

(Autoreferat, Załącznik nr 3)

**Radiobiokoniugaty peptydu substancji P oraz przeciwciała
monoklonalnego trastuzumabu znakowanych emiterami
promieniowania korpuskularnego w celowanej terapii
radionuklidowej**

Dr inż. Agnieszka Majkowska-Pilip



Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej

Warszawa 2021

SPIS TREŚCI

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.).	3
a) tytuł osiągnięcia naukowego.....	3
b) wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego.....	3
c) opis osiągnięcia naukowego.....	6
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.....	38
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....	39
7. Opis pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	41

1. Imię i Nazwisko: Agnieszka Majkowska-Pilip

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- doktor nauk chemicznych w zakresie chemii (20.04.2010)

Rozprawa doktorska „Kompleksy $^{44/47}\text{Sc}$ z multidentnymi ligandami jako prekursorzy radiofarmaceutyków” – praca obroniona z wyróżnieniem

Promotor: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz

Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

- magister chemii (22.06.2004)

Praca magisterska „Synteza i badanie pochodnych politiofenu zawierających ugrupowania oligoanilinowe w łańcuchu bocznym” – praca obroniona z wynikiem bardzo dobrym

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Zagórska

Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Katedra Chemii i Technologii Polimerów

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 01.06.2010 – obecnie adiunkt, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa
- 16.09. 2010 – 15.09.2013 post-doc, European Commission, Joint Research Centre, Karlsruhe, Germany
- 01.11.2006 – 31.05.2010 asystent, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa
- 02.01.2005 – 31.10.2006 chemik, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Radiobiokoniugaty peptydu substancji P oraz przeciwciała monoklonalnego trastuzumabu znakowanych emiterami promieniowania korpuskularnego w celowanej terapii radionuklidowej

b) wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

Materiałem źródłowym do opisu moich osiągnięć naukowych, będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, jest zamieszczony poniżej cykl publikacji, składający się

z 8 prac o łącznym IF równym 28,912 (MNiSW = 500 pkt) zgodnie z rokiem opublikowania oraz IF równym 29,594 (MNiSW = 680 pkt) dla 2019 roku.

Dla artykułów opublikowanych w 2020 i 2021 roku IF został uwzględniony z 2019 r.

[H1] **A. Majkowska-Pilip***, M. Rius, F. Bruchertseifer, C. Apostolidis, M. Weis, M. Bonelli, M. Laurenza, L. Królicki, A. Morgenstern. *In vitro* evaluation of ^{225}Ac -DOTA-Substance P for targeted alpha therapy of glioblastoma multiforme. *Chem. Biol. Drug Design*, **2018**, 92, 1344.

IF_{2018/2019} = 2,256/2,548; MNiSW_{2018/2019} = 25/70 pkt

Mój udział polegał na zaproponowaniu koncepcji otrzymywania radiobiokoniugatu [^{225}Ac]Ac-DOTA-SP, opracowaniu metody jego syntezy, wykonaniu badań stabilności, przeprowadzeniu większości eksperymentów biologicznych, analizie i interpretacji otrzymanych wyników oraz przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu. Przygotowywałam także odpowiedzi dla recenzentów.

[H2] **A. Majkowska-Pilip***, P. Koźmiński, A. Wawrzynowska, T. Budlewski, B. Kostkiewicz, E. Gniazdowska. Application of Neurokinin-1 receptor in targeted strategies for gliomas treatment. Part I: synthesis and evaluation of Substance P fragments labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and ^{177}Lu as potential receptor radiopharmaceuticals. *Molecules*, **2018**, 23(10), 2542.

IF_{2018/2019} = 3,060/3,267; MNiSW_{2018/2019} = 30/100 pkt

Mój udział polegał na zaproponowaniu koncepcji badań otrzymywania radiobiokoniugatów Substancji P znakowanych emitерem promieniowania β^- - ^{177}Lu , opracowaniu metod ich syntezy, wykonaniu badań stabilności, przeprowadzeniu prac biologicznych, opiece nad studentką A. Wawrzynowską, która wykonywała badania w ramach pracy magisterskiej, analizie i interpretacji otrzymanych wyników oraz przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu. Przygotowywałam także odpowiedzi dla recenzentów.

[H3] S. Ostrowski, **A. Majkowska-Pilip**, A. Bilewicz, J. Dobrowolski. On Au_nAt clusters as potential astatine carriers. *RSC Adv.*, **2017**, 7(57), 35854.

IF_{2017/2019} = 2,936/3,119; MNiSW_{2017/2019} = 35/100 pkt

Mój udział polegał na analizie i interpretacji wyników obliczeń oraz współudziale w przygotowaniu publikacji.

[H4] Ł. Dziawer, **A. Majkowska-Pilip***, D. Gawęł, M. Godlewska, M. Pruszyński, J. Jastrzębski, B. Wąs, A. Bilewicz. Trastuzumab-modified gold nanoparticles labeled with ^{211}At for local treatment of HER2-positive breast cancer. *Nanomaterials*, **2019**, 9(4), 632.

IF₂₀₁₉ = 4,324; MNiSW₂₀₁₉ = 70 pkt

Mój udział polegał na zaproponowaniu koncepcji otrzymywania radiobiokoniugatu [^{211}At]At-AuNPs-PEG-trastuzumab, opracowaniu metody jego syntezy, przeprowadzeniu części prac biologicznych, analizie i interpretacji otrzymanych wyników oraz przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu. Przygotowywałam także odpowiedzi dla recenzentów.

[H5] **A. Majkowska-Pilip***, P. Halik, E. Gniazdowska. The significance of NK1 receptor ligands and their application in targeted radionuclide tumour therapy. *Pharmaceutics*, **2019**, 11(9), 443.

IF₂₀₁₉ = 4,421; MNiSW₂₀₁₉ = 100 pkt

Mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy przeglądowej dotyczącej receptora NK1, opisanu rozdziałów (3.1-3.2) dotyczących znakowanych agonistów SP stosowanych zarówno w diagnostyce jak i w terapii, przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu. Przygotowywałam także odpowiedzi dla recenzentów.

[H6] **A. Majkowska-Pilip***, W. Gawęda, K. Żelechowska-Matysiak, K. Wawrowicz, A. Bilewicz. Nanoparticles in Targeted Alpha Therapy. *Nanomaterials*, **2020**, 10, 1366.

IF_{2020/2019} = brak/4,324; MNiSW_{2020/2019} = brak/70 pkt

Mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy przeglądowej dotyczącej zastosowania nanocząstek w celowanej α -terapii, opisanu rozdziału dotyczącego nanocząstek znakowanych radionuklidem ^{225}Ac oraz ^{227}Th , przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu. Przygotowywałam także odpowiedzi do recenzentów.

[H7] A. Cytryniak, E. Nazaruk, R. Bilewicz, E. Górzyńska, K. Żelechowska-Matysiak, R. Walczak, A. Mames, A. Bilewicz, **A. Majkowska-Pilip***. Lipidic cubic-phase nanoparticles

(cubosomes) loaded with doxorubicin and labeled with ^{177}Lu as a potential tool for combined chemo and internal radiotherapy for cancers. *Nanomaterials*, **2020**, 10(11), 2272.

IF_{2020/2019} = brak/4,324; MNiSW_{2020/2019} = brak/70 pkt

Mój udział polegał na zaproponowaniu koncepcji badań kubosomów znakowanych radionuklidem ^{177}Lu , zaplanowaniu eksperymentów dotyczących części chemicznej (synteza koniugatu DOTAGA-OA), radiochemicznej (znakowania, badania stabilności i lipofilowości) i radiobiologicznej (badania komórkowe), analizie i interpretacji otrzymanych wyników oraz przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu. Przygotowywałam także odpowiedzi do recenzentów.

[H8] K. Wawrowicz, **A. Majkowska-Pilip***, D. Gawęł, E. Chajduk, T. Pieńkowski, A. Bilewicz. Au@Pt core-shell nanoparticle bioconjugates for the therapy of HER2+ breast cancer and hepatocellular carcinoma. Model studies on the applicability of $^{193\text{m}}\text{Pt}$ and $^{195\text{m}}\text{Pt}$ radionuclides in Auger electron therapy. *Molecules*, **2021**, 26, 2051.

IF_{2020/2019} = brak/3,267; MNiSW_{2020/2019} = brak/100 pkt

Mój udział polegał na zaproponowaniu koncepcji badań otrzymywania biokoniugatu nanocząstek złota pokrytych monowarstwą platyny i przyłączonych do trastuzumabu, zaplanowaniu eksperymentów biologicznych, analizie i interpretacji otrzymanych wyników oraz przygotowaniu i wysłaniu manuskryptu. Przygotowywałam także odpowiedzi do recenzentów.

c) opis osiągnięcia naukowego

Cel badań

Celem podjętych przeze mnie badań było zaprojektowanie i zbadanie nowych skutecznych radiobiokoniugatów do celowanej radioterapii dwóch należących do najbardziej agresywnych i opornych lekowo nowotworów, glejaków wielopostaciowych oraz nowotworów piersi i jajnika wykazujących nadekspresję receptorów HER2. W przypadku glejaka wielopostaciowego zajęłam się syntezą oraz badaniem właściwości fizykochemicznych i biologicznych radiobiokoniugatów opartych na peptydzie - substancji P (SP), wykazujących powinowactwo do receptorów NK1, a w przypadku nowotworów o nadekspresji receptora HER2 radiobiokoniugatów opartych na przeciwciele monoklonalnym trastuzumabie. W zsyntezowanych radiofarmaceutykach obie wybrane przeze mnie biomolekuły były nośnikami

radionuklidów emitujących promieniowanie β^- (^{177}Lu), α (^{225}Ac , ^{211}At) oraz elektronów Auger ($^{193\text{m}}\text{Pt}$, $^{195\text{m}}\text{Pt}$).

Istotnym elementem mojej pracy było także znalezienie radiofarmaceutyku wykazującego radiotoksyczność w stosunku do macierzystych komórek tych nowotworów. Według ostatnich hipotez, komórki te wykazują wyjątkową oporność lekową i są odpowiedzialne za przerzutowość tych nowotworów.

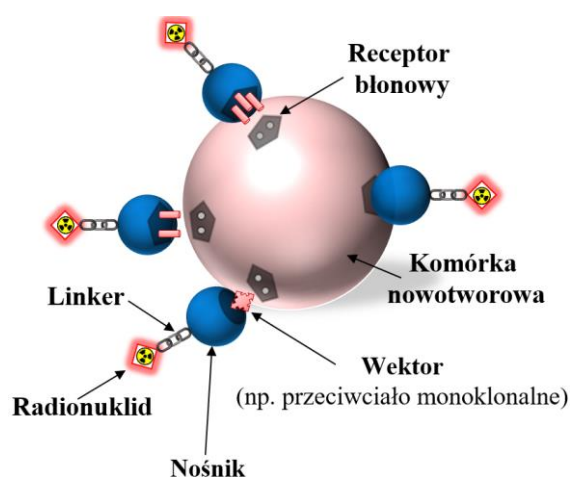
Etapy prowadzące do otrzymania potencjalnych radiofarmaceutyków obejmowały następujące zagadnienia badawcze:

- zaprojektowanie nowych radiofarmaceutyków, także z wykorzystaniem nanotechnologii;
- opracowanie schematów syntezy koniugatów oraz ich znakowania radionuklidami;
- określenie właściwości fizykochemicznych oraz stabilności zsyntezowanych preparatów w płynach biologicznych;
- charakterystykę otrzymanych biokoniugatów pod względem ich własności biologicznych na ludzkich liniach komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję receptorów NK1 oraz HER2 (badania *in vitro* powinowactwa receptorowego, internalizacji, cytotoksyczności).

Wprowadzenie

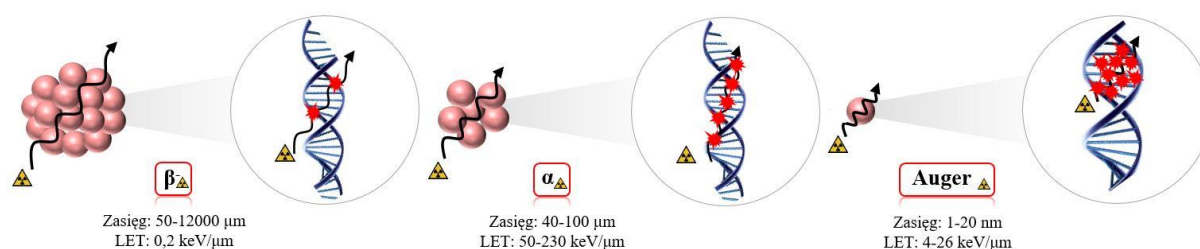
Następujący w ostatnich dwóch dekadach intensywny rozwój metod diagnostyki medycznej, głównie komputerowej tomografii (CT), funkcjonalnego rezonansu magnetycznego (fNMR), tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu (SPECT) i pozytonowej tomografii (PET) pozwala wykrywać zmiany nowotworowe w bardzo wczesnym stadium ich rozwoju, a zatem rozpoczynać leczenie znacznie wcześniej niż przy stosowaniu klasycznych metod diagnostycznych. Niestety, za ogromnym postępem w diagnostyce nowotworów nie podąża skuteczność terapii. Największym problemem staje się oporność lekowa i radiacyjna komórek nowotworowych. Obecnie najczęściej stosowanymi metodami w terapii przeciwnowotworowej, oprócz operacji chirurgicznych, są radioterapia i chemioterapia. Niestety, w przypadku wielu pacjentów ze względu na stan zaawansowania nowotworu oraz współistnienie innych chorób, zastosowanie chemioterapii jest praktycznie niemożliwe, gdyż może prowadzić do występowania bardzo poważnych efektów ubocznych. Ponadto, leczenie cytostatykami skierowane jest na szybko proliferujące komórki, podczas gdy znajdujące się w guzie macierzyste komórki nowotworowe (niewielka populacja opornych, komórek nowotworowych) dzielą się znacznie wolniej i nie ulegają zniszczeniu. Odpowiadają one za utrzymanie masy guza oraz są przyczyną powstawania przerzutów i nawrotów choroby

nowotworowej [1]. Ostatnio coraz lepsze wyniki leczenia tych nowotworów uzyskuje się stosując immunoterapię, celowaną terapię radionuklidową (*ang. Targeted Radionuclide Therapy, TAT*), a także celowane dostarczenie chemioterapeutyków do nowotworów. Dwie ostatnie metody oparte są na zastosowaniu radionuklidów lub chemioterapeutyków połączonych z odpowiednimi cząsteczkami nośnikowymi, takimi jak przeciwciała monoklonalne oraz ich fragmenty, peptydy oraz inne małe cząsteczki biologiczne aktywne, które lokalizują się w miejscach występowania zmian nowotworowych, dostarczając w te obszary terapeutyczne dawki leku lub promieniowania jonizującego (Rys. 1).



Rys. 1. Schemat działania radiofarmaceutyku receptorowego.

Ograniczeniem zastosowania „celowanej” radioterapii jest konieczność znalezienia odpowiednich receptorów na komórkach nowotworowych oraz cząsteczek biologicznie aktywnych wykazujących duże powinowactwo do tych receptorów. Jednakże według danych literaturowych [2] można spodziewać się znalezienia dla mniej więcej połowy rodzajów nowotworów odpowiednich cząsteczek biologicznie aktywnych mogących być wykorzystanych w „celowanej” radioterapii. W zależności od wielkości zmiany nowotworowej i jej stopnia zaawansowania, dobór odpowiedniego radionuklidu jest kluczowym czynnikiem w skuteczności terapii. Duże guzy lite są zazwyczaj leczone wysoko- i średnioenergetycznymi radionuklidami promieniowania β^- (^{90}Y , ^{188}Re , ^{166}Ho), dla których zasięg cząstek β jest rzędu 0,5-12 mm, co stanowi ~ 10 -100 warstw komórkowych. W przypadku małych zmian nowotworowych, lepsze własności terapeutyczne wykazują niskoenergetyczne emitery promieniowania β^- o zasięgu około 1 mm (np. ^{177}Lu). Jednakże w leczeniu małych guzów, przerzutów czy też nowotworów we wczesnym stadium rozwoju, emitery promieniowania α bądź też elektronów Auger wykazują znacznie większą cytotoksyczność niż cząstki β (Rys. 2).



Rys. 2. Zasięg promieniowania β , α oraz elektronów Auger.

Ze względu na krótki zasięg, cząstki α mają bardzo duże wartości liniowego przekazu energii ($\text{LET}\alpha \approx 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$), która powoduje, że wykazują zdolność do indukowania pęknięć podwójnoniciowych w DNA, co skutkuje całkowitym obumarciem komórki nowotworowej, podczas gdy promieniowanie β uszkadza głównie tylko jedną nić DNA i wówczas komórka nowotworowa jest w stanie ponownie się odbudować. Ponadto, krótki zasięg promieniowania α w tkance (40-90 μm), co odpowiada kilku warstwom komórek (2-10), nie powoduje niszczenia zdrowych tkanek otaczających nowotwór. Promieniowanie α jest bardzo efektywne pod względem radiotoksyczności, ponieważ działa niezależnie od stopnia natlenienia komórki (uszkadzanie komórek w warunkach hipoksji) oraz fazy jej cyklu. Ponadto, w badaniach *in vitro* wykazałam wysoką radiotoksyczność promieniowania α w stosunku do macierzystych komórek nowotworowych (*ang. cancer stem cells, CSC*) [H1].

Elektrony Auger, podobnie jak cząstki α charakteryzują się niewielkim zasięgiem w tkance (1-10 nm) ale dużym LET (~ 20 -krotnie większym LET w porównaniu do cząstek β), powodując również dwuniciowe pęknięcia DNA. Emisjaiskoenergetycznych elektronów zachodzi w wyniku dwóch rozpadów jądrowych, wychwyty elektronów (EC) oraz konwersji wewnętrznej (IC). Obydwa procesy prowadzą do powstania wolnych miejsc w wewnętrznych powłokach elektronowych, co jest energetycznie niekorzystne. Dążąc do osiągnięcia stanu podstawowego, w atomach następuje seria przejść elektronowych z powłok wyższych na niższe, co wiąże się z emisją nadwyżki energetycznej w postaci charakterystycznego promieniowania X, elektronów Auger lub elektronów Coster-Kronig. W procesach EC oraz IC emitowanych jest od kilku do kilkudziesięciu elektronów o energiach od kilku eV do około 1 keV [3]. Jednakże w przypadku elektronów Auger, ze względu na ich bardzo krótki zasięg, istotnym jest dostarczenie emitera tych elektronów w pobliże DNA w jądrze komórkowym, więc konieczna jest jego internalizacja do wnętrza komórki.

Niestety, niektóre bardzo atrakcyjne z punktu widzenia medycyny radionuklidy takie jak ^{198}Au , ^{223}Ra czy ^{211}At nie tworzą trwałych połączeń chelatowych, dlatego trudno jest je związać z cząsteczką biologicznie aktywną, inne nie wykazują dużej stabilności *in vivo* (np. biokoniugaty znakowane radionuklidem astatu). Naprzeciw tym trudnościom wychodzi nanotechnologia, która pozwala otrzymywać np. radioaktywne nanocząstki złota, adsorbować radionuklid astatu na powierzchni nanocząstek złota czy też immobilizować emiter promieniowania α – ^{223}Ra w strukturę nanozeolitu poprzez wymianę jonową pomiędzy jonami sodu znajdującymi się w przestrzeniach nanozeolitów, a jonami radu znajdującymi się w roztworze. Tymi zagadnieniami zajmuje się zespół w IChTJ, w którym pracuję.

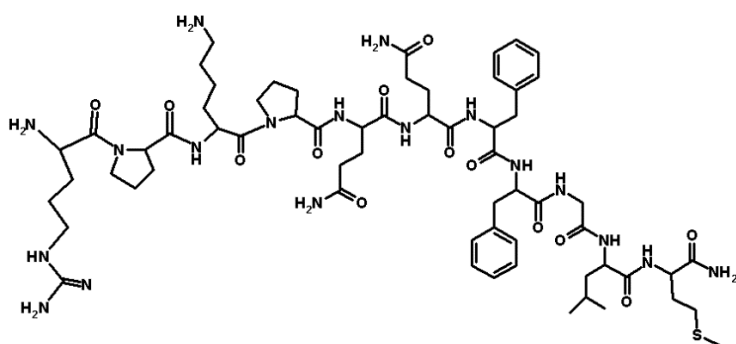
W ostatnich latach radioaktywne nanocząstki znajdują coraz szersze zastosowanie zarówno w diagnostyce jak i terapii medycznej [H6]. Ich główną zaletą jest fakt, że każda nanocząstka zawiera co najmniej setki atomów radionuklidów w odróżnieniu od konwencjonalnych radiofarmaceutyków, gdzie naprowadzająca biomolekuła jest znakowana jednym lub paroma atomami radioizotopu [4,5]. Pozwala to na zastosowanie znacznie większych aktywności w radioterapii i ma szczególne znaczenie w terapii elektronami Auger.

Przyszłość nanocząstek w medycynie związana jest także z ich wielofunkcyjnością polegającą na połączeniu diagnostyki i terapii w jednym radiofarmaceutyku, czyli jednoczesnym wykrywaniu zmian nowotworowych, monitorowaniu skuteczności terapii oraz leczeniu. Nanomedycyna pozwala także na równoczesne zastosowanie szeregu metod terapeutycznych, np. chemo- i radioterapii w jednej nanocząstce, co jest niezwykle istotne ze względu na dużą lekooporność komórek nowotworowych spowodowaną wytworzeniem przez te komórki wielu mechanizmów obronnych. Warto także dodać, że same nanocząstki mają zdolność gromadzenia się w obrębie guza nowotworowego poprzez tzw. transport bierny określany jako „podwyższona przenikalność i retencja” (*ang. Enhanced Permeation and Retention – EPR*). Jest to związane z nieszczelnością naczyń krwionośnych guza do których nanocząstki z łatwością przenikają z układu krążenia [5]. Aby zwiększyć kumulację nanocząstek w obrębie guza nowotworowego nie niszcząc prawidłowych tkanek, przyłącza się je do naprowadzającej biomolekuły np. peptydu, przeciwciała monoklonalnego, jego fragmentu lub innych małych cząsteczek aktywnych biologicznie. Nanocząstki z przyłączonym wektorem, wiążą się z receptorem lub wchodzą do wnętrza komórek nowotworowych na drodze endocytozy, czyli tzw. transportu aktywnego zwiększając w ten sposób skuteczność terapii i jednocześnie redukując toksyczność względem zdrowych komórek.

W moich badaniach prowadzących do otrzymywania nowych celowanych radiofarmaceutyków zastosowałam dwa wektory, peptyd **substancję P** oraz przeciwciało

monoklonalne **trastuzumab**. Wybrałam te biomolekuły ze względu na ich powinowactwo do dwóch z najbardziej agresywnych nowotworów, glejaka wielopostaciowego (substancja P) i nowotworów piersi i jajników zawierających receptory HER2 (trastuzumab).

SP jest endogennym neuropeptydem szeroko rozpowszechnionym w obwodowym i centralnym układzie nerwowym [6]. Biomolekuła ta składa się z 11 aminokwasów (Arg¹-Pro²-Lys³-Pro⁴-Gln⁵-Gln⁶-Phe⁷-Phe⁸-Gly⁹-Leu¹⁰-Met¹¹-NH₂, Rys. 3) i należy do grupy tachykinin neuropeptydowych wykazujących powinowactwo do receptorów NK1. Agoniści oraz antagoniści receptora NK1 włączając SP, stosowane w medycynie klasycznej jak i nuklearnej, zostały szczegółowo opisane w pracy przeglądowej, której jestem głównym autorem [H5].



Rys. 3. Struktura SP(1-11).

Fragment SP odpowiedzialny za wiązanie z receptorem NK1 to sekwencja pięciu aminokwasów zlokalizowanych na C-końcu peptydu (Phe⁷-Phe⁸-Gly⁹-Leu¹⁰-Met¹¹-NH₂) [7-9]. Tachikiny są degradowane przez enzymy neuralne endopeptydazy (NEPs) i enzym konwertujący angiotenzynę (ACE) [10], w związku z tym biologiczny czas życia SP we krwi i tkankach to 1,5 h, podczas gdy w osoczu kilka godzin [11].

Substancja P odgrywa znaczącą rolę w etiologii wielu chorób, głównie takich jak depresja, astma, łuszczyca, nieswoiste zapalenie jelit, schizofrenia, nerwica, migrena, jak i innych chorobach układu nerwowego, w których ból stanowi objawy dominujące [12-17]. Ponadto, wyniki uzyskanych badań potwierdzają również wpływ SP na działanie układu immunologicznego [18-21], oddechowego [22, 23], pokarmowego [24, 25], kostnego [26, 27], czy też sercowo-naczyniowego [28, 29]. Zidentyfikowanie receptorów NK1 na komórkach wielu nowotworów (np. astrocytoma, neuroblastoma, melanoma, rak trzustki), w tym także glejaka (glioblastoma multiforme, GBM) [30-32] umożliwiło zastosowanie substancji P w ich leczeniu.

W badaniach *in vivo* na pacjentach biokoniugaty oparte o SP znakowane były emiterami promieniowania β^- (^{90}Y , ^{177}Lu) oraz α (^{213}Bi , ^{225}Ac). Pierwszą terapię glejaka wielopostaciowego przeprowadzono na dwudziestu pacjentach z zastosowaniem radionuklidów ^{90}Y , ^{177}Lu oraz ^{213}Bi . Radiofarmaceutyki podawano do łoża pooperacyjnej bądź też bezpośrednio do guza stosując odpowiednio dobrany cewnik [33]. Terapia była bezpieczna i dobrze tolerowana bez skutków ubocznych, prowadząc do nekrozy komórek nowotworowych. Ze względu na dużą infiltrację odległych obszarów mózgu przez komórki glejakowe, w kolejnych badaniach zastosowano terapię neoadjuwantową, gdzie radiofarmaceutyk [^{90}Y]Y-DOTAGA-SP podano do masy guza przed jej chirurgicznym usunięciem [34]. Leczenie to spowodowało lepsze otorbienie guza (oddzielenie guza od komórek mózgu) oraz redukcję krwawienia śródoperacyjnego umożliwiając dokładniejszą resekcję nowotworu. Jednakże, jak wspomniałam wcześniej, radionuklid ^{90}Y jest wysokoenergetycznym emiterem promieniowania β^- o średnim zasięgu w tkankach około 2,5 mm i w przypadku glejaków zlokalizowanych w elokwentnych częściach mózgu, gdzie znajdują się ośrodki mowy, wzroku, słuchu czy też ruchu może prowadzić do uszkodzenia zdrowych komórek. W związku z tym, w kolejnych badaniach klinicznych zastosowano emiter promieniowania α - ^{213}Bi o znacznie krótszym zasięgu w tkankach ($\sim 80 \mu\text{m}$). Pierwsze pilotażowe badania przeprowadzono na pięciu pacjentach z użyciem analogu SP – [Thi⁸, Met(O₂)¹¹]SP(1-11) o większej trwałości w organizmie [35]. Terapia nie wykazała skutków ubocznych i była dalej kontynuowana na większej liczbie pacjentów [36, 37]. Ze względu na krótki czas połowicznego rozpadu ^{213}Bi ($T_{1/2} = 45,6 \text{ min}$), efektywność terapii w przypadku większych guzów nie była zadowalająca.

Kolejne, a jednocześnie pierwsze badania *in vitro* z zastosowaniem emitera α - ^{225}Ac , radionuklidu o dłuższym czasie połowicznego rozpadu ($T_{1/2} = 9,92 \text{ d}$) oraz emitowanej znacznie większej energii ($E_{\alpha} = 27,6 \text{ MeV}$) zostały przeprowadzone przeze mnie w ramach stażu podoktorskiego [H1].

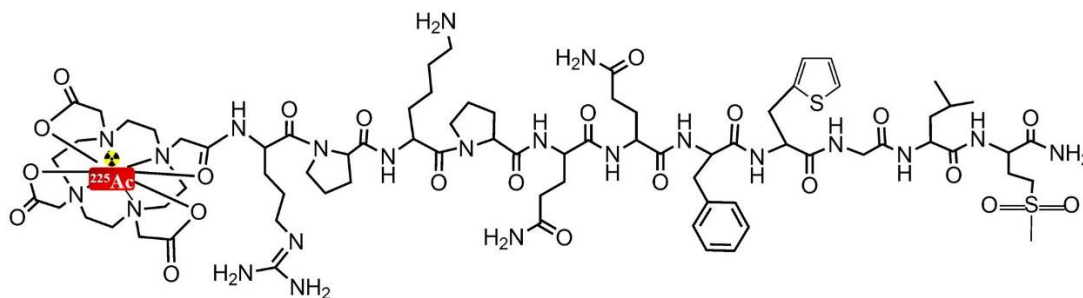
Znakowanie oraz badania biologiczne *in vitro* radiobiokoniugatu [^{225}Ac]Ac-DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP (publikacja H1)

Celem moich badań było otrzymanie potencjalnego radiofarmaceutyku mogącego znaleźć zastosowanie w celowanej terapii złośliwych guzów mózgu.

W syntezie radiofarmaceutyków bardzo istotnym parametrem jest uzyskanie wysokiej aktywności właściwej preparatu co przekłada się na jego lepsze efekty terapeutyczne. Aktywność właściwą związku wyraża się w jednostkach aktywności (radionuklidu) na mol czy

g koniugatu (np. GBq/nmol). Niska aktywność właściwa powoduje, iż niewyznakowany biokoniugat blokuje receptory na komórkach nowotworowych i wówczas radioaktywna cząsteczka ma ograniczoną możliwość połączenia się z receptorem i zniszczenia guza. Tak więc w pierwszym etapie swoich badań skupiłam się na opracowaniu warunków znakowania DOTA-[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP radioizotopem ²²⁵Ac stosując różne ilości zarówno ²²⁵Ac jak i biokoniugatu, uzyskując jednocześnie jak najwyższą aktywność właściwą preparatu oraz wysoką wydajność procesu znakowania. Aktyn jako trójdodatni kation związałam z makrocyclicznym ligandem DOTA (kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowy) skoniugowanym bezpośrednio z biomolekułą - SP. Chelator DOTA znany jest powszechnie jako środek kompleksujący głównie lantanowce tworząc z nimi połączenia o dużej trwałości kinetycznej i termodynamicznej. Jako wektor naprowadzający zastosowałam analog SP o znacznie dłuższym biologicznym okresie półtrwania ($T_{1/2} = 7,8 \pm 0,5$ h) [38] niż naturalnie występująca w organizmie SP. Peptyd ten został zmodyfikowany poprzez zamianę aminokwasów fenyloalaniny (Phe) oraz metioniny (Met) na tioninę (Thi) oraz utlenioną metioninę (Met(O₂)) nie zmieniając jednocześnie własności biologicznych cząsteczki [39].

W wyniku zoptymalizowania warunków znakowania uzyskałam radiobiokoniugat o dużej czystości radiochemicznej (> 99%) bez konieczności oczyszczania, co zostało potwierdzone metodą chromatografii cienkowarstwowej (*ang. Instant Thin Layer Chromatography, ITLC*) oraz wysokiej aktywności właściwej (3,3 MBq/nmol) (Rys. 4).



Rys. 4. Struktura otrzymanego radiobiokoniugatu [²²⁵Ac]Ac-DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP.

Otrzymany preparat charakteryzował się dużą stabilnością w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w 0,9% roztworze soli fizjologicznej z dodatkiem 1000 nadmiaru acyklicznego ligandu DTPA (kwas pentetynowy) (Rys. 2a; **H1**).

Właściwości biologiczne otrzymanego radiobiokoniugatu zbadałam na trzech liniach komórkowych ludzkiego nowotworu mózgu (T98G, U87MG, U138MG) oraz macierzystych

komórkach glejakowych (*ang. glioblastoma stem cells, GSC*) wyizolowanych bezpośrednio z guza o fenotypie CD133⁺.

Badania molekularne RT-PCR (Rys. 2b; **H1**) oraz Western blot (Rys. 2c; **H1**) potwierdziły nadekspresję receptorów NK1 na liniach T98G oraz GSC. Otrzymany radiobiokoniugat wykazał duże powinowactwo do receptorów NK1 (Rys. 2d; **H1**), gdzie wartość stałej dysocjacji K_d (stężenie liganda, który w stanie równowagi łączy się z 50% receptorów) była niewielka i wynosiła 19,2 nM, a liczba receptorów na komórce $4,6 \cdot 10^4$.

Po uzyskaniu pozytywnych wyników dotyczących selektywności SP względem receptora NK1 przeprowadziłam badania cytotoksyczności testem MTS oraz testem klonogennym. Test MTS polega na mierzeniu aktywności mitochondrialnego białka - dehydrogenazy bursztynianowej, która przekształca pomarańczową, rozpuszczalną w wodzie sól tetrazolową (bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu) do formazanu - substancji barwnej. Intensywność jego zabarwienia (absorbancja) zmierzona została przy użyciu czytnika płytek. Warto nadmienić, że formazan tworzy się tylko w przypadku komórek żywych. Test klonogenny natomiast pozwala określić zdolność komórek do proliferacji, a co za tym idzie do tworzenia kolonii.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały toksyczność preparatu w zależności od stosowanej dawki (10, 50, 100 kBq/mL) oraz czasu inkubacji (3, 4, 5, 6 dni) (Rys. 3a, 3b, 3c, 3d; **H1**). Badania wykonałam również z użyciem powszechnie stosowanego chemioterapeutyku w leczeniu pacjentów z glejakiem złośliwym - temozolomidu (Temodal, TMZ). Temozolomid jako pochodna dekarbazy w pH fizjologicznym ulega szybkiemu przekształceniu do aktywnego metabolitu wykazującego działanie alkilujące w stosunku do kwasu nukleinowego DNA (tworzenie O⁶-metyloguaniny w nici DNA) powodując jego zmiany strukturalne i fragmentację, a w konsekwencji zaburzenia syntezy DNA, RNA, syntezy białek, a także uniemożliwienie podziałów komórkowych poprzez blokadę w fazie cyklu G2/M, prowadząc ostatecznie do śmierci komórki. Dłuższy czas inkubacji oraz większa dawka radiobiokonigatu powodowały znaczącą redukcję przeżywalności w przeciwieństwie do chemioterapeutyku, który wykazywał mniejszą toksyczność wraz ze wzrostem czasu inkubacji (Rys. 3e, 3f, 3g, 3h; **H1**). Jest to zgodne z różnymi mechanizmami działania obydwu preparatów.

Wyniki testu klonogenego ujawniły, że komórki nowotworowe po dodaniu radiobiokonigatu nie tworzyły prawie kolonii (Rys. 4a; **H1**), natomiast zastosowanie dużego stężenia cytostatyku (500 μ M) wpłynęło tylko nieznacznie na redukcję proliferacji, szczególnie w przypadku linii T98G (Rys. 4b; **H1**).

Kolejnym etapem moich badań *in vitro* było określenie czy komórki glejaki po potraktowaniu różnymi dawkami radioaktywności uruchomią program apoptozy czy też ulegną szybkiej destrukcji na zasadzie nekrozy. W eksperymentach zastosowałam metodę cytometrii przepływowej z aneksyną V-FITC i jodkiem propidyny. Apoptoza to naturalna programowana śmierć komórki, natomiast nekroza spowodowana jest głównie uszkodzeniami mechanicznymi, której towarzyszy reakcja zapalna. Warto nadmienić, iż komórki nowotworowe wykazują charakterystyczną swoistą oporność na apoptozę i w związku z tym ograniczoną wrażliwość na stosowane terapie. Wyniki moich eksperymentów wykazały, że radiobiokoniugat indukował późną apoptozę po 72 h i 96 h inkubacji. Krótszy czas inkubacji (24 h) miał niewielki wpływ na programowaną śmierć komórki (Rys. 5; **H1**). W kolejnym eksperymencie zbadałam wpływ otrzymanego preparatu [²²⁵Ac]Ac-DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP na cykl komórek glejkowych stosując również metodę cytometrii, w której wykorzystuje się zjawisko zmiany poziomu ilości DNA w komórce w trakcie cyklu. Zaburzenia cyklu komórkowego wykorzystywane są w terapii przeciwnowotworowej, gdzie mechanizmy odpowiadające za ten proces stanowią miejsce uchwytu dla leku (np. cytostatyku). Przeprowadzone badania wykazały, iż radiobiokoniugat powodował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, zapobiegając przejściu komórek w fazę podziału mitotycznego M (Rys. 6; **H1**). Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku innej cząsteczki - analogu somatostatyny (DOTATOC) znakowanej również radionuklidem ²²⁵Ac [40].

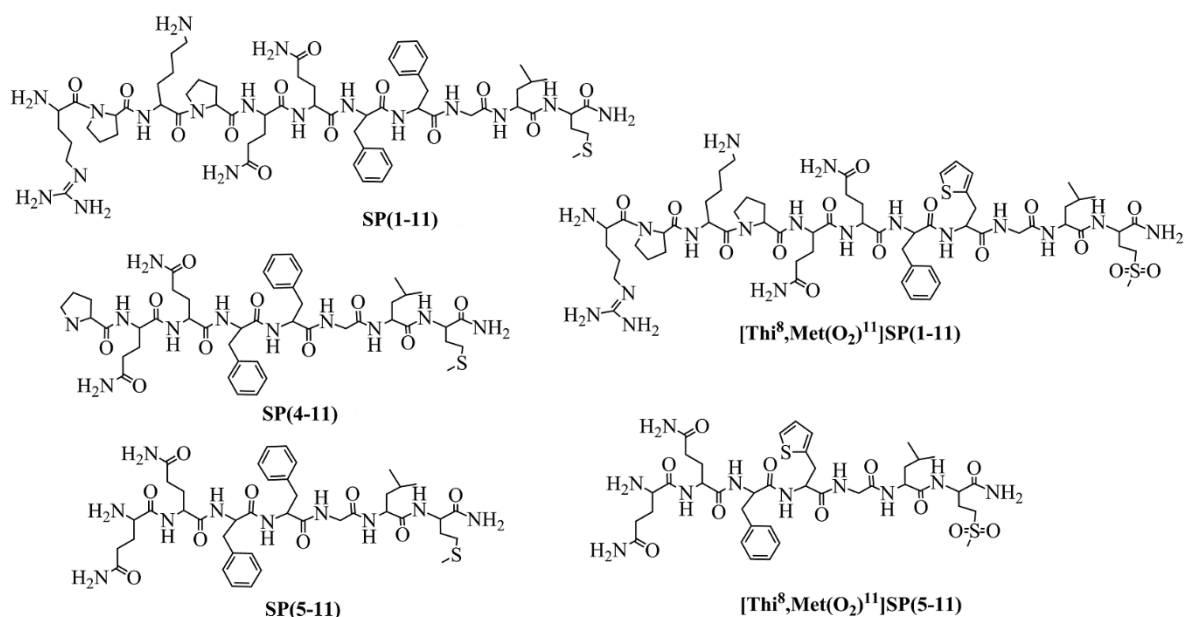
Szczególnym i pionierskim osiągnięciem było zbadanie wpływu promieniowania α na przeżywalność macierzystych komórek glejkowych – GSC (CD133⁺). Macierzyste komórki nowotworowe stanowią niewielką populację wśród komórek nowotworowych masy guza (w przypadku glejaka jest to 1 - 30%, w zależności od stopnia złośliwości) i są odpowiedzialne za jego rozwój, progresję, tworzenie przerzutów oraz nawrót choroby [41-44]. Ponadto, powszechnie stosowane metody terapeutyczne takie jak chemioterapia, radioterapia czy immunoterapia nie powodują niszczenia tych komórek. W związku z tym, skuteczne leczenie przeciwnowotworowe powinno zwalczać nie tylko zróżnicowane komórki guza, ale i populację nowotworowych komórek macierzystych. Przeprowadzone przeze mnie badania przeżywalności z zastosowaniem radiobiokoniugatu [²²⁵Ac]Ac-DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP wykazały jego toksyczność względem GSC. Jednakże, mimo stosowania wyższych dawek preparatu (100, 250, 500 kBq/mL), odsetek komórek apoptycznych był mniejszy niż w przypadku komórek glejkowych, co jest prawdopodobnie związane z ich większą opornością. Zaobserwowałam również blokadę cyklu komórkowego w fazie G2/M (Rys. 7; **H1**).

Podsumowując, zsyntezowany przeze mnie radiobiokoniugat [^{225}Ac]Ac-DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP wpływał na zmniejszenie aktywności metabolicznej komórek glejakowych w zależności od dawki i czasu inkubacji, inicjował apoptozę oraz powodował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. Dodatkowo, preparat ten wykazał toksyczność (przy wyższych dawkach radioaktywności) względem opornych na konwencjonalne metody leczenia macierzystych komórek glejakowych. Skuteczność TMZ nawet przy dużym stężeniu (500 μM) była niewielka w porównaniu do efektywności [^{225}Ac]Ac-DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP. Wg. danych literaturowych, stężenie TMZ jakie oznaczono w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów poddanych terapii tym cytostatykiem wynosiło około 5 μM [45]. Zastosowanie *in vivo* tak wysokich stężeń, które stosowałam *in vitro* na komórkach glejakowych, mogłoby doprowadzić do poważnych skutków ubocznych, w tym śmierci pacjenta.

Przeprowadzone badania *in vitro* przyczyniły się do zainicjowania przeze mnie współpracy naukowej między Zjednoczonym Ośrodkiem Badawczym Komisji Europejskiej w Karlsruhe (European Commission, Joint Research Centre, Directorate for Nuclear Safety and Security, Karlsruhe, Germany), gdzie pracowałam przez 3 lata na stażu podoktorskim, a Zakładem Medycyny Nuklearnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie i zastosowaniem radiobiokoniugatu w ramach eksperymentu medycznego na pacjentach z glejakiem wielopostaciowym. Badania te są cały czas kontynuowane, terapia jest bezpieczna, a wyniki bardzo obiecujące [46].

Synteza, badania fizykochemiczne oraz biologiczne *in vitro* analogów SP znakowanych emiterami $^{99\text{m}}\text{Tc}$ oraz ^{177}Lu (publikacja H2)

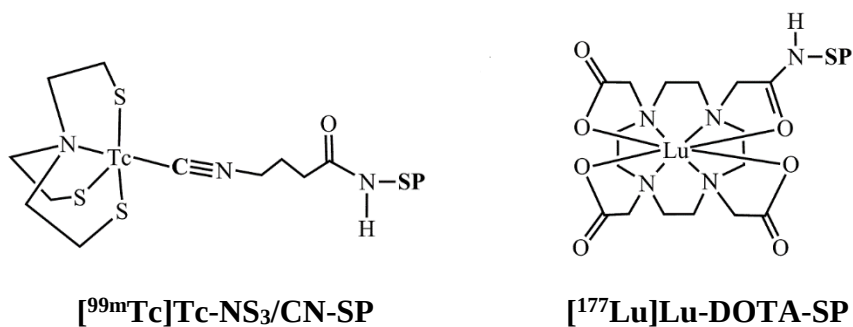
Celem badań (wychodząc naprzeciw sugestiom klinicystów) było znalezienie bardziej lipofilowego radiofarmaceutyku mogącego z łatwością przenikać w głębsze strefy guza bądź ścianek łoża pooperacyjnej, niż znakowany biokoniugat DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP, a jednocześnie wykazującego powinowactwo do receptorów NK1 na komórkach glejakowych. Do badań fizykochemicznych oraz biologicznych wybrałam naturalną SP(1-11) oraz jej cztery analogi (Rys. 5). Modyfikowana SP(1-11) stanowiła biomolekulę referencyjną ze względu na jej stosowanie w eksperymentach medycznych. Aby można było przeprowadzić proces znakowania radionuklidami $^{99\text{m}}\text{Tc}$ oraz ^{177}Lu , cząsteczki biologicznie aktywne przyłączone najpierw zostały do ligandów bifunkcyjnych – DOTA-NHS (ester kwasu 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowego) oraz CN-BFCA (ester sukcyńloimidylowy kwasu 4-izocyjanomasłowego), z którymi radioizotopy te tworzą, odpowiednio, trwałe i inertne kompleksy.



Rys. 5. Struktury SP(1-11) i jej analogów.

Otrzymane biokoniugaty zostały oczyszczone na kolumnie półpreparatywnej za pomocą metody HPLC (*ang. High Performance Liquid Chromatography*) (Rys. 8, 9; **H2**). Wydajność reakcji sprzęgania (poprzez utworzenie wiązania amidowego pomiędzy aktywnym chemicznie estrem liganda, a grupą aminową peptydu) wynosiła ~85-95%. Dodatkowo, związki te zostały scharakteryzowane techniką spektrometrii mas. Przyłączając biomolekulę do łącznika bifunkcyjnego należy pamiętać, aby grupa aminowa cząsteczki biologicznie aktywnej znajdowała się poza jej fragmentem farmakoforowym, a więc nie wpływała na jej oddziaływanie z receptorem.

W kolejnym etapie badań biokoniugaty zostały wyznakowane powszechnie dostępnymi radionuklidami: ^{99m}Tc (analog radioizotopu terapeutycznego ^{188}Re , emiter promieniowania γ , $T_{1/2}=6,01$ h, $E_{(\gamma)max}=0,141$ keV) oraz ^{177}Lu (emiter promieniowania β^- , $T_{1/2}=6,71$ d, $E_{(\beta)max}=496$ keV) (Rys. 6) i scharakteryzowane metodą HPLC (Rys. 3; **H2**). Wydajność procesu znakowania została określona za pomocą techniki ITLC (96-98%). Radiobiokoniugaty wykazały dużą stabilność w buforowanym roztworze soli fizjologicznej PBS (10^{-2} M) oraz roztworach aminokwasów cysteiny i histydyny ($10^{-3}M$) posiadających w swojej budowie aktywne chemiczne grupy SH, NH₂, COOH.



Rys. 6. Schemat budowy otrzymanych radiobiokoniugatów.

Mając na uwadze potencjalne zastosowanie SP i jej analogów w terapii glejaka wielopostaciowego postanowiłam określić stabilność biokoniugatów znakowanych ^{177}Lu w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz surowicy wyizolowanych bezpośrednio od pacjentów. Stabilność preparatów w surowicy ludzkiej oprócz techniki ITLC była również badana metodą HPLC, gdzie składniki białkowe wytrącałam za pomocą etanolu, a następnie usuwałam poprzez wirowanie. Przeprowadzone eksperymenty trwałości w płynie mózgowo-rdzeniowym wykazały dużą stabilność (96%) otrzymanych radiobiokoniugatów, nawet po 15 dniach inkubacji, podczas gdy stabilność preparatów w surowicy była bardzo niska (4-17% po 24 h) (Rys. 4, 5, 6; **H2**). Warto nadmienić, że stężenie białek w surowicy jest około dwiesięcie razy większe niż w płynie mózgowo-rdzeniowym [47]. Wyniki pokazały, że krótsze fragmenty substancji P ulegały szybszej i silniejszej degradacji enzymatycznej niż radiobiokoniugaty zawierające pełną sekwencję aminokwasów, co prawdopodobnie spowodowane jest lepszym dopasowaniem się krótszego peptydu do miejsc aktywnych enzymu. Najmniej stabilny okazał się niemodyfikowany fragment SP(5-11).

Kolejnym parametrem bardzo istotnym w ocenie radiofarmaceutyku jest jego lipofilowość, która wpływa m.in. na możliwość przechodzenia preparatu przez błony komórkowe, dystrybucję, transport zarówno w całym organizmie jak i w obrębie guza, czy też sposób jego wydalania. Lipofilowość ($\log P$, gdzie P jest współczynnikiem podziału) radiobiokoniugatów wyznaczyłam w układzie faz *n*-oktanol/PBS(pH=7,4). Preparaty technetowe charakteryzowały się kilkakrotnie większą lipofilowością niż lutetowe, co jest bezpośrednio związane z hydrofobowymi właściwościami tetradentnego ligandu NS₃ (tris(2-merkaptoetylo)aminy) w przeciwieństwie do hydrofilowych cech chelatora DOTA (obecność grup COOH). Ponadto, znakowane krótsze fragmenty SP były bardziej lipofilowe, podczas gdy zamiana aminokwasów w pozycji 8 i 11 peptydu (wydłużenie czasu biologicznego) zmniejszała jego charakter lipofilowy (Tabela 1, 2; **H2**).

W ostatnim etapie badań przeprowadziłam eksperymenty powinowactwa receptorowego trzech radiobiokoniugatów: [^{177}Lu]Lu-DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]Substance P(1–11), [^{177}Lu]Lu-DOTA-Substance P(4–11), [^{177}Lu]Lu-DOTA[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]Substance P(5–11) na linii komórkowej ludzkiego glejaka - U373MG, charakteryzującą się nadekspresją receptorów NK1 (Rys. 7; **H2**). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że wszystkie preparaty wiązały się specyficznie i wykazywały duże powinowactwo do receptora (wartości K_d w nM) (Tabela 3; **H2**). Jak oczekiwałam, wartości stałej dysocjacji K_d dla [^{177}Lu]Lu-DOTA [Thi⁸,Met(O₂)¹¹]Substance P(1–11) ($K_d=11,1$ nM) były podobne jak dla tego samego biokoniugatu znakowanego radionuklidem ²²⁵Ac ($K_d=19,2$ nM; **H1**), mimo stosowania różnych linii komórkowych.

Podsumowując, otrzymałam nowe radiobiokoniugaty oparte na krótszych fragmentach SP, mogące znaleźć zastosowanie w celowanej terapii radionuklidowej glejaków ze względu na ich powinowactwo do receptorów NK1 i większą lipofilowość w porównaniu do SP(1-11) jak i jej modyfikowanego analogu. Nie zaobserwowałam również enzymatycznej degradacji tych preparatów w płynie mózgowo-rdzeniowym. Niestety, niezadowalająca stabilność w surowicy w pewnym sensie ogranicza ich zastosowanie. Jednakże biorąc pod uwagę fakt, że radiofarmaceutyki te będą podawane bezpośrednio do żyły po resekcji guza i zakładając, że przy kolejnych podawaniach dawek w jamie pooperacyjnej nie będzie znajdować się krew, preparaty te nie będą degradowane. Niemniej należy pamiętać, że niewielka obecność krwi będzie powodować cięcie SP, dlatego też terapie te powinny być spersonalizowane i dostosowane do indywidualnego przebiegu choroby pacjenta. Ponadto, niezbędnym krokiem przed rozpoczęciem jakiegokolwiek terapii, powinna być dokładna diagnostyka.

W kolejnych moich pracach dotyczących otrzymywania nowych potencjalnych radiofarmaceutyków dla terapii agresywnych i lekoopornych nowotworów zajęłam się **trastuzumabem** jako biomolekułą naprowadzającą na nowotwory zawierające receptory HER2.

Trastuzumab (Herceptin®) jest rekombinowanym, humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym IgG1 o masie cząsteczkowej 145 kDa stosowanym w leczeniu bardzo agresywnych i opornych lekowo nowotworów piersi i jajnika z przerzutami [48] oraz HER2-dodatniego przerzutowego raka żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego. Trastuzumab łączy się selektywnie z zewnątrzkomórkową domeną IV (*ang. extracellular domain, ECD*) receptora ludzkiego czynnika wzrostu naskórka HER2 (*ang. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*). Nadekspresja receptora HER2 występuje u około 20-30%

wszystkich nowotworów piersi [49]. Ponadto, receptor ten jest wytwarzany w nadmiarze u około 22% pacjentów chorych na raka żołądka. Przeciwciało to blokuje zdolność komórek z nadekspresją HER2 do proliferacji poprzez zatrzymanie cyklu w fazie G1, osłabia proces angiogenezy, a także pobudza cytotoksyczność komórek typu ADCC (*ang. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*), zależną od przeciwciał o nadekspresji receptorów HER2. Wg. danych literaturowych trastuzumab w kombinacji z innymi cytostatykami (np. cisplatyna, tiotepa, etopozyd/doksorubicyna, paklitaksel, metotreksat, winblastyna) wykazuje synergizm lub addytywność, zwiększając stopień odpowiedzi na leczenie. Działanie terapeutyczne polega na blokowaniu mechanizmów naprawczych w komórkach nowotworowych uszkodzonych pod wpływem chemioterapii [50, 51]. Również połączenie przeciwciała z radionuklidami (Radioimmunoterapia; *ang. Radioimmunotherapy - RIT*) pozwala uzyskać silniejszy efekt terapeutyczny związany z niszczeniem komórek nowotworowych przez promieniowanie jonizujące oraz jednocześnie toksyczne działanie przeciwciała, który dodatkowo pełni rolę wektora naprowadzającego.

Klastry Au_nAt jako potencjalne nośniki ²¹¹At (publikacja H3)

Jednym z emiterów promieniowania α charakteryzującym się bardzo dobrymi własnościami jądrowymi i mogącym mieć zastosowanie w radionuklidowej terapii przeciwnowotworowej jest ²¹¹At. Jest on otrzymywany cyklotronowo, poprzez naświetlanie cząstkami α tarczy wykonanej z metalicznego bizmutu - ²⁰⁹Bi(α ,2n)²¹¹At. Astat jako pierwiastek należący do grupy 17 Układu Okresowego powinien występować w postaci jednoujemnego anionu At⁻ charakterystycznego dla grupy chlorowców. Jednak biorąc pod uwagę zmiany właściwości chemicznych pierwiastków w tej grupie, astat ze względu na bardziej metaliczny charakter zachowuje się inaczej niż pozostałe pierwiastki w grupie chlorowców. Jego własności chemicznie różnią się także znacznie od własności najbliższego sąsiada w grupie, jodu. Siła wiązania węgiel-astat jest znacznie niższa niż dla jodu, dlatego też wykorzystanie metod stosowanych do bezpośredniego znakowania biomolekuł radiojodem nie przyniosło spodziewanych efektów. Otrzymywane wyniki nie były zadowalające, ze względu na brak stabilności i uwalnianie ²¹¹At w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [52]. Od szeregu lat, w wielu ośrodkach prowadzone są badania nad alternatywnymi metodami związania ²¹¹At z biomolekułami. Dotychczas jednak nie udało się otrzymać trwałych radiofarmaceutyków astatowych.

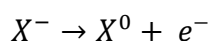
Jak wiadomo, siła wiązania węgla z chlorowcami maleje wzdłuż grupy co powoduje, że najsłabsze są połączenia z jodem i astatem. Podobne zjawisko, ale w mniejszym stopniu,

obserwowano w przypadku boru, który alternatywnie proponowano do związania ^{211}At . Zauważono jednak, że jod wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do metali szlachetnych, takich jak Ag, Au i Pt, a trwałość wiązań X-M wzrasta odpowiednio w dół grupy $\text{F} < \text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$. Przeprowadzone badania adsorpcji jonów Cl^- , Br^- , I^- na powierzchni AuNPs wykazały tworzenie się kowalencyjnego wiązania Au-X [53]. Sformułowaliśmy więc tezę, że siła wiązania At-Au powinna być wyższa niż siła wiązania Au-I i możliwe będzie przy użyciu nanotechnologii otrzymanie trwałych radiobiokoniugatów ^{211}At .

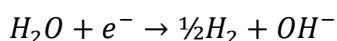
Wstępne wyniki badania adsorpcji ^{211}At na nanocząstkach złota potwierdziły te przypuszczenia. Połączenie astatu z powierzchnią złota okazało się trwalsze, niż w przypadku innych dotychczas badanych układów wiążących astat. W celu wyjaśnienia, jaki może być charakter tego wiązania i dlaczego astat tworzy tak trwałe połączenia ze złotem, prof. Dobrowolski z naszego Instytutu przeprowadził obliczenia kwantowo-mechaniczne określające siłę wiązania Au-At na nanocząstkach (nanoklastrach) złota [H3]. Niestety, ze względu na dużą złożoność układu, nie było możliwości przeprowadzenia obliczeń dla wytypowanych do dalszych badań nanocząstek złota o wymiarach 5 nm. Obliczenia wykonano dla połączeń At z pojedynczym atomem Au oraz klastrem złota, złożonego z 12 atomów (Au_{12}) o rozmiarze ok. 1,2 nm. Ponadto, obliczenia zostały przeprowadzone dla fazy gazowej. Obliczenia te pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu adsorpcji astatu na powierzchni nanocząstek złota.

Niespodziewanie, wyznaczona wartość energii wiązania Au-X okazała się dla Au-At najmniej ujemna, co oznaczałoby, że to fluor powinien najmocniej wiązać się ze złotem, astat zaś najsłabiej. Jednakże, jak zauważyliśmy, biorąc pod uwagę fakt, że obliczenia wykonano dla fazy gazowej, a halogenki w roztworze wodnym występują zazwyczaj w formie anionów, aby możliwe było utworzenie wiązania Au-X muszą kolejno zajść następujące trzy reakcje:

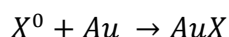
I) utlenienie anionu chlorowca do stopnia zerowego;



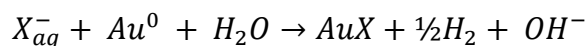
II) redukcja wody;



III) przyłączenie chlorowca na zerowym stopniu utlenienia do atomu złota;



Sumaryczna reakcja przedstawia się następująco:



W celu określenia siły wiązania anionów halogenkowych na powierzchni złota uwzględniono energie hydratacji anionów oraz ich potencjały redukcji. Anion At^- wykazuje najniższą w grupie fluorowców energię solwatacji oraz najmniej ujemny standardowy potencjał redukcji, co powoduje, że energia swobodna reakcji ΔG przyjmuje najbardziej ujemną wartość. Na tej podstawie możliwe jest wyjaśnienie, dlaczego astatki silnie adsorbują się na złocie, zaś fluorki najslabiej. Obliczenia te wyjaśniły istotę silnej chemisorpcji At i wykazały, że wyjątkowo silna adsorpcja astatu na złocie jest związana z jego wysokim potencjałem elektrodowym.

Uzyskane wyniki teoretyczne zaowocowały rozpoczęciem badań eksperymentalnych nad możliwością wykorzystania tego zjawiska do otrzymywania potencjalnego radiofarmaceutyku terapeutycznego - nanocząstek złota znakowanych radionuklidem ^{211}At i przyłączonych do biomolekuły naprowadzającej - trastuzumabu [H4].

Biokoniugaty nanocząstek złota znakowane emiterem promieniowania α - ^{211}At (publikacja H4)

Ze względu na fakt, iż kompleksy ^{211}At z biomolekułą wykazują małą stabilność *in vivo* (mała trwałość wiązania C-At), a przeprowadzone wcześniej obliczenia kwantowo-mechaniczne [H3] oraz badania eksperymentalne [54] wykazały, że astat jest bardzo silnie chemisorbowany na powierzchni złota, w pracy tej postanowiłam trwale związać ^{211}At ($T_{1/2}=7,21$ h; $E_{\alpha(\text{śred.})}=6,7$ MeV) z cząsteczką biologicznie aktywną – trastuzumabem stosując nanocząstki złota (AuNPs) jako nośniki.

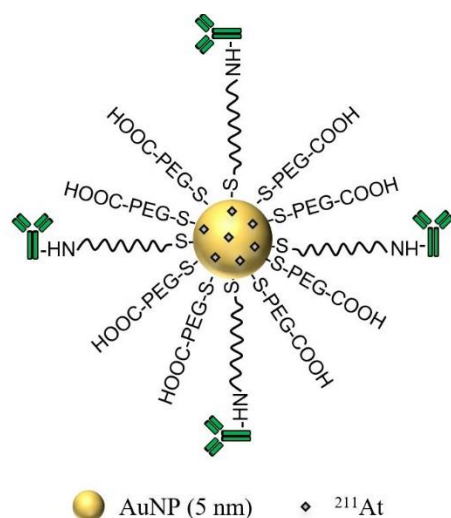
W pierwszym etapie badań zsyntezowano nanocząstki złota o rozmiarze 5 nm [55]. Wielkość nanocząstek ma istotny wpływ na ich czas cyrkulacji we krwi, szybkość dotarcia do guza, jego efektywną penetrację, a także możliwość wydalenia przez nerki. Kształt, rozmiar oraz morfologia otrzymanych nanostruktur zostały scharakteryzowane metodami DLS (Dynamiczne rozpraszanie światła, *ang. Dynamic Light Scattering*) oraz TEM (Transmisyjna mikroskopia elektronowa, *ang. Transmission Electron Microscopy*). Zdjęcia mikroskopowe pokazały, że w wyniku syntezy otrzymano małe, sferyczne nanocząstki koloidalnego złota o rozmiarze nieprzekraczającym 5 nm (Rys. 2; H4).

Nanostruktury, aby uniknąć wychwycenia przez makrofagi powinny charakteryzować się silnie hydrofilową powierzchnią [56]. Jedną z możliwości zwiększenia ich hydrofilowości jest pokrycie powierzchni nanocząstek polimerem, takim jak np. polietylenoglikol (PEG) [57, 58]. Dodatkowo, modyfikacja powierzchni wpływa znacząco na farmakokinetykę i

biodystrybucję nanocząstek w organizmie. W związku z tym, kolejnym etapem było opracowanie efektywnej i prostej metody funkcjonalizacji powierzchni, gdzie zastosowano dwufunkcyjny linker HOOC-PEG-SS-PEG-COOH zawierający w swojej strukturze mostek disiarczkowy (do łączenia z AuNPs, na zasadzie powinowactwa siarki do złota) oraz grupy karboksylowe (służące do sprzęgnięcia z cząsteczką biologicznie aktywną). Zmodyfikowane nanocząstki AuNPs-PEG-COOH poprzez aktywację grupy –COOH (otrzymując ester aktywny NHS) przyłączono do trastuzumabu tworząc wiązanie amidowe z grupą aminową lizyny (Rys. 1; **H4**).

W celu określenia średniej liczby cząsteczek przeciwciała przyłączonego do pojedynczej AuNP, trastuzumab wyznakowano radionuklidem ^{131}I i dodano podczas syntezy biokoniugatu. Technika jodowania białka polega na elektrofilowym przyłączeniu jodu do tyrozyny (w białku) przy zastosowaniu czynnika utleniającego, np. Iodogenu. Wyniki otrzymane metodą radiometryczną wykazały, że na powierzchni pojedynczej AuNP o rozmiarze 5 nm znajdują się 4 cząsteczki trastuzumabu. Dodatkowo, przyłączenie trastuzumabu do AuNPs zostało potwierdzone pomiarami rozmiaru oraz potencjału zeta przy użyciu techniki DLS (Tabela 1; **H4**). W swoich badaniach oprócz izotopu ^{211}At , który otrzymywany był w cyklotronie U200-P w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów UW w wyniku reakcji $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$, a następnie wydzielany z tarczy metodą suchej destylacji, stosowałam także radionuklid ^{131}I (jako surogat ^{211}At), ze względu na jego podobieństwo chemiczne oraz większą dostępność.

W kolejnym etapie, otrzymany biokoniugat został wyznakowany izotopami ^{131}I oraz ^{211}At z dużą wydajnością (>99%) (Tabela 2; **H4**) (Rys. 7). Mechanizm znakowania polegał na adsorpcji radionuklidów na powierzchni nanocząstek złota.



Rys. 7. Radiobiokoniugat [^{211}At]At-AuNPs-PEG-trastuzumab.

Badania stabilności radiobiokoniugatów [^{211}At]At-AuNPs-PEG-trastuzumab oraz [^{131}I]I-AuNPs-PEG-trastuzumab w surowicy wykazały niewielki wyciek radionuklidów, jednakże był on większy w przypadku biokoniugatu znakowanego radioizotopem ^{131}I (Tabela 3; **H4**). Porównując stabilność opartych na nanocząstkach złota astatowanych biokoniugatów ze stabilnością radiobiokoniugatów, gdzie ^{211}At przyłączono do pierścienia fenyłowego [59], kompleksu Rh(S4) [60] czy klastrów boronowych [61, 62] można zauważyć znacznie lepszą trwałość biokoniugatów znakowanych ^{211}At z wykorzystaniem AuNPs.

W celu określenia praktycznej możliwości zastosowania radiofarmaceutyków przeprowadziłam badania biologiczne *in vitro*. Eksperymenty powinowactwa receptorowego wykazały, iż nanocząstki z przyłączonym trastuzumabem oddziałują w sposób specyficzny z receptorami HER2 komórek nowotworowych linii SKOV-3. Parametr K_d , określający stężenie przeciwciała potrzebnego do wysycenia połowy obecnych receptorów wynosił $16,6 \pm 4,1 \text{ nM}$ i był zbliżony do wartości K_d wyznaczonej porównawczo w tych samych warunkach dla jodowanego trastuzumabu ($K_d = 10 \pm 3,2 \text{ nM}$) (Rys. 3; **H4**).

W celu zobrazowania oraz potwierdzenia specyficzności wiązania biokoniugatu z receptorem HER2 oraz wnikania związku do komórek nowotworowych SKOV-3, wykonane zostały badania z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. W komórkach inkubowanych z biokoniugatem, zaobserwowano sygnały pochodzące od AuNPs oraz trastuzumabu, podczas gdy AuNPs bez przeciwciała nie były widoczne. Otrzymane wyniki świadczą o skutecznym przenikaniu (internalizacji) związku AuNPs-PEG-trastuzumab do przestrzeni okołojądrowej komórek SKOV-3. Dodatkowo, niektóre z połączonych sygnałów zaobserwowano również w jądrze, co może wskazywać, że badany biokoniugat przechodzi przez błonę jądrową (Rys. 4; **H4**).

Badania cytotoksyczności z zastosowaniem testu MTS pozwoliły określić wpływ zsyntezowanych radiobiokoniugatów na aktywność metaboliczną komórek nowotworowych. W zależności od wielkości dawki oraz czasu inkubacji radiobiokoniugat wykazywał cytotoksyczność względem komórek SKOV-3. Wartość mediany dawki letalnej (LD_{50}) dla [^{211}At]At-AuNPs-PEG-trastuzumab wynosiła $0,55 \text{ MBq/mL}$, podczas gdy parametr LD_{50} był znacznie większy dla nanocząstek znakowanych radionuklidem bez wektora ($\text{LD}_{50} = 1,3 \text{ MBq/mL}$) (Rys. 5; **H4**). Wyniki te świadczą o bardzo dużej specyficzności oddziaływania trastuzumab - receptor HER2. Widać więc jasno, że połączenie z 5 nm nanocząstką Au nie zmniejsza istotnie oddziaływania receptorowego trastuzumabu. Ponadto, uzyskany efekt cytotoksyczności z zastosowaniem emitera promieniowania α - ^{211}At był około 7 razy

silniejszy, niż gdy AuNPs-PEG-trastuzumab znakowane były emitery β^- - ^{177}Lu , mimo, że czas połowicznego rozpadu ^{211}At jest 22 razy krótszy niż ^{177}Lu [63].

Podsumowując, w ramach przeprowadzonych badań otrzymałam innowacyjny radiobiokoniugat [^{211}At]At-AuNPs-PEG-trastuzumab, który łączy się specyficznym z receptorami HER2, internalizuje do wnętrza komórki oraz wykazuje cytotoksyczność względem komórek (SKOV-3) z nadekspresją tych receptorów. Potencjalne zastosowanie takiego radiofarmaceutyku w celowanej terapii przeciwnowotworowej wymaga przeprowadzenia badań *in vivo*. Dodatkowo, ze względu na niespecyficzne gromadzenie się preparatów opartych na nanocząstkach w różnych organach układu fagocytarnego organizmu np: wątrobie, śledzionie, podanie systemowe jest niewskazane. Związki te mogą być tylko wstrzyknięte bezpośrednio do guza lub łoża pooperacyjnej po jego resekcji. Powyższa koncepcja przypomina klasyczną brachyterapię, jednakże w odróżnieniu od niej, zamiast znakowanych radionuklidami mikrosfer stosujemy nanocząstki z przyłączoną dodatkowo cząsteczką biologicznie aktywną naprowadzającą na receptory komórek nowotworowych. Zaletą takiej terapii w porównaniu do „klasycznego” miejscowego podawania radiofarmaceutyku jest znacznie efektywniejsze gromadzenie nanobiokoniugatu w guzie lub obrębie guza. Warto także dodać, że badania z wykorzystaniem nanostruktur złota do wiązania ^{211}At są kontynuowane w czołowym ośrodku radiofarmaceutycznym na uniwersytecie Duke (USA) przez prof. M. Zalutskiego.

Zastosowanie lipidowych nanocząstek – kubosomów, jako nośników doksorubicyny i emitery promieniowania β^- - ^{177}Lu , do jednoczesnej chemo- i radioterapii nowotworów (publikacja H7)

Lekooporność komórek nowotworowych stanowi duży problem w efektywnym leczeniu pacjentów. Stosowane chemioterapeutyki czy też radioterapia powodują zmniejszenie objętości guza poprzez niszczenie tylko części komórek nowotworowych. Poszukuje się więc nowoczesnych leków o większym potencjale terapeutycznym bądź też stosuje się terapie kombinowane oparte na kilku metodach leczenia (np. chemioterapię z radioterapią). **Celem moich badań prowadzących do uzyskania silniejszego efektu terapeutycznego była synteza multimodalnego potencjalnego radiofarmaceutyku zawierającego w swojej strukturze jednocześnie chemioterapeutyk – doksorubicynę (DOX) oraz emitery promieniowania β^- - ^{177}Lu . Nośnikiem jakim zastosowałam były lipidowe ciekłokrystaliczne nanocząstki (*ang. lipid liquid-crystalline nanoparticles, LCNPs*) –**

kubosomy. Są to pierwsze badania, w których kubosomy stanowią platformę dla równoczesnej chemo- i radioterapii.

Kubosomy w przeciwieństwie do już powszechnie stosowanych liposomów charakteryzują się większą powierzchnią właściwą ($400 \text{ m}^2/\text{g}$) umożliwiającą wprowadzenie w ich strukturę większej ilości leków, a także wykazują wyższą stabilność oraz odporność na uszkodzenia mechaniczne. Uwalnianie leku z kubosomów do komórki nowotworowej indukowane jest zmianą środowiska, w tym przypadku, zmianą pH. Mikrośrodowisko guza w przeciwieństwie do zdrowych tkanek charakteryzuje się niższą wartością pH (~ 5.8). Rolą kubosomów jest transport cytostatyku do komórek nowotworowych i uwalnianie leku w miejscu docelowym, w efektywnym stężeniu. Dodatkowo, zastosowanie LCNP ma na celu ograniczenie toksyczności i niepożądanych skutków ubocznych dostarczanego chemioterapeutyku.

W ramach współpracy z Wydziałem Chemii UW przeprowadzona została synteza kubosomów o wielkości około 100 nm (średnica hydrodynamiczna 181 ± 10 nm) stosując metodę „top-down” [64]. Rozmiar zsyntezowanych nanocząstek został potwierdzony techniką DLS, natomiast ich struktura metodą SAXS (niskokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego, *ang. small-angle X-ray scattering*).

W celu uzyskania domieszkowanych radioaktywnie kubosomów, w pierwszym etapie zsyntezowano koniugat p-NSC-benzyl-DOTA-GA-OA-oleylamina (DOTAGA-OA) poprzez utworzenie wiązania NHCSNH pomiędzy grupą NCS bifunkcyjnego liganda p-NSC-benzyl-DOTA-GA, a grupą NH_2 oleylaminy (Rys. 1c; **H7**). Kompleksy metali z DOTAGA wykazują charakter hydrofilowy, w związku z tym aby można było wbudować chelator do lipidowej warstwy struktury kubicznej przyłączono go do hydrofobowej aminy – oleylaminy. Otrzymany produkt został scharakteryzowany metodami spektroskopii ^1H NMR, ^{13}C NMR (Rys. S1, S2; **H7**) oraz spektrometrii mas MS (Rys. S3; **H7**).

Badanie lipofilowości zsyntezowanego radiokoniugatu [^{177}Lu]Lu-DOTAGA-OA przeprowadzone w układzie faz *n*-oktanol/PBS pH=7,4 potwierdziło możliwość wprowadzenia związku do struktury kubicznej ($\log P = -0,84 \pm 0,14$), gdzie prawdopodobnie radioaktywny kompleks [^{177}Lu]Lu-DOTAGA jest umieszczony w kanale wodnym, natomiast sprzężona z nim oleylamina w dwuwarstwie lipidowej.

W kolejnym etapie badań zoptymalizowano warunki domieszkowania DOX oraz koniugatu DOTAGA-OA stosując ich różne ilości wagowe (Tabela 1; **H7**). Wpływ domieszkowania na strukturę kubosomów został określony metodami fizykochemicznymi: DLS, SAXS oraz cryo-EM (Mikroskopia krioelektronowa, *ang. Electron cryomicroscopy*).

Proces znakowania domieszkowanych nanocząstek ze względu na zastosowanie liganda makrocyklicznego DOTAGA został przeprowadzony w podwyższonej temperaturze 95°C, jednakże nie spowodowało to istotnych zmian w parametrach strukturalnych faz kubicznych (Tabela 2; **H7**). Stopień wyznakowania otrzymanych radiokoniugatów określony został metodą ITLC, gdzie wydajność reakcji wynosiła >99%. Badania stabilności w ludzkiej surowicy oraz buforze PBS po 24 h inkubacji wykazały ich około 78% i 86% trwałość. Niestety, dłuższy czas inkubacji powodował odpowiednio słabszą stabilność.

Eksperymenty biologiczne z zastosowaniem testu MTS przeprowadzone na linii komórkowej HeLa (nowotwór szyjki macicy) pokazały, że puste kubosomy o stężeniu monooleiny 54 µg/mL były nietoksyczne (Rys. 5A; **H7**). Unieruchomienie DOX w ciekłokrystalicznych nanocząstkach spowodowało śmierć komórek w zależności od stężenia chemioterapeutyku. Wyznaczony parametr IC₅₀ wynosił odpowiednio 0,5 oraz 0,2 µg/mL po 48 h i 72 h inkubacji (Tabela S2; **H7**). Kubosomy znakowane emitery promieniowania β⁻ wykazywały toksyczność zależnie od dawki oraz czasu inkubacji. Największą redukcję przeżywalności komórek nowotworowych zaobserwowano dla najwyższej dawki - 15 kBq/mL oraz najdłuższego czasu inkubacji 72 h (~53%) (Rys. 5A; **H7**).

W przypadku nanostruktur domieszkowanych zarówno cytostatykiem jak i radionuklidem ¹⁷⁷Lu nie uzyskano efektu synergicznego ani addytywnego w porównaniu do efektywności działania tych związków stosowanych oddzielnie. Przeżywalność komórek po 72 h inkubacji dla radiokoniugatu wynosiła 36,5±2,33% i była niewiele mniejsza niż dla nanocząstek z DOX (0,21 µg/mL) 43,6±4,26% oraz kubosomów z radionuklidem (15 kBq/mL) 47,4±3,54% (Rys. 5; **H7**). Najsilniejszy efekt działania otrzymanego radiokoniugatu uzyskano po 24 h inkubacji, co jest prawdopodobnie związane z brakiem rozpadu lipidowych struktur jeszcze po tym czasie.

Podsumowując, otrzymałam radioaktywny koniugat domieszkowany chemioterapeutykiem oraz emiterym niskoenergetycznego promieniowania β⁻ - ¹⁷⁷Lu. Preparat ten wykazywał ograniczoną stabilnością w płynach biologicznych (PBS, ludzka surowica), co jednocześnie miało wpływ na badania cytotoksyczności. Niestety, w czasie inkubacji komórek nowotworowych z radiokoniugatem nie zaobserwowano efektu synergistycznego ani też addytywnego, uzyskano tylko niewiele większą toksyczność niż w przypadku związków stosowanych pojedynczo. Biorąc pod uwagę czas połowicznego rozpadu ¹⁷⁷Lu (T_{1/2}=6,71 d) i stosunkowo niewielką stabilność kubosomów, w przyszłych badaniach planowane jest zastosowanie radionuklidu α – ²¹³Bi, o znacznie krótszym czasie połowicznego rozpadu (T_{1/2}=45,6 min). Ponadto, ²¹³Bi jako emiter promieniowania α wykazuje dużo silniejsze działanie

terapeutyczne w porównaniu do stosowanego w tych eksperymentach ^{177}Lu . Dodatkowo, przyłączenie wektora np. trastuzumabu lub antygenu błony komórkowej komórek stercza (PSMA) do kubosomów powinno zapewnić precyzyjne dostarczenie nanostruktury do określonych typów komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję receptorów, bez uszkodzania zdrowych tkanek.

Biokoniugat nanocząstek złota pokrytych platyną ($\text{Au@Pt-PEG-trastuzumab}$) do celowanej terapii elektronami Auger (publikacja H8)

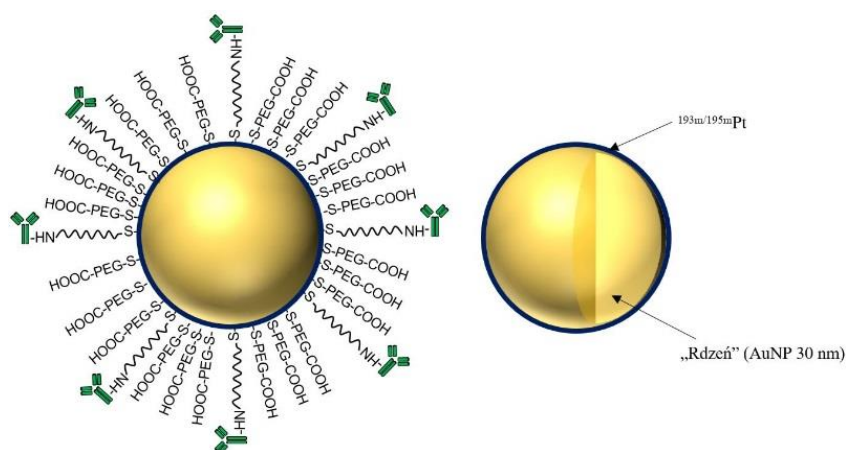
W ostatnich latach obserwuje się bardzo dobre efekty leczenia z wykorzystaniem emiterów promieniowania α . W wielu badaniach klinicznych uzyskano spektakularne wyniki w leczeniu przerzutów nowotworowych spowodowanych nowotworem prostaty dla znakowanej emiterem α - ^{225}Ac małej cząsteczki PSMA-617 [65-67]. Podanie radiofarmaceutyku [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 spowodowało całkowite wyleczenie pacjenta, mimo wcześniejszej oporności na pozostałe metody leczenia [68]. Ponadto, inne badania wskazały na ogromny potencjał α radioterapii. Pokazałam to także w pracy **H1**, w przypadku niszczenia macierzystych komórek nowotworowych. Niestety dostępność emiterów α jest ograniczona i pozwala na przeprowadzenie jedynie paru badań klinicznych rocznie. Jednak podobne właściwości jak emitowana cząstka α mogą mieć także elektrony Auger. Elektrony Auger mające krótki zasięg w tkance oraz wysoki liniowy przekaz energii (LET) mogłyby być stosowane w terapii małych zmian nowotworowych, mikroprzerzutów czy pojedynczych komórek rakowych i w przyszłości mogłyby zastąpić emitery cząstek α , gdyż ich dostępność jest znacznie większa.

Za podjęciem badań nad zastosowaniem emiterów promieniowania Auger - $^{193\text{m}}\text{Pt}$ ($T_{1/2}=4,33$ d) oraz $^{195\text{m}}\text{Pt}$ ($T_{1/2}=4,03$ d) przemawiała emisja przez nie dużej ilości elektronów Auger, odpowiednio 26 i 36. Ze względu na znane cytotoksyczne właściwości kompleksów platynowych (cisplatyna, karboplatyna), próbowano znakować je radionuklidami $^{193\text{m}}\text{Pt}/^{195\text{m}}\text{Pt}$. Otrzymywane radiokoniugaty podobnie do stosowanej cisplatyny niszczyły zarówno zdrowe jak i chore tkanki organizmu, co świadczyło o ich niskiej selektywności. Kolejną inspiracją do podjęcia badań z użyciem platyny były opublikowane wyniki pracy [69], w której odkryto, że niektóre komórki nowotworowe o wysokim potencjale oksydacyjnym, np. komórki raka wątroby HepG2 (rak wątrobowokomórkowy, *ang. hepatocellular carcinoma, HCC*), powodują utlenienie nanocząstek platyny do jonów Pt^{2+} (rozpuszczenie nanocząstek), a następnie uwolnione kationy Pt^{2+} przechodzą przez błonę do jądra komórkowego i przyłączają się do DNA powodując cytotoksyczność. Wg danych literaturowych podwyższone stężenie nadtlenu

wodoru H_2O_2 występuje również w komórkach nowotworu jajnika (np. SKOV-3), które wykazują nadekspresję HER2 [70]. **Celem kolejnych badań była synteza ukierunkowanych na receptory HER2 nanocząstek złota pokrytych cienką warstwą platyny oraz określenie ich własności biologicznych.** Są to badania wstępne z zastosowaniem nieradioaktywnej platyny, których kolejnym etapem będzie uzyskanie radioaktywnego biokoniugatu – nanocząstek typu „core-shell” mogących mieć potencjalne zastosowanie w celowanej terapii radionuklidowej elektronami Auger.

W pierwszym etapie zsyntezowano nanocząstki złota o rozmiarze 30 nm, a następnie pokryto je platyną poprzez redukcję soli sześciochlorku platyny ($Na_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$) roztworem kwasu askorbinowego. Badania metodami HR-TEM (*ang. high-resolution transmission electron microscopy*) (Rys. 1; **H8**) oraz DLS (Tabela 1, 2; **H8**) potwierdziły rozmiar otrzymanych nanocząstek. Ilość platyny przyłączona do powierzchni nanostruktur została wyznaczona metodą ICP-MS (*ang. inductively coupled plasma mass spectrometry*) poprzez pomiar jej stężenia w supernatancie, po odwirowaniu $Au@Pt$ (Rys. 3; **H8**). Bardzo ważnym aspektem w późniejszych badaniach z zastosowaniem radioaktywnej platyny jest uzyskanie monoatomowej jej warstewki na powierzchni AuNPs ze względu na bardzo krótki zasięg promieniowania Auger. W wyniku zoptymalizowania warunków reakcji przyłączania różnych ilości platyny uzyskano bardzo cienkie pokrycie, nawet jednej warstwy atomów (Tabela 1, Rys. 3; **H8**).

Do syntezy biokoniugatu wykorzystany został odpowiedni linker OPSS-PEG-NHS zawierający PEG o masie cząsteczkowej 5000 Da oraz ester aktywny, który posłużył do przyłączenia grupy NH_2 lizyny w trastuzumabie. Dodatkowo cząsteczka była stabilizowana PEGiem (HS-PEG-COOH, 5 kDa) z grupą karboksylową (Rys. 8). W celu określenia ilości cząsteczek przeciwciała skoniugowanego z nanocząstką złota pokrytą platyną, zastosowano metodę radiometryczną, gdzie trastuzumab wyznakowany radionuklidem ^{131}I dodano do syntezy biokoniugatu. Otrzymane wyniki wykazały, że na jednej nanostrukturze znajdują się około 22 cząsteczki przeciwciała.



Rys. 8. Biokoniugat Au@Pt-PEG-trastuzumab.

Każdy etap funkcjonalizacji powierzchni został potwierdzony pomiarem wielkości nanokoniugatu oraz potencjału zeta stosując metodę DLS (Tabela 2; **H8**). Badania tą techniką wykazały również, że zsyntezowany biokoniugat był stabilny w buforze PBS oraz roztworze soli fizjologicznej, nie zaobserwowano aglomeracji nanocząstek po czasie 7 dni w temperaturze 37°C (Rys. 6; **H8**).

Otrzymane wyniki powinowactwa receptorowego jednoznacznie wskazały na wystąpienie specyficznego wiązania pomiędzy przeciwciałem przyłączonym do powierzchni nanocząstek, a receptorami zlokalizowanymi na powierzchni komórek SKOV-3 (Rys. 7A; **H8**). W przypadku linii komórkowej MDA-MB-231 (HER2 negatywnej) nie zaobserwowano efektu wiązalności (Rys. 7B; **H8**), co potwierdziło selektywność otrzymanego związku.

Istotnym aspektem terapii elektronami Auger jest konieczność dostarczenia radiofarmaceutyku w bardzo bliskie sąsiedztwo DNA, a więc wymagana jest jego internalizacja. Przeprowadzone eksperymenty z zastosowaniem linii komórkowej SKOV-3 wykazały, że biokoniugat już po 1 h inkubacji ulega około 95% internalizacji (Rys. 9; **H8**). W celu zobrazowania gromadzenia się związku w komórce przeprowadzono badania mikroskopią konfokalną. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że biokoniugat po przejściu przez błonę komórkową akumuluje się w przestrzeni okołojądrowej pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną membraną (Rys. 10; **H8**), a nawet częściowo w jądrze (Rys. 12; **H8**). Efektu tego nie zaobserwowano dla linii HER2 negatywnej – MDA-MB-231 (Rys. 11; **H8**).

Analizując wyniki cytotoksyczności wykonane testem MTS można zauważyć, że wpływ biokoniugatu na aktywność metaboliczną zarówno komórek SKOV-3 jak i MDA-MB-231 jest bardzo niewielki (Rys. 14; **H8**). Biorąc pod uwagę dane literaturowe, gdzie nanocząstki złota pokryte zostały monowarstwą/multiwarstwą platyny [71] przeprowadzono badania

cytotoksyczności Au@Pt dla większych stężeń platyny osadzonej na powierzchni AuNPs niż w zsyntezowanym biokoniugacie, tj. 10 µg/mL oraz 145 µg /mL. Wyniki wykazały, że stosowane stężenia platyny nie powodowały śmierci komórek nowotworowych SKOV-3, natomiast redukcję przeżywalności zaobserwowano w przypadku linii HepG2 dla dawki 145 µg/mL (Rys. 15; **H8**). Komórki raka wątroby, jak wcześniej wspomniano, charakteryzują się dużym potencjałem oksydacyjnym i utleniając platynę powodują uwolnienie Pt²⁺ i cytotoksyczność. Wyniki te stanowią inspirację do podjęcia kolejnych eksperymentów chemiczno-biologicznych (np. zbadanie stężenia reaktywnych form tlenu - *ang. reactive oxygen species, ROS*), w których można byłoby określić terapeutyczny mechanizm działania biokoniugatu ze względu na przyłączoną platynę.

Reasumując, otrzymałam biokoniugat Au@Pt-PEG-trastuzumab, który jest stabilny, wykazuje powinowactwo do receptorów HER2 i internalizuje w pobliże jądra. Dodatkowo, nanocząstki Au@Pt przy większych ilościach platyny na powierzchni powodują cytotoksyczność komórek raka wątroby o naturalnie zwiększonym stężeniu nadtlenu wodoru w cytoplazmie. Kolejnym etapem tych badań będzie zastąpienie „nieradioaktywnej” platyny radionuklidami emitującymi promieniowanie Auger - ^{193m}Pt i ^{195m}Pt oraz przeprowadzenie badań biologicznych zarówno na linii komórkowej SKOV-3, jak i HepG2. Warto nadmienić, iż skuteczność promieniowania Auger jest związana z bezpośrednim oddziaływaniem prowadzącym do uszkodzenia DNA czy też innych struktur komórkowych, bądź też zależy od generacji reaktywnych form tlenu i jest to działanie pośrednie. Jeżeli efekt rozpuszczania się nanocząstek platyny w komórkach nowotworowych o dużym potencjale utleniającym (np. HepG2) potwierdzi się, to w przypadku radioaktywnych nanocząstek zawierających emiter Auger ^{193m/195m}Pt będziemy mogli osiągnąć selektywne niszczenie komórek nowotworowych przez elektrony Auger. Takiego efektu nie udało się dotychczas uzyskać dla innych radiofarmaceutyków stosowanych w terapii elektronami Auger. Dodatkowym aspektem prowadzącym do zwiększenia cytotoksyczności, a jednocześnie ograniczenia skutków ubocznych terapii jest przyłączenie cząsteczki biologicznie aktywnej ukierunkowanej na konkretne receptory, w tym przypadku HER2. Niestety, badania powinowactwa receptorowego z zastosowaniem peptydu SP94 ([¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-SP94), który wg. danych literaturowych wykazuje nadekspresję receptora GRP78 znajdującego się na komórkach raka wątroby [72], nie wykazały specyficznego łączenia się tego koniugatu z receptorami na komórkach linii HepG2 (Rys. 8; **H8**), co eliminuje dalsze jego stosowanie w celowanej terapii. Uzyskany efekt terapeutyczny pochodzący bezpośrednio od promieniowania Auger oraz będący efektem

rozpuszczania się nanocząstek platyny może być mniejszy ze względu na brak selektywnego wektora wykazującego powinowactwo do komórek raka wątroby.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć będących podstawą postępowania habilitacyjnego:

Przedstawione w cyklu publikacji wyniki badań radiobiokoniugatów ukierunkowanych na terapię jednych z najbardziej agresywnych i opornych lekowo nowotworów mózgu, piersi i jajników przyczyniły się do zaproponowania nowych skuteczniejszych metod leczenia tych nowotworów. Pragnę tutaj podkreślić, że prace związane z projektowaniem nowych receptorowych radiofarmaceutyków to dziedzina interdyscyplinarna, wymagająca umiejętności i wiedzy m. in. z chemii organicznej, chemii koordynacyjnej, radiochemii, a nawet radiobiologii. Stąd też, aby uwiarygodnić swoje osiągnięcia i innowacyjne rozwiązania w dziedzinie chemii radiofarmaceutyków, musiałam wielokrotnie wykonywać wiele badań i testów o charakterze badań biologicznych.

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych w ramach moich badań należy:

- zaprojektowanie, synteza i charakteryzacja chemiczno-biologiczna innowacyjnego radiofarmaceutyku [^{225}Ac]Ac-DOTA-SP przeznaczonego do terapii nowotworów mózgu, który wykazywał cytotoksyczność nie tylko względem komórek nowotworowych ale także, co jest bardzo istotne, wobec opornych na konwencjonalne metody leczenia glejakowych komórek macierzystych. Są to pierwsze badania w których wykazano skuteczność promieniowania α dla trudnych do zniszczenia GSC. Preparat ten stosowany jest obecnie w ramach eksperymentu medycznego i podawany jest bezpośrednio do łoży po resekcji guza;
- wykazanie, że krótsze fragmenty SP – SP(4-11), SP(5-11) są bardziej lipofilowe niż dotychczas stosowany koniugat [Thi^8 , $\text{Met}(\text{O}_2)^{11}$]SP(5-11) przez co z łatwością mogą przenikać przez błony komórkowe, a jednocześnie zachowują powinowactwo do receptorów NK1. Mogłoby to pozwolić na systemowe podawanie radiofarmaceutyków opartych na tych biomolekułach. Niestety radiobiokoniugaty oparte na krótkich fragmentach SP charakteryzują się słabą stabilnością w surowicy, co może ograniczać ich zastosowanie w systemowej terapii glejaków, a także w miejscowej terapii, ponieważ w niektórych przypadkach po resekcji guza w wyniku uszkodzenia bariery krew-mózg dochodzi do wysięgu płynu surowiczego. Jednak przeprowadzone badania sugerują także, że na uwagę zasługuje preparat oparty na fragmencie

SP(4-11). Radiobiokoniugat [^{177}Lu]Lu-DOTA-SP(4-11) wykazuje prawie dwukrotnie wyższą lipofilowość oraz niewiele niższą stabilność w porównaniu do stosowanego obecnie w terapii preparatu opartego na biokoniugacie DOTA- [Thi⁸,Met(O₂)¹¹]SP(1-11);

- określenie za pomocą obliczeń kwantowo-mechanicznych mechanizmu wiązania astatu na powierzchni nanocząstek złota, który polega na tworzeniu się silnego wiązania kowalencyjnego Au-At, którego źródłem jest najmniej dodatni potencjał utlenienia At⁻ do At⁰;

- na podstawie wyników kwantowo-mechanicznych oddziaływania astat-złoto zaprojektowanie i zsyntezowanie nowego radiofarmaceutyku astatowego. Otrzymany radiobiokoniugat [^{211}At]At-AuNPs-PEG-trastuzumab był trwały w warunkach *in vitro*, wykazywał wysokie powinowactwo do receptorów HER2 oraz dużą cytotoksyczność,

- zaprojektowanie i otrzymanie multimodalnego radiofarmaceutyku zawierającego jednocześnie chemioterapeutyk oraz emiter promieniowania β^- - ^{177}Lu , w którym lipidowe nanocząstki - kubosomy pełnią rolę nośników. Niestety, ze względu na ograniczoną trwałość kubosomów nie uzyskano efektu synergicznego ani też addytywnego, ale wykazano silniejszy efekt cytotoksyczności niż w przypadku stosowania tych związków oddzielnie. Badania te będą kontynuowane z użyciem krótko-życiowego emitery promieniowania α – ^{213}Bi ;

- opracowanie metody pokrycia nanocząstek złota cienką warstwą platyny oraz przyłączenie trastuzumabu w celu otrzymania radiobiokoniugatu receptorowego do terapii elektronami Auger. Dodatkowo, wykazano toksyczność związku w stosunku do komórek raka wątroby charakteryzujących się wysokim potencjałem oksydacyjnym. Badania te są kontynuowane z użyciem emitery promieniowania Auger - $^{193\text{m}}\text{Pt}$ oraz $^{195\text{m}}\text{Pt}$ zamiast nieradioaktywnej platyny. W świetle ostatnich danych literaturowych dotyczących rozpuszczania nanocząstek platyny w płynach biologicznych zawierających duże stężenia ROS oraz otrzymanych wstępnych wyników eksperymentalnych można się spodziewać, że taki radiobiokoniugat może być pierwszym radiofarmaceutykiem opartym na emiterych elektronów Auger selektywnie działającym na komórki rakowe.

Obecnie w leczeniu zaawansowanych nowotworów, ze względu na występowanie dużych skutków ubocznych chemioterapii, badania naukowe są głównie skierowane na poszukiwanie nowoczesnych leków celowanych. Zaprojektowane i otrzymane przeze mnie radiobiokoniugaty, które uważam za swoje osiągnięcie naukowe, są preparatami ukierunkowanymi na konkretne receptory: NK1 oraz HER2. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskanych badań mogę stwierdzić, iż jednymi z najbardziej obiecujących emitery promieniowania korpuskularnego ze względu na ich krótki zasięg oraz dużą liniową energię

przekazu (LET) są radionuklidy emitery cząstek α oraz elektronów Auger. Za zastosowaniem tych radioizotopów w moich dalszych badaniach przemawia fakt, że cząstki α , jak pokazały wyniki moich eksperymentów, i jak można przypuszczać elektrony Auger, powodują niszczenie także macierzystych komórek nowotworowych. Do tej pory nie znaleziono skutecznego leku, który powodowałby śmierć opornych komórek macierzystych. Są to badania, które mogą dać nadzieję pacjentom cierpiącym na najcięższe choroby nowotworowe. Dlatego aktualnie planuję zająć się szeroko zbadaniem cytotoksycznego działania radiofarmaceutyków opartych na emiterach α i elektronach Auger na macierzyste komórki nowotworowe.

Literatura

- [1] E. M. Hurt, W. L. Farrar. Purification and characterization of cancer stem cells (Section I). Cancer stem cell ed. by W. L. Farrar, Cambridge University Press, 2010, pp. 1-14.
- [2] V. Tolmachev, J. Carlsson, H. Lundqvist. A limiting factor for the progress of radionuclide-based cancer diagnostics and therapy Availability of suitable radionuclides. *Acta Oncologica*, 2004, 43, 264.
- [3] A. I. Kassis, S. J. Adelstein. Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. *J. Nucl. Med.*, 2005, 46, 4S–12S.
- [4] P. Carmaliet, R. K. Jain. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407, 249.
- [5] H. Hong, Y. Zhang, J. Sun, W. Cai. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano Today*, 2009, 4 (5), 399.
- [6] B. Lisowska. Rola i znaczenie Substancji P. *Geriatrics* 2007, 1, 18.
- [7] G. J. Graham, J. M. Stevens, N. M. Page, A. D. Grant, S. D. Brain, P. J. Lowry, J. M. Gibbins. Tachykinins regulate the function of platelets. *Blood* 2004, 104, 1058.
- [8] A. Mashaghi, A. Marmalidou, M. Tehrani, P. M. Grace, C. H. Pothoulakis, R. Dana. Neuropeptide Substance P and the Immune Response. *Cell Mol Life Sci.* 2016, 73, 4249.
- [9] E. F. Grady, A. M. Garland, P. D. Gamp, M. Lovett, D. G. Payan, N.W. Bunnett. Delineation of the Endocytic Pathway of Substance P and Its Seven-Transmembrane Domain NK1 Receptor. *Mol Biol Cell* 1995, 6, 509.
- [10] M. Muñoz, J. Martinez-Armesto, R. Coveñas. NK-1 receptor antagonists as antitumor drugs: A survey of the literature from 2000 to 2011. *Expert Opin Ther.* 2012, 22, 735.
- [11] P. Datar, S. Srivastava, E. Coutinho, G. Govil. Substance P: Structure, Function, and Therapeutics. *Curr Top Med Chem* 2004, 4, 75.
- [12] R. Barker. Substance P and neurodegenerative disorders. A speculative review. *Neuropeptides* 1991, 20, 73.
- [13] N. M. Rupniak. Elucidating the antidepressant actions of substance P (NK1 receptor) antagonists. *Curr Opin Investig Drugs* 2002, 3, 257.
- [14] W. H. Berrettini, D. R. Rubinow, J. I. Nurnberger Jr, S. Simmons-Alling, R. M. Post, E. S. Gershon. CSF substance P immunoreactivity in affective disorders. *Biol Psychiatry* 1985, 20(9), 965.
- [15] L. Heikkilä, R. Rimon, L. Terenius. Dynorphin A and substance P in the cerebrospinal fluid of schizophrenic patients. *Psychiatry Res* 1990, 34(3), 229.
- [16] M. K. Herbert, P. Holzer. Why are substance P(NK1)-receptor antagonists ineffective in pain treatment? *Anaesthesia* 2002, 51(4), 308.
- [17] L. A. Chahl. Tachykinins and neuropsychiatric disorders. *Curr Drug Targets.* 2006, 7(8), 993.

- [18] D. W. Pascual, J. R. McGhee, H. Kiyono, K. L. Bost. Neuroimmune modulation of lymphocyte function-I. SubstanceP enhances immunoglobulin synthesis in lipopolysaccharide activated murine splenic B cell cultures. *Int Immunol* 1991, 3(12), 1223.
- [19] D. W. Pascual, J. C. Xu-Amano, H. Kiyono, J. R. McGhee, K. L. Bost. Substance P acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. *J Immunol* 1991, 146(7), 2130.
- [20] T. M. O'Connor, J. O'Connell, D. I. O'Brien, T. Goode, C. P. Bredin, F. Shanahan. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004, 201(2), 167.
- [21] G. J. Graham, J. M. Stevens, N. M. Page, A. D. Grant, S. D. Brain, P. J. Lowry, J. M. Gibbins. Tachykinins regulate the function of platelets. *Blood* 2004, 104, 1058.
- [22] G. F. Joos, P. R. Germonpre, R. A. Pauwels. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 2000, 55(4), 321.
- [23] K. O. De Swert, G. F. Joos. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur J Pharmacol* 2006, 533(1-3), 171.
- [24] M. Lordal, A. Hallgren, O. Nylander, P. M. Hellstrom. Tachykinins increase vascular permeability in the gastrointestinal tract of the rat. *Acta Physiol Scand* 1996, 156(4), 489.
- [25] P. T. Schmidt, M. Lordal, B. Gazelius, P. M. Hellstrom. Tachykinins potently stimulate human small bowel blood flow: a laser Doppler flowmetry study in humans. *Gut* 2003, 52(1), 53.
- [26] T. Goto, T. Tanaka. Tachykinins and tachykinin receptors in bone. *Microsc Res Tech* 2002, 58(2), 91.
- [27] T. Goto, K. Nakao, K. K. Gunjigake, M. A. Kido, S. Kobayashi, T. Tanaka. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides* 2007, 41(1), 25.
- [28] D. A. Walsh, D. F. McWilliams. Tachykinins and the cardiovascular system. *Curr Drug Targets* 2006, 7(8), 1031.
- [29] D. B. Hoover, Y. Chang, J. C. Hancock, L. Zhang. Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol* 2000, 84(4), 367.
- [30] J. M. Allen, N. R. Hoyle, J. C. Yeats, M. A. Ghatei, D. G. Thomas, S. R. Bloom. Neuropeptides in neurological tumours. *J Neurooncol* 1985, 3, 197.
- [31] I. M. Henning, J. A. Laissue, U. Horisberger, J. C. Reubi. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer* 1995, 61, 786.
- [32] C. Palma, F. Nardelli, S. Manzini, C. A. Maggi. Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *British J Cancer*. 1999, 79(2), 236.
- [33] S. Kneifel, D. Cordier, S. Good, M. C. S. Ionescu, A. Ghaari, S. Hofer, M. Kretschmar, M. Tolnay, C. Apostolidis, B. Waser, M. Arnold, J. Mueller-Brand, H. R. Maecke, J. C. Reubi, A. Merlo. Local Targeting of Malignant Gliomas by the Di_usible Peptidic Vector 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1-Glutaric Acid-4,7,10-Triacetic Acid-Substance P. *Clin Cancer Res* 2006, 12, 3843.
- [34] D. Cordier, F. Forrer, S. Kneifel, M. Sailer, L. Mariani, H. Maecke, J. Muller-Brand, A. Merlo. Neoadjuvant targeting of glioblastoma multiforme with radiolabeled DOTAGA–substance P—Results from a phase I study. *J Neurooncol* 2010, 100, 129.
- [35] D. Cordier, F. Forrer, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, C. Apostolidis, S. Good, J. Müller-Brand, H. Mäcke, J. C. Reubi, A. Merlo. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ²¹³Bi-DOTA-[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]-substance P: A pilot trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010, 37, 1335.
- [36] L. Królicki, F. Bruchertseifer, J. Kunikowska, H. Koziara, B. Królicki, M. Jakuciński, D. Pawlak, C. Apostolidis, S. Mirzadeh, R. Rola, A. Merlo, A. Morgenstern. Prolonged survival in secondary glioblastoma following local injection of targeted alpha therapy with ²¹³Bi-substance P analogue. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018, 45, 1636.

- [37] L. Królicki, F. Bruchertseifer, J. Kunikowska, H. Koziara, B. Królicki, M. Jakuciński, D. Pawlak, C. Apostolidis, S. Mirzadeh, R. Rola, A. Merlo, A. Morgenstern. Safety and efficacy of targeted alpha therapy with ^{213}Bi -DOTA-substance P in recurrent glioblastoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2019, 46, 614.
- [38] S. Good, Ph D thesis entitled. “Entwicklung neuer rezeptorgesteuerter Radiopharmazeutika für die Therapie von malignen Hirntumoren und medullären Schilddrüsenkarzinomen”, Basel, Switzerland, 24.10.2006, supervisor prof. H. Maecke
- [39] A. Merlo, H. Mäcke, J. C. Reubi, S. Good. Radiolabeled Conjugates Based on Substance P and the Uses. Thereof. Patent No. WO 2004/082722, 30 September 2004.
- [40] F. Graf, J. Fahrner, S. Maus, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, S. Venkatachalam, C. Fottner, M. M. Weber, J. Huelsenbeck, M. Schreckenberger, B. Kaina, M. Miederer. DNA double strand breaks as predictor of efficacy of the alpha-particle emitter Ac-225 and the electron emitter Lu-177 for somatostatin receptor targeted radiotherapy. *PLoS ONE* 2014, 9, 88239.
- [41] S. K. Singh, I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, P. B. Dirks. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003, 63, 5281.
- [42] C. T. Jordan, M. L. Guzman, M. Noble. Cancer stem cells. *The New Eng J Med* 2006, 355, 1253.
- [43] S. Bao, Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner, J. N. Rich. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006, 444(7120), 756.
- [44] G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black, J. S. Yu. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006, 5, 67.
- [45] S. Ostermann, C. Csajka, T. Buclin, S. Leyvraz, F. Lejeune, L. A. Decosterd, R. Stupp. Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. *Clin Cancer Res* 2004, 10, 3728.
- [46] L. Królicki, F. Bruchertseifer, J. Kunikowska, H. Koziara, D. Pawlak, R. Kuliński, R. Rola, A. Merlo, A. Morgenstern. Dose escalation study of targeted alpha therapy with [^{225}Ac]Ac-DOTA-substance P in recurrence glioblastoma – safety and efficacy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021.
- [47] E. R Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell. Principles of Neural Science, 4th ed.; Chapter 57; The McGraw-Hill Companies, New York, NY, USA, 2000; Volume 4, pp. 1295–1298.
- [48] M. M. Goldenberg. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther* 1999, 2, 309.
- [49] N. E. Hynes, D. F. Stern. The biology of erbB-VneuHER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1198, 165.
- [50] M. Pegram, S. Hsu, G. Lewis, R. Pietras, M. Beryt, M. Sliwkowski, D. Coombs, D. Baly, F. Kabbinavar, D. Slamon. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999, 18, 2241.
- [51] M. D. Pegram, A. Lopez, G. Konecny, D. J. Slamon, Trastuzumab and chemotherapeutics: drug interactions and synergies. *Semin Ocol* 2000, 27 (6 Suppl 11), 21.
- [52] K. Berei, L. Vasaros. Organic Chemistry of Astatine. Hungarian Academy of Sciences, Central Research Institute for Nuclear Physics 1981, 114, Budapest, Hungary.
- [53] Z. Zhang, H. Li, F. Zhang, Y. Wu, Z. Guo, L. Zhou and J. Li. Investigation of Halide-Induced Aggregation of Au Nanoparticles into Sponge like Gold. *Langmuir*, 2014, 30, 2648.
- [54] L. Dziawer, P. Kozminski, S. Meczynska-Wielgosz, M. Pruszyński, M. Łyczko, B. Wąs, G. Celichowski, J. Grobelny, J. Jastrzębski, A. Bilewicz. Gold nanoparticle bioconjugates labelled with ^{211}At for targeted alpha therapy. *RSC Adv* 2017, 7, 41024.
- [55] K. Soliwoda, E. Tomaszewska, B. Tkacz-Szczesna, E. Mackiewicz, M. Rosowski, A. Bald, C. Blanck, M. Schmutz, J. Novák, F. Schreiber, G. Celichowski, J. Grobelny. Effect of the alkyl chain

length of secondary amines on the phase transfer of gold nanoparticles from water to toluene. *Langmuir* 2014, 30, 6684.

[56] S. M. Moghimi, J. Szebeni. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 2003, 42, 463.

[57] M. C. Garnett, P. Kallinteri. Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. *Occup Med (Lond)* 2006, 56(5), 307.

[58] A. Verma, F. Stellacci. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small* 2010, 6(1), 12.

[59] M. R. Zalutsky, A. S. Narula. Astatination of proteins using an N-succinimidyl tri-n-butylstannyl benzoate intermediate. *Appl Radiat Isot* 1988, 39, 227.

[60] M. Lyczko, M. Pruszyński, A. Majkowska-Pilip, K. Lyczko, B. Was, S. Meczynska-Wielgosz, M. Kruszewski, K. Szkliniarz, J. Jastrzebski, A. Stolarz, A. Bilewicz. ^{211}At labeled substance P (5–11) as potential radiopharmaceutical for glioma treatment. *Nucl Med Biol* 2017, 53, 1.

[61] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, R. R. Srivastava, M. K. Chyan. Synthesis, radioiodination, and biodistribution of some nido- and closo-monocarbon carborane derivatives. *Nucl Med Biol* 2004, 31, 523.

[62] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, R. R. Srivastava. Radioiodinations of nido-carboranes. Potential hydrophilic pendant groups for radiohalogenation of biological molecules. *J Labelled Comp Radiopharm* 1994, 35, 199.

[63] S. Rasaneh, H. Rajabi, M. H. Babaei. Toxicity of trastuzumab labeled ^{177}Lu on MCF7 and SKBr3 cell lines. *Appl Radiat Isot* 2010, 68, 1964.

[64] E. Nazaruk, A. Majkowska-Pilip, R. Bilewicz. Lipidic Cubic-Phase Nanoparticles-Cubosomes for Efficient Drug Delivery to Cancer Cells. *Chempluschem* 2017, 82, 570.

[65] C. Kratochwil, F. Bruchertseifer, F. L. Giesel, M. Weis, F. A. Verburg, F. Mottaghy, K. Kopka, C. Apostolidis, U. Haberkorn, A. Morgenstern. ^{225}Ac -PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Nucl Med* 2016, 57 (12) 1941.

[66] M. Sathekge, F. Bruchertseifer, O. Knoesen, F. Reyneke, I. Lawal, T. Lengana, C. Davis, J. Mahapane, C. Corbett, M. Vorster, A. Morgenstern. ^{225}Ac -PSMA-617 in chemotherapy-naïve patients with advanced prostate cancer: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019, 4, 129.

[67] C. Kratochwil, U. Haberkorn, F. L. Giesel. ^{225}Ac -PSMA-617 for Therapy of Prostate Cancer. *Semin Nucl Med* 2020, 50(2).

[68] H. Rathke, F. Bruchertseifer, C. Kratochwil, H. Keller, F. L. Giesel, C. Apostolidis, U. Haberkorn, A. Morgenstern. First patient exceeding 5-year complete remission after ^{225}Ac -PSMA-TAT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 18 May 2020.

[69] M. S. Shoshan, T. Vonderach, B. Hattendorf, H. Wennemers. Peptide-coated platinum nanoparticles with selective toxicity against liver cancer cells. *Angew Chem Int Ed* 2019, 58, 4901.

[70] T. P. Szatrowski, C. F. Nathan. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991, 51, 794.

[71] T. Mironava, M. Simon, M. H. Rafailovich, B. Rigas. *Toxicol Vitro* 2013, 27(2), 882.

[72] Y. Li, Y. Hu, J. Xiao, G. Liu, X. Li, Y. Zhao, H. Tan, H. Shi, D. Cheng. Investigation of SP94 peptide as a specific probe for hepatocellular carcinoma imaging and therapy. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej:

W latach 2010-2013 odbyłam staż podoktorski w zespole prof. A. Morgensterna w Zjednoczonym Centrum Badawczym (Joint Research Centre, JRC) Komisji Europejskiej w Karlsruhe, w Niemczech. Grupa jako nieliczna w świecie od wielu lat zajmuje się zastosowaniem emiterów promieniowania α (głównie ^{213}Bi oraz ^{225}Ac) w medycynie nuklearnej.

Celem jednego z projektów, w realizację którego byłam zaangażowana, było opracowanie nowego radiofarmaceutyku opartego na biomolekule - substancji P (wykazującej nadekspresję receptorów NK1) mogącego mieć potencjalne zastosowanie w celowanej terapii glejaka. Zsyntezowany przeze mnie radiobiokoniugat [^{225}Ac]Ac-DOTA-SP wykazywał powinowactwo oraz cytotoksyczność do nowotworowych komórek mózgu [H1]. Ponadto były to pierwsze badania, gdzie związek DOTA-SP wyznakowany emiterem α okazał się skuteczny względem macierzystych komórek nowotworowych czyli komórek opornych na standardowe metody leczenia takie jak radio-, chemo- i immunoterapia.

Owocem tej pracy było zainicjowanie przeze mnie badań klinicznych z zastosowaniem radiofarmaceutyku [^{225}Ac]Ac-DOTA-SP w terapii nowotworów złośliwych mózgu, które są obecnie prowadzone w Zakładzie Medycyny Nuklearnej, w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym WUM. Preparat podawany jest bezpośrednio do łoża, po resekcji guza.

Współpraca z ośrodkiem JRC jest cały czas przeze mnie kontynuowana o czym mogą świadczyć wspólne publikacje. Ponadto, w ramach konsorcyjnego grantu Agencji Badań Medycznych na działalność badawczo - rozwojową w zakresie niekomercyjnych badań klinicznych „Ocena skuteczności leczenia chorych z nowotworami neuroendokrynnymi i nieresekcyjnymi przerzutami do wątroby, z użyciem analogu somatostatyny znakowanego alfa emiterem, ^{225}Ac -DOTATATE” prowadzę badania z zastosowaniem radiofarmaceutyku [^{225}Ac]Ac-DOTATATE na pacjentach chorych na guzy neuroendokrynne (nowotwory wykazujące nadekspresję receptorów somatostatyny - SST2). Terapia jako pierwsza w Europie prowadzona jest od listopada 2019 roku, a uzyskiwane wyniki są bardzo obiecujące.

Współpraca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora:

- Instytut Chemii Jądrowej, Uniwersytet Johanna Gutenberga, Moguncja, Niemcy - prof. Frank Roesch

- Instytut Technologii Nuklearnych, Lizbona, Portugalia - dr Maria Neves
- Narodowe Laboratorium Energii i Geologii, Lizbona, Portugalia - dr Fatima Teixeira

Współpraca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora:

- Joint Research Centre, European Commission, Karlsruhe, Niemcy - prof. Alfred Morgenstern, dr Frank Bruchertseifer
- NCSR "Demokritos", Laboratorium Radiochemiczne INRASTES, Ateny, Grecja - dr Penelope Bouziotis
- Instytut Technologii w Karlsruhe (KIT), Niemcy - dr Damien Hudry
- Instytut Nauk Jądrowych, Ege Uniwersytet w Izmirze, Turcja - prof. dr Perihan Ünak
- Centrum Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, - dr hab. Damian Gawel
- Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski - dr hab. Ewa Nazaruk
- Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa - dr hab. Marta Grodzik
- Instytut Chemii Fizycznej PAN, Warszawa - dr Tomasz Ratajczyk
- Centralny Szpital Kliniczny MSWiA, Warszawa - dr n. med. Tadeusz Budlewski

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę:

przed uzyskaniem stopnia doktora:

- czynne uczestnictwo w Pikniku Naukowym, Festiwalu Nauki oraz Nocy Muzeów jako przedstawiciel Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie (2005-2009)
- prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych ze studentami studiów podyplomowych „Energetyka Jądrowa” (2009-2010)
- opiekun naukowy 2 studentów realizujących praktyki w IChTJ

po uzyskaniu stopnia doktora:

- promotor pomocniczy 6 prac doktorskich, promotor główny 4 prac magisterskich i 1 pracy licencjackiej
- promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr Emilii Górzyńskiej „Radiobiokoniugaty nanocząstek złota znakowanych emiterami elektronów Augera: $^{197}\text{Hg}/^{197\text{m}}\text{Hg}$ do terapii

przeciwnowotworowej” realizowanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza

- promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr Kingi Żelechowskiej-Matysiak „Biokoniugaty radioaktywnych kłastrów złota z przyłączonym chemioterapeutycznym dla celowanej terapii radionuklidowej” realizowanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza

- promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr inż. Kamila Wawrowicza „Radiobiokoniugaty nanocząstek złota znakowanych $^{193m/195m}\text{Pt}$ oraz trastuzumabem do celowanej terapii elektronami Auger” realizowanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza

- promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr Adrianny Cytryniak „Nanostrukturalne ciekłokrystaliczne lipidowe nośniki chemioterapeutyków oraz emiterów promieniowania korpuskularnego do zastosowań w celowanej terapii nowotworów” realizowanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie oraz na Wydziale Chemii UW pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Bilewicz

- promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr Michała Żuka „Radiobiokoniugaty nanocząstek złota-198 dla jednoczesnej celowanej radioterapii i hipertermii radiofrekwencyjnej” realizowanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie oraz na Wydziale Chemii UW pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Krysińskiego

- promotor pracy magisterskiej Antoniny Matuszyńskiej „Znakowana radionuklidem ^{135}La biomolekuła DOTATATE dla terapii elektronami Auger nowotworów neuroendokrynych” (obrona planowana na czerwiec 2021)

- promotor pracy magisterskiej Emilii Górzyńskiej, „Synteza oraz badania *in vitro* radiobiokoniugatu $^{198}\text{AuNPs-PEG-DOX-Oktreotyd}$ do celowanej terapii nowotworowej” (obrona - 30.06.2020)

- promotor pracy licencjackiej Emilii Górzyńskiej „Radiokoniugat $^{198}\text{AuNP-Oktreotyd}$ do celowanej terapii guzów neuroendokrynych” (obrona 2018). Praca uzyskała I nagrodę Polskiego Towarzystwa Nukleonicznego w 2019 r. za najlepszą pracę licencjacką w dziedzinie nukleoniki

- promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr Łucji Dziawer, „Biokoniugaty nanocząstek złota jako nośniki ^{211}At w celowanej alfa terapii” realizowanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza (obrona 2018)

- promotor pracy magisterskiej Anny Wawrzynowskiej „Synteza oraz badania *in vitro* biokoniugatów Substancji P znakowanych radionuklidem ^{177}Lu ” (obrona 2016)
- promotor pracy magisterskiej Marceliny Bednarczyk „Radiotoksyczność biokoniugatu znakowanego radionuklidem ^{223}Ra względem glejakowych komórek nowotworowych oraz macierzystych komórek glejakowych” (obrona 2016). Praca została wyróżniona w konkursie na Prace Dyplomowe o największym potencjale komercyjacyjnym organizowanym przez Uniwersytecki Ośrodek Transferu Technologii (UOTT).

7. Opis pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

a) otrzymane nagrody i wyróżnienia

przed uzyskaniem stopnia doktora:

- otrzymanie nagrody Dyrektora IChTJ za osiągnięte postępy w realizacji pracy doktorskiej i aktywność zawodową (2006 i 2007)
- I nagroda Marszałka Województwa Mazowieckiego, praca doktorska uzyskała najwyższą ocenę ekspertów pod względem naukowym i przydatności dla dalszego rozwoju działalności naukowo-badawczej na terenie Mazowsza (2009)

po uzyskaniu stopnia doktora:

- I nagroda Polskiego Towarzystwa Medycyny Nuklearnej za prowadzenie innowacyjnych badań naukowych na potrzeby medycyny nuklearnej („*Radiolabeling and biological evaluation of ^{225}Ac -DOTA-SubstanceP for targeted alpha therapy of gliomas*”), 13 Zjazd Polskiego Towarzystwa Medycyny Nuklearnej, 19-22.09.2012, Kielce, Polska
- nagroda Dyrektora IChTJ za cykl publikacji dotyczących zastosowania radionuklidów skandu w diagnostyce i terapii (2014)
- nagroda zespołowa za osiągnięcie „*The therapeutic radiopharmaceutical based on astatine-211-labelled gold nanoparticles and method of its preparation*” Ł. Janiszewska, M. Pruszyński, P. Koźmiński, **A. Majkowska**, A. Bilewicz – Diploma and Special Award of the Romanian Inventors Forum – Show IWIS 2016, Warszawa, Polska, 10-12.10.2016

- nagroda zespołowa za osiągnięcie „*The therapeutic radiopharmaceutical based on astatine-211-labelled gold nanoparticles and method of its preparation*” Ł. Janiszewska, M. Pruszyński, P. Koźmiński, **A. Majkowska**, A. Bilewicz – Platinum Medal – Show IWIS 2016, Warszawa, Polska, 10-12.10.2016
- nagroda zespołowa za osiągnięcie „*Method for obtaining diagnostic amounts of ^{43}Sc radionuclide*” - A. Bilewicz, R. Walczak, **A. Majkowska-Pilip**, Gold medal at the International Warsaw Invention Show IWIS 2017, Warszawa, Polska, 9-11.10.2017
- nagrody Dyrektora IChTJ za serię publikacji dotyczących zastosowania nanocząstek w celowanej terapii radionuklidowej oraz nowych potencjalnych radiofarmaceutyków i chemioterapeutyków w leczeniu nowotworów (2018, 2019).

A. Majkowska-Pilip