

Teplán István

az MTA rendes tagja

# ANTITUMOR AKTIVITÁSÚ PEPTIDEK

Daganatellenes peptidmolekulák kifejlesztése és vizsgálata.  
Remények – realitások

Elhangzott 1998. március 17-én

A hipotalamikus eredetű releasing hormonok felfedezése, izolálása, szerkezetigazolása, szintézise, amely az 1960-as évek végére, az 1970-es évek elejére tehető, és elsősorban A. V. Schally nevéhez fűződik, egy hatalmas, igen széles spektrumú kutatási területnek teremtette meg az alapjait. A releasing hormonok közül is kiemelkedő jelentőséggel bír a gonadotropin hormonok releasing hormonja, a GnRH:

## A humán GnRH szekvenciája

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

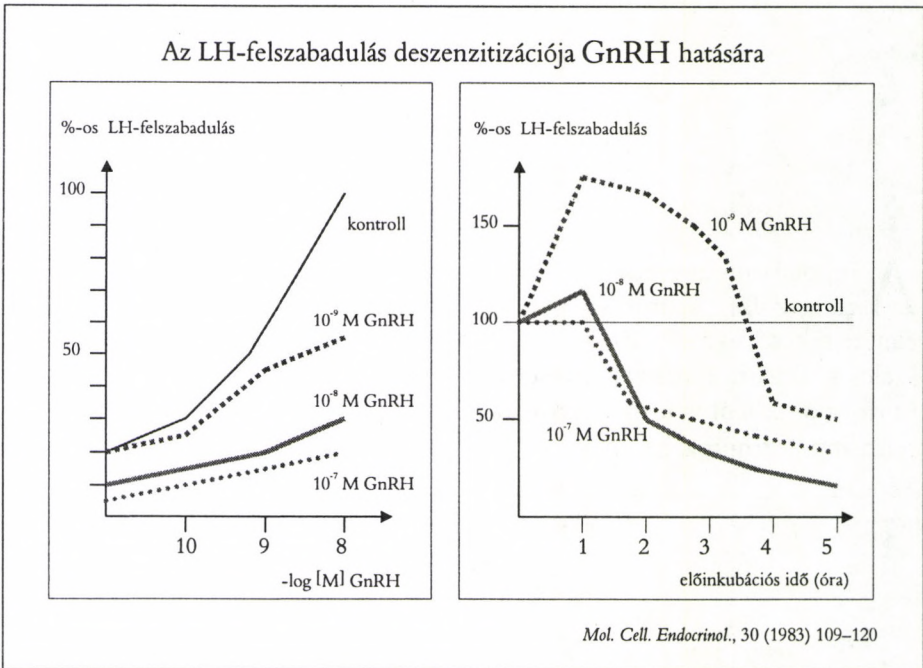
Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

1. ábra. A GnRH 10 aminosavból álló deka-peptid. A GnRH luteinizáló és folliculusz-stimuláló (LH és FSH) hormonokat szabadít fel, melyek szaporodás-biológiai folyamatokat szabályoznak

A GnRH agonista és antagonistá analógjaitól a szaporodásbiológia néhány nehezen kezelhető problémájának megoldását remélték és reméltük mi is. Ettől a reménytől indítva kezdődött el a világ számos laboratóriumában – így az általam vezetett laboratóriumában is – a minél jobb hatású agonista, ún. szuperaktív, illetve antagonistá, ún. inhibitor analógok előállítása, vizsgálata, aminek eredményeként százával készültek el a jobbnál jobb hormon-analógok.

Az általunk készített és vizsgált GnRH-agonistákról a levelező tagságomhoz kapcsolódó székfoglalóm során számoltam be.

Ezeket a nagy hatékonyságú GnRH analógokat az emlősök és a haszonállatok terméketlenségével összefüggő problémák, anomáliák kezelése érdekében fejlesztettük ki. Fő szempontunk a klinikai vagy állatgyógyászati alkalmazásba történő bevezetés elősegítése volt.



2. ábra. A GnRH tartósan nagy koncentrációban adagolva kevesebb LH- és FSH-hormont szabadít fel, mint egyszeri adagolást követően kis koncentrációban

Természetesen a gyakorlati alkalmazást megelőzően tisztázni kellett azt a mechanizmust, amelyen keresztül ezek az anyagok kifejtik hatásukat.

Ennek során már az első megfigyelések az agyalapi mirigy receptorai deszenzitizációjának és down-regulációjának felfedezéséhez vezettek. Ugyanis



## Antitumor aktivitású peptidek

mind *in vitro*, mind *in vivo* kísérletekben azt a paradox jelenséget tapasztaltuk, hogy a GnRH nagyobb koncentrációban és tartósan adagolva kevesebb LH-hormont szabadít fel, mint kisebb koncentrációban. Ez a megfigyelésünk összhangban van azzal a korábbi felismeréssel, hogy a GnRH nem folyamatosan, hanem ritmikus, pulzatív módon szabadul fel a hipotalamuszból. Az így felszabaduló GnRH szabályozza a reprodukciós folyamatokat – többek között a gonadális szteroidogenezist és a gametogenezist – a hipofízisből felszabaduló gonadotrop hormonokon keresztül.

A GnRH-származékok másik csoportját, az antagonistá hatású analógok egész sorát mi elsősorban az ovuláció gátlására fejlesztettük ki. Ezek az előzőtől gyökeresen eltérő mechanizmus szerint fejtik ki hatásukat: nem növelik, hanem kifejezetten gátolják a hipofízis gonadotrop hormonjainak, az LH-nak és FSH-nak felszabadulását. Az alábbi táblázat mutatja be néhány általunk előállított, kiemelkedő antagonistá analóg szerkezetét és ovuláció-gátló hatását.

GnRH-inhibitorok szerkezete és antiovlációs hatása										OVULÁCIÓ- GÁTLÁS ( $\mu\text{M}$ )	Kód
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Glp-	DPhe-	Phe-	Ser-	Tyr-	DPhe-	Leu-	Arg-	Pro-	Gly-NH <sub>2</sub>	1000	
	DPhe-	DTrp-			DPhe-					1000	
DGlp-	DCpa-	DTrp-			DPhe-					120	
AcDCpa-	DCpa-	DTrp-			DPhe-					50	
AcDCpa-	DCpa-	DTrp-			DPhe-				DAla-NH <sub>2</sub>	10	
AcDCpa-	DCpa-	DTrp-			DLys-				DAla-NH <sub>2</sub>	8	
AcDNal-	DCpa-	DTrp-			DArg-				DAla-NH <sub>2</sub>	1	
AcDTrp-	DCpa-	DTrp-			DLys-				DAla-NH <sub>2</sub>	2	MI-1544
AcDNal-	DCpa-	DTrp-			DCit-				DAla-NH <sub>2</sub>	3	SB-30
AcDNal-	DCpa-	DPal-			DCit-				DAla-NH <sub>2</sub>	-	SB-75

B. B. R. C., 100 (1981) 915., *Peptides*, 3 (1982) 969., *Endocrinology*, 110 (1982) 1445.,  
*Peptides*, 4 (1983) 149., B. B. R. C., 118 (1984) 351., *PNAS*, 85 (1988) 1637.

3. ábra. A GnRH-analógokkal gátolni lehet az LH- és FSH-hormonok felszabadulását; az agonista analógok tartós adagolása lecsökkenti a GnRH-receptorok számát; az antagonistá analógok gátolják a natív GnRH receptor kötődését

A GnRH-agonisták és -antagonisták eddig felderített gátló hatásának mechanizmusa röviden a következő: az agonista analógok tartós adagolása csökkenti a GnRH-receptorok számát – mintegy deszenzitizálja azokat –, aminek következtében csökken a gonadotropinok felszabadulása. Ezzel ellentétben az antagonista analógok szintén erősen kötődnek a hipofízis receptoraihoz, és mint kompetitív inhibitorok gátolják a természetes eredetű GnRH kötődését, ezáltal az LH és FSH szekrécióját.

Az elmondottakból következik, hogy mind szuperaktív, mind antagonistá hatású analóggal el lehet érni az ovuláció gátlását, hisz mindkét mechanizmus eredménye a szteroidszint csökkenéséhez vezet, aminek eredményeként az ovuláció nem következik be.

Azonban amíg az antagonisták a gonadműködés direkt és azonnali csökkenését idézik elő, addig az agonisták először a stimulus következtében egy gyors LH- és FSH-felszabadulást okoznak, és csak ezután jelentkezik a deszenzitizáció, aminek következménye a szteroidszekréció csökkenése.

Ezek a felismerések idézték elő azt a paradigmaváltást a GnRH-, illetve GnRH-analógok (agonisták–antagonisták) kutatásában, amely az 1980-as évek elejére tehető, és szintén Schally nevéhez fűződik. Ez az új elképzelés abból a logikából indul ki, hogy az ilyen mértékű szteroidszint-csökkenés hatással lehet a hormondependens tumorokra, és befolyásolhatja azok növekedését. Ezt az elképzelést már az első kísérleteink is igazolták.

A GnRH-analógok ilyen célra történő alkalmazása azt a lehetőséget is jelezte, hogy az irreverzibilis kasztrációt is magába foglaló eljárásokkal ellentétben a hormonszint ezekkel az anyagokkal történő átmeneti, drasztikus csökkentése visszafordítható folyamat, vagyis a kezelés befejeztével az ovárium működése helyreáll, és elkerülhető a műtéti trauma és a mellékhatások többsége. Mindezek és az adagolás viszonylagos egyszerűsége a GnRH-analógok széles körű alkalmazását ígérte.

Miután saját korábbi szintetikus munkáinkból adódóan kiemelkedő hatású GnRH-agonista és -antagonista analógokkal egyaránt rendelkezünk, kézenfekvőnek tűnt, hogy megvizsgáljuk ezek antitumor aktivitását. Ez az 1980-as évek végén azért volt időszerű, mert több nagy gyógyszergyár is – igaz, hogy nem magyar – kifejlesztett olyan szuperaktív és relatíve hosszan tartó hatású GnRH-analógokat, amelyek a hormonális kasztráció révén eredményesen használhatók voltak emlő-, ovárium- és prosztatatumorok kezelésére. Az általunk ezekkel egy időben kifejlesztett és szabadalmaztatott, hasonló biológiai aktivitással rendelkező szuperaktív GnRH-analógok – az OVURELIN-nek nevezett termékcsalád tagjai – sajnos a közismert hazai nehézségek és nehézségek miatt nem jutottak el a klinikai kipróbálásig. A következő ábra az általunk kifejlesztett molekulákat mutatja be.



**OVURELIN<sup>®</sup>**

**Glp - His - Trp - Ser - Tyr - D-Phe - Leu - Arg - Pro - NH - Et**

*Hung Pat., No.: 185 535*

**OVURELIN-C<sup>®</sup>**

**Glp - His - Trp - Ser - Tyr - D-Cpa - Leu - Arg - Pro - NH - Et**

*USA Pat., No. 4 552 864*

4. ábra. Az OVURELIN hatóanyagot állatgyógyászati célra 1986 óta forgalmazza a Reanal Rt. Finomvegyészgyár

Bár az OVURELIN néven szabadalmaztatott egyik analógunkat a Reanal Rt. Finomvegyészgyár állatgyógyászati készítményeként a mai napig forgalmazza, a humán gyógyszerfejlesztésre kijelölt analógjaink további kutatása néhány reményteljes eredmény után elakadt. Történt ez annak ellenére, hogy vizsgálataink egyértelműen bizonyították az OVURELIN jelentős tumorgátló hatását, amely megegyezett az ismert szuperaktív analógok hatásával a humán emlőtumor sejtvonalakon *in vitro* körülmények között. Tríciummal jelzett OVURELIN segítségével – egésztest-autoradiográfias módszerrel – sikerült kimutatnunk azt is, hogy a jelzett OVURELIN jelentősen feldúsul a tumorszövetben, és hogy bizonyos tumorsejteken specifikus GnRH-kötőhelyek vannak, melyekhez mind az agonisták, mind az antagonisták kötődnek.

Ugyanakkor *in vivo* kísérletekben az Országos Onkológiai Intézetben dolgozó együttműködő partnereink a következő nagyon érdekes eredményre jutottak. Amíg az ismert és forgalomban lévő, hosszan tartó hatású agonista GnRH-analógok (pl. Zoladex, Decapeptyl) úgynevezett depokészítmény formájában xenograftos egereknél a kezdeti tumornövekedést követően drasztikusan csökkentették a tumorok súlyát, addig az OVURELIN és más agonista analógok – beleértve az előbbieket is – *nem depo* formában még napi kétszeri adagolás esetén se mutattak érdemleges tumorgátló hatást. Ez a felismerés irányította figyelmünket olyan megoldások keresése felé, amelyek a mi analóg-

jaink számára is biztosítják a tartósan magas koncentrációt. Sikertült azt is megállapítanunk, hogy mind a szteroid dependens, mind a szteroid independens tumoros sejtvonalak, valamint a xenograftok membránfrakciói GnRH-specifikus kötőhellyel rendelkeznek, és minden bizonnyal e kötőhelyen keresztül következik be a tumornövekedés gátlása. Ez utóbbi feltételezésünket az a kísérleti eredményünk is alátámasztja, hogy a tríciummal jelzett, agonista típusú OVURELIN ezekhez a tumorsejtekhez jelentős mértékben kötődik, amit a következő táblázat adatai is megerősítenek:

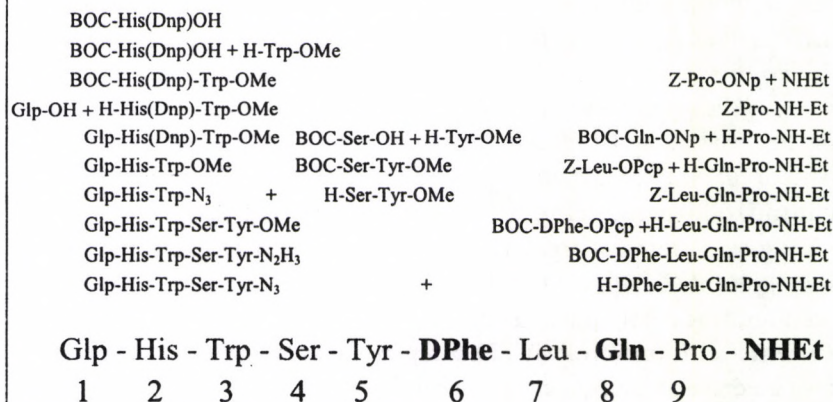
	Disszociációs konstans ( $K_d \times 10^{-9} M$ )	( $^3H$ )OVURELIN kötőkapacitás (pmol/mg protein)
MCF-7 sejtszuspenzió	36,48	3,95
MDA-MB-231 sejtszuspenzió	37,12	4,62
MCF-7 xenograft membránfrakció	30,22	3,56
MDA-MB-231 xenograft membránfrakció	30,12	4,23

*J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 38, 119 (1996)

5. ábra. Bizonyos tumorsejteken specifikus kötőhelyek vannak, amelyekhez az agonista és az antagonisták típusú GnRH-analógok kötődnek. - Az OVURELIN jelentősen feldúsul ezekben a tumorszövetekben

Az OVURELIN mellett a másik, szintén tumorelles hatásra kifejlesztett GnRH-analógunk érdekes módon a csirke-GnRH egyik származéka volt. E fejlesztésnek az volt az előzménye, hogy az 1980-as évek közepén nagyszámú

### A FOLLIGÉN kémiai szintézise



6/a ábra



## Antitumor aktivitású peptidek

### GnRH:

Glp - His - Trp - Ser - Tyr - Gly — Leu - Arg - Pro - Gly -NH<sub>2</sub>

### OVURELIN:

Glp - His - Trp - Ser - Tyr - D-Phe — Leu - Arg - Pro - NH - Et

### BUSERELIN:

Glp - His - Trp - Ser - Tyr - D-Ser(tBu) - Leu - Arg - Pro - NH - Et

### ZOLADEX:

Glp - His - Trp - Ser - Tyr - D-Ser(tBu) - Leu - Arg - Pro - AzaGly -NH<sub>2</sub>

### FOLLIGÉN:

Glp - His - Trp - Ser - Tyr - D-Phe — Leu - Gln - Pro - NH - Et

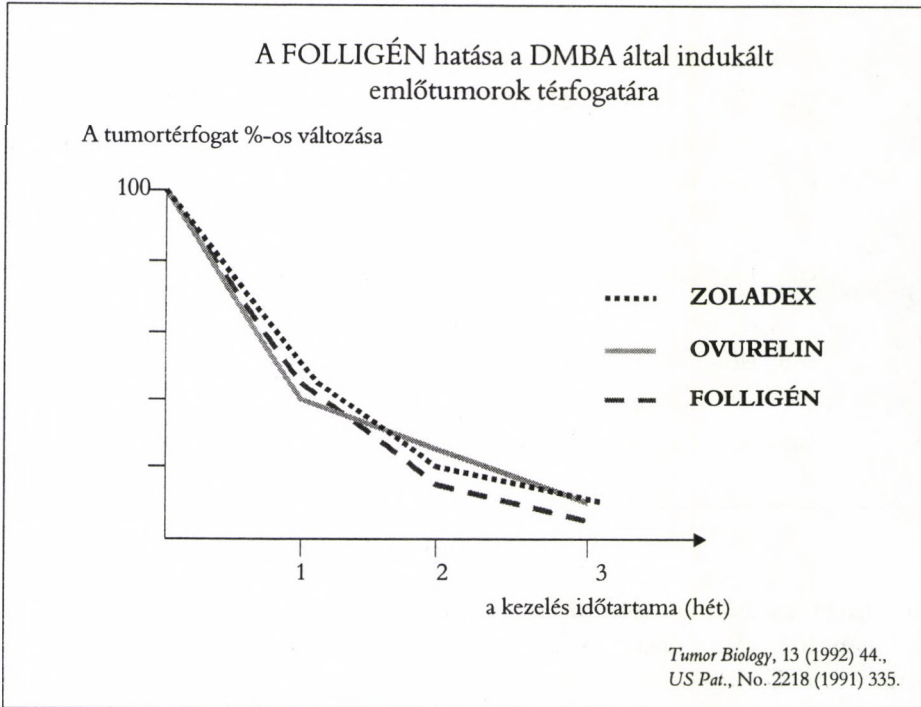
### 6/b ábra

új GnRH-analógot állítottunk elő, amelyek molekulatervezésében az ez idő tájt ismertté vált csirke- és lazac-GnRH-szerkezetét, valamint az emlős szuperaktív GnRH-analógok előállításánál bevált kombinációkat alkalmaztuk. Ezek alapján továbbfejlesztésre kiválasztott leghatékonyabb tumorgátló hatású GnRH-analógunkat FOLLIGÉN néven szabadalmaztattuk, amelynek a szerkezetét a 6. ábra mutatja be.

A FOLLIGÉN első vizsgálatai is már igen jelentős tumorgátló hatásról tanúskodtak. A 7. ábra két agonista analóg mellett a FOLLIGÉN *in vivo* tumor-térfogatra kifejtett gátló hatását tünteti fel.

A részletes vizsgálatok során azt találtuk, hogy a FOLLIGÉN patkányokban dimetil-benzantracén (DMBA) által indukált emlőtumorokon gyakorlatilag azonos mértékű tumorgátlást váltott ki, mint az ICI klinikai gyakorlatban lévő, ZOLADEX nevű készítménye: nevezetesen a tumor térfogatának 90–95%-os csökkenését. Azonban amíg ez utóbbi mellékhatásként hormonális kasztrációt és az ovárium működésének teljes gátlását eredményezte, addig a FOLLIGÉN-kezelés egyáltalán nem gátolta az ovariális működést, és nem okozott kémiai kasztrációt sem. Mindez a két molekula különböző hatásmechanizmusát jelzi, ami érthetően a különböző kémiai szerkezetből adódik.

A tumorgátlással párhuzamosan kezdtünk el foglalkozni az onkogén transzformációban meghatározó szerepet játszó tirozin-kináz enzim hatásmechanizmusának vizsgálatával, különböző peptidszubsztrátok, inhibitorok, ill. antigén determinánsok tervezésével és szintézisével. Ennek a témának a jelen-



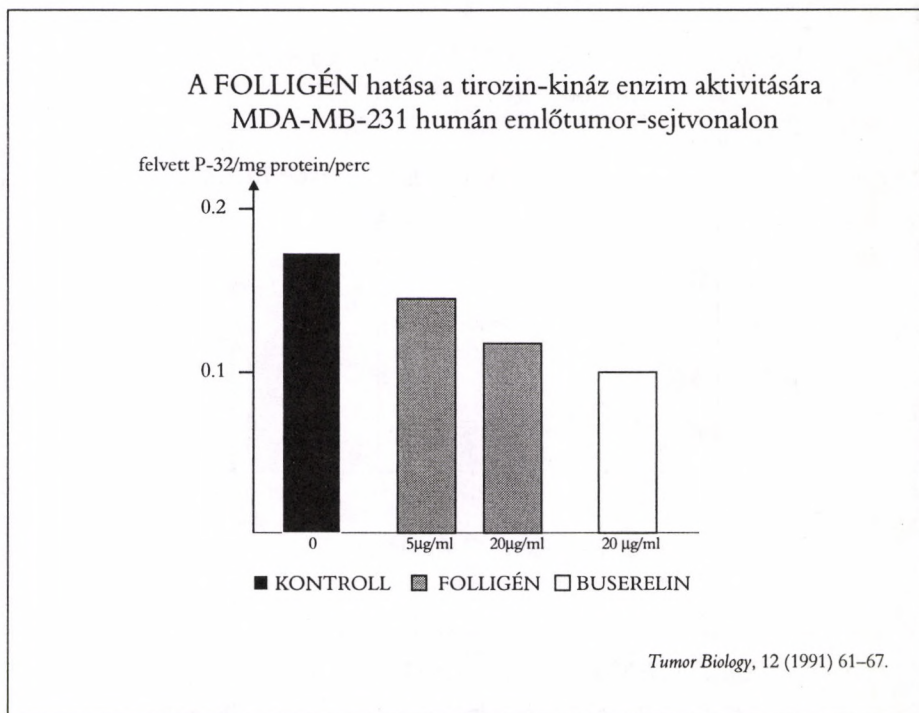
7. ábra. A FOLLIGÉN® nem gátolja az ovariális működést, nem okoz kémiai kasztrációt, jelentősen gátolja az emlőtumорок növekedését

tőségét az adja, hogy az eddig ismert onkogének közel fele tirozin-kináz enzim kódol, de emellett a növekedési faktor receptorok és az inzulin receptor is tirozin-kináz, vagyis a tirozin-kináz típusú enzim. Ezen molekulák alapvető szerepet játszanak a sejtosztódás regulációjában, és emiatt a gyógyszerkutatás fontos célmolekulái.

Antitumor peptidjeink hatásmechanizmusát vizsgálva fedeztük fel, hogy számos emlő-, prosztatá- és vastagbél-tumor-sejtvonal rendelkezik jelentős tirozin-kináz-aktivitással, és ez az aktivitás peptidhormonokkal kedvező irányban befolyásolható. Így például a FOLLIGÉN és egy másik, forgalomban levő GnRH-agonista, a BUSERELIN is gátolja az MDA-MB-231 emlőtumor-sejtvonal tirozin-kináz-aktivitását.

Érdekesnek találtuk azonban, hogy ez a tirozin-kináz-gátló hatás nem feltétlenül járt együtt a tumorsejtek osztódásának gátlásával, ugyanis a FOLLIGÉN a tirozin-kináz-aktivitását csak kisebb mértékben csökkentette, mint a BUSERELIN (8. ábra), ugyanakkor viszont a lecsökkent GnRH-hatású



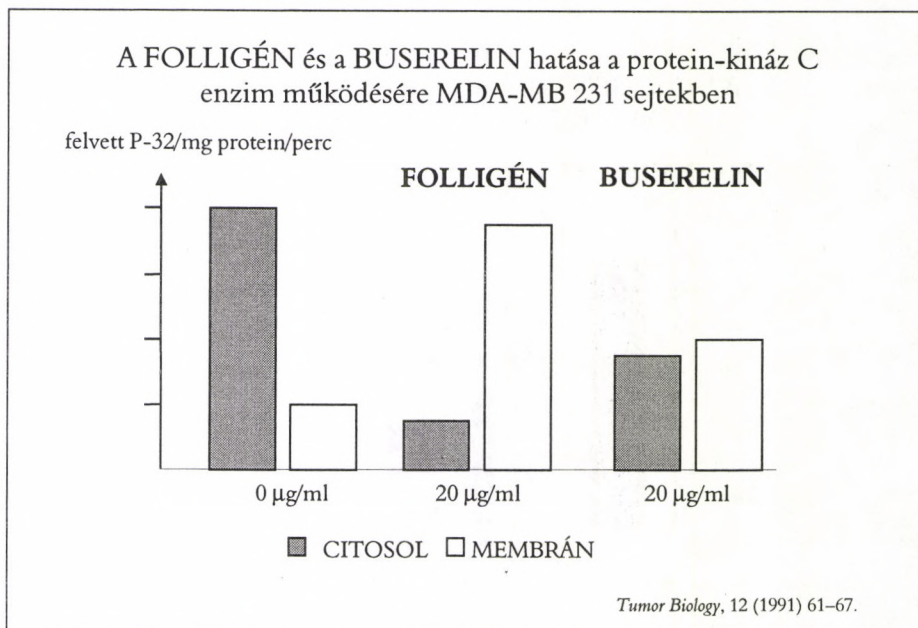


8. ábra. A FOLLIGÉN® és a BUSERELIN gátolja az MDA-MB-231 emlőtumor-sejtvonal tirozin-kináz-aktivitását

FOLLIGÉN a sejtosztódást hatékonyabban gátolta, mint a BUSERELIN. Emellett azt is kimutattuk, hogy a FOLLIGÉN és a BUSERELIN is hat a protein-kináz C enzim aktivitására. A totál enzimaktivitást ezek a hormonok ugyan nem változtatják meg, de jelentős mértékű enzimaktivitás-eltolódást okoznak a citoszolból a membránba.

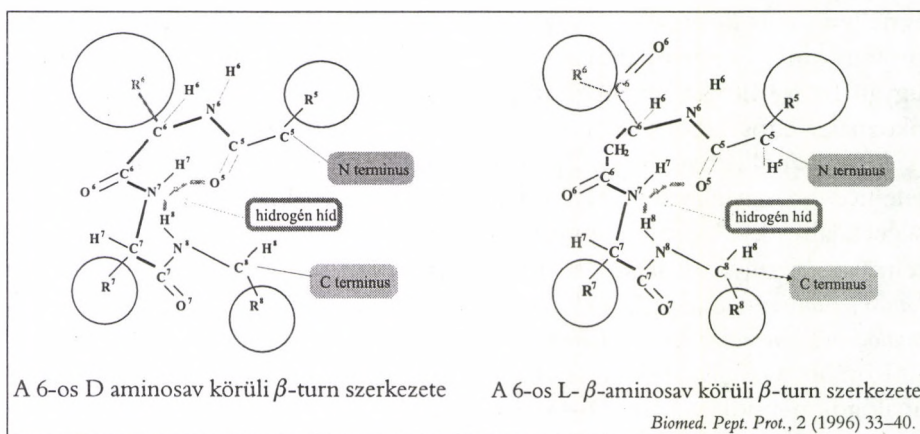
A 9. ábrából látható, hogy a protein-kináz C aktivitását a FOLLIGÉN jóval jelentősebb mértékben befolyásolta, mint a BUSERELIN, és hasonló különbséget találtunk a foszfolipid-átalakulás stimulálásában is. Eredményeink egyértelműen bizonyítani látszanak azt a tényt, hogy a FOLLIGÉN tumorelles hatásmechanismusa jelentősen eltér a forgalomban levő és ismert szuperaktív GnRH-analógokétól nemcsak in vitro, hanem in vivo körülmények között is.

Korábbi vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a szuperaktív GnRH-analógok peptidláncában a 6-os helyzetű D-konfigurációjú aminosavak előnyösen helyettesíthetők olyan  $\beta$ -aszpartil szerkezeti résszel, melyek különböző típusú csoportokat tartalmaznak az  $\alpha$ -karboxil csoportjukon. Az említett



9. ábra. A FOLLIGÉN tumorelles hatásának mechanizmusa jelentősen eltér az ismert szuperaktív GnRH-analógok hatásmechanizmusától

$\beta$ -aszpartil származékoknak és a D-aminosavoknak – például a BUSERELIN 6-os pozíciójában levő D-Ser(tBu)-csoportnak – igen hasonló térszerkezete van, mint az a 10. ábrán látható.



10. ábra



Ennek alapján várható volt, hogy a biológiai aktivitáshoz szükséges konformációt – nevezetesen egy  $\beta$ -turnt – ezzel a szerkezeti megoldással is lehet stabilizálni. E felismerésünk alapján magától adódott az a gondolat, hogy a FOLLIGÉN sajátos szerkezetéből fakadó előnyöket, vagyis a kis LH-release mellett jelentkező jelentős tumornövekedést gátló, valamint antiproliferációs hatást a  $\beta$ -aszpartil szubsztitúcióval kombinálva minimális endokrin, ugyanakkor tumorgátló hatású GnRH-analógot állítsunk elő. A így előállított, TH-332 jellel ellátott, tumorgátló vegyületünk képlete a 11. ábrán látható.

**EMLŐS GnRH:**

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

**CSIRKE GnRH:**

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Gln-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

**TH-332:**

Glp-His-Trp-Ser-Tyr- $\beta$ Asp(DEA)-Leu-Gln-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

11. ábra. A TH-332-analóg hatékonyan gátolja a humán prosztata-tumorsejtek proliferációját, és apoptozist indukál

Ez az analógunk – a POTE Anatómiai Intézetében dolgozó együttműködő partnereink által elvégzett, ún. szuperfúziós *in vitro* kísérletekben az emlős-GnRH-hoz képest elhanyagolható mértékű endokrin aktivitást fejt ki, és *in vivo* kísérletekben sem befolyásolja a patkányok ovariális ciklusát. Másrészt viszont – mint már említettem – tumoros sejtvonalon a tríciummal jelzett analóggal végzett kísérleteink során specifikus GnRH-kötőhelyeket találtunk, ezért várható volt a TH-332 analóg antitumor aktivitása is. Az *in vitro* vizsgálatok során valóban ki is derült, hogy a TH-332 analóg gátolja a humán prosztata-tumorsejtek proliferációját, és jelentős mértékű apoptozist (programozott sejthalált) okoz.

Az agonista analógok mellett az antagonistá analógokra is kiterjesztettük vizsgálatainkat, amelyek – mint arról már korábban szó volt – a gonadotropin szekréciójának gátlásával azonnali kémiai kasztrációt és szteroidszint-csökkenést okoznak. Ennek keretében tanulmányoztuk a már ismertetett, nagy hatású ovulációgátló antagonistának, az MI-1544 jelű analógunknak a kötődési

sajátosságait, és azt tapasztaltuk, hogy a már szintén bemutatott GnRH agonista OVURELIN és az antagonistá MI-1544 egyformán kötődik az MCF-7 és MDA-MB-231 sejtvonalakhoz, és a két különböző GnRH-analóg ugyanahhoz a receptorhoz kötődik.

A TH-332 agonista, valamint az MI-1544 antagonistá analóggal szerzett tapasztalataink alapján az L- $\beta$ -aszpartil-( $\alpha$ -dietilamid) és a 8-glutamin-csoportokat az MI-1544 analóg szerkezetébe is beépítettük. Mivel időközben már ismertté vált a konjugátumok előnyös, megnövekedett tumorgátló hatása, ezért és a fenti szubsztitúciók miatt olyan analóg szintézisét kellett megtervezni és megvalósítani, amelyben a 5-Tyr aminosavat L-lizinnel helyettesítettük. Ezzel megteremtettük a hordozóhoz való kötés lehetőségét, és így jutottunk el az MI-1892 jelű analóghoz (12. ábra).

### **MI-1544:**

**Ac-DTrp-DCpa-DTrp-Ser-Tyr-DLys-Leu-Arg-Pro-DAla-NH<sub>2</sub>**

### **MI-1892:**

**Ac-DTrp-DCpa-DTrp-Ser-Lys-L- $\beta$ -Asp(DEA)-Leu-Gln-Pro-DAla-NH<sub>2</sub>**

*Biomed. Pept. Prot.*, 2 (1996) 33–40.

12. ábra. Az MI-1544 analóg gátolja az ovulációt és a daganatsejtek proliferációját

Az MI-1892 jelű analógunk egészen nagy dózisban – *in vitro* szuperfúziós vizsgálatokban – gátolja ugyan a humán GnRH LH-releasing hatását, azonban az *in vivo* kísérletekben az antagonisták hatásos dózisának húszszorosában sem gátolja az ovulációt. Ugyanakkor viszont ez a viszonylag gyenge antagonistá GnRH-analóg jelentős telepképződés- és proliferáció-gátló hatással rendelkezik.

*In vivo* kísérletekben pedig a szteroid independens xenograftot viselő egekrnél naponta kétszeri kezelés mellett több mint 30%-os tumornövekedés-gátlást eredményezett (13. ábra).



**AZ MI-1892 ANALÓG TUMORGÁTLÓ HATÁSA**

	Dózis		
	1 $\mu$ M	30 $\mu$ M	50 $\mu$ M
MCF-7 telepképződés	8.0	34.0	38.2
MDA-MB-231 telepképződés	30.0	40.5	36.0
MCF-7 proliferációgátlás	21.7	26.8	35.0
MDA-MB-231 proliferációgátlás	18.0	20.5	35.0

*Biomed. Pept. Prot.*, 2 (1996) 33–40.  
*J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 34 (1991) 119–126.

13. ábra. Az MI-1892 analóg nem gátolja az ovulációt, de jelentősen gátolja a tumorsejtek telepképződését és proliferációját

Az amerikai Omahai Creighton Egyetem kutatóival együttműködve kezdtük el vizsgálni az orsóhalból izolált releasing hormon, a GnRH-III biológiai tulajdonságait, ennek az emlős-GnRH-tól eltérő szerkezetét mutatja a 14. ábra.

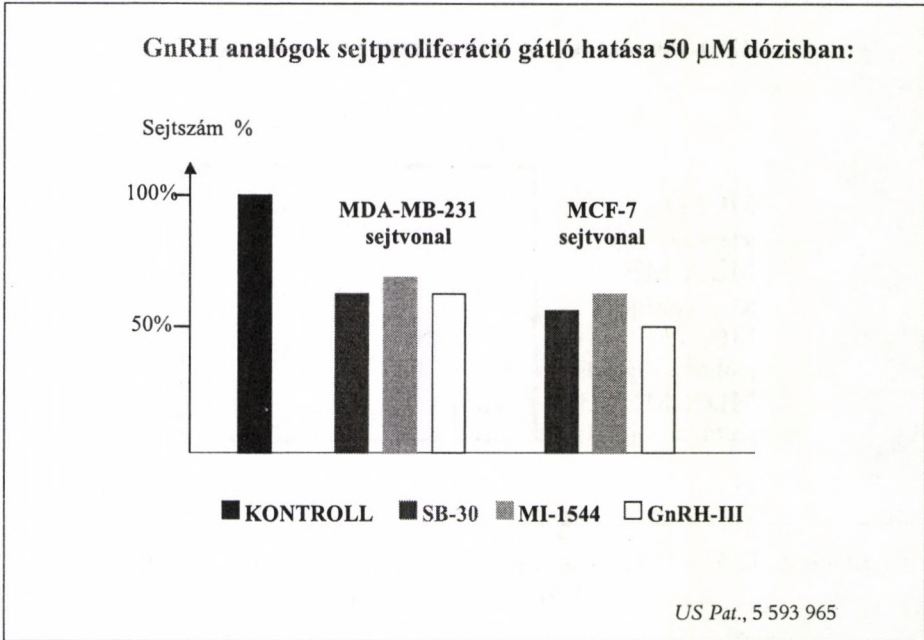
**HUMÁN GnRH:**

Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

**ORSÓHAL (LAMPREY) GnRH-III:**

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

14. ábra. A GnRH-III nem gátolja az ovulációt, ugyanakkor jelentősen gátolja a tumorsejtek telepképződését és proliferációját



15. ábra. A GnRH-III a legjobb antagonistá analógokkal azonos mértékben gátolja a humán emlőtumor sejtek telepképző képességét

A GnRH-III tartós és nagy dózisú kezelés esetén nem befolyásolja a patkányok ovariális ciklusát, és nem okoz kémiai kasztrációt sem, ugyanakkor a legjobb antagonistá analógokkal azonos mértékben gátolja a humán emlőtumor-sejtvonalak telepképződését, és jelentős mértékű sejtproliferáció-gátló hatással is rendelkezik (15. ábra).

Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a GnRH-III nagy hatású, természetes eredetű, szelektív tumorgátló hormon, amely felismerésünket közös magyar-amerikai szabadalommal védjük.

A GnRH-III jelentős tumorelles hatását azért tartottuk és tartjuk még ma is nagyon figyelemreméltónak, mert a GnRH-III csupa természetes L-aminosavból épül fel, ellentétben az antagonistá analógokkal, melyek esetenként 4–5, a természetben elő nem forduló D-aminosavat is tartalmaznak, melyek metabolizmusa még felderítetlen.

Mint a 14. ábrán látható volt, a GnRH-III szerkezete a humán GnRH szerkezetétől a lánc közepén lévő 4 aminosav-részben tér el, így talán jogosan feltételeztük, hogy a vegyület jelentős tumorelles aktivitása ehhez a szerkezeti részhez köthető, és ez az az ok, amiért e szekvenciárészletnek a jelentőségét tucatnyi analóg előállításával és vizsgálatával próbáltuk meg tisztázni. A natív



GnRH analógok hatása  
tumorsejtek telepkező képességére

Analógok	sejtvonalak				
	MCF-7	MDA-MB-231	Ishikawa	PC3	LNcaP
1. Lys <sup>5</sup> -/GnRH-III	0	0	0	0	0
2. [Lys(N <sup>F</sup> -Fmoc)] <sup>f</sup> -/GnRH-III	-	-	-	-	-
3. Lys <sup>5</sup> ,cyclo[Asp <sup>6</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]-/GnRH-III	+++	++	+	+	-
4. cyclo[Asp <sup>6</sup> ,Lys <sup>8</sup> ]-/GnRH-III	+++	++	+	+	-
5. Lys <sup>4</sup> ,[Lys(N <sup>F</sup> -Fmoc)] <sup>f</sup> -/GnRH-III	+++	+++	++	+	-
6. Lys <sup>4</sup> -/GnRH-III					
7. [Lys(N <sup>F</sup> -Ac)] <sup>f</sup> -/GnRH-III	+++	+++	+	+	-
8. Glu <sup>6</sup> -/GnRH-III	+++	++	0	+	-
9. Phe <sup>7</sup> -/GnRH-III	++	++	-	-	-
10. [Trp(For)] <sup>3,7</sup> , ΔPro <sup>9</sup> -/GnRH-III	+++	+++	++	+	-
11. /GnRH-III-(1-9)-EA	++	++	+	++	-
12. D-Ala <sup>10</sup> -/GnRH-III	0	+	0	0	-
13. Ac-D-Trp <sup>1</sup> ,D-Ala <sup>10</sup> -/GnRH-III	+	0	+	-	+
14. [Trp(For)] <sup>3,7</sup> ,[ <sup>3</sup> H-Pro] <sup>9</sup> -/GnRH-III	-	-	-	-	-
15. Asu <sup>6</sup> -/GnRH-III[30]	+	-	-	-	++
16. ΔPro <sup>9</sup> -/GnRH-III	+++	+++	++	+	+++
/GnRH-III	+++	+++	+	++	+++
Decapeptyl	++	++	+	+	-

0: hatástalan (0-10%), +: gyenge (11-20%), ++: közepes (21-30%), +++: erős (>3096)

J. Med. Chem., 40 (1997) 3353.

16. ábra. Megállapításaink: a 6-Asp és 8-Lys aminosavak között ionos kapcsolat van; a 7-Trp indolcsoportja hidrogénhid-kötésben vesz részt; a 6-Glu analóg specifikus tumorgátló hatással rendelkezik; a C-terminális etilamid nem rontja le a biológiai hatást; a 6-os és 8-as aminosavak oldalláncainak ciklizálása enzimrezisztens analógot eredményezett

molekula szisztematikus változtatásával szintetizált analógjaink szerkezete és tumorelles hatása a 16. ábrán látható.

A táblázatban feltüntetett vegyületek szerkezetbiológiai hatásösszefüggésének elemzése több érdekes felismeréshez vezetett, melyek részletes tárgyalásába most nem mennék bele, csak néhány érdekességet emelnék ki:

– Megállapítottuk, hogy a 6-Asp és 8-Lys aminosavak között ionos kölcsönhatás következtében egy „sóhid” alakul ki, amely stabilizálja a GnRH-III kon-

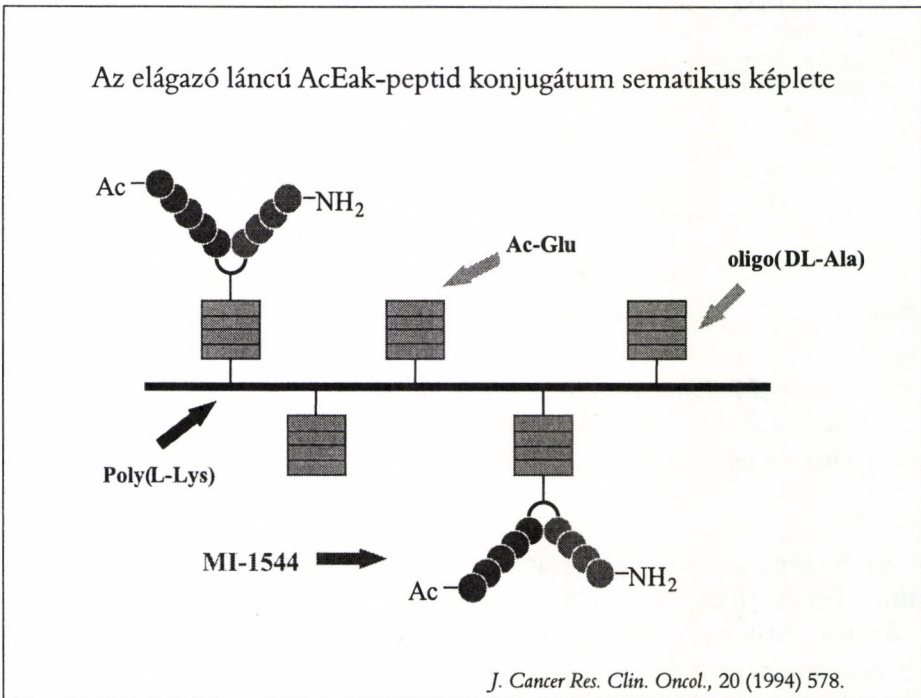
formációját, és ez, valamint a GnRH-III primer struktúrája idézheti elő a kiemelkedő antitumor-aktivitást.

– Megállapítottuk továbbá, hogy a 7-es helyzetű triptofán nem helyettesíthető más aminosavval, pl. fenil-alaninnal, mert feltehetően a triptofán indolcsoportja hidrogénhíd-kötés kialakításával hozzájárul a kötődéshez.

– Igen érdekesnek tartjuk, hogy az 6-Asp-analóghoz képest a 6-Glu-GnRH-III analóg emlőtumoros sejtvonalakon megtartotta a hatását, de más sejtvonalakon csökkent a tumorelles hatása, ily módon az emlőtumor-sejtvonalakra specifikus analóghoz jutottunk.

– Mivel a GnRH-analógok a szervezetben viszonylag gyorsan lebomlanak, ezért több, enzimatis hatásoknak ellenállóbb szerkezetű analógot állítottunk elő. Ezek közül kettő (4.,11. analóg) tumornövekedés gátló aktivitása megegyezett a natív GnRH-III-aktivitással.

Mint már korábban említettem, a GnRH-analógok csak tartósan magas hormonszint biztosítása mellett – például depóformulázás esetén – fejtenek ki jelentős tumorelles hatást. Az MI-1544 szerencsés analógnak bizonyult eb-



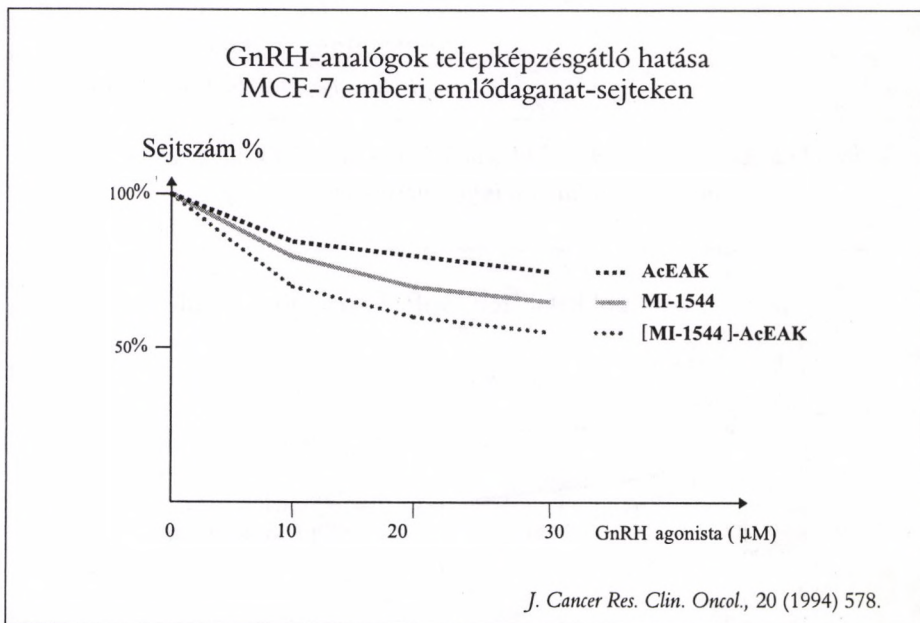
17. ábra. A biodegradábilis peptid-polimer konjugátum 2-3-szor nagyobb tumorgátló hatással rendelkezik, mint az MI-1544 peptid, illetve a polimer hordozó



ből a szempontból, mert a 6-os helyzetű lizin aminocsoportján és egy megfelelő, ún. spaceren keresztül polimer hordozóhoz köthető. Ettől a konjugátumtól azt vártuk, hogy a polimerről lassan leszakadva, tartósan magas koncentrációt, úgynevezett *long acting* hatást biztosít, mivel a konjugátum megnöveli a hormonmolekula enzimatisz stabilitását is.

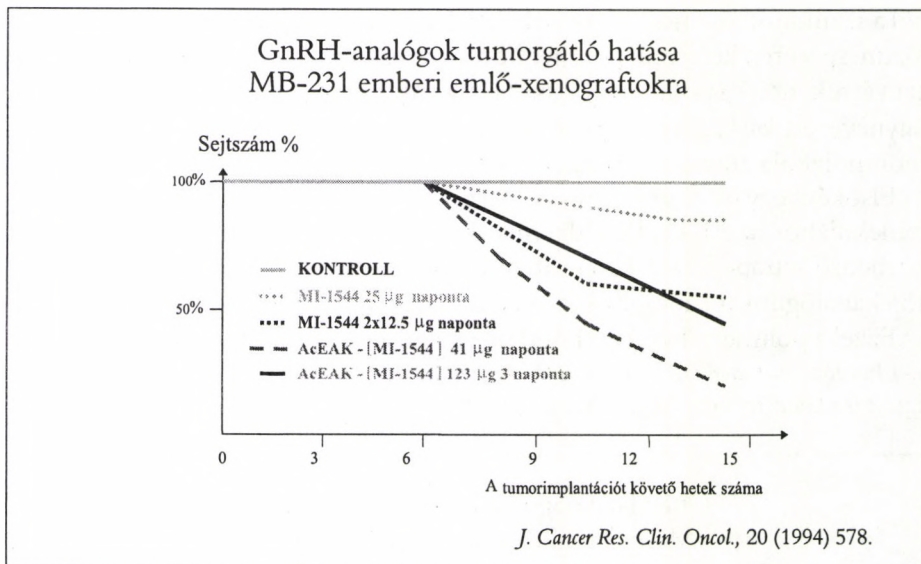
Elsőként egy biodegradábilis poli-lizin gerincű polipeptidhez mint hordozó molekulához az ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjával együttműködve egy közbenső tetrapeptiden keresztül a leghatékonyabb GnRH-antagonista MI-1544 analógunkat kapcsoltuk, amit a sematikus 17. ábra szemléltet.

Ezzel a polimerrel végzett kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy míg a polimer hordozó önmagában csak kb. 15%-os, addig a konjugátum 45–50%-os tumorgátló hatást mutatott *in vitro*. Ezt illusztrálja a 18. ábra.

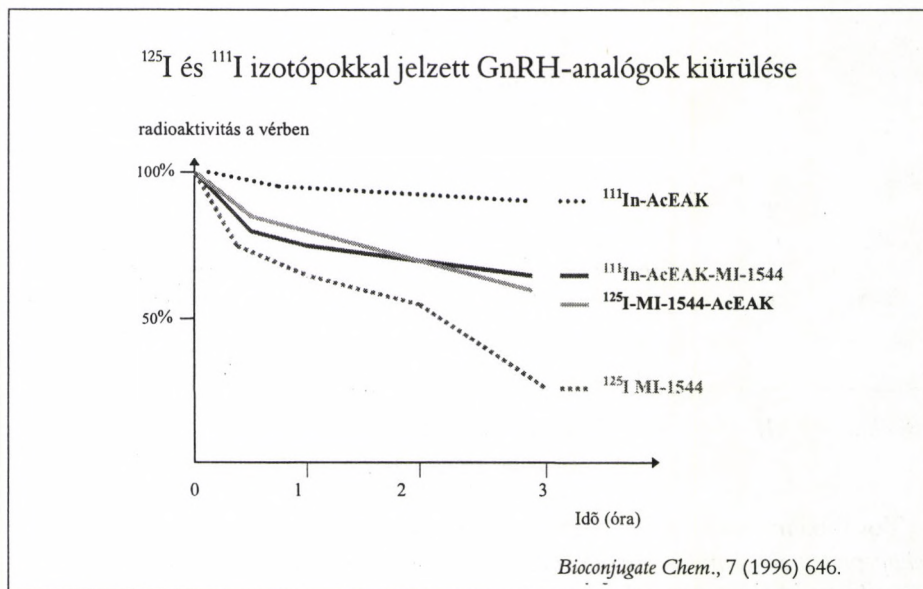


18. ábra. Az MI-1544 analóg polimer konjugátuma 50%-os telepképzésgátló hatással rendelkezik *in vitro*

Továbbá *in vivo* kísérletekben sikerült kimutatnunk, hogy míg az antagonistá decapeptid analóg önmagában napi kétszeri adagolás mellett is csak 30%-kal csökkentette a tumornövekedést, addig a konjugátum napi egyszeri adagolás mellett is 70%-ban – tehát igen jelentős mértékben – gátolta a tumortérfogat spontán növekedését. Ez látható a 19. ábrán.



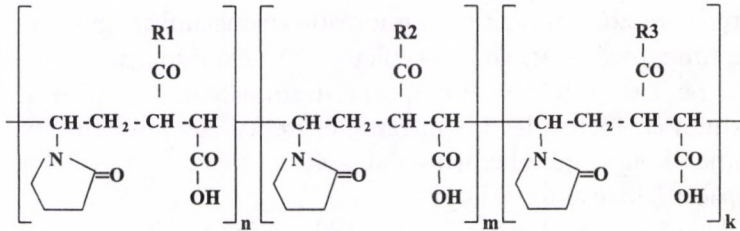
19. ábra. Az AcEAK-MI-1544 konjugátum 70%-ban gátolta a szteroid independens humán tumor növekedését in vivo



20. ábra. Az AcEAK-peptid-konjugátum háromszor lassabban ürül ki a szervezetből, mint a hormonanalóg



Nem biodegradabilis GnRH-analógok sematikus képlete



R1: OH, NH<sub>2</sub>, vagy NH(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, X:0-7

R2: GFLG-OH

R3: GFLG-GnRH antagonist, MI-1544 vagy MI-1892

Hung. Pat., Number 212662

**MI-1892:**

Ac-DTrp-DCpa-DTrp-Ser-Lys-β-Asp(DEA) -Leu-Gln-Pro-DAla-NH<sub>2</sub>

**MI-1544:**

Ac-DTrp-DCpa-DTrp-Ser-Tyr - D-Lys - Leu - Arg - Pro- DAla-NH<sub>2</sub>

21. ábra

Míg a nem kezelt állatok a tumorimplantáció után 3-4 hónap múlva elhullottak, addig a konjugátummal kezelt állatok 25-30%-a tumormentessé vált, és élettartamuk megegyezett a tumorról nem kezelt állatokéval.

Megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a 125-jóddal jelzett antagonistá deka-peptid, az abból készített konjugátum, valamint a 111-indiummal jelzett hordozó és az azt tartalmazó konjugátum biodisztribúcióját. Azt találtuk, amit egyébként reméltünk is, hogy a konjugátum kb. háromszor lassabban ürül ki a kísérleti állat szervezetéből, mint a deka-peptid-analóg önmagában. Az eredményeket a 20. ábra szemlélteti.

Emellett jelentős eltérés mutatkozott a hormon és konjugátuma biodisztribúciójában is.

A poli-lizin gerincű hordozóval elért biztató eredmények alapján úgy véltük, hogy a molekula gyógyszerre fejlesztése érdekében nagy mennyiségben, gazdaságosan előállítható, vízdékonyabb polimer hordozót célszerű alkal-

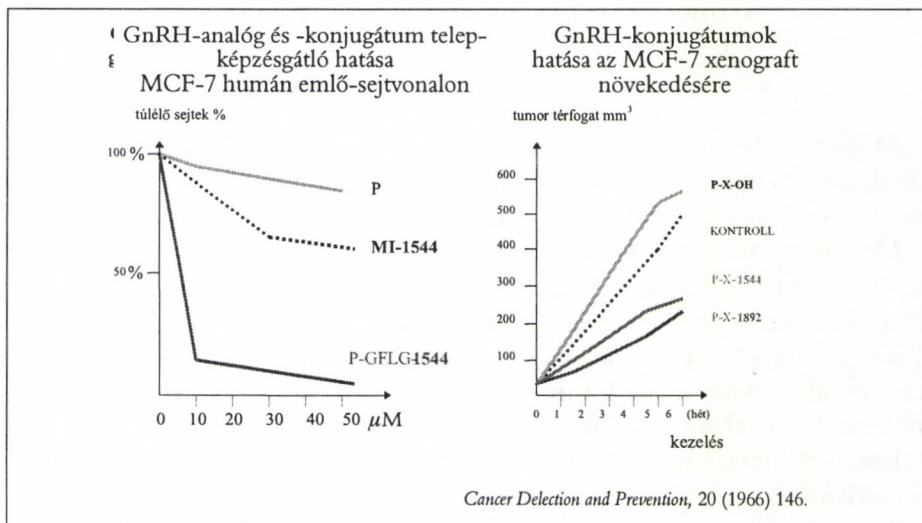
mazni a GnRH analógjaink konjugálására. Az MTA Központi Kémiai Kutató-intézetében dolgozó partnereink által korábban kifejlesztett vízdékony poli-vinil-pirrolidon-co-maleinsav polimer hordozó eleget tesz ezeknek a követelményeknek. A polimer hordozó molekula gerincéhez egy tetrapeptid spaceren keresztül kapcsoltuk a tumorgátló analógjainkat, így olyan vegyületet kaptunk, melyek sematikus képletét a 21. ábra mutatja.

Az ábrán látható R2 spacer csoport C-terminálisán levő glicin acilezi a peptidhormon analógból levő lizin részt, és ezáltal egy kovalens savamid-kötés biztosítja a konjugátum kémiai stabilitását.

A spacer lehetővé teszi, hogy:

- a hormonrész a hordozótól távolabb essék, és a konjugátum a hormon által irányítottan a receptorhoz tudjon kötődni;
- enzimatis hasítás következtében a hormon lehasadjon, és önálló peptidként is kifejthesse hatását.

A konjugátumokkal végzett *in vitro* kísérletek azt mutatták, hogy míg maguk a decapeptid analógok (vagyis a hordozóhoz nem kapcsolt MI-1544 és -1892 analógok) a proliferációt csak 10–38%-ban, illetve a telepképződést 10–45%-ban gátolják a vizsgált dózisokban, addig – mint az a 22. ábrán látható – az ugyanakkora dózisban alkalmazott P-X-1544 és P-X-1892 jelű konjugátumok a proliferáció-gátlást 45–70%-ra, a telepképződés-gátlást pedig drámai mértékben, 95–100%-ra emelték meg, attól függően, melyik sejtvonalon mértük azokat.

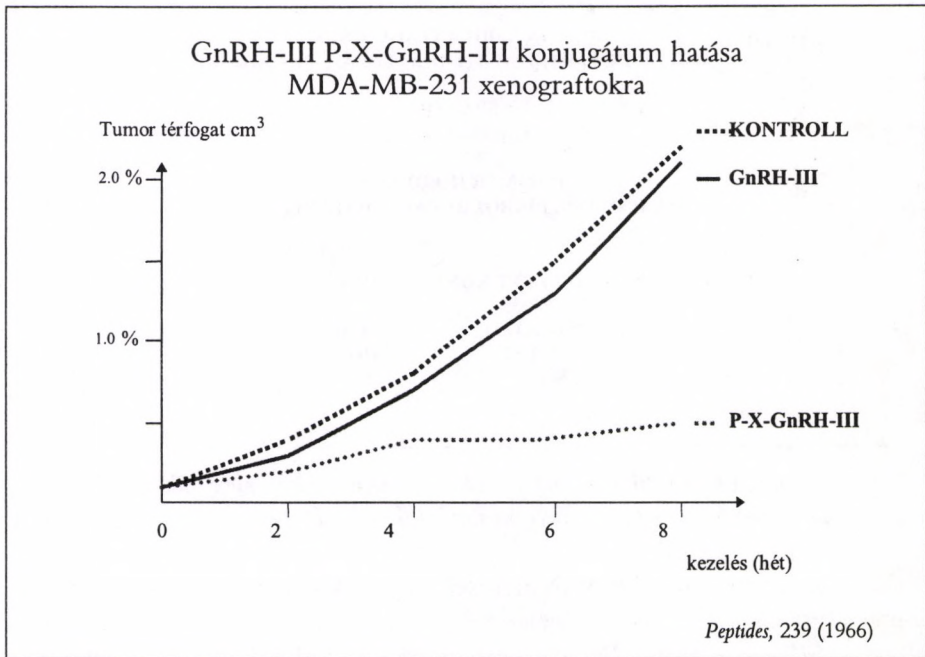


22. ábra. A konjugálás jelentősen megnövelte a peptidek proliferáció-gátló hatását *in vitro* és daganatgátló hatását *in vivo*



E konjugátumok *in vivo* 40–50%-kal csökkentették mind a szteroid dependens, mind az independens tumorok növekedését.

Vizsgálataink következő fázisában a legígéretesebb analógra, a GnRH-III-ra és konjugátumára koncentráltuk vizsgálatainkat. A natív GnRH-III konjugátuma *in vivo* a lassan növekvő MDA-MB-231 xenograftos egereknél a 9 hetes alkalmazás során igen jelentősen, 80%-ot is meghaladó mértékben csökkentette a tumornövekedést, sőt tumormentes állatokat is találtunk a kezelt állatok között. Az elmondottakat a 23. ábra mutatja be:

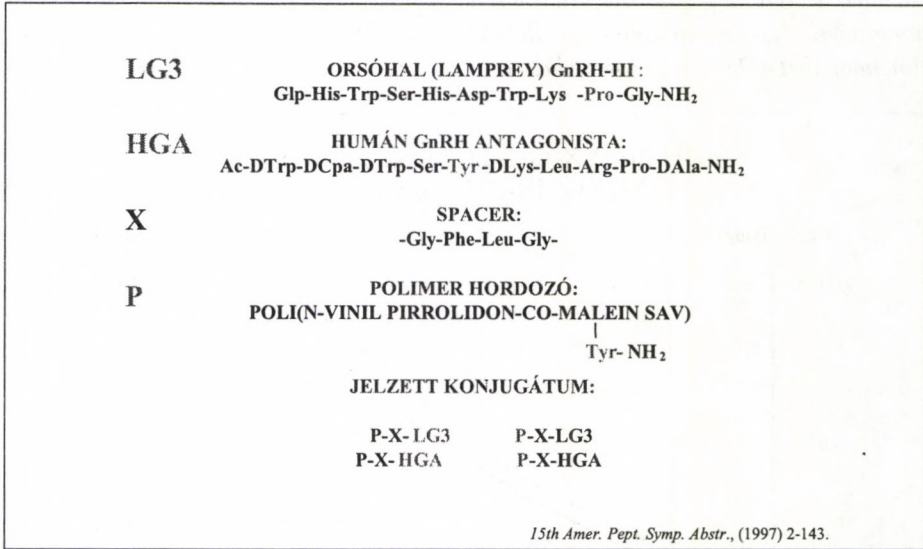


23. ábra. A P-X-GnRH-III konjugátum 80%-ot is meghaladó mértékben csökkenti a tumor növekedését; a hosszan tartó kezelés során a szteroid dependens és independens tumorsejtek GnRH-kötőhelyeinek száma nem csökkent

A gyorsabban növekvő MCF-7 xenograftos egereknél is a 6 hetes kezelés során kb. 70%-os tumornövekedés-gátlást tapasztaltunk.

Fontos megjegyezni, hogy ez a konjugátum egyáltalán nem csökkentette a tumorsejtek kötőhelyeinek számát, és fenntartotta a tumornövekedés-gátlást a hosszan tartó kezelés során. Ezt az támasztotta alá, hogy megvizsgáltuk maguknak a peptideknek és konjugátumaiknak a kötődését, a kötődés kinetikai paramétereit, illetve szöveti megoszlásaikat.

Erre a célra sikerrel tudtuk alkalmazni az 1970-es években általunk kidolgozott és alkalmazott ún. prekursoros szintetikus módszert a tríciummal specifikusan jelzett tumorelles peptidek előállítására. A tríciummal és radioaktív jódizotópokkal jelzett anyagok struktúráját és a radiojelzések helyét a 24. ábra mutatja.



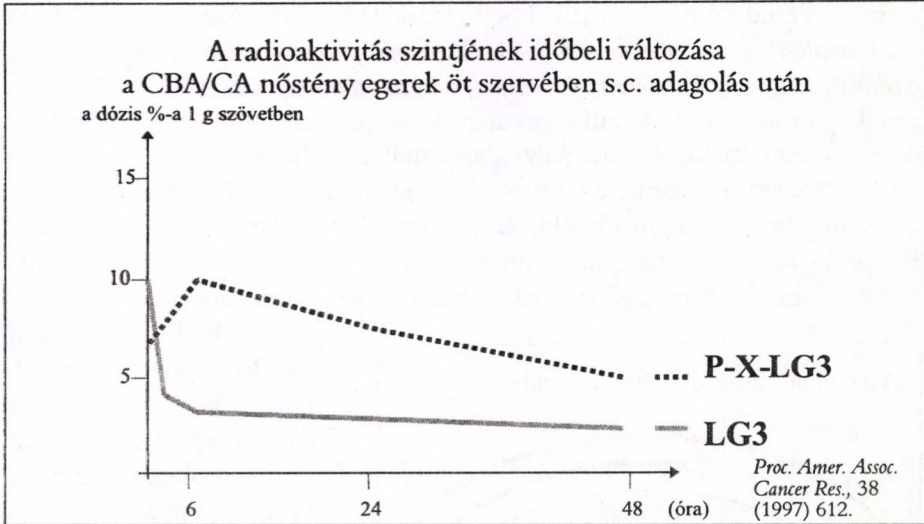
24. ábra. A konjugálás megnöveli a hormonreceptor komplex stabilitását; a tumorsejtek jelentős mértékben, specifikusan kötik a GnRH-polimer konjugátumokat

A velük végzett radioreceptor-mérések alapján azt is igazoltuk, hogy az általunk vizsgált tumorsejtvonalak és xenograftok a GnRH-konjugátumokat specifikusan és jelentős mértékben megkötik. Ezzel szemben magát a radiojelzett polimerhordozót egyáltalán nem kötik meg. Összehasonlítva a peptidhormonok és konjugátumaik specifikus kötődésének kinetikai paramétereit, megállapítottuk, hogy a konjugálás megnöveli a hormonanalóg-receptor komplex stabilitását, és a specifikus kötődéséért egyértelműen a GnRH-molekularész felelős.

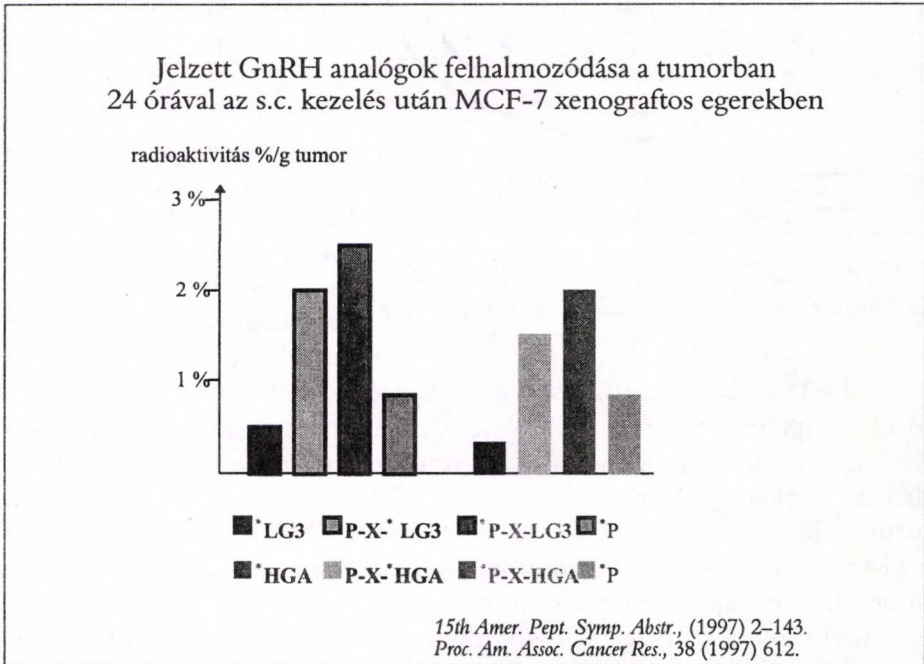
Tumormentes állatokban a radiojelzett anyagok szöveti megoszlásának vizsgálata azt mutatta, hogy a konjugálás megnövelte a különböző szervek szövetében a hormonanalógok biológiai felezési idejét (25. ábra).

Az előzőekben bemutatott eredményekkel összhangban a xenograftos állatoknál is a jelzett konjugátumoknak tumorokban mért radioaktív koncentrációja kb. ötszöröse volt annak az értéknek, amit a konjugátatlan szubsztanciával kezelt állatok tumorszövetében találtunk. Ezt mutatja a 26. ábra.





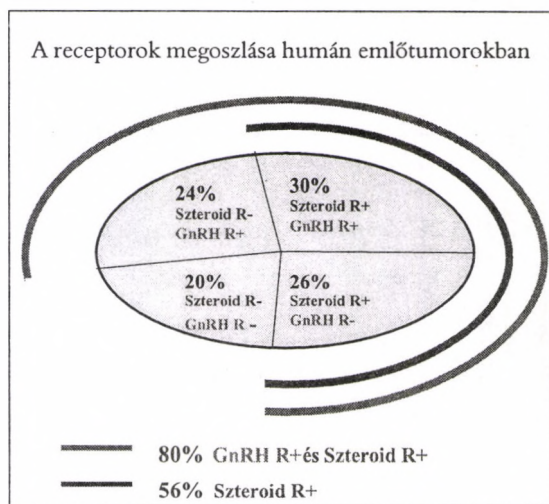
25. ábra. A konjugálás megnöveli a GnRH-III peptidhormon biológiai felezési idejét



26. ábra. A jelzett konjugátumok tumoros szövetben mért koncentrációja ötször magasabb, mint a nem konjugált peptideké

Fontos eredménynek tartjuk, hogy a kezelést követő 48. órában, a szervek közül – a vese után – a tumorer radioaktivitása bizonyult a legmagasabbnak, vagyis ezek az eredmények igazolják a készítmény retard, hosszan tartó hatását, és ezáltal lehetővé teszik a tumorgátláshoz szükséges állandó és magas hormonkoncentrációt.

A GnRH-analógok szelektív daganatellenes hatásának alapfeltétele a GnRH-receptorok jelenléte a tumorszövetekben. Az O. O. I.-ben primer emlődaganatos beteganyagban GnRH-receptor-meghatározást végeztek, a szteroid receptor- (ösztadiol receptor és progreszteron receptor) vizsgálatokkal párhuzamosan. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményeit szemlélteti a 27. ábra.



27. ábra. A GnRH-konjugátumok alkalmasak lehetnek a szteroid independens emlődaganatok kezelésére

Az ábrából a következő olvasható ki: a tumorszövetminták 54%-a bizonyult GnRH-receptor-pozitívnak. Emlőtumorok esetében szteroidreceptor-pozitivitást a minták 56%-ában tudták kimutatni. Az összes vizsgált emlődaganatos szövet 24%-a szteroid receptorra nézve negatív, míg GnRH-receptorra nézve pozitív volt. Mindezekből az a következtetés vonható le, hogy a direkt daganatellenes hatású GnRH analógok konjugátumai alkalmasak lehetnek ezen utóbbi szteroid independens emlődaganatos betegek kezelésére is.

Eddig különböző, GnRH-hormonokból levezethető tumorellenes peptidokkal kapcsolatos kutatásainkat és eredményeinket ismertettem. A továbbiakban röviden a 14 aminosavból álló natív szomatostatinból levezethető hepta- és oktapeptid analógjainkkal kapcsolatos eredményeinket szeretném bemutatni.

Mint ismeretes, a natív szomatostatin egy általános antiszokréción hormon, mely gátolja a növekedési hormon felszabadulását, de ezen túlmenően számos más endokrin szekréción (pl. glucagon-, insulin-, gastrin-), illetve sejtfunkción is gátol és szabályoz. Az elmúlt évek során a szomatostatin analógjainak különböző tumorsejtekre gyakorolt *in vitro* és *in vivo* gátló hatását is megfigyelték, azonban ezek antitumor ágensként történő alkalmazását – éppen a



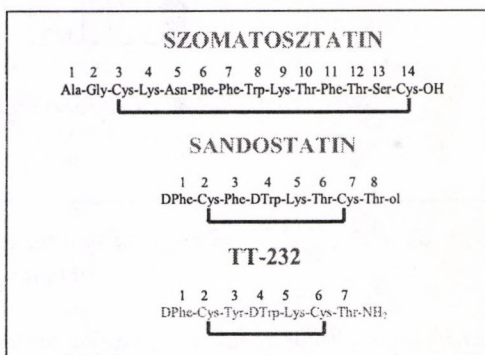
## Antitumor aktivitású peptidek

sokrétű biológiai hatása miatt – számos nemkívánatos mellékhatás akadályozta. Ma már ugyan két szomatostatin analóg is klinikai alkalmazásban van, mint antiszekrétációs hormon és egyéb analógokat is eredményesen alkalmaznak bizonyos hormonfüggő tumorok kezelésében, azonban még mindig világszerte intenzív kutatások folynak a szelektív hatású tumorelles szomatostatin analógok kifejlesztésére.

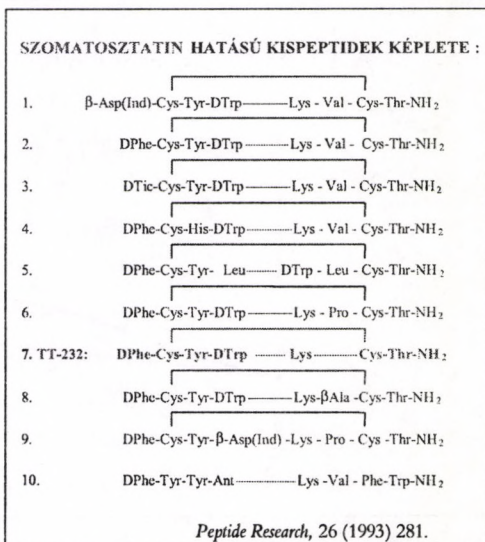
A mi érdeklődésünk akkor fordult a szomatostatin hatású kispeptidek előállítására felé, amikor ismeretessé vált, hogy a natív szomatostatin aktiválja a tirozin-foszfatazokat, és gátolja a tirozin-kináz-enzimet. Mi is számos új antitumor-hatású analógot állítottunk elő azzal a céllal, hogy a hormonhatás idejét, biológiai aktivitását és szelektivitását meg-növeljük. Alapvegyületnek a szomatostatin ismert ciklikus okta-peptidjét választottuk, és ezen a molekulán részben az irodalmi adatokra, részben saját eredményeinkre támaszkodva, szisztematikusan szubsztituens-cseréket hajtottunk végre. Ezeket az analógokat mutatja be a 28. ábra.

Az analógok kiválasztásánál a molekulák tirozin-kináz-gátló aktivitása és antiproliferációs hatása volt a fő szempontunk. Analógjaink egyike – a legjobb – egy hét aminosavból álló peptid, mely az irodalomból ismert analógokkal szemben nem hat, hanem öt aminosavrészből álló ciklust tartalmaz. Ezt a továbbiakban TT-232 jelű anyagnak neveztük el.

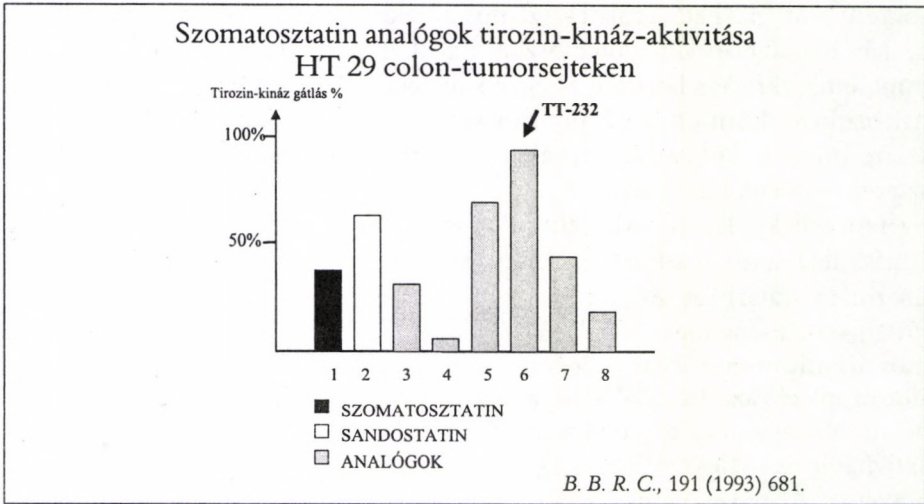
Ez a peptid a többiek közül jelentős tirozin-kináz- és sejtosztódást gátló hatása révén tűnt ki. 24 órás kezelés során a TT-232 erősen gátolta különböző humán vas-



28/a ábra

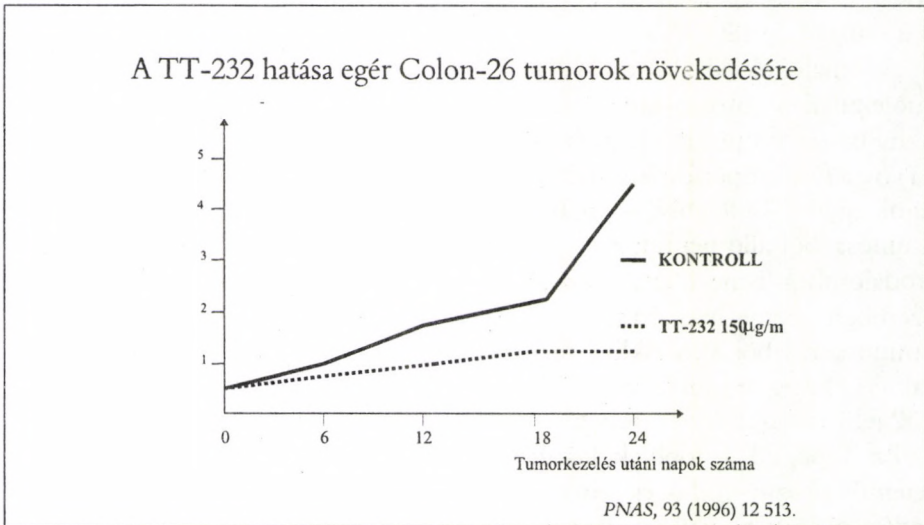


28/b ábra



29. ábra. A TT-232 erősen gátolja a humán vastagbél-tumorsejtek tirozin-kináz-aktivitását

tagbél-tumorsejtekben a tirozin-kináz-aktivitást, és ez a hatás jól korrelált a sejtosztódást gátló hatással, ugyanakkor sem in vitro, sem in vivo nem gátolta a növekedési hormon felszabadulását (29. ábra).



30. ábra. A TT-232 analóg tumorszelektív peptid gátolja a tumornövekedést és apoptozist indukál

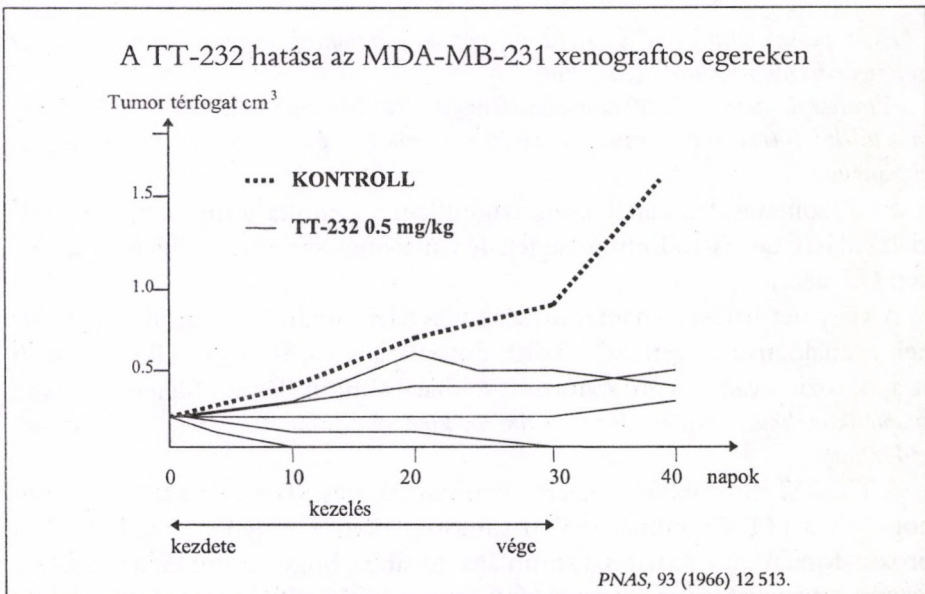


Kimutattuk továbbá, hogy a TT-232 nem kötődik a hipotalamuszban, a hipofízisben, illetve a cortexben, ezzel szemben jelentős mértékben kötődik a tumorsejtekhez, ami alátámasztja a szelektivitásra vonatkozó korábbi vizsgálatainkat. Kimutattuk azt is, hogy ez a tumorszelektív peptid *in vivo* különböző állatitumor-modelleken (S180 sarcoma, Colon26) jelentősen gátolja a tumor növekedését, és apoptozist indukál, melynek révén az állatok egy része tumormentessé vált (30. ábra).

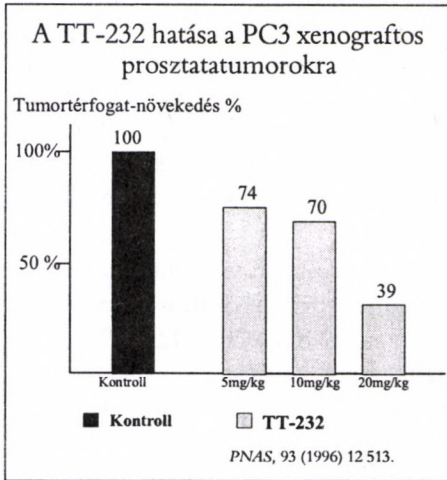
A gyógyszerre való fejlesztésre kiválasztott TT-232 jelű szomatosztatin analógunk erős antitumor-hatást mutatott számos további tumor-sejtvonalon (MCF-7 humán emlő-, PC3 humán prosztatata-, ill. SW 620 és HT 29 humán colon-tumorsejteken) *in vitro* kísérletben is. Ez az analóg a Cancer Research Institute mérései szerint 60 humán tumor-sejtvonalból 59-en hatásosnak bizonyult.

A TT-232 tumorgátló hatását MDA-MB-231 humán emlő xenograft modellen a 31. ábra szemlélteti.

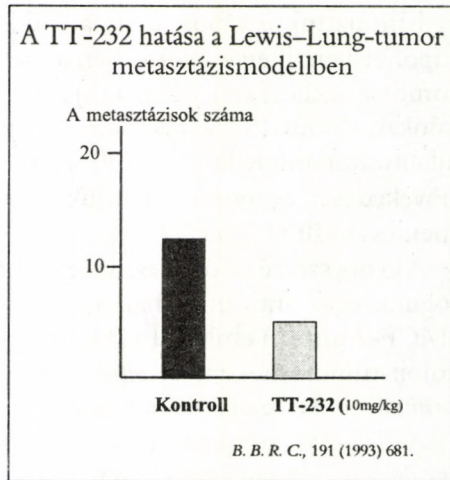
Látható, hogy a 30 napon át tartó kezelés során tumormentessé vált állatokat lehetett találni, viszont az egyes egerek TT-232-vel szembeni érzékenysége nagy különbségeket mutatott. A szomatosztatin analóggal szemben érzékenyebb xenograftos egerek esetében a tumor visszafejlődése, illetve a tumornövekedés 80%-os gátlása a kezelések beszüntetése után is megfigyelhető volt. A vegyület tumorgátló hatása a túlélés alapján is jelentős mértékű volt a kontrollcsoporttal szemben.



31. ábra. A TT-232 analóggal kezelt állatok egy része tumormentessé vált



32. ábra. A PC3 prosztatatumoron végzett TT-232-kezelés 60%-os tumorgátlást eredményezett, és a transzplantálás után 60 nappal a TT-232-vel a túlélés 100%-os volt



33. ábra. A TT-232 szignifikánsan gátolja a Lewis-tüdőtumorosejtek metasztázisát

PC3 prosztatatumoron TT-232-vel végzett háromhetes kezelés esetében 60%-os tumorgátlást tapasztaltunk (32. ábra).

A transzplantálás után 60 nappal a 20 mg/kg dózisban alkalmazott TT-232 hatására a túlélés 100%-os volt a mindössze 20%-os túlélést mutató kontroll állatcsoporthoz viszonyítva.

Ez a szomatosztatin analógunk szignifikánsan gátolta a tumor-metasztázis kialakulását Lewis-tüdőtumorosejtek lép-máj-metasztázismodelljében egereken (33. ábra).

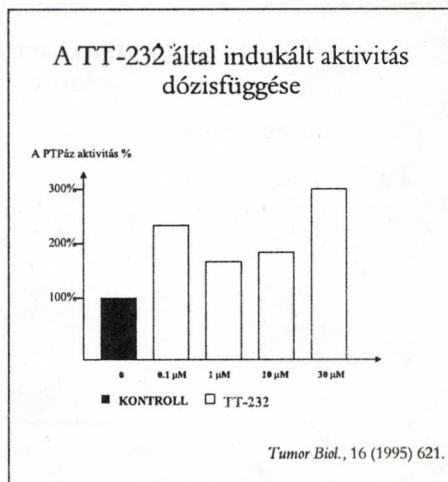
A vegyület hatásmechanizmusának vizsgálata során kimutattuk, hogy ennek az analógnak az igen széles körű, dózisfüggő és erős antiproliferatív hatása az apoptózis – vagyis a programozott sejthalál – indukálásával függ össze, és az apoptotikus hatás mediálásában a tirozin-kinázok gátlásának fontos szerepe van (34. ábra).

A TT-232 jeltovábbítási mechanizmusainak vizsgálata során az is kiderült, hogy pl. a HT-29 humán colon-tumorosejteken a vegyület rövid távon a tirozin-foszfátázok aktivitását stimulálja, továbbá, hogy hosszú távon gátolja a tirozin-kinázokat, és ez a hosszú távú tirozin-kináz-gátlás vezet apoptozishoz (35. ábra).





34. ábra. A TT-232 tumorgátló hatásában az apoptotikus hatás mediálásában a tirozin-kinázok gátlásának fontos szerepe van



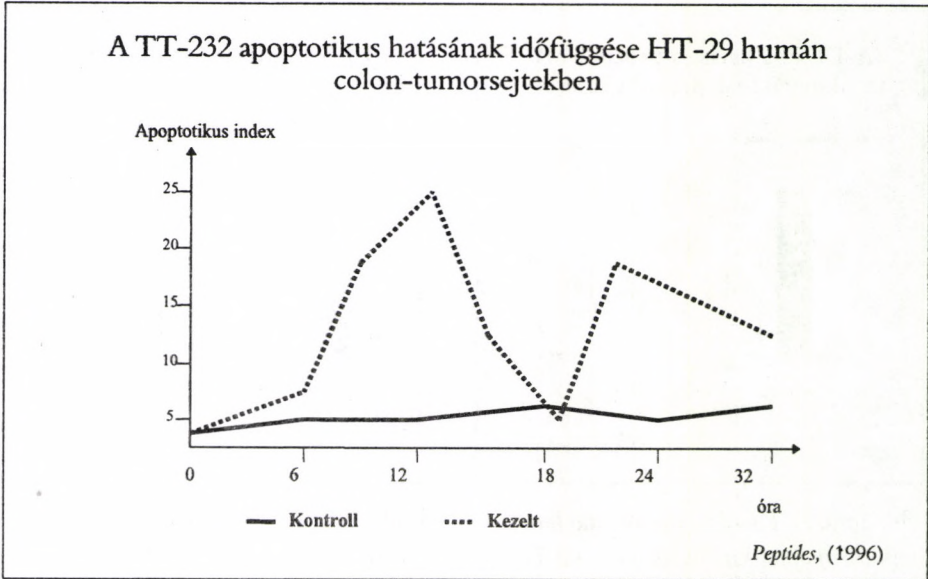
35. ábra. A TT-232 rövid távon stimulálja a tirozin foszfatázok aktivitását, hosszú távon viszont a tirozin-kináz gátlás vezet apoptozishoz

Az apoptozis-indukció időfüggését mutatja a 36. ábra.

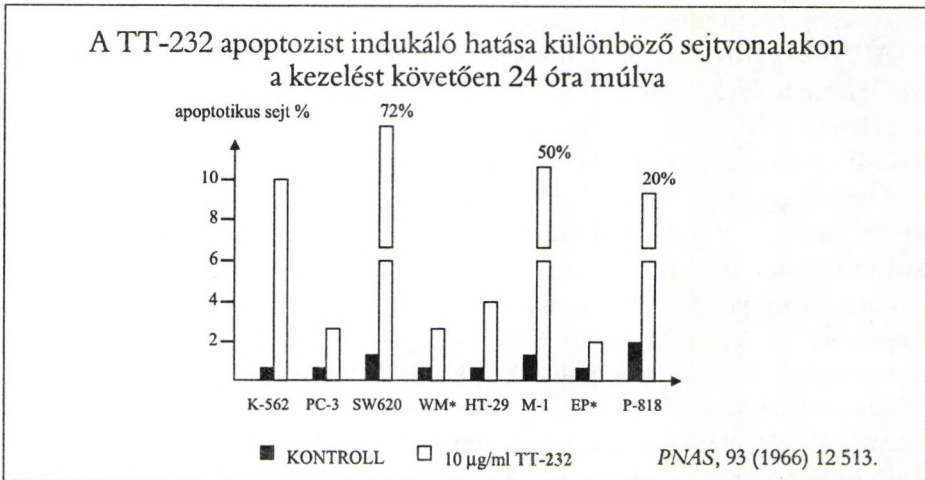
A TT-232 erős apoptozist indukáló hatását számos humán tumor-sejtvonalon kimutattuk (37. ábra).

Jelenleg a TT-232 a preklinikai kipróbálás stádiumában van, és gyógyszerre válásához komoly reményeket fűzünk.

Összefoglalva e kutatások jelentőségét és a kutatócsoportunk által elért eredményeket, elmondható, hogy míg korábban a peptidhormon-származékok antitumor-hatását csak a természetes hormonhatás következményeként – mintegy nem specifikus – mellékhatásnak tekintették, addig az általunk kifejlesztett, hormonális hatás nélkül ható GnRH-analógok és az igen széles körű antitumor- és tirozin-kináz-gátló hatással rendelkező, de hormonhatást szintén nem mutató szomatostatin analógok alapvető áttörést jelentenek az antitumor peptidek kutatásában. Nekünk sikerült először olyan újszerű peptidhormon-származékokat előállítanunk, melyek különböző in vitro és in vivo modelleken jelentős antitumor-aktivitással rendelkeznek, minden más endokrin hatás nélkül. Kimutattuk ugyanis, hogy az általunk előállított új peptidhormon-származékok nem az endokrin hatás közvetítésével fejtik ki in vivo antitumor-aktivitásukat. Ezek a peptidek nemcsak szelektíven gátolják bizonyos emlő-, ill. prosztata- és vastagbél-tumorsejtek osztódását, de megváltoztatják a jeltovábbítási mechanizmusait is, aminek eredményeként aktiválódik a programozott sejthalál (az apoptozis) mechanizmusa.



36. ábra. A TT-232 apoptozist indukáló hatása bifázikus



37. ábra. A TT-232 erős apoptozist indukáló hatását számos humán tumorsejtvonalon kimutattuk

A teljesség kedvéért, de valóban csak nagyon röviden, a daganatok ellen használt gyógyszerekkel szemben kialakuló széles körű gyógyszer-rezisztencia, az ún. MDR (Multi Drug Resistance) gátlására kifejlesztett peptidjeinkről



is szeretnék egy villanásnyi képet adni, mivel ezek is nagy jelentőségűek lehetnek.

Ismert ugyanis, hogy a rákos sejtek nagy része előbb vagy utóbb rezisztenssé válik a leghatékonyabb rákellenes szerekkel szemben is. Ennek a gyógyszer-rezisztenciának oka elsősorban az a P-glikoproteinnek nevezett membránfehérje, mely igen aktívan megakadályozza az általában hidrofób gyógyszer-molekuláknak a sejtekbe való beáramlását. Sikerült megfigyelni és számos *in vitro* kísérleti modellen bizonyítani, hogy az apoláris csoportokban igen gazdag, poláris csoportot pedig egyáltalán nem tartalmazó kispeptidek kompetitív módon képesek gátolni a transzportfehérjének is nevezett P-glikoprotein okozta rezisztenciát. Néhány hatékony analógunk képletét és két jellemző paraméterét a 38. ábra mutatja.

	MDR1 GÁTLÓ VEGYÜLETEK	$K_m$ (nM)	$T_{ret}$ (min)
1.	[BOC-Pro-Glu(OH)] <sub>2</sub> -Lys-OMe	>50000	1.1
2.	(Z-Pro) <sub>2</sub> -Lys-OMe	1650	1.6
3.	[BOC-Pro-Pro-Glu(OBzl)] <sub>2</sub> -Lys-OMe	100	2.8
4.	[BOC-Pro-Glu(OBzl)] <sub>2</sub> -Lys-OMe	40-50	3.4
5.	(Boc-Glu(OBzl)) <sub>2</sub> -DAB-OMe	30-40	3.6
6.	(Boc-Glu(OBzl)) <sub>2</sub> -Lys-OMe	20-30	3.9
7.	Boc-Asp(OBzl)-Lys(Z)-OtBu	50	5.3
8.	[BOC-Asp(OBzl)-Glu(OBzl)] <sub>2</sub> -Lys-OMe	20-60	11.1
9.	FMOC-Glu[Lys(Z)OtBu] <sub>2</sub>	10-20	12.5

*Peptides*, (1966) 234.

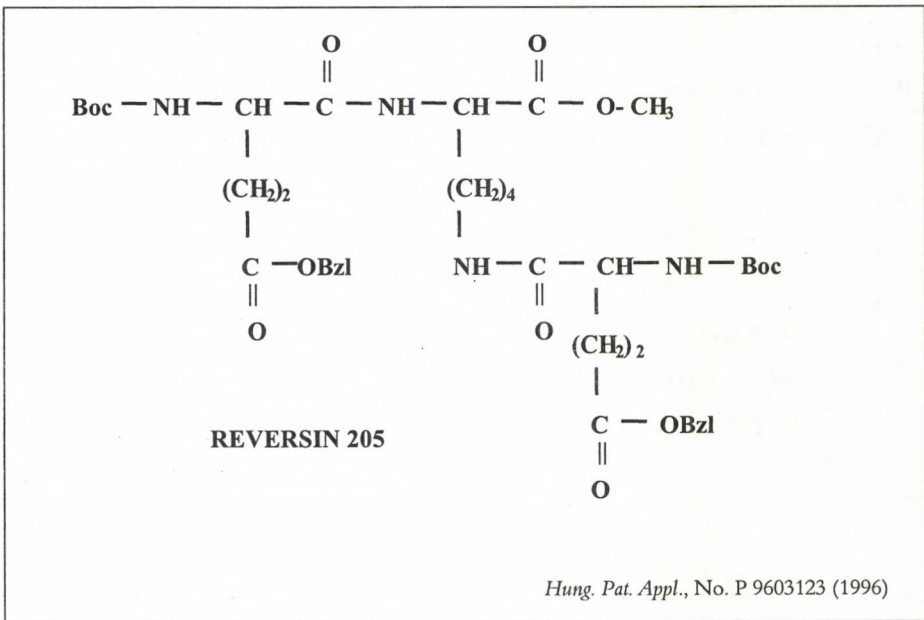
38. ábra. Az erősen hidrofób peptidek hatékonyan befolyásolják a tumorgátló gyógyszerek elleni rezisztenciát okozó MDR1 fehérje működését

Egyrészt szoros korrelációt lehet megfigyelni a fenti peptidjeink hidrofób jellegét tükröző HPLC-módszerrel meghatározott retenciós idő, valamint a peptidek biológiai hatását mutató ATPáz indukció aktivációs konstansai között, másrészt sikerült bebizonyítani, hogy ezek az erősen hidrofób peptidek hatékonyan gátolják a gyógyszerrezisztenciát okozó – a sejtmembránból kifelé irányuló – gyógyszer-transzportot. *In vitro* sejtmodelleken ugyanis sikerült

visszafordítani a rákos sejteknek eme rezisztens hatását, vagyis a peptidanalógjaink a P-glikoprotein – más néven MDR1 fehérje – működését gátolták, és ezáltal lehetővé vált a tumorellenes gyógyszer, például a vinkrisztin bejuttatása az egyébként vinkrisztinre rezisztens tumoros sejtekbe. Ennek következtében aztán azok el is pusztultak. E kísérleteket az Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Immunológiai Intézetrel, valamint kanadai kutatókkal együttműködve végeztük.

Két analógunk (a 6. és a 7. sorszámú analóg) hatásmechanizmusát több különböző módszerrel részletesen vizsgáltuk *in vitro* körülmények között, de ezeket az eredményeinket nincs idő részletesen ismertetni.

MDR-ellenes anyagaink *in vivo* vizsgálatai is elkezdődtek, és az előkísérletek szerint a peptidok önmagukban nem mutatkoztak toxikusnak, továbbá az NIH Cancer Research Institute kutatói által elvégzett kísérletekben a rezisztens daganatot hordozó egerek jelentős túlélését idézték elő.



39. ábra. A Reversin 205 jelű tripeptid tízszer aktívabb *in vitro*, mint a hasonló célra kifejlesztett 11 aminosavat tartalmazó CIKLOSPORIN

A 39. ábrán látható REVERSIN 205 jelű tripeptidszármazékunk az *in vitro* tesztekben 1-2 nagyságrenddel aktívabbnak bizonyult, mint a gyógyszer-rezisztencia ellen kifejlesztett és a klinikai kipróbálás stádiumában levő 11



aminosavból álló CIKLOSPORIN-analóg. Ez indokolta szabadalmaztatásukat, mivel jogosan feltételezhetjük, hogy a jövő ígéretes gyógyszerjelöltjeinek tekinthetők ezek a vegyületek.

És most szeretnék visszatérni a címben említett „Remények – realitások” szópárra. Mit is akartam ezzel kifejezni?

Szerettem volna kinyilvánítani azt a meggyőződésemet, hogy a kutató mindenütt a világon arról ismerhető fel, hogy:

- hisz abban, amit csinál,
- reméli, hogy kutatásai során eredményeket ér el,
- sőt a merészebbek (vagy az elvetemültebbek) még azt is remélik, hogy kutatásaik eredményei kézzelfogható gyakorlati haszonnal is járnak.

Ez utóbbi reményeknek a legtöbb esetben a *realitások* szabnak határt vagy állítanak leküzdhetetlen akadályokat. A realitásoknak két fajtája van:

- az egyik, amelynek a megjelenését a kőkemény objektív okok, mint pl. a fejlesztéshez szükséges pénzügyi háttér hiánya motiválja,
- a másik, amelyet erősen szubjektív okok irányítanak, nevezetesen az érdekellentét vagy éppen az érdekeltség hiánya motivál.

Mindkettő súlyos tünet, de a kettő együtt végzetes lehet a kutatási eredmények gyakorlati hasznosítása szempontjából.

Kutatócsoportunk ebből a szempontból nem tartozik a legszerencsésebbek közé, voltak ugyan kudarcaink, de azért megtanultuk a *realitásokat* tisztelni. E tisztelet mellett a reményeinket a jövőben sem adjuk fel. És ezt tudom ajánlani minden kutató kollégámnak.

Úgy gondolom, a jelenlévők előtt teljesen nyilvánvaló, hogy egy ilyen hatalmas munkát, amelyről az elmúlt egy óra alatt szóltam, és amelynek az időkorlát miatt csak a felületén, a legfelső rétegen tudtam kalandozni, kizárólag egy hosszú időn át együtt dolgozó, jól összeszokott, kiváló kutatókból álló team képes elvégezni. Éppen ezért először közvetlen munkatársaimnak szeretném megköszönni közreműködésüket, munkájukat. Közülük három munkatársamat szeretném név szerint és külön is említeni: dr. Kéri György a tudomány doktora, dr. Mező Imre, dr. Seprődi János Attila főmunkatársak, akiket nemcsak köszönet illet, hanem annak a ténynek a közlése is, hogy nélkülük ez a munka nem készülhetett volna el.

Gondolom, az is nyilvánvaló, és erre előadásom során többször is utaltam, hogy egy ilyen széles körű kutatási aktivitást és egymástól távol eső kutatási tevékenységet igénylő munkát csak jól összehangolt együttműködés keretében lehet megvalósítani, hiszen a bemutatott eredmények eléréséhez – mint azt láthattuk – szükséges volt a polimer kémiától az endokrinológiai kutatásokig, a jelzéstechnikától a tumorbiológiai kutatásokig számos kutatási terület együtt-

működése. Szerencsésnek mondhatjuk magunkat, mert mindig sikerült a legjobb partnert megtalálnunk a nélkülözhetetlen együttműködéshez. Szeretném nekik is megköszönni munkájukat, közreműködésüket. Úgyszintén a külföldi együttműködő partnereket is köszönet illeti.

S végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani a Magyar Tudományos Akadémiának, ezen belül is elsősorban a Biológiai Tudományok Osztályának, amiért érdemesnek tartott arra, hogy tagjai közé válasszon.