

Magdalena Lipok

## Selekcja i optymalizacja peptydowych antagonistów oddziaływania FGF1-FGFR1

### Streszczenie

Receptor czynnika wzrostu fibroblastów jeden (FGFR1; ang. *fibroblast growth factor receptor 1*) jest białkiem zaangażowanym w aktywację kluczowych szlaków sygnałnych. Aktywacja receptora możliwa jest poprzez jego oddziaływanie z ligandami. Jednym z ligandów oddziałujących z FGFR1 jest czynnik wzrostu fibroblastów jeden (FGF1; ang. *fibroblast growth factor 1*). Związanie liganda do receptora powoduje aktywację szlaków sygnałnych wpływających na proliferację, angiogenezę oraz różnicowanie komórek. Zaburzenia naturalnej aktywności FGFR1 są kluczowym elementem rozwoju wielu typów nowotworów. Do najczęściej występujących aberracji receptora można zaliczyć jego nadmierną amplifikację na powierzchni komórki, mutacje punktowe, czy fuzje chromosomowe z innymi białkami. Zaburzenia związane z nieprawidłową aktywnością receptora FGFR1 spotykane są najczęściej w nowotworach płuc i piersi.

Zahamowanie aktywacji FGFR1, jest jedną z metod wykorzystywanych w terapiach wycelowanych w nowotwory FGFR1 - zależne. Do dnia dzisiejszego FDA pozytywnie zaopiniowała dwa leki skierowane na FGFR, które mogą zostać wykorzystane w terapii celowanej. Są to erdafitinib (*Balversa*) oraz pemigatinib (*Pemazyre*). Obie cząsteczki to selektywne inhibitory niskocząsteczkowe wycelowane w wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej FGFR. Alternatywę stanowią potencjalne leki wycelowane w zewnątrzkomórkową domenę FGFR lub jego ligandy, które zaczynają być testowane w początkowych fazach badań klinicznych. Do tej grupy można zaliczyć np. przeciwciała, których produkcja wiąże się niestety z wysokimi kosztami. Ponadto, większość przeciwciał wymaga specjalnych warunków transportu i przechowywania, co również podnosi koszty i ogranicza zakres ich stosowania. Dlatego, optymalnym rozwiązaniem wydaje się być poszukiwanie cząsteczek, które będą charakteryzować się nie tylko dobrymi parametrami kinetycznymi i trwałą strukturą, ale również niskim kosztem produkcji, łatwością transportu i niekłopotliwym przechowywaniem. Jednym z formatów potencjalnego leku, który spełnia większość tych kryteriów są peptydy. Na korzyść tych cząsteczek przemawia szybka i stosunkowo tania produkcja (w zależności od długości łańcucha i modyfikacji) oraz łatwy transport i przechowywanie (np. w formie zliofilizowanej). Dobrze zoptymalizowane peptydy charakteryzują się również znaczącą selektywnością i silnym powinowactwem do celu molekularnego.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było poszukiwanie peptydów, które oddziałują specyficznie z FGFR1 albo z FGF1, i osłabiają interakcję liganda z receptorem. Do selekcji specyficznych peptydów wykorzystano technikę *Phage Display*. Polega ona na przeprowadzeniu kilku rund selekcji, w toku których stopniowo zawęża się pulę klonów fagowych ekspresjonujących na swojej powierzchni peptydy, które mogą oddziaływać z antygenem. Do przeprowadzenia selekcji wykorzystano komercyjnie dostępną fagową

bibliotekę peptydów cyklicznych *Ph.D.<sup>TM</sup> C7C* (New England Biolabs) oraz fagową bibliotekę peptydów liniowych *Ph.D.<sup>TM</sup> 12* (New England Biolabs).

W ramach realizacji pracy doktorskiej przeprowadzono selekcje fagowych bibliotek peptydów cyklicznych i liniowych, wycelowanych w zewnątrzkomórkową domenę FGFR1 lub FGF1. Następnie wyselekcjonowane klony fagowe sprawdzono w teście ELISA aby wytypować te, które najsilniej oddziałują z antygenem. Wybrane klony fagowe zostały poddane sekwencjonowaniu w celu ustalenia kolejności reszt aminokwasowych w cząsteczkach peptydów wiążących się do celu molekularnego. Następnie, peptydy syntetyzowano na nośniku stałym zgodnie z strategią Fmoc. Peptydy wyselekcjonowane z fagowej biblioteki peptydów cyklicznych zostały poddane cyklizacji w celu utworzenia mostku disiarczkowego pomiędzy resztami cystein znajdujących się w ich strukturze. Peptydy cykliczne i liniowe oczyszczono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych i potwierdzono ich masę molową wykorzystując do tego celu spektrometrię mas. Otrzymane peptydy zostały zliofilizowane, po czym ich odpowiednie naważki rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO). W tej formie, peptydy zostały zbadane w testach komórkowych na aktywację szlaków sygnałnych zależnych od FGFR1, na linii komórkowej NIH3T3 (mysie embrionalne fibroblasty), ekspresjonującej na swojej powierzchni wszystkie typy receptorów FGF. Pozwoliło to na wytypowanie cyklicznego peptydu F8 (R°F8), który oddziałował z zewnątrzkomórkową domeną FGFR1 i osłabiał oddziaływanie liganda z receptorem. Następnie peptyd F8 w formie cyklicznej i liniowej poddano testom proliferacyjnym przeprowadzonym na linii komórkowej BAF/3 FGFR1c (IL-3-zależna mysia krwiotwórcza linia komórkowa) - nadekspresjonującej na swojej powierzchni FGFR1 izoformę IIIc, oraz na linii komórkowej BAF/3, która nie wykazuje ekspresji żadnego z receptorów FGF. Wyniki testów proliferacyjnych przeprowadzonych na linii komórkowej BAF/3 FGFR1c potwierdziły, że cykliczny peptyd R°F8 zmniejsza żywotność komórek, wraz z wzrastającym stężeniem (1-80  $\mu$ M). Ponadto, eksperymenty na linii komórkowej BAF/3 wykazały, że cykliczny peptyd R°F8 oddziałuje specyficznie z FGFR1c. Należy podkreślić, że rezultaty testów cytotoksyczności peptydów przeprowadzone na linii komórkowej BAF/3 FGFR1c dowiodły, że cykliczny peptyd R°F8 nie jest toksyczny dla komórek w badanym zakresie stężeń, a zaobserwowany spadek żywotności komórek wynika ze zdolności R°F8 do hamowania interakcji FGF1-FGFR1. Wyniki testów proliferacyjnych przeprowadzonych na linii komórkowej BAF/3 FGFR1c potwierdziły także, że cykliczna forma peptydu R°F8 jest niezbędna, aby wykazywał on pożądaną aktywność biologiczną.

Podsumowując wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej należy stwierdzić, że screening fagowych bibliotek peptydów cyklicznych i liniowych wobec FGFR1 i FGF1, pozwolił na wyselekcjonowanie cyklicznego peptydu R°F8, specyficznego wobec FGFR1, który osłabia oddziaływanie tego receptora z ligandem. Warto podkreślić, że wyselekcjonowany peptyd R°F8 jest pierwszym peptydem cyklicznym opisanym w literaturze, który działa jako antagonist oddziaływania FGF1-FGFR1. Potwierdzono też, że cykliczna konformacja peptydu jest niezbędna do zachowania pożądaney aktywności biologicznej.