

Pályázatunkban vizsgálni kívántuk az emlőrákok terápia rezisztenciájának okait, és olyan új, ill. szinergisztikus terápiás eljárásokat akartunk tesztelni, amelyek a betegség eliminálását, de legalábbis stabilizálását eredményezhetik. Az elmúlt négy év során a kísérleteink eredményeit 31 közleményben írtuk le; a közleményeket megjelentető folyóiratok összesített impakt faktora 127.6. Az alábbi beszámolóban elsősorban azokat az eredményeket tárgyaljuk részletesebben, amelyek jelenleg vannak közlés alatt, illetve amelyeket még nem zártunk le, ahol még további kísérletek szükségesek ahhoz, hogy megfigyeléseinket nemzetközi folyóiratokban publikáljuk.

Kutatásaink során a terápiákkal szemben fellépő rezisztencia négy területét vizsgáltuk:

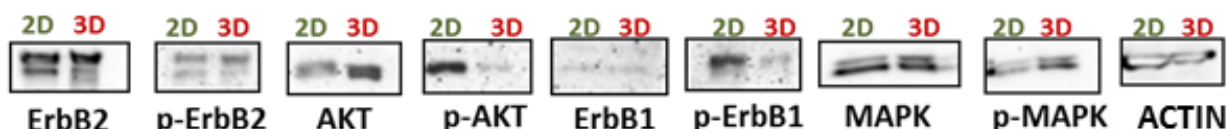
1. Tanulmányozni kívántuk azokat a molekuláris útvonalakat, amelyek fontos szerepet játszanak az ErbB2-t célzó antitest-terápiával szemben mutatott rezisztencia kialakulásában.

Korábbi eredményeink szerint sejtvonalakban és xenograft tumorokban a trastuzumab rezisztencia kialakulásában fontos szerepet játszik az ErbB2 trastuzumab kötő epitópjának hialuronsav általi maszkírozása. A projekt során végzett kutatásaink során ezen eredményeinket erősítettük meg emberi emlőtumor mintákon. Kidolgoztunk egy módszert a pericelluláris hialuronsav mennyiségének és a membránhoz kötött, ErbB2 expresszióra normalizált trastuzumab mennyiségének kvantitatív meghatározására konfokális mikroszkópos képeken. Az algoritmus alkalmazásával negatív korrelációt találtunk a pericelluláris hialuronsav mennyisége és a trastuzumab kötődés között. A negatív korrelációt mind egyedi minták szintjén, mind az egyes betegek összehasonlítása után feltártuk. A trastuzumab kötődését a metszetek hialuronidáz emésztésével fokozni tudtuk, ami szintén a hialuronsav maszkírozó hatását bizonyította (J. Histochem. Cytochem, 60: 567-575, 2012).

Korábbi eredményeink és irodalmi adatok arra utaltak, hogy az elisidepsin nevű kísérletes kemoterapikum a lipid tutajokon keresztül, azok hidroxilált lipid komponenseihez kötődve vált ki nekrotikus sejthalált. Kutatásaink során azt vizsgáltuk, hogy a gyógyszer hatékonysága hogyan változik hipoxia hatására. Eredményeik szerint a sejtek érzékenysége korrelációt mutat a zsírsav 2-hidroxiláz (fatty acid 2-hydroxylase, FA2H) enzim expressziós szintjével. A legtöbb vizsgált sejtvonal érzékenysége felére, negyedére csökkent hipoxiás körülmények között. Ez összhangban van azon eredményeinkkel, melyek szerint a hipoxia csökkentette a fluoreszcens elisidepsin kötődését ezen sejtek membránjához. (Marine Drugs, 11:4858-4875, 2013)

Kísérleteink során az ErbB fehérjék sejt felszíni eloszlásának vizsgálatára az általunk használt Förster rezonancia energia transzfer (FRET) módszert alkalmassá kellett tenni alacsony expressziós szinttel rendelkező fehérjék tanulmányozására is. Ugyanis a FRET hatásfok pontos meghatározása olyan körülmények között, amikor a specifikus jel alacsony, a háttérzaj viszont magas (pl. szövetmetaszetekken), jelentős torzításokat eredményez. Ennek kiküszöbölésére kifejlesztettünk egy maximum valószínűségi becslésen alapuló eljárást, amely a detektált fotonszámok Poisson statisztikája alapján meghatározza a legvalószínűbb FRET értéket úgy, hogy a mérési hiba miatt kilógó pixeleket eltávolítja az analízisből. A kidolgozott algoritmus működőképességét szimulációkkal és alacsony fotonszám, ill. magas aspecifikus jelölődés mellett is ellenőriztük (Cytometry A, 85A: 942-952, 2014).

Tanulmányoztuk, hogy a sejtenyésztés körülményei hogyan befolyásolják az ErbB receptor tirozinkinázok jelátviteli hatékonyságát. Ezek az eredményeink érdekesek és biztatóak, de még nem kerültek közlésre. A konvencionális és a 3-dimenziós sejt kultúrák vizsgálata során olyan tumoros sejtvonalat alkalmaztunk, melynek sejt felszínén a sejtek osztódását és életben maradását nagymértékben befolyásoló ErbB2 receptorok overexpressziója figyelhető meg, valamint nem elhanyagolható mennyiségben epidermális növekedési faktor receptorokat (ErbB1) is kifejez (SKBR-3 emlő adenokarcinóma sejtvonal). A sejteket Matrigel-be ágyazva tenyésztettük 3-dimenziós körülmények között 3, 7 illetve 10 napig, majd vizsgáltuk a jelátviteli folyamatokban részt vevő fehérjéket western-blott technika alkalmazásával. Azt tapasztaltuk, hogy az ErbB1 receptorok foszforilációja 3D-s sejt kultúrákban jelentősen lecsökkent a konvencionálisan tenyésztett sejtekhez képest, ami összhangban van azzal az eredményünkkel, hogy a matrigel-be ágyazott sejtek esetén az AKT kináz, ami részt vesz a sejtek életben maradásáért felelős PI3K-AKT szignalizációs útvonalban, nem foszforilálódott akkor, amikor a sejtek 7 és 10 napig voltak 3D-s körülmények között tenyésztve. Ezzel szemben a sejtek proliferációját a RAS-MAPK útvonalon keresztül szabályozó MAP kináz minden esetben foszforilálódott (1.1. ábra). Ezekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a 3-dimenziós körülmények között tenyésztett sejtek esetén a PI3-AKT jelátviteli útvonal nem játszik szerepet. Hasonló eredményeket kaptunk abban az esetben is, amikor a



1.1. ábra

sejtek mesenchymális őssejtek (MSC) felülúszóját kapták 7 napon keresztül 2 naponta.

Az ErbB2 fehérjék homoasszociációját olyan konvencionális kokultúrákban vizsgáltuk FRET segítségével, ahol 5 napon keresztül különböző arányban voltak jelen SKBR-3 és MSC sejtek, de nem tapasztaltunk változást mesenchymális őssejtek jelenlétében az ErbB2 receptorok homoasszociációjában. Azonban az ErbB2 expressziós szintje lecsökkent abban az esetben, ha jelen volt MSC is. További kísérleteink során vizsgálni fogjuk különböző tumoros sejtek felszínén többféle fehérje expressziós szintjét mesenchymális őssejtekkel együtt alkotott kokultúrákban.

2. Vizsgálni akartuk, hogy a multidrog rezisztencia (MDR) fehérjék túlzott kifejeződése hogyan járulhat hozzá terápiák hatástalanságához.

A trastuzumab kezelésre rezisztens JIMT1 emlőkarcinóma sejteken vizsgáltuk Hoechst 33342 festés segítségével az oldal populáció megjelenése és az ABC transzporterek expressziója közötti összefüggést. Azt tapasztaltuk, hogy gyakorlatilag minden JIMT-1 sejt kifejezi az ABCG2-t, valószínűleg az emlő mirigyhám eredete miatt. Ugyanakkor a sejteknek csak kb. 10 %-a mutat Pgp expressziót, azonban a Pgp expresszió és az „oldal-populáció festődés” nem korrelál egymással. A Pgp⁺ és Pgp⁻ sejteket áramlási citometriával elválasztva és *in vitro* tovább tenyésztve azt tapasztaltuk, hogy az elválasztott sejtek osztódási üteme nem tért el, a Pgp⁻ sejtek utódai is Pgp negatívak maradtak, míg a Pgp⁺ sejtek mindkét populációt létrehozták. További kísérleteinkben a JIMT1 sejteket SCID egerekbe xenotranszplantálva azt tapasztaltuk, hogy a kifejlődött tumorokban a sejtek 90-95%-a Pgp⁺ lett. A tumorokból CFSE festődés alapján különböző osztódási ütemű sejteket azonosítottunk. A CFSE festéket legkevésbé visszatartó, gyorsan osztódó sejtek között kimutattunk egy kis sejtpopulációt (0,2-0,3%), amely a sejtek zöméhez képest kb. 20-szoros Pgp expressziót mutat. Mivel a tumor sejtek gyakran genetikailag instabilak, az intenzív proliferáció során genetikailag eltérő sejtpopulációk is megjelenhetnek. Ezért megvizsgáltuk, hogy az eltérő Pgp expressziójú sejtpopulációk megjelenésének hátterében nem a Pgp-t kódoló *mdr1* gén amplifikációja áll-e. Kísérleteinkben sikeresen ki tudtuk mutatni a JIMT-1 sejtekre jellemző *erbB1* gén amplifikációját, azonban az *mdr1* gén amplifikációja nem volt detektálható. Reverzibilis, talán a sejtek *in vivo* mikrokörnyezete által kiváltott Pgp expresszió változásokról utal az a tény is, hogy a SCID egerekből eltávolított 20-szoros Pgp expressziót mutató sejteket, ha áramlási citométer segítségével kiszortoljuk és *in vitro* tovább tenyésztjük, lassan néhány hét alatt ismét lecsökken a Pgp expressziós szintjük.

A Pgp⁺ sejtpopuláció *in vivo* körülmények közötti dominánssá válásának okait (a sejtek 90-95 %-át teszik ki) próbáltuk a továbbiakban kideríteni. Mivel a gyorsan fejlődő tumorokban gyakran hipoxiás körülmények uralkodnak, vizsgáltuk a Pgp

expresszió és a hipoxia közötti összefüggést. A JIMT-1 sejteket *in vitro* hipoxiás körülmények között tenyésztve 7 napig 50%-os emelkedést tapasztaltunk a Pgp⁺ sejtek arányában, miközben az expresszió mértéke nem változott. Ezután a sejteket újabb 7 napig normál oxigén szint mellett tenyésztve a Pgp-t kifejező sejtek aránya visszaállt az eredeti kb. 10 %-os értékre.

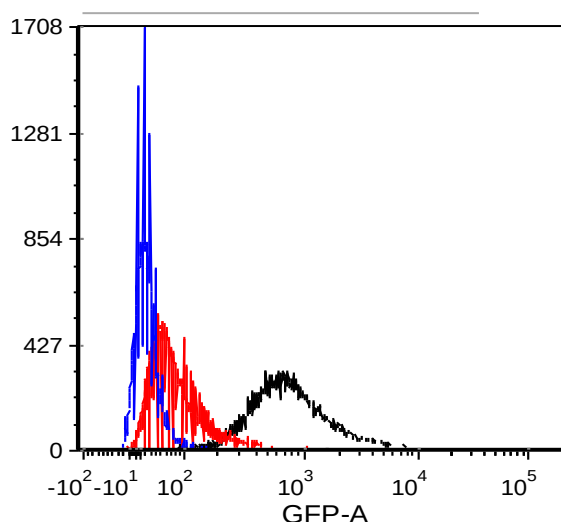
Egy másik kísérleti rendszerben az MDR okait vizsgálva bebizonyítottuk, hogy a kis koncentrációban alkalmazott modulátorok és az UIC2 antitest együttes adása gátolja a P-glikoprotein (Pgp) általi drog transzportot. A kombinált kezelés SCID egerekbe transzplantált Pgp-t expresszáló multidrog rezisztens tumorok méretének klinikailag is releváns mértékű csökkenéséhez vezetett. A kezelés *in vivo* tapasztalt tumor ellenes hatásához a Pgp gátlásán kívül az antitest-függő citotoxikus hatás (ADCC) is hozzájárul (PLoS One. 9(9):e107875, 2014)

A sikeres tumor terápia egyik feltétele a multidrog rezisztenciáért felelős fehérjék funkcionális expressziójának detektálása a terápia megkezdése előtt, illetve a betegség alakulásának követése során. Erre a célra szolid tumorok és tumor metasztázisok esetében legjobban a PET vizsgálatok alkalmazhatók, amennyiben megfelelő radiofarmakonok kerülnek kifejlesztésre. *In vitro* kísérleteinkben a rhodamin származék 2'[(18)F]-fluoroethylrhodamine B-t teszteltük és ígéretes, a Pgp-hez nagy affinitással kötődő szubsztrátnak találtuk (Eur J Pharm Sci. 74:27-35, 2015), ezért a továbbiakban Pgp⁺ és Pgp⁻ tumorokkal xenotranszplantált állatokon végzett kisállat PET vizsgálatokban kívánjuk tovább tesztelni.

Az ABC fehérjék, pl. a Pgp expressziója gyakran a sikeres tumor terápia gátját képezi, ugyanis bizonyos tumorok esetében nem állnak rendelkezésre olyan kemoterápiás szerek, amelyeket az ABC transzporterek nem képesek eltávolítani a tumor sejtekből. Az ABC transzporterek pontos működési mechanizmusának megértése elősegítheti újabb, az eddiginél szelektívebb gátlószerek kifejlesztését. Sajnos az ABC fehérjék működési mechanizmusának részletei közel 30 évi intenzív kutatómunka után sem ismertek pontosan. Vizsgálataink alátámasztják, hogy a fehérje magas szubsztrát affinitású, a citoplazma felé nyitott konformációjából már az ATP kötődése hatására átfordul az alacsony szubsztrát affinitású, extracelluláris oldal felé nyitott konformációba, melyet az ATP hidrolízise billent vissza az újabb szubsztrát megkötésére alkalmas állapotba. Kísérleteink azt is bizonyították, hogy mindkét ATP-kötőhely konzervált Walker A szekvenciájában előidézett mutáció a fehérjét inaktíválja, ugyanakkor csak az egyik ATP kötőhely mutációja nem akadályozza meg az ATP hidrolízist és a fehérje transzport aktivitását alátámasztva, hogy az ATP kötőhelyek random módon köteleződnek el az ATP hidrolízisre (Scientific Reports 6:24810, 2016).

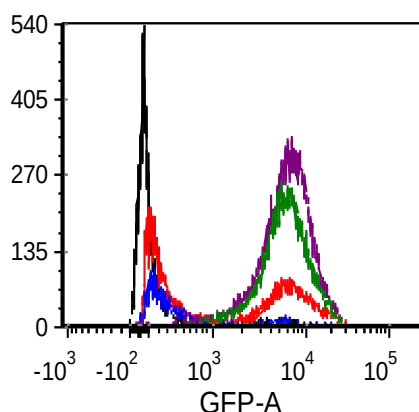
3. Emlőrák összejtek sejtfelszíni és nukleáris markereit kívántuk szisztematikusan meghatározni.

Az ErbB2 pozitív JIMT-1 emlőtumor sejtek in vitro passzáláskor a populáció sejtjeinek osztódási üteme azonos, nem látható CFSE jelölést visszatartó alpopuláció, a CFSE tartalom folyamatosan csökken minden sejtben (3.1. ábra, a fekete, vörös és kék görbék 1, 4 és 8 napos kultúrák hisztogramjait mutatják).



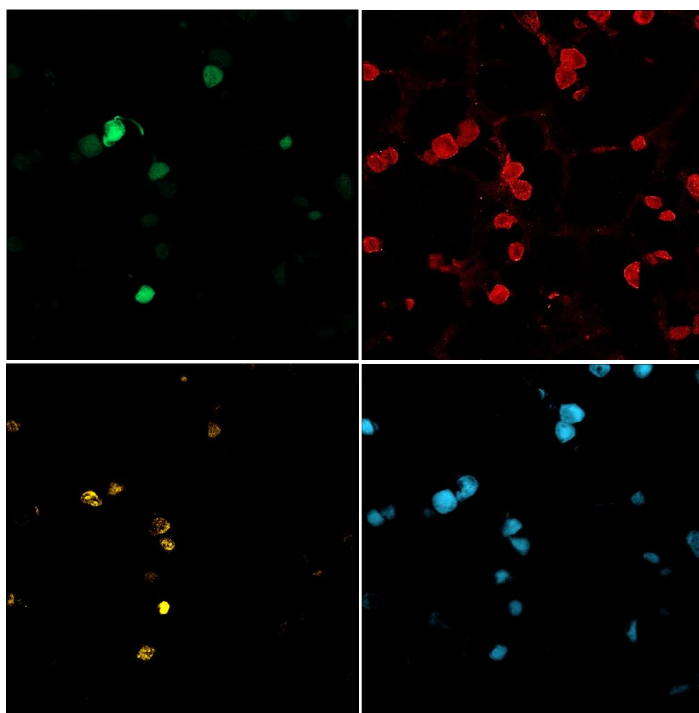
3.1. ábra

Ha a CFSE jelölt JIMT-1 sejteket SCID egérbe subcutan oltjuk, majd egyre növekvő időtartamokat követően a daganatot kivesszük és sejtjeit diszpergáljuk, a CFSE jelölést megtartó sejtpopulációk azonosíthatók áramlási citometriával (3.2. ábra, a lila, zöld vörös, kék és fekete hisztogramok 2, 5, 15, 20 és 25 napos tumorból származnak).



3.2. ábra

Fagyasztott metszetek immunfluoreszcenciás jelölését követően szintén láthatók a CFSE jelölést visszatartó, tehát a mintavételig nem, vagy ritkábban osztódó sejtek és sejtcsoportok (3.3. ábra; zöld: CFSE, vörös: ErbB2, sárga: Ki67 proliferációs marker, kék: DAPI/DNS). Érdekes módon ezek gyakran ErbB2 és humán MHC1 negatív, tehát



3.3. ábra

feltehetően egér eredetű strómális sejtek közelében találhatók.

Az ex vivo visszanyert CFSE pozitív sejtek nagy része magas ABC transzporter aktivitást mutat, de ez egyébként is jellemző az in vivo oltott sejtekre (l. 2. pont). Emellett számos, más epitheliális rendszerben ősz/progenitorsejt markernek mondható molekula is globálisan magas szinten fejeződik ki az in vivo szaporodó JIMT-1 sejtekben (pl. DKK4, C/EBPdelta, IFITM1), ami arra utal, hogy ez a sejtvonal egészében tranziens amplifikálódó jelleget mutat. Ugyanakkor az ex vivo fagyasztott metszetek immunfluoreszcens jelölést követő képanalízise azt mutatja, hogy a CFSE pozitivitás a sejtek egy részében Nanog és OCT4 pozitivitással jár együtt, ami ezen sejtek niche indukálta dormáns jellegére utal. Érdekes módon az SSEA4 jelölés viszont antikorrrelációt mutat a CFSE pozitivitással, ami további vizsgálatokat igényel. A kiválogatott CFSE pozitív sejtek ioncsatornáinak jellemzése jelenleg is folyik. Emellett az in vivo CFSE megtartást okozó niche in vitro modellezésén dolgozunk különféle 3D rendszerekben. Őssejtekre jellemző, globális epigenetikai specifikumokat nem sikerült kimutatnunk. Egér embrionális őssejtek és neurogén irányban differenciáltatott derivatívumai között nem volt kimutatható különbség sem általában a nukleosómák, sem a promoter-közei (H3K4me3 pozitív) nukleosómák stabilitásában, újonnan kifejlesztett hiszton elúciós tesztünkben.

4. Tanulmányozni kívántuk, hogy hogyan lehet javítani az emlőtumor elleni immunválasz hatékonyságát.

A daganatos betegség elleni harc egyik fontos pillére az immunrendszer működésének célzott befolyásolása, a daganat elleni Immunitás fokozása és a daganatos szövetben kialakuló immunszuppresszió csökkentése. Az elmúlt évtizedben kiderült, hogy az immunrendszer sejtjei igen sokféle ioncsatornát fejeznek ki, és a csatornák gátlásával az immunrendszer működése specifikusan befolyásolható. A pro- és anti-daganat hatások egyensúlya eltolható a daganatelleni immunitás irányába (Philosophical transactions, 369:20130106,2014). Az elmúlt években jelentős előrehaladást tettünk annak megértésében, hogy a skorpiók által termelt peptid toxinok milyen hatásmechanizmussal gátolják a limfociták ioncsatornáit és ezeken keresztül a T sejtek egyes funkcióit.

Szolid fázisú peptid szintézis felhasználásával olyan módosított skorpió toxint hoztunk létre (N17A/F32T-AnTx) amelyik a vad típusú peptidhez képes sokkal nagyobb szelektivitással gátolja a limfociták Kv1.3 K⁺ csatornáját. A vad típusú és a mutáns peptid NMR szerkezetének összehasonlításával megállapítottuk, hogy a szelektivitás növekedéséért elsősorban a módosított toxin vad típusúhoz képest

sokkal rigidebb szerkezete lehet a felelős, ami nem engedi meg azt, hogy a toxin többféle ioncsatornához is kötődjön. Eredményeink alapján egy olyan új szelektivitási mechanizmust definiáltunk, ami elsősorban a toxinok különböző flexibilitásán alapszik (Scientific Reports, 5 18397, 2015).

A peptidek szerkezet-funkció vizsgálatainak egyik pillére az ionáramok és a szelektivitás mérése elektrofiziológiával, a másik pedig az NMR-alapú szerkezet meghatározás. Ez utóbbiban lényeges előrelépést tettünk azzal, hogy az AnTx (ld fentebb) egy olyan változatát állítottuk elő, amely az N17A/F32T helyettesítés mellett a ciszteinek helyett szelenociszteint tartalmazott, és a toxin a stabilitását a diszulfid hidak helyett 4 db diszelenoid kötés biztosította. Az így létrejött Sec-N17A/F32T-AnTx megtartotta fiziológiás aktivitását, azaz nagy hatékonysággal gátolta a Kv1.3 csatornákat, ugyanakkor a Sec speciális tulajdonságai miatt az NMR szerkezet meghatározásból a peptidek diszulfid/diszelenoid hidak körüli konformációs dinamikájára vonatkozó lényeges, új információ volt kinyerhető (Chemical Sci. ISSN:2041-6520, 2015).

A fentebb ismertetett gondolatmenetnek megfelelően számos olyan új skorpió toxint izoláltunk és jellemeztünk, melyeknek igen komoly szerepe lehet az Immunitás megfelelő irányba történő módosításában, és a daganat elleni Immunitás fokozásában. Ezek közé tartozik a *Centruroides tecomanus* skorpióból származó α -KTx 10.4, α -KTx 2.15; α -KTx 2.16; α -KTx 2.17 and γ -KTx 1.9 (Toxicon,115:1-12, 2016), valamint az *Urodoacus yaschenko* skorpió mérgéből származó urotoxin (α -KTx 6.21), mely peptid toxin a korábban leírt orientációtól eltérően kapcsolódik a csatorna pórushoz (Mol. Pharmacol, 86:28-41, 2014).

Felmerült annak a lehetősége, hogy a kombinált kezelések egyik célpontja a STAT3 transzkripciós faktor lehet. A STAT3 (pl. IL-6 által kiváltott) tirozin foszforilációja számos, a sejtek proliferációjában és túlélésében, ill. az apoptózis gátlásában kritikus gén átíródását váltja ki. A STAT3 szerin oldalláncon is foszforilálódhat. A kétfajta foszforilációs mechanizmus egyensúlya kritikus a STAT3 működés szabályozásában. A foszforilációs mechanizmusok közötti kapcsolat, illetve az azt reguláló tényezők feltárása elősegítheti a STAT3 funkció megértését, így az azt célzó terápiás eljárások kifejlesztését.

Saját és irodalmi adatok alapján a benzofenantridinvázis alkaloidok közé tartozó kelidonin számos sejtípus esetén azok apoptózist váltja ki. Kísérleteinkben a STAT3 érintettségét tanulmányoztuk a kelidonin által kiváltott apoptózis folyamatában. A STAT3 aktiválását IL-6 kezeléssel idéztük elő. IL-6 stimuláció hatására a STAT3 tirozin és szerin oldalláncon történő foszforilálódása, valamint

magi transzlokációja volt megfigyelhető. Ellentétben a tirozin foszforilációs adatokkal, a STAT3 már külső stimulus (azaz citokinkötés) hiányában is megfigyelhető, ún. alap szerin foszforilációjához viszonyítva stimulus (IL-6 kötődés) hatására csak kismértékű szerin foszforiláció növekedést tapasztaltunk.

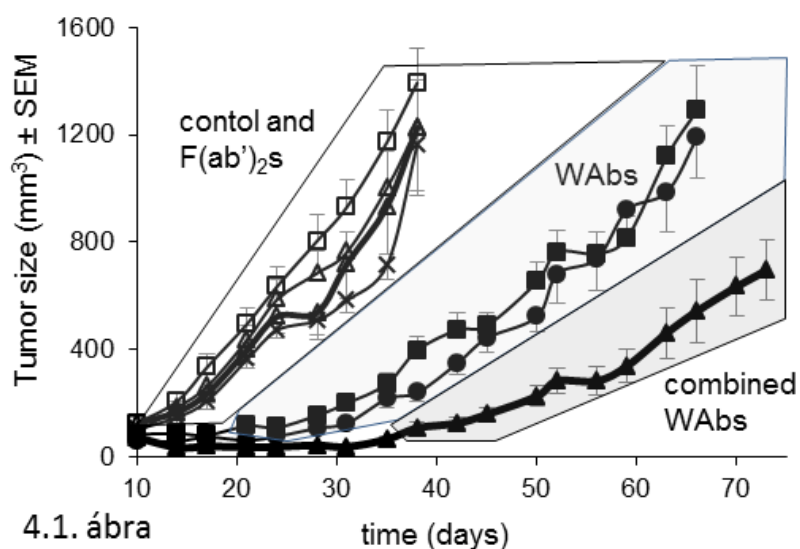
Kelidoninnal történő előkezelés a sejtek jelentős hányadában drasztikusan megnövelte az alap szerin foszforiláció szintjét, ezzel szemben az alap tirozin foszforiláció mértéke nem változott. Ezen sejtekben IL-6 kezelés hatására már nem tapasztaltuk a szerin foszforiláció mértékének további növekedését, azaz kelidonin hatására feltehetően az összes elérhető STAT3 szerin foszforilációja bekövetkezett, „telítődtek” a foszforilációs helyek. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a kelidonin a szerin foszforilációt pozitívan szabályozó folyamatokat felerősíti és/vagy a negatív szabályozókat gátolja.

Érdekes módon az IL-6 által kiváltott tirozin foszforiláció mértékének csökkenése és az alap szerin foszforiláció növekedése egymással korrelál: a megnövekedett alap szerin foszforilációs szinttel rendelkező sejtek többségén a STAT3 tirozin foszforilációja nem következett be IL-6 stimuláció hatására. Ezen sejtekben a STAT3 magi transzlokációja sem figyelhető meg.

A trastuzumab rezisztens emlőtumor sejtek immunrendszer általi támadhatóságát több terápiás modellrendszerben is teszteltük, ezek közül három is eredményesnek bizonyult.

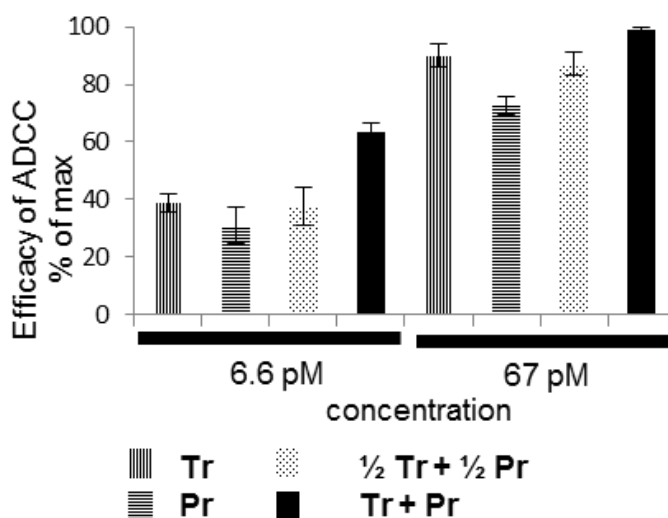
Egyrészt a pertuzumab ErbB2-t célzó monoklonális antitestet trastuzumabbal kombinációban és önmagában is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a két antitest kombinációja klinikai

dózisokat alkalmazva additív hatású, és ez a hatás az antitest mediált citotoxicitáson alapszik, mivel az Fc fragmentumot nélkülöző $F(ab')_2$ fragmentumot tisztán előállítva és azzal kezelve sem egyedi, sem kombinált terápiás hatást nem láttunk (4.1.ábra).



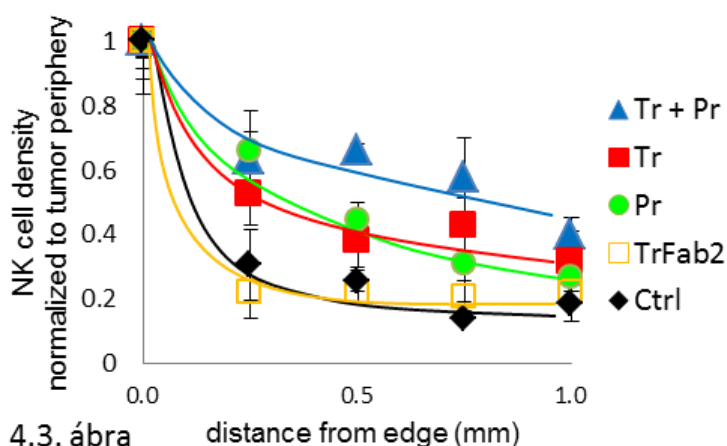
4.1. ábra

In vitro ADCC vizsgálatokból azt is megállapítottuk, hogy alacsony koncentrációknál a két antitest hatása additív, míg telítő koncentrációknál nem jelentkezik többlethatás (4.2. ábra). Az in vivo eredmények fényében ezt úgy értelmezhetjük, hogy a klinikai dózírozással elért antitest koncentrációk feltehetőleg nem telítik sem a sejteken expresszált ErbB2-t, sem az ADCC mechanizmust, s ez magyarázhatja az in vivo additivitást.



4.2. ábra

Ennek megfelelően a kombinált kezelés nagyobb számban és mélyebb tumor penetrációval rekrutálja az NK sejteket, ami az ex vivo fagyasztott tumorok kvantitatív immunfluoreszcenciás



4.3. ábra

analíziséből állapítható meg (4.3. ábra). A kísérletek arra hívják fel a figyelmet, hogy a ErbB2 pozitív emlőtumorok immutérapiája során az alkalmazott dózisok nem telítik az antitumor immunválaszt, és azonos targetet eltérő epitópokon támadó kombinációval jobb terápiás hatás érhető el. Ez

fontos üzenet a klinikum számára: egyrészt mechanisztikusan magyarázza, hogy a most befejezett CLEOPATRA klinikai kipróbálás kapcsán miért érték el egy évnél hosszabb átlagos túlélést metasztatikus emlőrák esetén, másrészt azt indikálja, hogy bármely ErbB2 pozitív tumor esetén a maximális megengedett dózissal végzett kombinált kezelést kellene végezni.

Mivel az ErbB2 célpontú antitest terápiával szemben tanúsított rezisztencia egyik kulcseleme a daganatsejtek számottevő extracelluláris mátrixa (ECM), azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy az olyan esetekben, mikor a passzívan diffundáló terápiás antitestek már nem képesek áthatolni az ECM-on, az ErbB2-t felismerni képes immunsejtek aktív felkutatató mozgásuk miatt még mindig eljutnak a célponthoz.

Ennek tesztelésére olyan átprogramozott T sejteket hoztunk létre, melyek un. kiméra antigén receptort (CAR) fejeznek ki. A konstrukció a trastuzumab alapját képező 4D5 antitestből készített egyláncú variabilis fragmentumot (scFv) tartalmazza target kötő részként, ez egy flexibilis linkerrel kapcsolódik a CD28 – CD3zeta szegmenseket tartalmazó tandemhez. A lentivirális transzdukcióval létrehozott egér CAR-T-sejtek felismerik a humán ErbB2-t, a CD28 szegmens létrehozza a kostimulatorikus jelet, ami a sejtek túléléséhez és klonális expanziójához szükséges, míg a CD3zeta

beindítja a citotoxikus

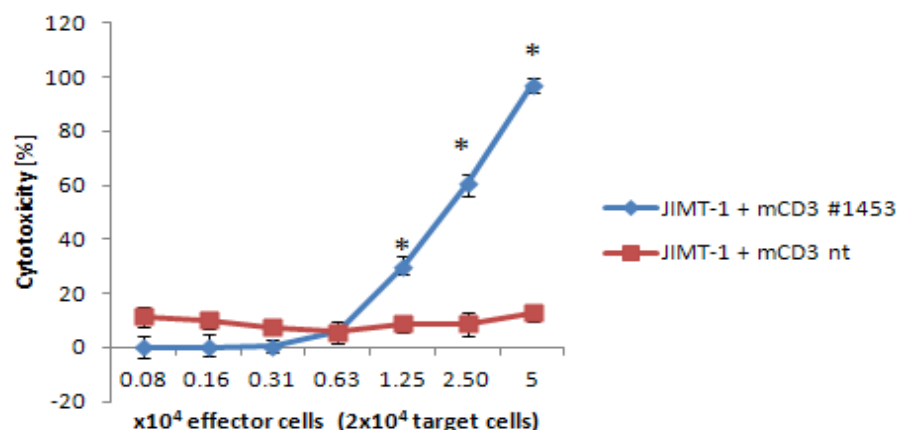
választ, amely az scFv alkalmazása miatt MHC

független, viszont minden ErbB2

célpontra toxikus, s így in vitro a

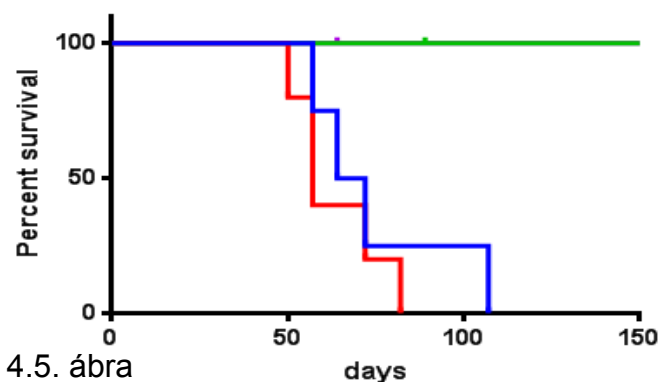
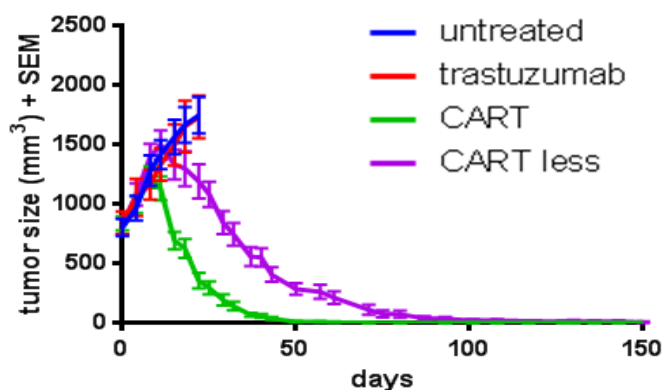
JIMT-t célsejteket elpusztításához

vezet (4.4. ábra).



4.4. ábra

In vivo az így előállított designer T sejtek hatékonyan pusztítják el a kifejlődött ErbB2 pozitív JIMT-1 xenograftokat még abban a stádiumban is, amikor a trastuzumab kezelés már egyáltalán nem hatékony (4.5. ábra, CART: egyszeri 200.000 sejt iv., CART less: egyszeri 20.000 sejt iv.). Figyelemre méltó, hogy hónapokkal a tumor eliminálása után is perzisztálnak ezek a transzgén T sejtek, és az ismételt beoltott JIMT-1 xenograftokat nem engedik kinőni. Elmondhatjuk tehát, hogy a kifejlett ECM-mel rendelkező tumorok esetén, mikor már a



4.5. ábra

kombinált antitestterápia sem hatékony, a páciens saját T sejtjeinek átprogramozása továbbra is teljes objektív választ eredményezhet.

Mivel a trastuzumab hatásmechanizmusai között az antitest általi leszabályozás, és ezáltal okozott funkció-csökkenés is fontos mechanizmus, vizsgáltuk azt is, hogy a rezisztens tumorok terápiájában az archazolid myxobakteriális antibiotikum, amely a vakuoláris V-típusú proton ATPáz gátlója, és így a leszabályozást potenciálisan elősegíti, sikerrel alkalmazható-e. Azt tapasztaltuk, hogy a V-ATPáz archazoliddal történő gátlása jelentősen gátolta a JIMT-1 sejtek proliferációját, fokozta a sejtek apoptotikus pusztulását, és csökkentette az Akt túlélési kináz működését. Emellett a sejtmembránban csökkent a kifejeződő ErbB2 mennyisége, míg a citoplazmában – kolokalizálódva az endoszómákkal, lizoszómákkal és autofagoszómákkal – felhalmozódott az ErbB2, melynek aktiváltsági állapota ugyanakkor, foszforiláltsága alapján kvantitálva, jelentősen csökkent. In vivo a SCID egerekbe oltott JIMT-1 tumorok növekedését az Archazolid gátolta, a kezelt egerek tumoraiban csökkent a Ki67 proliferációs marker előfordulása (Mol Oncol.8:9-19, 2014), tehát vizsgálataink alapján rendelkezésre áll egy új, inhibitor molekulára alapozott terápiás modalitás is a trastuzumab rezisztencia leküzdésére.