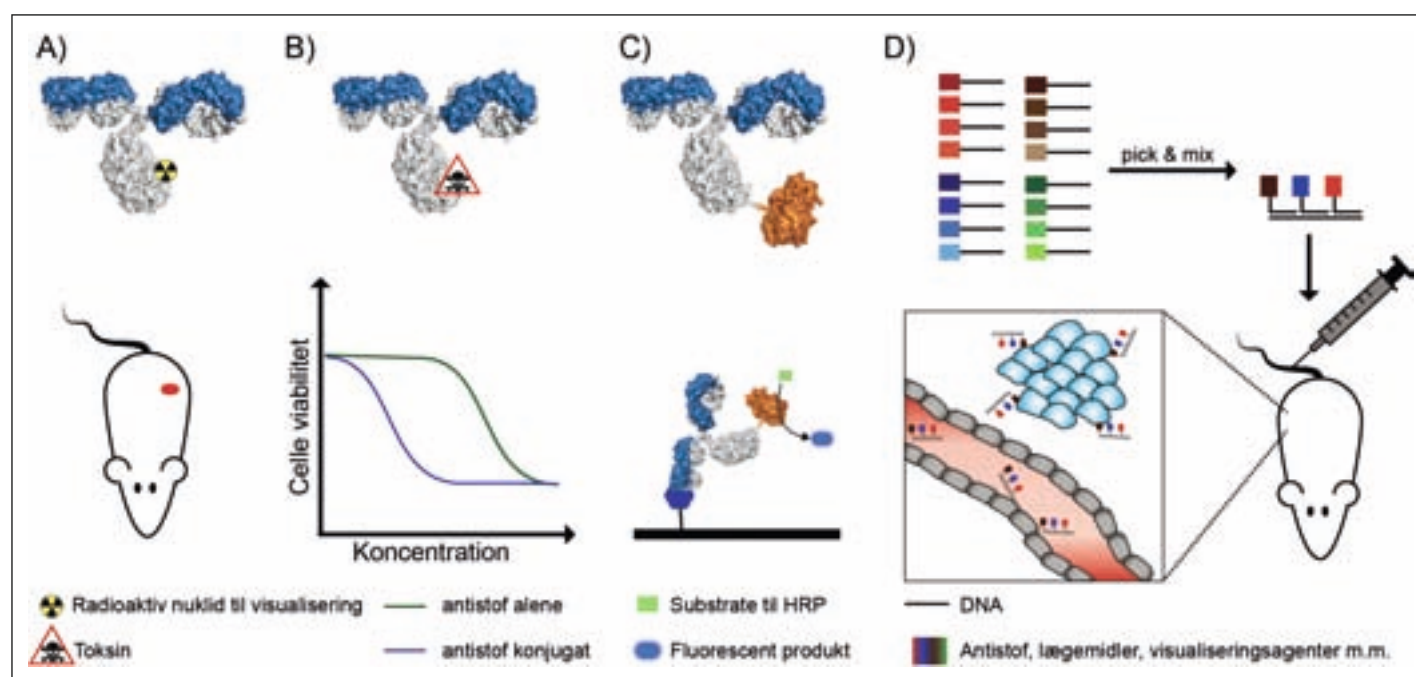


DNA-protein-konjugater til udvikling af multifunktionelle lægemidler

DNA's forudsigelige baseparring gør det muligt at samle designede strukturer på nanoskala, hvor den kendte dobbelthelix fungerer som molekyllær lim. Konstruktioner bestående af proteiner og terapeutiske molekyler kan samles med DNA, hvilket potentielt kan bruges til at samle flere funktioner i et medikament-kompleks og til udvikling af personlig medicin.



Figur 1. Anvendelser af protein-konjugater. **A.** Radioaktivt mærkede antistoffer til brug i PET-skanninger til at visualisere områder med cancerceller. **B.** Protein-toksin-konjugater kan bruges til at øge effekten af behandlingen, men samtidigt beholde selektiviteten overfor sygdomsramte celler. **C.** Antistof-enzym-konjugat kan bruges til detektion af et antigen i f.eks. ELISA. Her binder antistof-enzym-konjugatet til antigenet, hvilket fanger enzymet ved overfladen, og tilstedeværelsen kan detekteres ved omdannelse af et substrat til et farvestof. **D.** Ideen om et personligt multifunktionelt lægemiddel holdt sammen af DNA. Der vælges et antal elementer fra et bibliotek af medicinsk relevante organiske og bioorganiske molekyler, som forbindes ved hjælp af DNA og gives til patienten. Formålet er at tilbyde en effektiv målrettet behandling med færre bivirkninger.

Af Mikkel B. Skovsgaard¹, Michael R. Mortensen¹,
Thorbjørn B. Nielsen^{1,2} og Kurt V. Gothelf¹

¹ Center for Multifunctional Biomolecular Drug Design,
iNANO, Kemisk Institut, Aarhus Universitet

² Novo Nordisk, Måløv

Proteiner er naturens arbejdsheste og har et hav af forskellige virkemåder. I levende organismer syntetiserer proteiner således små organiske metabolitter eller større biomolekyler, de modtager og viderebringer signaler, de faciliterer den livsnødvendige transport af saltioner over cellemembraner og medierer immunforsvarets genkendelse af skadelige stoffer og organismer.

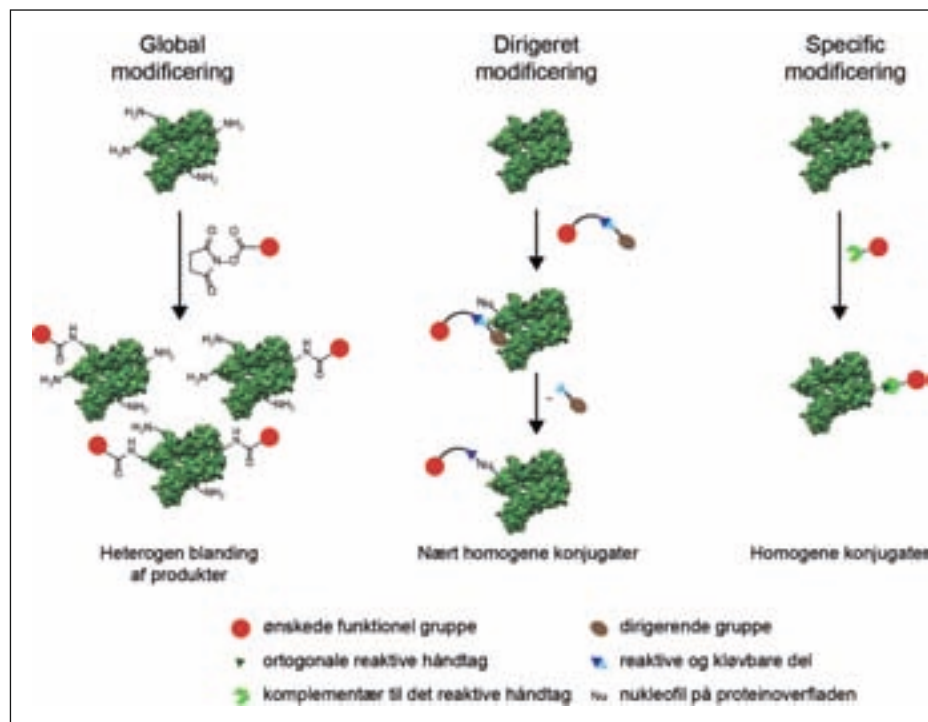
For at tilføje yderligere diagnostiske og terapeutiske egenskaber til proteiner har man koblet dem kovalent (konjugeret)

med molekyler med interessante egenskaber såsom et radioaktivt nuklid eller et toksin, figur 1A og 1B [1,2]. Alternativt har man fusioneret flere forskellige proteiner og derved dannet komplekser, som kombinerer egenskaberne fra proteinerne. Disse protein-protein-konjugater kan blandt andet bruges inden for diagnostik.

Eksempelvis kan et antistof, der binder det stof (antistoffets antigen), man ønsker at detektere, fusioneres med et enzym, der giver et visuelt resultat, hvis stoffet er til stede, figur 1C. Inden for medicin benyttes antistoffer som behandlingsform mod blandt andet forskellige typer af cancer. Antistofferne i sig selv kan finde cancercellerne ved binding til antigener på cancercellens overflade. Herefter genkender resten af immunforsvaret, at antistofferne er bundet og immuncellerne aktiveres overfor cancercellen. Desværre er og bliver nogle typer cancer resistente overfor antistoffernes virkning, og her kan et antistof-toksin-konjugat i nogle tilfælde være løsningen. Ved at kombinere toksin og antistof fås både, at antistoffet kan genkende cancercellerne, og derved en specificitet som toksinet alene ikke har, samt en øget toksisk effekt. Cancercellerne bliver med andre ord både påvirket af immunforsvaret og lægemidlet [3]. Da cancercellerne bliver dræbt *via* to helt separate veje mindskes risikoen for, at resistens udvikles betydeligt.

Nyt forskningscenter for multifunktionelle lægemidler

Indtil videre har medicinsk brug af protein-konjugater hovedsageligt været en kobling mellem to komponenter. Dog er der et stort potentiale for at udvikle medicin, der samler tre eller flere proteiner og lægemidler til et multifunktionelt kompleks. På den måde kan man udnytte mange af deres egenskaber på samme tid, f.eks. kan et trekomponentsystem bestå af et antistof til genkendelse af specifikke celler koblet med et protein, der kan få komplekset ind over cellemembranen samt et lægemiddel til at bekæmpe cellen. Dette vil give mulighed for også at udnytte lægemidlet, der kun virker inde i cellen og har svært ved at krydse membranen af sig selv. Ved det nyetablerede *Center for Multifunctional Biomolecular Drug Design* (CEMBID), som er finansieret med en bevilling på 60 mio. kr. af Novo Nordisk Fondens Challenge Programme, vil et hold forskere undersøge multifunktionelle kompleksers potentiale som lægemidler. Det nye center er etableret på iNANO ved



Figur 2. Hovedkategorierne inden for protein-konjugationsmetoder.

I den globale modificeringsmetode udnyttes et aktiveret reagens, der kan reagere med en nukleofil aminosyre på proteinoverfladen. Her er det illustreret med en NHS-ester, der reagerer med lysin. Reaktionen giver en heterogen blanding af produkter. Den specifikke modificeringsmetode bygger på genetisk modificering af proteinet ved at indsætte et håndtag (mørkegrøn), der efterfølgende kan reagere med den komplementære reaktive gruppe (lysegrøn). Derved fås et homogent produkt. Dirigeret modificering udnytter, at visse proteiner kan binde til en bestemt gruppe såsom metal-ioner eller en ligand. Herved bringer den dirigerende gruppe den reaktive del tæt på proteinoverfladen i et afgrænset område. Her er det illustreret ved et organisk molekyle bestående af en dirigerende del (brun), en reaktiv del (blå), der bliver kløvet under reaktionen og den ønskede funktionelle gruppe (rød). Metoden giver et mere homogent produkt end den globale og er ikke afhængig af genetiske modifikationer af proteinet, hvilket betyder, at den kan udføres på mange naturlige proteiner.

Aarhus Universitet og ledes af professor Kurt Vesterager Gothelf og involverer også kollegaerne professor Jørgen Kjems og lektor Ken Howard samt professor Tony LaHoutte fra Vrije Universiteit i Bruxelles.

Visionen for centeret er at udvikle et modulært set-up, hvor et stort bibliotek af proteiner, lægemidler, cirkuleringsforbedrende agenter, visualiseringsagenter m.m. nemt kan samles i komplekse konjugater ved hjælp af et modulært håndtag. Gennem de mange kombinationer, som et sådant bibliotek tillader, kan et medikament skræddersys til den enkelte sygdom og i sidste ende til den enkelte patient. Ideelt vil den personlige medicin resultere i effektiv behandling med færre bivirkninger.

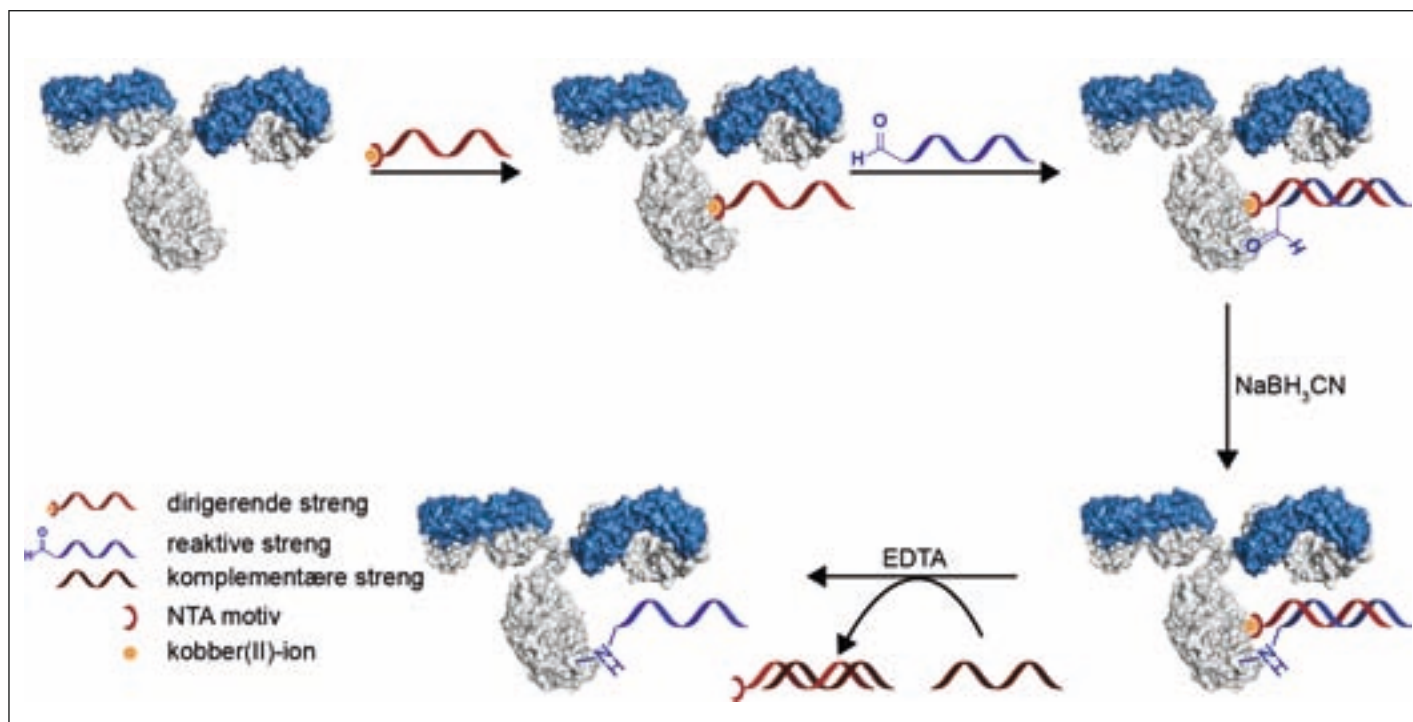
Som tidligere nævnt bygger metoden på, at der opbygges et bibliotek bestående af en bred skare af konjugater med et modulært håndtag. Dette håndtag skal bruges til at sammenkoble de forskellige elementer. I CEMBID vil dette blive gjort ved at koble DNA sammen med

de andre elementer illustreret i figur 1D. Når forskellige elementer; lægemidler, proteiner m.m. har forskellige DNA-strenger koblet på, kan man udnytte DNA som en molekylær lim, der bruges til at fastgøre de andre elementer. Man kan forestille sig, at man har elementerne liggende hver for sig og derefter kan blande dem med den sammensætning, der er passende for den enkelte patient.

Modifikation af proteiner

Det nævnte eksempel kræver, at DNA konjugeres til de proteiner, der skal samles. I de seneste år er anvendelsen af protein-konjugater inden for forskellige områder øget og dette har dannet grundlag for udviklingen af en bred vifte af konjugationsreaktioner. De metoder, der i dag er udviklet til at koble et molekyle til et protein, kan deles i to yderpunkter: en global konjugationsmetode og en specifik konjugationsmetode illustreret i figur 2.

Den globale metode er den nemmeste at foretage. Ved denne metode



Figur 3. Skematisk repræsentation af DTPC-metoden. Den dirigerende streng (rød) modificeret med tre NTA-motiver danner et kompleks med kobber(II)-ioner (gul cirkel). Derefter kan komplekset koordinere til en gruppe af histidiner, der sidder tæt på hinanden på det konstante domæne af antistoffet. Den reaktive streng (blå), modificeret med et aldehyd, hybridiserer med den dirigerende streng. Det bringer aldehydet tæt på en lysin på proteinoverfladen. Ved tilsætning af NaBH_3CN dannes en sekundær amin gennem reductiv aminering. EDTA tilsættes for at bryde metalkomplekset samtidig med, at en komplementær streng (rødbrun) til den dirigerende streng tilsættes. Herefter kan antistof-DNA-konjugatet oprenses.

konjugeres der til mange forskellige positioner på proteinet, og der opnås derfor en blanding af produkter, både hvad angår antallet af modifikationer og placeringen af disse. De globale metoder bygger på at bruge et reagens, der er selektivt overfor en eller et par af aminosyretyperne i proteinet. Når reagentet tilsættes til proteinet, vil det reagere med de aminosyrer, der er tilgængelige på proteinoverfladen. F.eks. vil en NHS-ester reagere med et udvalg af alle de lysiner, der er tilgængelige på proteinoverfladen [4]. Det kan give en meget stor spredning, da f.eks. IgG1-antistoffer har omkring 90 lysiner på overfladen. Metoden kan benyttes til de fleste proteiner, men i nogle tilfælde vil lysiner, der er væsentlige for aktiviteten eller selektiviteten af proteinet, blive ramt [5].

Den *specifikke* konjugationsmetode kræver oftest genetisk manipulation af proteinet for at indsætte en reaktiv gruppe, der kan modificeres kemisk eller enzymatisk. Da den reaktive gruppe indsættes på det genetiske niveau, er der fuld kontrol over antallet af modifikationer og placeringen af disse, til gengæld er det en længerevarende proces for hvert nyt protein, da alle nye proteiner skal igennem genetisk modificering efterfulgt af optimering af selve udtrykket af proteinet. En af disse specifikke metoder udnytter, at man ved hjælp af en modificeret cellelinje kan indsætte naturlige aminosyrer i et protein [6]. Herved kan man indsætte en aminosyre med en reaktiv gruppe, som kemoselektivt kan funktionaliseres i en hurtig reaktion, når det ønskede element senere kobles på. Det giver mulighed for at koble proteinet med mange andre elementer, både biomolekyler som DNA og små organiske molekyler såsom lægemidler.

DNA-dirigeret modifikation af metalbindende proteiner

Imellem de to ovenfor beskrevne metoder ligger der en anden type konjugationsmetode, kaldet dirigeret modifikation. Ken-

detegnet ved disse metoder er, at der dannes en ikke-kovalent koordination til proteinet, før den reelle kovalente binding bliver dannet. Den reaktive probe, f.eks. en NHS-ester, bruges i lav koncentration, hvilket mindsker uspecifik kobling. Koordineringen gør, at proben bringes tæt på proteinoverfladen. Der ved øges den lokale koncentration og dermed øges hastigheden for reaktionen med lysiner tæt på koordineringsstedet. Det gør det oftest også nemmere at styre antallet af modifikationer, da koordinationsstedet bliver mættet, og nye reagenser har derved svært ved at finde ind til proteinet.

I Kurt Gothelfs forskningsgruppe er en metode, der udnytter koordinering til at modificere protein, kaldet "DNA-Templated Protein Conjugation" (DTPC) blevet udviklet [7,8]. Metoden bruger to modificerede komplementære DNA-streng. Den ene streng er modificeret med tre nitrilotrieddikesyre (NTA) grupper, der kan koordinere en kobber(II)-ion hver, og strengen fungerer således som dirigerende gruppe. Den reaktive DNA-streng er modificeret med enten en NHS-ester eller et aldehyd.

Når de to DNA-strenges blandes, hybridiserer de til hinanden, mens NTA-kobber-komplekset koordinerer til det metalbindende område på proteinet. Dette bringer den reaktive gruppe tæt på proteinoverfladen og reaktionen kan forløbe. Dette foregår enten ved, at en lysin-sidekæde reagerer med NHS-esteren og danner en amidbinding, eller at der tilsættes natrium cyanoborhydrid, og aldehydet reagerer med en lysin-sidekæde gennem reductiv aminering. Efter endt reaktion tilsættes et metalbindende reagens, såsom etylen-diamin-tetraeddikesyre (EDTA) til at bryde metalkomplekset op, samt en komplementær DNA-streng til den dirigerende DNA-streng. Resultatet er et protein-DNA-konjugat, der kan oprenses ved hjælp af den fastgjorte DNA-streng, noget der oftest er meget vanskeligt, hvis der kun sættes små modifikationer på. Disse konjugater er nu klar til at indgå i biblioteket til dannelse af

multifunktionelle medikamenter. En videreudvikling af metoden bliver allerede brugt af en erhvervs-ph.d. i samarbejde med Novo Nordisk til udviklingen af større protein-komplekser bundet sammen af DNA.

Metalbindende proteiner

Rekombinante proteiner indeholder ofte en polyhistidinsekvens, et såkaldt his-tag, for at lette oprensningen efter endt udtryk. Da dette tag er i stand til at binde og chelatere NTA-kobber-komplekser kan en lang række af kommercielt tilgængelige rekombinante proteiner modificeres ved brug af DTPC-metoden. Udover proteiner med et his-tag er det anslået, at 25-50% af alle proteiner kan binde til metal-ioner, hvilket gør DTPC særdeles anvendeligt til modifikation af naturlige proteiner [9]. Antistoffer af typen IgG1 fra mus, kanin og menneske, besidder en histidin-klynge på det konstante domæne af antistoffet. Denne klynge kan ligeledes udnyttes som grundlag til at danne metalkomplekser. Derved kan antistof-DNA-konjugater laves med en hurtig og simpel metode uden forudgående genetisk modifikation af antistofferne. Holdet af forskere bag metoden har vist, at det er muligt at modificere klinisk relevante antistoffer mod flere typer cancer, og derved er en af grundstenene for CEMBED allerede lagt [8]. Grundet det store potentiale i metoden har forskerne ved Aarhus Universitet udtaget patent på metoden og startet virksomheden Affycon. Virksomheden arbejder på at kommercialisere teknologien og udvikle kits for at gøre koblingsreaktionen ligetil og uproblematisk for andre forskere og virksomheder at benytte.

E-mail:

Kurt Vesterager Gothelf: kvg@chem.au.dk

Referencer

- Schjoeth-Eskesen, C., Nielsen, C.H., Heissel, S., Højrup, P., Hansen, P.R., Gillings, N. & Kjaer, A. [64 Cu]-labelled trastuzumab: optimisation of labelling by DOTA and NODAGA conjugation and initial evaluation in mice. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **58**, 227-233 (2015).
- Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 315-337 (2017).
- Baselga, J., Ph, D., Pegram, M., Oh, D. & Ph, D. Trastuzumab Emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Eng J Med* **367**, 1783-1791 (2016).
- Leonidova, A., Foerster, C., Zarschler, K., Schubert, M., Pietzsch, H.-J., Steinbach, J., Bergmann, R., Metzler-Nolte, N., Stephan, H. & Gasser, G. In vivo demonstration of an active tumor pretargeting approach with peptide nucleic acid bioconjugates as complementary system. *Chem. Sci.* **6**, 5601-5616 (2015).
- Kazane, S.A., Sok, D., Cho, E.H., Uson, M.L., Kuhn, P., Schultz, P.G. & Smider, V.V. Site-specific DNA-antibody conjugates for specific and sensitive immuno-PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 3731-3736 (2012).
- Wang, L., Xie, J. & Schultz, P.G. Expanding the Genetic Code. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 225-249 (2006).
- Rosen, C.B., Kodai, A.L.B., Nielsen, J.S., Schaffert, D.H., Scavenius, C., Okholm, A.H., Voigt, N.V., Enghild, J.J., Kjems, J., Tørring, T. & Gothelf, K.V. Template-directed covalent conjugation of DNA to native antibodies, transferrin and other metal-binding proteins. *Nat. Chem.* **6**, 804-809 (2014).
- Kodai, A.L.B., Rosen, C.B., Mortensen, M.R., Tørring, T. & Gothelf, K.V. DNA-templated introduction of an aldehyde handle in proteins. *ChemBioChem* **17**, 1338-1342 (2016).
- Bowman, S.E.J., Bridwell-Rabb, J. & Drennan, C.L. Metalloprotein crystallography: More than a structure. *Acc. Chem. Res.* **49**, 695-702 (2016).

Stillesiddende arbejde?

SID DIG I FORM

PRØV
GRATIS
RING PÅ TELEFON
4494 5244



På en aktiv trænende kontorstol

Takket være deres unikke boldlignende bevægelser følger vores aktive stole dig og din krop mens du arbejder. Kroppens intuitive bevægelses behov får dig til at skifte arbejdsstilling uden du tænker over det. Det eliminerer stillesiddende arbejde, holder blodomløbet i gang og træner ryg, lænd & mavemusklere. God medicin mod ryg & lændesmerter.

Få en af vores aktive stole gratis på prøve i 14 dage. Så kan du selv mærke effekten på din egen krop. Se mere på swopper.dk

swopper®
SID DIG I FORM



muvman

Aktiv sidde & stå stol til fx produktion & laboratorie



swopper

Aktiv ergonomisk kontor & arbejdsstol



3Dee

Aktiv ergonomisk kontorstol m. ryglæn