

Selekcja fragmentów przeciwciał wobec receptora 1 czynnika wzrostu fibroblastów w celu zastosowania w terapii przeciwnowotworowej

STRESZCZENIE

Ukierunkowane dostarczanie związków o działaniu przeciwnowotworowym, z zastosowaniem przeciwciał skierowanych wobec antygenów specyficznym występujących na komórkach nowotworowych, reprezentuje jedno z ważniejszych podejść terapeutycznych, którymi zajmuje się współczesna onkologia. Wykazano, że amplifikacja genu *FGFR1* występuje w guzach ponad 20% pacjentów chorych na płaskonabłonkowego raka płuca, a receptor 1 czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR1) może stanowić dobry cel molekularny dla ukierunkowanej terapii przeciwnowotworowej. Wyniki przedstawione w pracy obejmują przygotowanie w pełni ludzkiego fragmentu przeciwciała anty-FGFR1 w formie scFvFc oraz jego koniugację ze związkiem cytotoksycznym, w celu uzyskania preparatu o silnym i specyficznym działaniu cytotoksycznym wobec komórek nowotworowych FGFR1-pozytywnego raka płuca.

W pierwszym etapie pracy skonstruowano, wyprodukowano, oczyszczono i scharakteryzowano rekombinowane warianty białek FGFR, których następnie użyto do selekcji specyficznych fragmentów przeciwciał oraz ich analizy. Jednołańcuchowe fragmenty zmienne przeciwciał (scFv) o wysokim powinowactwie wobec zewnątrzkomórkowej domeny FGFR1 (izoformy IIIc) uzyskano poprzez selekcję bibliotek ludzkich scFv Tomlinson I oraz J, przy użyciu metody prezentacji białek na powierzchni fagów (ang. *phage display*). Otrzymane przeciwciała poddano charakterystyce *in vitro* przy użyciu testu immunoenzymatycznego (ELISA) oraz powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR). Wybrane warianty scFv przeformatowano do scFv *diabody* oraz scFv w fuzji z fragmentem Fc ludzkiej immunoglobuliny G (scFvFc). Najsilniejsze oddziaływanie z FGFR1 wykazały przeciwciała oparte na scFvD2, których stałe dysocjacji wynosiły 18 nM (scFvD2), 0,82 nM (scFvD2 *diabody*) i 0,59 nM (scFvD2Fc). Analiza reaktywności krzyżowej scFvD2 z pozostałymi receptorami FGF wykazała jego wysoką selektywność względem FGFR1. Ponadto cząsteczka scFvD2 posiadała zdolność oddziaływania z FGFR1 również w obecności naturalnego liganda FGF2, co pokazała kompetycyjna analiza wiązania do receptora metodą SPR. Przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazano, że scFvD2Fc

ulega specyficznej oraz szybkiej internalizacji przez komórki U2OS stabilnie stransfekowane *FGFR1* (U2OS-R1), a proces ten zachodzi na drodze endocytozy zależnej od receptora. Jednocześnie nie obserwowano internalizacji scFvD2Fc przez komórki FGFR1-negatywne, U2OS. scFvD2Fc było także efektywnie wychwytywane i internalizowane przez komórki raka płuca NCI-H1581 oraz DMS114, charakteryzujące się amplifikacją genu *FGFR1* i nadprodukcją białka FGFR1 na powierzchni.

Ostatnim etapem pracy było przygotowanie koniugatu scFvD2Fc-vcMMAE, który otrzymano poprzez przyłączenie MMAE - związku o silnym działaniu cytotoksycznym do zredukowanych grup tiolowych cystein regionu zawiasowego przeciwciała scFvD2Fc, za pomocą proteolitycznego łącznika peptydowego Val-Cit. Uzyskany preparat scFvD2Fc-vcMMAE posiadał cztery cząsteczki związku cytotoksycznego przyłączone do jednej cząsteczki przeciwciała i charakteryzował się wysoką homogennością, co zostało pokazane przy użyciu metody wysokorozdzielczej spektrometrii mas. scFvD2Fc-vcMMAE wykazał silne właściwości antyproliferacyjne i cytotoksyczne wobec komórek raka płuca DMS114 i NCI-H1581 oraz FGFR1-pozytywnych komórek modelowych U2OS-R1 *in vitro*, charakteryzując się wartościami EC50 kolejno: 53 nM, 33 nM i 17 nM. Wpływ scFvD2Fc-vcMMAE na przeżywalność i proliferację komórek U2OS był bardzo niski, potwierdzając jego wysoką specyficzność. Ponadto, wstępne badania toksyczności scFvD2Fc-vcMMAE przeprowadzone na modelu zwierzęcym wykazały dobrą tolerancję otrzymanego preparatu *in vivo*.

Przedstawione wyniki pokazują, że scFvD2Fc posiada wszystkie niezbędne właściwości przeciwciała kierującego i może stanowić skuteczny system specyficznego dostarczania związków cytotoksycznych do komórek raka płuca, charakteryzujących się nadprodukcją białka FGFR1.