

NANODEM – Entwicklung eines Gerätes zum Therapeutischen Drug Monitoring von Immunsuppressiva

*Kathrin Freudenberger, Celina Wortmann, Günter Gauglitz
Eberhard Karls Universität Tübingen, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie,
Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Deutschland,
Kathrin.freudenberger@uni-tuebingen.de*

Abstract:

Direkt nach einer Transplantation ist es wichtig die Funktion des Immunsystems des Patienten durch die Gabe von Immunsuppressiva zu vermindern, damit das Organ nicht abgestoßen wird. Dazu ist eine genaue Dosierung dieser Medikamente anhand der aktuellen Arzneistoffkonzentration im Blut nötig. Ein Gerät zur Überwachung der Immunsuppressiva im Blut von Transplantationspatienten soll entwickelt werden. Die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die Arzneistoffe Tacrolimus und Mycophenolsäure wurden mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) charakterisiert. Außerdem wurden Kreuzreaktivitäten zwischen den strukturell ähnlichen Immunsuppressiva Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus (Makrolide) bestimmt.

Key words: Point-of-care testing, Immunsuppressiva, Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), biochemischer Sensor, Therapeutisches Drug Monitoring

Einleitung

Die ersten 72 Stunden nach einer Organtransplantation sind hinsichtlich einer Abstoßungsreaktion besonders kritisch. Immunsuppressiva verhindern die Abstoßung des transplantierten Organs, indem sie das Immunsystem unterdrücken. Sie besitzen eine enge therapeutische Breite und müssen deshalb möglichst exakt dosiert werden. Bei Unterdosierung besteht die Gefahr der Abstoßung, bei Überdosierung können toxische Nebenwirkungen das Leben des Patienten gefährden. In der Klinik werden zur Berechnung der nächsten Dosis einmal täglich die Arzneistoffkonzentrationen der Immunsuppressiva im Blut bestimmt. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die Bestimmung

der Fläche unter der Blutspiegelkurve zur Bestimmung der nächsten Dosis besser geeignet ist. Dazu ist es nötig Blutproben in kurzen Zeitintervallen von 5-20 min zu analysieren.

In dem von der EU geförderten Projekt NANODEM (NANOphonic Device for Multiple therapeutic drug monitoring) soll ein Gerät entwickelt werden, das die Überwachung der Immunsuppressiva und deren Metabolite im Blut von Transplantationspatienten direkt am Patientenbett (Point-Of-Care) ermöglicht [1]. Dies soll in Form eines Immunoassays mithilfe spezifischer Antikörper geschehen. Der Patient soll dabei über einen intravenösen Katheter mit Mikrodialyseeinheit direkt mit der Messeinheit verbunden sein.

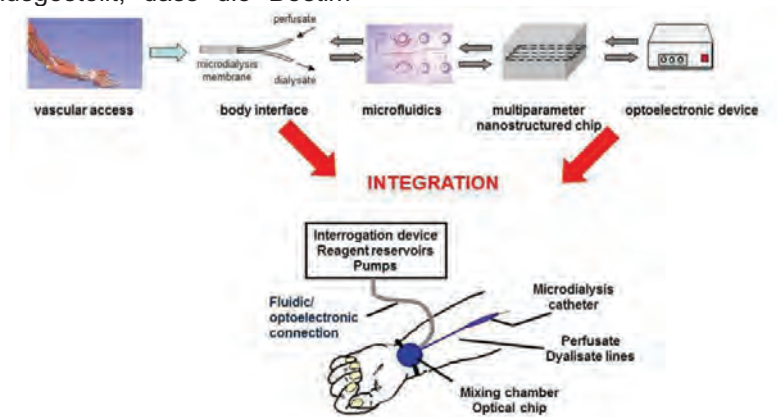


Abbildung 1: Schematische Zeichnung des POCT-Gerätes [2]

In diesem Zusammenhang stellte sich die Aufgabe die Antikörper gegen die entsprechenden Arzneistoffe zu charakterisieren. Als Methode bot sich die „Reflektometrische Interferenz Spektroskopie“ (RIIS) an. Hier soll über erste Ergebnisse berichtet werden.

Methoden

Bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie handelt es sich um eine optische Detektionsmethode, die auf der Interferenz von Weißlicht an dünnen Schichten beruht [3]. Vorteile dieser Methode sind, dass kein Labeln der Analyten bzw. Antikörper notwendig ist, was eine Bestimmung von Affinitätskonstanten im natürlichen Zustand ermöglicht. Außerdem wird ein zeitaufgelöstes Bindungssignal erhalten.

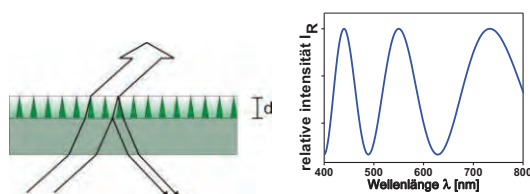


Abbildung 2: Charakteristisches Interferenzspektrum bei der Einstrahlung von Weißlicht [4]

Die oberste Schicht eines Glastransducers wird chemisch modifiziert. Weißlicht wird eingestrahlt und an den Phasengrenzen der verschiedenen Schichten teils transmittiert, teils reflektiert. Die reflektierten Teilstrahlen überlagern sich zu einem Interferenzspektrum.

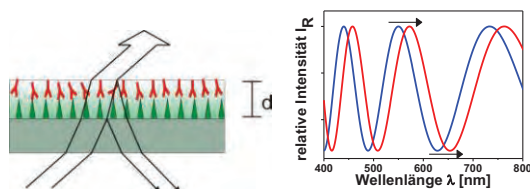


Abbildung 3: Verschiebung des Interferenzspektrums bei Anbindung eines Moleküls an die sensitive Schicht des Transducers

Durch die Wechselwirkung eines Moleküls mit der Transduceroberfläche, kommt es zu einer Änderung der optischen Schichtdicke, dem Produkt aus der physikalischen Schichtdicke und dem Brechungsindex. Das Interferenzspektrum verschiebt sich.

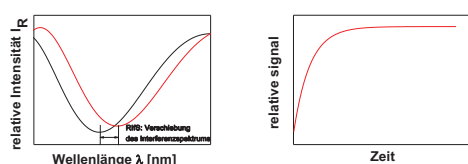


Abbildung 4: Zeitaufgelöstes Signal der Anbindung eines Moleküls an die sensitive Schicht

Über die Verschiebung eines Minimums im Interferenzspektrum kann die Anbindung über die Zeit detektiert werden.

Chemische Modifizierung der Oberflächen

Um die Interaktion zwischen Immunsuppressivum und Antikörper zu charakterisieren, wurden die Arzneistoffe an der Oberfläche von Glastransducern immobilisiert [5]. Dazu wird die Oberfläche zuerst mit 6M Kalilauge gereinigt und anschließend mit Piranha-Lösung aktiviert (konzentrierte Schwefelsäure, Wasserstoffperoxid (30%), (3:2)). Die Silanolgruppen auf der Oberfläche werden mit GOPTS (3-Glycidyloxypropyl-trimethylsilan) silanisiert. Um unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers an der Glasoberfläche zu verhindern wird im Folgenden das Biopolymer Diaminopolyethylenglykol (DA-PEG) aufgebracht, welches mit den Epoxygruppen des GOPTS reagiert. Sowohl Mycophenolsäure als auch das verwendete Tacrolimusderivat besitzen eine Carboxyfunktion die mit DIC (Diisopropylcarbodiimid) aktiviert wird und so an die Aminogruppe des DA-PEGs koppelt. Die beschichteten Transducer können einige Wochen im Kühlschrank (4°C) gelagert werden.

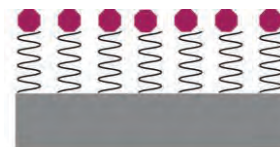


Abbildung 5: Immobilisierter Arzneistoff (Mycophenolsäure bzw. Tacrolimus) auf der Oberfläche

Um Antikörper auf der Oberfläche zu immobilisieren, wird wie bereits beschrieben DA-PEG auf die Oberfläche aufgebracht. Dieses wird mit Glutarsäureanhydrid (GA) umfunktionalisiert, so dass die Carboxygruppen der Oberfläche mittels DIC/NHS (N-Hydroxysuccinimid) aktiviert werden können. Der Antikörper wird nun über seine Aminogruppen angekoppelt.

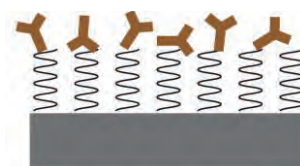


Abbildung 6: Immobilisierter Antikörper auf der Oberfläche

Ergebnisse

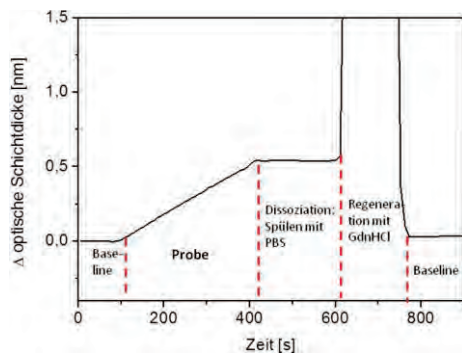


Abbildung 7: Ablauf einer RfS-Messung

Zu Beginn jeder Messung wird Puffer über den Transducer gegeben, sodass eine Basislinie erhalten wird. Es folgt die Probe. Ein Bindungssignal kann beobachtet werden. Nach dem Auftrag der Probe wird mit PBS (Phosphatpuffer) gespült, um eine mögliche Dissoziation von der Oberfläche erkennen zu können. Damit der selbe Transducer mehrmals hintereinander verwendet werden kann, wird die Oberfläche nach jeder Messung regeneriert, bevor bei Spülen mit PBS-Puffer wieder die Basislinie erhalten wird.

Die folgenden Messungen wurden in PBS-Puffer durchgeführt, als Regenerationsmittel diente 6M Guanidiniumchlorid-Lösung pH1,5.

Tacrolimus

Zuerst wurde die Anbindung des Anti-Tacrolimus-Antikörpers an Tacrolimus untersucht. Es konnte ein spezifisches Signal erhalten werden, das durch Zugabe des Analyten gehemmt werden kann. Dazu wurde der Antikörper vor dem Probenauftrag 30 min bei Raumtemperatur mit dem Arzneistoff vorinkubiert.

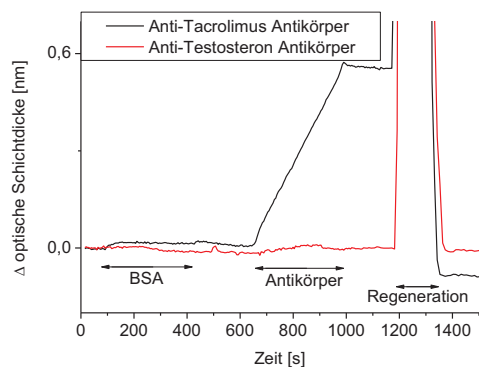


Abbildung 8: Spezifische Antikörperbindung

Vor der eigentlichen Messung mit Antikörper wird die unspezifische Bindung von Proteinen

(hier BSA) an die Oberfläche überprüft. Ein Spülschritt mit Puffer schließt sich an, bevor ab Sekunde 600 die Anbindung des Anti-Tacrolimus-Antikörpers zu sehen ist. Der Anti-Testosteron-Antikörper bindet hingegen nicht an die Oberfläche.

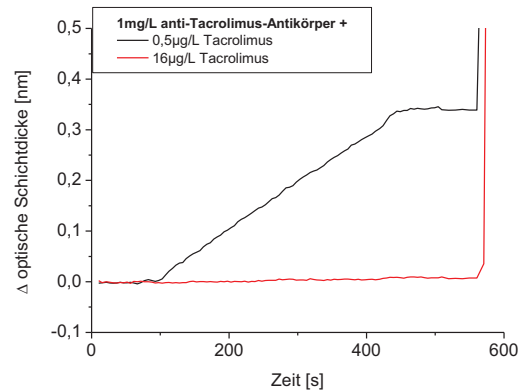


Abbildung 9: Bindungs-Inhibition Tacrolimus

Durch die Zugabe von 16 µg/L Tacrolimus zu 1 mg/L Anti-Tacrolimus-Antikörper werden alle Bindungsstellen der Antikörper gesättigt, so dass keine Anbindung an die Oberfläche mehr stattfindet.

Mycophenolsäure

Auch bei dem Immunsuppressivum Mycophenolsäure (MPA) wird ein spezifisches Signal durch die Anbindung des Antikörpers an den Arzneistoff auf der Transduceroberfläche erhalten. Dieses Signal kann durch Zugabe von MPA inhibiert werden.

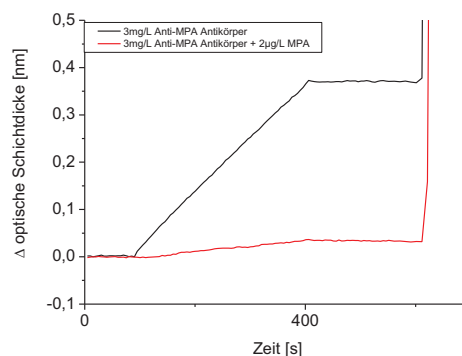


Abbildung 10: Bindungs-Inhibition Mycophenolsäure

Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Makroliden

Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität wurden die Makrolide Tacrolimus, Sirolimus und Everolimus je auf der Oberfläche eines Glas-Transducers immobilisiert. Es zeigte sich, dass der Anti-Tacrolimus-Antikörper auch alle strukturell ähnlichen immobilisierten Makrolide er-

kennt. Das Bindungssignal war bei allen dieser immobilisierten Arzneistoffe ähnlich hoch.

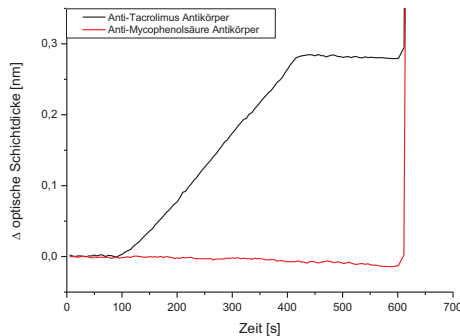


Abbildung 11: Kreuzreaktivität des Anti-Tacrolimus Antikörpers zu immobilisiertem Everolimus

Der Anti-Tacrolimus-Antikörper bindet an die mit Everolimus beschichtete Transduceroberfläche. Der Anti-Mycophenolsäure Antikörper zeigt keine Anbindung.

AFM-Messung der Immobilisierten IgG-Antikörper

Die Anbindung des Anti-MPA-Antikörpers an die Transduceroberfläche wurde mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) überprüft.

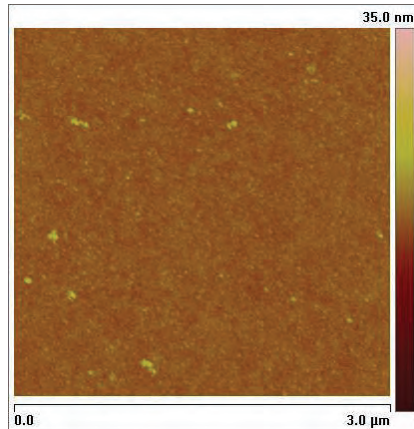


Abbildung 12: AFM-Bild der DA-PEG Oberfläche

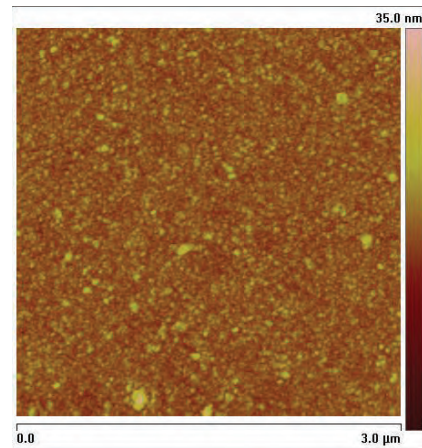


Abbildung 13: AFM-Bild des immobilisierten Anti-Mycophenolsäure-Antikörpers (IgG)

Im Vergleich zur DA-PEG-Oberfläche, auf die der Antikörper aufgebracht wurde, sieht man eine deutliche Zunahme der Rauigkeit.

Ausblick

Durch die Charakterisierung der Antikörper gegen die Immunsuppressiva Tacrolimus und Mycophenolsäure konnten unter anderem Informationen über Spezifität, Reproduzierbarkeit, Affinität und Inhibierbarkeit erhalten werden. Auf Grund dieser Erkenntnisse wird ein fluoreszenzbasierter Immunoassay unter Verwendung von Nanopartikeln entwickelt werden.

Literatur

- [1] Lupp PB, Müller C, Schlichtiger A, Schlebusch H (2011) Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30 (6):887-898. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.019>
- [2] DOW NANODEM Grant agreement no: 318372 (2012). Seventh Framework Programme.
- [3] Proll G, Markovic G, Steinle L, Gauglitz G (2009) Reflectometric interference spectroscopy. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 503:167-178. doi:10.1007/978-1-60327-567-5_8
- [4] Ewald M. LBA, Frimmer V., Gauglitz G. (2011) Eine neue Biosensorplattform für den Einsatz in der Tierdiagnostik. 10 *Dresdner Sensor-Symposium 2011*:27-30. doi:10.5162/10dss2011/1.2
- [5] Hermanson GT (2008) *Bioconjugate Techniques*. Elsevier Inc.,

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme ([FP7/2007- 2013] under grant agreement n° 318372