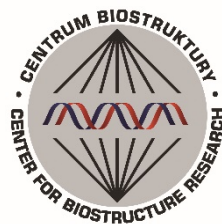


Warszawski Uniwersytet Medyczny Centrum Biostruktury



Paulina Stańczak (Grygielewicz)

Opracowywanie i badanie aktywności biologicznej drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz z rodziny receptorowych czynników wzrostu fibroblastów (FGFR) jako innowacyjnych leków przeciwnowotworowych. Badanie mechanizmów oporności na inhibitory kinaz FGFR w oparciu o opracowane modele komórkowe.

Praca doktorska

Praca wykonana pod kierunkiem naukowym

Prof. dr hab. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek oraz

Dr Karoliny Dzwonek

w Studium Medycyny Molekularnej

Warszawa 2017

1 Streszczenia

1.1 Streszczenie w języku polskim

Proces rozwoju leku można podzielić na trzy główne etapy: odkrycie cząsteczki, badania przedkliniczne i badania kliniczne¹. Zaledwie 1 spośród 10 000 badanych związków zostaje zatwierdzony do stosowania u pacjentów, a proces rozwoju nowego leku zajmuje średnio od 8 do 12 lat². Właściwy dobór modeli w badaniach przedklinicznych, a także trafna interpretacja danych są niezwykle ważne i umożliwiają zwiększenie prawdopodobieństwa powodzenia przy wyborze kandydatów na leki³. W niniejszej rozprawie doktorskiej opisano proces rozwoju nowego inhibitora kinaz z rodziny FGFR – CPL-8, jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego. Opracowany związek jest aktywnym inhibitorem FGFR o niskich, nanomolowych wartościach IC_{50} w testach enzymatycznych z użyciem rekombinowanych białek: IC_{50} dla FGFR1 – 4 nM; FGFR2 – 1,5 nM; FGFR3 – 10,6 nM. CPL-8 charakteryzuje się również wysoką selektywnością wobec pozostałych testowanych kinaz. Wykazano, że związek hamuje proliferację komórek zależnych od szlaku FGFR zarówno z dzikim typem receptora (H1581, SNU-16, Cal-120), jak i z mutacją punktową FGFR (AN3CA, UM-UC-14) bądź fuzją (RT-112, Ba/F3 TEL-FGFR1). Ponadto, w badanych liniach komórkowych obserwowano zahamowanie fosforylacji ERK pod wpływem CPL-8, świadczące o efektywnym zablokowaniu szlaku FGFR (EC_{50} równe 8,6 nM; 3,6 nM; 14,5 nM oraz 13,1 nM dla kolejno: H1581, SNU-16, UM-UC-14 oraz RT-112). Stosując komórki linii nowotworowych niezależne od ścieżki FGFR (H460, LoVo) wykazano, że CPL-8 nie wpływa na ich żywotność (H460 – IC_{50} 24,6 μ M), co oznacza, że związek nie wykazuje nieswoistej cytotoksyczności. Przeprowadzone badania *in vivo* w mysim modelu ksenograftów z podskórnymi wszczepionymi komórkami linii H1581 wykazały zahamowanie wzrostu guza o 92% po podaniu CPL-8 w dawce 40 mg/kg (BID, p.o.). Potwierdzono również, że związek obniża poziom pERK w samym guzie.

Ponadto opracowano nowe modele komórkowe, które pozwoliły określić potencjalne mechanizmy oporności mogące wystąpić u pacjentów leczonych selektywnymi inhibitorami kinaz FGFR. W wyniku długotrwałej ekspozycji komórek raka żołądka SNU-16 na zwiększające się stężenia komercyjnie dostępnych inhibitorów FGFR: AZD4547, BGJ398 oraz PD173074, wyprowadzono linie odporne (SNU-16R). Wykazano, że wywołana oporność związana była z przejściem epitelialno-mezenchymalnym (EMT), zjawiskiem, które powoduje oporność na różnego typu inhibitory kinaz⁴⁻⁸. W wyprowadzonych, opornych liniach procesowi EMT towarzyszyła utrata ekspresji FGFR2 i innych receptorów o aktywności kinazy

tyrozynowej, a także znacząca aktywacja niektórych białek, m. in. AKT, ERK i STAT3. Ponadto, ekspresja TGF- β 1, znanego induktora EMT i zależnego od niego białka SMAD2 były zwiększone w komórkach opornych. Wykazano, że farmakologiczne hamowanie przekaźnictwa przez TGF- β , poprzez inhibicję receptora TGF- β I (T β RI), nie było wystarczające, aby odwrócić zmiany EMT. Dodatkowo, zbadano wpływ szeregu leków przeciwnowotworowych na żywotność SNU-16R i wykazano, że mubritinib (inhibitor HER2) oraz AUY922 (inhibitor HSP90) skutecznie hamowały proliferację komórek opornych. Wyniki te wskazują, że inhibitory HER2 oraz HSP90 mogą potencjalnie stanowić alternatywną strategię terapeutyczną u pacjentów, u których doszło do pojawienia się oporności zależnej od EMT po leczeniu selektywnymi inhibitorami FGFR.

1.2 Streszczenie w języku angielskim

The drug discovery process can be divided into three main phases: the discovery of the molecule, pre-clinical and clinical studies¹. It is known that only 1 out of 10 000 compounds tested in preclinical studies will be approved for the treatment of patients. The process from discovery to the market takes from 8 to 12 years². The appropriate selection of models for preclinical studies, as well as the precise interpretation of data are extremely important and can increase the probability of success in selecting drug candidates for the future development³. The present doctoral thesis describes the process of developing a new inhibitor of FGFR kinases – CPL-8, as a potential anti-cancer drug. Newly discovered compound is an active inhibitor of FGFRs with a low nanomolar IC₅₀ values as assessed using enzymatic assays with recombinant kinases (IC₅₀ for FGFR1 – 4 nM; FGFR2 – 1,5 nM; FGFR3 – 10,6 nM) with high selectivity towards other tested enzymes. CPL-8 inhibits the proliferation of cell lines with the wild type FGFR receptor (H1581, SNU-16, Cal-120), as well as with point mutation (AN3CA, UM-CA-14) and gene fusions (RT-112, BaF3 TEL-FGFR1). In addition, it was demonstrated that the compound inhibits phosphorylation of ERK in the tested cell lines (EC₅₀ 8,6 nM; 3,6 nM; 14,5 nM and 13,1 nM for H1581, SNU-16, UM-UC-14 and RT-112, respectively). Using cell lines independent from the FGFR signaling pathway (H460, LoVo) it has been shown that CPL-8 does not affect their viability (H460 – IC₅₀ 24,6 μ M), which means that the compound does not exhibit nonspecific cytotoxicity. In the *in vivo* study using mouse xenografts model with subcutaneously inoculated H1581 cells CPL-8, in the dose of 40 mg/kg (p.o., BID) inhibited tumor growth by 92% and decreased the phosphorylation of ERK kinase in the tumor.

In addition, new models of induced drug resistance to commercially available FGFR inhibitors: AZD4547, BGJ398, and PD173074 were developed. The established models allowed to determine the potential mechanisms of drug resistance that may occur in patients treated with selective inhibitors of FGFR kinases. Long-term exposure to increasing concentrations of selected inhibitors induced resistance driven by epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a phenomenon that has previously been shown to be involved in resistance to other kinase inhibitors⁴⁻⁸. Resistant cells (SNU-16R) displayed loss of FGFR2 expression and other tyrosine kinase receptors concurrent with activation of downstream signaling proteins (AKT, ERK, STAT3) and upregulation of TGF- β level. However, treatment of parental SNU-16 cells with TGF- β 1 did not evoke EMT, and pharmacological inhibition of TGF- β receptor I was not sufficient to reverse EMT changes in the resistant cells. Finally, the effect of a number of anticancer drugs on the viability of resistant cells was examined. It was shown that SNU-16R cell lines were sensitive to HER2 inhibitor – mubritinib and the HSP90 inhibitor AUY922 suggesting that these drugs may comprise an alternative therapeutic approach for treating cancer patients with EMT-mediated resistance to FGFR inhibitors.