

## Streszczenie

Rozwój współczesnej medycyny nie byłby możliwy bez opracowania odpowiednich procedur obrazowania medycznego pozwalającego na dokładną wizualizację wewnętrznych struktur i dostarczania kluczowych informacji dotyczących procesu leczenia. W szerokiej gamie strukturalnych (morfologicznych) metod obrazowych czynnościowe procedury radioizotopowe medycyny nuklearnej wydają się odgrywać szczególną, i wciąż rozwojową, rolę ze względu na możliwość wizualizowania i mierzenia procesów biochemicznych *in vivo* na poziomie komórkowym i molekularnym w czasie rzeczywistym w najwcześniejszych stadiach choroby, przed pojawieniem się zmian strukturalnych czy objawów morfologicznych. Narzędzia medycyny nuklearnej – radiofarmaceutyki diagnostyczne i terapeutyczne – jako związki wysoce selektywne i specyficzne względem danego celu lub markera molekularnego realizują nie tylko koncepcję obrazowania, ale również wpisują się w koncept leczenia spersonalizowanego i ideę tzw. *magic bullet*, tj. związków bądź leków działających swoiście na zmienione chorobowo komórki bez szkody dla pozostałych narządów. Poszukiwanie i opracowanie nowych, peptydowych i niepeptydowych, radiofarmaceutyków receptorowych opartych na inhibitorach kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1 jest przedmiotem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Wspomniany powyżej układ VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1 jest składową pro-angiogenego kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/VEGFR-2/NRP-1 zaangażowanego w proces patologicznej angiogenezy nowotworowej tj. procesu wytwarzania nowych naczyń w obrębie powstającego guza nowotworowego niezbędnych dla jego wzrostu, rozwoju i rozprzestrzeniania się. Ponadto, nadekspresja receptora NRP-1, będącego celem molekularnym projektowanych przeze mnie związków, obserwowana jest również na powierzchni wielu typów komórek nowotworowych, stąd receptor ten może stanowić idealny cel molekularny umożliwiając precyzyjne obrazowanie i skuteczną terapię.

W ramach przeprowadzonych badań zastosowałam serię związków (inaczej biomolekuł lub wektorów) peptydowych i niepeptydowych wykazujących według danych literaturowych wysokie powinowactwo wiązania względem receptora NRP-1 i będących jednocześnie inhibitorami wspomnianego kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1. Były to: peptyd A7R (Ala<sup>1</sup>-Thr<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>-Leu<sup>4</sup>-Pro<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>), jego retro-inverso analog <sup>D</sup>R7A (<sup>D</sup>Arg<sup>1</sup>-<sup>D</sup>Pro<sup>2</sup>-<sup>D</sup>Pro<sup>3</sup>-<sup>D</sup>Leu<sup>4</sup>-<sup>D</sup>Trp<sup>5</sup>-<sup>D</sup>Thr<sup>6</sup>-<sup>D</sup>Ala<sup>7</sup>), peptydomimetyki K4R (Lys<sup>1</sup>(hArg)-Dab<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>) i KA\*AR (Lys<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup>[CH<sub>2</sub>-NH]Ala<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup> zawierający zredukowane wiązanie peptydowe [CH<sub>2</sub>-NH] oznaczone symbolem \*) oraz mała cząsteczka organiczna o symbolu EG01377 (3-((5-(4-(Aminomethyl)phenyl)-2,3-

dihydrobenzofuran)-7-sulfonamido)-thiophene-2-carbonyl)-L-arginine). Część z nich zsyntezowałam osobiście w Pracowni Peptydów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, a część zakupiłam. Otrzymane inhibitory poddałam następnie funkcjonalizacji poprzez dodanie do ich struktury łącznika i chelatora makrocyklicznego w celu umożliwienia wykonania znakowania promieniotwórczego tak otrzymanych koniugatów.

Serię siedmiu koniugatów (prekursorów radiofarmaceutycznych, DOTA-Ahx-A7R, Lys(DOTA)-A7R, DOTA-Ahx-K4R, <sup>177</sup>R7A-<sup>177</sup>Lys(DOTA), DOTA-Ahx-KA\*AR, DOTA-EG oraz DOTA-Ahx-EG) poddałam następnie procesowi znakowania promieniotwórczego w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej przy użyciu trzech radionuklidów (<sup>68</sup>Ga][Ga, <sup>44</sup>Sc][Sc i <sup>177</sup>Lu][Lu) w koncepcji par teranostycznych, a także zoptymalizowałam warunki tego procesu. Otrzymałam również serię zimnych związków odniesienia zawierających w swojej budowie w miejscu radionuklidu odpowiadający mu kation stabilnego izotopu danego metalu. Dla otrzymanych radiokoniugatów przeprowadziłam pełny profil badań *in vitro* właściwości fizykochemicznych, a dla ich zimnych związków referencyjnych badania biologiczne powinowactwa receptorowego, pod kątem określenia użyteczności otrzymanych radioinhibitorów jako radiofarmaceutyki receptorowe w celowanej terapii radionuklidowej w kontekście wczesnej diagnostyki i terapii anty-angiogennej.

Przeprowadzone badania fizykochemiczne serii 19 radiokoniugatów obejmowały badania stabilności w medium prowadzenia reakcji, w obecności nadmiarowych stężeń ligandów konkurencyjnych (tzw. *challenge experiments*) i w środowisku surowicy ludzkiej, oraz wyznaczenie parametru lipofilowości. Badania biologiczne wolnych biomolekuł (inhibitorów kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1) oraz zimnych związków odniesienia odpowiadających syntezowanym radiokoniugatom przeprowadzone zostały w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk przy użyciu metody ELISA typu kompetycyjnego i umożliwiły wyznaczenie powinowactwa receptorowego badanych związków do receptora NRP-1 względem związku konkurencyjnego.

Wszystkie otrzymane radiokoniugaty okazały się stabilne w medium prowadzenia reakcji - roztworach PBS (pH 7,4) oraz w roztworach cysteiny i histydyny. Radiokoniugaty zawierające w swojej budowie jako biomolekułę inhibitory peptydowe okazały się niestabilne w środowisku surowicy ludzkiej, natomiast całkowitą stabilność w tym medium wykazały radiokoniugaty zawierające jako inhibitor cząsteczkę EG01377. Wszystkie otrzymane radiokoniugaty charakteryzowały się niskim parametrem lipofilowości wykazując silnie hydrofilowy

charakter. Wśród inhibitorów peptydowych oraz opartych na nich zimnych związkach odniesienia wysokie powinowactwo wiązania do receptora NRP-1 wykazały jedynie związki zawierające peptyd A7R oraz peptydomimetyk K4R. Związki zawierające peptyd <sup>D</sup>R7A i peptydomimetyk KA\*AR (zarówno inhibitory jak i oparte na <sup>D</sup>R7A zimne związki odniesienia) wykazały brak powinowactwa do receptora NRP-1. Wysokie powinowactwo wiązania do receptora NRP-1 wykazał natomiast również inhibitor EG01377, a także zawierające go zimne związki odniesienia. Przedstawione wyniki badań *in vitro* fizykochemicznych i biologicznych właściwości radiopreparatów wykazały, że radiokoniugaty zawierające inhibitor EG01377 całkowicie spełniają wymagania stawiane radiofarmaceutynom i mogą być rozważane jako potencjalne diagnostyczne/terapeutyczne radiofarmaceutyki receptorowe w celowanej anty-angiogennej terapii.

Podsumowując, opisane w niniejszej pracy syntezy, przeprowadzone badania i otrzymane wyniki pozwoliły na poszerzenie wiedzy w zakresie otrzymywania i przydatności peptydowych i niepeptydowych inhibitorów kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1 oraz zastosowania ich jako wektory radiofarmaceutyków receptorowych, nakreśliły kierunek ku projektowaniu niepeptydowych (małocząsteczkowych) inhibitorów i stały się istotnym wskazaniem dla dalszych poszukiwań w tej dziedzinie.