

Célzott tumorterápiára alkalmas peptid-hatóanyag konjugátumok szerkezetének optimalizálása

MEZŐ GÁBOR^{1,2}, BIRI-KOVÁCS BEÁTA^{1,2}, PETHŐ LILLA^{1,2}, SABINE SCHUSTER^{1,2}, KISS KRISZTINA^{1,2}, OLÁHNÉ SZABÓ RITA¹, IVAN RANĐELOVIĆ³, TÓVÁRI JÓZSEF³

¹Magyar Tudományos Akadémia, Eötvös Loránd Tudományegyetem, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, ²Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, ³Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály, Budapest

Pályázati forrás: A kutatást a Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Hivatal támogatta a „Nemzeti versenyképességi és kiválósági program” keretében (NVKP_16-1-2016-0036).

Levelezési cím:

Dr. Mező Gábor, Magyar Tudományos Akadémia, Eötvös Loránd Tudományegyetem, MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A., tel.: +3613722500, e-mail: gmezo@caesar.elte.hu

Közlésre érkezett:

2019. szeptember 16.

Elfogadva:

2019. október 21.

A magas mortalitású tumorok esetében hatékony gyógymód hiányában szükség van új, innovatív gyógyítási eljárásokra. Ezen a területen jelentős áttörést hozhat a célzott tumorterápia, amely azon alapul, hogy a hatékony tumorellenes szert olyan irányítómolekulához (pl. peptidhez) kapcsoljuk, amely nagy szelektivitással ismeri fel a tumorspecifikus vagy a tumorsejteken nagy mennyiségben megjelenő receptorokat/antigéneket. Egy ilyen konjugátum hatékonyságát számos paraméter befolyásolja. Így az irányítómolekula szerkezete, a kapcsolódó hatóanyag típusa, száma, a konjugátumban elfoglalt helyzete és a hatóanyag kémiai kapcsolódásának módja az irányítómolekulához mind olyan tulajdonságok, amelyek befolyásolják a receptorkötődést és a sejtbejutást, továbbá a szabad hatóanyag, vagy aktív metabolitjának felszabadulását és lokalizációját a sejtekben. Az NVKP_16-1-2016-0036 pályázat keretében végzett munkánk során a magas mortalitású tumorok ellen próbálunk kifejleszteni megfelelő konjugátumokat. Az itt közölt néhány példán keresztül mutatjuk be azt a kutatási folyamatot, amelynek során az egyes konjugátumokat optimalizáljuk a minél hatékonyabb gyógyszerjelöltek előállítására érdekében. *Magy Onkol* 63:290-300, 2019

Kulcsszavak: gyógyszer célba juttatása, célzott molekula-terápia, peptidkönyvtár, vastagbél-neoplázia, glioblasztóma

In case of cancers with high mortality rate and lacking efficient medication there is a huge need of new, innovative treatments. Targeted tumor therapy, a real breakthrough in this field, is based on the concept that the antitumor agent is linked to a targeting molecule (e.g. peptide) specifically recognizing receptors or antigens that are tumor specific or overexpressed by tumor cells. The efficiency of this conjugate can be influenced by several factors. Among these, the structure of the targeting device, the type and number of the antitumor drug, its position in the conjugate and the chemical bonding of the drug to the targeting molecule are all important features that can determine receptor affinity and cellular uptake, and also the release and the cellular localization of the free drug or its active metabolite. Our goal in the framework of the grant NVKP_16-1-2016-0036 was to generate conjugates against cancers with high mortality rate. Through the below described studies, we introduce the course of the research process through which conjugates are optimized in order to develop more efficient drug candidates.

*Mező G, Biri-Kovács B, Pethő L, Schuster S, Kiss K, Oláhné Szabó R, Randelović I, Tóvári J. Optimization of peptide-drug conjugates for targeted tumor therapy. *Magy Onkol* 63:290-300, 2019*

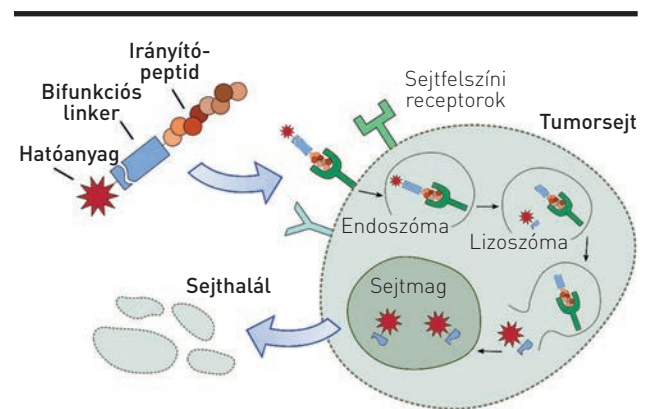
Keywords: drug delivery systems, molecular targeted therapy, peptide library, colonic neoplasms, glioblastoma

BEVEZETÉS

Magyarországon, hasonlóan a fejlett országokhoz, a második vezető halálok a rák. Hatékony gyógymód hiányában a magas mortalitású tumorok esetében szükség van új, innovatív gyógyítási eljárásokra. Ezen a területen jelentős áttörést hozhat a célzott tumorterápia. Ennek lényege, hogy a gyógyszert egy, a tumorsejteket nagy szelektivitással felismerő komponens segítségével juttatjuk a sejtekbe, így az egészséges szövetek megkímélhetők, és a mellékhatások visszaszorításával a beteg életminősége kevésbé romlik a kezelés során. A célzott terápiára alkalmazott konstrukciók többsége 3 komponensből áll: a hatóanyagból, az irányító-molekulából és az ezeket összekapcsoló egységből (1, 2). A klinikumban eddig bevezetett gyógyszerekben mesterséges ellenanyagokat alkalmaznak a tumorelles hatóanyag szállítására és célba juttatására. Ezek az ellenanyag-hatóanyag konjugátumok (Antibody Drug Conjugates; ADCs) nagy specifitással ismerik fel az adott tumorsejteket, és hosszú ideig, akár egy-két hétig is kimutathatók a véráramban. Azonban a pozitív hatásai mellett e készítmények gyenge pontja, hogy a tumorszövetben kedvezőtlen a penetrációjuk, esetleg nem kívánt immunválaszt válthatnak ki, és nagyon magas az előállítás költségek. További probléma, hogy viszonylag kevés drogmolekula (átlagban 2–4) kapcsolható egy ellenanyag-molekulához, ami nem mindig elég a megfelelő tumorelles hatás kiváltásához. Az ezzel kapcsolatos jelenleg folyó kutatások egyik fő törekvése, hogy miként lehetne több hatóanyag-molekulát kapcsolni az ellenanyagokhoz (3). Mindezeket figyelembe véve egyre nagyobb figyelem irányul a peptidalapú irányító-molekulákra, amelyek képesek nagy specifitással kötődni a tumorsejteken lévő receptorokhoz. A kismolekula-hatóanyag konjugátumokhoz hasonlóan (Small Molecule Drug Conjugates; SMDCs) a peptidhordozó-hatóanyag konjugátumokkal végzett kísérletek is biztatóak (4). Azonban a tumorsejteken lévő receptorok korlátozott száma miatt (általában néhány száz fmol/cm²), az egyetlen konjugátummal végzett kezelés nem mindig vezet eredményre. Ezért – hasonlóan a kemoterápiához – kombinált kezelés lehet a megoldás. Ebben az esetben ez azt jelenti, hogy különböző receptorokat felismerő irányító-molekulákhoz különböző hatóanyagokat (lehetőleg különböző hatásmechanizmussal rendelkező gyógyszereket) kapcsolunk, és a velük végzett kombinált kezeléssel próbáljuk meg a hatást fokozni (5, 6).

A Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) 2016-ban kiírt „Nemzeti versenyképességi és kiválósági program” (NVKP_16) pályázat keretében jelentős összeggel támogatott olyan innovatív megoldásokat eredményező kutatásokat, amelyek a „Kiemelkedő halálozási kockázattal járó betegségek gyógyításának eredményességét lényegesen javító nemzeti program” céljainak megfelelően, e betegségcsoportok gyógyításában hozhatnak meghatározó új eredményeket. Az Eötvös Loránd Tudományegyetem (ELTE) Kémiai Intézete és az ott működő MTA-ELTE Peptid-kémiai Kutatócsoport Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadó

vezetésével létrehozott egy konzorciumot, amelynek tagja a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézete (Dr. Kőhidai László vezetésével) és a ComInnex Kutatás Fejlesztési Zrt. (Dr. Bertók Béla vezetésével), akik sikeresen pályáztak a támogatásra (NVKP_16-1-2016-0036) (7). A konzorcium arra vállalkozott, hogy három olyan vegyület-tárát állít elő (1. tumorelles hatóanyagok; 2. irányító-molekulák; 3. az előző kettőt összekapcsoló bifunkciós linkerek), amelyek nagy variabilitással kapcsolhatók egymáshoz, így akár 100 különböző gyógyszerjelölt molekulát is könnyen elő lehet állítani. Ezek a gyógyszerjelöltek alkalmasak lehetnek a magas mortalitású tumorok hatékony, személyre szabott, célzott terápiájára (1. ábra).



1. ÁBRA. A tumorspecifikus peptidhordozó-hatóanyag konjugátumok felépítésének és lehetséges hatásmechanizmusának sematikus ábrázolása. A peptidhordozó specifikusan kötődik a tumorsejtek felszínén megtalálható receptorhoz. A receptor és a ligandum (konjugátum) endocitózissal internalizálódik a sejtekbe, a lizoszómákba kerülve a bifunkciós linker enzimek és a savas közeg hatására elbomlik, a hatóanyag felszabadul és kifejti hatását

Tekintettel arra, hogy számos tumortípus kezelését kell így megoldani, érdemes nagyszámú kombinációt kialakítani. Kutatásunkban tehát arra teszünk kísérletet, hogy olyan vegyület-tárakat hozzunk létre, amelyekben az elemek sokféle kombinációban kapcsolhatók egymáshoz, növelve a célzott tumorterápiára alkalmas konjugátumok tárházát. Az első tár a már ismert és újonnan általunk kifejlesztetni kívánt hatóanyagokat tartalmazza (ez utóbbiak szabadalmi szempontok miatt itt nem kerülnek publikálásra), a második tár a bifunkciós linkerek csoportja lesz, amelyek a kapcsolatot biztosítják a hatóanyag és az irányító-molekulák között, a harmadikba pedig a vizsgálni kívánt tumorsejtek felszínén lévő receptorokat felismerő, peptidalapú irányító-molekulák tartoznak. Ezen elemekből kívánunk számos konjugátumot létrehozni és tumorelles hatásukat vizsgálni.

A vegyületek tervezésénél figyelembe kell venni, hogy egy ilyen konjugátum tumorelles hatása számos tényezőtől függ. Ezért a következő szempontokat érdemes szem előtt

tartani. Az egyik legfontosabb, de persze nem elégséges feltétel, hogy az irányítómolekula nagy szelektivitással és affinitással kötődjön a tumorsejtek felszínén megjelenő, tumorspecifikus vagy túltermelődött receptorokhoz, és az így kialakult konjugátum-receptor komplex hatékonyan internalizálódjon a sejtekbe (sejtbejutási képesség). Ezt a kötődést befolyásolhatja a peptid szekvenciája/szerkezete, a hozzá kapcsolódó linker és drog típusa, száma és helyzete. Fontos, hogy a konjugátum a keringésben lehetőleg stabil legyen, ugyanakkor a sejtekbe jutva a lizoszómákban degradálódjon és a megfelelő szabad hatóanyag vagy annak aktív metabolitja szabaduljon fel. A keletkező termék szerkezete szintén befolyásolhatja a hatóanyag lokalizációját a sejten belül, ami szintén hathat a konjugátum aktivitására. Mindezek alapján az előállított konjugátumokat nagyon sokféle vizsgálatnak kell alávetni. Így például vizsgáljuk a tumorsejtek receptor-készletét (Western-blot), a konjugátumok *in vitro* citotoxicitását (sejt-életképességi esszék), sejtekbe jutásukat (áramlási citometria, konfokális mikroszkópia), plazmastabilitásukat és lizoszomális lebomlásukat, a keletkező termékek szerkezetét (HPLC-MS), valamint a hatékony anyagok *in vivo* akut és krónikus toxicitását, tumorelles hatását egereken, illetve különböző szerveken megfigyelt toxicitását, érzékdést és metasztázist gátló hatását. Egy-egy kiragadott példán keresztül szeretnénk a következőkben bemutatni ezt a sokrétű kutatási folyamatot.

AZ IRÁNYÍTÓPEPTID KIVÁLASZTÁSA

A tumorsejtek felszínén található receptorok egy részéről, illetve azok funkciójáról számos ismerettel rendelkezünk. Így például több peptidhormon receptoráról kimutatták, hogy a tumorsejtekben nagyobb mértékben expresszálódnak, mint normális sejtekben, így ezek alkalmasak lehetnek az adott peptidhormonhoz kapcsolt hatóanyag nagy szelektivitással történő tumorsejtbe juttatására. Ilyen peptidhormonok lehetnek pl. a gonadotropin-releasing hormon (GnRH), a szomatostatin, a bombezin, a melanocitastimuláló hormon (α -MSH) vagy a neurotensin. Tumortípustól és a tumor receptor-készletétől függően egyik vagy másik alkalmazása lehet előnyös. E hormonok egy része (pl. GnRH és szomatostatin) önmagában is tumornövekedést gátló hatással rendelkezik. Mások esetében olyan antagonistá hatású származékokat kell előállítani, amelyek a natív hormonnal ellentétben gátolják a tumornövekedést. Elsősorban a gátló hatású peptidok lehetnek alkalmas hordozók a hatóanyagok célba juttatására, különösen a hormonfüggetlen szolid tumorok esetén. Ezek a peptidok a tumorterápia szempontjából elég jól feltérképezettek és sok peptid-hatóanyag konjugátumot készítettek belőlük, amelyek egy részét már klinikai vizsgálatok valamelyik fázisában is tesztelték. Ugyanakkor még mindig van lehetőség ennél is hatékonyabb variánsok előállítására [5, 6].

Egy másik lehetőség a tumorsejteken lévő célpontok és ligandumaik feltérképezésére az irányított evolúció egyik fajtája, az ún. fágbeutató technika. Az eljárás lényege, hogy

a vizsgálni kívánt peptidszekvenciákat kódoló gént a peptid kifejezésére használt bakteriofág génjéhez illesztik, így ez a peptidszakasz kifejeződik a bakteriofág burokkéregjében. Minden egyes fág egy peptidet fog kifejezni, és a fágban található örökítőanyag tartalmazni fogja az adott peptidet kódoló nukleinsavat. A felszínükön különböző peptideket megjelenítő fágok közül szelekciós eljárással lehet a legmegfelelőbbeket kiválasztani, ami általában kötődési teszten alapul. A megfelelő szelekcióhoz egy adott irányítópeptidet kifejező fágból kb. 100 kópiát használnak, így egy hét aminosavat prezentáló fágkönyvtár, figyelembe véve a 20 természetes aminosav maximális számú variációit, 10^{11} fágból állhat. Minél több szelekciós lépést hajtanak végre, annál nagyobb a valószínűsége annak, hogy a legjobban kötődő peptideket lehet kiválasztani. Természetesen a szelekció sikeressége függhet attól is, hogy az összes lépést *in vitro* végzik sejteken, vagy kombinálják az *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* körülményeket. Az utóbbiak bonyolultabb és drágább, de megbízhatóbb eredményt szolgáltató eljárások. A megfelelő irányítómolekulák kiválasztásához használhatnak hosszabb vagy rövidebb peptideket bemutató fágokat [8]. A módszerrel számos olyan peptidet sikerült kifejleszteni, amelyek nagyon hatékonyan tudnak a tumorsejtek felszínén lévő molekulákhoz kötődni. E molekulák egy részéről igazolták, hogy mely fehérjék ezek, más esetekben ez még nem sikerült. Egy azonban tény, hogy a legtöbb, irodalomban publikált, fágkönyvtár segítségével kiválasztott peptidszekvencia szerkezetének optimalizálására nem került sor, noha a módszer nem garantálja, hogy a legmegfelelőbb peptid kerül szelektálásra. Ezért ezek a peptidok különböző módszerekkel (aminosavcsere, lánchrövidítés vagy éppen -hosszabbítás, ciklizálás stb.) módosíthatók egy még hatékonyabb szerkezet elérése érdekében. Munkánk egyik lényeges pontja, hogy ilyen, az irodalomban leírt peptidok szerkezetmódosításával még hatékonyabb irányítómolekulákat állítsunk elő.

A GnRH-HORDOZÓ PEPTID SZERKEZETÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA

A humán gonadotropin-releasing hormon a hipotalamuszban termelődő decapeptid, amelynek a szekvenciája Gln-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (ahol a Gln piroglutaminsavat jelent), és elsődleges funkciója a reprodukcióban részt vevő más hormonok szekréciójának a szabályozása. Mivel azonban a tumorsejtek az egészséges sejtekhez és szervekhez képest jelentősen nagyobb mennyiségben expresszálják a GnRH-receptorokat, a GnRH-analógok hatékony irányítómolekulák lehetnek. Számos GnRH-analógnak (agonisták és antagonisták) önmagában is jelentős proliferációgátló hatása van [9, 10]. A szekvenciában a Gly cseréje nagy térkitöltésű apoláros oldalláncot tartalmazó D-aminosavakra (pl. D-Leu [leuprolid], D-Trp [triptorelin]) szuperagonista vegyületeket eredményez [11]. Amennyiben tumorelles hatóanyagot akarnak kapcsolni a GnRH-hoz, akkor a 6-os pozícióban a Gly-t D-lizinre cserélik (zoptarelin), így annak

oldallánc-aminocsoportja konjugációs helyként alkalmas a drog kapcsolására egy megfelelő linker keresztül. Az eddig legsikeresebb konjugátumban a doxorubicin kapcsolódott egy glutársav linker keresztül a [D-Lys⁶]-GnRH peptidhez [12]. A zoptarelin-doxorubicin eljutott a klinikai III. fázisba, azonban itt megszakadtak a kísérletek, mert nem tapasztaltak hatásvnövekedést és egyéb pozitív hatást a szabad hatóanyaghoz képest [13]. Ennek oka lehet, hogy ebben a vegyületben a doxorubicin és a glutársavlinker között észterkötés található, ami a véráramban lévő észterázok hatására is bomolhat, így még a célsejtekbe jutás előtt a konjugátum jelentős része komponenseire eshet szét. Ezért a mi kísérleteinkben új megközelítést alkalmaztunk.

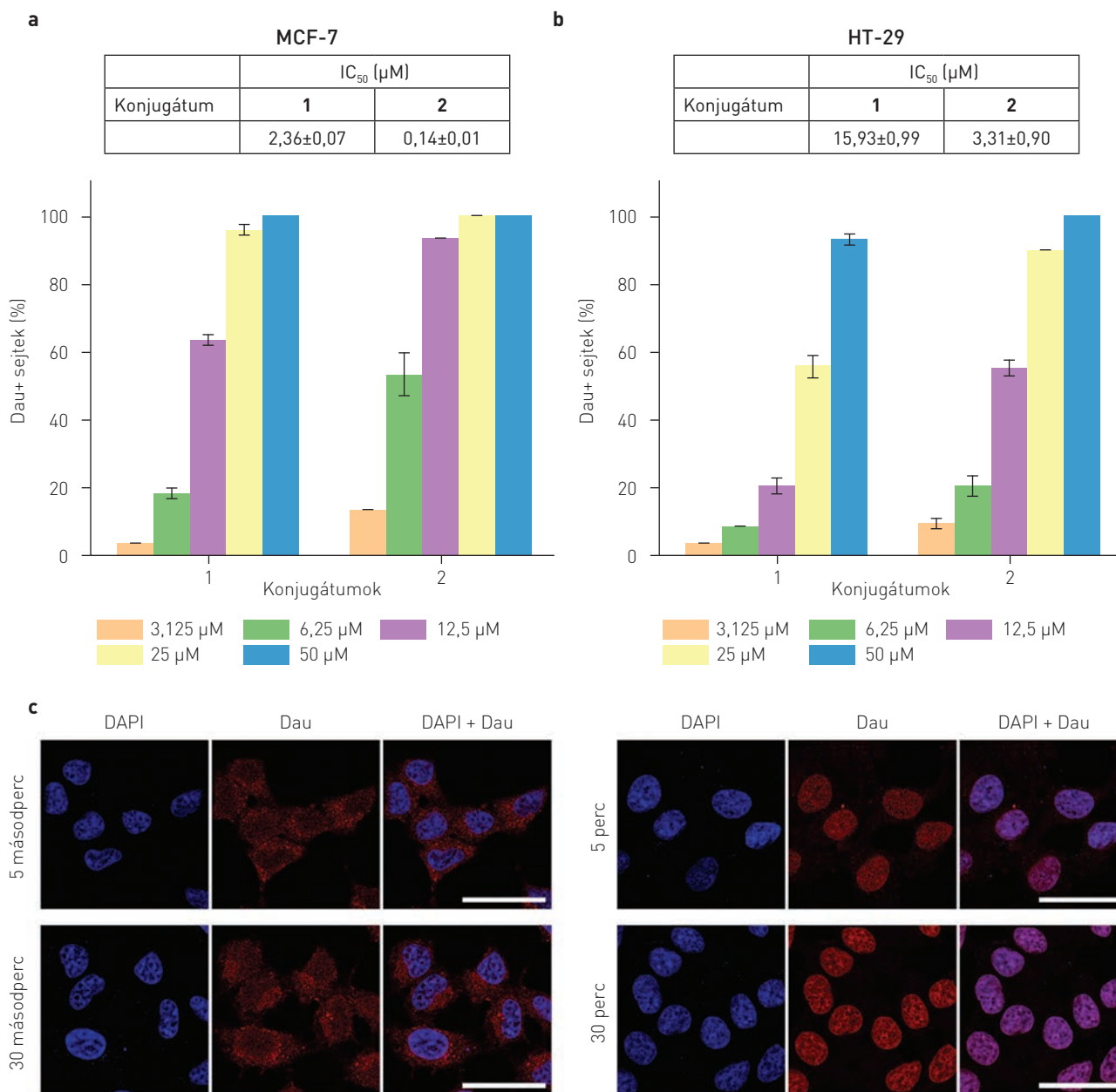
Az első fontos változtatás az volt, hogy a humán GnRH (hGnRH vagy GnRH-I) helyett egy másik természetes GnRH-izomert, a nagy tengeri ingolából (sea lamprey) izolált GnRH-III (IGnRH-III) peptidet alkalmaztuk [14]. Ennek a peptidnek a szekvenciája csak négy aminosavban tér el a GnRH-I szekvenciájától (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂), tehát a receptorkötődéshez fontos terminális aminosavak azonosak. Ennek megfelelően hatékonyan kötődnek a GnRH-receptorokhoz, ugyanakkor hormonhatásuk emlősökben elhanyagolható. Ez fontos szempont, mert így a hormonális mellékhatások elkerülhetők a tumorok kezelésénél, ami különösen a hormonfüggetlen tumorok gyógyításánál lehet előnyös. A szekvencia 8-as pozíciójában található Lys alkalmas konjugálási hely, így a hatóanyag kapcsolásához nincs szükség újabb aminosavcserére [15]. A második lényeges változtatásunk az volt, hogy a véráramban instabil észterkötés helyett oximkötést vezetünk be, és ennek segítségével kapcsolunk daunorubicint a funkcionális (aminooxiacetil-csoporttal módosított) GnRH-III-hoz (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂, ahol az Aoa aminooxiacetil-csoportot, a Dau daunorubicint jelent) [16]. Kimutattuk, hogy ez a konjugátum a vérplazmában akár 24 óráig is stabil, ellenben lizoszóma-homogenátumban gyorsan felszabadul a legkisebb hatóanyagot tartalmazó metabolit, a H-Lys(Dau=Aoa)-OH, amely vizsgálataink szerint kisebb affinitással, mint a daunorubicin, de hatékonyan kötődik a DNS-hez. Az így előállított konjugátum tumorelles hatása azonban két nagyságrenddel kisebb volt, mint a zoptarelin-doxorubicin aktivitása. Ezért a GnRH-III peptid szerkezetét úgy próbáltuk módosítani, hogy jelentős hatásvnövekedést érjünk el.

Nem részletezve a változtatásokkal előállított kb. 40 vegyületet, a két legaktívabb származékot mutatnánk be. A legnagyobb lépést azzal értük el, hogy a 4-es helyzetbe az oldalláncán vajsavval acilezett lizint (-Lys(Bu)-) építettünk be (Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂), ami közel egy nagyságrenddel növelte a konjugátum tumorelles hatását HT-29 humán vastagbél-tumor-sejteken és valamivel kisebb mértékben MCF-7 humán emlőtumor-sejteken [17]. Ez elsősorban a nagyobb sejtbejutási képességgel volt magyarázható. Érdemes megjegyezni, hogy ez

a hatásvnövekedés akkor volt jelentős, ha viszonylag rövid (6 óra) kezelést alkalmaztunk, majd a konjugátum sejtekről történő lemosása után további 66 órát inkubáltuk a sejteket friss médiumban. Azonban, ha a kezelést 24 órára növeltük, akkor ez a különbség jelentősen csökkent, igazolva azt, hogy az eredeti konjugátum lassabban jut be a sejtbe, de egy bizonyos idő után eléri a sejtben a megfelelő hatáshoz szükséges koncentrációt. A Lys(Bu) egységgel módosított konjugátum esetén a kezelési idő növelésével már nem lehetett jelentős hatásvnövekedést elérni.

A következő jelentős hatékonyságjavulást egy olyan konjugátummal sikerült elérni, amelyben a GnRH-analóg 3-as pozíciójában a Trp aminosavat irodalmi analógia alapján egy D-Tic (Tic: 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin-3-karbonsav) nem természetes aminosavra cseréltük, és egyben a 2-es helyzetű hisztidint elhagytuk [18]. A kapott konjugátumot (Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂) 23 különböző tumortípust vizsgálva (MTT-teszt) és összehasonlítva a Lys(Bu) egységgel módosított GnRH-III-konjugátummal kijelenthető, hogy valamennyi vizsgált tumortípuson általában 3–5-szörös hatékonyságvnövekedést értünk el. A D-Tic aminosavat tartalmazó konjugátum valamennyi általunk vizsgált tumor-sejten (emlő-, prosztata-, ovárium-, fej-nyaki és tüdő-tumorok, illetve glioblasztóma- és melanómasejtek) – kivéve a Panc-1 hasnyálmirigy-tumor és az MRC-5 normális fibroblaszt kontroll sejteket – 1–10 µM közötti IC₅₀-értékeket eredményezett. Már a korábbi vezérmolekulánk (Lys(Bu)-t tartalmazó, továbbiakban **1**-gyel jelölt) is hatékonyabban jutott be a tumor-sejtekbe (áramlási citometriával mérve), mint a natív GnRH-III szekvenciát tartalmazó konjugátum, de ez tovább fokozódott a D-Tic-tartalmú konjugátum esetén (**2**), különösen az alacsony koncentrációknál (3,125–12,500 µM). Ez azért jelentős, mert megfigyeléseink alapján a 10 µM feletti koncentrációk esetén nő a nem specifikus sejtbejutás mértéke. Az MCF-7 humán emlőtumor- és HT-29 humán vastagbél-tumor-sejteken végzett citotoxicitási és sejtbejutási vizsgálatok eredményei a *2. ábrán* láthatóak.

Korábban már kimutattuk *in vivo* vizsgálatokban, hogy a 4-es helyzetben Ser helyett rövid szénláncú zsírsavval acilezett Lys beépítése fokozta a tumornövekedés-gátlást ortotopikusan egerekbe beültetett HT-29 humán vastagbél-tumor-sejtek esetében (~30%-kal nagyobb tumornövekedés-gátlás) [19]. A mostani kísérleteinkben a korábban legjobbnak talált Lys(Bu)-t tartalmazó konjugátumot (**1**) hasonlítottuk össze a D-Tic-tartalmú konjugátummal (**2**) azonos *in vivo* rendszerben. Az új konjugátum sem mutatott akut (1×50 mg Dau-tartalom/ttkg), illetve krónikus toxicitást (5×15 mg Dau-tartalom/ttkg). A SCID egereket a tumorbeültetést követő 7. napon kezdtük el kezelni a konjugátumokkal és a szabad daunorubicinnel. A konjugátumokkal összesen 7 kezelést végeztünk (10 mg Dau-tartalom/ttkg) 3–4 naponta, míg a szabad hatóanyaggal heti egyszer, összesen 3 kezelést tudtunk elvégezni (1 mg/ttkg) a toxikus mellékhatások elkerülése érdekében. Ennek ellenére az egerek súlya a 15.



2. ÁBRA. GnRH-III-konjugátumok (1: Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂ és 2: Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂) citotoxicitási és sejtbetűtési vizsgálata MCF-7 humán emlő- és HT-29 humán vastagbél-tumor-sejteken. a, b) Cito-toxicitási vizsgálatok (MTT-teszt) során kapott IC₅₀-értékek a konjugátumokkal történő 24 órás inkubáció (+48 óra) után, illetve a konjugátumok sejtbetűtésének összehasonlítása áramlási citometria segítségével (6 órás inkubációt követően). c) A 2-es számú konjugátum sejtbetűtését az idő függvényében konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A daunorubicinnel (Dau) konjugált peptid pirossal, a sejtmagfestés (DAPI) kék színnel látható. A vonalas mérték 20 μm-t jelöl

naptól kezdve jelentősen csökkent, így a kísérleteket a 30. napon be kellett fejeznünk. A konjugátumokkal kezelt egerek súlya lényegesen nem változott a kísérlet ideje alatt.

A tumorok kioperálása után valamennyi kezelt állat esetében jelentős tumornövekedés-gátlást figyelhettünk meg.

A szabad Dau esetén átlagban 84,3%, a Lys(Bu)-t tartalmazó konjugátummal (1) 80,8%-os, míg a D-Tic-et tartalmazó konjugátummal (2) 87,1%-os gátlást detektáltunk. Tehát az új konjugátum még a szabad hatóanyagnál is hatékonyabban tudta gátolni a tumornövekedést az adott alkalmazható

dózisok mellett. Továbbá amíg a konjugátumokkal kezelt állatokban 5–8%-kal nagyobb volt a máj tömege a kezeletlen kontrollhoz képest, addig a szabad daunorubicinnel kezelt állatoknál jelentős, átlagban 32,8%-os májtömegcsökkenést figyeltünk meg (1. táblázat). Mindezek alapján elmondhat-

hogy a Val, a Leu és a Tyr aminosavak alaninra történő cseréje a tumorelles hatás jelentős csökkenéséhez vezet. Azonban, ha heptapeptid 4-es pozíciójában a Gly-t cseréltük Ala-ra (Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH₂; IC₅₀: 24,1±1,6 μM), kétszer olyan aktív konjugátumhoz jutottunk, mint a kiindulási

1. TÁBLÁZAT. GnRH-III-konjugátumok (1: Glp-His-Trp-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂ és 2: Glp-D-Tic-Lys(Bu)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂) és daunorubicin (Dau) hatása ortotopikusan egerekbe (n=6/csoport) ültetett HT-29 humán vastagbél-tumorsejtek vizsgálata során

	Kontroll	Dau	1	2
Testtömeg (g, 7. nap)	24,48±2,36	24,33±0,61	23,58±1,44	24,98±1,04
Testtömeg (g, végső)	18,97±2,44	18,15±1,22	20,75±2,54	22,80±1,18
Tumortömeg (g)	0,2442±0,194	0,038±0,030	0,047±0,017	0,032±0,019
Májtömeg (g)	0,812±0,132	0,546±0,110	0,879±0,161	0,857±0,116
Máj-testtömeg arány (%)	4,25±0,18	3±0,52	4,22±0,44	3,78±0,43

A kezelés a tumortranszplantációt követő 7. napon kezdődött 10 mg/ttkg Dau-tartalom (1-es és 2-es konjugátumok) vagy 1 mg/ttkg (Dau) adagolásával. A kísérletet terminálni kellett a 23. (Dau-csoport) vagy a 30. napon (1-es és 2-es konjugátumokkal kezelt csoportok esetén). Ezt követte a tumorok és a máj tömegének mérése, illetve a proliferációs index (Ki-67 alapján) meghatározása

juk, hogy a GnRH-III-analógokkal készített konjugátumok kevesebb mellékhatás mellett a szabad hatóanyaggal összemérhető tumornövekedés-gátló hatással rendelkeznek [20]. Egyben ez a kísérletsorozat arra is jó példa, hogy érdemes a már sokrétűen vizsgált hormonpeptidek módosításával foglalkozni, még hatékonyabb célzó molekulák előállításának érdekében.

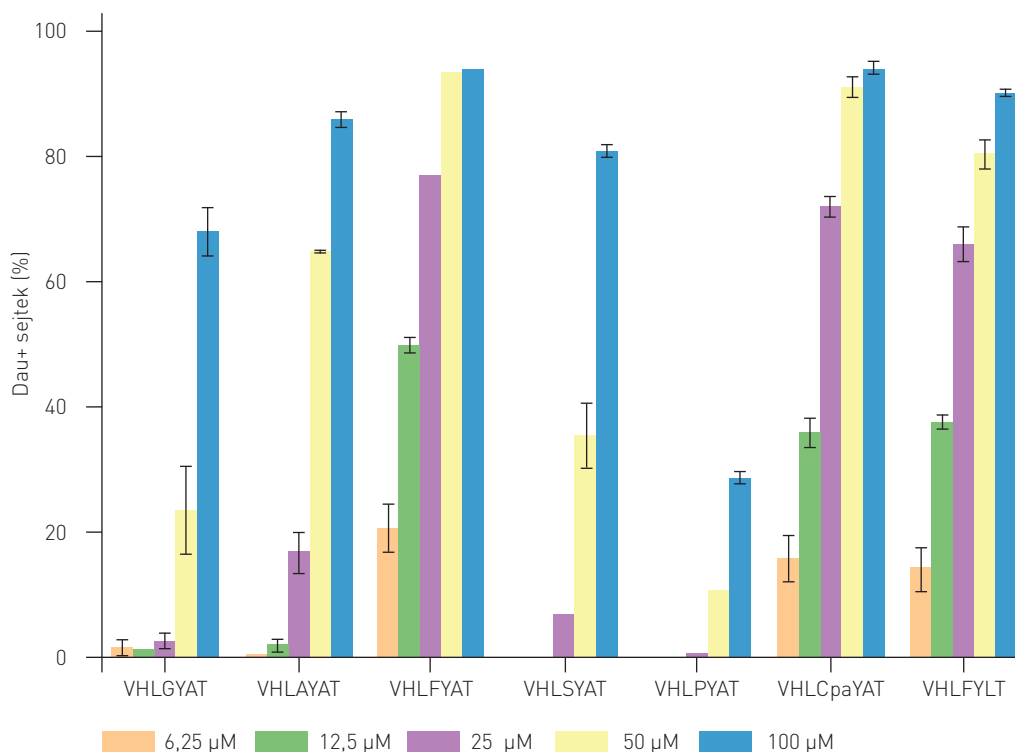
FÁGKÖNYVTÁRBÓL KIVÁLASZTOTT IRÁNYÍTÓPEPTID SZERKEZETÉNEK OPTIMALIZÁLÁSA

Zhang és munkatársai 10¹¹ fág felhasználásával szelektáltak olyan heptapeptideket, amelyek hatékonyan kötődtek HT-29 humán vastagbél-tumorsejtekhez. A három szelekciós lépés után random módon választottak ki 50 fagot, amelyek vizsgálatából a VHLYAT heptapeptid mutatta a leghatékonyabb kötődést a tumorsejtekhez [21]. Véleményünk szerint a három szelekciós lépés és a random kiválasztott 50 fág ebben az esetben kevésnek bizonyulhat, és ezáltal akár hatékonyabb molekulák is elkerülhetik a kutatók figyelmét. Ezért vizsgáltuk az egyes aminosavak fontosságát a biológiai hatásban. Az első körben minden egyes aminosavat egyenként alaninra cseréltünk (Ala-scan eljárás). Az irányító-heptapeptidek N-terminálisára minden esetben egy LRRY, katepszin B lizoszomális enzimre hasadó és az oldékonyságot növelő tetrapeptid-spaceren keresztül kapcsoltuk a daunorubicint oximkötéssel. Az egységes spacer alkalmazását az is indokolta, hogy így minden esetben azonos metabolit (Dau=Aoa-Leu-OH) szabadult fel közel azonos sebességgel a konjugátumokból patkánylizoszóma-preparátumban, így ez nem befolyásolhatta a tumorelles hatás mértékét. *In vitro* sejtéletképességi vizsgálattal (MTT-teszt) kimutattuk,

vegyület volt (Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH₂; IC₅₀: 46,9±9,4 μM). A konjugátumok sejtéletképességre gyakorolt hatása egyértelműen összefüggött a konjugátumok sejtbejutási képességével. Az áramlási citométerrel mért adatok alapján a Dau=Aoa-LRRY-VHLYAT-NH₂ konjugátum jutott be leghatékonyabban a tumorsejtekbe.

Mivel úgy tűnt, hogy a 4-es pozícióban a változtatás megengedett, a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy milyen aminosavak beépítése jár hatásnövekedéssel ebben a pozícióban. Az eredmények azt mutatták, hogy a nagyméretű apoláris aminosavak beépítése tovább növeli a konjugátumok tumorelles hatását (a Leu, Phe, Cpa (*p*-klór-fenilalanin) cserével készült konjugátumok IC₅₀-értékei sorban: 7,5±3,5 μM, 6,6±2,9 μM, illetve 3,6±0,1 μM). Ezzel szemben a Lys és Pro beépítése kifejezetten csökkentette a hatást (>50 μM), a többi vizsgált, főleg poláris aminosavak nem eredményeztek lényeges hatásváltozást (3. ábra).

Mivel az irányító-heptapeptid 6-os pozíciójában Ala található, ezt értelemszerűen nem cseréltük ki az Ala-scan vizsgálat során. Azonban vizsgálni akartuk, hogy ennek az aminosavnak a változtatása hogyan befolyásolja a konjugátumok tumorelles hatását. Megállapítottuk, hogy ennek a pozíciónak a változtatása kisebb hatással van a konjugátum hatékonyságára. Itt is a nagy apoláris oldallánc a kedvező (Dau=LRRY-VHLYLT-NH₂; 3,2±0,1 μM), míg a savas karakterű glutaminsav jelenléte rontja a hatást (>50 μM). Mivel a kétszeres aminosavcserét tartalmazó peptid hatékonysága nem volt jelentősen jobb, mint a korábbi származékok, viszont a konjugátum oldékonysága jelentősen romlott, a további összehasonlító



3. ÁBRA. Fágbemutató technikájával kiválasztott peptidből származó konjugátumok (Dau=Aoa-LRRY-VHLGYAT-NH₂ és variánsai) optimalizálásának hatása HT-29 vastagbél-tumor-sejtekbe történő bejutásra. A sejtbejutás mérése 3 óra inkubációs idő elteltével történt áramlási citometria segítségével

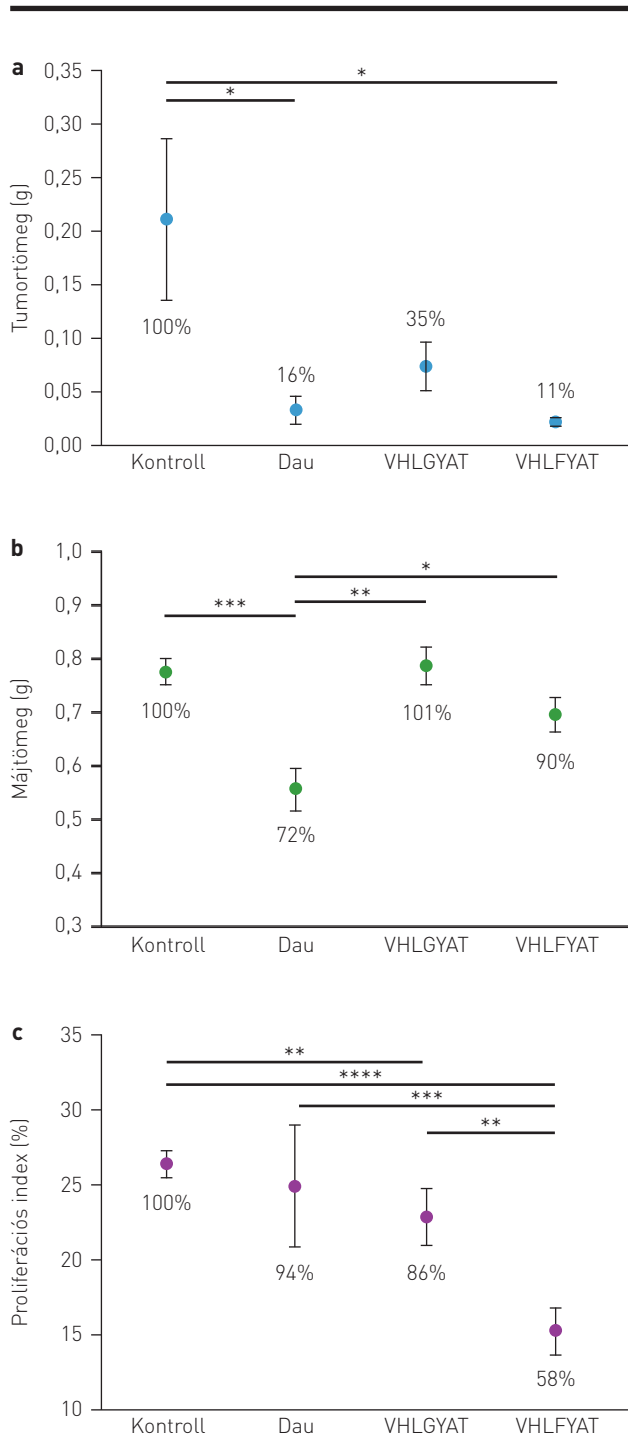
in vitro és *in vivo* vizsgálatokhoz az eredeti és a Phe-nal módosított konjugátumokat (Dau=LRRY-VHLGYAT-NH₂ és Dau=LRRY-VHLYFYAT-NH₂) használtuk.

A két hatóanyag-irányítópeptid konjugátum sejtelétképesre gyakorolt hatását megvizsgáltuk további 21 különböző eredetű tumorsejtvonalon és kontrollként normális fibroblasztokon (MRC-5). Azt tapasztaltuk, hogy a konjugátumok toxikusabbak voltak a tumorsejteken, és minden esetben a Phe-t tartalmazó konjugátumnak volt nagyobb tumorel- lenes hatása, amely sejttípustól függően 1,5–5-szöröse volt az eredeti konjugátumnak. Különösen tüdő-tumor- (A549, H1650, H1975), prosztata- (DU145, PC-3) és melanómasej- teken (A2058, M24, WM983B, B16) mutattak a konjugátumok kiemelkedő hatást, míg a HT-29 vastagbél-tumor-sejteken, amire eredetileg kifejlesztették az irányítópeptidet, közepes aktivitást mutattak [22].

Ez a széles spektrumú hatékonyság a különböző típusú tumorsejteken arra ösztökélt minket, hogy kiderítsük, milyen receptort ismer fel az irányítópeptid, hiszen eddig ezt még nem vizsgálták. Affinitáskromatográfia és LC-MS segítségével, fehérje-adatbázisokat felhasználva az egyik legva- lószínűbb fehérje a membránkötött Hsp70 (hőszokkprotein 70), amely jelentősen túltermelődik számos tumortípusban

és jelentős szerepe van a tumorsejtek elleni immunválasz kiváltásában. Bár további vizsgálatok szükségesek a feltéte- lezésünk pontosabb igazolására, az mindenesetre figyelemre érdemes, hogy korábban leírtak olyan peptideket, amelyek kötődni képesek a Hsp70-hez, és nagyfokú homológiát mu- tatnak a mi irányítópeptidjeinkkel (A6R: [ASHLGLAR] és HbS: [VHLTPVEK]).

Az *in vivo* vizsgálatokat SCID egerekbe ortotopikusan be- ültetett HT-29 tumormodellel végeztük. A két konjugátum és a nem kezelt kontrollcsoport mellett szabad daunorubicinnel kezelt csoportot is vizsgáltunk (8-8 egér/csoport). A kezelést a tumortranszplantációt követő 13. napon kezdtük. A szabad Dau-t 1 mg/ttkg (MTD) dózisban adtuk kétszer (13. és 20. nap). Ezzel a csoporttal a kísérleteket a 23. napon le kellett állítani az egerek jelentős súlyvesztése miatt. A többi csoport terminálását a 30. napon végeztük. A konjugátumokból 10 mg/ttkg Dau-tartalmú dózist adtunk (36,6, illetve 38,3 mg/ ttkg konjugátum) a 13., 16., 20., 23. és 27. napokon). Az egerek ennél nagyobb dózisokat is elviselnek a konjugátumokból komolyabb toxikus mellékhatás nélkül. Az eredmények azt mutatták, hogy az eredeti konjugátum 65%-os, míg a Phe-t tartalmazó konjugátum 89%-os tumornövekedés-gátlást eredményezett. Ez utóbbi meghaladta a szabad Dau hatékony-



4. ÁBRA. Fágbemutató technikájával kiválasztott peptidből származó két konjugátum (Dau=Aoa-LRRY-VHLYGYAT-NH₂ és Dau=Aoa-LRRY-VHLYFYAT-NH₂), illetve szabad daunorubicin (Dau) hatása ortotopikusan egerre (n=8/csoport) ültetett HT-29 humán vastagbél-tumor progressziójára. A kezelés a tumortranszplantációt követő 13. napon kezdődött 10 mg/ttkg Dau-tartalom (1-es és 2-es konjugátumok) vagy 1 mg/ttkg (Dau) adagolásával. A kísérletet terminálni kellett a 23. (Dau) vagy a 30. napon (1-es és 2-es konjugátumok) esetén. Ezt követte a tumorok és a máj tömegének mérése, illetve a proliferációs index (Ki-67 alapján) meghatározása. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (Mann-Whitney-teszt)

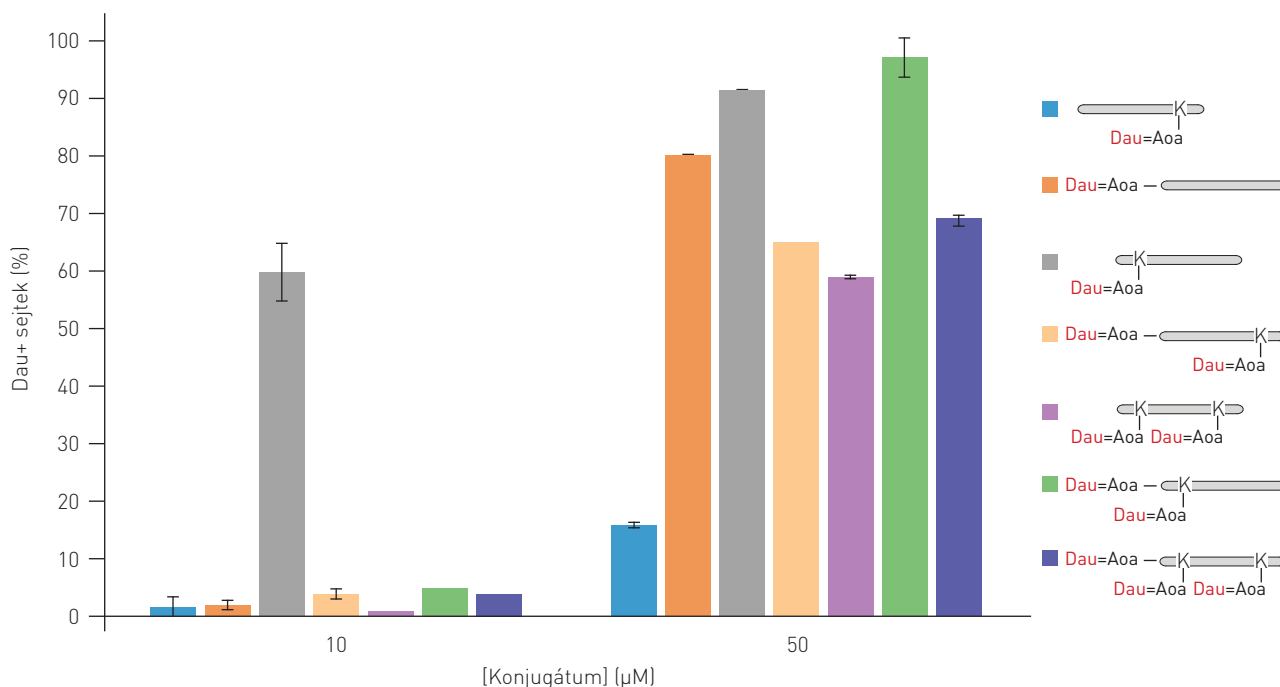
ságát is, miközben a májra gyakorolt toxikus mellékhatása sokkal kisebb volt, mint a szabad hatóanyagé. A kiemelkedő tumorelles hatás összefügghet azzal, hogy a Phe-tartalmú konjugátum jelentős proliferációgátlást mutat a szabad Dauhoz és az eredeti konjugátumoz képest (proliferációs index: 58%, 94% és 86% egyenként) (4. ábra) [22].

Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a fágbemutató eljárással kiválasztott tumorfelismerő irányítópeptidek esetén lehetséges a szerkezetük optimalizálásával még hatékonyabb konjugátumokat előállítani.

A HATÓANYAG SZÁMÁNAK ÉS KONJUGÁCIÓS HELYÉNEK MEGVÁLASZTÁSA

Az Angiopep-2 elnevezésű, 19 aminosavat tartalmazó peptidet (H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH) közel száz peptid vizsgálata után választották ki mint olyan peptidet, amely hatékonyan tud kötődni az LRP1 (alacsony sűrűségű lipoproteinreceptor-kapcsolt fehérje 1) receptorhoz, amely részben megtalálható a vér-agy gát (BBB) apikális oldalán, másrészt túlexpresszálódik bizonyos típusú tumorsejtekben [23]. Így a belőle készített tumorelles hatóanyagot tartalmazó konjugátum először átjuthat a vér-agy gáton receptormediált transzcitózissal, majd ott szelektíven bejuthat a tumorsejtekbe receptormediált endocitózissal. Ezért ez az irányító molekula kettős funkciójával alkalmas lehet agytumorkok célzott terápiájában hatóanyag-hordozóként. A peptidben két lizin található, így az N-terminális aminosocsoporttal együtt három lehetséges konjugálási helyet is vizsgáltunk a molekulában. Az Angiopep-2 felhasználásával már több, gyógyszer-molekulát tartalmazó konjugátumot előállítottak, amelyekben pl. paklitaxelt [24] vagy doxorubicint [25] kapcsoltak mindhárom konjugációs helyhez észterkötés kialakításával. Kémiai szintézis szempontjából egyszerűbb mindhárom csoporthoz kapcsolni a hatóanyagot, mint szelektíven egyik vagy másik csoporthoz. Másrészt az esetek többségében több hatóanyag egy irányító molekulán nagyobb tumorelles hatást eredményezhet, ha a kapcsolt drogmolekulák nem befolyásolják a receptorkötődést. Ezt azonban a korábbi munkákban nem vizsgálták. Továbbá visszautalnánk a korábban leírtakra, hogy az észterkötés sok esetben nem elég stabil ahhoz, hogy a célsejteket bomlás nélkül elérje a konjugátum. Ezért ebben a kísérlet-sorozatban azt vizsgáltuk, hogy az Angiopep-2 peptidhez kapcsolt hatóanyagok száma és pozíciója hogyan befolyásolja a konjugátumok biológiai aktivitását. Elsőként a daunorubicint, az előzőekben leírtaknak megfelelően oximkötés kialakításával kapcsoltuk a megfelelő funkciós helyekre. Előállítottuk az összes egy, két, illetve három hatóanyagot tartalmazó variánst (összesen 7 konjugátum).

Az U87 humán glioblastómasejtekben végzett *in vitro* citosztázisvizsgálatok (MTT-teszt) azt mutatták, hogy ha a Dau a C-terminálisához közelebbi lizinhez kapcsolódik, akkor nagyobb IC₅₀-értékeket kapunk (>30 µM), mintha az az N-terminálisához vagy az N-terminálisához közelebbi



5. ÁBRA. Angiopep-2 konjugátumok sejtbejutási vizsgálata U87 humán glioblasztómasejteken. A sejtbejutás mérése 1 óra inkubációs idő után történt áramlási citometria segítségével

lizin oldalláncához kapcsolódik. A legnagyobb tumorelles hatást azok a konjugátumok mutatták, amelyekben az N-terminálshoz kapcsolódott a Dau (<10 μM). A több Dau kapcsolása az Angiopep-2 hordozópeptidhez nem befolyásolta jelentősen a hatást, így a hatás szempontjából a drog pozíciója volt a fő tényező. A három hatóanyagot tartalmazó konjugátumot oldékonyági problémák miatt nem tudtuk pontosan vizsgálni.

A korábban bemutatott peptideknél egyértelmű összefüggést tudunk kimutatni a konjugátumok sejtbejutási képessége és a tumorelles hatás között. Ezért ebben az esetben is megvizsgáltuk, hogy milyen mértékben képesek a konjugátumok a sejtekbe jutni. Az eredmények részben igazolták a mért sejtéletképességi adatokat, mert ha a Dau a C-terminálshoz közeli lizinhez kapcsolódott, akkor az jelentősen rontotta a sejtbejutást. Feltehetőleg az Angiopep-2 peptid e részlete fontos szerepet tölthet be a receptorkötésben. Ugyanakkor kimagasló sejtbejutást tapasztaltunk azon konjugátumnál, ahol a Dau a másik lizin oldalláncához kapcsolódott. Ezt a fokozott mértékű sejtbejutást viszont a citosztázis-adatok nem támasztották alá (5. ábra).

Az ellentmondás feloldása érdekében a továbbiakban vizsgáltuk a konjugátumok metabolizmusát patkánymáj lizoszómapreparátumban. A keletkezett termékeket LC-MS technikával vizsgálva bizonyítottuk, hogy az N-terminálisról

felszabaduló Dau=Aoa-Thr-OH és a C-terminális lizinhez kapcsolódó Dau esetén a H-Lys(Dau=Aoa)-OH metabolit már 1 óra inkubálás után megjelenik, és 6 óra elteltével már ez a fő termék. Ugyanakkor az N-terminálshoz közelebbi Lys-hez kapcsolt Dau-t tartalmazó konjugátumok esetén a H-Lys(Dau=Aoa)-OH metabolit nagyon lassan jelenik meg. Egy óra után még nem detektálható, 6 óra után már kis mennyiségben megjelenik az elegyenben, de még 72 óra elteltével sem ez a Dau-t tartalmazó fragmensek közül a fő termék. A domináns fragmensek a H-GK(Dau=Aoa)R-OH és H-GK(Dau=Aoa)-OH metabolitok. Ez a megfigyelés magyarázhatja azt, hogy a hatékonyabb sejtbejutás ellenére miért kisebb e konjugátum tumorelles hatása (2. táblázat). Egyben arra is figyelmeztetnek az eredmények, hogy abban az esetben, ha nem hasadó linkeren keresztül kapcsoljuk a hatóanyagot, vagyis nem történik meg a szabad hatóanyag felszabadulása, akkor különös tekintettel kell lenni a konjugációs hely megválasztására, mert a konjugátum lebomlásának mechanizmusa jelentősen befolyásolhatja annak biológiai hatását.

ÖSSZEGZÉS

A célzott tumorterápia jelentős áttörést hozhat a személyre szabott rákgyógyításban. Az eljárás segítségével a hatékony tumorelles szereket nagyobb szelektivitással tudjuk a tumorsejtekbe juttatni, így a nem kívánt mellékhatások visz-

2. TÁBLÁZAT. Angiopep-2 konjugátumok (patkánymáj) lizoszomális emésztése során kapott legkisebb aktív metabolitok és U87 sejteken végzett citotoxicitási esszé (MTT-teszt) során kapott IC₅₀-értékek összehasonlítása

Szerkezet	Legkisebb metabolit	IC ₅₀ (µM)
	H-Lys(Dau=Aoa)-OH	34,7±1,6
	Dau=Aoa-Thr-OH	9,9±5,1
	H-Lys(Dau=Aoa)-OH	18,2±2,8

szaszoríthatók és ezáltal a beteg életminősége sem romlik nagy mértékben, amelynek mind társadalmi, mind gazdasági hasznossága megkérdőjelezhetetlen. A módszer sikeréhez a hatékony drogmolekulák mellett nagyon fontos, hogy olyan megfelelő irányítómolekulákat fejlesszünk ki, amelyek specifikusan felismerik azokat a tumorsejtfelszíni molekulákat, amelyek által megkülönböztethetőek lesznek az egészséges sejtektől. Az NVKP-pályázat keretében az itt bemutatott irányítópeptidek mellett előállított több mint száz peptid és konjugátum segítségével fontos információkat nyertünk arról, hogy milyen paraméterek milyen mértékben képesek befolyásolni egy-egy konjugátum hatékonyságát. Rámutattunk arra, hogy ismert tumorelles hatóanyag hormonpeptidek vagy fágbemutatásos technikával kiválasztott irányítópeptidek szerkezete optimalizálható aminosavcserevel, a lánchossz változtatásával, sejtbejutást fokozó anyagok (zsírsavak, sejt-penetráló peptidek) kapcsolásával stb., a hatás fokozása

érdekében. A receptorkötődés és sejtbejutás mellett fontos szempont, hogy az irányítómolekulához hány hatóanyag, milyen pozícióban és milyen linkerrel keresztül kapcsolható, ezek befolyásolják a szabad hatóanyag vagy aktív származékának felszabadulását, illetve sejtbeni lokalizációját. Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az eredményeink hozzájárulhatnak olyan vegyülettárak összeállításához (drog, irányítómolekula, linker), amelyek segítségével számos konjugátum állítható elő: e vegyületek akár önmagukban, akár kombinációban alkalmazva növelhetik a rákterápia hatékonyságát.

Etikai engedélyek

Az egerek gondozása, tartása és használata minden esetben a „Helsinki Nyilatkozat Guiding Principles for the Care and Use of Animals” vezérelve szerint és a helyi etikai bizottság jóváhagyásával történt. Állatkísérleti engedélyk száma: PEI/001/1738-3/2015 és PEI/001/2574-6/2015.

IRODALOM

- Padma VV. An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine* (Taipei) 5:19, 2015
- Baudino TA. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol* 12:3–20, 2015
- Sau S, Alsaab HO, Kashaw SK, et al. Advances in antibody-drug conjugates: A new era of targeted cancer therapy. *Drug Discov Today* 22:1547–1556, 2017
- Gilad Y, Firer M, Gellerman G. Recent innovations in peptide based targeted drug delivery to cancer cells. *Biomedicine* 4:p.ii:E11, 2016
- Mezo G, Manea M. Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones. *Expert Opin Drug Deliv* 7:79–96, 2010
- Szepeshazi K, Schally AV, Treszl A, et al. Therapy of experimental hepatic cancers with cytotoxic peptide analogs targeted to receptors for luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin or bombesin. *Anticancer Drugs* 19:349–358, 2008
- NVKP_16-2016-0036. https://pak.elte.hu/NVKP_16-2016-0036
- Hyyonen M, Laakkonen P. Identification and characterization of homing peptides using in vivo peptide phage display. *Methods Mol Biol* 1324:205–222, 2015
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, et al. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202:631–633, 1978
- Ghanghoria R, Kesharwani P, Tekade RK, et al. Targeting luteinizing hormone-releasing hormone: A potential therapeutics to treat gynecological and other cancers. *J Control Release* 269:277–301, 2018
- Mezo G. Peptide and protein based pharmaceuticals. In: *Amino Acids, Peptides and Proteins: Volume 38*. Eds. Farkas E, Ryadnov M, 2014, pp. 203–252
- 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
- Miller DS, Scambia G, Bondarenko I, et al. ZoptEC: Phase III randomized controlled study comparing zoletarelin with doxorubicin as second line therapy for locally advanced, recurrent, or metastatic endometrial cancer (NCT01767155). *J Clin Oncol* 36(15_suppl):5503, 2018
- Manea M, Mezo G. lGnRH-III – a promising candidate for anticancer drug development. *Protein Pept Lett* 20:439–449, 2013
- Szabo I, Manea M, Orban 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

16. Schlage P, Mezo G, Orban 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
17. Hegedus R, Manea M, Orban 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
18. Schuster S, Biri-Kovacs B, Szeder B, et al. Enhanced in vitro antitumor activity of GnRH-III-daunorubicin bioconjugates influenced by sequence modification. *Pharmaceutics* 10:pii:E223, 2018
19. Kapuvári B, Hegedus R, Schulcz A, et al. Improved in vivo antitumor effect of a daunorubicin - GnRH-III bioconjugate modified by apoptosis inducing agent butyric acid on colorectal carcinoma bearing mice. *Invest New Drugs* 34:416–423, 2016
20. Randelović I, Schuster S, Kapuvári B, et al. Improved in vivo anti-tumor and anti-metastatic effect of GnRH-III-daunorubicin analogs on colorectal and breast carcinoma bearing mice. *Int J of Mol Sci* 20:pii:4763, 2019
21. Zhang B, Yan Y, Shen Q, et al. A colon targeted drug delivery system based on alginate modified graphene oxide for colorectal liver metastasis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 79:185–190, 2017
22. Kiss K, Biri-Kovacs B, Szabo R, et al. Sequence modification of heptapeptide selected by phage display as homing device for HT-29 colon cancer cells to improve the anti-tumour activity of drug delivery systems. *Eur J Med Chem* 176:105–116, 2019
23. Demeule M, Regina A, Che C, et al. Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 324:1064–1072, 2008
24. Regina A, Demeule M, Che C, et al. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol* 155:185–197, 2008
25. Che C, Yang G, Thiot C, et al. New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration. *J Med Chem* 53:2814–2824, 2010