

Julia Chudzian

Fragmenty przeciwciał specyficzne wobec fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF1) oraz jego receptora, FGFR1

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Inżynierii Białka
pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka Otlewskiego

Wrocław 2020

Streszczenie

Ukierunkowana terapia przeciwnowotworowa, wykorzystująca cząsteczki specyficznie rozpoznające cele molekularne charakterystyczne dla zmienionych komórek, stanowi dynamicznie rozwijające się podejście lecznicze alternatywne dla chemioterapii cytotoksycznej. Zastosowanie terapii celowanej umożliwia zarówno wzrost skuteczności, jak i znaczne obniżenie skutków ubocznych leczenia. Aktualne doniesienia naukowe wskazują, że do grupy białek zaangażowanych w procesy nowotworzenia należą fibroblastyczne czynniki wzrostu (FGF) oraz ich receptory (FGFR). Wykazano, że oddziaływanie FGF-FGFR może stanowić istotny cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej. W niniejszej pracy skupiono się na otrzymaniu i scharakteryzowaniu ligandów białkowych w różnych formatach, wiążących FGF1 bądź FGFR1, zdolnych do osłabiania lub blokowania oddziaływania FGF-FGFR.

W pierwszym etapie, w celu otrzymania fragmentów przeciwciał wiążących FGF1, przeprowadzono selekcję z użyciem techniki prezentacji białek na powierzchni fagów (*phage display*) z bibliotek przeciwciałowych Tomlinson I i J. Otrzymane jednołańcuchowe fragmenty zmienne przeciwciał (scFv) wstępnie analizowano z użyciem testu immunoenzymatycznego (ELISA) i interferometrii biowarstwowej (BLI), a następnie wybrane białka poddano nadprodukcji w systemie bakteryjnym i oczyszczaniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa. Siedem uzyskanych fragmentów scFv szczegółowo scharakteryzowano pod kątem specyficzności wobec antygeny docelowego, wykorzystując metody ELISA, magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), a także BLI oraz określając parametry kinetyczne wiązania do FGF1. Wykazano, że wybrane scFv charakteryzują się specyficznością oraz wysokim powinowactwem wobec FGF1, o czym świadczą niskie wartości stałych dysocjacji.

W kolejnym kroku trzy opracowane cząsteczki scFv przeformatowano do biwalentnych scFv-Fc. Białka te, po nadprodukcji w systemie ssaczym i oczyszczaniu, poddano charakterystyce oraz wyznaczono ich parametry kinetyczne. Za pomocą pomiarów metodą BLI potwierdzono, że

zmiana formatu pozytywnie wpłynęła na właściwości opracowanych przeciwciał. W ostatniej części tego etapu pracy przeprowadzono analizę aktywności biologicznej uzyskanych fragmentów przeciwciał, wykorzystując linie komórkowe, charakteryzujące się nadprodukcją białka FGFR1 na swojej powierzchni. Dowiedziono, że cztery scFv – scFvC9, scFvD2, scFvC1 oraz scFvG4, posiadają potencjał do efektywnego blokowania zależnej od FGF1 aktywacji FGFR1 w komórkach mysich fibroblastów NIH/3T3, jak również ludzkiego kostniakomięsa U2OS, stabilnie transfekowanych *FGFR1* (U2OSR1). Eksperymenty proliferacyjne przeprowadzone na liniach NIH/3T3 oraz ludzkiego kostniakomięsa G-292 nadprodukującego FGFR1 wykazały, że scFvD2, scFvC1 i scFvE5, a także scFvD2-Fc, scFvC1-Fc oraz scFvG4-Fc charakteryzują się zdolnością do wydajnego blokowania mitogennej aktywności FGF1.

Drugi etap pracy zakładał opracowanie, otrzymanie i analizę wiązania peptydów rozpoznających FGFR1 w fuzji z fragmentem Fc – cząsteczek *peptibodies* – oraz badanie aktywności *in vitro* uzyskanych białek. Na podstawie danych literaturowych i struktur krystalicznych, w sekwencji aminokwasowej białka FGF2 wytypowano rejony odpowiedzialne za oddziaływanie z receptorem i zaprojektowano białka fuzyjne *peptibodies* o potencjalnej zdolności wiązania do FGFR1. Białka rekombinowane nadprodukowano w systemie ssaczym, oczyszczono poprzez chromatografię powinowactwa i poddano charakterystyce. Następnie otrzymane *peptibodies* przeanalizowano pod kątem zdolności do zahamowania aktywacji szlaków sygnałowych zależnych od FGF1 w komórkach linii U2OSR1 i wykazano, że *peptibody* R wydajnie blokuje aktywację FGFR1. W ostatnim kroku, za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, oceniono wiązanie oraz kolokalizację opracowanych *peptibodies* z FGFR1 obecnym na powierzchni komórek linii U2OSR1 oraz U2OSR1-SBP, nadprodukujących FGFR1 znakowany peptydem wiążącym streptawidynę (SBP). Potwierdzono, że opracowane *peptibodies* wiążą się specyficznym do zadanego antygeny.

Przedstawione wyniki wskazują, że otrzymane w ramach pracy fragmenty przeciwciał oraz białka w formacie *peptibodies* posiadają potencjał do zastosowania jako cząsteczki *ligand trap*, a także cząsteczki kierujące w terapiach przeciwnowotworowych.