

Sposób selekcji związków niskocząsteczkowych wywołujących ukierunkowaną degradację białek

Przedmiotem wynalazku jest wysokoprzepustowy przesiewowy sposób selekcji niskocząsteczkowych związków wywołujących ukierunkowaną degradację białek.

Rynek poszukiwania i opracowywania nowych leków charakteryzuje się dużymi nakładami finansowymi mającymi na celu ciągły rozwój w kierunku opracowywania innowacyjnych technologii oraz bardziej skutecznych mechanizmów działania związków o właściwościach leczniczych. O ile późniejsze etapy rozwoju każdego leku (badania przedkliniczne i kliniczne) są wystandardyzowane i ściśle regulowane, o tyle etapem ograniczającym rozwój nowych terapii jest dobór odpowiednich celów molekularnych oraz opracowanie wydajnych i wiarygodnych metod badań przesiewowych.

Z publikacji Chopra R., Sadok A., Collins I., 2019, A critical evaluation of the approaches to targeted protein degradation for drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 31:5-13 oraz Tae H.S., Sundberg T.B., Neklesa T.K., Noblin D.J., Gustafson J.L., Roth A.G., Raina K., Craig M., 2012, Identification of Hydrophobic Tags for the Degradation of Stabilized Proteins. *Chembiochem.* 13(4): 538–54 wiadomo, że destabilizacja struktury białek prowadzi do ich degradacji w wielkącząsteczkowym kompleksie enzymatycznym - proteasomie. Sygnałem do degradacji białka może być ekspozycja łańcuchów polipeptydowych składających się głównie z aminokwasów hydrofobowych lub przyłączenie cząsteczek ubikwityny do białka przeznaczonego do degradacji.

Od roku 2000 wiadomo, że proteasomalną degradację można również wymusić w komórce dzięki zastosowaniu związków stanowiących małowcząsteczkowe metki hydrofobowe, imitujące występującą naturalnie ekspozycję regionów hydrofobowych, indukując tym samym degradację niezależną od ubikwityny. Verma R, Deshaies RJ. *Cell.* 2000 May 12;101(4):341-4 *A proteasome howdunit: the case of the missing signal*. Potencjał terapeutyczny tego podejścia oceniany jest niezwykle wysoko. Główną zaletą jest skuteczność tych związków, ponieważ nie wymagają one, aby białko docelowe wykazywało funkcję enzymatyczną lub wiążącą. Dzięki temu możliwe jest typowanie nowych celów terapeutycznych, dla których było to do tej pory niewykonalne (ang. „*undruggable proteome*”, 80% ludzkiego proteomu). Związki te, nazwane związkami typu „degron”, wykazują aktywność biologiczną zarówno wobec patogennych białek endogennych (np. białka nowotworowe, amyloidy) jak i egzogennych (np. białka wirusowe).

Z zastosowania leków opartych na związkach typu degron, w porównaniu z klasycznymi sposobami leczenia preparatami chemicznymi i biologicznymi wynika wiele korzyści, jednak brak jest dostępnych rozwiązań technicznych pozwalających na wysokoprzepustową identyfikację małowcząsteczkowych związków wywołujących zjawisko ukierunkowanej degradacji białek.

Znane są sposoby wykonywania badań przesiewowych mających na celu identyfikację nowych związków wykazujących potencjalne działanie biologiczne. W US2018327869 ujawniono sposób

identyfikacji inhibitorów komórkowych szlaków sygnałowych, który opiera się na pomiarze poziomu ekspresji genu reporterowego sprzężonego z elementem regulatorowym oraz poziomu ekspresji genu kodującego represor powodujący supresję pierwszego genu oraz elementu regulatorowego aktywowanego sygnałem, który ulega aktywacji przez komórkowy szlak sygnałowy. Ten element regulatorowy jest funkcjonalnie sprzężony z pierwszą i drugą sekwencją nukleotydową. Bibliotekę badanych związków wprowadzano do populacji komórek ssących i określano ekspresję pierwszego i drugiego wykrywalnego reportera w jednej lub większej ilości populacji transfekowanych komórek, przy czym wykazano, że ekspresja pierwszego wykrywalnego reportera, ale nie drugiego wykrywalnego reportera wskazywała, że badana biocząsteczka eksprymowana przez kwas nukleinowy w komórce hamuje komórkowy szlak sygnałowy.

Ekspresja wykrywalnego reportera może prowadzić do wytworzenia sygnału, na przykład fluorescencyjnego, bioluminescencyjnego lub kolorymetrycznego, który można wykryć rutynowymi technikami. Jedną z technik jest FACS (cytometria przepływowa).

W dokumencie US9429566 ujawniono natomiast system kompatybilny z wysokoprzepustowym przesiewaniem do określenia czy badany związek może być zastosowany do leczenia nowotworu. Układ obejmuje: komórkę eksprymującą białko fuzyjne zawierające polipeptydy Cip/Kip i białko reporterowe połączone C-końcem z polipeptydem Cip/Kip, inhibitor syntezy białka i system do pomiaru odczytu sygnału białka reporterowego. Inhibitorem syntezy białka jest cykloheksymid (CHX). Białkiem reporterowym jest lucyferaza a wspomnianym sygnałem do odczytu jest bioluminescencja w obecności substratu dla lucyferazy (np. koelenterazyny). Test wysokoprzepustowego przesiewania jest zdolny do identyfikowania inhibitorów (takich jak inhibitory drobnocząsteczkowe) degradacji inhibitora Cdk rodziny Cip/Kip. Test wysokoprzepustowy stanowi sposób, który pozwala na szybkie równoczesne przeszukanie dużej liczby związków (setek, tysięcy) na aktywność wiązania lub aktywność biologiczną wobec docelowej cząsteczki. Takie testy przeprowadza się zazwyczaj w płytkach do mikromiareczkowania.

Znany jest również system do przesiewania oparty o analizę komórek. Dokument US6727071 opisuje systemy, sposoby i testy przesiewowe do optycznej analizy komórek w celu szybkiego określenia dystrybucji, otoczenia lub aktywności oznaczonych fluorescencyjnie cząsteczek reporterowych w komórkach. System ten służy identyfikacji dużej ilości związków, które specyficznie wpływają na konkretne funkcje biologiczne. Wynalazek zapewnia komórki zawierające fluorescencyjne cząsteczki reporterowe osadzone na matrycy (typu płytka do mikromiareczkowania), skanowanie wielu komórek w każdej lokalizacji za pomocą układu optycznego do badania fluorescencji o wysokim powiększeniu oraz konwersję informacji optycznej na dane cyfrowe w celu określenia rozmieszczenia, otoczenia lub aktywności cząsteczki reporterowej w komórce. Analiza wielu tysięcy związków następuje za pomocą standardowego wysokoprzepustowego testu (HTS) z wykorzystaniem mieszaniny związków i odczynników biologicznych ze związkami indykatorowymi załadowanymi na studzienki matrycy w standardowych płytkach do mikromiareczkowania. Sposób opiera się na wysokim powinowactwie cząsteczek fluorescencyjnych lub luminescencyjnych (np. GFP) do określonych komponentów komórki.

Ponadto w dokumencie US2014302523A ujawniono związki hydrofobowe, które są używane w celu zaburzania działania białek transbłonowych lub wewnątrzkomórkowych co indukuje degradację proteasomalną tych białek. Wynalazek obejmuje również sposób indukowania degradacji proteasomalnej jak również sposób walidacji białka będącego przedmiotem zainteresowania jako celu terapeutycznego do leczenia stanu chorobowego. Związki według wynalazku są użyteczne do wiązania białka fuzyjnego, które zawiera białko będące przedmiotem zainteresowania (np. potencjalny lek lub inny cel fizjologiczny) oraz znacznik taki jak np. halo, snap, cliptag, ACPtag, MCPtag, który jest użyteczny do wiązania związku hydrofobowego z białkiem. W wynalazku przedstawiono podejście biologiczno-chemiczne do systematycznego degradowania dowolnego białka będącego przedmiotem zainteresowania w hodowli komórkowej lub bezpośrednio w zwierzęciu. Układ wymaga konstrukcji białka fuzyjnego, które ulega specyficznej degradacji przez dodanie nietoksycznego znacznika hydrofobowego o niskiej masie molekularnej.

Jednak mimo innowacji przedstawionych powyżej nadal problemem ograniczającym rozwój technologii indukowanej degradacji białek jest brak dostępu do wydajnych, informatywnych i wysokoprzepustowych testów umożliwiających detekcję związków wykazujących aktywność degradacyjną wobec białek patogennych.

Zasada działania związków typu degron znacząco różni się od klasycznego podejścia bazującego na inhibitorach. Po pierwsze inhibitory regulują aktywność białek posiadających aktywność katalityczną. Po drugie działanie inhibitorowe jest najczęściej procesem równowagowym co oznacza, że im większe stężenie enzymu, tym większe zapotrzebowanie na inhibitor.

Związki typu degron wiążąc się do białka indukują jego degradację przez proteasom. Kompleks białko-degron trafia do kompleksu proteasomalnego, gdzie następuje degradacja białka na peptydy, a uwolniony związek wraca do cytoplazmy, gdzie może wejść w ponowną interakcję z białkiem docelowym.

W związku z powyższym, celem wynalazku jest opracowanie dwuetapowego wysokoprzepustowego sposobu przesiewania związków niskocząsteczkowych indukujących degradację celu białkowego. Zastosowanie testu „DegScreen” obejmuje także wykorzystanie własnej zoptymalizowanej biblioteki związków chemicznych specjalnego przeznaczenia, o parametrach dobranych pod kątem potencjału indukcji degradacji białek w komórce. Test ten może także znaleźć zastosowanie względem dowolnej innej zaprojektowanej biblioteki związków. Proponowany przez twórców sposób testowania związków niskocząsteczkowych wychodzi naprzeciw opisanym powyżej potrzebom. Sposób pozwoli na poszukiwanie substancji, które specyficznie oddziałują z badanym białkiem spośród tysięcy związków pochodzących z biblioteki.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wysokoprzepustowego przesiewowego badania związków niskocząsteczkowych do indukowania i specyficznej degradacji wybranych celów terapeutycznych, charakteryzujący się tym, że obejmuje etapy:

przygotowawczy) nadekspresji białka docelowego będącego celem wymuszonej i ukierunkowanej degradacji proteasomalnej w docelowej linii nowotworowej, w postaci konstruktu w fuzji z białkiem reporterowym - lucyferazą (rPOI-Luc);

a) wysokoprzepustowych i zautomatyzowanych luminescencyjnych testów przesiewowych, wykorzystujących pomiar spadku sygnału od rPOI-Luc. Testy te odbywają się na mikroplatkach 96 lub 384-dołkowych, w których biblioteka związków chemicznych pochodząca z dowolnego źródła jest przeszukiwana pod kątem związków indukujących degradację rPOI-Luc, co jest manifestowane przez spadek sygnału luminescencyjnego generowanego dzięki lucyferazie będącej w fuzji z rPOI-Luc w stosunku do odpowiednich kontroli. Związki, dla których uzyskano odpowiedni poziom zmiany sygnału w teście luminescencyjnym, kierowane są do analizy w kolejnym etapie;

b) analizy porównawczej proteomu badanych linii nowotworowych techniką spektrometrii mas MS/MS. Wytypowane w teście luminescencyjnym związki poddawane są analizie specyficzności działania względem badanego rPOI-LUC, poprzez traktowanie badanych komórek wybranymi związkami. Następnie komórki te poddawane są lizie, w celu wypreparowania wszystkich białek, które następnie trawione są trypsyną i frakcjonowane, a fragmenty po trawieniu są analizowane w spektrometrze masowym, przy czym kontrolę stanowią komórki nietraktowane.

Korzystnie, system ekspresyjny w etapie a) oznacza system komórek U2OS lub HEK293.

Korzystnie, biblioteka związków chemicznych jest biblioteką własną lub zewnętrzną.

Korzystnie, testowane związki stanowią związki typu degron, PROTAC, czy induktory destabilizacji, które mają ukierunkowaną aktywność proteolityczną, przy czym jest ona niezależna od ubikwityny.

Korzystnie, białkiem referencyjnym jest nanolucyferaza.

Korzystnie, wyniki wstępnie uzyskane w etapie a) są weryfikowane za pomocą MS/MS, przy czym opracowana jest metoda porównania całych proteomów komórkowych przed i po zastosowaniu czynników o aktywności proteolitycznej.

Korzystnie, wyniki badania MS wskazują, czy badany związek ma ukierunkowane działanie proteolityczne czy działa niespecyficznie.

Test cechuje łatwość wykonania i elastyczność aplikacyjna.

Istnieje również możliwość przeprowadzenia testu na żywych komórkach zamiast na lizatach komórkowych w oparciu o substraty, które przenikają błonę komórkową.

Problemem technicznym rozwiązywanym przez wynalazek jest umożliwienie poszukiwania w stosunkowo łatwy i wysokoprzepustowy sposób dowolnych związków chemicznych, które aktywowałyby proces celowanej degradacji białek i pozwoliłyby na rozwój nowej generacji leków innowacyjnych (nie odtwórczych), dzięki zastosowaniu testu DegScreen.

Na obecnym etapie rozwoju technologii ukierunkowanej degradacji celów terapeutycznych brak jest wystarczająco skutecznych metod dających takie rezultaty. Test umożliwia dalszy postęp badań i zastosowań opartych o mechanizmy indukowanej degradacji białek patogennych. Nowość proponowanego rozwiązania opiera się na sposobie zestawienia i wykorzystania następujących elementów: metod biochemicznych i biofizycznych wraz z dostarczoną, dowolną biblioteką związków chemicznych, razem budujących unikalny w skali światowej sposób testowania - DegScreen. Dzięki opracowanej technologii możliwe jest wielkoskalowe przeszukiwanie dowolnej wielkości bibliotek związków chemicznych w celu identyfikacji takich substancji, które indukują degradację wewnątrzkomórkową wybranych białek.

Nowatorski charakter testu DegScreen opiera się po pierwsze na nieoczywistej kombinacji wyspecjalizowanych metod biochemicznych i biofizycznych. Ich połączenie – wraz z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej, hodowli komórkowych i zaawansowanych analiz proteomicznych pozwala na monitorowanie regulowanej degradacji białek w kontekście komórkowym.

Sposób wykorzystuje system dwuetapowy. Etap pierwszy, przeprowadzany jest w wysokiej przepustowości, dzięki czemu możliwe jest przesiewanie nawet bardzo dużych bibliotek związków, podczas gdy etap drugi korzysta z technik spektrometrii mas, dla których przeskalowanie do wysokiej przepustowości nie jest możliwe – stąd też nie istnieją komercyjne testy oferujące tego typu metodykę.

W pierwszym etapie identyfikowane są związki niskocząsteczkowe, które powodują indukcję selektywnej degradacji wybranego białka (POI – ang. *Protein-Of-Interest*) przez maszynę komórkową. Co ważne, DegScreen jest metodą uniwersalną – mechanizm, na drodze którego zidentyfikowane cząsteczki powodują degradację POI, nie jest istotny dla wyników metody. Sprawia to, że technologia DegScreen może być zastosowana do identyfikacji związków z takich kategorii funkcjonalnych jak degron, PROTAC, czy induktory destabilizacji.

Klasyczny schemat przeprowadzenia analizy DegScreen składa się z następujących etapów:

- a) Nadekspresji konkretnego białka lub białek będącego/będących przedmiotem zainteresowania, w wybranym systemie ekspresyjnym (np. system komórek U2OS lub HEK293) w postaci specjalnego konstruktów w fuzji z białkiem lucyferazą – rPOI-Luc.
- b) Wielkoskalowych luminescencyjnych testów przesiewowych, wykorzystujących zautomatyzowany sposób rPOI-Luc. Sposób odbywa się na mikroplatkach 96- oraz 384-dołkowych, w których biblioteka związków chemicznych (pochodząca z dowolnego źródła, biblioteka własna lub zewnętrzna) jest przeszukiwana w zautomatyzowanym wielkoskalowym teście w celu identyfikacji związków, które indukują degradację rPOI-Luc, co będzie manifestowane przez spadek sygnału luminescencyjnego (generowanego dzięki lucyferazie będącej w fuzji z rPOI-Luc) w stosunku do odpowiednich kontroli. Związki, dla których uzyskano odpowiedni poziom sygnału w teście luminescencyjnym, kierowane będą do analizy w kolejnym etapie.
- c) Analizy degradacji natywnego POI w komórkach techniką spektrometrii mas (MS/MS).

Analiza wygląda w ten sposób, że wytypowane w wielkoskalowym teście luminescencyjnym związki są dodawane do komórek. Komórki kontrolne (punkt odniesienia) po dodaniu związków chemicznych są poddawane lizie, preparowane są z nich całościowo białka, które następnie trawione są odpowiednimi enzymami proteolitycznymi (zwykle trypsyną) i frakcjonowane. Fragmenty po trawieniu są następnie analizowane w spektrometrze masowym i analizowane z wykorzystaniem zaawansowanych algorytmów oprogramowania do analizy danych masowych. Analiza MS/MS nakierowana jest w podstawowej wersji na obecność/degradację białka będącego przedmiotem zainteresowania. Możliwe będzie również analizowanie różnic w proteomach dla szerszego spektrum białek, by wykryć, czy analizowane związki mogą mieć wpływ na poziom innych białek niż POI w komórkach (tzw. polifarmakologia).

Pod pojęciem „odpowiedniego poziomu sygnału” rozumie się co najmniej 50% spadek luminescencji decydujący o zakwalifikowaniu związku jako tego o działaniu degradującym białka.

Wynalazek został przedstawiony na rysunkach, na których:

Fig. 1 przedstawia przebieg dwuetapowego wysokoprzepustowego testu do identyfikowania białek będących przedmiotem zainteresowania.

Fig. 2 przedstawia zestawienie wyników wartości luminescencji wyrażone jako procent średniej luminescencji. W przypadku linii HEK 293 BRD4-NLuc stymulowanej 1 μ M związkiem 949-13 można zaobserwować wyraźny spadek luminescencji, wynoszący ponad 50% wyjściowej luminescencji, co oznacza silną degradację proteasomalną białka BRD4. Podobną sytuację można zaobserwować w przypadku kilku związków (006-3, 421-5, 175-3, 031-7, 839-8, 839-9), które w stężeniu 1 μ M znacząco wpłynęły na degradację białka NS3.

Fig. 3 przedstawia zestawienie wyników wartości luminescencji wyrażonych jako procent średniej luminescencji. W przypadku linii HEK 293 BRD4-NLuc wraz ze wzrostem stężenia związków degradujących można zaobserwować spadek wartości luminescencji w stosunku do kontroli, świadczący o proteasomalnej degradacji celu molekularnego. Optymalne stężenie związków degradujących zaobserwowano w przedziale od 1 μ M do 5 μ M przy czasie stymulacji 24h. Nie zaobserwowano degradacji w przypadku linii HEK 293 NS3-NLuc.

Fig. 4 przedstawia zestawienie wyników wartości luminescencji wyrażonych jako procent średniej luminescencji. W przypadku linii HEK 293 BRD4-NLuc stymulowanej zarówno 1 μ M jak i 4 μ M związkiem 949-13 można zaobserwować wyraźny spadek luminescencji, wynoszący ponad 50% wyjściowej luminescencji, co oznacza silną degradację proteasomalną białka BRD4. Podobną sytuację można zaobserwować w przypadku związków 178-3 oraz 177-3, które w stężeniu 1 μ M wpłynęły na degradację białka BRD4. W przypadku białka NS3 degradację obserwuje się w przypadku związków 421-5, 175-3 i 839-8.

Poniższe przykłady ilustrują wynalazek i nie mają charakteru zawężającego.

Przykład 1

Etap przygotowawczy, czyli opracowanie linii komórkowej

Przygotowanie konstruktów do ekspresji białek fuzyjnych w liniach komórek eukariotycznych.

24 godziny przed transfekcją na płytkę 6-dołkową wysiano po 1,2 mln komórek HEK 293 lub 0,6 mln komórek U2OS (DMEM, GlutaMAX⁺, 10% FBS i 100 µg/ml normocyna). W dniu transfekcji komórki osiągnęły konfluencję ok. 80-90%.

Do transfekcji wykorzystano plazmidy rozcieńczone do roboczego stężenia 100 ng/µl. Schemat mieszanki do transfekcji przedstawia Tabela 1.

Tabela 1

| Plazmid | 1 µg DNA [µl] | Opti-MEM [µl] | +1 µl P3000 Reagent do każdej probówki | Lipofectamine™ 3000 + Opti-MEM [µl] | | |
|------------------------|---------------|---------------|--|-------------------------------------|-----|--|
| pcDNA3.1-NS3-FLAG-NLuc | 10,0 | 115,0 | | → | 125 | |
| pcDNA3.1-BRD4-NLuc | 10,0 | 115,0 | | | 125 | |
| pcDNA3.1-NS1-NLuc | 10,0 | 115,0 | | | 125 | |
| pcDNA3.1-KRAS-NLuc | 10,0 | 115,0 | | | 125 | |
| pcDNA3.1-STAT3-NLuc | 10,0 | 115,0 | | | 125 | |
| C1-eGFP | 10,0 | 115,0 | | | 125 | |

Przygotowano także z nadmiarem mieszankę Lipofectamine™ 3000 z medium Opti-MEM® (z dodaną L-glutaminą⁺) w stosunku odpowiednio 7 µl + 875 µl. Następnie przeniesiono po 125 µl mieszanki lipofektaminy z Opti-MEM® do każdej probówki z mieszaniną transfekcyjną i zmieszano przez kilkukrotne pukanie w probówkę. Inkubowano przez 15 minut w temp. pokojowej po czym uzyskaną mieszaninę dodano do odpowiednich dołków przygotowanych wcześniej płytek z komórkami. Inkubowano 48 h w temp. 37°C i atmosferze 5% CO₂.

Selekcja transformantów:

Po 48 h hodowli znad komórek zebrano medium (przez zaaspirowanie). Oba plazmidy pcDNA3.1 użyte do transfekcji zawierają gen oporności na genitycynę G418 (marker selekcyjny w komórkach eukariotycznych), dlatego wymieniono medium na DMEM, GlutaMAX⁺, 10% FBS i G418 250 µg/ml i traktowano nim komórki przez kolejne 28 dni, często wymieniając medium z dużą liczbą martwych komórek i w międzyczasie przesiewając je na butelki T-25 i zamrażając.

Weryfikacja poprawności ekspresji białek:

Z rozmrożonych hodowli NS3 i BRD4 pobrano przez trypsynizację po 1 mln komórek i odpłukano 3x w 1x DPBS. Następnie przystąpiono do lizy przy zastosowaniu buforu do lizy (50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0,1% Triton X-100) poprzez 30 minutową inkubację na lodzie i

okazjonalne wytrząsanie. Na 1 mln komórek użyto 75 μ l buforu suplementowanego na świeżo koktajlem inhibitorów proteaz (10 μ l/1 ml buforu).

Tak przygotowane lizaty rozpuszczano w 4x stężonym buforze Laemmliego, suplementowanym na świeżo 2-merkaptanoetolem (inkubacja 10 min, 99°C) i наносzono na 12%, 1,5 mm żel poliakrylamidowy w ilości 15 i 30 μ l. Elektroforezę prowadzono w warunkach 20 mA w żelu zagęszczającym i 45 mA w żelu rozdzielającym do momentu wyjścia barwnika z żelu.

Następnie przeprowadzono mokry transfer na membranę nitrocelulozową w warunkach: 110 mA, 4°C, przez noc. Membranę poddano inkubacji z przeciwciałami:

- I°Ab anti-FLAG® królicze, Cell Signaling #14793, 1:1000 w TBS-T z 1% kazeiną, inkubacja RT, 2h, roller
- II°Ab Ośle anti-królicze IgG IRDye 800CW, LI-COR #926-32213, 1:10 000 w TBS-T z 1% kazeiną, inkubacja RT, 50 min, roller

Po tym czasie obrazowano membrany z wykorzystaniem czytnika podczerwieni LI-COR Odyssey CLx. Membrany stripowano (1,5% glicyna, 1% Tween 20, 0,1% SDS) i wywoływano na β -aktynę w celu kontroli poprawności wykonania oznaczenia. Użyto następujących przeciwciał:

- I°Ab anti- β -aktyna, mysie, Sigma-Aldrich #A5441, 1:1000 w TBS-T z 1% kazeiną, inkubacja RT, 2h, roller
- II°Ab kozie anti-mysie IgG IRDye 680RD, LI-COR #926-68070, 1:10 000 w TBS-T z 1% kazeiną, inkubacja RT, 50 min, roller

Przykład 2

Test ukierunkowanej degradacji białek

W celu dobrania odpowiednich warunków dla testu degradacji białek NS3 (przykład białka egzogenne – NS3 z wirusa Zika) i BRD4 (przykład białka endogenne) wybrano dwa związki posiadające udowodnione działanie degradujące w przypadku białka BRD4: ARV-711 i ARV-825.

Na dzień przed stymulacją związkami degradującymi na każdy dołek płytki 96-dołkowej wysiano po 75 tys. komórek linii HEK 293 NS3-NLuc i HEK 293 BRD4-NLuc w 200 μ l medium DMEM, GlutaMAX⁺, 10% FBS i normocyna 100 μ g/ml i inkubowano w 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Przygotowano 5 mM roztwory wyjściowe związków ARV-771 i ARV-825, a z nich przy zastosowaniu sterylnego DMSO przygotowano rozcieńczenia od 0,2 do 1000 μ M. Kolejne rozcieńczenie (100x) przeprowadzono używając medium DMEM GlutaMAX⁺. Schemat rozcieńczeń przedstawiono poniżej:

| 5 mM stock | | | | | | | | |
|---|---|--------------|--------------------------|--------------|---|------------------|-------------|---------------|
| ↓ | | | | DMEM bez FBS | | stężenie robocze | x7 | DMEM bez FBS |
| 10 μ l 5mM + 40 μ l DMSO | → | 1000 μ M | 0,5 μ l 1000 μ M | 49,5 μ l | → | 10 μ M | 3,5 μ l | 346,5 μ l |
| 10 μ l 1000 μ M + 40 μ l DMSO | → | 200 μ M | 0,5 μ l 200 μ M | 49,5 μ l | → | 2 μ M | 3,5 μ l | 346,5 μ l |
| 5 μ l 200 μ M + 45 μ l DMSO | → | 20 μ M | 0,5 μ l 20 μ M | 49,5 μ l | → | 0,2 μ M | 3,5 μ l | 346,5 μ l |
| 5 μ l 20 μ M + 45 μ l DMSO | → | 2 μ M | 0,5 μ l 2 μ M | 49,5 μ l | → | 0,02 μ M | 3,5 μ l | 346,5 μ l |
| 5 μ l 2 μ M + 45 μ l DMSO | → | 0,2 μ M | 0,5 μ l 0,2 μ M | 49,5 μ l | → | 0,002 μ M | 3,5 μ l | 346,5 μ l |

W dniu rozpoczęcia stymulacji medium z nad komórek zbierano i dodawano 50 μ l medium DMEM, GlutaMAX⁺, 2% FBS, normocyna 100 μ g/ml, za wyjątkiem komórek nietraktowanych, kontrolnych (ctrl), do których od razu dodano po 100 μ l wspomnianego medium. Następnie do każdego z pozostałych dołków dodano po 50 μ l roztworów związków degradujących (zgodnie z tabelą powyżej), tak, że ich stężenie końcowe w poszczególnych dołkach osiągnęło wartości od 0,001 μ M do 5 μ M i stymulowano nimi komórki przez 24h w warunkach 37°C, 5% CO₂.

Po inkubacji przystąpiono do lizy komórek i pomiaru luminescencji. Do tego celu wykorzystano zestaw Nano-Glo[®] Luciferase Assay System firmy Promega (N1120) postępując według zmodyfikowanej instrukcji producenta i wykorzystując stację pipetującą Tecan Freedom Evo 150. Przygotowano także odpowiednią ilość mieszaniny reakcyjnej do wywołania reakcji luminescencyjnej, zachowując proporcję 1 objętości Nano-Glo[®] Luciferase Assay Substrate i 50 objętości Nano-Glo[®] Luciferase Assay Buffer.

Medium z nad komórek zbierano i zastąpiono je 75 μ l Opti-MEM[®]. Następnie dodano do każdego dołka po 75 μ l mieszaniny reakcyjnej i inkubowano przez 1 minutę. Odczytu dokonano z wykorzystaniem zintegrowanego ze stacją wieloparametrowego czytnika płytek Infinite M1000.

Wyniki zostały znormalizowane do średniej luminescencji kontroli w programie GraphPad Prism 7 i przedstawione na Fig. 3.

Przykład 3.

Zwalidowany program dla płytek formatu 96 z wykorzystaniem robota pipetującego TECAN FreedomEVO.

Program pipetujący składa się z pięciu głównych grup zadań nazwanych w kolejności wykonywania: OPTI, Substrat, Inkubacja, Transfer i Pomiar.

1. Etap pierwszy „OPTI” na płytkę hodowlaną nanoszone jest 55 μ l OPTI (Fig.3.)
2. Etap drugi „Substrat” na płytkę hodowlaną nanoszone jest 55 μ l mieszaniny buforu lizującego z substratem dla lucyferazy.
3. Etap trzeci stanowi „Inkubacja” obejmująca wytrząsanie płytki przez 3 minuty (180 sekund). Celem etapu jest pełna liza hodowli komórkowej, tym samym uwolnienie wewnątrzkomórkowej lucyferazy dla substratu podanego w etapie 2.
4. Etap czwarty „Transfer” obejmuje przeniesienie 100 μ l lizatu komórkowego wraz z substratem z przezroczystej 96-dołkowej płytki hodowlanej na białą płytkę 96-dołkową służącą do wykonywania pomiarów luminescencyjnych.
5. Etap piąty „Pomiar” polega na przeniesieniu przez robota płytki, której zawartość ma zostać poddana pomiarom, na tackę czytnika luminescencji.
6. Pomiar
7. Zakończenie procedury i przekazanie plików do analizy.

Przykład 4

Wykazanie funkcjonalności testu przesiewowego DegScreen

Test przeprowadzono z wykorzystaniem płytek 96-dołkowych w następujący sposób: Na dzień przed stymulacją związkami degradującymi na każdy dołek dwóch płytek wysiano po 75 tys. komórek linii

HEK 293 NS3-NLuc i HEK 293 BRD4-NLuc na dołek w 200 μ l medium DMEM, GlutaMAX⁺ zawierającym 10% FBS i normocynę 100 μ g/ml i inkubowano w 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Zakodowane związki o potencjale degradującym, zostały udostępnione do testu przez Captor Therapeutics. Na podstawie wcześniejszych eksperymentów ustalono, że optymalne stężenie związków degradujących do stymulacji komórek wynosi 1 μ M, a czas stymulacji wynosi 24h.

Wszystkie związki doprowadzono do stężenia wyjściowego 5 mM poprzez odpowiednie ich rozcieńczenie w sterylnym DMSO, a następnie kolejne rozcieńczenie do stężenia 200 μ M. Aby uzyskać zakładane stężenie robocze związków w medium komórkowym związki wyjściowe rozcieńczano 100x przy zastosowaniu DMEM GlutaMAX⁺ do stężenia 2 μ M, co przedstawia poniższa Tabela 2.

Tabela 2

| Lp. | ID | Stężenie [mM] | Objętość próbki [μL] | Ilość próbek | rozc. | Rozcieńczenie do 5 mM | | | rozc. | Rozcieńczenie do 200 μM | | | rozc. | Rozcieńczenie do 2 μM (x 7 próbek) | | |
|-----|--------|---------------|----------------------|--------------|-------|-----------------------|-----------|------------------------|-------|---------------------------|-----------|------------------------|-------|------------------------------------|-------------------|------------------------|
| | | | | | | objętość próbki [μL] | DMSO [μL] | Stężenie stocku 1 [mM] | | objętość stocku 5 mM [μL] | DMSO [μL] | Stężenie stocku 2 [μM] | | objętość stocku 200 μM [μL] | DMEM bez FBS [μL] | Stężenie stocku 3 [μM] |
| 1 | 006-3 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | 25x | 2 | 48 | 200 | 100x | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 2 | 489-3 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 3 | 436-3 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 4 | 421-5 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 5 | 389-4 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 6 | 388-4 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 7 | 328-5 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 8 | 282-4 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 9 | 254-6 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 10 | 253-6 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 11 | 252-4 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 12 | 178-3 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 13 | 177-3 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 14 | 176-6 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 15 | 175-3 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 16 | 033-6 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 17 | 032-7 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 18 | 031-7 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 19 | 030-6 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 20 | 990-3 | 50 | 8 | 1 | 10x | 1 | 9 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 21 | 949-13 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 22 | 886-8 | 10 | 6 | 3 | 2x | 5 | 5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 23 | 885-18 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 24 | 840-7 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 25 | 839-8 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 26 | 838-9 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 27 | 836-9 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 28 | 835-7 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 29 | 834-5 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |
| 30 | 833-5 | 20 | 6 | 3 | 4x | 2,5 | 7,5 | 5 | | 2 | 48 | 200 | | 2,8 | 277,2 | 2 |

W dniu rozpoczęcia testu medium znad komórek aspirowano i zastąpiono je 50 μ l medium DMEM, GlutaMAX⁺, zawierającym 2% FBS, normocynę 100 μ g/ml, za wyjątkiem komórek nietraktowanych, kontrolnych (ctrl), do których od razu dodano po 100 μ l wspomnianego medium. Następnie do każdego z pozostałych dołków dodano po 50 μ l związków degradujących tak, że ich stężenie końcowe w każdym dołku osiągnęło 1 μ M i stymulowano nimi komórki przez 24h w warunkach 37°C, 5% CO₂.

Po inkubacji przystąpiono do lizy komórek i pomiaru luminescencji. Do tego celu wykorzystano zestaw Nano-Glo[®] Luciferase Assay System firmy Promega (N1120) postępując według zmodyfikowanej instrukcji producenta i wykorzystując stację pipetującą Tecan Freedom Evo 150. Przygotowano także odpowiednią ilość mieszaniny reakcyjnej do wywołania reakcji luminescencyjnej, zachowując proporcję 1 objętości Nano-Glo[®] Luciferase Assay Substrate i 50 objętości Nano-Glo[®] Luciferase Assay Buffer

Medium znad komórek zaaspirowano i zastąpiono je 75 μ l Opti-MEM[®]. Następnie dodano do każdego dołka po 75 μ l mieszaniny reakcyjnej i inkubowano z wytrząsaniem 250 rpm przez 1 minutę. Odczytu dokonano poprzez zintegrowany ze stacją pipetującą wieloparametrowy czytnik płytek Infinite M1000

Pro przy parametrach wzmocnienia nastawianych automatycznie, sygnał normalizowano względem komórek kontrolnych.

Wyniki zostały znormalizowane do średniej luminescencji kontroli w programie GraphPad Prism 7 i przedstawione na Fig. 2.

Test na płytkach 384-dołkowych

Podobnie jak postępowano z płytkami 96-dołkowymi, przeskalowano test na płytce 384-dołkowe.

Na podstawie wcześniejszych eksperymentów ustalono, że optymalne stężenie związków degradujących do stymulacji komórek wynosi 1 μM , dodatkowo komórki taktowano wyższym - 4 μM stężeniem, a czas stymulacji wynosił 24h.

Wszystkie związki doprowadzono do stężenia 5 mM poprzez odpowiednie ich rozcieńczenie w sterylnym DMSO, a następnie kolejne rozcieńczenie do stężenia 200 μM . Aby uzyskać zakładane stężenia wyjściowe związków w medium komórkowym związki rozcieńczano 25x (dla stężenia 8 μM) lub 100x (dla stężenia 2 μM) przy zastosowaniu DMEM GlutaMAX⁺

Na dzień przed testowaniem związków degradujących na dołki czterech płytek 384 wysiano po 18 tys. komórek linii HEK 293 NS3-NLuc i HEK 293 BRD4-NLuc (w objętości 50 μl DMEM, GlutaMAX⁺, zawierającym 10% FBS i normocynę 100 $\mu\text{g/ml}$) i inkubowano w 37°C w atmosferze 5% CO₂.

W dniu rozpoczęcia testu medium znad komórek aspirowano i zastąpiono je 25 μl medium DMEM, GlutaMAX⁺ zawierającym 2% FBS, normocynę 100 $\mu\text{g/ml}$, za wyjątkiem komórek nietraktowanych, kontrolnych (ctrl), do których od razu dodano po 50 μl wspomnianego medium. Następnie do każdego z pozostałych dołków dodano po 25 μl związków degradujących (zgodnie z Fig. 3) tak, że ich stężenie końcowe w każdym dołku osiągnęło 1 μM lub 4 μM i stymulowano nimi komórki przez 24h w warunkach 37°C, 5% CO₂.

Po inkubacji przystąpiono do pomiaru luminescencji. Do tego celu wykorzystano zestaw Nano-Glo[®] Luciferase Assay System firmy Promega postępując według zmodyfikowanej instrukcji producenta i wykorzystując stację pipetującą Tecan Freedom Evo 150. Przygotowano także odpowiednią ilość mieszaniny reakcyjnej do wywołania reakcji luminescencyjnej, zachowując proporcję 1 objętości Nano-Glo[®] Luciferase Assay Substrate i 50 objętości Nano-Glo[®] Luciferase Assay Buffer.

Medium znad komórek zaaspirowano i zastąpiono je 30 μl Opti-MEM[®]. Następnie dodano do każdego dołka po 30 μl mieszaniny reakcyjnej i inkubowano z wytrząsaniem 250 rpm przez 1 minutę. Odczytu dokonano poprzez zintegrowany ze stacją pipetującą wieloparametrowy czytnik płytek Infinite M1000 Pro przy parametrach wzmocnienia nastawianych automatycznie, znormalizowanym do luminescencji komórek kontrolnych.

Wyniki zostały znormalizowane do średniej luminescencji kontroli w programie GraphPad Prism 7 i przedstawione na Fig. 4.

Przykład 5

Zoptymalizowana metoda pomiarowa MS

Do wykonania analizy składu i relatywnej zawartości poszczególnych białek w próbkach izolatów pochodzących z linii komórkowych wybrano metodę opartą na pomiarach spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową. Pomiary przeprowadzono zgodnie ze strategią bottom-up, polegającą na analizie peptydów powstałych po enzymatycznym trawieniu białek. Próbki, stanowiące mieszaniny stabilnie znakowanych izotopowo (znacznikami TMT) pochodnych peptydów mierzono z wykorzystaniem techniki nano-LC-MS/MS zoptymalizowanej do tego celu. Wykorzystaną aparaturę oraz warunki przeprowadzenia pomiarów przedstawiono poniżej.

1. Aparatura badawcza

- LTQ Orbitrap Elite ETD wyposażony w nanosprejowe źródło jonów (NSI) (Thermo Scientific)
- nanoprzepływowy chromatograf cieczowy Easy nLC-1000 wyposażony w chłodzony autosampler (Thermo Scientific)

2. Warunki rozdziału chromatograficznego

| | |
|----------------------------|--|
| Kolumna chromatograficzna: | Acclaim PepMap C18, 100A, 500 mm × 0.075 mm x 3 μm (Thermo Scientific) |
| Prekolumna (pułapkująca): | Acclaim PepMap C18, 100A, 20 mm × 0.075 mm x 3 μm (Thermo Scientific) |
| Faza ruchoma A: | woda + 0,1% kwas mrówkowy |
| Faza ruchoma B: | woda:acetonitryl (10:90, v/v) + 0,1% kwas mrówkowy |
| Przepływ: | 300 nl/min |
| Temperatura kolumny: | otoczenia |
| Temperatura autosamplera: | 10°C |
| Nastrzyk: | 5 μl |

Nastrzyk wykonywany z wykorzystaniem autosamplera, w który wyposażony jest chromatograf cieczowy. Podana objętość odpowiada ustawieniom metody zadany w oprogramowaniu sterującym.

Gradient: 2–55% B w 200 min

3. Warunki NSI-MS/MS

Kluczowe parametry metody MS:

| | |
|-------------------------------|-------------------------|
| Tryb jonów: | dodatni |
| Metoda pomiaru: | full-scan, DDA (top10) |
| Napięcie kapilary: | 3000 V |
| Gaz pomocniczy: | 5 j.a. |
| Zakres pomiaru: | 110 – 2000 m/z |
| Rozdzielczość w trybie MS: | 120 000 |
| Rozdzielczość w trybie MS/MS: | 15 000 |
| Fragmentacja: | HCD |
| Energia kolizji: | znormalizowana, 35.0 eV |
| Okno izolacji: | 1 m/z |
| Ładunek jonu macierzystego: | 2+ i więcej |

Kalibracja: zewnętrzną na standard LTQ Velos Positive (Pierce), SD ≤ 1 ppm
Opis przygotowania próbki

Do analizy nLC-MS/MS przygotowano peptydy z białek wyizolowanych z linii komórkowych, a następnie wyznakowano je znacznikami izobarycznymi TMT.

Procedura:

1. Kondycjonowanie kolumniek MWCO (3kDa)
 - na kolumnię naniesiono 500 µl wody, zwirowano, 10 000 rcf, 4°C
 - na kolumnię naniesiono 100 µl 100 mM wodorowęglanu trietyloamoniowego (TEAB), zwirowano, 10 000 rcf, 4°C, 100 mM
2. Próbkę
 - na kolumnię naniesiono po 80 µg białka, zwirowano, 10 000 rcf, 4°C
 - na kolumnię naniesiono 100 µl 100 mM TEAB, zwirowano, 10 000 rcf, 4°C, powtórzono
3. Redukcja
Przygotowanie 200 mM tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP): rozpuszczono 10 mg TCEP w 140 µl wody, wymieszano a następnie dodano 35 µl 1 M TEAB i wymieszano
 - na kolumnię naniesiono 100 µl 100 mM TEAB
 - dodano 5 µl 200 mM TCEP, wymieszano i inkubowano 1 godzinę w 55°C
4. Alkilacja
Przygotowanie 375 mM jodoacetamidu (IAA): rozpuszczono 9 mg IAA w 132 µl 100 mM TEAB krótko przed użyciem chroniąc przed światłem
 - na kolumnię dodano 5 µl 375 mM IAA, wymieszano i inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności
 - próbki zwirowano, 10 000 rcf, 4°C
5. Trawienie
 - kolumnię przeniesiono do nowych próbek typu Eppendorf 2 ml
 - na kolumnię dodano po 100 µl buforu 50 mM TEAB zawierającego trypsynę (2 µg trypsyny/próbkę), zabezpieczono parafilmem i inkubowano przez noc w 37°C.
 - następnego dnia próbki zwirowano otrzymując przesącz zawierający hydrolizat trypsynowy,
 - filtr usunięto
6. Znakowanie peptydów znacznikami izobarycznymi TMT
 - dodano 41 µl acetonitrylu do próbki zawierającej 0,8 mg znacznika (dostarczonej przez producenta zestawu TMT), rozpuszczano znacznik przez 5 minut mieszając co jakiś czas
 - dodano cały hydrolizat trypsynowy z punktu 5 do próbki z rozpuszczonym znacznikiem i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej
 - do próbki dodano 8 µl 5 % hydroksyloaminy, inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej w celu zatrzymania reakcji.