

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **227502**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **403542**

(22) Data zgłoszenia: **15.04.2013**

(51) Int.Cl.

A61K 47/66 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Koniugat zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1
oraz jego zastosowania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
27.10.2014 BUP 22/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
29.12.2017 WUP 12/17

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET WROCŁAWSKI, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANNA SZLACHCIC, Wrocław, PL

KATARZYNA PALA, Wrocław, PL

MAŁGORZATA ZAKRZEWSKA, Wrocław, PL

PIOTR JAKIMOWICZ, Wrocław, PL

JACEK OTLEWSKI, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Heyck

PL 227502 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem zgłoszenia jest koniugat zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1 z silnym związkiem cytotoksycznym, sposób jego otrzymywania i zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

Najnowsze sposoby leczenia nowotworów oparte są w przeważającej większości o terapie ukierunkowane, wykorzystujące występowanie na powierzchni komórek nowotworowych specyficznych białek, nieobecnych (lub też obecnych w znacząco mniejszej ilości) w zdrowych komórkach organizmu. W strategię tę wpisują się bardzo dobrze przeciwciała połączone ze związkami o aktywności cytotoksycznej (ADC – ang. *antibody-drug conjugates*), które zostały opracowane stosunkowo niedawno, zaś zainteresowanie nimi ogromnie wzrosło w ostatnich latach. Ich zastosowanie umożliwia bardziej selektywne i skuteczniejsze dostarczanie leku do miejsca zmienionego chorobowo (Senter, 2009; Ducry, 2010),

Wiele koniugatów typu ADC jest na różnych etapach prób klinicznych. W sierpniu 2011 r. został wprowadzony na rynek pierwszy lek tego typu – Brentuximab vedotin (SGN-35) firmy Seattle Genetics. ADC są immunokoniugatami składającymi się z ludzkiego przeciwciała (lub też jego fragmentu zmiennego) połączonego z niskocząsteczkowym związkiem o charakterze cytotoksycznym. Przeciwciało kieruje konstrukcją precyzyjnie do antygenu ekspozowanego na komórce nowotworowej, z reguły jest ono następnie internalizowane, zaś cytotoksyczny lek zostaje uwolniony do cytoplazmy komórki (Chari, 1992). Dzięki takiemu ukierunkowanemu dostarczeniu leku możliwe jest zminimalizowanie szkodliwych efektów ubocznych wykazywanych przez wolne silne związki cytotoksyczne na komórki zdrowe (Safety Assessment of Antibody Drug Conjugates, 2010).

Substancje przyłączane do przeciwciał to związki należące do dwóch grup pod względem mechanizmu swojego działania. Pierwsza z nich to związki hamujące polimeryzację tubuliny – takie jak aurystatyny (ang. *auristatins*) i majtanzinoidy (ang. *maytansinoids*). Wiążą się one bardzo silnie do tubuliny w tym samym miejscu co toksyczne alkaloidy roślinne, hamując jej polimeryzację i powodując przejście komórki na szlak prowadzący do apoptozy. Majtanzinoidy są związkami pozyskiwanymi z naturalnych źródeł, zaś aurystatyny są syntetyzowane chemicznie (choć również są pochodnymi naturalnej toksyny, dolastatyny). Druga grupa związków jest cytotoksyczna dla komórek przez swoje niekorzystne w skutkach oddziaływanie z DNA. Należą do nich kalicheamycyny i duokarmycyna. Kalicheamycyna (ang. *calicheamicin γ 1*) to organiczny związek chemiczny wyizolowany z bakterii *Micromonospora echinospora calichensis*, zdolny do rozcinania łańcuchów DNA. Duokarmycyna zaś jest związkiem wykazującym silną aktywność alkilującą DNA, również całkowicie zaburzającą jego funkcje.

Wszystkie wyżej wymienione cytostatyki charakteryzują się cytotoksycznością nieporównywalnie większą niż leki stosowane obecnie w terapii nowotworów, jednakże nie mogą zostać zastosowane samodzielnie ze względu na swoje szkodliwe działanie ogólnoustrojowe i powodowanie szerokiego spektrum skutków ubocznych (Senter, 2009). Wszystkie one są szczególnie toksyczne dla dzielących się komórek, przez swoje oddziaływanie ze składnikami cytoszkieletu i DNA. W połączeniu z białkami kierującymi takimi jak przeciwciała, wykazują dużo mniejszą szkodliwość i w takiej formie mogą być wprowadzane do terapii.

Przeciwciała są łączone z cytostatykami za pomocą różnego rodzaju łączników (linkerów), które również wpływają na efektywność końcowego produktu. Możemy wyróżnić łączniki stabilne, nieulegające rozpadowi, jak również łączniki cięte wewnątrz komórki w sposób chemiczny lub też enzymatyczny. Przykładem stabilnego łącznika jest wiązanie tioeterowe – lek cytotoksyczny jest uwalniany do cytoplazmy dopiero po degradacji przeciwciała w lizosomie. Łączniki rozpadające się w endosomach lub lizosomach pozwalają na wcześniejsze uwolnienie cytostatyku do cytoplazmy. Hydroliza łącznika może nastąpić na drodze chemicznej, jak w łącznikach hydrazonowych, wrażliwych na niskie pH, jak również na drodze enzymatycznej, czego przykładem są linkery peptydowe zawierające miejsce cięcia dla enzymów lizosomalnych, np. sekwencja walina-cytrulina rozpoznawana przez lizosomalną katępsynę B (Koblinski i wsp., 2000).

W dziedzinie koniugatów przeciwciał z cytostatykami przoduje firma Seattle Genetics, która zajmuje się produkcją leków typu ADC ale również projektowaniem nowych łączników (linkerów). W patencie WO2009117531 opisano łączniki zawierające nienaturalne lub D-aminokwasy które zostały wykorzystane do koniugacji aurystatyny z przeciwciałami. Linkery te są stabilne w krwioobiegu, a dzięki różnicom w metabolizmie komórek nowotworowych i zdrowych są selektywnie hydrolizowane

w tkance guza. Zastosowanie ich do koniugatów ADC pozwoliło na uwalnianie leku w tkance nowotworowej co może znacznie zmniejszyć skutki uboczne terapii.

Podobne linkery zostały opisane w patencie przedstawiającym metodę leczenia chłoniaka Hodgkina (US8263083). Metoda polega na synergistycznym działaniu chemioterapii i koniugatów przeciwciała anty-CD30 z aurystatyną (wspomniany powyżej Brentuximab vedotin). Lek skoniugowano z przeciwciałem za pomocą dipeptydowego linkera który jest hydrolizowany przez katepsynę B w komórkach nowotworowych.

Koniugaty przeciwciał z lekami cytotoksycznymi otworzyły nowy rozdział w terapii przeciwnowotworowej. Nie jest to jednak układ uniwersalny. Przeciwciała są stosunkowo duże, co utrudnia ich modyfikację. Ponadto często wykazują powinowactwo do więcej niż jednego celu molekularnego, zmniejszając tym samym specyficzność terapii. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania innych cząsteczek kierujących, które w koniugacie z cytostatykami będą wykazywały wysoką selektywność. Przedstawiony wynalazek przedstawia alternatywne do przeciwciał podejście dostarczania leku cytotoksycznego do komórek nowotworowych.

Istotą wynalazku jest koniugat zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1, zawierającego punktowe mutacje stabilizujące takie jak Gln40Pro, Ser47Ile, His93Gly i/lub mutację Cys117Ser, i linker trójglicynowy z N-kończową resztą cysteiny, CysGlyGlyGly, z przyłączonym za pomocą hydrolizowalnego linkera niskocząsteczkowym organicznym związkiem cytotoksycznym, którym jest pochodna dolastatyny – monometyloaurystatyna E.

Istotą wynalazku jest również koniugat zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1, zawierającego punktowe mutacje stabilizujące takie jak Gln40Pro, Ser47Ile, His93Gly i/lub mutację Cys117Ser, i linker trójglicynowy z N-kończową resztą cysteiny, CysGlyGlyGly, z przyłączonym za pomocą hydrolizowalnego linkera niskocząsteczkowym organicznym związkiem cytotoksycznym, którym jest pochodna antracykliny – doksorubicyna.

Istotą wynalazku jest także sposób hamowania proliferacji komórek o wysokiej ekspresji receptorów fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR) in vitro, polegający na tym, że wykorzystuje się koniugat zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1 określony w powyższych akapitach.

Istotą wynalazku jest także zastosowanie koniugatu zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1 określonego powyżej do wytwarzania leku do terapii nowotworowej.

W wielu nowotworach, m.in. piersi, prostaty, pęcherza, jak również w raku płuc zaobserwowano zwiększoną ekspresję receptorów fibroblastycznych czynników wzrostu (FGF). Zastosowanie specyficznych ligand dla receptorów FGF, stwarza możliwość opracowania metod diagnostycznych lub też terapeutycznych w tych nowotworach. Czynniki wzrostowe są wysoce selektywne, a co więcej mają rozmiar mniejszy od przeciwciał, co sprawia, że mogą mieć większy potencjał jako cząsteczki kierujące niż immunoglobuliny.

Czynniki wzrostowe wiążąc się do swoich receptorów na powierzchni komórek powodują aktywację szlaków sygnałowych prowadzących do stymulacji proliferacji komórek. Lek cytotoksyczny musi więc być na tyle silny aby znieść ten efekt i zahamować wzrost i podziały komórkowe, a następnie doprowadzić do śmierci komórki.

Dzięki mechanizmowi działania zarówno związku cytotoksycznego, jak i czynnika wzrostowego, koniugaty czynników wzrostowych z inhibitorami polimeryzacji tubuliny działają synergistycznie. Czynniki wzrostowe stymulują proliferację, a tym samym aktywuje polimeryzację tubuliny dzięki czemu jest ona bardziej dostępna dla inhibitora. Proces ten zwiększa wydajność działania leku cytotoksycznego, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórek.

Niniejszy opis został wzbogacony o przykłady realizacji wynalazku, które służą jedynie zobrazowaniu przedmiotowego rozwiązania i nie powinny być uznane za ograniczające zakres ochrony patentowej.

W przykładach wykonania do reakcji koniugacji wybrano ludzki czynnik wzrostu fibroblastów 1 (FGF1) oraz monometyloaurystatynę E, zawierającą linker walinowo-cytrulinowy oraz grupę maleimidową reaktywną wobec tioli.

Ludzki czynnik wzrostu fibroblastów 1 (FGF1) jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych przedstawicieli rodziny fibroblastycznych czynników wzrostu. Jest to globularne, nieglikozylowane białko, zbudowane ze 154 aminokwasów, o strukturze przestrzennej w postaci motywu typu „ β -koniczynki” (ang. *β -trefoil*) (Jaye i wsp., 1986; Burgess i Maciag, 1989). Jest on ligandem dla wszyst-

kich czterech receptorów czynników wzrostu fibroblastów FGFR (FGFR1-4) nadekspresjonowanych w wielu typach nowotworów.

W przykładach wykonania wykorzystano również stabilny mutant białka FGF1 z dodatkowym linkerem glicynowym zakończonym cysteiną na N-końcu (zgłoszenie nr P.398908). Mutant zawierał dodatkowo trzy mutacje stabilizujące (Gln40Pro, Ser47Ile, His93Gly, Zakrzewska i wsp., 2005) oraz mutację Cys117Ser. Dzięki temu cysteina dodana do N-końca białka była jedynym ekspozowanym aminokwasem z grupą sulfhydrylową zdolną do reakcji z resztą maleimidową aurystatyny. Koniugacja przebiegała więc w sposób specyficzny dając w rezultacie jeden produkt.

Aby uniknąć niejednoznaczności stabilny mutant FGF1 zawierający linker glicynowy z cysteiną oraz mutację Cys117Ser oznaczono symbolem FGF1_v.

Opis rysunków:

- Fig. 1. Schemat koniugatu białka FGF1_v z monometyloaurystatyną, na którym zaznaczono resztę maleimidową oraz miejsce proteolizy przez katepsynę B.
- Fig. 2. Proponowany mechanizm działania koniugatu FGF1_v-MMAE: wiąże się on do receptorów FGF obecnych w zwiększonej ilości na powierzchni komórek nowotworowych, zostaje zinternalizowany, a następnie w obecności enzymów lizosomalnych, m.in. katepsyny B, degradowany jest łącznik między czynnikiem wzrostowym a związkiem cytotoksycznym. Cytotoksyk jest następnie uwalniany do cytoplazmy, gdzie wiążąc się z elementami cytoszkieletu, zaburza funkcjonowanie komórki i prowadzi do jej apoptozy.
- Fig. 3. Żel SDS-PAGE oczyszczonego wariantu FGF1_v.
- Fig. 4. Widma fluorescencji tryptofanu (Trp107) w natywnym białku FGF1_v, dzikim typie FGF1 oraz gdy białko jest zdenaturowane termicznie (widoczna wyraźnie zwiększona intensywność fluorescencji przy 353 nm).
- Fig. 5a. Żel SDS-PAGE koniugatu FGF1 z doksorubicyną wybarwiony Commassie Blue (na dole) oraz widoczny w świetle UV (na górze). 5b. Test proliferacyjny komórek NIH3T3 traktowanych FGF1, doksorubicyną (DOX) oraz koniugatem FGF1 – doksorubicyna (FGF1-DOX) – w obydwu przypadkach użyto zmutowanego wariantu FGF1_v.
- Fig. 6. Postęp reakcji koniugacji białka FGF1_v z MMAE monitorowany za pomocą elektroforezy oraz spektrometrii mas.
- Fig. 7. Rozdział elektroforetyczny (SDS-PAGE) koniugatu FGF1_v-MMAE oczyszczonego na złożu tiopropyl-safarozowym (a), gdzie M – marker, CR – reakcja koniugacji, FT – frakcja niezwiązana z kolumną, W1-W2 – frakcje zebrane po płukaniu, E – elucja oraz na kolumnie analitycznej Superdex 75 (b), gdzie M – marker, CR – reakcja koniugacji, E1-E5 – frakcje elucji.
- Fig. 8. Rozdział elektroforetyczny białka FGF1_v oraz koniugatu FGF1_v-MMAE po trawieniu katepsyną B: M – marker, ścieżki 1-3 – białko FGF1_v po trawieniu katepsyną B (1) 0 min; (2) 30 min; (3) 1 h trawienia), ścieżki 4-6 – koniugat FGF1_v-MMAE po trawieniu katepsyną B (4) 0 min; (5) 30 min; (6) 1 h trawienia).
- Fig. 9. Analiza aktywacji ścieżek sygnałowych dla aktywowanych przez FGFR przeprowadzona metodą Western blot.
- Fig. 10. Wynik badania żywotności ludzkich komórek fibroblastycznych (BJ) oraz mysich (NIH 3T3) poddanych działaniu wolnej MMAE, koniugatu FGF1_v-MMAE oraz FGF1_v przez 96 h, sprawdzana testem Alamar Blue (a) oraz poprzez obserwację komórek w świetle widzialnym (b).
- Fig. 11. Wynik badania żywotności komórek MDA-MB-134 VI poddanych działaniu wolnej MMAE, koniugatu FGF1_v-MMAE oraz FGF1_v przez 96 h, sprawdzana testem Alamar Blue (a) oraz poprzez obserwację komórek w świetle widzialnym (b).
- Fig. 12. Różnice żywotności komórek U2OS i U2OSR1 (stabilnie transferowanych FGFR1) traktowanych koniugatem FGF1_v-MMAE.

Przykład 1

Nadprodukcja, oczyszczanie i charakterystyka rekombinowanego wariantu FGF1_v

W sekwencji kodującej ludzki FGF1 wklonowanej do wektora pET-3c wprowadzono substytucję ekspozowanej cysteiny seryną (C117S) oraz czteroaminokwasową insercję (Cys-Gly-Gly-Gly) na N-końcu białka za pomocą ukierunkowanej mutagenazy QuikChange (Stratagene). Otrzymane kon-

strukty zostały zsekwencjonowane w celu potwierdzenia obecności wprowadzonych mutacji. Konstrukty o właściwej sekwencji zostały namnożone w szczepie *Escherichia coli* DH10 i oczyszczone. Czystość preparatów DNA została potwierdzona za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Konstrukty zmodyfikowanego FGF1 stransformowano szczep bakterii *E. coli* BL21(DE3)pLysS przeznaczonych do nadprodukcji białek rekombinowanych. Hodowla prowadzona była w pożywce pełnej LB w 37°C, ekspresję białka indukowano izopropylotiogalaktozydem (IPTG) o stężeniu końcowym 0,5 mM przy gęstości optycznej (OD_{600}) między 0,6 a 0,8. Następnie hodowla prowadzona była przez 4 h w 37°C, zwirowana, a osad bakteryjny zawieszono w buforze o składzie: 20 mM TrisHCl, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF i zamrażano w -20°C.

Osady bakteryjne po rozmrożeniu były sonikowane w temperaturze 4°C i wirowane (14 000 g, 4°C, 1 h). Supernatant po wirowaniu, będący frakcją białek rozpuszczalnych, był wiązany do złoża Heparin-Sepharose zrównoważonego uprzednio 20 mM TrisHCl, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT. Następnie złoże było przemywane schłodzonym buforem o powyższym składzie, i kolejno buforem zawierającym 20 mM TrisHCl, 0,7 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 1 mM DTT. Elucję białka przeprowadzono buforem 20 mM TrisHCl, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT – białko zwalniane było ze złoża pod wpływem wysokiej siły jonowej. Obecność białka w poszczególnych frakcjach eluatu (1 ml) była oznaczana spektrofotometrycznie przez absorbancję przy 280 nm. Czystość otrzymanego preparatu była sprawdzana za pomocą SDS-PAGE (Fig. 3) oraz spektrometrii mas. Natywność białka została potwierdzona za pomocą analizy widm fluorescencji (Fig. 4). Wykorzystano fakt, iż w natywnie zwiniętej cząsteczce FGF1 fluorescencja reszty tryptofanu (Trp107) jest całkowicie wygaszona przy wzbudzeniu falą 280 nm). W stanie zdenaturowanym widmo emisji charakteryzuje się typowym dla tryptofanu maksimum przy 353 nm. Pomiary fluorymetryczne zostały przeprowadzone przy użyciu spektrofluorymetru Jasco FP-750, w buforze fosforanowym (25 mM H_3PO_4 , pH 7,3), w temperaturze 21°C. Zebrano widmo z zakresu 300–400 nm, przy wzbudzeniu falą o długości 280 nm. Użyto kuwety o drodze optycznej 1 cm, a stężenie białka wynosiło 4 μ M.

Przykład 2

Reakcja koniugacji doksorubicyny z wariantem FGF1_v

Rekombinowany fibroblastyczny czynnik wzrostu FGF1_v skoniugowano z doksorubicyną przez heterobifunkcyjny linker SMCC (Thermo Scientific) reagujący z grupami aminowymi doksorubicyny oraz tiolowymi białka. Reakcję prowadzono w roztworze wodnym w temperaturze 4°C. Doksorubicyna absorbuje światło UV dzięki czemu postęp reakcji można była badać w żelu SDS-PAGE (Fig. 5a).

W celu zbadania funkcjonalności koniugatu przeprowadzono testy proliferacyjne na liniach NIH3T3 (mysie fibroblasty) oraz na ludzkich fibroblastach (BJ). Wyniki wskazują, że białko jest w pełni aktywne i zdolne do stymulacji proliferacji komórek (Fig. 5b)

Przykład 3

Koniugacja wariantu FGF1_v z cytostatykiem, monometyloaurystatyną E (MMAE)

Roztwór wariantu FGF1_v o stężeniu 30 μ M, w buforze fosforanowym (25 mM H_3PO_4 , pH 7,3) zawierającym 100 mM NaCl, był poddany redukcji za pomocą 1 mM TCEP przez 20 min w temperaturze pokojowej. Następnie białko było odsalane na kolumnie Zeba (Thermo Scientific) aby pozbyć się nadmiaru czynnika redukującego i dodawane do monometyloaurystatyny E (MMAE) połączonej z dipeptydowym linkerem zakończonym grupą maleimidową. Reakcja była prowadzona w 4°C oraz w obecności 20% acetonitrylu (CH_3CN) oraz siarczanu heparanu w stężeniu 100 U/ml przy 2-5-krotnym molowym nadmiarze cytostatyku w stosunku do ilości białka. Reakcja kończona była po 16 h przez dodanie nadmiaru wolnej cysteiny. Postęp koniugacji monitorowany był za pomocą SDS-PAGE oraz spektrometrii masowej MALDI-TOF (Fig. 6.).

Aby zapewnić całkowitą czystość koniugatu i oddzielenie go od FGF1_v niezmodyfikowanego przez MMAE (wydajność reakcji była niższa od 100%), preparat oczyszczano za pomocą chromatografii oddziaływań hydrofobowych, ang. *hydrophobic interaction chromatography* (HIC). Oczyszczanie przeprowadzono na kolumnie ze złożem fenylo-Sepharose (GE Healthcare). Mieszanina reakcyjna była nakładana na kolumnę zrównoważoną buforem z wysoką zawartością soli – 25 mM TrisHCl pH 7,4, 2 M NaCl. W tych warunkach do złoża powinien wiązać się tylko koniugat, który jest dużo bardziej hydrofobowy od niezmodyfikowanego białka. Elucja FGF1_v-MMAE następowała przez przepłukiwanie kolumny buforem ze zmniejszającym się stężeniem soli, aż do 25 mM TrisHCl pH 7,4, 0,1 M NaCl. Obecność modyfikacji i czystość koniugatu była potwierdzona przez elektroforezę SDS-PAGE (Fig. 7).

Przykład 4

Trawienie linkera walinowo-cytrulinowego przez katepsynę B

Używana w eksperymencie monometyloaurystatyna E zawierała linker dipeptydowy walinowo-cytrulinowy, który jest specyficznie trawiony przez lizosomalną katepsynę B (Doronina i wsp., 2003). Enzym ten jest nadekspresjonowany w komórkach nowotworowych (Hughes i wsp., 1998).

Trawienie koniugatu FGF1_v-MMAE przeprowadzono *in vitro* w celu zbadania efektywności uwalniania cytostatyku pod wpływem proteolizy. Zmianę masy koniugatu badano metodą chromatografii żelowej w gradientowym żelu poliakryloamidowym.

Eksperyment wykazał efektywne trawienie linkera walinowo-cytrulinowego pod wpływem katepsyny B. Jednocześnie udowodniono, że białko FGF1_v nie jest trawione przez enzym (Fig. 7).

Przykład 5

Aktywacja ścieżek przekazywania sygnału

Aktywność biologiczną koniugatów FGF1_v-MMAE porównano z aktywnością wariantu FGF1_v. Aktywację szlaków sygnałnych badano metodą Western Blot wykorzystując głodzone komórki NIH 3T3 (mysie fibroblasty), które charakteryzują się ekspresją receptora FGFR1.

Głodzone komórki stymulowano przez 15 min w obecności heparyny (10 U/ml) odpowiednio białkiem FGF1_v w stężeniu 1, 10 i 100 ng/ml lub koniugatem w takim stężeniu aby ilość czynnika wzrostowego była taka sama jak przy stężeniach 1, 10 i 100 ng/ml wolnego białka. Komórki następnie przemywano buforem PBS, lizowano i sonikowano. Gotowe lizaty poddano analizie Western Blot z użyciem przeciwciał anty-fosfo-Erk1/2, anty-fosfo-FGFR, anty-fosfo-PLC γ , oraz anty- γ -tubuliny jako kontroli

Wykazano, że koniugat FGF1_v-MMAE aktywuje te same ścieżki sygnałne co wolne białko FGF1_v. Analiza Western Blot pokazała również że koniugat charakteryzuje się nieznacznie obniżoną aktywnością w porównaniu do wariantu FGF1_v (Fig. 8).

Przykład 6

Testy cytotoksyczności

Wpływ koniugatów na żywotność komórek posiadających receptor FGFR1 badano na przykładzie mysiej linii, fibroblastów NIH 3T3 oraz ludzkich fibroblastów BJ (które charakteryzują się średnim poziomem ekspresji receptora FGFR1), a także MDA-MB-134, posiadającą wysoką nadekspresję receptora. Eksperymenty przeprowadzono również na liniach U2OS i U2OSR1. Komórki U2OSR1 to linia stabilnie stransformowana receptorem FGFR1. W takim układzie możliwe jest porównanie komórek z FGFR1 do analogicznego modelu komórkowego nieposiadającego receptora na swojej powierzchni (U2OS).

Komórki wysiano na płytkę 96-dołkową (10⁴ komórek/dołek) w medium niezawierającym surowicy, a następnie traktowano wariantem FGF1_v i koniugatem FGF1_v-MMAE w obecności heparyny (10 U/ml) oraz medium z surowicą. FGF1_v, koniugat i wolna aurystatyna stosowane były w stężeniach od 5x10⁻¹⁰M do 1x10⁻⁶M. Odpowiada to stężeniom koniugatu i FGF1_v w zakresie od 10 ng/ml do 15 ug/ml. Komórki inkubowano 96 h w 37°C, 5% CO₂ po czym analizowano żywotność testem Alamar Blue (Invitrogen) wg protokołu producenta. Oprócz tego zliczano żywe i martwe komórki barwione Trypanem Blue (Invitrogen). Równocześnie badano zmianę morfologii komórek obserwując je pod mikroskopem świetlnym.

Podatność różnych linii komórkowych na wolną aurystatynę była podobna. Różnice pojawiły się w przypadku koniugatów FGF1_v-MMAE i zależały od poziomu ekspresji receptora FGFR1. Koniugaty znacznie obniżyły żywotność komórek BJ i MDA-MB-134 a w stężeniu powyżej 1x10⁻⁷M (1.5 ug/ml) zaobserwowano całkowitą śmiertelność linii MDA-MB-134 (Fig. 9, Fig. 10). Różnice były widoczne również dla linii U2O5 i U2OSR1 (Fig. 11). Linia U2O5 okazała się znacznie bardziej odporna na działanie koniugatów w porównaniu z linią transfekowaną receptorem FGFR1 (U2OSR1)..

Zastrzeżenia patentowe

1. Koniugat zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1, zawierającego punktowe mutacje stabilizujące takie jak Gln40Pro, Ser47Ile, His93Gly i/lub mutację Cys117Ser, i linker trójglicynowy z N-kończową resztą cysteiny, CysGlyGlyGly, z przyłączonym za pomocą hydrolizowalnego linkera niskocząsteczkowym organicznym związkiem cytotoksycznym, którym jest pochodna dolastatyny – monometyloaurystatyna E,

2. Koniugat zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1, zawierającego punktowe mutacje stabilizujące takie jak Gln40Phe, Ser47Ile, His93Gly i/lub mutację Cys117Ser, i linker trójjedynowy z N-kończącą resztą cysteiny, CysGlyGlyGly, z przyłączonym za pomocą hydrolizowalnego linkera niskocząsteczkowym organicznym związkiem cytotoksycznym, którym jest pochodna antracykliny – doksorubicyna.
3. Sposób hamowania proliferacji komórek o wysokiej ekspresji receptorów fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR) *in vitro*, **znamienny tym**, że wykorzystuje się koniugat zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1 określony w zastrz. 1 lub 2.
4. Zastosowanie koniugatu zmutowanego wariantu fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF1 określonego w zastrz. 1 lub 2 do wytwarzania leku do terapii nowotworowej.

Rysunki

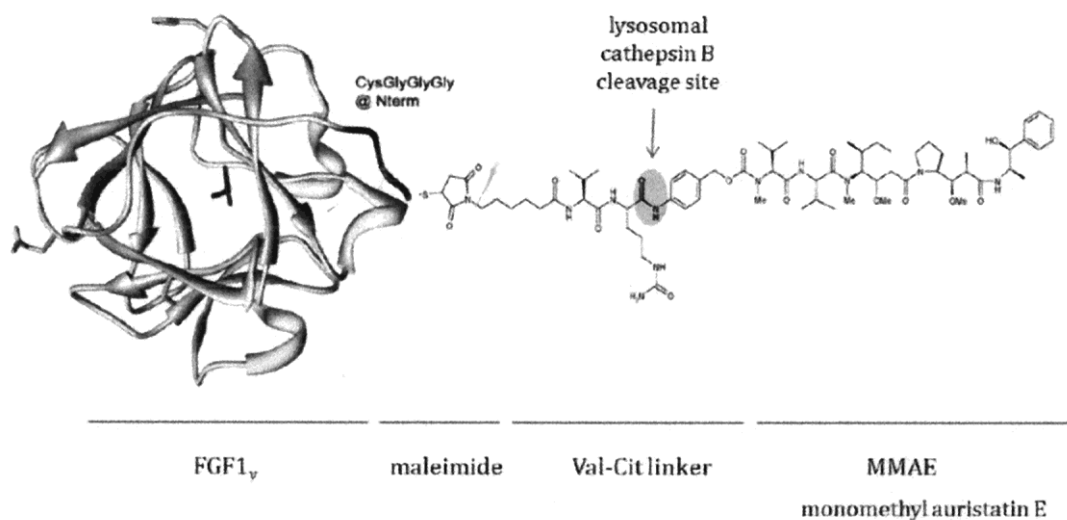


Fig. 1. Schemat koniugatu białka FGF1_v z monometyloaurystatyną, na którym zaznaczono resztę maleimidową oraz miejsce proteolizy przez katępsynę B.

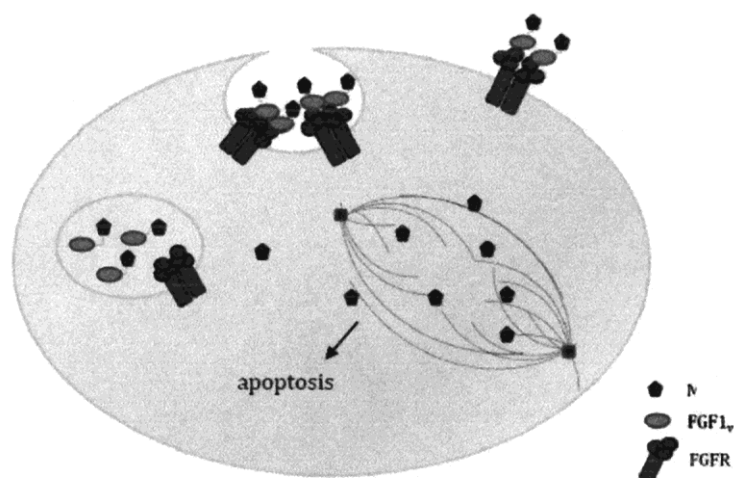


Fig. 2. Proponowany mechanizm działania koniugatu FGF1_v-MMAE: wiąże się on do receptorów FGF obecnych w zwiększonej ilości na powierzchni komórek nowotworowych, zostaje zintegrowany, a następnie w obecności enzymów lizosomalnych m.in. katępsyny B, degradowany jest łącznik między czynnikiem wzrostowym a związkiem cytotoksycznym. Cytotoksyk jest następnie uwalniany do cytoplazmy, gdzie wiąże się z elementami cytoszkieletu, zaburza funkcjonowanie komórki i prowadzi do jej apoptozy.

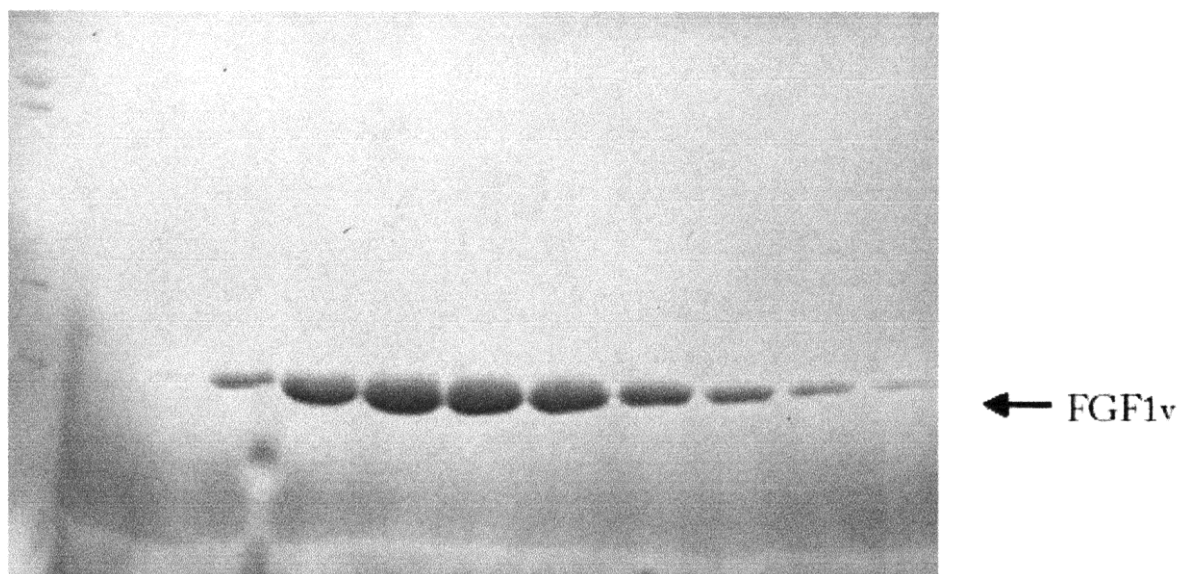


Fig. 3. Żel SDS-PAGE oczyszczonego wariantu FGF1_v.

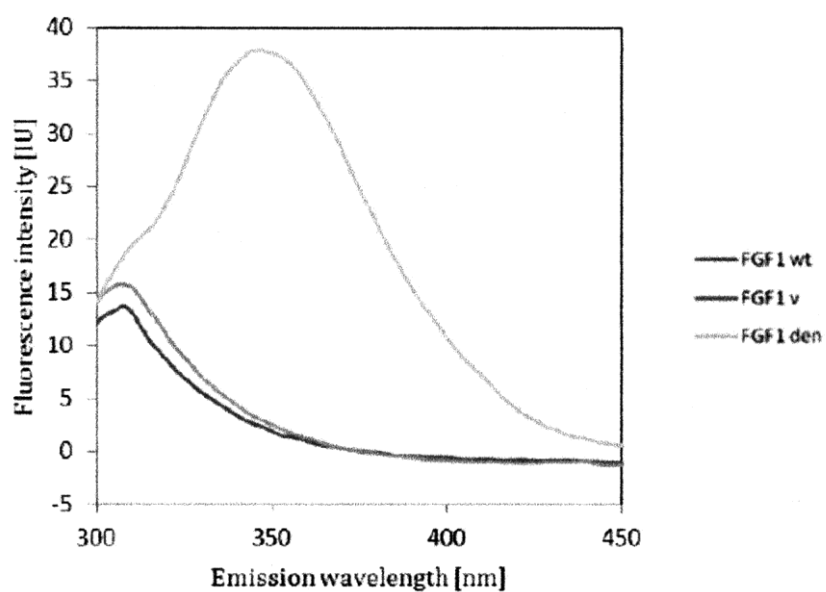


Fig. 4. Widma fluorescencji tryptofanu (Trp107) w natywnym białku FGF1_v, dzikim typie FGF1 oraz gdy białko jest zdenaturowane termicznie (widoczna wyraźnie zwiększona intensywność fluorescencji przy 353 nm).

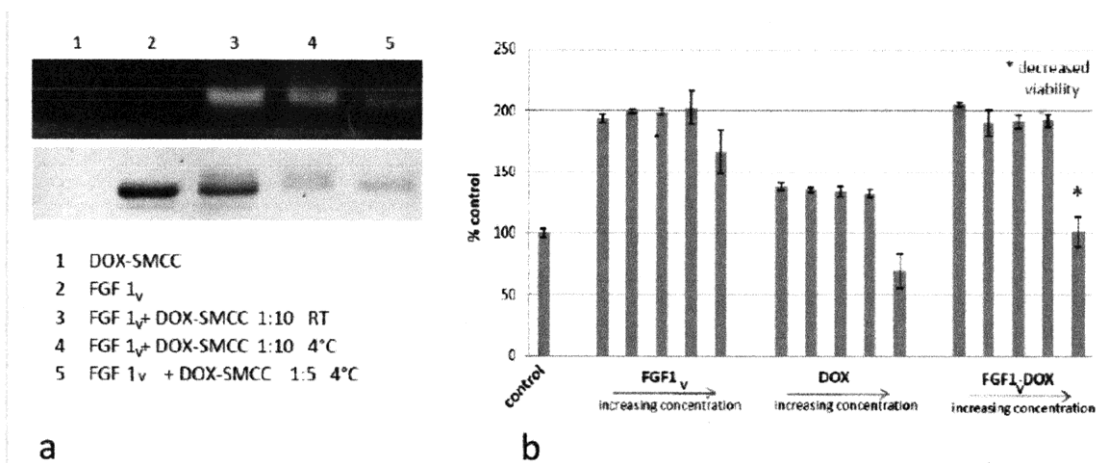


Fig. 5a. Żel SDS-PAGE koniugatu FGF1_v z doksorubicyny wybarwiony Commassie Blue (na dole) oraz widoczny w świetle UV (na górze).

Fig. 5b. Test proliferacyjny komórek NIH3T3 traktowanych FGF1_v, doksorubicyną (DOX) oraz koniugatem FGF1_v – doksorubicyna (FGF1_v-DOX).

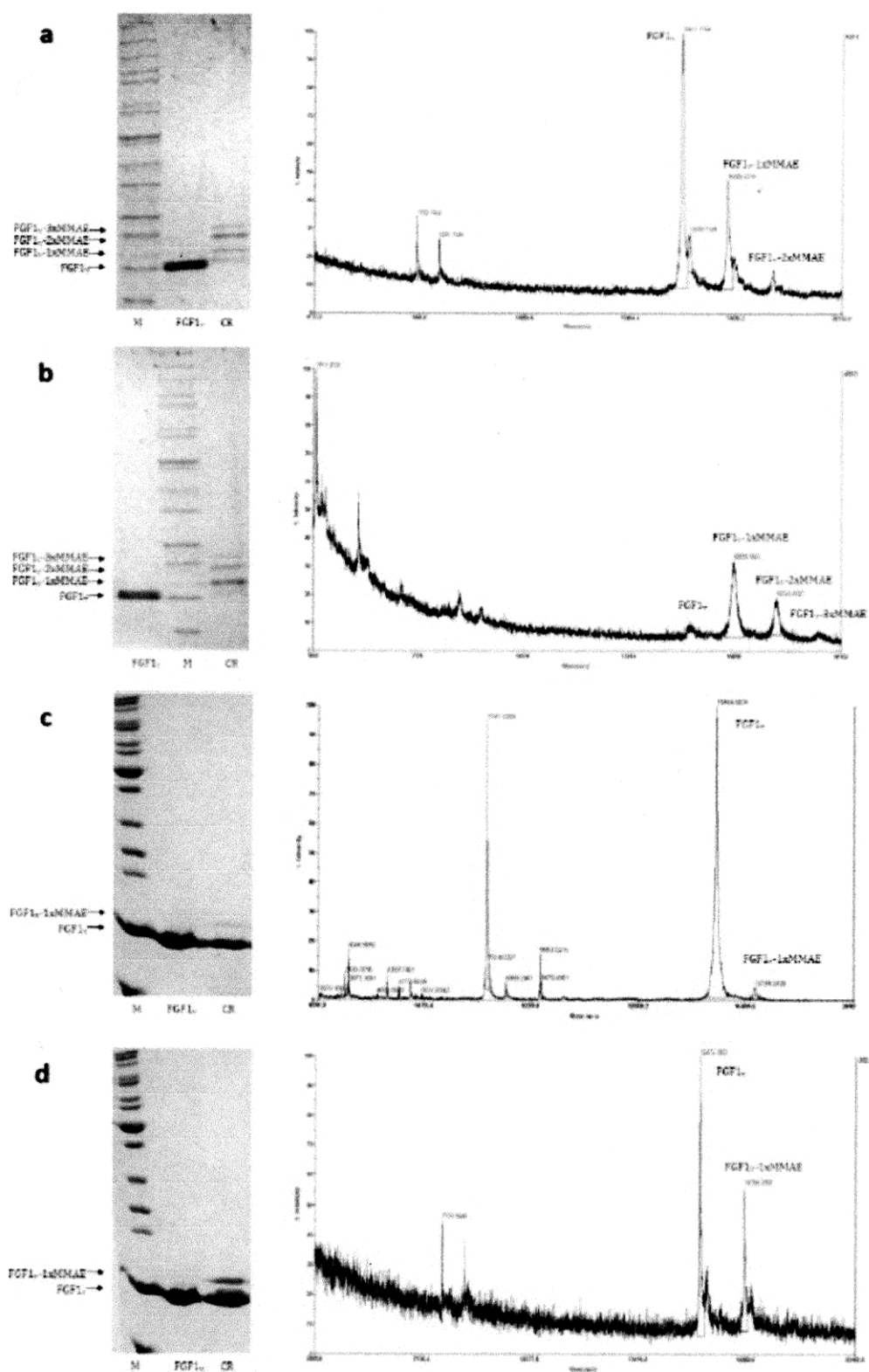


Fig. 6. Postęp reakcji koniugacji białka FGF1_v z MMAE monitorowany za pomocą elektroforezy oraz spektrometrii mas.

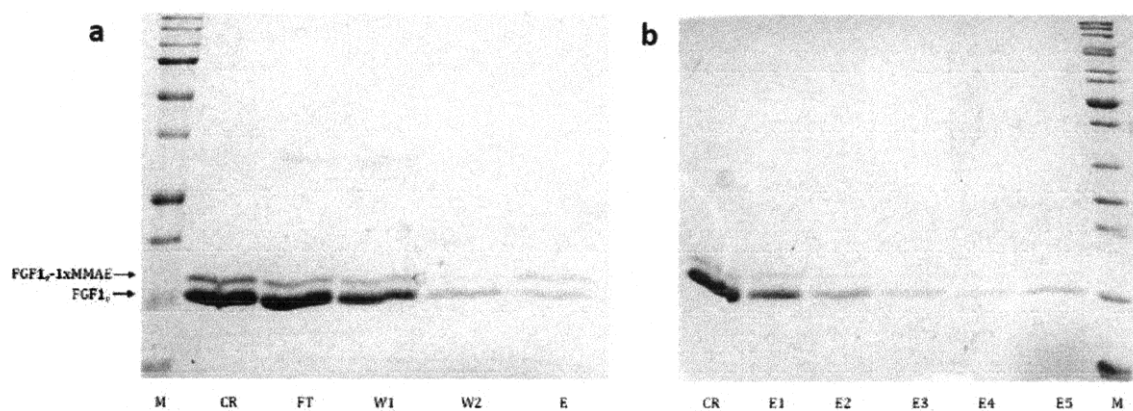


Fig. 7. Żel SDS PAGE koniugatu FGF1V-MMAE oczyszczonego na złożu tiopropylsefarozyowym (a), gdzie M – marker, CR – reakcja koniugacji, FT – frakcja niezwiązana z kolumną, W1-W2 – frakcje zebrane po płukaniu, E – elucja oraz na kolumnie analitycznej Superdex 75 (b), gdzie M – marker, CR – reakcja koniugacji, E1-E5 – frakcje elucji.

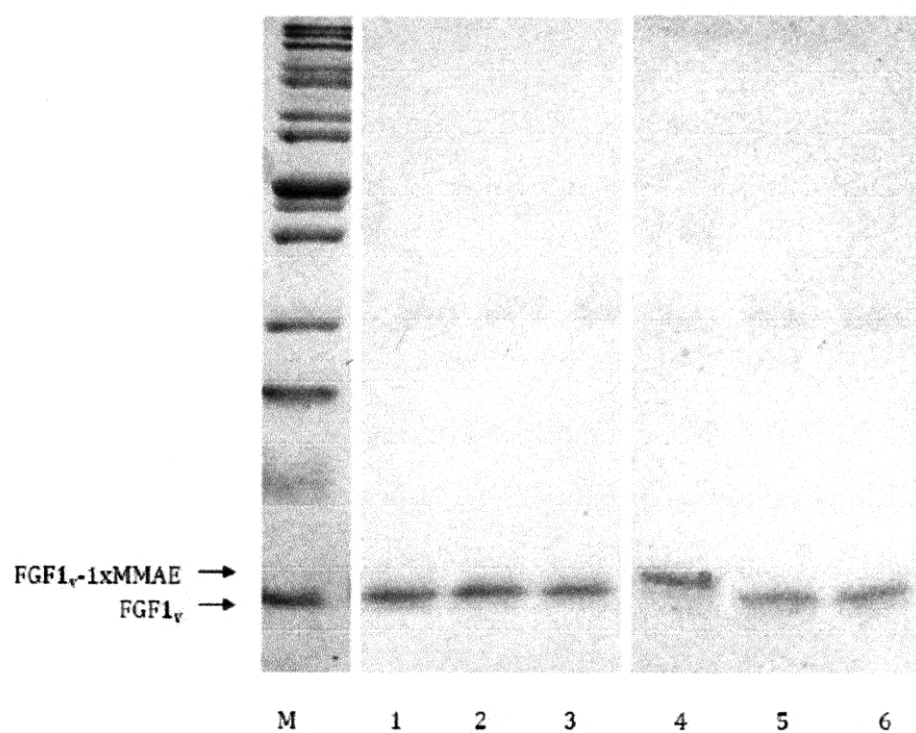


Fig. 8. Żel SDS-PAGE białka FGF1V koniugatu FGF1V-MMAE po trawieniu Katepsyną B: M – marker, ścieżki 1-3 – białko FGF1V po trawieniu Katepsyną B (1) 0 min; 2) 30 min; 3) 1 h trawienia), ścieżki 4-6 – koniugat FGF1V-MMAE po trawieniu Katepsyną B (4) 0 min; 5) 30 min; 6) 1 h trawienia).

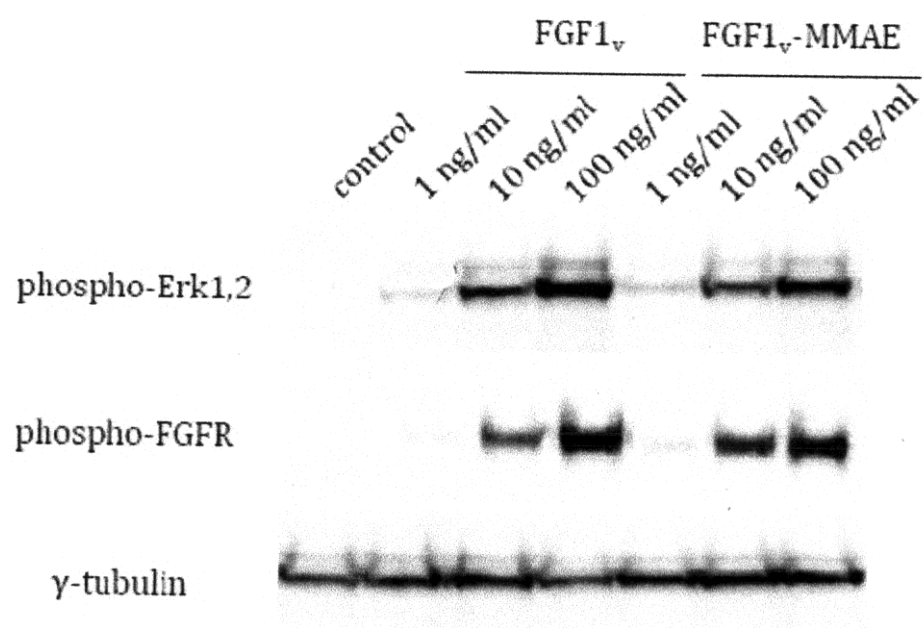


Fig. 9. Analiza aktywacji ścieżek sygnałowych dla aktywowanych przez FGFR przeprowadzona metodą Western Blot.

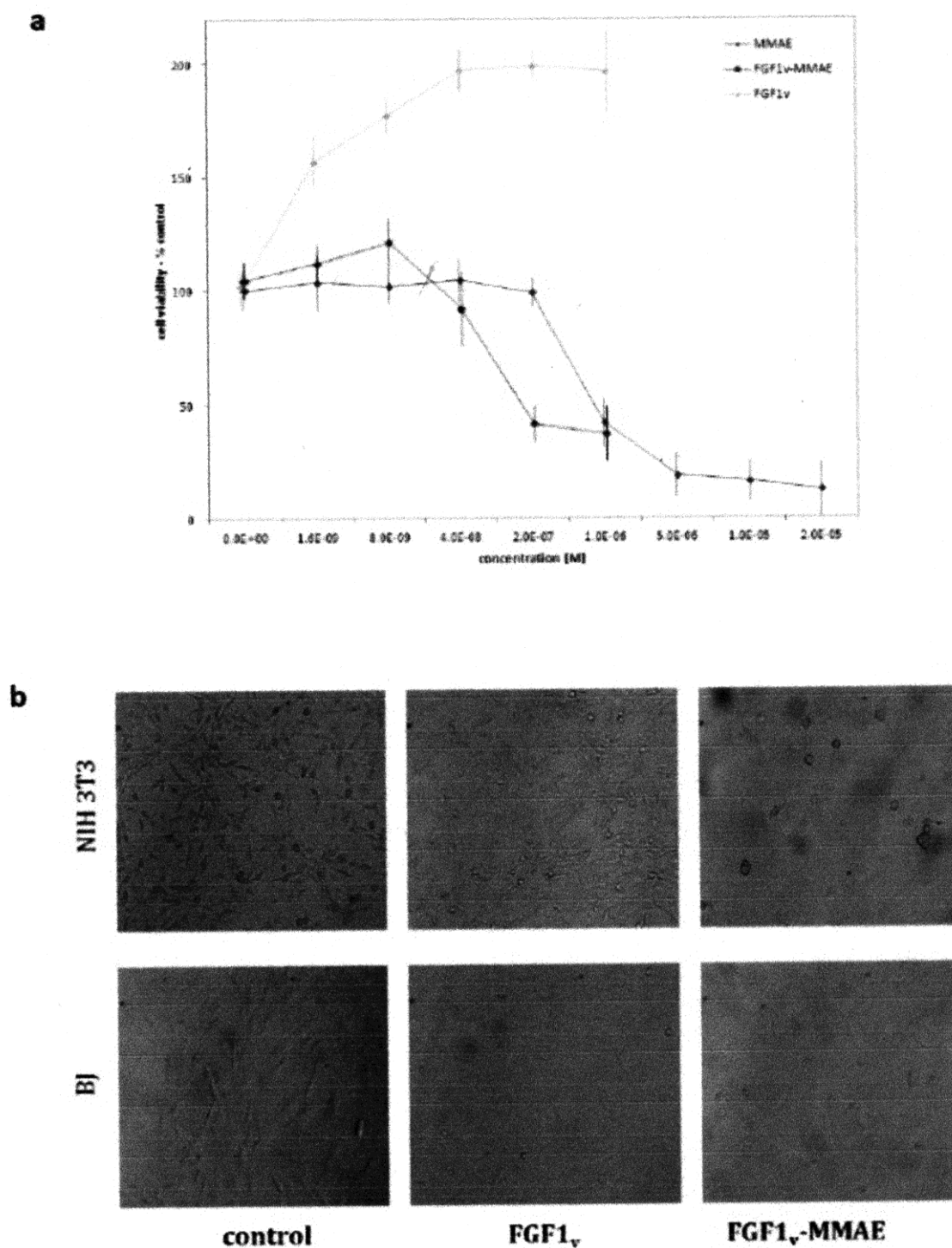


Fig. 10. Wyniki badania żywotności ludzkich komórek fobroblastycznych (BJ) oraz mysich (NIH 3T3) poddanych działaniu wolnej MMAE, koniugatu FGF1V-MMAE oraz FGF1V przez 96 h, sprawdzana testem Alamar Blue (a) oraz poprzez obserwację komórek w świetle widzialnym (b).

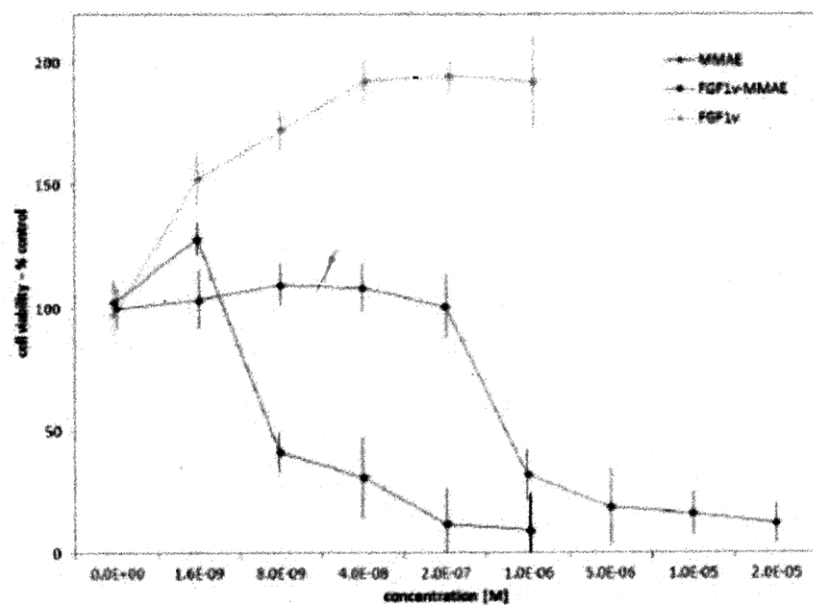
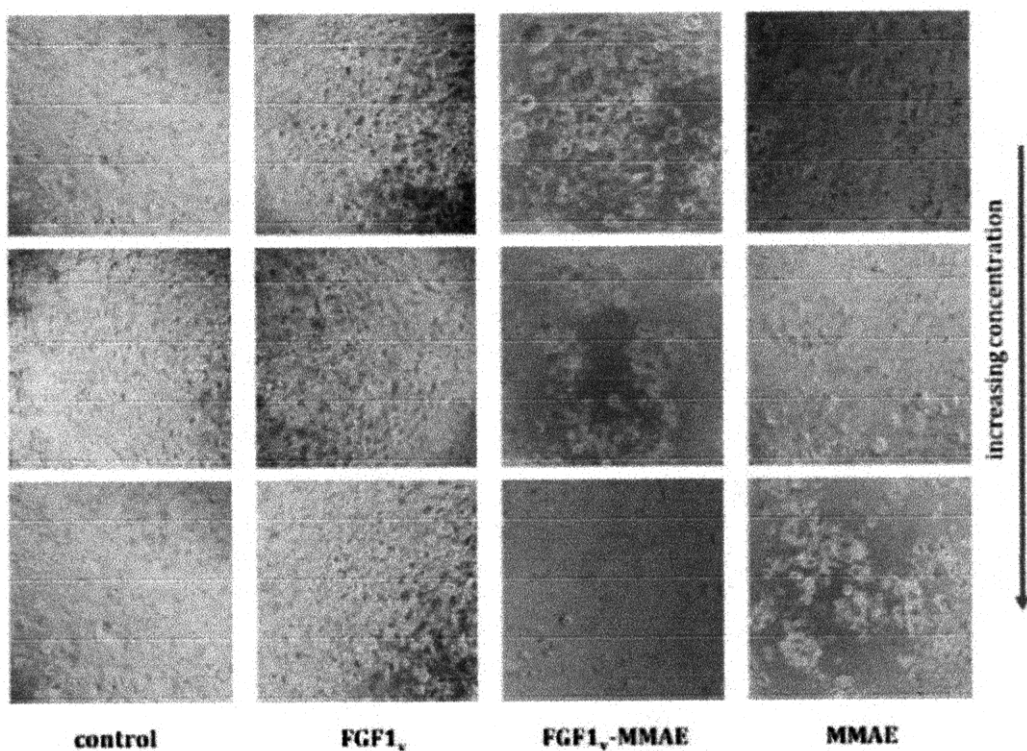
a**b**

Fig. 11. Wyniki badania żywotności komórek MDA-MB-134 VI poddanych działaniu wolnej MMAE, koniugatu FGF1V-MMAE oraz FGF1V przez 96 h, sprawdzana testem Alamar Blue (a) oraz poprzez obserwację komórek w świetle widzialnym (b).

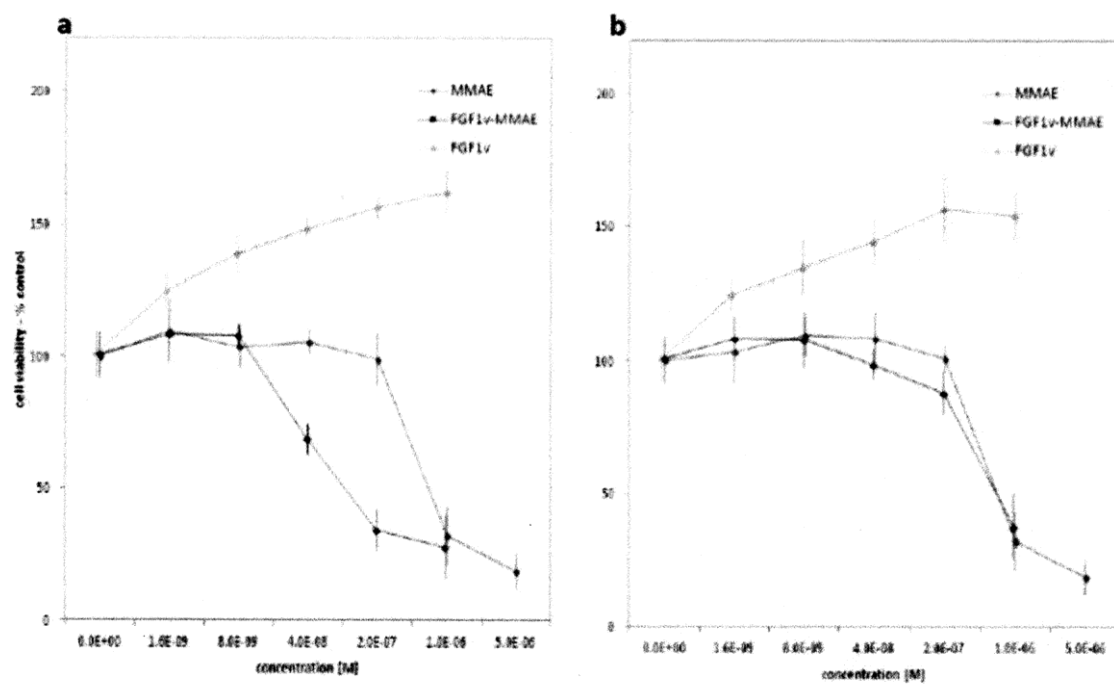


Fig. 12. Różnice żywotności komórki U2OS i U2OSR1 (stabilnie transferowanych FGF1) traktowanych koniugatem FGF1V-MMAE.

