

Załącznik 2: Autoreferat przedstawiający opis osiągnięć naukowych w języku polskim.

Projektowanie nowych potencjalnych radiofarmaceutyków receptorowych opartych na analogach peptydów wazopresyny i greliny oraz leku lapatinib

AUTOREFERAT

Dr Ewa Gniazdowska

Warszawa, wrzesień, 2014

1. Imię i Nazwisko: Ewa Gniazdowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- a) magister chemii; Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; 11.06.1974
- b) doktor nauk chemicznych; Rada Naukowa Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej;
26.10.2000

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 01.01.1983 – 30.09.2014 Instytut Chemii i Techniki Jądrowej (ICHTJ), ul.
Dorodna 16, 03-195 Warszawa
- 01.08.1974 - 31.12.1982 Instytut Badań Jądrowych (IBJ), ul. Dorodna 16, 03-195
Warszawa

Informacje wstępne

Po ukończeniu studiów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (czerwiec 1974) podjęłam pracę w Instytucie Badań Jądrowych (sierpień 1974), w Zakładzie Technologii Chemicznej, w Pracowni Technologii Wody Reaktorowej. Prace, w których wówczas uczestniczyłam, dotyczyły analizy i oczyszczania wody I obiegu chłodzenia reaktora WWER-440, a szczególnie możliwości zateżania kwasu borowego w chłodziwie (bor-10, ze względu na duży przekrój czynny na wychwyt neutronów, ok. 750 barnów, miał być stosowany jako składnik chłodziwa i używany do regulacji biegu reaktora). Prace te prowadzone były na zlecenie Energoprojektu Warszawa i związane były z planowaną (marzec 1982) budową w okolicach Żarnowca pierwszej w Polsce elektrowni jądrowej. Wyniki tych prac nie były publikowane, lecz w formie tajnych raportów wewnętrznych IBJ, a potem IChTJ, przekazywane do Energoprojektu.

W latach 1985 – 1990 przebywałam na bezpłatnym urlopie wychowawczym z tytułu opieki nad dziećmi do lat 3.

Po powrocie do pracy zawodowej kierunek mojej tematyki badawczej uległ częściowej zmianie (w 1990 roku rząd polski podjął decyzję o zaprzestaniu rozpoczętej już budowy elektrowni jądrowej). Nadal zajmowałam się metodami rozdzielczymi, szczególnie z zastosowaniem selektywnych jonitów (jestem współautorem patentu Nr 145223 „Sposób wytwarzania żelazocyjanku tytanu”), ale potencjalne zastosowanie tych badań zostało ukierunkowane na analizę i oczyszczanie wód oraz odpadów przemysłowych.

Po obronie pracy doktorskiej w 2000r. (tytuł pracy: Hydratacja oksaalkanów w roztworach wodnych) rozpoczęłam badania w dziedzinie nowo wprowadzonej do działalności statutowej IChTJ - chemii radiofarmaceutycznej. Wyniki uzyskane w tej dziedzinie stanowią moje osiągnięcie naukowe, będące podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

4. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 i późn. zm.)

Wskazanie osiągnięcia:

Projektowanie nowych potencjalnych radiofarmaceutyków receptorowych opartych na analogach peptydów wazopresyny i greliny oraz leku lapatinib

Materiałem źródłowym do opisu moich osiągnięć naukowych, będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, jest zamieszczony poniżej cykl publikacji (w których jestem „autorem do korespondencji”), składający się z 8 prac o łącznym IF równym 18,913 (MNiSW = 250).

- H1. L. Fuks, **E. Gniazdowska**, J. Mieczkowski, J. Narbutt, W. Starosta, M. Zasepa, „Structure and vibrational spectra of *fac*-Re^I(CO)₃⁺ complex with N-methyl-2-pyridinecarbothioamide”, *J. Organomet. Chem.*, **689**, 4751-4756 (2004). *IF*=2,025 (*MNiSzW* = 30)

Mój wkład pracy oceniam na 45%: współudział w zaplanowaniu i wykonaniu badań, opracowanie wyników, współudział w przygotowaniu pracy do druku.

- H2. L. Fuks, **E. Gniazdowska**, J. Mieczkowski, N. Sadlej-Sosnowska, „Structural features of tricarbonyl(N-methyl-2-pyridinecarboxamide)chloro-rhenium(I)-potential precursor of radiopharmaceuticals”, *Polyhedron* **27**, 1353-1360 (2008). *IF*=1,801 (*MNiSzW* = 30)

Mój wkład pracy oceniam na 40%: opracowanie syntezy kompleksu, przeprowadzenie krystalizacji, interpretacja wyników, przygotowanie pracy do druku.

- H3. L. Fuks, **E. Gniazdowska**, P. Koźmiński, M. Łyczko, J. Mieczkowski, J. Narbutt, „‘2+1’ tricarbonyltechnetium(I) and -rhenium(I) mixed-ligand complexes with N-methylpyridine-2-carboxamide and isocyanide or imidazole ligands - potential precursors of radiopharmaceuticals”, *Applied Radiation and Isotopes*, **68**, 90-95 (2010). *IF*=1,114 (*MNiSzW* = 25)

Mój wkład pracy oceniam na 40%: zaplanowanie i wykonanie badań, opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

- H4. P. Koźmiński, **E. Gniazdowska**, L. Fuks, S. Kowalska, „‘2+1’ tricarbonyltechnetium(I)/tricarbonylrhenium(I) mixed-ligand complexes with methyl

thiosalicylate and isocyanide ligands as potential precursors of radiopharmaceuticals”, Applied Radiation and Isotopes, **69**(2), 436-442 (2011). *IF=0,999 (MNiSzW = 25p)*

Mój wkład pracy oceniam na 50%: zaplanowanie koncepcji pracy, współudział w wykonywaniu badań, dyskusja i opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

- H5. **E. Gniazdowska**, P. Koźmiński, L. Fuks „Synthesis, radiochemistry and stability of the conjugates of technetium-99m complexes with Substance P”, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, **298**, 1171-1177 (2013). *IF=1,520 (MNiSzW = 25)*

Mój wkład pracy oceniam na 55%: zaplanowanie badań, współudział w wykonywaniu badań, dyskusja i opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

- H6. **E. Gniazdowska**, P. Koźmiński, K. Bańkowski, P. Ochman „^{99m}Tc-labeled Vasopressin Peptide as a Radiopharmaceutical for Small-Cell Lung Cancer (SCLC) Diagnosis”, Journal of Medicinal Chemistry, DOI 10.1021/jm500272r, **57**, 5986–5994 (2014). *IF=5,614 (MNiSzW = 45)*

Mój wkład pracy oceniam na 70%: sformułowanie problemu badawczego, zaplanowanie badań, główny udział w badaniach, dyskusja i opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

- H7. P. Koźmiński, **E. Gniazdowska** “Synthesis and in vitro/in vivo evaluation of novel mono- and trivalent technetium-99m labeled Ghrelin peptide complexes as potential diagnostic radiopharmaceuticals”, Nuclear Medicine and Biology, DOI 10.1016/j.nucmedbio.2014.08.012, praca w druku. *IF=2,408 (MNiSzW = 30)*

Mój wkład pracy oceniam na 55%: sformułowanie problemu badawczego, zaplanowanie badań, udział w wykonywaniu badań, dyskusja i opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

- H8. **E. Gniazdowska**, P. Koźmiński, K. Bańkowski, W. Łuniewski, L. Królicki, „Synthesis, physicochemical and biological evaluation of technetium-99m labelled lapatinib as a novel potential tumour imaging agent of Her-2 positive breast cancer”, European Journal of Medicinal Chemistry, DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.080, **87** 493-499 (2014). *IF=3,432 (MNiSzW = 40)*

Mój wkład pracy oceniam na 75%: sformułowanie problemu badawczego, zaplanowanie badań, główny udział w badaniach, dyskusja i opracowanie wyników, przygotowanie pracy do druku.

Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

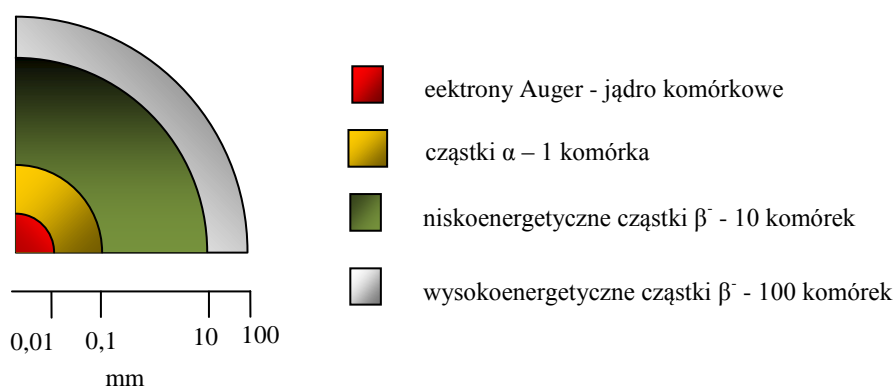
Radiofarmaceutyki są to z reguły związki koordynacyjne z kationem radionuklidu jako jonem centralnym, przyłączone do cząsteczki biologicznie czynnej. Po podaniu pacjentowi pomiar rozkładu przestrzennego intensywności emitowanego z wewnątrz organizmu promieniowania gamma umożliwia lokalizację rozmieszczenia radiofarmaceutyku w organizmie, a tym samym określanie nieprawidłowości struktur tkankowych lub zaburzeń w funkcjonowaniu badanych narządów. Metody diagnostyczne medycyny nuklearnej przedstawiają obraz badanego narządu w aspekcie czynnościowym, co umożliwia znacznie wcześniejsze wykrycie zmian chorobowych, zanim jeszcze doprowadzą one do wykrywalnych zmian morfologicznych. Pozwala to na wcześniejsze podjęcie terapii, co często decyduje o skuteczności leczenia. Radiofarmaceutyki terapeutyczne to selektywnie absorbowane przez tkankę nowotworową preparaty zawierające radionuklidy o tak dobranym zasięgu emitowanego promieniowania korpuskularnego, aby praktycznie cała energia promieniowania była pochłaniana przez chorobowo zmienioną tkankę, a szkodliwy wpływ promieniowania na tkankę zdrową (cały organizm) był niewielki. Obecnie najważniejszą grupę radiofarmaceutyków stanowią tzw. radiofarmaceutyki receptorowe. W związkach tych trwałe i inertny kompleks diagnostycznego lub terapeutycznego radionuklidu związany jest poprzez dwufunkcyjny łącznik (reagent BFCA, Bi-Functional Coupling Agent) z wybraną cząsteczką biologicznie czynną (np. peptydem, przeciwciałem lub jego fragmentem). Odpowiednio dobrana do danego receptora biomolekuła, na zasadzie rozpoznania molekularnego, pełni rolę wektora, dzięki któremu radiofarmaceutyk dociera i gromadzi się wybiórczo w określonych tkankach, a tym samym diagnozuje lub leczy chorobowo zmienione narządy. Jednocześnie podawana dawka diagnostycznego lub terapeutycznego radiofarmaceutyku jest tak mała, że nie ma ona żadnego znaczenia dla organizmu, nie zakłóca jego normalnego funkcjonowania ani nie prowadzi do zaburzeń czynnościowych danego narządu.

Ze względu na wciąż rosnące na świecie zainteresowanie chemią radiofarmaceutyczną można powiedzieć, że obecnie jest to najbardziej perspektywiczny kierunek rozwoju współczesnej radiochemii stosowanej.

Projektowanie radiofarmaceutyków

Główny podział radiofarmaceutyków ze względu na ich funkcje to radiofarmaceutyki diagnostyczne i terapeutyczne. Dlatego też pierwszym krokiem przy projektowaniu radiofarmaceutyku jest dobór radionuklidu: diagnostycznego lub terapeutycznego.

Obecnie w diagnostycznych metodach medycyny nuklearnej wykorzystywana jest tomografia emisyjna pojedynczych fotonów, powszechnie nazywana SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), wykorzystująca radionuklidy emitujące promieniowanie γ , oraz pozytonowa tomografia emisyjna – PET (Positron Emission Tomography), wykorzystująca radionuklidy emitujące cząstki β^+ (np. C-11, O-15, F-18). Najbardziej rozpowszechnione w metodzie SPECT są związki technetu-99m ze względu na jego praktycznie idealną charakterystykę jądrową (czas połowicznego rozpadu 6 godzin, energia 140 keV), możliwość podania jednorazowo bezpiecznej dawki rzędu 740÷1110 MBq oraz bardzo bogatą chemię koordynacyjną. Najbardziej popularnymi radiofarmaceutykami wykorzystywanymi w technice PET są [^{18}F]fluoro-2-deoksyglukoza ([^{18}F]FDG) i znakowane Ga-68 peptydy (np. somatostatyna, substancja P). Zaletą techniki PET, w porównaniu do techniki SPECT, jest relatywnie wyższa czułość i rozdzielczość tej metody. Wadą metody PET jest stosunkowo krótki czas połowicznego zaniku stosowanych obecnie radionuklidów (rzędu 1 h). Dlatego też obecnie intensywnie poszukuje się nowych emiterów promieniowania β^+ , o nieco dłuższym czasie połowicznego zaniku lub możliwych do otrzymywania z przenośnych generatorów (np. Rb-82, Sc-44, Ga-68). Podstawą do wyboru radionuklidu terapeutycznego jest rozmiar zmiany chorobowej, do którego należy dobrać radionuklid o odpowiednim zasięgu promieniowania.



Schemat zasięgu promieniowania w organizmie żywym

Radionuklidem, który stosowałam w zaprojektowanych przeze siebie potencjalnych diagnostycznych radiofarmaceutykach receptorowych (opartych na analogach peptydów wazopresyny i greliny oraz leku lapatinib) był technet-99m, otrzymywany z generatora $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ w postaci jonu nadtechnecjanowego.

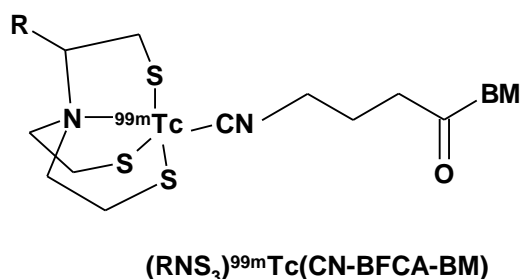


Schemat budowy radiofarmaceutyków receptorowych.

Radionuklid X związany jest w trwały i inertny kompleks, który poprzez dwufunkcyjny łącznik BFCA związany jest z wybraną cząsteczką biologicznie czynną (biomolekułą, BM). Ze względu na bogatą chemię koordynacyjną technetu, w literaturze opisanych jest bardzo wiele kompleksów technetowych, w których kation technetu występuje na stopniach utlenienia +1, +3, +5 lub +6. W trakcie swoich prac doświadczalnych syntezowałam kompleksy technetowe zawierające kation technetu na wszystkich wymienionych stopniach utlenienia, aczkolwiek w projektowanych przeze siebie potencjalnych diagnostycznych radiofarmaceutykach receptorowych stosowałam głównie kompleks technetu(III). W kompleksie tym, tzw. '4+1', o strukturze bipiramidy trygonalnej, ligand tetradentny tris(2-merkaptotetylo)-amina (NS_3), z trzema atomami donorowymi siarki i jednym atomem azotu, łączy się z trójwartościowym technetem pozostawiając jedno miejsce koordynacyjne wolne dla liganda monodentnego. Ligandem monodentnym jest dwufunkcyjny reagent CN-BFCA – ester sukcyloimidylowy kwasu 4-izocyjanomasłowego. Związek ten zawiera grupę izonitrylową CN, poprzez którą koordynuje kation radionuklidu, i grupę estrową, poprzez którą może być przyłączona biomolekuła, BM. Z danych literaturowych oraz badań własnych wiadomo, iż kompleksy takie są wyjątkowo trwałe nie tylko w sensie termodynamicznym, lecz także pod względem kinetyki wymiany ligandów *in vivo* (np. nie ulegają one reakcji podstawienia grupami SH z takich cząsteczek jak cysteina lub glutation). Ponadto wprowadzenie odpowiednio dobranej grupy hydrofilowej R, jako peryferyjnego podstawnika do tetradentnego ligandu NS_3 , umożliwi otrzymanie radiobiokoniugatu o żądanej wartości lipofilowości (parametru decydującego o zachowaniu się cząsteczki w warunkach *in vivo*). Używany do syntezy radiobiokoniugatu ligand monodentny CN-BFCA

sprzęgany był uprzednio z biomolekułą (poprzez utworzenie wiązania amidowego pomiędzy aktywnym chemicznie estrem sukcyloimidylowym z reagenta CN-BFCA i grupą aminową biomolekuły) i zajmując piąte miejsce koordynacyjne w kompleksie technetowym wnosił jednocześnie do syntezowanego radiofarmaceutyku biomolekułę. Przyłączając biomolekułę należy jednak pamiętać, aby nie zmieniać fragmentu biomolekuły odpowiedzialnego za jej oddziaływanie z receptorem. Grupa aminowa biomolekuły użyta do utworzenia wiązania amidowego powinna znajdować się poza fragmentem farmakoforowym biomolekuły.

Schemat budowy radiobiokoniugatu, zawierającego kompleks technetu(III), typu '4+1', zamieszczony jest poniżej.



Schemat budowy radiobiokoniugatu z kompleksem technetu(III), typu '4+1'

W zaprojektowanych przeze mnie potencjalnych diagnostycznych radiofarmaceutykach receptorowych w przypadku peptydu wazopresyna wykorzystałam α -aminową grupę N-końca peptydu (zablokowanie α -aminowej grupy N-końca wazopresyny jest wskazane w celu zwiększenia okresu półtrwania peptydu *in vivo*). W przypadku peptydu grelina do utworzenia wiązania amidowego z estrem sukcyloimidylowym reagenta CN-BFCA wykorzystywany był zmodyfikowany C-koniec peptydu (α -aminowa grupa N-końca geliny jest częścią fragmentu peptydu odpowiedzialnego za oddziaływanie z receptorem).

Ze względu na duże podobieństwo właściwości fizykochemicznych i biologicznych analogicznych kompleksów technetowych i renowych oraz brak naturalnego izotopu technetu, dla wszystkich syntezowanych przeze mnie potencjalnych technetowych radiofarmaceutyków receptorowych syntezowane były w skali miligramowej tzw. „zimne renowe związki odniesienia” (cold rhenium reference compounds). Związki te charakteryzowane były za pomocą metod AE, MS, NMR, HPLC, TLC, UV-Vis, IR. Porównanie analiz HPLC (R_T) i

TLC (R_F) "zimnego renowego związku odniesienia" (detekcja UV-Vis) i analogicznego związku zawierającego technet-99m (detekcja promieniowania gamma) było kryterium potwierdzającym fakt otrzymania w skali n.c.a. (no-carrier added) związku technetowego o danym składzie i budowie, jak analogiczny związek renu.

Wybór biologicznie czynnej cząsteczki

Poszukiwania nowych radiofarmaceutyków to zarówno dobieranie odpowiednich radionuklidów (rodzaj i energia promieniowania), jak też szukanie nowych biomolekuł, BM, (w świecie medycyny czy biologii biomolekuły nazywane są 'ligandami'), które „dostarczają” radioizotop w odpowiednie miejsce, umożliwiając zobrazowanie danej tkanki. Biomolekuły (peptydy, fragmenty przeciwciał monoklonalnych) dobiera się w oparciu o znajomość funkcji pełnionych przez daną tkankę - są one w tej tkance wychwytywane, metabolizowane lub uczestniczą w jej fizjologicznych procesach. Uzyskuje się w ten sposób informację o strukturze narządu, ale poprzez informację o pełnieniu przez niego swojej funkcji, co stanowi zasadniczą różnicę pomiędzy metodami scyntygraficznymi, a innymi technikami obrazowania. Utrudnieniem w diagnostyce/terapii przy użyciu radiofarmaceutyków, podobnie jak w przypadku stosowania leków standardowych, może być często pojawiająca się oporność na stosowane preparaty. Może być ona wynikiem zahamowania transportu preparatu do komórki w wyniku mutacji receptora (czyli punktu wychwytu radiofarmaceutyku) lub nasilenia transportu preparatu na zewnątrz komórki (w przypadku radiofarmaceutyków internalizowanych) na skutek aktywacji błonowej glikoproteiny P. Co więcej, także sama komórka zdolna jest do wytworzenia alternatywnego szlaku metabolicznego lub nasilenia naprawy DNA. Ponadto wiadomo także, że w przypadku wielu typów nowotworów na błonie komórkowej występuje nadekspresja często kilku różnych receptorów, wobec których powinowactwo wykazują różne biomolekuły. Tak więc poszukiwania nowych radiofarmaceutyków wymagają umiejętności znakowania coraz to nowych biomolekuł.

Cząsteczkami biologicznie aktywnymi, na których oparłam zaprojektowane przeze siebie radiofarmaceutyki receptorowe, są peptydy, (a ściślej mówiąc ich analogi) wazopresyna i grelina oraz lek antynowotworowy lapatinib.

Wazopresyna (arginiono wazopresyna, (Arg⁸)-Vasopressin, **AVP**), zwana także arginopresyną lub hormonem antydiuretycznym (ADH), jest cyklicznym peptydem zawierającym 9 aminokwasów. Dwa z nich to cysteina, w pozycji 1 i 6 (Cys¹ i Cys⁶). W

wyniku powstania mostka dwusiarczowego pomiędzy tymi aminokwasami, wazopresyna ma kształt 6-cio aminokwasowego pierścienia, poza który wystaje fragment peptydu składający się z 3 aminokwasów.

Wazopresyna jest peptydem występującym u ssaków, w tym także u ludzi. Powstaje z prekursora hormonu peptydowego (preprohormonu) syntezowanego w podwzgórzu, skąd uwalniana jest podczas transportu do tylnego płata przysadki mózgowej. AVP reguluje zatrzymywanie wody w organizmie. Jej ilość zwiększa się w przypadku odwodnienia (działanie antydiuretyczne za pośrednictwem receptora V2). Powoduje, że nerki zatrzymują wówczas wodę (ale nie sole), co prowadzi do zmniejszenia ilości moczu. AVP może także poprzez zwężanie światła naczyń powodować wzrost tętniczego ciśnienia krwi (działanie wazopresyjne za pośrednictwem receptora V1). Ponadto, poza powyższymi dominującymi funkcjami, wazopresyna, jako neuropeptyd, wywołuje szereg neurologicznych efektów w centralnym układzie nerwowym (CNS). Może powodować, za pośrednictwem różnych podtypów receptora, sprawniejszą pracę mózgu, powodującą np. zwiększenie zdolności poznawczych czy przeżywanie emocji. W ostatnich latach wazopresynie przypisuje się także coraz większy wpływ na zachowania społeczne i udział w takich chorobach jak schizofrenia i autyzm. Stężenie wazopresyny w surowicy jest poniżej 4 pg/ml, a okres półtrwania rzędu 10-35 min (AVP ulega biodegradacji pod wpływem wazopresynaz obecnych w wątrobie i nerkach). Wydłużenie okresu półtrwania AVP można osiągnąć poprzez zablokowanie grupy α -aminowej na N-końcu peptydu (przy Cys¹) i użycie w pozycji 8 D-argininy zamiast naturalnej L-argininy.

Poza naturalną wazopresyną używałam także jej analogu, związku $d(CH_2)_5[D-Tyr(Et^2)-Ile^4-Eda^9]AVP$, (AVP(an)), posiadającego właściwości antagonisty względem receptora wazopresyny V2 (5 mg próbkę tego związku otrzymałam, w ramach współpracy, od Prof. Maurice Manning, University of Toledo, Toledo, Ohio, United States).

Występowanie nadekspresji receptora wazopresyny V2 na komórkach nowotworowych zostało stwierdzone w przypadku drobnokomórkowej postaci raka płuc (small-cells of lung cancer, SCLC). Jest to nieoperowalna postać nowotworu, pochodzenia neuroendokrynnego, stanowiąca około 20% zachorowań na raka płuc i charakteryzująca się bardzo krótkim okresem przeżywalności – 5-cio letni okres przeżywalności stanowi mniej niż 20 %. Komórki SCLC charakteryzują się szybkim rozmnażaniem się i rozprzestrzenianiem do węzłów chłonnych i innych organów, takich jak mózg, wątroba, kości.

Za oddziaływanie wazopresyny z receptorem V2 odpowiedzialna jest struktura 6-cio członowego pierścienia utworzonego przez dwusiarczkowy mostek pomiędzy Cys¹ i Cys⁶,

tróaminokwasowy „ogon”, obecność tyrozyny w pozycji 2 i zamiana grupy karboksylowej C-końca peptydu w formę amidu.

Zastosowanie znakowanej wazopresyny (potencjalnych radiofarmaceutyków receptorowych opartych na AVP lub (AVP(an)) może służyć do efektywnego diagnozowania i typowania do leczenia pacjentów cierpiących na drobnokomórkową postać raka płuc.

Grelina jest 28-aminokwasowym endogennym hormonem występującym we krwi. Uwalniana jest z komórek okładzinowych (tzw. X/A-like cells) trzonu i dna żołądka i może występować w dwóch formach: jako grelina acylowana (GHR) i jako grelina des-acylowana (des-acyl Ghr). Nazwa grelina pochodzi od angielskiego słowa "grow" - „rosnąć” ze względu fakt, iż najważniejszą funkcją *in vivo* tego peptydu jest pobudzenie przedniego płata przysadki mózgowej do wydzielania hormonu wzrostu (GH, **G**rowth **H**ormone). W warunkach *in vivo* grelina, jak wszystkie hormony, ulega procesowi biodegradacji enzymatycznej pod wpływem działania enzymów proteolitycznych (butyrylcholinesteraza, PAF-acetylhydrolaza, karboksylesteraza). Pierwszym etapem biodegradacji jest deacylacja, czego wynikiem jest powstawanie des-acylowanej greliny. Według danych literaturowych okres półtrwania Ghr w surowicy ludzkiej jest stosunkowo dość długi – po 240 min. jeszcze około 50% peptydu istnieje w niezmienionej formie. Grelina jest endogennym ligandem receptora hormonu wzrostu (GHS-R, **G**rowth **H**ormone **S**ecretagogue **R**eceptor). Początkowo uważano, że aktywnym fragmentem greliny, odpowiedzialnym za oddziaływanie biomolekuła-receptor, jest sekwencja trzech pierwszych aminokwasów N-końca peptydu: Gly¹-Ser²-(n-oktaacyl)Ser³. Późniejsze badania pokazały, że za aktywny fragment greliny należy uważać dłuższy fragment peptydu, składający się z pięciu pierwszych aminokwasów: Gly¹-Ser²-(n-oktaacyl)Ser³-Phe⁴-Leu⁵. Wykazano również, że fragment ten może być używany jako wektor do syntezy radiofarmaceutyków receptorowych. Grelina jest przykładem peptydu, którego N-koniec odpowiedzialny jest za oddziaływanie z receptorem, a więc radioznacznik powinien być przyłączany np. poprzez C-koniec peptydu, poza fragmentem farmakoforowym biomolekuły. W tym celu opracowany został sposób modyfikacji C-końca peptydu, który polegał na przyłączeniu aminokwasu lizyna, Lys. Aminokwas ten posiada dwie pierwszorzędowe grupy aminowe: α-aminową grupę N-końca i ε-aminową w łańcuchu bocznym. Poprzez jedną z tych grup Lys zostaje przyłączona do C-końca peptydu, natomiast druga grupa aminowa bierze udział w utworzeniu wiązania amidowego z aktywnym chemicznie estrem sukcyloimidylowym reagenta CN-BFCA. Z punktu widzenia zastosowania końcowego radiobiokoniugatu jako potencjalny radiofarmaceutyk, nie ma

znaczenia na etapie przyłączania lizyny do C-końca peptydu, która grupa aminowa lizyny bierze udział w tej reakcji, a która w sprzęganiu peptydu z reagentem CB-BFCA.

W ostatnich latach pojawiły się liczne doniesienia o występowaniu nadekspresji receptora GHS-R1a na komórkach różnych typów nowotworów (gruczolak przysadki, guzy neuroendokrynne tarczycy, płuc, piersi, gonad, rak prostaty, żołądka, jelita grubego, endokrynne i nieendokrynne guzy trzustki). Fakt ten pozwala sądzić, iż peptyd grelina ma potencjalne szanse być zastosowanym w radiofarmaceutykach receptorowych jako wektor doprowadzający biokoniugat danego radionuklidu do chorobowo zmienionej tkanki.

Lapatinib (ditozylan pochodnej 4-anilinochinazoliny, nazwy handlowe: *Tykerb* -USA, *Tyverb* –Europa) jest to lek antynowotworowy opracowany przez firmę GlaxoSmithKline (GSK), stosowany w leczeniu onkologicznym guzów litych, takich jak rak sutka i rak płuca. Lek ten w marcu 2007 roku przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) został dopuszczony do leczenia zaawansowanych (z przerzutami) przypadków raka sutka. Substancją czynną leku jest jednowodny ditozylan lapatynibu. Lapatinib jest inhibitorem wewnątrzkomórkowych domen kinazy tyrozynowej obydwu receptorów: naskórkowego czynnika wzrostu (**E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor, EGFR) i receptora Her-2 (**H**uman **E**pidermal growth factor **R**eceptor 2). Cząsteczka lapatynibu wnika do wnętrza komórki (okres półtrwania *in vivo* jest rzędu 24 godz.), gdzie łączy się z wewnątrzkomórkową częścią receptora Her-2 oraz Her-1 i hamuje ich zdolność do przyspieszania wzrostu i podziału komórki. Lapatinib wykazuje silne powinowactwo do receptora Her-2, występującego na powierzchni komórek nowotworowych w około 30% przypadków raka piersi. W stanie chorobowym na powierzchni komórki występuje nadekspresja receptora (komórka jest obciążona cząsteczkami receptora). Wiarygodna ocena ilości cząsteczek receptora Her-2 umożliwia przewidywanie dalszego przebiegu choroby (czynnik prognostyczny) i odpowiedzi na stosowane leczenie (czynnik predykcyjny). Istnieją dwa zasadnicze rodzaje metod do wykrywania nadekspresji receptora Her-2. (a) Metoda immunohistochemiczna (**I**mmunohistochemistry, IHC) - pozwala określić, jak dużo receptorów znajduje się na błonie komórkowej (ocenia nadekspresję, czyli nadprodukcję białka Her-2). Jest ona powszechnie dostępna, łatwa do wykonania, tania, ale mało dokładna. Polega na subiektywnym określeniu natężenia odczynu barwnego, co może utrudniać interpretację wyniku; (b) Metody FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja in situ, **F**luorescence **i**n-situ **h**ybridization) i CISH (chromogenna hybrydyzacja in situ, **C**hromogenic **i**n situ **h**ybridisation) – pozwalają one na określenie liczby kopii genu odpowiedzialnego za

powstanie i działanie receptora wzrostu Her-2. Metody te są trudniejsze, droższe, ale dokładnie precyzują, czy mamy do czynienia z amplifikacją genu. Niemniej wszystkie wymienione tu metody wymagają do badania pobrania materiału w czasie biopsji. Zastosowanie potencjalnego receptorowego radiofarmaceutyku opartego na lapatinibie do oceny nadekspresji receptora Her-2 może być metodą konkurencyjną (precyzyjną, szeroko dostępną, nie wymagającą biopsji i stosunkowo dużych kosztów) w stosunku do metod IHC, FISH i CISH.

Lapatinib został wybrany przeze mnie jako potencjalny wektor w wyniku zgłaszanego przez prof. Królickiego (Zakład Medycyny Nuklearnej Centralnego Szpitala Klinicznego w Warszawie) zapotrzebowania na radiofarmaceutyk posiadający powinowactwo do receptora Her-2.

Fizykochemiczne i biologiczne badania potencjalnych radiofarmaceutyków

Wszystkie syntezowane przeze mnie w skali nca radiobiokuniugaty technetowe wydzielane były z mieszaniny reakcyjnej za pomocą semi-preparatywnej metody HPLC, a następnie poddawane badaniom fizykochemicznym i biologicznym.

Stabilność preparatu (o stężeniu poniżej 10^{-4} mM) badana była w funkcji czasu jego inkubacji w 10^{-2} M roztworze PBS, pH 7,40, oraz roztworach zawierających nadmiarowe stężenia (rzędu 10 mM) konkurencyjnych ligandów (tzw. „challenge experiments”). Jako ligandy konkurencyjne stosowano związki obecne w płynach fizjologicznych organizmów żywych (np. histydyna, cysteina, glutation), posiadające w swojej budowie aktywne chemicznie grupy SH, NH₂, COOH. Po różnych odstępach czasu, od 0,5 h do 24h, począwszy od rozpoczęcia inkubacji, wykonywane były analizy HPLC.

Stabilność preparatu w surowicy ludzkiej lub szczurzej badano poprzez oznaczenie (po upływie różnych okresów inkubacji) procentowej zawartości aktywności danego preparatu w roztworze, z którego przed pomiarem wytrącono (za pomocą etanolu) i usunięto (poprzez wirowanie) składniki białkowe. Każdorazowo wykonywano także analizy HPLC w celu stwierdzenia, czy w roztworze istnieje nadal tylko jeden związek chemiczny będący badanym preparatem.

Lipofilowość preparatu (parametr mający wpływ na aktywność biologiczną substancji leczniczych, rozpuszczalność w płynach ustrojowych, możliwość przechodzenia przez błony komórkowe, dystrybucję, transport i akumulowanie się leku w organizmie, a także jego

oddziaływanie z receptorem) wyznaczana była jako $\log D$, gdzie D jest współczynnikiem podziału preparatu w układzie faz *n*-oktanol / PBS pH 7,40, przyjętym jako standard w badaniach biologicznych.

Badania biologiczne wykonywałam używając linii komórkowych posiadających receptory odpowiednie dla danej cząsteczki biologicznie czynnej. Były to: w przypadku wazopresyny linia komórkowa NCI-H69 (receptory V2), w przypadku greliny – linia komórkowa DU-145 (receptory GHS-R1a) i w przypadku leku lapatinib – linia komórkowa SKOV-3 (receptory Her-2). W ramach tych badań wyznaczone zostały parametry B_{\max} , K_d , K_i i IC_{50} charakteryzujące powinowactwo receptorowe zaprojektowanych potencjalnych diagnostycznych radiofarmaceutyków receptorowych.

Ostatnim etapem badań biologicznych były badania biodystrybucji wielonarządowej. Badania prowadzone były na 3-miesięcznych samcach mysich BALB/c, o masie w zakresie 23-28 g. W objętości 100 –180 μ L wstrzykiwany był przez żyłę ogonową preparat technetowy o aktywności w granicach 2,38 – 3,78 MBq. Po upływie danego okresu czasu myszy były uśmiercane (zgodnie z obowiązującym prawem). Dla wypreparowanych narządów mierzona była ilość zakumulowanej radioaktywności, a następnie wyznaczany (po uwzględnieniu poprawki na rozpad technetu-99m) parametr %ID/g (procent dawki podanej na g narządu).

Omówienie uzyskanych wyników i ocena możliwości wykorzystania opracowanych potencjalnych diagnostycznych radiofarmaceutyków receptorowych

We wszystkich czterech syntezowanych radiobiokoniugatach dana biologicznie czynna cząsteczka (analog wazopresyny, analog greliny i lek lapatinib) zawsze w jednakowy sposób związana jest z kompleksem technetowym. Zawsze wprowadzana była do cząsteczki radiobiokoniugatu poprzez monodentny ligand izonitrylowy CN-BFCA sprzężony uprzednio z biomolekułą BM.

W tabeli poniżej zebrane są parametry trzech zaprojektowanych przeze mnie potencjalnych nowych diagnostycznych radiofarmaceutyków receptorowych:

- radiobiokoniugatu zawierającego kompleks technetu-99m, typu '4+1', i jako wektor analog wazopresyny, AVP(an), (1);

- radiobiokoniugatu zawierającego kompleks technetu-99m, typu '4+1', i jako wektor analog greliny, GHR, (2);
- radiobiokoniugatu zawierającego kompleks technetu-99m, typu '4+1', i jako wektor lek antynowotworowy lapatinib (4).

W tabeli podane są także dodatkowo parametry charakteryzujące

- radiobiokoniugat (3) zawierający tzw. *fac*-trikarbonylkowy kompleks technetu-99m na +1 stopniu utlenienia, typu '2+1', z bidentnym anionowym ligandem estrem metylowym kwasu 2-tiosalicylowego, $L_{S,O}$, i jako wektor analog greliny, GHR.

Radiobiokoniugat	$^{99m}\text{Tc}(\text{NS}_3)$ (CN-AVP(an)) (1)	$^{99m}\text{Tc}(\text{NS}_3)$ (CN-Lys-GHR) (2)	$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(L_{S,O})$ (CN-Lys-GHR) (3)	$^{99m}\text{Tc}(\text{NS}_3)$ (CN-lapatinib) (4)
LogD	$-0,44 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,04$
B_{max} (nM)	$0,0058 \pm 0,0003$	15 ± 5	30 ± 4	$2,4 \pm 0,3$
K_D (nM)	$0,13 \pm 0,04$	$2,5 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,4$
K_i (nM)	$0,11 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,5$
IC₅₀ (nM)	$29 \pm 1,3$	45 ± 3	54 ± 4	$41,2 \pm 0,4$
drogi wydalania	wątroba	wątroba	wątroba/nerki	wątroba/nerki

Zamieszczenie danych dla radiobiokoniugatu 3 pozwala na ocenę wpływu lipofilowości preparatu na oddziaływanie greliny z receptorem oraz drogi wydalania preparatu w warunkach *in vivo*. Z porównania właściwości radiobiokoniugatów 2 i 3 widać, że preparat 2 o nieco większej lipofilowości charakteryzuje się nieco gorszymi właściwościami biologicznym (niższa wartość B_{max} , co przekłada się na mniejszą ilość wysyconych receptorów na komórce, oraz wyższe wartości K_D i K_i). Ponadto większa lipofilowość preparatu 2 powoduje, że jest on wydalany głównie szlakiem wątrobowym.

Zaprojektowane przeze mnie radiobiokoniugaty **1**, **2** i **4** można syntezować bezpośrednio w laboratoriach przyszpitalnych poprzez dodanie nadtechnecjanu sodu (w formie $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ eluowanego z przenośnego $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generatora) do tzw. „kitu”, zawierającego w postaci zliofilizowanej odpowiednie ilości reagentów (czynnik redukujący SnCl_2 , ligand NS_3 i ligand izonitrylowy sprzężony z biomolekułą).

W przypadku wszystkich radiobiokoniugatów wartości parametrów K_D i K_i są rzędu kilku nM, a wartości IC_{50} rzędu 30-50 nM, co świadczy o dużym powinowactwie tych radiobiokoniugatów do ich receptorów.

Na szczególną uwagę zasługuje tu radiobiokoniugat **1**. Jako wektor zawiera on pochodną wazopresyny, AVP(an), która jest antagonistą receptora V2. Preparat ten charakteryzuje się wyjątkowo niskimi wartościami K_D i K_i , co wskazuje na jego bardzo trwałе wiązanie się z receptorem.

Radiobiokoniugat **4** jest potencjalnym diagnostycznym receptorowym radiofarmaceutykiem do obrazowania nadekspresji receptora Her-2. W literaturze istnieją dwa doniesienia o znakowaniu lapatinibu radionuklidami C-11 i F-18 oraz kilkanaście doniesień o znakowaniu trastuzumabu (humanizowane przeciwciało monoklonalne IgG1, łączące się wybiórczo z receptorem Her-2) radionuklidami diagnostycznymi (Tc-99m , In-111, Zr-89, Ga-67, Cu-64, I-131) i terapeutycznymi (I-125, Lu-177, At-211). Porównując parametry uzyskane dla syntezowanego przeze mnie radiobiokoniugatu **4** i dostępne w literaturze dane odnośnie znakowanego trastuzumabu należy pamiętać, że eksperymentalnie wyznaczone wartości parametrów charakteryzujących właściwości biologiczne badanego preparatu silnie zależą od warunków eksperymentalnych. Wynika to z faktu, iż zarówno reakcja wiązania biomolekuły z receptorem, jak i zachowanie się białka receptora silnie zależą od temperatury. Ponadto biologiczne zachowanie się tego samego typu receptora, ale występującego na różnego rodzaju liniach komórkowych, także może się różnić. Tak więc, wartości eksperymentalne uzyskane w różnych laboratoriach nie mogą być uważane jako ‘absolutne’ i ich porównywanie może być tylko jakościowe. Z porównania warunków znakowania lapatinibu technetem-99m i warunków znakowania lapatinibu radionuklidami C-11 i F-18 oraz trastuzumabu różnymi radionuklidami, a także z jakościowego porównania właściwości biologicznych tych wszystkich radiobiokoniugatów można powiedzieć, że lapatinib znakowany technetem-99m jest obiecującym, łatwo dostępnym i stosunkowo tanim potencjalnym diagnostycznym radiofarmaceutykiem receptorowym do oceny nadekspresji receptora Her-2. Zgodnie z sugestią prof. Królickiego lapatinib, sprzężony z ligandem makrocyklicznym DOTA, wyznakowany został także Ga-68, co umożliwi diagnostykę

nadekspresji receptora Her-2 metodą PET. Wyniki tej pracy (będącej tematem pracy magisterskiej studentki Wydziału Fizyki UW na kierunku Fizyka Medyczna, planowana obrona wrzesień 2014) nie były jeszcze publikowane. Badania biologiczne radiobiokoniugatu ^{68}Ga -lapatinib są w toku.

Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych po uzyskaniu stopnia doktora

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje łącznie:

- ✓ 20 prac oryginalnych o sumarycznym IF = 35,721 (548 pkt. MNiSzW), w tym cykl 8 prac będących materiałem źródłowym do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, o łącznym **IF równym 18,913 (250 pkt. MNiSW)**;
- ✓ 13 rozszerzonych streszczeń w recenzowanych materiałach konferencyjnych;
- ✓ 44 wystąpienia na zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych (25 komunikatów na konferencjach zagranicznych i 19 komunikatów na konferencjach krajowych);
- ✓ 5 recenzji publikacji w czasopismach z IF;
- ✓ Udział w realizacji 7 grantów badawczych finansowanych przez Unię Europejską / KBN \ MNiSzW \ NCBiR, w tym kierowanie 2 projektami i współautorstwo grantu finansowanego przez Unię Europejską;
- ✓ Opieka naukowa nad 1 pracą doktorską i rola promotora w 2 pracach magisterskich.



Dr Ewa Gniazdowska