

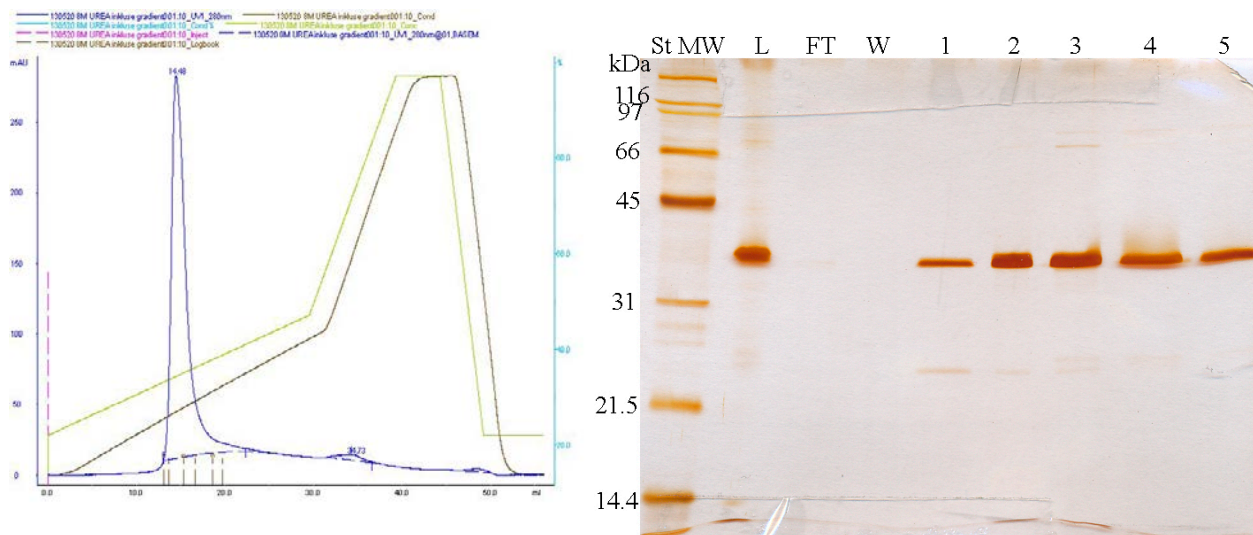
Nový způsob značení rekombinantních fragmentů protilátek radionuklidu mědi pro PET zobrazování nádorů

Celkově byla činnost v souladu s návrhem dílčího projektu v uplynulém období zaměřena na „proof-of-concept“ schématu radioaktivního značení rekombinantních fragmentů (scFv) protilátek pomocí dvojice peptidových „coiled-coil“ struktur vytvářejících pevnou vzájemnou nekovalentní vazbu. Ve stručnosti, pro tento účel bylo zajištěno dodání scFv M75 modifikovaného prvním z dvojice peptidů a byla zadána chemická syntéza druhého peptidu pro konjugaci výhodného chelátoru radionuklidu. Protože ve vývoji dvojic pevně se vázajících peptidů byl na jiných pracovištích dosažen značný pokrok (Geoffrey M Lynn, ... , Michal Pechar et al., Nature Biotechnology 33, 1201–1210, 2015), byla namísto původně uvažované dvojice (VAALKEK)₄ a (VAALEKE)₄ použita dvojice peptidů o aminokyselinových sekvencích

I A A L E S E I A A L E S E I A A L S K I A A L E S E (pro modifikaci scFv) a

I A A L K S K I A A L K S E I A A L K S K I A A L K S K (pro syntetický peptid).

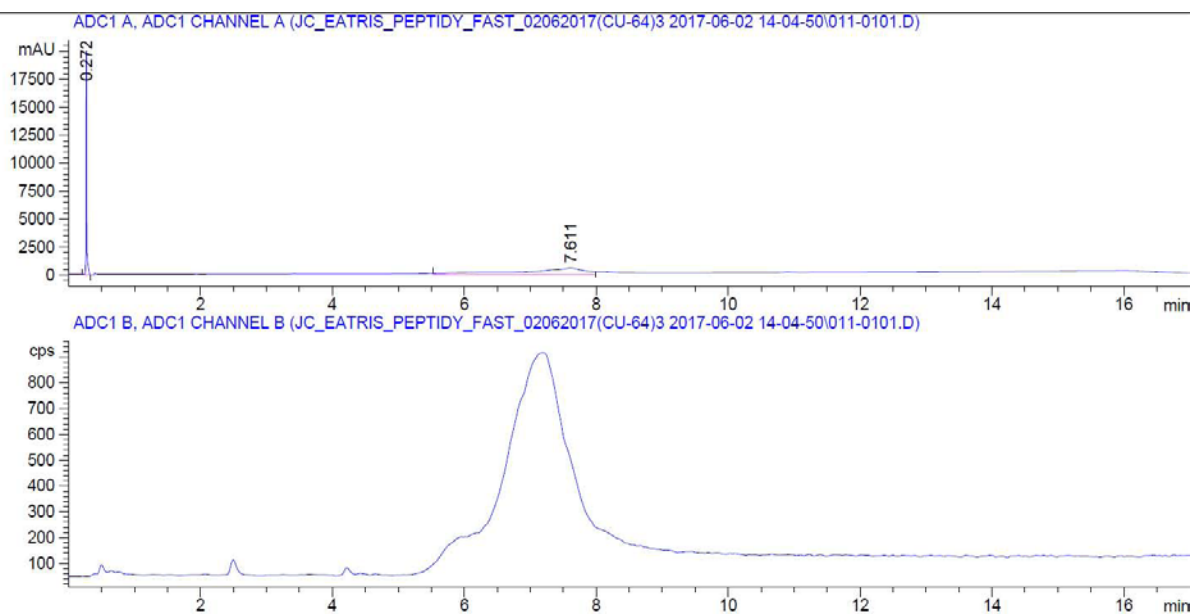
Bylo zajištěno **dodání rekombinantního fragmentu protilátky M75 modifikovaného 28-peptidem** (viz výše), tj. konstrukce expresního plasmidu PelB-scFvM75(H-20aa-L-myc-IAALESE₄-His₅), akumulace produktu v *E. coli*, purifikace a charakterizace: finální čištění na koloně ionexu MonoQ poskytlo homogenní produkt o výtěžku 0,6 mg/l kultivačního média



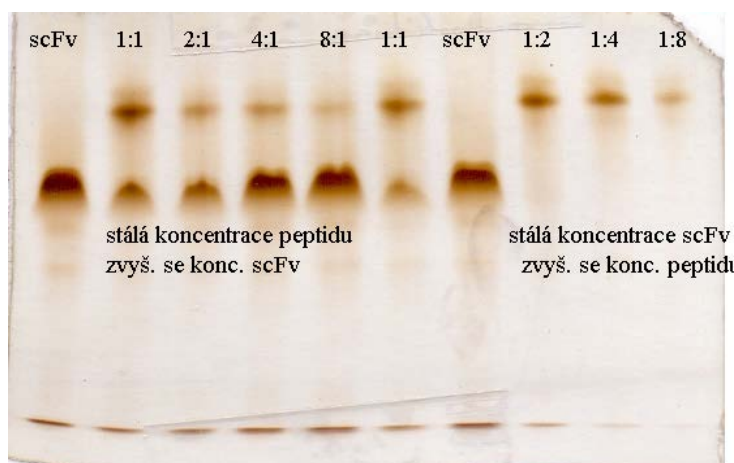
Výtěžek je přijatelný (asi třikrát nižší než u nemodifikovaného scFv M75).

31-peptid konjugovaný s chelátorem pro vazbu radionuklidu mědi: Pro vazebný „protějšek“ k peptidu obsaženému v modifikovaném scFv M75 (jak je popsán shora) byla navržena struktura

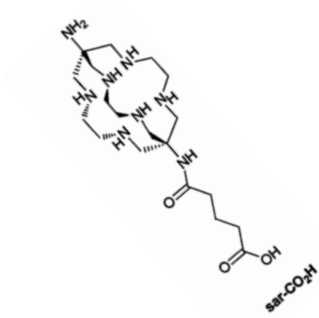
SarAr Y G S I A A L K S K I A A L K S E I A A L K S K I A A L K S K, kde SarAr byl výhodný komerční chelátor <http://www.claritypharmaceuticals.com/> ke konjugaci s N-koncovým tyrosinovým zbytkem a glycinový a serinový zbytek představují flexibilní spojku. Syntéza tohoto 31-peptidu byla provedena u společnosti Vidia a.s. Konjugace SarAr s tímto peptidem diazotační chemií (diazotace aminoskupiny na aromátu a kopulace s terminálním tyrosinem) se nedařila s dostatečnou účinností, zřejmě z důvodu nemožnosti dosažení patřičně vysokých koncentrací reaktantů. Jako alternativa byl peptid modifikován na aminoskupinách bočních řetězců lysinových zbytků běžným chelátorem NOTA pomocí thiokyanátové chemie. Hmotnostní spektroskopie produktu ukázala modifikaci v průměru na pěti lysinových zbytcích peptidu. Značení tohoto modifikovaného peptidu radionuklidem Cu^{64} v ÚJF AVČR v Řeži proběhlo (podle chromatografické analýzy produktu) prakticky s kvantitativním výtěžkem:



Pro sledování **interakce peptidu a scFv** byl vyvinut systém nativní elektroforézy PAGE: komplex peptidu a scFv fragmentu protilátky vykazuje změněnou pohyblivost a s malým přebytkem peptidu přejde scFv kompletně do komplexu:



Takovouto žádoucí tvorbu komplexu však nevykazuje NOTA-modifikovaný peptid, patrně kvůli zásadní roli modifikací zasažených lysinových zbytků. Z tohoto důvodu byla u společnosti Vidia a.s. již zadána syntéza jinak modifikovaného peptidu, kde bude výhodný chelátor Sar-COOH zaveden jako N-koncový zbytek ještě během syntézy peptidu na nosiči kondenzační reakcí s aminoskupinou tyrosinového zbytku flexibilní spojky:



YGSIAALKSKIAALKSEIAALKSKIAALKSK

Jelikož takováto modifikace nezasáhne “coiled-coil” strukturu peptidu, neočekává se narušení interakce s scFv fragmentem protilátky. Radioaktivní značení takto Sar-modifikovaného peptidu Cu^{64} je zadáno u ÚJF AVČR v Řeži.

Závěr: Jednotlivé kroky nového způsobu radioaktivního značení rekombinantních fragmentů protilátek byly úspěšně ověřeny. Kompletní “proof-of-concept” se dá realisticky očekávat od již připravených experimentů krátce po uplynutí grantového termínu.

V případě zájmu o další informace k výsledkům tohoto projektu nebo zakoupení neexkluzivní licence na prototyp soupravy pro zjednodušenou, zrychlenou a zlevněnou analýzu RNA z malých počtů buněk se obraťte na **Centrum pro transfer technologií**, ÚMG AV ČR, Vídeňská 1083, 14220 Praha 4, Tel. 420-241 063 227 nebo 420-602 892 876, e-mail: ctt@img.cas.cz