentrációban hatásosak, mint az általuk szállított hatóanyag szabad formájában.
- A stabil crizotinib-GnRH-I, illetve MJ95-GnRH-I konjugátumok esetén lizoszomális enzimek hatására sem keletkezik szabad crizotinib, azonban a crizotinib GnRH-hoz kapcsolt állapotában is képes a c-Met fehérje hatékony gátlására *in vitro*. Ennek ellenére ezen konjugátumok hatása az EBC-1 sejteken több nagyságrenddel magasabb koncentrációban jelentkezik, mint a szabad hatóanyag esetében.
- Az észterkötést tartalmazó konjugátumok esetén a hatóanyag egy része a célzott bejutás előtt felszabadul, ezért ezek a konjugátumok hatékonyabbak, a daganatsejt-célzott hatóanyag-bejuttatásuk rovására.
- Az (R)-MJ55 GnRH-III konjugált formában az EBC-1 sejteken magasabb IC₅₀ értékkel rendelkezik, mint a (R)-MJ55 és a GnRH-III 1:1 arányú kombinációja.
- A leghatékonyabb c-Met gátló MJ37 analóg alacsony permeabilitásából adódó problémáját a GnRH-R-célzott bejuttatás sem oldotta meg. A sejtekbe juttatott MJ37 számára a gyenge permeabilitás továbbra is hátrányt jelent.
- Ismert, hogy a GnRH konjugátumok a GnRH-R-mediált endocitózis következtében a lizoszómában dúsulnak, melyet a FITC-GnRH konjugátumok vizsgálata is igazolt.
- A pH-függő membrán-permeabilitás vizsgálata hívta fel a figyelmet arra, hogy a lizoszómára jellemző savasabb pH esetén a crizotinib analógok 2-aminopiridin alapváza ionizálódik és ennek következtében a permeabilitásuk jelentősen csökken.

A felsorolt eredmények alapján, a *lizoszóma-csapda-teória* azt feltételezi, hogy a GnRH receptoron keresztül bejuttatott crizotinib analógok nehezebben jutnak el a c-Met receptor tirozin kináz ATP-kötőzsebéhez, mint a passzív diffúzióval történő hatóanyagtranszport esetén. Az GnRH-R-mediált endocitózis során fokozottabban érvényesülő intracelluláris akadályt a lizoszóma membránja jelenti.

Összefoglalás

Összességében elmondható, hogy a szintetikus GnRH analógok képesek hatóanyagot szelektíven bejuttatni a célsejtekbe, amit a kutatómunkám során előállított FITC-jelölt GnRH analógok eredményei is bizonyítanak. Megállapítottam, hogy a GnRH-R-célzott hatóanyagtranszport eredményességét a GnRH-R sejtvonalként eltérő intenzitású membrán-transzlokációja determinálja. Az előállított öt crizotinib-GnRH konjugátum vizsgálata rámutatott arra, hogy a GnRH-R-közvetített endocitózis során a lizoszóma jelentős akadályt jelenthet abban, hogy a GnRH-konjugált hatóanyagok eljussanak molekuláris célpontjaikhoz. A crizotinib-GnRH konjugátumok hatékonyságát és célzott terápiás relevanciáját a crizotinib 2-aminopiridin alapvázának lizoszomotróp karaktere tovább csökkenti. A GnRH konjugátumok magasabb koncentrációja esetén feltételezhető, hogy GnRH-R-független módon is bejutnak a sejtekbe, ami a lizoszóma elkerülését eredményezheti, de ez a mechanizmus a célzott terápiás előnyt is megkérdőjelezi. Az előállított konjugátumok közül az EBC-1 tüdőrák sejtvonalon a GnRH-III-mal konjugált (R)-MJ55 analóg bizonyult a leghatékonyabbnak. Az (R)-MJ55 analóg mind konjugált, mind pedig szabad formájában a klinikumban alkalmazott (R)-crizotinibhez hasonló eredményeket ért el *in vitro*.

5. Következtetések

Az általam elsőként előállított FITC-GnRH konjugátumok eredményeivel kapcsolatos következtetésem az alábbiak:

1. A sejtek által felvett [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-I, [D-Lys⁶(FITC)]-GnRH-II és [Lys⁸(FITC)]-GnRH-III fluoreszcencia intenzitása idő- és koncentrációfüggő módon mérhető, a szelektív jelölés következtében mennyiségük egymással összehasonlítható. Fizikai-kémiai paramétereik alapján a FITC-GnRH konjugátumok *in vitro* kísérletekben megbízhatóan alkalmazhatók.
2. A GnRH-R expresszálo daganatsejtek igen eltérő mennyiségben helyezik ki a receptort a sejtmembránba. A GnRH-R anterográd transzportját feltehetően maguk a GnRH analógok is sejttípus-függő módon indukálják. Ezért a GnRH-R expresszió vizsgálat önmagában nem biztos prediktív biomarkere az eredményes GnRH-R célzott terápiának. A FITC-GnRH konjugátumok előnye, hogy közvetlenül a sejtek által felvett GnRH analógok mennyisége mérhető és ez alapján lehet a GnRH-R-célzott hatóanyag-bejuttatás hatékonyságát prediktálni *in vitro*.
3. A Detroit-562 sejtvonal vizsgálata elsőként mutatott rá arra, hogy GnRH-alapú hatóanyag-szállító rendszerekkel egyes garatrákok is igen hatékonyan célozhatóak. A FITC-GnRH konjugátumok dúsulása az újonnan vizsgált EBC-1, H-1993 és H-2228 tüdőrák sejtekben szintén célzott terápiás jelentőséggel bír.
4. Alacsony koncentrációban alkalmazott FITC-GnRH konjugátumok esetén, a sejtek által felvett konjugátumok mennyisége szoros összefüggésben áll a sejtek membránjában található GnRH-I-R mennyiségével. Magasabb koncentrációk esetén feltételezhető, hogy GnRH-R-független, ismeretlen transzportmechanizmus is szerepet játszik a GnRH konjugátumok intracelluláris transzportjában.

Az általam elsőként előállított crizotinib analógok és a crizotinib-GnRH konjugátumok eredményeivel kapcsolatos következtetésem az alábbiak:

5. A szelektíven Boc-védett crizotinib analógok felhasználhatóak GnRH konjugátumok előállítására. Az (R)-MJ55 mind az ALK, ROS1, c-Met és RON kinázok gátlásában, mind pedig a daganatmodellként kiválasztott, c-Met amplifikált EBC-1 sejtek életképességének gátlásában a klinikumban alkalmazott crizotinibhez hasonló eredményeket ért el *in vitro*. Az (R)-MJ37 a crizotinibnél hatékonyabb c-Met-gátló, azonban gyengébb permeabilitása miatt az EBC-1 sejteken jelentősen kisebb hatással rendelkezik.

6. A crizotinib-GnRH konjugátumok hatékonyságát és szelektivitását a hatóanyag és összekötő egység között kialakított kémiai kötés döntő módon befolyásolja. A kevésbé hatékony crizotinib-GnRH-I és MJ95-GnRH-I konjugátumokban található savamid, illetve karbamát kötés stabil, ezért belőlük szabad hatóanyag nem keletkezik. Az MJ37-GnRH-I, MJ55-GnRH-I és (R)-MJ55-GnRH-III konjugátumok esetén a hatóanyagokkal létesített észterkötés gyorsan hidrolizál. A GnRH-R-célzott bejutást megelőzően felszabaduló hatóanyagok fokozottabb hatást eredményeznek, de a célzott terápiás előnyt is megkérdőjelezzik.

7. A crizotinib-GnRH konjugátumok hatásmechanizmusában kulcsfontosságú tényező a GnRH-R-mediált endocitózissal járó hatóanyagtranszport a lizoszómába. A crizotinib fehérjekötődésben érintett 2-aminopiridin alapvázának lizoszomotróp jellege miatt, a permeabilitást csökkentő ionizáció elkerülhetetlen a lizoszómában. Ezért feltételezhető, hogy a GnRH receptoron keresztül bejutatott crizotinib analógok nehezebben jutnak el a receptor tirozin kinázok ATP-kötőzsebéhez. A feltárt problémát „*lizoszóma-csapda-teóriaként*” nevesítettem.

8. Eredményesebb GnRH konjugátumok előállításához a célsejteken belül felszabaduló és lizoszóma-effluxra képes hatóanyagokra van szükség. Ha a hatóanyag kémiai szerkezete ezt nem teszi lehetővé, akkor a GnRH-hoz lizoszomális enzimek hatására felhasadó kötással kapcsolt membrán-penetráló egység, majd a penetráló egységhez stabil kötással kapcsolt hatóanyag lehet egy alternatív megoldás. A daganatsejtek membránjában található GnRH-R csekély mennyisége miatt a szelektíven bejuttatható hatóanyag korlátozott mennyiségét is számításba kell venni.

6. Saját publikációk jegyzéke

Murányi J., Varga A, Gurbi B, Gyulavári P, Mező G, Vántus T

In vitro imaging and quantification of the drug targeting efficiency of fluorescently labeled GnRH analogues

JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS 2017: (121) e55529. (2017)

Murányi J., Gyulavári P, Varga A, Bökönyi G, Tanai H, Vántus T, Pap D, Ludányi K, Mező G, Kéri G

Synthesis, characterization and systematic comparison of FITC-labelled GnRH-I, -II and -III analogues on various tumour cells

JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE 22: (8) pp. 552-560. (2016)