

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244382 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438583**

(22) Data zgłoszenia: **2021.08.26**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.02.27 BUP 09/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.01.22 WUP 04/2024**

(51) MKP:

C07K 14/50 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Wrocławski, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

ANNA SZLACHCIC, Wrocław, PL

KAROLINA JENDRYCZKO, Wrocław, PL

JAKUB RZESZÓTKO, Bielawa, PL

JACEK OTLEWSKI, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Rożkowicz, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Białko fuzyjne z domeną Fc z IgG1 zawierające fragment sekwencji ludzkiego fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF4 oraz jego zastosowanie

PL 244382 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem zgłoszenia jest białko fuzyjne zawierające C-końcowy fragment Fc pochodzący z immunoglobuliny G1 oraz fragment sekwencji ludzkiego fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF4 i jego zastosowanie lecznicze jako cząsteczki wiążącej receptory FGF na powierzchni komórek nowotworowych i przenoszące do ich wnętrza substancję cytotoksyczną.

Białka będące fuzją peptydu kierującego i fragmentu Fc, zwane peptibody, wykazują polepszoną stabilność i farmakokinetykę i mogą być stosowane w celach diagnostycznych i terapeutycznych.

Komórki nowotworowe często posiadają na swojej powierzchni zwiększoną liczbę receptorów reagujących na różnego rodzaju czynniki wzrostowe. Doniesienia naukowe z ostatnich lat wyraźnie wskazują, że jednym z receptorów czynników wzrostowych będących markerami procesów nowotworzenia są receptory z grupy FGFR (ang. fibroblast growth factor receptors). Receptory te w zwiększonej ilości wykryto na komórkach m.in. z nowotworów płuc, żołądka, sutka. Cząsteczki wiążące się do FGFR mają znaczenie zarówno diagnostyczne, jak i terapeutyczne – po połączeniu z ładunkiem o działaniu terapeutycznym.

Obecnie zaakceptowane do klinicznego użycia są dwa leki o formacie peptibodies, a kilkanaście kolejnych badanych jest w testach klinicznych, jednak żadne z nich nie są skierowane wobec FGFR. W chwili obecnej na rynku dostępny jest jeden lek, którego działanie ukierunkowane jest na blokowanie oddziaływania FGF z jego receptorem – Erdafitynib. Jest to jednak lek niskocząsteczkowy, o całkiem innym mechanizmie wiązania do FGFR.

W przedstawionym wcześniej zgłoszeniu patentowym nr P.433329 opisana została cząsteczka oparta o peptyd kierujący i domenę Fc, jednak zawierająca inną sekwencję kierującą, i zidentyfikowana w inny sposób („Koniugat białka fuzyjnego zawierającego fragment Fc z IgG1 z fragmentem sekwencji ludzkiego fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF2 oraz jego zastosowanie”).

Przedmiotem wynalazku jest białko fuzyjne zawierające domenę Fc pochodzącą z immunoglobuliny G1 oraz sekwencję IALSKNGKTKKGNRVSPMKVTHFLPRL stanowiącą fragment sekwencji (179–206) ludzkiego fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF4.

Korzystnie, białko fuzyjne posiada przyłączony za pomocą hydrolizowalnego linkera niskocząsteczkowy, organiczny związek cytotoksyczny.

Korzystnie, związkiem cytotoksycznym jest monometyloaurystatyna E.

Przedmiotem wynalazku jest również białko fuzyjne określone powyżej do zastosowania jako lek.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest białko fuzyjne określone powyżej do zastosowania w hamowaniu proliferacji oraz zmniejszania żywności komórek nowotworowych charakteryzujących się wysoką ekspresją receptora fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR1).

Aby uniknąć niejednoznaczności białko fuzyjne zawierające fragment Fc z immunoglobuliny IgG1 z peptydem IALSKNGKTKKGNRVSPMKVTHFLPRL oznaczono w tekście jako peptibodyF4_1, zaś na rysunkach symbolem pepF4_1.

Peptyd kierujący zawarty w peptibodyF4_1 został zidentyfikowany na podstawie analizy sekwencji białek FGF, naturalnych ligandów receptorów FGF. PeptibodyF4_1 wiąże się specyficznie do receptorów FGF na komórkach, również nowotworowych, i może zostać wykorzystane w celach diagnostycznych. Po koniugacji z lekiem cytotoksycznym może być również zastosowane terapeutycznie względem nowotworów wykazujących zwiększoną ekspresję receptorów FGF.

Aby zidentyfikować sekwencje peptydowe wykazujące wiązanie do FGFR1 dokonano przeglądu dostępnych w formie rekombinowanej ligandów tego receptora – białek FGF. Różne białka z rodziny FGF zostały rozwinięte i zimmobilizowane na membranie, a następnie sprawdzone pod kątem wiązania zewnątrzkomórkowej części receptora FGFR1 wyznakowanej fluorescencyjnie. Sygnał wskazujący na wiązanie zaobserwowano dla kilku białek FGF, między innymi dla FGF4. Dokonano równoległej analizy jego sekwencji za pomocą fragmentacji, wiązania do FGFR1 i identyfikacji peptydów za pomocą spektrometrii mas.

Peptyd 179–206 (o sekwencji IALSKNGKTKKGNRVSPMKVTHFLPRL) został zidentyfikowany jako wiążący FGFR1 niezależnie za pomocą obu metod.

Wynalazek ujawnia także selektywną cytotoksyczność powyższego koniugatu wobec komórek o wysokiej ekspresji receptorów fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR) *in vitro*, przy ograniczonym efekcie cytotoksycznym wobec komórek charakteryzujących się niskim poziomem receptorów FGFR.

Zalety wynalazku, cenne z uwagi na potencjalne zastosowanie medyczne, potwierdza analiza internalizacji peptibodyF4_1 do komórek U2OS FGFR1 (komórek U2OS stabilnie transfekowanych genem FGFR1) za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Jako kontrola negatywna zastosowana została linia komórkowa U2OS, wykazująca się bardzo niskim poziomem FGFR na swojej powierzchni. Dodawane białka wybarwione zostały po internalizacji odczynnikami wykrywającym domenę Fc (Zenon AF488). Białko endosomalne Rab5a zostało zwizualizowane za pomocą zestawu CellLight-Early endosomes (Thermo Fisher Scientific), zaś jądra wybarwione zostały odczynnikami DAPI.

Ważna jest również analiza odpowiedzi proliferacyjnej wywoływanej przez peptibodyF4_1 w mysich komórkach fibroblastycznych (NIH 3T3). Komórki traktowane były przez 48 godzin peptibodyF4_1, domeną Fc (kontrola negatywna) oraz białkiem FGF1 (kontrola pozytywna). Po tym czasie ich żywotność oznaczana była za pomocą odczynnika AlamarBlue (Invitrogen), pozwalając stwierdzić, że peptibodyF4_1 nawet w wysokich stężeniach nie powoduje wzrostu żywotności komórek i ich proliferacji, które zaobserwować możemy w przypadku czynników wzrostu fibroblastów (FGF).

PeptibodyF4_1-MMAE wykazuje cytotoksyczność specyficzną względem komórek nowotworów płuc ekspresjonujących FGFR1. Wynik badania żywotności komórek linii nowotworów płucnych różniących się poziomem ekspresji FGFR1 (NCI-H520 – z ekspresją FGFR1, oraz HCC-95, bez wykrywalnej ekspresji FGFR1), poddanych działaniu koniugatów peptibodyF4_1-MMAE. Żywotność sprawdzana była po 96 h od dodania koniugatów i oznaczana testem Alamar Blue.

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

Opis figur:

Fig. 1. Schemat metody wykrycia peptydu wiążącego FGFR1 z sekwencji białka FGF4.

Schemat metody wykrycia peptydu wiążącego FGFR1 z sekwencji białka FGF4. (a) wstępne potwierdzenie, iż w obrębie sekwencji FGF4 znajduje się liniowy fragment, do którego wiąże się FGFR1. (b) identyfikacja konkretnej sekwencji aminokwasowej z FGF4.

Fig. 2. Ekspresja peptibodyF4 w komórkach ssaczych (CHO) oraz oczyszczanie za pomocą chromatografii powinowactwa na złożu z immobilizowanym białkiem A.

Ekspresja peptibodyF4 w komórkach ssaczych (CHO) oraz oczyszczanie za pomocą chromatografii powinowactwa na złożu z immobilizowanym białkiem A. Detekcja Western blot przeprowadzana była przeciwciałem anti-Fc. B. Analiza SEC z wykorzystaniem kolumny Superdex200 10/300.

Fig. 3. Potwierdzenie wiązania pepF4_1 do immobilizowanej zewnątrzkomórkowej domeny FGFR1.

Potwierdzenie wiązania pepF4_1 do immobilizowanej zewnątrzkomórkowej domeny FGFR1. Pomiar oddziaływania wykonano techniką powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *surface plasmon resonance*) przy użyciu aparatury Biacore 3000 (GE Healthcare), kolejno dla różnych stężeń pepF4_1.

Fig. 4. Analiza internalizacji peptibodyF4_1 do komórek U2OS FGFR1 (komórek U2OS stabilnie transfekowanych genem FGFR1) za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.

Analiza internalizacji peptibodyF4_1 do komórek U2OS FGFR1 (komórek U2OS stabilnie transfekowanych genem FGFR1) za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Jako kontrola negatywna zastosowana została linia komórkowa U2OS, wykazująca się bardzo niskim poziomem FGFR na swojej powierzchni. Dodawane białka wybarwione zostały po internalizacji odczynnikami wykrywającym domenę Fc (Zenon AF488). Białko endosomalne Rab5a zostało zwizualizowane za pomocą zestawu CellLight-Early endosomes (Thermo Fisher Scientific), zaś jądra wybarwione zostały odczynnikami DAPI.

Fig. 5. Analiza odpowiedzi proliferacyjnej wywoływanej przez peptibodyF4_1 w mysich komórkach fibroblastycznych (NIH 3T3).

Analiza odpowiedzi proliferacyjnej wywoływanej przez peptibodyF4_1 w mysich komórkach fibroblastycznych (NIH 3T3). Komórki traktowane były przez 48 godzin peptibodyF4_1, domeną Fc (kontrola negatywna) oraz białkiem FGF1 (kontrola pozytywna). Po tym czasie ich żywotność oznaczana była za pomocą odczynnika AlamarBlue (Invitrogen), pozwalając stwierdzić, że peptibodyF4_1 nawet w wysokich stężeniach nie powoduje wzrostu żywotności komórek i ich proliferacji, które zaobserwować możemy w przypadku czynników wzrostu fibroblastów (FGF).

Fig. 6. Rozdział elektroforetyczny potwierdzający koniugację białka peptibodyF4_1 z MMAE – silnym cytotoksykiem.

Rozdział elektroforetyczny potwierdzający koniugację białka peptibodyF4_1 z MMAE – silnym cytotoksykiem.

Fig. 7. PeptibodyF4_1-MMAE wykazuje cytotoksyczność specyficzną względem komórek nowotworów płuc ekspresjonujących FGFR1.

PeptibodyF4_1-MMAE wykazuje cytotoksyczność specyficzną względem komórek nowotworów płuc ekspresjonujących FGFR1. Wynik badania żywotności komórek linii nowotworów płucnych różniących się poziomem ekspresji FGFR1 (NCI-H520 – z ekspresją FGFR1, oraz HCC-95, bez wykrywalnej ekspresji FGFR1), poddanych działaniu koniugatów peptibody4_1-MMAE. Żywotność sprawdzana była po 96 h od dodania koniugatów i oznaczana testem Alamar Blue.

Przykład 1

Identyfikacja sekwencji peptydowych wiążących FGFR1 pochodzących z sekwencji białka FGF4 i otrzymanie ich w formacie typu „peptibody”.

Zastosowana strategia identyfikacji nowych peptydów wiążących FGFR1 opierała się na sprawdzeniu, czy w obrębie naturalnych ligandów FGFR – białek z rodziny FGF, nie znajdują się liniowe fragmenty sekwencji, które nawet po rozwinięciu białka wykazują wiązanie do FGFR1 (Fig. 1a). Rozwiniecie białka było konieczne, aby wykluczyć te epitopy wiążące FGFR1, które składają się z reszt aminokwasowych rozproszonych w sekwencji białka, i znajdujących się w swoim sąsiedztwie jedynie po zwinieniu białka. Dla białka FGF4 pokazano, że nawet po rozwinięciu i immobilizacji w stanie zdenaturowanym na membranie PVDF obserwujemy wiązanie fluorescencyjnie wyznakowanego rekombinowanego FGFR1.

Aby stwierdzić jaki rejon sekwencji FGF4 jest odpowiedzialny za wiązanie FGFR1, FGF4 poddano trawieniu chymotrypsyną, a uzyskane peptydy inkubowano z fuzją zewnątrzkomórkowej domeny FGFR1 z fragmentem Fc z IgG1 (FGFR1-Fc), lub kontrolnie z samym fragmentem Fc. Białka te wraz ze związanymi peptydami inkubowano ze złożem z białkiem A (wiązącym fragment Fc), a po odpłukaniu peptydów związanych niespecyficznie eluowano pozostałe peptydy. Analiza za pomocą spektrometrii mas pozwoliła na zidentyfikowanie dwóch peptydów pochodzących z FGF4 obecnych w próbkach inkubowanych z FGFR1-Fc, zaś nieobecnych w próbkach kontrolnych (samo Fc) (Fig. 1b).

Równolegle przeprowadzono analizę wiązania FGFR1 do membrany PepSpot, na której immobilizowane były peptydy kolejno pokrywające całą sekwencję FGF4. Zauważono specyficzne wiązanie do FGFR1 rejonów sekwencji FGF4 analogicznych do tych wytypowanych przez MS – jednym z nich był rejon 179–206 odpowiadający sekwencji peptydowej IALSKNGKTKKGNRVSPMTMKVTHFLPRL.

Sekwencja DNA kodująca sekwencję aminokwasową

F4_1 (IALSKNGKTKKGNRVSPMTMKVTHFLPRL) została wklonowana do wektora pLEV113 metodą *inverse PCR*. Wektor pLEV113 zawiera sekwencję kodującą fragment Fc z immunoglobuliny IgG1, tak więc otrzymany konstrukt koduje białko fuzyjne zawierające fragment Fc i sekwencję F4_1 na jego końcu C (peptibodyF4_1).

Otrzymany konstrukt został zsekwencjonowany oraz poddany analizie restrykcyjnej i elektroforetycznej. Szczep bakteryjny *Escherichia coli* DH10 został transformowany konstruktem zawierającym sekwencję z białkiem fuzyjnym. Powstałe kolonie namnożono oraz zsekwencjonowano oczyszczone plazmidy. Konstrukty o prawidłowej sekwencji wykorzystano w transfekcji linii komórkowej z jajnika chomika chińskiego (CHO, ang. *Chinese Hamster Ovary*), która jest wykorzystywana w nadprodukcji białek fuzyjnych. Transfekcja była prowadzona w medium do transfekcji komórek CHO (ProCHO, Lonza) z dodatkiem polietyloiminy (PEI), roztworu 150 mM NaCl oraz plazmidów z zakodowaną sekwencją białka fuzyjnego przez 4 h, w warunkach: 37°C, 8% CO₂, 110 rpm. Następnie dodano medium do hodowli komórek (PowerCHO, Lonza) w stosunku 1:1 i prowadzono hodowlę w temperaturze 32°C, 8% CO₂, 110 rpm. Po 24 h dodano 8 mM L-glutaminy.

Po 9 dniach ekspresji zwirowano hodowlę komórkową (15 000 g, 4°C, 45 minut) i dodano EDTA do stężenia końcowego 2 mM. Supernatant, w którym znajdowało się białko rekombinowane wydzielane przez komórki do pożywki przefiltrowano i naniesiono go na złożę Protein A – Sepharose, zrównoważone wcześniej roztworem PBS (100 mM NaCl, 33 mM Na₂HPO₄, 18 mM NaH₂PO₄). Następnie złożę było przemywane schłodzonym buforem A zawierającym: 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% Tween 20, a następnie buforem B o składzie: 550 mM NaCl, 2 mM EDTA. Elucję białka przeprowadzono 0,1M roztworem cytrynianu sodu o pH 3,5. W celu zrównoważenia niskiego pH do probówek zbiorczych dodano roztworu 1M Tris o pH 9,0. Proces oczyszczania białka był przeprowadzony z wykorzystaniem systemu AKTA Start w temperaturze 4°C. Zebrane frakcje były dializowane w roztworze PBS przez noc

w 4°C. Stężenie białka było oznaczane spektrofotometrycznie przy absorbancji A280 nm. Czystość otrzymanego preparatu została potwierdzona przez SDS-PAGE, zaś brak agregacji potwierdzony za pomocą analitycznej filtracji żelowej na kolumnie Superdex200 (GE Healthcare) (Fig. 2).

Przykład 2

PeptibodyF4_1 wiąże zewnątrzkomórkową domenę FGFR1 *in vitro*

Wiązanie pepF4_1 do immobilizowanej zewnątrzkomórkowej domeny FGFR1 zostało potwierdzone przy pomocy pomiarów powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *urface plasmon resonance*) przy użyciu aparatury Biacore 3000 (GE Healthcare) (Fig. 3). Roztwór pepF4_1 (w buforze fosforanowym PBS pH 7,4, 0,05% Tween, 0,02% NaN₃) w zakresie stężeń od 75 nM do 2,4 μM nastrzykiwano na sensor CM5 z zimmobilizowanym na jego powierzchni białkiem FGFR1-Fc (zewnątrzkomórkową domeną FGFR1 jako fuzją z białkiem Fc, białko rekombinowane) (8800 RU) z przepływem 30 μl/min, w temperaturze 25°C. Mierzono asocjację przez 120 sekund, a następnie dysocjację przez kolejne 120 sekund. Powierzchnię sensora regenerowano przy użyciu 2,5 M roztworu NaCl. Otrzymane wyniki analizowano przy użyciu programu BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare). Na podstawie analizy sygnału dla wzrastających stężeń pepF4_1 wyznaczono stałą dysocjacji na poziomie $6,7 \times 10^{-7}$ M.

Jako próbka referencyjna użyty był roztwór białka Fc w tym samym stężeniu. Nie zaobserwowano dla niego wiązania do immobilizowanego na sensorze białka FGFR1-Fc.

Przykład 3

PeptibodyF4_1 jest specyficznie internalizowane do komórek ekspresjonujących FGFR1, zaś internalizacji takiej nie obserwujemy dla domeny Fc pozbawionej peptydu kierującego (Fig. 4).

Internalizację peptibodyF4_1 zależną od FGFR1 przeprowadzono na liniach komórkowych U2OS oraz U2OS stabilnie transferowanych FGFR1. Komórki inkubowano w medium głodowym przez 16 h w 37°C z 5% CO₂. Następnego dnia, po schłodzeniu płytki wymieniono medium z dodatkiem 1% BSA, dodano 2 μg peptibodyF4_1 oraz 2 μg Fc (kontrola) i inkubowano w 4°C przez 15 min, a następnie w 37°C przez 30 min. Następnie komórki utrwalono 4% roztworem paraformaldehydu i wyznakowano białka odczynnikami fluorescencyjnymi mającym powinowactwo do domeny Fc (Zenon AF488 Human IgG Labeling Kit, Thermo Scientific). Jądra komórkowe wyznakowano NucBlue Live (Thermo Fisher Scientific), natomiast endosomy z wykorzystaniem odczynnika CellLight™ Early Endosomes-RFP, BacMam 2.0 (Thermo Fisher Scientific), który wiąże się z białkiem Rab5a. Analizę przeprowadzono na mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss Axio Observer Z1 z obiektywem LD-Plan-Neofluar 40/0.6 oraz kamerą Axiocam 503 (Zeiss). Otrzymane zdjęcia analizowano i obrabiano przy użyciu oprogramowania Zeiss ZEN 2.3 software (Zeiss) and Adobe Photoshop CS6 (Adobe).

Sygnał pochodzący odpeptibodyF4_1 obserwowano w komórkach U2OS-FGFR1 jako zielone punkty, które w większości kolokalizowały się ze wczesnym markerem endosomalnym – białkiem Rab5a. Nie zaobserwowano fluorescencji peptibodyF4_1 w komórkach pozbawionych receptora 1 FGF. Na żadnej z linii komórkowej nie zaobserwowano sygnału pochodzącego od domeny Fc.

Przykład 4

PeptibodyF4_1 nie powoduje efektu proliferacyjnego w komórkach posiadających naturalny poziom FGFR1.

Głodzone komórki mysich fibroblastów (NIH 3T3) – wykazujące naturalną ekspresję FGFR1 – inkubowano z peptibodyF4_1 w zakresie stężeń 0,1–20 μg/ml przez 48 h w 37°C z 5% CO₂. Jako kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane FGF1 w stężeniach 1, 10 i 100 ng/ml, natomiast kontrolę negatywną – komórki inkubowane z domeną Fc (0,1–20 μg/ml). Efekt proliferacyjny mierzono poprzez określenie żywotności za pomocą odczynnika AlamarBlue (Invitrogen). Wykazano, że peptibodyF4_1 nawet w wysokich stężeniach nie powoduje efektu mitogennego, w przeciwieństwie do FGF1, a więc przy ewentualnym zastosowaniu nie grozi niepożądaną stymulacją komórek do podziałów.

Przykład 5

Koniugacja peptibodyF4_1 z cytostatykiem, monometyloaurystatyną E (MMAE).

Do roztworu peptibodyF4_1 o stężeniu 1 mg/ml w buforze PBS pH 7,2 (100 mM NaCl, 33 mM Na₂HPO₄, 18 mM NaH₂PO₄) z dodatkiem 1M mocznika oraz 5% glicerolu dodano 10 molowy nadmiar 0,5M TCEP (pH 7,0) nad białkiem. Mieszaninę redukcyjną inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Następnie do nowej probówki dodano monometyloaurystatynę E połączoną z dipeptydowym walino-cytrulinowym łącznikiem zakończonym ugrupowaniem maleimidowym (vcMMAE). Lek rozcieńczono buforem PBS z dodatkiem 1M mocznika oraz 5% glicerolu. W ostatnim etapie dodano białko,

którego stężenie w reakcji koniugacji wynosiło 0,5 mg/ml. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 3 h w 15°C. Podczas reakcji użyto 15-krotnego nadmiaru leku cytotoksycznego w stosunku do ilości białka. Wydajność koniugacji sprawdzana była za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (Fig. 6).

W celu pozbycia się nadmiaru monometyloaurystatyny E, koniugat został oczyszczony na kolumnie ze złożem Sepharose z immobilizowanym białkiem A (GE Healthcare). Przed nałożeniem skoniugowanego białka, kolumna została zrównoważona buforem PBS pH 7,2. Koniugat związany na kolumnie eluowany był 0,1 M cytrynianem sodu o pH 3,5 używając funkcji *reverse backflow*, która pozwoliła na znaczne zagęszczenie białka. Niskie pH zwolnionego koniugatu neutralizowane było za pomocą 1M Tris o pH równym 9,0, a następnie koniugat był dializowany do PBS przez 16 godzin w temperaturze 4°C. Zdolność do związania się na kolumnie z immobilizowanym białkiem A potwierdza również właściwe zwinięcie domeny Fc w koniugacie.

Przykład 6

PeptibodyF4_1-MMAE wykazuje cytotoksyczność specyficzną względem komórek nowotworów płuc ekspresjonujących FGFR1.

Właściwości koniugatów peptibodyF4_1-MMAE badano na przykładzie linii płaskonabłonkowego nowotworu płuc wykazującego wysoką nadekspresję FGFR1 (NCI-H520) oraz płucnej linii nowotworowej o niskiej ekspresji receptora (HCC-95). Komórki wysiano na płytkę 96-dołkową (10⁴ kom./dołek] w pełnym medium. Po 24 h komórki traktowano koniugatem peptibodyF4_1-MMAE w stężeniach 5x10⁻¹¹ M – 1x10⁻⁶ M) i inkubowano komórki 96 h w temperaturze 37°C, przy stężeniu 5% CO₂. Żywotność badano poprzez dodanie do komórek AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z protokołem producenta.

Wykazano, że żywotność komórek o wysokim poziomie ekspresji FGFR1 (NCI-H520) spada poniżej 20% wyjściowej wartości przy stężeniach peptibodyF4_1-MMAE 50 nM i wyższych. Stężenia takie nie powodują znaczącego spadku żywotności dla komórek HCC-95, pozbawionych zwiększonej ilości FGFR1 na powierzchni (Fig. 7). Traktowanie komórek nowotworowych peptibodyF4_1 nieskoniugowanym z lekiem cytotoksycznym nie wpływało istotnie na ich żywotność.

Zastrzeżenia patentowe

1. Białko fuzyjne zawierające domenę Fc pochodzącą z immunoglobuliny G1 oraz sekwencję IALSKNGKTKKGNRVSPMTKVTFLPRL stanowiącą fragment sekwencji (179–206) ludzkiego fibroblastycznego czynnika wzrostu FGF4.
2. Białko fuzyjne według zastrz. 1 **znamiennie tym**, że posiada przyłączony za pomocą hydrolizowalnego linkera niskocząsteczkowy, organiczny związek cytotoksyczny.
3. Białko fuzyjne według zastrz. 2, **znamiennie tym**, że związkiem cytotoksycznym jest monometyloaurystatyna E.
4. Białko fuzyjne określone w zastrz. 2 albo 3 do zastosowania jako lek.
5. Białko fuzyjne określone w zastrz. 2 albo 3 do zastosowania w hamowaniu proliferacji oraz zmniejszania żywotności komórek nowotworowych charakteryzujących się wysoką ekspresją receptora fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR1).

Rysunki

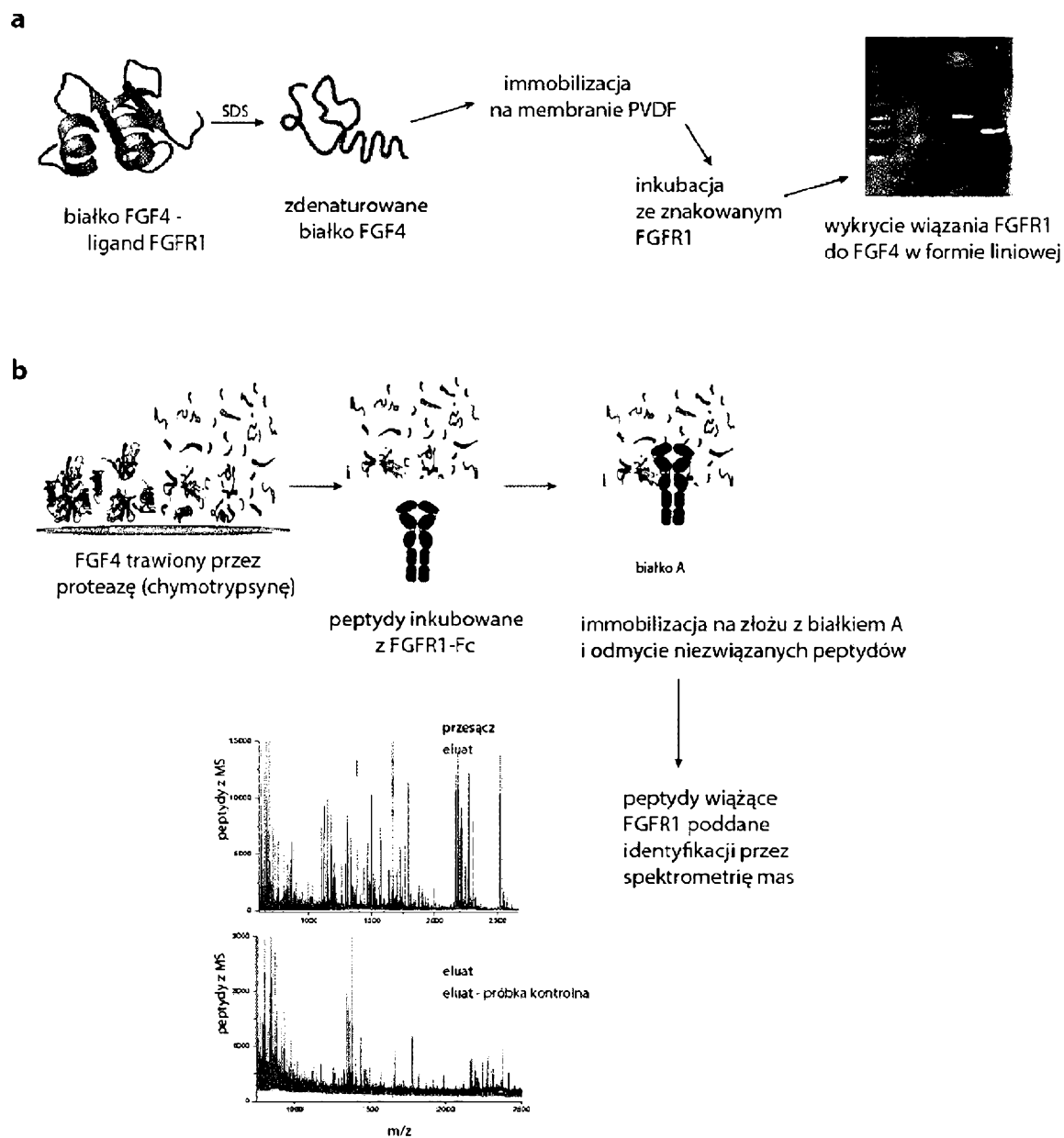


Fig. 1

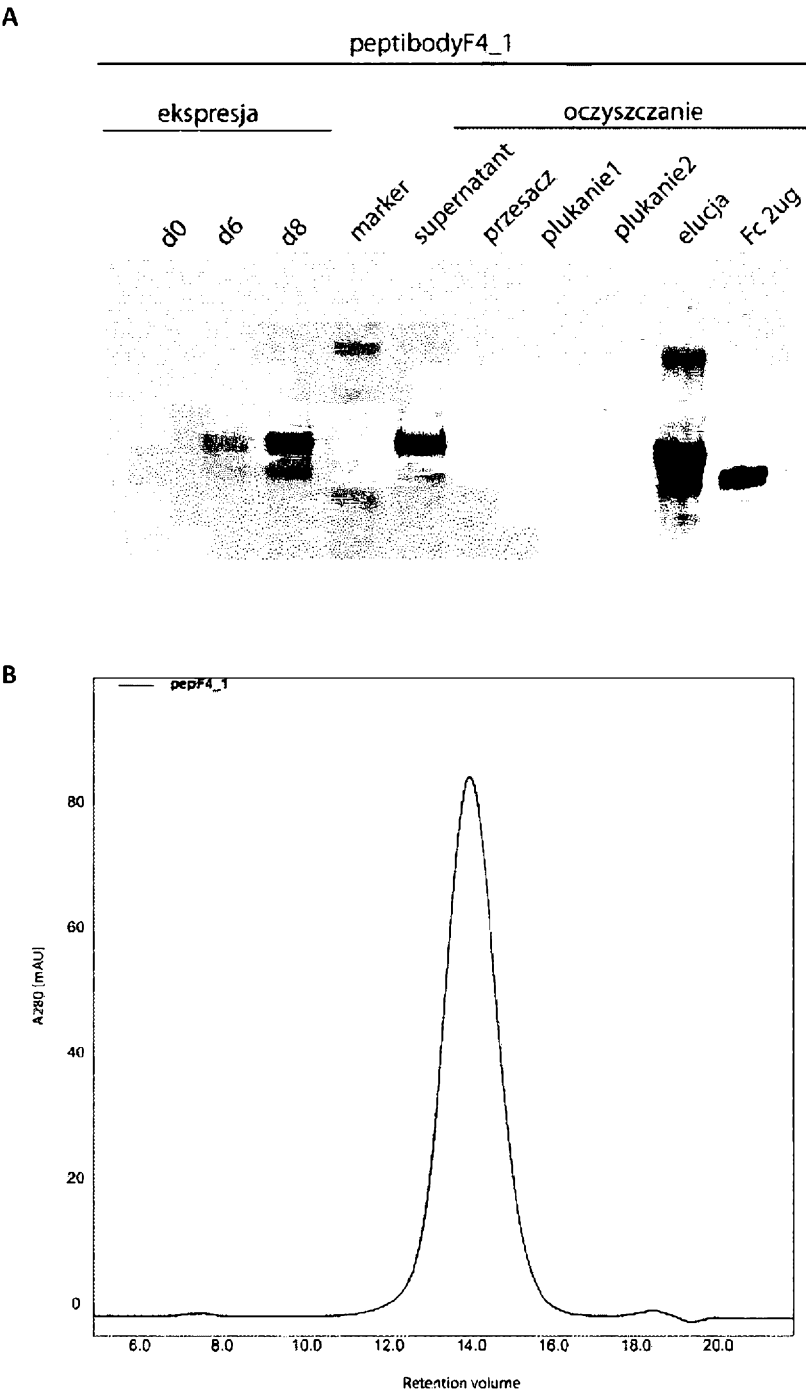


Fig. 2

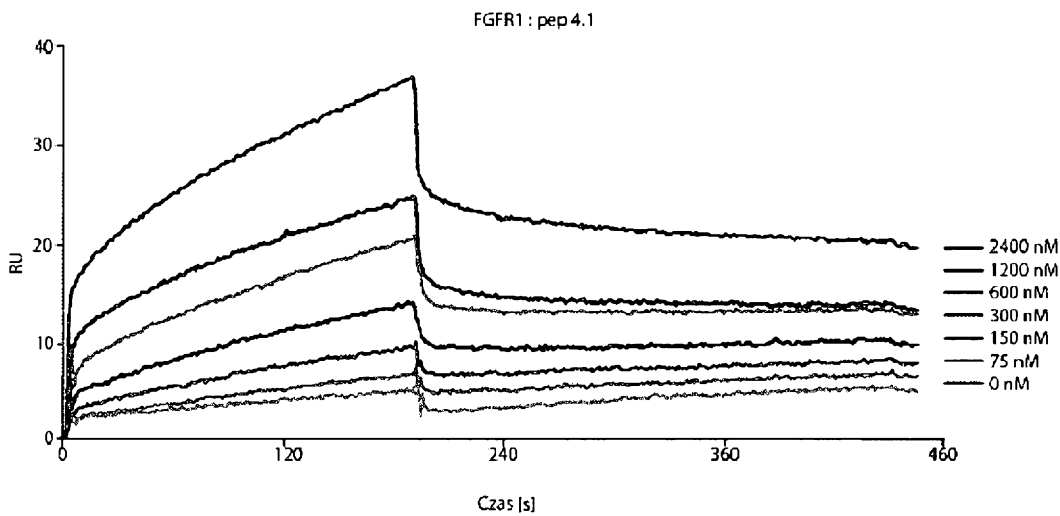


Fig. 3

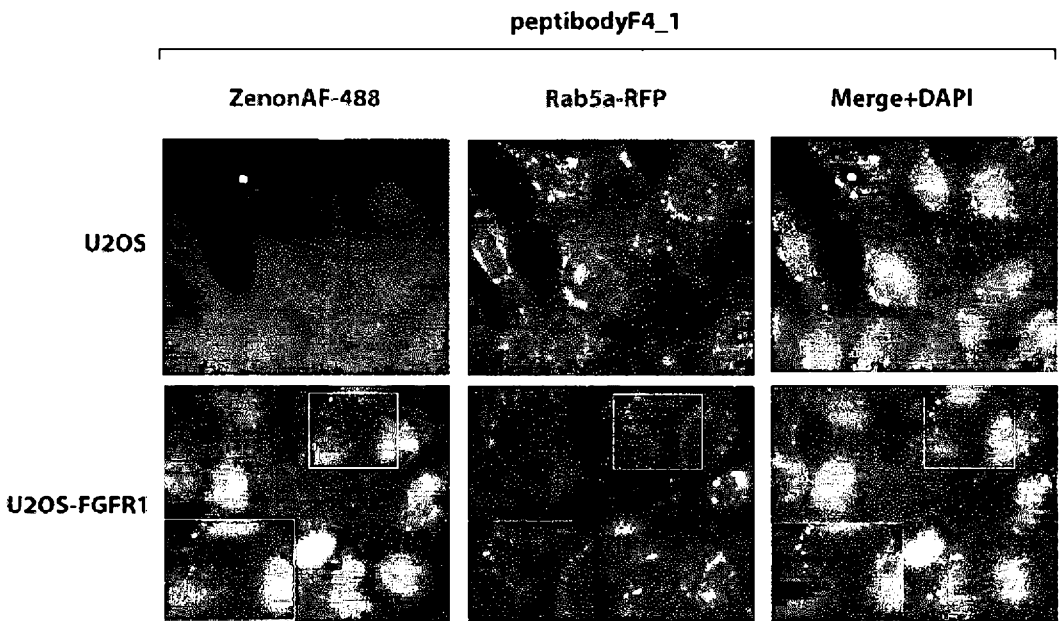


Fig. 4

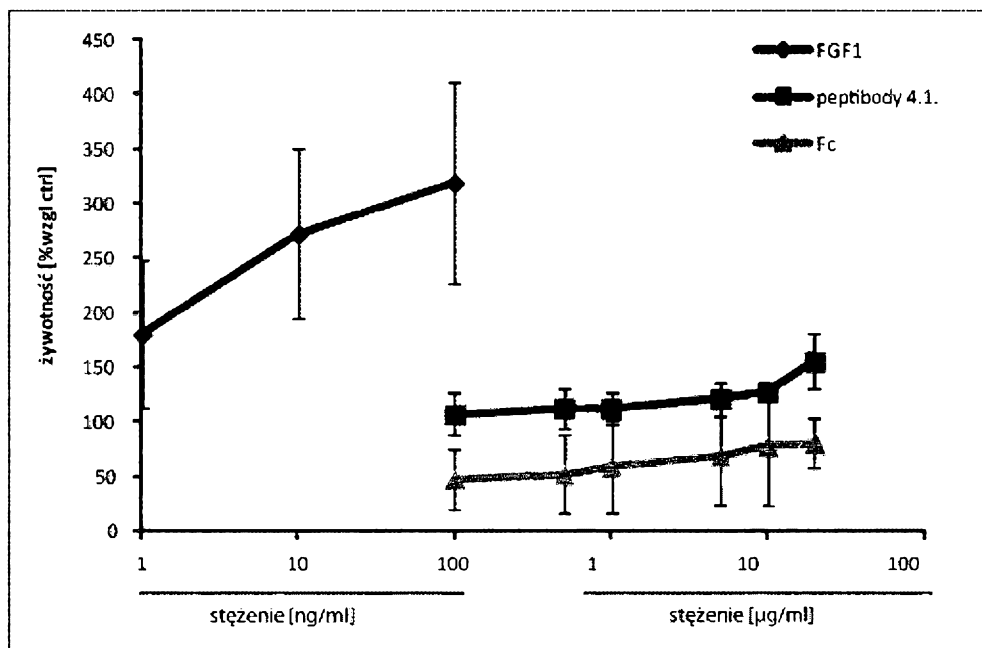


Fig. 5

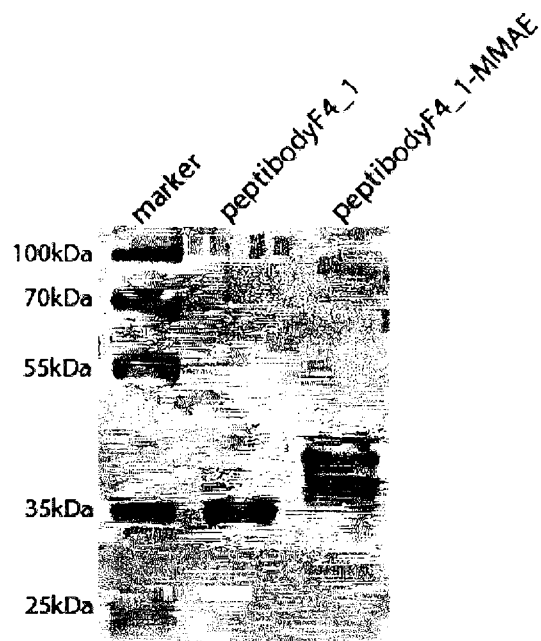
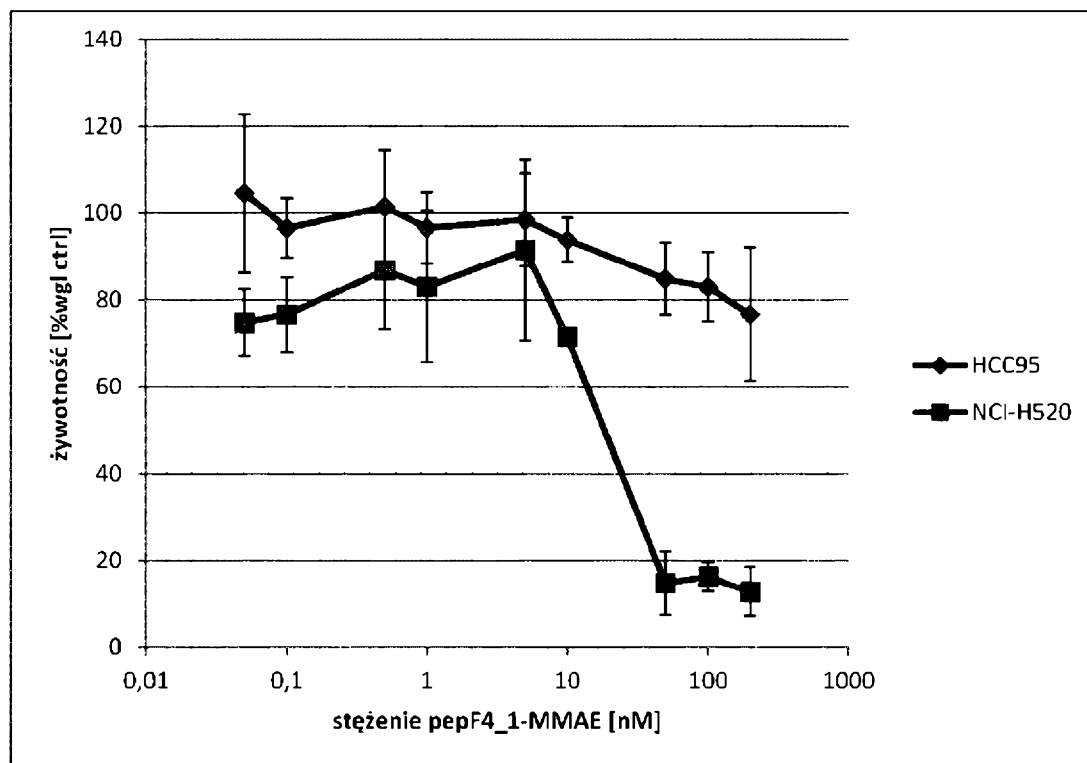


Fig. 6



+++

Fig. 7