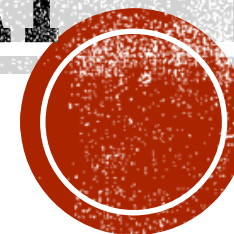


TARGETED ULTRASOUND-ASSISTED CANCER-SELECTIVE CHEMICAL LABELING AND SUBSEQUENT CANCER IMAGING USING CLICK CHEMISTRY

Hua Wang, Marianne Gauthier, Jamie R. Kelly, Rita J. Miller, Ming Xu, William D. O'Brien, Jr. and Jianjun Cheng

Püinkösti Zoltán

Csoportgyűlés, 2016. április 12.



BEVEZETÉS

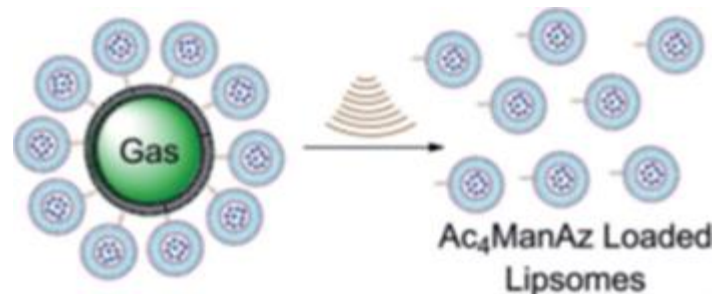
- Nem természetes cukrok metabolikus címkézése: hatékony módszer funkciós csoportok beépítésére sejtfelszíni glikoproteinekre
- Alkalmazás rákkezelésben:
 - Reaktív funkciós csoportokkal (pl. azidocsoport) ellátott nem természetes cukrok bejuttatása és metabolizálása a rákos szövetekbe
 - Dibenzociklooktin (DBCO)-hordozó gyógyszerek célba juttatása klikk-kémiával
- Előnyök:
 - A klikk kémia használatával rendkívül pontos célba jutás
 - A DBCO kismolekula lévén könnyen beépíthető terápiás szerekbe
- Felmerülő probléma in vivo rák targetingnél: hogyan juttassuk az azidocukrokat specifikusan a rákos szövetekhez?

BEVEZETÉS

- Ultrahangos (US) leképezés: biztonságos gyógyászati eszköz betegségek diagnosztizálására és kezelésére.
- Mikrobuborékok (MB-k): gázt tartalmazó, biokompatibilis anyagból készült mikroméretű részecskék, amelyek stabilitásuknak és nagy US visszaverésüknek köszönhetően jó US kontrasztanyagok.
- Nagy amplitúdójú US az MB-k összehúzódását és kitágulását okozza → szétszakadnak
- MB szétszakadásának másodlagos hatása a kapilláris permeabilitás ideiglenes megnövekedése
- Lehetséges gyógyszerrel töltött MB-liposzóma konjugátumokat a célszövetekben szétrobbantani ultrahanggal, így célba juttatva a gyógyszert

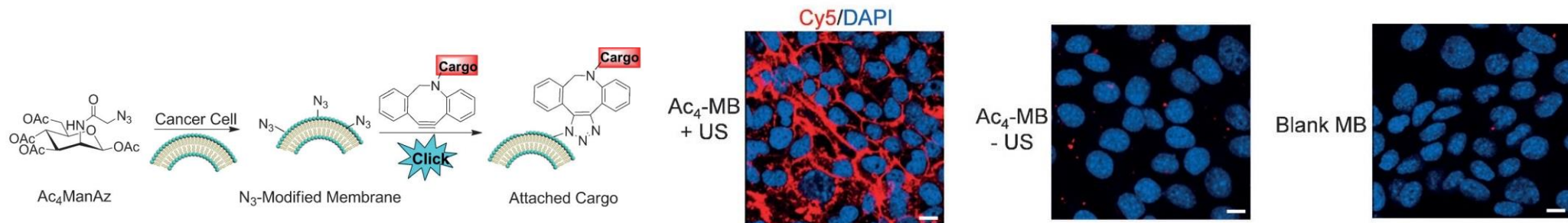
A SZINTÉZISEK

- Aktivált karboxilátokkal funkcionizált, 5,3 m/m % tetraacetil *N*-azidoacetilmannózaminnal (Ac_4ManAz) töltött liposzómák előállítása
- Perfluorobutánnal töltött MB-k előállítása
- Ac_4ManAz -nal töltött liposzómák és az MB-k összekapcsolása az aktivált karboxilátok és aminocsoportok segítségével ($\text{Ac}_4\text{-MB}$)
- $\text{Ac}_4\text{-MB}$ -k: stabilak fiziológias körülmények között több, mint 6 napig, de nagy amplitúdójú US hatására szétesnek



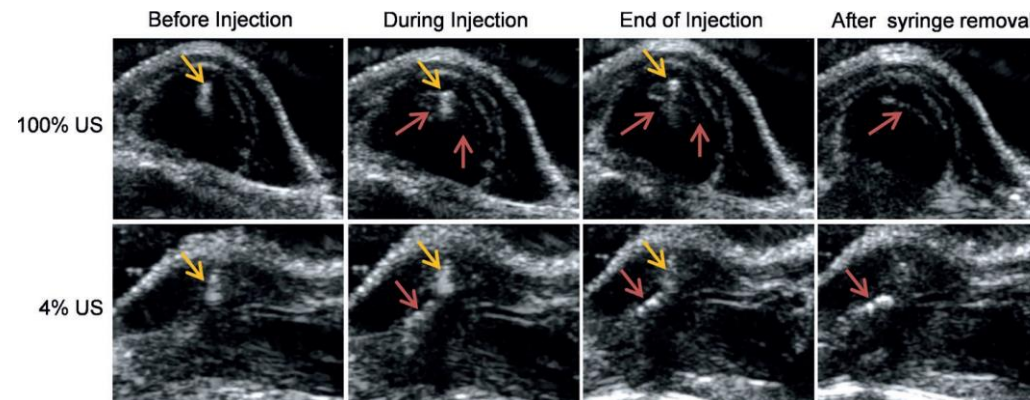
IN VITRO TESZTEK

- 4T1 mellrák sejtek kezelése ultrahanggal 1 percen át $\text{Ac}_4\text{-MB}$ -t tartalmazó közegben
- Minimum 3 nap inkubálás
- DBCO-Cy5-tel való kezelés 1 órán át az azidcsoportok detektálására



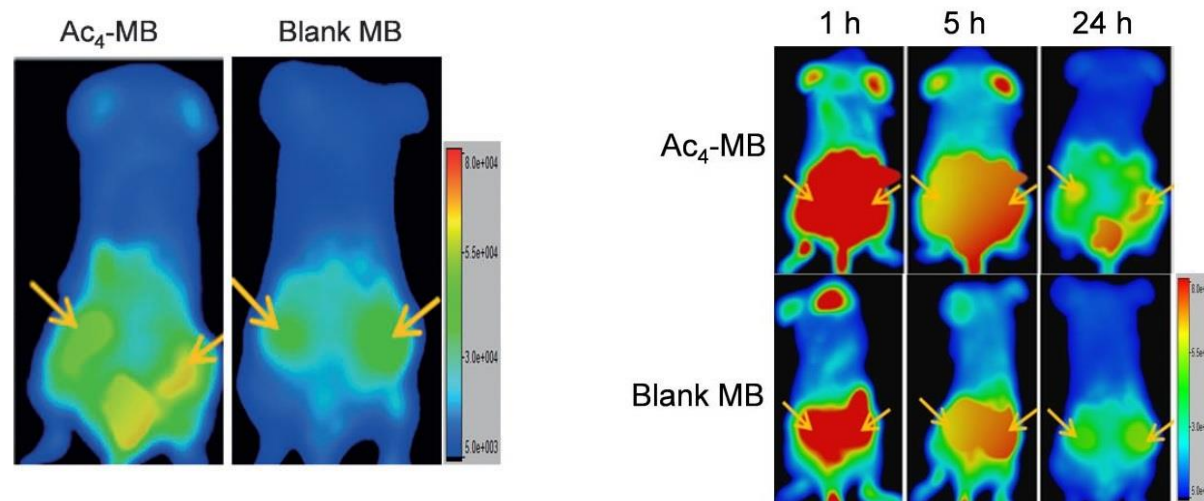
IN VIVO TESZTEK TUMORBA INJEKTÁLT MB-K ESETÉN

- Ac_4 -MB injektálása jobb- és bal oldali tumorba egérben
- Jobb oldali tumorok kezelése nagy amplitúdójú (100 % US), bal oldali tumorok kezelése kis amplitúdójú (4 % US) ultrahanggal
- Jobb oldali tumorok: gyorsan szétesett az Ac_4 -MB és a szövet többi részébe diffundált; több azidocsoporttal ellátott fehérje
- Bal oldali tumorok: nem esett szét az Ac_4 -MB és az injektálás helyén maradt



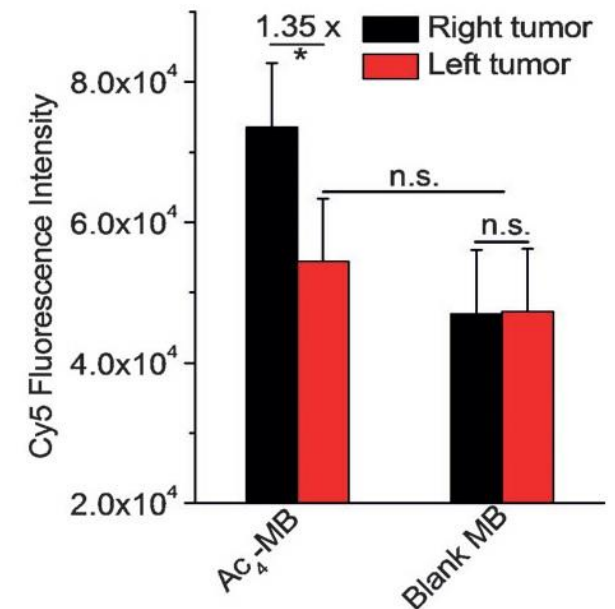
IN VIVO TESZTEK TUMORBA INJEKTÁLT MB-K ESETÉN

- DBCO-Cy5 intravénás injekciója, majd a szétoszlásának in vivo fluoreszcenciás vizsgálata 24 vagy 48 órával injekció után
- Nem módosított (blank) MB: nincs számottevő eltérés a két tumor között
- Ac₄-MB: a jobb- és bal oldali tumor számottevően eltér



EX VIVO VIZSGÁLATOK TUMORBA INJEKTÁLT MB-K ESETÉN

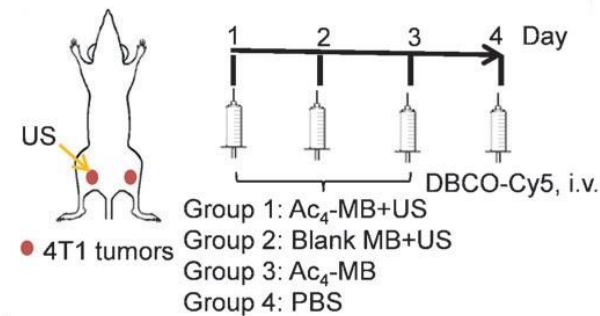
- Blank MB: nincs számottevő különbség a két tumor között
- Ac₄-MB: 1,35-szoros Cy5 intenzitás a jobb tumorban
- A 4 % US-gal kezelt, Ac₄-MB-s tumorra mért intenzitás nem sokkal nagyobb a blank MB-kre mért intenzitásnál → az Ac₄-MB stabil a tumorban
- Összefoglalva: az Ac₄-MB-ből származó azidocsoportok sikeresen fokozták a DBCO-Cy5 felhalmozódását a tumorban a klikk-reakción keresztül
- Működhet a módszer intravénás injekálás esetén is?



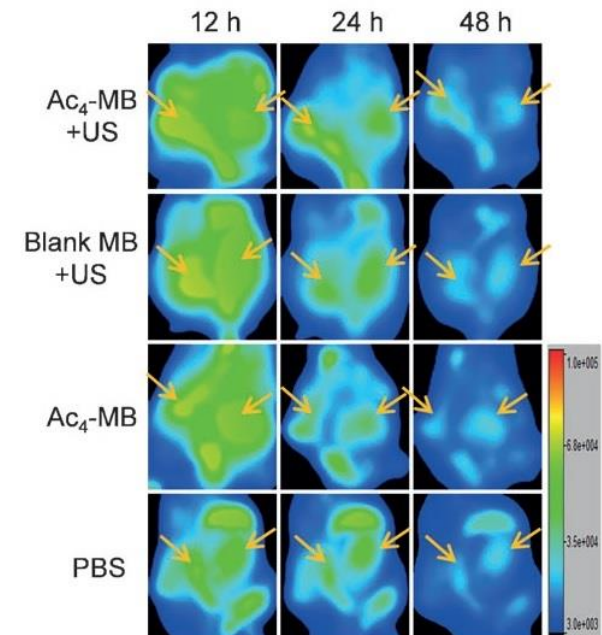
IN VIVO TESZTEK INTRAVÉNÁSAN BEADOTT MB-K ESETÉN

- Négy csoport:

- Ac₄-MB, US kezeléssel a bal tumoron
- Üres MB, US kezeléssel a bal tumoron
- Ac₄-MB, US kezelés nélkül
- PBS, US kezelés nélkül

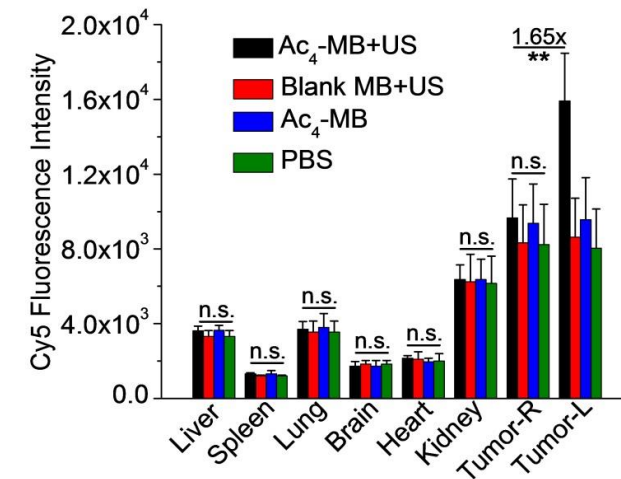
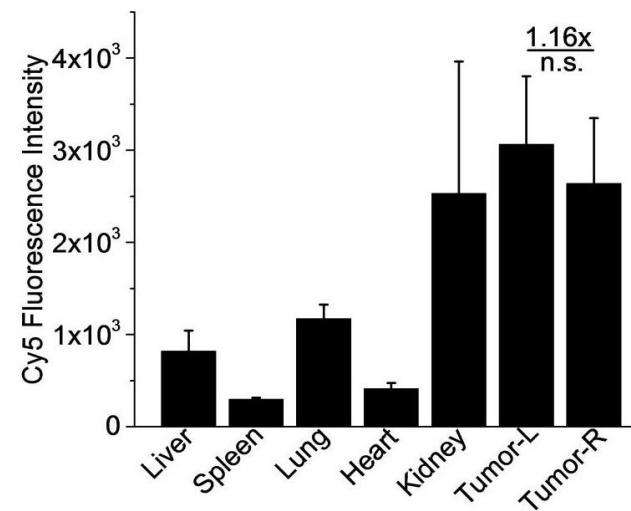
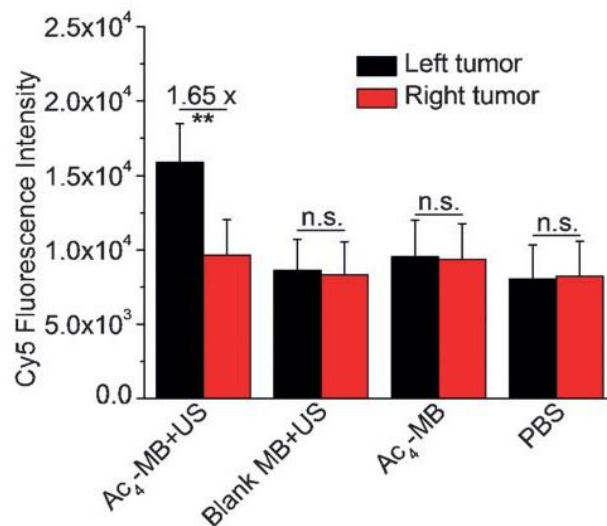


- Napi egy injekció US kezeléssel párhuzamosan 3 napon át, a 4. nap DBCO-Cy5 intravénás injekciója
- Az első csoportot kivéve mindenütt elhanyagolható a különbség a két tumorra mért intenzitás között



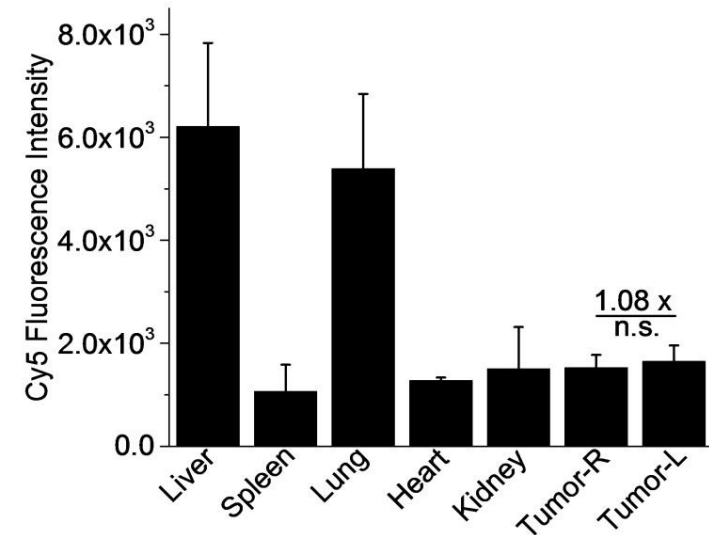
TESZTEK INTRAVÉNÁSAN BEADOTT MB-K ESETÉN

- Ex vivo ugyanezek az eredmények (1,65-szoros Cy5 fluoreszcenciás intenzitás)
- Egy Ac₄-MB-injekció esetén 1,16-szoros intenzitás a jobb tumorhoz képest
- Az egészséges szervek egyik esetben sem jelölődtek meg



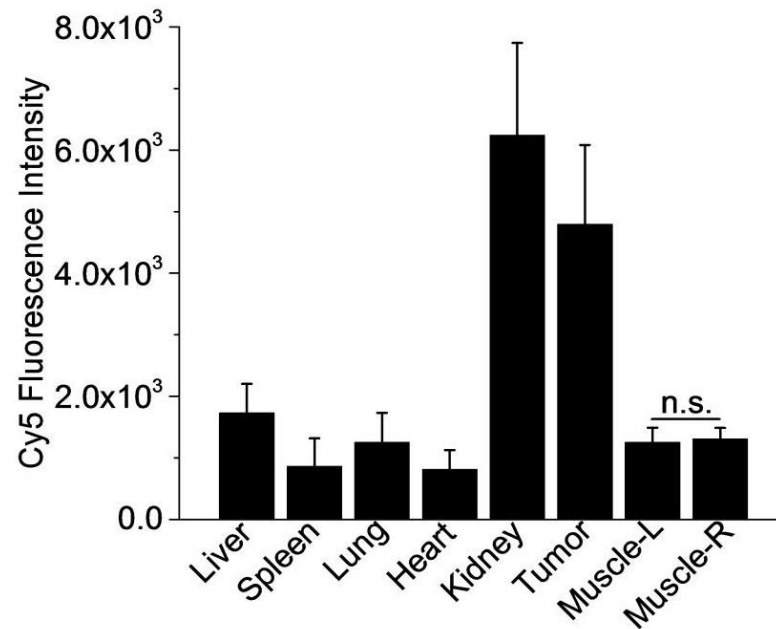
AZ AC₄-MB ÉS A KLIKK REAKCIÓ ELŐNYEINEK VIZSGÁLATA

- Cy5-tel jelölt MB (Cy5-MB) intravénás beadása, majd a bal oldali tumor ultrahangos kezelése → nincs számottevő különbség a két tumor fluoreszcenciája között
- A Cy5-MB nagy része a májba és a tüdőbe kerül → rendkívül alacsony tumor/szerv felhalmozódási arány



AZ AC₄-MB ÉS A KLIKK REAKCIÓ ELŐNYEINEK VIZSGÁLATA

- Ac₄-MB intravénás beadása a jobb combizom US kezelésével párhuzamosan → DBCO-Cy5 beadása után nincs számottevő különbség a két comb izmai között → a cukor kötődése a rákos szövetekhez kedvezőbb, mint az egészséges szövetekhez



ÖSSZEFOGLALÁS

- Tetraacetyl *N*-azidoacetilmannózámmal töltött MB-k ($\text{Ac}_4\text{MB-k}$) előállítása *in vivo* rákjelölésre célzott ultrahang segítségével
- Az US hatására a $\text{Ac}_4\text{MB-k}$ szétestek és a tumorba került az azidocukor, így 65 %-kal több DBCO-Cy5 kapcsolódott az ultrahanggal kezelt tumorhoz
- Az egészséges szövetekben nem halmozódott fel több DBCO-Cy5
- Míg az antitest-gyógyszer és a nanorészecske-ligandum konjugátumok a sejtes felvételt növelik, ez a módszer a terápiás szerek tumor/szerv felhalmozódási arányát növeli eredendően