

Streszczenie

Choroby nowotworowe są drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. Mimo ciągłego postępu w medycynie, wciąż nie mamy w pełni skutecznej terapii przeciwnowotworowej. Dotychczas stosowane chemioterapeutyki niskocząsteczkowe wykazują wysoką toksyczność ogólnoustrojową i niezadowalające efekty terapeutyczne. Dlatego coraz większym zainteresowaniem cieszą się strategie zwiększające specyficzność działania leków poprzez, na przykład, wykorzystanie jako nośników cząsteczek kierujących, które wybiórczo rozpoznają cel molekularny na powierzchni komórek nowotworowych. Takie podejście umożliwi zastosowanie dużo silniejszych toksyn, gdyż dostarczane są one wprost do komórek nowotworowych, z pominięciem tkanek zdrowych.

Najpowszechniej stosowanymi cząsteczkami kierującymi są przeciwciała monoklonalne, które po sprzężeniu z toksynami tworzą koniugaty przeciwciało-lek (ang. *Antibody-Drug Conjugates, ADCs*). Dotychczas dopuszczonych do stosowania u pacjentów zostało dziewięć preparatów ADC. Pomimo zalet, takich jak wysokie powinowactwo do celu molekularnego, stabilność i długi czas przebywania w organizmie, przeciwciała monoklonalne posiadają również wady. Między innymi możliwość stymulacji odpowiedzi immunologicznej czy duży rozmiar powodujący nieoptymalną penetrację litych guzów nowotworowych. Dlatego poszukuje się nowych alternatywnych klas cząsteczek kierujących. W spektrum zainteresowania grup badawczych znajdują się takie cząsteczki, jak affibody, aptamery, DARPiny, inhibitorowe węzły cysteinowe (ang. *knottins*) czy centryny. Do tej grupy należą również ligandy receptorów, w tym czynniki wzrostu fibroblastów (FGF), które są obiektem badań prowadzonych w naszej grupie od ponad 20 lat.

Do rodziny FGF należy czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2). Posiada on wysokie powinowactwo do receptora 1 czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR1), białka transbłonowego nadprodukowanego w wielu typach komórek nowotworowych, w tym płuc, piersi, pęcherza moczowego, prostaty, trzustki, szpiczaku mnogim i wielu rodzajach mięsaków. We wcześniejszych badaniach pokazaliśmy, że FGF2 po kowalentnym połączeniu z silną cytotoksyną - monometrylo aurystatyną E (MMAE) - wykazuje wysoką toksyczność w stosunku do komórek nowotworowych nadprodukujących FGFR1 (EC_{50} na poziomie nanomolowym), ale jest praktycznie nietoksyczny w stosunku do komórek prawidłowych, o niskim poziomie tego receptora. Wskazuje to, że FGF2 może być zastosowany jako cząsteczka kierująca i stanowi ciekawą alternatywę do przeciwciał monoklonalnych. Obserwacja ta stanowi dobry punkt wyjścia dla dalszych prac nad tworzeniem terapii skierowanych przeciw nowotworom nadprodukującym FGFR1.

W moich badaniach opracowałem i scharakteryzowałem szereg koniugatów. Pierwsza grupa koniugatów oparta o FGF2 zawierała dwie cząsteczki MMAE przyłączone do naturalnie występujących w białku reszt cysteinylowych. Aby zwiększyć obciążenie cząsteczki kierującej cytotoksykiem, do sekwencji dzikiej formy FGF2 została wprowadzona dodatkowa, wysoce reaktywna reszta cysteinylowa o sekwencji KCK, obecna w linkerze dodanym na koniec N albo

na koniec C białka. Dzięki temu, możliwa była koniugacja trzech cząsteczek cytotoksyku do jednej cząsteczki kierującej. W toku prowadzonych prac otrzymałem pięć koniugatów FGF2-MMAE, charakteryzujących się: czystością przekraczającą 95%, niezaburzoną strukturą trzeciorzędową, zachowanym wysokim powinowactwem do FGFR1 oraz wysoką specyficznością i toksycznością (EC_{50} na poziomie nanomolowym) wobec komórek nadprodukujących receptor 1 FGF. Wyniki prac zostały opublikowane w 2017 roku w czasopiśmie *ACS Omega* oraz były przedmiotem zgłoszenia patentowego.

Drugim etapem rozwoju koniugatów FGF2 było zwiększenie ich hydrofilowości i promienia hydrodynamicznego, w celu wydłużenia cyrkulacji w organizmie. Zastosowanie hydrofilowej pochodnej aurystatyny (aurystatyny Y, AY) oraz jej PEGyloowanych pochodnych zaowocowało zwiększeniem toksyczności koniugatów FGF2 wobec komórek FGFR1-dodatnich, redukcją niespecyficznej toksyczności oraz zwiększeniem promienia hydrodynamicznego do wartości pozwalającej zredukować szybkość usuwania koniugatu z organizmu w procesie filtracji kłębuszkowej. Efektem pracy było otrzymanie trzech PEGyloowanych pochodnych aurystatyny Y i czterech koniugatów FGF2-AY. Wszystkie koniugaty charakteryzowały się wysoką czystością, brakiem tendencji do agregacji, niezaburzonym powinowactwem do receptora, zwiększoną toksycznością względem komórek nowotworowych FGFR1-pozytywnych, a zredukowaną względem komórek FGFR1-negatywnych oraz otrzymano koniugat o zwiększonym promieniu hydrodynamicznym (~60 kDa), pozwalającym przekroczyć próg filtracji kłębuszkowej. Wyniki prac zostały opublikowane w 2020 roku w czasopiśmie *Molecular Pharmaceutics* i międzynarodowym zgłoszeniu patentowym.

Najbardziej zaawansowany koniugat oparty o FGF2 posiadał dwa cytotoksyki różniące się mechanizmem działania. Pierwszym cytotoksykiem była cząsteczka MMAE, której mechanizm działania polega na inhibicji polimeryzacji mikrotubul (używana wcześniej). MMAE to hydrofobowy oligopeptyd, posiadający zdolność pasywnego przenikania przez błony biologiczne. Drugą toksyną był inhibitor polimerazy II i III RNA - amanityna α , hydrofilowy oktapeptyd bicykliczny, który nie przenika pasywnie przez błony biologiczne, ale nie jest również substratem dla transporterów ABC. Zastosowanie dwóch cytotoksyków o różnym mechanizmie działania, przenikalności przez błony biologiczne i podatności na aktywne wypompowywanie z komórki, znacząco zwiększa specyficzną toksyczność koniugatu oraz może być użyteczne w leczeniu heterogennych guzów nowotworowych i wykazywać większą skuteczność w stosunku do komórek nowotworowych o dużym potencjale do nabywania lekooporności. Efektem prowadzonych prac było opracowanie wydajnej metody otrzymywania koniugatów posiadających dwa różne cytotoksyki. Otrzymany koniugat zachował wszystkie biofizyczne i biologiczne funkcje charakterystyczne dla FGF2 oraz wykazywał znacznie zwiększoną cytotoksyczność, szczególnie względem komórek nowotworowych o umiarkowanej nadekspresji FGFR1. Wyniki tej części prac zostały opublikowane w 2019 roku w czasopiśmie *Molecular Pharmaceutics*.