



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **427358**

(51) Int. Cl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **09.10.2018**

(54) **Transformujący czynnik wzrostu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu beta 3 (TGFβ2 lub TGFβ3) do zastosowania w leczeniu pacjentów z glejakami wielopostaciowymi, w przypadku których to glejaków ponad 5% komórek nowotworowych jest EGFRvIII-pozytywna**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

20.04.2020 BUP 09/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

19.07.2021 WUP 16/21

(73) Uprawniony z patentu:

RIESKE PIOTR, Łódź, PL

STOCZYŃSKA-FIDELUS EWELINA, Maków, PL

PIASKOWSKI SYLWESTER,

Konstantynów Łódzki, PL

WYRZYKOWSKI ANDRZEJ SZCZEPAN,

Warszawa, PL

PERSONATHER SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ

ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ,

Konstantynów Łódzki, PL

CELATHER POLSKA SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ

ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ,

Konstantynów Łódzki, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

PIOTR RIESKE, Łódź, PL

EWELINA STOCZYŃSKA-FIDELUS, Maków, PL

SYLWESTER PIASKOWSKI,

Konstantynów Łódzki, PL

ANDRZEJ SZCZEPAN WYRZYKOWSKI,

Warszawa, PL

Opis wynalazku

Niniejszy wynalazek dotyczy zastosowania TGF β 2 lub TGF β 3 (transformujący czynnik wzrostu typu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu typu beta 3) w terapii pacjentów ze zmianami nowotworowymi, charakteryzującymi się obecnością ponad 5% komórek nowotworowych wykazujących określony fenotyp, mianowicie obecność zmutowanego receptora dla EGF, to jest EGFRvIII.

Opis stanu techniki

W przypadku wielu nowotworów obserwujemy mutację prowadzącą do powstawania tzw. EGFRvIII. Aktualnie obowiązuje pogląd stwierdzający, że działania przeciwnowotworowe w odniesieniu do komórek nowotworowych z EGFRvIII mogą polegać na wywołaniu ich śmierci komórkowej dzięki blokowaniu aktywności kinazowej tego receptora. Stosowano też ogólnie dostępne formy terapii: chemioterapia, radioterapia, chirurgia. Próbowano również bez powodzenia stosować terapie immunologiczne.

Nikt nie proponował do tej pory zastosowania TGF β 2 lub TGF β 3 w terapii pacjentów z nowotworami, których komórki wykazują ekspresję EGFRvIII.

EGFRvIII powstaje w wyniku delecji fragmentu genu *EGFR* zawierającego eksony 2-7 [Wikstrand 1998]. Mutant ten nie występuje w komórkach prawidłowych. Ekspresja EGFRvIII w wielu typach nowotworów tłumaczy olbrzymie zapotrzebowanie na terapię eliminującą komórki nowotworowe wykazujące ekspresję EGFRvIII.

Komórki nowotworowe wykazujące ekspresję EGFRvIII wykazują dużą lekooporność na terapię związkami drobnocząsteczkowymi [Liu 2013, Learn 2004, Schulte 2013, Ji 2006, Zanca 2017] i terapię immunologiczną [Brand 2011, Yang 2008, Patel 2007].

Komórki EGFRvIII pozytywne mogą odgrywać rolę nowotworowych komórek macierzystych, ewentualnie komórki EGFRvIII negatywne mogą być zależne od komórek EGFRvIII pozytywnych [Zanca 2017, Pęciak 2017].

Popyt na poszukiwany lek działający specyficznie na komórki, które wykazują ekspresję EGFRvIII, jest bardzo duży. W tej chwili nie ma na rynku substancji, które powodują śmierć komórek nowotworowych wykazujących ekspresję EGFRvIII, ale względnie nieszkodliwych dla komórek prawidłowych. Stosowane obecnie substancje lecznicze wykazują bardzo poważne efekty uboczne ponieważ zazwyczaj, molekuly na które oddziałują, znajdują się zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych [Dudek 2006, Perez-Soler 2004, Petty 2003, Nguyen 2009].

Komórki nowotworowe wykazujące wysokie stężenie EGFRvIII to przede wszystkim komórki glejaka wielopostaciowego [Pęciak 2017]. Wiele innych nowotworów charakteryzuje się obecnością komórek EGFRvIII pozytywnych. Natomiast w przypadku glejaka wielopostaciowego mediana czasu przeżycia to jedynie 15-18 miesięcy. Najbardziej optymistyczne dane wskazują, że tylko kilka procent pacjentów z glejakiem wielopostaciowym przeżyje więcej niż pięć lat od momentu postawienia diagnozy w USA. Dla porównania tylko 10% kobiet z rakiem piersi w USA nie przeżyje pięciu lat od momentu postawienia diagnozy. W przypadku glejaka wielopostaciowego najdłużej przeżywają pacjenci, u których stosuje się połączenie radioterapii, temozolomidu (chemioterapia) i chirurgii. Terapii towarzyszy najczęściej ekstremalne pogorszenie stanu pacjentów i dramatyczne zmiany osobowości. Blisko połowa pacjentów z glejakiem wielopostaciowym to osoby starsze (około 70-letnie), które bardzo źle znoszą obecnie stosowane rodzaje terapii. Nie ma zgody co do tego jakie powinny być w ich przypadku standardy terapeutyczne. W przypadku tych pacjentów mediana przeżycia wynosi około dziesięciu miesięcy. Nie jest znana terapia prowadząca do śmierci komórek nowotworowych glejaka wielopostaciowego, która jest nieszkodliwa dla komórek prawidłowych co poprawiłoby sytuację pacjentów z glejakiem wielopostaciowym. Takie terapie przeciwnowotworowe nie zostały jeszcze odkryte lub stanowią absolutną rzadkość. U pacjentów z glejakiem wielopostaciowym próbowano stosować terapie immunologiczne, które mogłyby spełnić kryterium ewidentnej nieszkodliwości ale bez powodzenia [Hopper-Borge 2009, Grisanti 2008, Rades 2010].

TGF β (TGF β 2 lub TGF β 3) generalnie znane są z innego wpływu na komórki nowotworowe niż ten opisany w zgłoszeniu. Dotychczas próbowano stosować w terapii onkologicznej blokery receptora dla TGF β [Han 2015]. Nie są znane skuteczne próby zastosowania TGF β 2 lub TGF β 3 jako substancji przeciwnowotworowych, tym bardziej w terapii nowotworów, w których występują komórki EGFRvIII pozytywne. Powszechnie wiadomo, że czynnik wzrostu TGF β 2 lub TGF β 3 nie może być szkodliwy wobec komórek prawidłowych w takim sensie jak np. erlotynib, afatynib czy temozolomid. TGF β jest substancją

produkowaną w organizmie człowieka w warunkach fizjologicznych. Jego szkodliwość jest więc relatywnie znikoma.

Istota wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest transformujący czynnik wzrostu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu beta 3 (TGF β 2 lub TGF β 3) do zastosowania w leczeniu pacjentów z glejakami wielopostaciowymi, w przypadku których to glejaków ponad 5% komórek nowotworowych jest EGFRvIII-pozytywna.

Korzystnie komórki nowotworowe EGFRvIII-negatywne są biologicznie zależne od komórek EGFRvIII-pozytywnych. Korzystnie komórką nowotworową podatną na efekt cytotoksyczny i cytostaticzny jest macierzysta komórka nowotworowa EGFRvIII-pozytywna. Korzystnie komórka jest ludzką komórką nowotworową.

Korzystne skutki wynalazku

Korzystnie transformujący czynnik wzrostu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu beta 3 (TGF β 2 lub TGF β 3) jest:

- minimalnie toksyczny w stężeniach fizjologicznych i terapeutycznych wobec komórek prawidłowych;
- nietoksyczny w stężeniach fizjologicznych i terapeutycznych wobec komórek prawidłowych;
- nieszkodliwy dla komórek prawidłowych w stężeniach fizjologicznych i terapeutycznych;
- wykazuje nieznaczną toksyczność w porównaniu z drobnocząsteczkowymi blokerami kinaz EGFR;
- wykazuje nieznaczną toksyczność w porównaniu z drobnocząsteczkowymi związkami chemicznymi stosowanymi w terapii onkologicznej.

Korzystnie efektem działania transformującego czynnika wzrostu beta 2 lub transformującego czynnika wzrostu beta 3 (TGF β 2 lub TGF β 3) jest:

- zatrzymanie podziałów komórkowych komórek nowotworowych;
- śmierć komórek nowotworowych.

Korzystnie efekt taki obserwuje się w przypadku komórek nowotworowych EGFRvIII-negatywnych, jeśli są biologicznie zależne od komórek EGFRvIII-pozytywnych.

Korzystnie komórka jest komórką nowotworową glejaka wielopostaciowego, w którym ponad 5% komórek nowotworowych jest EGFRvIII-pozytywna.

Korzystnie komórka jest komórką innego nowotworu niż glejak wielopostaciowy, w którym ponad 5% komórek nowotworowych jest EGFRvIII-pozytywna.

Objaśnienie figur rysunku

Przedmiot wynalazku w przykładach wykonania jest uwidoczniony na rysunkach:

Figura 1. Struktura TGF β 2.

Figura 2. Struktura TGF β 3.

Figura 3. Wyniki obserwacji w czasie rzeczywistym komórek podlinii DK-MG high z wykorzystaniem urządzenia BioStation CT. Cząsteczka oznaczona jako TGF β 2 jest skuteczna przeciwnowotworowo wobec komórek DK-MG high już w stężeniu 1 ng/ml – hamuje ich proliferację i wywołuje śmierć. Wpływ TGF β 2 jest znamienny.

Figura 4. Wyniki obserwacji w czasie rzeczywistym komórek podlinii DK-MG low z wykorzystaniem urządzenia BioStation CT. Cząsteczka oznaczona jako TGF β 2 jest nieskuteczna przeciwnowotworowo wobec komórek DK-MG low w stężeniu 1 ng/ml.

Figura 5. Wyniki obserwacji w czasie rzeczywistym komórek podlinii DK-MG high z wykorzystaniem urządzenia BioStation CT. Cząsteczka oznaczona jako TGF β 3 jest skuteczna przeciwnowotworowo wobec komórek DK-MG high już w stężeniu 1 ng/ml – hamuje ich proliferację i wywołuje śmierć. Wpływ TGF β 3 jest znamienny.

Figura 6. Wyniki obserwacji w czasie rzeczywistym komórek podlinii DK-MG low z wykorzystaniem urządzenia BioStation CT. Cząsteczka oznaczona jako TGF β 3 jest nieskuteczna przeciwnowotworowo wobec komórek DK-MG low w stężeniu 1 ng/ml.

Figura 7. Przykładowa analiza cytotoksyczności TGF β 2 na indukowane prawidłowe neuralne komórki macierzyste z wykorzystaniem urządzenia BioStation CT. Wpływ TGF β 2 jest statystycznie nieznamienny.

Figura 8. Przykładowa analiza cytotoksyczności TGF β 3 na prawidłowe ludzkie perycyty z wykorzystaniem urządzenia BioStation CT. Wpływ TGF β 3 jest statystycznie nieznamienny.

Szczegółowy opis przedmiotu wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest TGF β (TGF β 2 lub TGF β 3, transformujący czynnik wzrostu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu beta 3), opisane w bazie danych białek HPRD pod identyfikatorem

01828 (TGF β 2) i 01829 (TGF β 3), do zastosowania w leczeniu pacjentów ze zmianami nowotworowymi, w których komórki nowotworowe wykazują ekspresję EGFRvIII (charakteryzującego się brakiem regionu kodowanego przez eksony 2-7). TGF β 2 został dostarczony przez Sigma-Aldrich, TGF β 3 został dostarczony przez Gibco™ (Thermo Fisher Scientific).

Subrodzina czynników TGF β , dla których receptorem jest TGF β R, składa się z trzech czynników: β 1, β 2 i β 3. Każdy z nich w formie aktywnej składa się ze 112 aminokwasów.

TGF β 2 składa się wyjściowo z 414 aminokwasów, z których otrzymywana jest sekwencja TGF β 2 w formie aktywnej składająca się ze 112 aminokwasów. Są to aminokwasy 303 do 414 całkowitej sekwencji aminokwasowej TGF β 2. To właśnie forma aktywna TGF β 2 była testowana w analizach. Należy pamiętać, że białko TGF β 2 podlega glikozylacji w pozycjach 72, 140 i 241. W obrębie struktury występują mostki dwusiarczkowe (Fig. 1).

ALDAAYCF RNVQDNCCLR PLYIDFKRDL GWKWIHEPKG YNANFCAGAC
PYLWSSDTQH SRVLSLYNTI NPEASASPCC VSQDLEPLTI LYYIGKTPKI
EQLSNMIVKS CKCS

Wzór 1. Sekwencja aminokwasów formy aktywnej czynnika wzrostu zwanego dalej jako TGF β 2.

TGF β 3 składa się wyjściowo z 412 aminokwasów, z których otrzymywana jest sekwencja TGF β 3 w formie aktywnej składająca się, tak samo jak pozostałych czynników z podrodziny TGF β ze 112 aminokwasów. Są to aminokwasy 301 do 412 całkowitej sekwencji aminokwasowej TGF β 3. To właśnie forma aktywna TGF β 3 była testowana w analizach. Należy pamiętać, że białko TGF β 3 podlega glikozylacji w pozycjach 74, 135 i 142. W obrębie struktury występują mostki dwusiarczkowe (Fig. 2).

ALDTNYCFRN LEENCCVRPL YIDFRQDLGW KWVHEPKGYY ANFCSGPCPY
LRSADTTHST VLGLYNTLNP EASASPCCVP QDLEPLTILY YVGRTPKVEQ
LSNMVVKSCK CS

Wzór 2. Sekwencja aminokwasów formy aktywnej czynnika wzrostu zwanego dalej jako TGF β 3.

Wyniki badań *in vitro* zostały ujęte w przykładach. Do badań wykorzystano komercyjnie dostępną linię komórkową DK-MG, z której wyprowadzono dwie podlinie komórkowe. Pierwsza podlinia tzw. DK-MG high wykazywała od 40% do 70% komórek EGFRvIII pozytywnych. Druga podlinia DK-MG low wykazywała nie więcej niż 5% komórek EGFRvIII-pozytywnych. Podlinie te opisano w artykule Stec i wsp. [Oncotarget 2017].

Do oceny toksyczności badanego związku na komórki prawidłowe wykorzystano ludzkie perycyty oraz ludzkie indukowane neuralne komórki macierzyste.

W badaniach wykazano ekstremalną toksyczność TGF β , wobec komórek nowotworowych wykazujących ekspresję EGFRvIII i brak toksyczności TGF β wobec komórek prawidłowych (BALB 3T3). W przypadku komórek prawidłowych zaobserwowano korzystny wpływ TGF β na ich proliferację. Badano komórki prawidłowe pomimo, że wiadomo że TGF β nie może być wobec nich toksyczny w takim stopniu jak stosowane drobnocząsteczkowe substancje lecznicze (np. erlotynib czy temozolomid). Stosowano czynnik TGF β 2 (cat. No. SRP3170-5UG; Sigma-Aldrich) oraz TGF β 3 (cat. No. PHG9305; Gibco™; Thermo Fisher Scientific). Stosowano aktywne formy TGF β składające się ze 112 aminokwasów.

Przykłady

P r z y k ł a d 1. Analiza wpływu TGF β 2 na komórki linii DK-MG high w oparciu o metody obrazowe (BioStation CT).

Przykład ilustruje efekt TGF β 2 na przeżywalność i proliferację komórek linii DK-MG high. W tym celu wykonano badanie na komórkach linii, wykazującej nie mniej niż 40% komórek EGFRvIII pozytywnych (DK-MG high). Podlinię tę opisano w artykule Stec i wsp. Oncotarget 2017.

Dzień 1

1. Komórki linii DK-MG high w konfluencji do 90% przepłukano buforowaną solą fizjologiczną (PBS) bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto PBS.
2. Komórki odklejono od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1x) w czasie 1-3 min w 37°C.
3. Komórki przeniesiono do probówki o objętości 15 ml, zwirować (200xg, 4 min) i zawieszono w pożywce RPMI1640 z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami,
4. Zliczono komórki.
5. Dodano 4×10^4 komórek na dołek płytki 6-dołkowej do hodowli adherentnej.
6. Uzupełniono w/w pożywką i pozostawić na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 2

7. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
8. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy i pozostawiono na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 3

9. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
10. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy z odpowiednimi związkami (DMSO; objętościowo równą maksymalnej objętości testowanych związków); pojedynczo lub w kombinacjach z EGF (20 ng/ml (Sigma, Cat. no. E9644)), erlotynib (10 μ M Molecula; Cat. No. 89983631), TGF β 2 (1; 2,5; 5 ng/ml numer katalog. SRP3170-5UG; Sigma-Aldrich).
11. Wstawiono naczynie z komórkami do BioStation CT. Opisano płytkę i każdy dołek.
12. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych.

Kolejne dni

13. Co 48 godzin zmieniano pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/ EGF/erlotynibu/TGF β 2 pojedynczo lub w kombinacjach do odpowiednich naczyń hodowlanych.
14. Wstawiono komórki do urządzenia BioStation CT.
15. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych. Oprogramowanie BioStation CT pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
16. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że BioStation CT umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

Wyniki: TGF β 2 jest skuteczny wobec komórek nowotworowych DK-MG wykazujących ekspresję EGFRvIII i komórek od nich zależnych – hamuje ich proliferację i wywołuje śmierć komórkową (Fig. 3). Wartości IC50 TGF β 2 wobec tych komórek wahały się w zakresie kilku nanogramów na mililitr.

P r z y k ł a d 2. Analiza wpływu TGF β 2 na komórki linii DK-MG low w oparciu o metody obrazowe (BioStation CT).

Przykład ilustruje efekt TGF β 2 na przeżywalność i proliferację komórek linii DK-MG low. W tym celu wykonano badanie na komórkach linii, wykazującej nie więcej niż 5% komórek EGFRvIII pozytywnych (DK-MG low). Podlinię tę opisano w artykule Stec i wsp. Oncotarget 2017.

Dzień 1

1. Komórki linii DK-MG low w konfluencji do 90% przepłukano buforowaną solą fizjologiczną (PBS) bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto PBS.
2. Komórki odklejono od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1x) w czasie 1-3 min w 37°C.
3. Komórki przeniesiono do probówki o objętości 15 ml, zwirowano (200xg, 4 min) i zawieszono w pożywce RPMI1640 z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami.
4. Zliczono komórki.
5. Dodano 4×10^4 komórek na dołek płytki 6-dołkowej do hodowli adherentnej.
6. Uzupełniono w/w pożywką i pozostawiono na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 2

7. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
8. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy i pozostawiono na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 3

9. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
10. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy z odpowiednimi związkami (DMSO; objętościowo równą maksymalnej objętości testowanych związków); pojedynczo lub w kombinacjach z EGF (20 ng/ml (Sigma, Cat. no. E9644)), erlotynib (10 μ M Molecula; Cat. No. 89983631), TGF β 2 (1; 2,5; 5 ng/ml numer katalog. SRP3170-5UG; Sigma-Aldrich).
11. Wstawiono naczynie z komórkami do BioStation CT. Opisać płytkę i każdy dołek.
12. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych.

Kolejne dni

13. Co 48 godzin zmieniono pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/EGF/erlotynibu/TGF β 2 pojedynczo lub w kombinacjach do odpowiednich naczyń hodowlanych.
14. Wstawiono komórki do urządzenia BioStation CT.
15. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych. Oprogramowanie BioStation CT pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
16. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że BioStation CT umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

Wyniki: TGF β 2 jest nieskuteczny wobec komórek nowotworowych DK-MG i niewykazujących EGFRvIII (Fig. 4). Przedstawiony wynik wskazuje na brak toksyczności cząsteczki TGF β 2 wobec komórek linii DK-MG low w analizowanych warunkach.

P r z y k ł a d 3. Analiza wpływu TGF-3 na komórki linii DK-MG high w oparciu o metody obrazowe (BioStation CT).

Przykład ilustruje efekt TGF β 3 na przeżywalność i proliferację komórek linii DK-MG high. W tym celu wykonano badanie na komórkach linii, wykazującej nie mniej niż 40% komórek EGFRvIII pozytywnych (DK-MG high). Podlinię tę opisano w artykule Stec i wsp. Oncotarget 2017.

Dzień 1

1. Komórki linii DK-MG high w konfluencji do 90% przepłukano buforowaną solą fizjologiczną (PBS) bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto PBS.
2. Komórki odklejono od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1x) w czasie 1-3 min w 37°C.
3. Komórki przeniesiono do probówki o objętości 15 ml, żwirowano (200xg, 4 min) i zawieszono w pożywce RPMI1640 z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami.
4. Zliczono komórki.
5. Dodano 4×10^4 komórek na dołek płytki 6-dołkowej do hodowli adherentnej.
6. Uzupełniono w/w pożywką i pozostawiono na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 2

7. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
8. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy i pozostawiono na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 3

9. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
10. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy z odpowiednimi związkami (DMSO; objętościowo równą maksymalnej objętości testowanych związków); pojedynczo lub

w kombinacjach z EGF (20 ng/ml (Sigma, Cat. no. E9644)), erlotynib (10 μ M Molecula; Cat. No. 89983631), TGF β 3 (1; 2,5; 5 ng/ml numer katalog. PHG9305; Gibco™; Thermo Fisher Scientific).

11. Wstawiono naczynie z komórkami do BioStation CT. Opisano płytkę i każdy dołek.
12. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych.

Kolejne dni

13. Co 48 godzin zmieniano pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/EGF/erlotynibu/TGF β 2 pojedynczo lub w kombinacjach do odpowiednich naczyń hodowlanych.
14. Wstawiono komórki do urządzenia BioStation CT.
15. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych. Oprogramowanie BioStation CT pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
16. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że BioStation CT umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

Wyniki: TGF β 3 jest skuteczny wobec komórek nowotworowych DK-MG wykazujących ekspresję EGFRvIII i komórek od nich zależnych – hamuje ich proliferację i wywołuje śmierć komórkową (Fig. 5). Wartości IC50 TGF β 3 wobec tych komórek wahały się w zakresie kilku ng na mililitr.

P r z y k ł a d 4. Analiza wpływu TGF β 3 na komórki linii DK-MG low w oparciu o metody obrazowe (BioStation CT).

Przykład ilustruje efekt TGF β 3 na przeżywalność i proliferację komórek linii DK-MG low. W tym celu wykonano badanie na komórkach linii, wykazującej nie więcej niż 5% komórek EGFRvIII pozytywnych (DK-MG low). Podlinię tę opisano w artykule *Stec i wsp. Oncotarget 2017*.

Dzień 1

1. Komórki linii DK-MG low w konfluencji do 90% przepłukano buforowaną solą fizjologiczną (PBS) bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺. Usunięto PBS.
2. Komórki odklejono od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1x) w czasie 1-3 min w 37°C.
3. Komórki przeniesiono do probówki o objętości 15 ml, zwirowano (200xg, 4 min) i zawieszono w pożywce RPMI1640 z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami.
4. Zliczono komórki.
5. Dodano 4x10⁴ komórek na dołek płytki 6-dołkowej do hodowli adherentnej.
6. Uzupełniono w/w pożywką i pozostawiono na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 2

7. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺. Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
8. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy i pozostawiono na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 3

9. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺. Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
10. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy z odpowiednimi związkami (DMSO; objętościowo równą maksymalnej objętości testowanych związków); pojedynczo lub w kombinacjach z EGF (20 ng/ml (Sigma, Cat. no. E9644)), erlotynib (10 μ M Molecula; Cat. No. 89983631), TGF β 3 (1; 2,5; 5 ng/ml numer katalog. PHG9305; Gibco™; Thermo Fisher Scientific).
11. Wstawiono naczynie z komórkami do BioStation CT. Opisać płytkę i każdy dołek.
12. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych.

Kolejne dni

13. Co 48 godzin zmieniano pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/EGF/erlotynibu/TGF β 2 pojedynczo lub w kombinacjach do odpowiednich naczyń hodowlanych.
14. Wstawiono komórki do urządzenia BioStation CT.

15. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych. Oprogramowanie BioStation CT pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
16. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że BioStation CT umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

Wyniki: TGF β 3 jest nieskuteczny wobec komórek nowotworowych DK-MG i niewykazujących EGFRvIII (Fig. 6). Przedstawiony wynik wskazuje na brak toksyczności cząsteczki TGF β 3 wobec komórek linii DK-MG low w analizowanych warunkach.

P r z y k ł a d 5. Analiza toksyczności TGF β 2 i znanych inhibitorów kinazy EGFR wobec indukowanych prawidłowych neuralnych komórek macierzystych z wykorzystaniem urządzenia BioStation CT.

Dzień 1

1. Komórki linii iNSc (Neural Induction Stem Cells) w konfluencji do 80% przepłukano buforowaną solą fizjologiczną (PBS) bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺. Usunięto PBS.
2. Komórki odklejono od naczynia używając StemPro Accutase (ThermoFisher Scientific, Cat. No. A110501) w czasie 5 min w temperaturze pokojowej.
3. Komórki przeniesiono do probówki o objętości 15 ml, zwirowano (200xg, 4 min) i zawieszono w pożywce PSC Neural Induction Medium (ThermoFisher Scientific, Cat. No. A1647801) z antybiotykami.
4. Zliczono komórki.
5. Dodano 1x10⁵ komórek na dołek płytki 6-dołkowej do hodowli adherentnej.
6. Uzupełniono w/w pożywką i pozostawić na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 2

7. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺. Usunęto dokładnie PBS każdorazowo.
8. Dodano 1,5 ml pożywki PSC Neural Induction Medium z antybiotykami z odpowiednimi związkami (DMSO; objętościowo równą maksymalnej objętości testowanych związków); pojedynczo lub w kombinacjach z EGF (20 ng/ml (Sigma, Cat. no. E9644)), erlotynib (10 pM Molecula; Cat. No. 89983631), TGF β 2 (; 2,5 i 5 ng/ml; numer katalog. SRP3170-5UG; Sigma-Aldrich).
9. Wstawiono naczynie z komórkami do BioStation CT. Opisano płytkę i każdy dołek.
10. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych.

Kolejne dni

11. Co 48 godziny zmieniano pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/EGF/erlotynibu/TGF β 2 pojedynczo lub w kombinacjach do odpowiednich naczyń hodowlanych.
12. Wstawiono komórki do urządzenia BioStation CT.
13. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych. Oprogramowanie BioStation CT pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
14. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że BioStation CT umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

Wyniki: Przedstawiony wynik wskazuje na brak cytotoksyczności cząsteczki TGF β 2 wobec **indukowanych prawidłowych neuralnych komórek macierzystych** w analizowanych warunkach w sposób istotny statystycznie (Fig. 7). Wartości IC₅₀ TGF β 2 wobec tych komórek były niemierzalne i wynosiły więcej niż kilkaset nanogramów na minilitr.

P r z y k ł a d 6. Analiza toksyczności TGF β 3 i znanych inhibitorów kinazy EGFR wobec prawidłowych ludzkich perycytów z wykorzystaniem urządzenia BioStation CT.

Dzień 1

1. Perycyty w konfluencji do 90% przepłukano buforowaną solą fizjologiczną (PBS) bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺. Usunięto PBS.

2. Komórki odklejono od naczynia używając Trypsyny-EDTA (0,05%, 1x) w czasie 1-3 min w 37°C.
3. Komórki przeniesiono do probówki o objętości 15 ml, zwirować (200xg, 4 min) i zawieszono w pożywce RPMI1640 z 10% surowicą bydlęcą i antybiotykami.
4. Zliczono komórki.
5. Dodano 4×10^4 komórek na dołek płytki 6-dołkowej do hodowli adherentnej.
6. Uzupełniono w/w pożywką i pozostawić na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 2

7. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
8. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy i pozostawiono na ok. 24 godziny w 37°C.

Dzień 3

9. Komórki przemyto 2-3 razy buforowaną solą fizjologiczną bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} . Usunięto dokładnie PBS każdorazowo.
10. Dodano 2 ml pożywki RPMI1640 z antybiotykami i bez surowicy z odpowiednimi związkami (DMSO; objętościowo równą maksymalnej objętości testowanych związków); pojedynczo lub w kombinacjach z EGF (20 ng/ml (Sigma, Cat. no. E9644)), erlotynib (10 pM Molecula; Cat. No. 89983631), TGF β 3 (1; 2,5 i 5 ng/ml numer katalog. GF111 Merck EMD Millipore).
11. Wstawiono naczynie z komórkami do BioStation CT. Opisano płytkę i każdy dołek.
12. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych.

Kolejne dni

13. Co 48 godziny zmieniano pożywkę pamiętając o dodawaniu DMSO/EGF/erlotynibu/TGF β 3 pojedynczo lub w kombinacjach do odpowiednich naczyń hodowlanych.
14. Wstawiono komórki do urządzenia BioStation CT.
15. Dokonano automatycznej obserwacji mikroskopowej w odstępach 6-godzinnych. Oprogramowanie BioStation CT pozwala na automatyczne zliczanie komórek i pola powierzchni zajmowanego przez te komórki.
16. Analogiczne obserwacje z mniejszą dokładnością mogą zostać wykonane dzięki zastosowaniu mikroskopu JULI czy zwykłego mikroskopu świetlnego. Należy jednak pamiętać, że BioStation CT umożliwia zachowanie warunków środowiska w czasie eksperymentu i obserwację wielu naczyń hodowlanych równocześnie.

Wyniki: Przedstawiony wynik wskazuje na brak cytotoksyczności cząsteczki TGF β 3 wobec komórek prawidłowych (ludzkich prawidłowych astrocytów) w analizowanych warunkach w sposób statystycznie znamieny (Fig. 8). Wartości IC₅₀ TGF β 3 wobec tych komórek były niemierzalne i wynosiły więcej niż kilkaset ng na mililitr.

Piśmiennictwo

Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther.* 2011 May 1;11(9):777-92.

Dudek AZ, Kmak KL, Koopmeiners J, Keshtgarpour M. Skin rash and bronchoalveolar histology correlates with clinical benefit in patients treated with gefitinib as a therapy for previously treated advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2006 Jan;51(1):89-96.

Emrich JG, Brady LW, Quang TS, et al. Radioiodinated (1-125) monoclonal antibody 425 in the treatment of high grade glioma patients: ten-year synopsis of a novel treatment. *Am J Clin Oncol* 2002;25:541-6.

Grisanti S, Amoroso V, Buglione M, Rosati A, Gatta R, Pizzocaro C, Ferrari VD, Marini G. Cetuximab in the treatment of metastatic mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: a case report and review of literature. *J Med Case Rep.* 2008 Sep 30;2:320.

Han J, Alvarez-Breckenridge CA, Wang Q, Yu J. TGF- β signaling and its targeting for glioma treatment. *Am J Cancer Res.* 2015; 5(3): 945-955.

Hopper-Borge EA, Nasto RE, Ratushny V, Weiner LM, Golemis EA, Astsaturov I. Mechanisms of tumor resistance to EGFR-targeted therapies. *Expert Opin Ther Targets.* 2009 Mar; 13(3):339-62.

Ji H, Li D, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, McNamara K, Mahmood U, Mitchell A, Sun Y, Al-Hashem R, Chirieac LR, Padera R, Bronson RT, Kim W, Jänne PA, Shapiro Gf Tenen D, Johnson BE, Weissleder R, Sharpless NE, Wong KK. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR- targeted therapies. *Cancer Cell*. 2006 Jun;9(6):485–95.

Learn CA, Hartzell TL, Wikstrand CJ, Archer GE, Rich JN, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Sampson JH. Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3216–3224.

Liu XJ, Wu WT, Wu WH, Yin F, Ma SH, Qin JZ, Liu XX, Liu YN, Zhang XY, Li P, Han S, Liu KY, Zhang JM, He QH, Shen L. A minority subpopulation of CD133(+) /EGFRvIII(+) /EGFR(-) cells acquires sternness and contributes to gefitinib resistance. *CNS Neurosci Ther*. 2013 Jul;19(7):494–502.

Nguyen A, Hoang V, Laquer V, Kelly KM (December 2009). „Angiogenesis in cutaneous disease: part I”. *J. Am. Acad. Dermatol*. 61 (6): 921–42; quiz 943–4,

Patel D, Lahiji A, Patel S, Franklin M, Jimenez X, Hicklin DJ, Kang X. Monoclonal antibody cetuximab binds to and down-regulates constitutively activated epidermal growth factor receptor vIII on the cell surface. *Anticancer Res*. 2007 Sep-Oct;27(5A):3355–66.

Peciak J, Stec WJ, Treda C, Ksiazkiewicz M, Janik K, Popeda M, Smolarz M, Rosiak K, Hulas-Bigoszewska K, Och W, Rieske P, Stoczynska-Fidelus E. Low Incidence along with Low mRNA Levels of EGFRvIII in Prostate and Colorectal Cancers Compared to Glioblastoma. *J Cancer*. 2017 Jan 1;8(1):146–151. doi: 10.7150/jca. 16108. eCollection 2017.

Roman Pérez-Soler, M.D., et al. (2004). „Selected Highlights”. *Lung Cancer Frontiers* 22 (16): 3238–3247.

Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C i wsp. Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 1993; 53: 2379–85.

Stec WJ, Rosiak K, Siejka P, Peciak J, Popeda M, Banaszczyk M, Pawłowska R, Treda C, Hulas-Bigoszewska K, Piaskowski S, Stoczynska-Fidelus E, Rieske P. Cell line with endogenous EGFRvIII expression is a suitable model for research and drug development purposes. *Oncotarget*. 2016 May 31;7(22):31907–25. doi: 10.18632/oncotarget.8201.

Schulte A, Lififers K, Kathagen A, Riethdorf S, Zapf S, Merlo A, Kolbe K, Westphal M, Lamszus K. Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp105. *Neuro Oncol*. 2013 Oct; 15(10): 1289–301.

Thomas L. Petty, MD. (2003). „Determinants of Tumor Response and Survival With Erlotinib in Patients With Non—Small-Cell Lung Cancer”. *Journal of Clinical Oncolog>r* 1 (17): 3–4.

Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, et al. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer* 515 Res 1997; 57: 4130–40.

Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, Zalutsky MR, Signer DD. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target *J Neurovirol*. 1998; 4(2): 148–58.

Yang CH, Yu CJ, Shih JY, Chang YC, Hu FC, Tsai MC, Chen KY, Lin ZZ, Huang CJ, 520 Shun CT, Huang CL, Bean J, Cheng AL, Pao W, Yang PC. Specific EGFR mutations predict treatment outcome of stage II IB/II V patients with chemotherapy-naïve non-small- cell lung cancer receiving first-line gefitinib monotherapy. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 1;26(16):2745–53.

Zanca C, Villa GR, Benitez JA, Thome AH, Koga T, D’Antonío M, Ikegami S, Ma Jt 525 Boyer AD, Banisadr A, Jameson NM, Parisian AD, Eliseeva OV, Barnabe GF, Liu F, Wu S, Yang H, Wykosky J, Frazer KA, Verkhusha VV, Isaguliant MG, Weiss WA, Gahman TC, Shiau AK, Chen CC, Mischel PS, Cavenee WK, Fumari FB *Genes Dev*. 2017 Jul 19. doi: 10.1101/gad.300079.117.

Zastrzeżenia patentowe

1. Transformujący czynnik wzrostu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu beta 3 (TGFβ2 lub TGFβ3) do zastosowania w leczeniu pacjentów z glejakami wielopostaciowymi, w przypadku których to glejaków ponad 5% komórek nowotworowych jest EGFRvIII-pozytywna.

2. Transformujący czynnik wzrostu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu beta 3 ($TGF\beta 2$ lub $TGF\beta 3$) do zastosowania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że komórki nowotworowe EGFRvIII-negatywne są biologicznie zależne od komórek EGFRvIII-pozytywnych.
3. Transformujący czynnik wzrostu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu beta 3 ($TGF\beta 2$ lub $TGF\beta 3$) do zastosowania według zastrz. 1, **znamienny tym**, że komórką nowotworową podatną na efekt cytotoksyczny i cytostatyczny jest macierzysta komórka nowotworowa EGFRvIII-pozytywna.
4. Transformujący czynnik wzrostu beta 2 lub transformujący czynnik wzrostu beta 3 ($TGF\beta 2$ lub $TGF\beta 3$) do zastosowania według zastrz. 1. **znamienny tym**, że komórka jest ludzką komórką nowotworową.

Rysunki

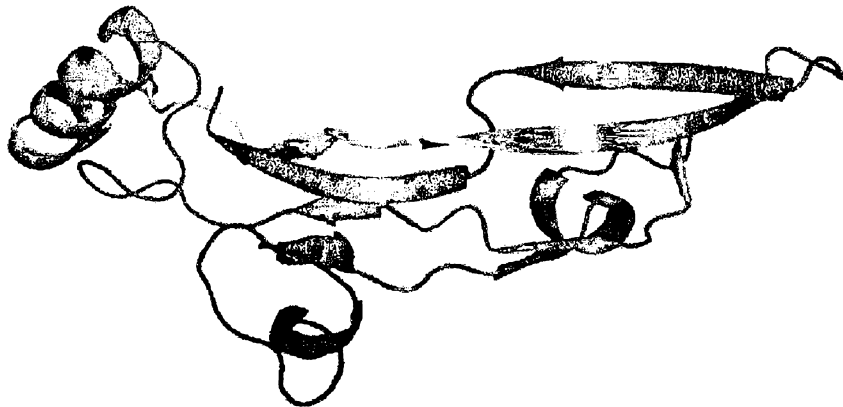


Figura 1

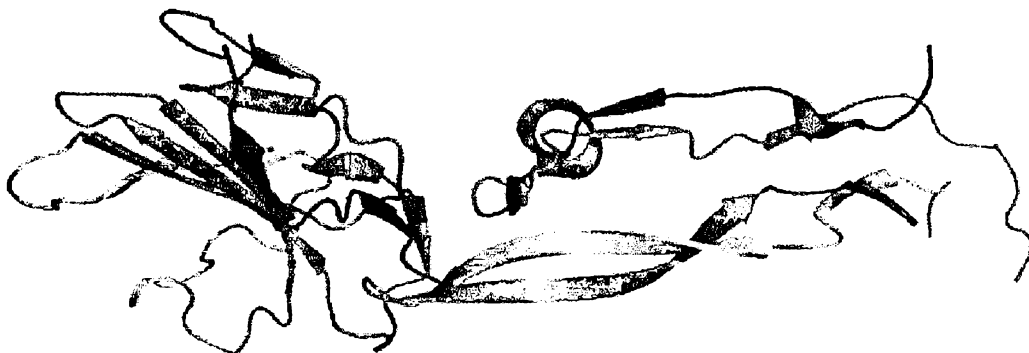


Figura 2

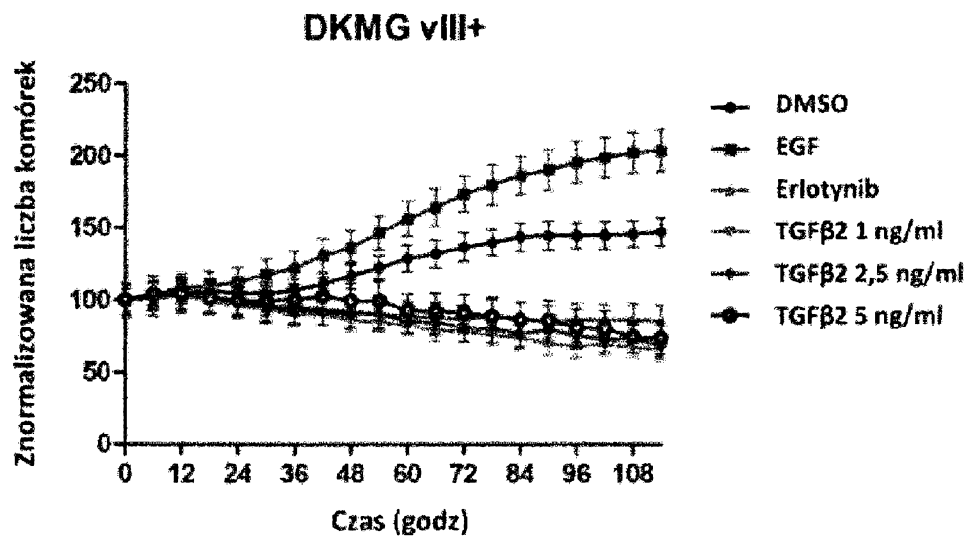


Figura 3

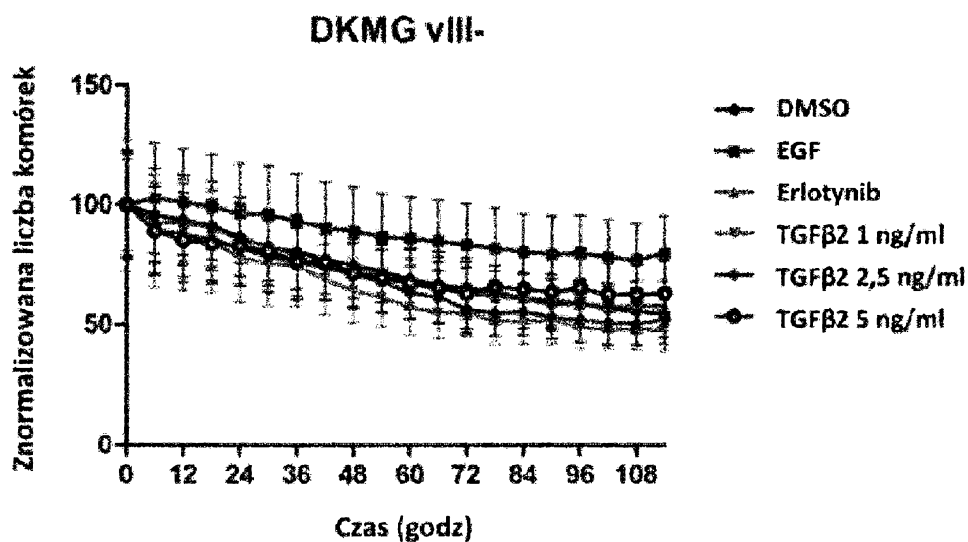


Figura 4

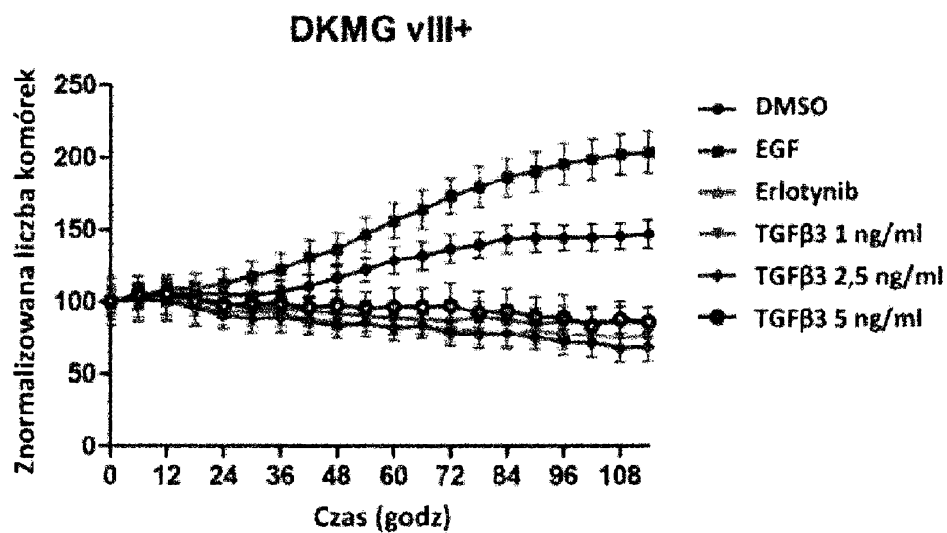


Figura 5

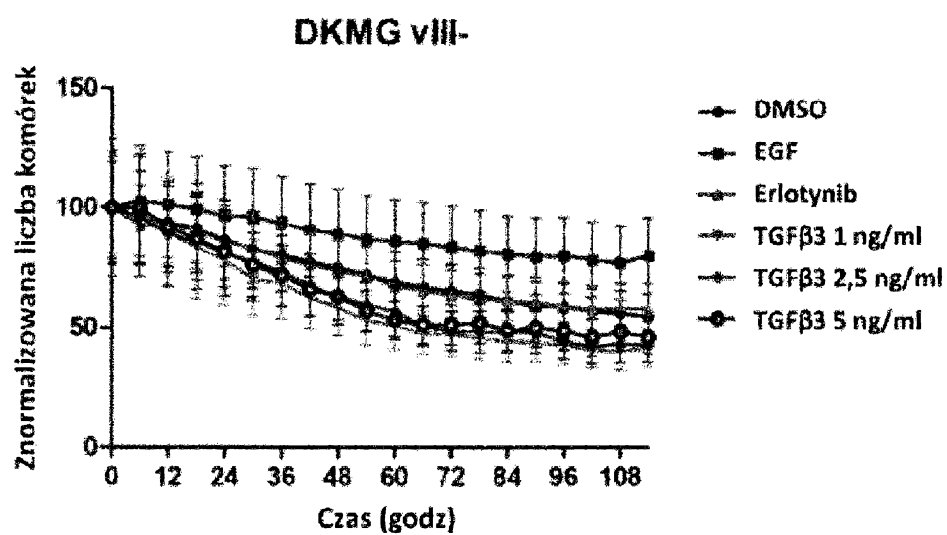


Figura 6

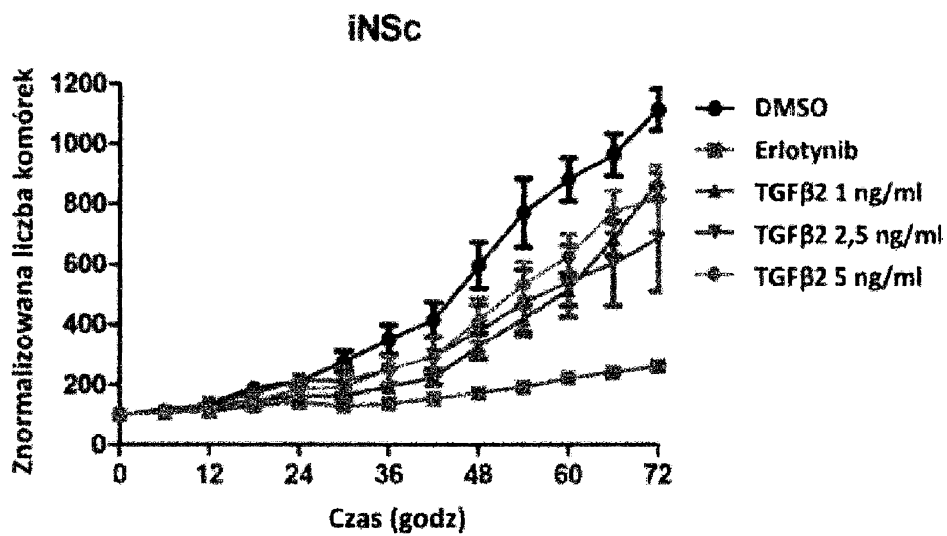


Figura 7

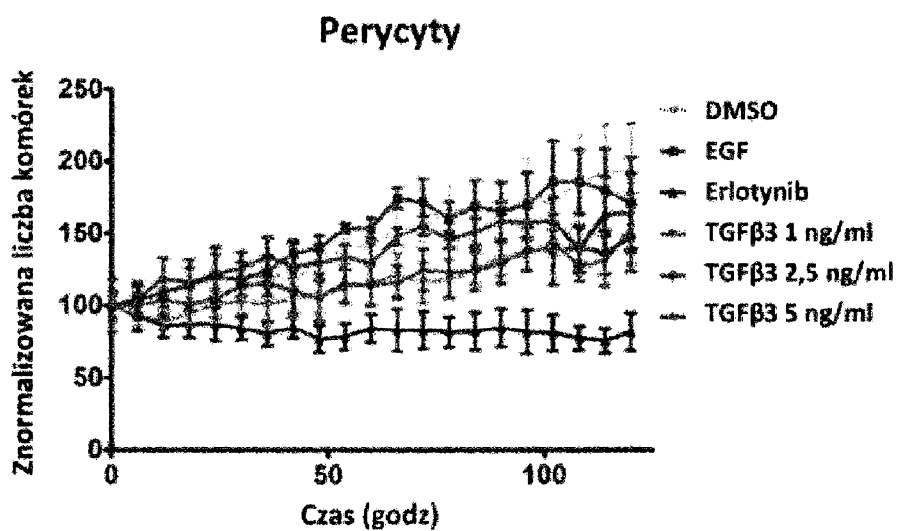


Figura 8