

# Streszczenie

Celowana terapia radionuklidowa (*targeted radionuclide therapy*, TRT), zaliczana do technik radioterapii wewnętrznej, jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin we współczesnej onkologii. W przeciwieństwie do chemioterapii i radioterapii zewnętrznej, TRT jest metodą wysoce selektywną wobec konkretnego celu lub markera molekularnego (głównie receptora, enzymu lub innej struktury białkowej), który jest ściśle specyficzny dla komórek nowotworowych lub określonego procesu patologicznego. Celowana terapia radionuklidowa bazuje na zastosowaniu radiofarmaceutyków, to jest znakowanych promieniotwórczo cząsteczek zdolnych do wiązania się z wysokim powinowactwem jedynie do preferencyjnych (swoistych) celów molekularnych. Tym samym, zaprojektowanie i uzyskanie radiofarmaceutyku zdolnego do osiągnięcia zamierzonego celu wydaje się być istotą powodzenia celowanej terapii radionuklidowej.

Obiecującym potencjałem użyteczności w przeciwnowotworowej strategii terapeutycznej cechuje się dobrze znany receptor neurokininy 1 (receptor NK1, NK1R). Jest to receptor o ograniczonej abundancji w organizmie ludzkim, występujący głównie w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, swoisty dla endogennego neuropeptydu Substancja P (SP) o działaniu mitotycznym. Do tej pory opracowano już pierwsze wysoce selektywne ligandy receptora NK1 o znaczeniu klinicznym, w tym także pierwszy radiofarmaceutyk stosowany w eksperymentalnej TRT NK1R-pozytywnego glejaka wielopostaciowego, niemniej wciąż istnieje potrzeba poszukiwania nowych wysoce efektywnych radiofarmaceutyków do celów onkologicznych.

W prezentowanej rozprawie przedstawiłem sposób w jaki otrzymałem potencjalne radiofarmaceutyki dedykowane do celowanej diagnostyki i terapii patologii NK1R-dodatnich. Podczas realizacji tego celu skupiłem swoją uwagę na dwóch grupach antagonistów NK1R, peptydowych antagonistach receptora cechujących się pełną stabilnością *in vivo*, mianowicie SPANTIDE I oraz SPANTIDE I (5-11), oraz wysoce specyficznych i wysoce selektywnych antagonistach niepeptydowych, mianowicie L732,138 i aprepitancie. W przypadku aprepitantu, zaproponowałem dwie metody modyfikacji cząsteczki otrzymując dwie serie pochodnych aprepitantu. Seria pochodnych L732,138 zsyntezowana została w ramach wspólnego projektu w Zakładzie Neuropeptydów Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Dwa peptydomimetyki SPANTIDE I zakupiłem w formie nieacetylowanej na N-końcu. Wszystkie związki poddałem funkcjonalizacji

umożliwiającej znakowanie promieniotwórcze powszechnie dostępnymi radionuklidami pary teranostycznej,  $^{68}\text{Ga}$  i  $^{177}\text{Lu}$ , w sposób pozwalający na zachowanie celowości do NK1R.

W kolejnym kroku otrzymałem pary  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -radiokoniugatów dwóch peptydomimetyków SPANTIDE I, jednej serii pochodnych L732,138 oraz obydwu serii pochodnych aprepitantu, dla których wykonałem badania właściwości fizykochemicznych pod kątem użyteczności otrzymanych radiokoniugatów do celów TRT.

Następnie wykonałem badania charakterystyki wiązania (powinowactwa receptorowego i pojemności wiązania radiokoniugatu do celu molekularnego) wszystkich otrzymanych  $^{177}\text{Lu}$ -radiokoniugatów pochodnych L732,138 i aprepitantu na komórkowym modelu NK1R-pozytywnym. Dla  $^{177}\text{Lu}$ -radiokoniugatów opartych na peptydomimetykach SPANTIDE I nie udało mi się zaobserwować bezpośredniego wiązania radiokoniugatów do żadnej z analizowanych linii komórkowych. Dodatkowo przeprowadziłem te same badania *in vitro* dla  $^{177}\text{Lu}$ -radiokoniugatu opartego na pochodnej SP obecnie stosowanej w medycynie nuklearnej, w celu oceny konkurencyjności otrzymanych przeze mnie radiokoniugatów.

Podsumowując, w tej rozprawie zademonstrowałem sposoby otrzymywania oraz możliwości nowych radiokoniugatów o wysokiej specyficzności wobec linii komórkowych z nadekspresją NK1R oraz ich przewagę we właściwościach wiązania receptorowego nad radiofarmaceutykiem pochodnej SP. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań są pierwszym porównaniem dwóch grup antagonistów NK1R ze wskazaniem kierunku dla dalszych badań w radiofarmacji oraz precyzują nową użyteczność aprepitantu do poszukiwania nowych terapii onkologicznych niepeptydowymi antagonistami receptora NK1.

# Abstract

Targeted radionuclide therapy (TRT), classified as a technique of internal radiotherapy, is one of the fastest growing fields in contemporary oncology. Unlike chemotherapy and external radiotherapy, TRT is a method that is highly selective for a specified target or molecular marker (mainly receptor, enzyme or other protein) that is strictly specific to cancer cells or a particular pathological process. Targeted radionuclide therapy is based on the use of radiopharmaceuticals, i.e. radiolabelled molecules capable of binding with high affinity only to preferential (specific) molecular targets. Thus, designing and obtaining a radiopharmaceutical capable of achieving the intended goal seems to be the essence of the success of targeted radionuclide therapy.

The well-known neurokinin 1 receptor (NK1 receptor, NK1R) has promising potential for utility in an antitumor therapeutic strategy. It is a receptor with limited abundance in the human body, found mainly in the central and peripheral nervous system, specific for the endogenous neuropeptide Substance P (SP) with a mitotic effect. The first highly selective NK1 receptor ligands of clinical significance have already been developed, including the first radiopharmaceutical used in experimental TRT NK1R-positive glioblastoma multiforme, but there is still a need to search for new highly effective radiopharmaceuticals for oncological purposes.

In the following essay, I presented the way in which I have received potential radiopharmaceuticals dedicated to the targeted diagnosis and therapy of NK1R-positive pathologies. In pursuit of this goal, I have focused my attention on two groups of NK1R antagonists, peptide antagonists of receptor with full *in vivo* stability, namely SPANTIDE I and SPANTIDE I (5-11), and highly specific and highly selective non-peptide antagonists, namely L732,138 and aprepitant. In the case of aprepitant, I have proposed two methods of molecule modification, resulting in two series of aprepitant derivatives. The series of L732,138 derivatives was synthesized as part of a joint project at the Department of Neuropeptides of the Mossakowski Medical Research Institute of the Polish Academy of Sciences. Two SPANTIDE I peptidomimetics were purchased non-acetylated at the *N*-terminus. I have functionalized all compounds to enable radiolabeling with the widely available theranostic pair radionuclides  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{177}\text{Lu}$ , in a way that allows the NK1R targetability to be maintained.

In the next step, I have obtained pairs of  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -radioconjugates of two SPANTIDE I peptidomimetics, one series of L732,138 derivatives, and both series of aprepitant derivatives, for which I have determined physicochemical properties for the usefulness of the obtained radioconjugates for TRT purposes.

Then, I have performed binding characterization studies (receptor affinity and radioconjugate binding capacity to the molecular target) of all obtained L732,138 and aprepitant  $^{177}\text{Lu}$ -radioconjugates on the NK1R-positive cellular model. For  $^{177}\text{Lu}$ -radioconjugates based on SPANTIDE I peptidomimetics, I was unable to observe direct binding of the radioconjugates to any of the analyzed cell lines. In addition, I have conducted the same *in vitro* studies for a  $^{177}\text{Lu}$ -radioconjugate based on a derivative of SP currently used in nuclear medicine to evaluate the competitiveness of the radioconjugates I obtained.

In conclusion, in this dissertation I demonstrated the methods of obtaining and possibilities of new radioconjugates with high specificity for NK1R overexpressing cell lines and their advantage in receptor binding properties over SP derivative radiopharmaceutical. The results of my research are the first comparison of two groups of NK1R antagonists with an indication of the direction for further research in radiopharmaceutical field and they specify the new usefulness of aprepitant in the search for new oncological therapies with non-peptide NK1 receptor antagonists.