

A valóra vált „magic-bullet”: antitest-konjugátumok a rákkutatásban

Simon Dorka Boróka

Székely Mikó Kollégium, Sepsiszentgyörgy

Ardey Bálint

ELTE Apáczai Csere János Gyakorló Gimnázium, Budapest



Témavezetők:

Dr. Petri László tudományos munkatárs

Szepesi Kovács Dénes PhD hallgató

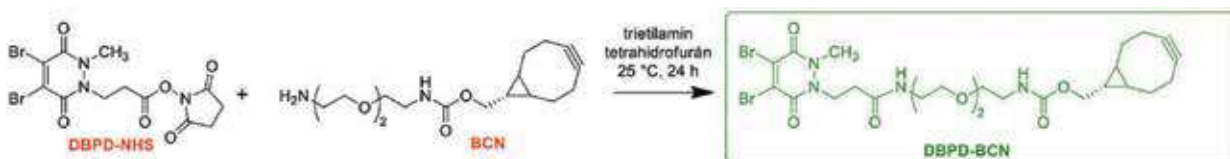
Kutatócsoport:

Gyógyszerkémiai Kutatócsoport, Szerves Kémiai Intézet

A daganatbiológiai kutatások óriási fejlődésen mentek keresztül az elmúlt néhány évtizedben, ami jelentős előrelépésekhez vezetett nemcsak a rák megelőzésében és korai felismerésében, hanem az előrehaladott stádiumú páciensek gyógyításában is. Sok daganatos megbetegedés esetében a kemoterápia az egyetlen lehetséges gyógymód, és bár az onkológiai gyógyszerek képesek elpusztítani a rákos sejteket, a környező szövetekben is kárt tesznek. Ezen a problémán sokat javít egy új gyógyszertípus, az antitest-gyógyszer konjugátumok alkalmazása, amelyek segítségével a rákos sejteket nagyon pontosan lehet „megcélozni” terápiás hatóanyagokkal. Az antitest-gyógyszer konjugátumok a pontos „célzás” kivitelezése érdekében antitesteket használnak: ezek az immunrendszerben található makromolekulák, amelyek a szervezetben megtalálható egészséges, vagy rákos sejteket, továbbá például baktériumok és vírusok képesek felismerni. Az antitest-gyógyszer konjugátumok használata fontos mérföldkő

egy olyan kezelés eléréséhez, amely nem ronsolja az egyébként egészséges szöveteket.

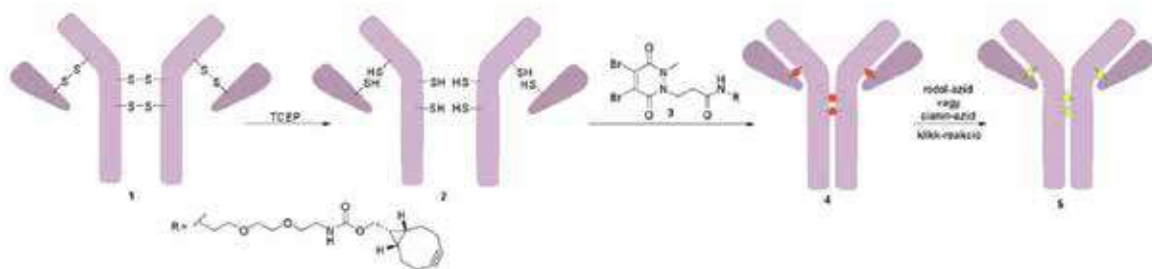
Munkánk során első lépésként a későbbi antitest-módosításhoz használható rekonjugálószer állítottuk elő egy N-acilezési reakcióban. Ehhez acetonitrilben feloldottuk az aktív észtert (DBPD-NHS), majd hozzáadtuk az aminszármazékot, amely egyben a ciklooktinil-egységet (BCN) tartalmazta. Fél óra után HPLC-MS használatával ellenőriztük a reakció végbemenetelét. Ennek során megállapítottuk, hogy az acilezési reakció lejátszódott és a kiindulási anyagok teljesen átalakultak az előállítani kívánt rekonjugálószer terméké (DBPD-BCN). Ezután rotációs vákuumbepárlón eltávolítottuk az oldószert, és dimetilszulfoxidban feloldva a nyersterméket preparatív fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával tisztítottuk. A megfelelő frakciókat összegyűjtöttük és liofilizálás módszerrel hidegen szárazra pároltuk. Végezetül a célterémek szerkezetét NMR-spektróscópiai méréssel is igazoltuk.

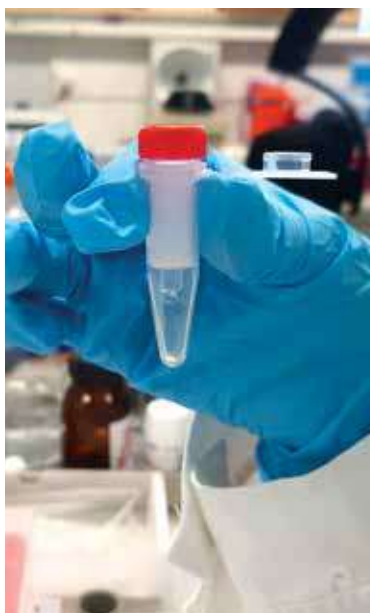
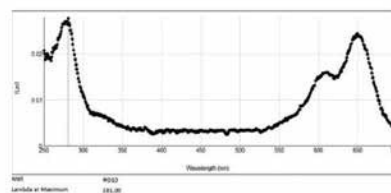
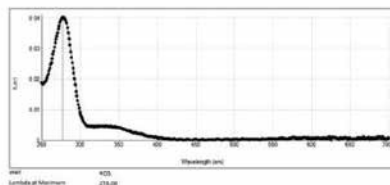
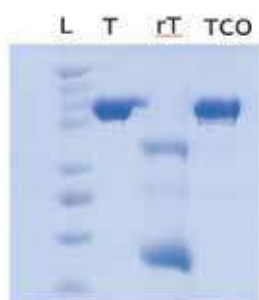




A munkánk következő célja a fluoreszcens festékekkel jelölt antitest előállítás volt. Ennek során redukciós-rekonjugációs módszerrel előállítottuk a szulfocianin-trastuzumab konjugátumot (T-SuCy5). A redukciós lépés során négy diszulfid hidat redukáltunk, amelyek eredetileg az antitest könnyű- és nehézláncait hivatottak összetartani. A TCEP redukáló anyag hatására felnyíló intramolekuláris diszulfidhidak helyére a ciklooktinil csoportot hordozó rekonjugálószeret építettünk be. Az utóbbi fő szerepe, hogy ezáltal az antitest bioortogonális reakcióban kapcsolható terápiás vagy diagnosztikai kismolekulához, vagyis akár élő biológiai rendszerekben, adalékanyagtól mentesen is jelölhetővé válik. A rekonjugálási reakciót 4 °C-on, egy egész éjszakán át végeztük.

A rekonjugáció sikerességét másnap SDS-PAGE gélelektroforézis módszerrel vizsgáltuk. Ennek során megállapítottuk, hogy a kezdeti, egységes anyag a redukálás során két részre vált majd újra egyesült. (L: létra referencia; T: teljes antitest; rT: redukált antitest; TCO: ciklooktinil-csoporttal felszerelt, rekonjugált antitest). Miután meggyőződünk a folyamat sikeréről elkezdtük a módosított antitestek jellemzését. Ennek során először meghatároztuk az antitest-konjugátumra jellemző DAR-számot. Ezt a többfunkciós spektrofotométer segítségével, abszorbanancia alapján végeztük el. A DAR- szám az angol „Drug Antibody Ratio” mozaikszóra utal, vagyis a „gyógyszer-antitest arányt” fejezi ki, tehát az egy antitesthez kapcsolódó kismolekulák átlagos számát adja meg. Az általunk előállított konjugátum esetében DAR=4 arányszámot határoztunk meg.

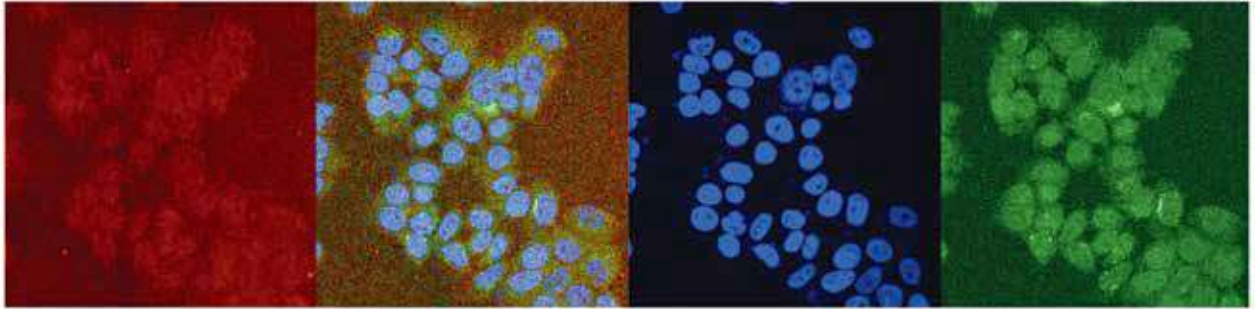




Végül az előállított antitest-festék biokonjugátumok „működését” ellenőriztük konfokális mikroszkópia segítségével. A vizsgált során megfigyelt NCI-N87 sejtek GFP-fehérjét és Her2 receptort expresszálnak. Ezzel párhuzamosan a Her2 receptort nem expresszáló (Her2-) MCF-7 sejtvonalon végeztünk kontrollkísérleteket. A sejtmagokat minden esetben DAPI-festéssel tettük láthatóvá. A mikroszkópia alapján megállapítottuk, hogy az NCI-N87 sikerült a membránjelölés az általunk előállított antitest-konjugátummal (vörös), míg a Her2- MCF7-sejtvonalon nem történt specifikus jelölés. A DAPI-festéssel történő sejtmagjelölés és a sejtek által expresszált GFP-fehérje mindkét esetben jól láthatóvá teszi a sejtek elhelyezkedését. Megállapítottuk tehát, hogy a Her2 receptort túlexpresszáló sejtek esetében szelektíven sikerült a sejtek körvonalát megjelölni a T-SuCy konjugátum segítségével.

A kutatótábor során tehát végrehajtottuk egy monoklonális antitest kémiai módosítását redukciós-rekonjugációs módszerrel. Ennek során szintetizáltuk a konjugációhoz szükséges kismolekulát, majd az előállított antitest-konjugátum többféle módszerrel is jellemztük. Megállapítottuk a termék tisztaságát, a hozzá kapcsolódó fluoreszcens festékmolekulák számát és végül konfokális mikroszkóp alatt azt is megvizsgáltuk, hogy képes-e az általunk előállított antitest-konjugátum különbséget tenni az egészséges és a rákos sejtek között. A kutatótáborban végzett munkánk során találkoztunk biológiai és gyógyszerkémiai laboratóriumokban gyakran alkalmazott módszerekkel és eszközökkel, megismerkedtünk több fontos laboratóriumi készülék, például az ultracentrifuga, a gélelektroforézis készülék, a többfunkciós spektrofotométer, az NMR-spektrométer, valamint preparatív és analitikai célú nagyhatékony-ságú folyadékkromatográfiás készülék működésével és használatával.

MCF7 (Her2-) +T-Sucy



NCI-N87 (Her2+) +T-Sucy

