

AUTOREFERAT

Dr Marek Pruszyński

**Projektowanie, otrzymywanie i charakterystyka nowych
radiofarmaceutyków molekularnych do diagnostyki i terapii
nowotworów z nadekspresją receptora HER2**

Załącznik nr 2

Autoreferat w języku polskim przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych
w związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora habilitowanego



Instytut Chemii i Techniki Jądrowej

Warszawa 2018

SPIS TREŚCI

1. IMIĘ I NAZWISKO	3
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	3
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH	3
4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)	3
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	3
b) Cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	4
c) Omówienie celu prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania	7
I. Wprowadzenie	7
II. Cel podjętych badań	10
III. Omówienie osiągniętych wyników i możliwości ich wykorzystania	11
IV. Podsumowanie	25
V. Literatura	27
5. OPIS POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH	31
6. WYKAZ OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH ORAZ INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, WSPÓŁPRACY NAUKOWEJ I POPULARYZACJI NAUKI	33
a) Podsumowanie dorobku naukowego	33
b) Lista wszystkich publikacji	33
c) Udział w grantach i projektach badawczych	39
d) Staże i stypendia naukowe	40
e) Otrzymane nagrody i wyróżnienia	41
f) Patenty i zgłoszenia patentowe	42
g) Osiągnięcia w zakresie działalności dydaktycznej i opieki naukowej nad studentami	42
h) Osiągnięcia w zakresie upowszechniania nauki, działalności popularyzatorskiej	43
i) Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych	44
j) Członkostwo w radach naukowych, organizacjach i towarzystwach naukowych	44
k) Współpraca naukowa	44
l) Komunikaty naukowe (postery, komunikaty ustne, wykłady)	45

1. IMIĘ I NAZWISKO:

Marek Pruszyński

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE:

- Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii (25.04.2008)
Tytuł rozprawy doktorskiej: *"Kompleksy ^{211}At jako prekursory radiofarmaceutyków"* – praca obroniona z wyróżnieniem.
Promotor: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz
Zakład Radiochemii i Chemii Jądrowej, Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie
- Magister chemii (14.06.2002)
Tytuł pracy magisterskiej: *"Potencjometryczne oznaczanie L-dopy z zastosowaniem elektrody jonoselektywnej w warunkach stacjonarnych i przepływowo-wstrzykowych"* – praca obroniona z wyróżnieniem.
Promotor: prof. dr hab. Anatol Kojło; opiekun: dr Elżbieta Wołyniec
Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

- 03.09.2018 – obecnie Adiunkt – Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa
- 01.07.2008 – obecnie Adiunkt – Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa
- 01.04.2010 – 31.03.2013 Post-doc – Duke University Medical Center, Durham, USA
- 01.05.2006 – 30.06.2008 Asystent – Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa
- 01.12.2002 – 30.04.2006 Chemik – Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 r. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl publikacji na temat:

Projektowanie, otrzymywanie i charakterystyka nowych radiofarmaceutyków molekularnych do diagnostyki i terapii nowotworów z nadekspresją receptora HER2

Moje zainteresowania naukowo-badawcze dotyczą projektowania i syntezy nowych potencjalnych radiofarmaceutyków do diagnostyki i terapii nowotworów. W przedstawionym poniżej osiągnięciu skupiłem się głównie na otrzymywaniu radioznaczników opartych na bazie biomolekuł przyłączających się do receptora HER2. Badania dotyczyły optymalizacji warunków otrzymywania radiofarmaceutyków, poprzez dobranie odpowiednich już istniejących lub opracowanie nowych chemicznych metod trwałego przyłączania radionuklidów do biomolekuł, tak aby nie utraciły one swoich właściwości biologicznych. Celem było również uzyskanie finalnego produktu o wysokiej czystości radiochemicznej, który charakteryzowałby się wysoką zdolnością gromadzenia w guzie nowotworowym, przy jednoczesnej niskiej retencji w zdrowych tkankach. Badania te rozpocząłem wstępnie podczas mojego stażu podoktorskiego w Duke University Medical Center w Durham w USA, a następnie kontynuowałem w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie w ramach projektu z Narodowego Centrum Nauki SONATA 5, którego byłem kierownikiem. **Efektom moich badań było opracowanie oraz scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych (*in vitro* oraz *in vivo*) nowych radioznaczników oraz wykazanie, że posiadają one cechy potencjalnych radiofarmaceutyków receptorowych do diagnostyki i terapii nowotworów z nadekspresją receptora HER2.**

b) cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

* - autor korespondencyjny

IF - współczynnik oddziaływania czasopisma z roku, w którym praca została opublikowana/5-letni; wg *Journal Citation Reports* z dnia 01.10.2018

TC - liczba cytowań wg *Web of Science/Scopus/Google Scholar* z dnia 01.10.2018

[H1] Pruszyński M, Koumarianou E, Vaidyanathan G, Revets H, Devoogdt N, Lahoutte T, Zalutsky MR*.

Targeting breast carcinoma with radioiodinated anti-HER2 nanobody.

Nuclear Medicine and Biology **2013**; 40:52-59.

IF_{2013/5-letni} = **2,408**/2,186; MNiSzW₂₀₁₃ = 30 pkt; TC: 40/38/51

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu badań, które obejmowały: syntezę organiczną grupy prostetycznej [*I]IB-Mal-D-GEEEK i jej prekursora, radiojodowanie nanociała 5F7GGC dwiema metodami, wykonanie badań kontroli jakości otrzymanych grup prostetycznych i radiofarmaceutyków (analizy HPLC, LCMS, ITLC, TCA-strącanie, SDS-PAGE, immunoreaktywność, analiza radiofarmaceutyków i ich metabolitów w moczu); analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu; przygotowaniu odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na **50%**.*

[H2] Pruszyński M, Koumarianou E, Vaidyanathan G, Revets H, Devoogdt N, Lahoutte T, Lyster HK, Zalutsky MR*.

Improved tumor targeting of anti-HER2 nanobody through *N*-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-iodobenzoate radiolabeling.

Journal of Nuclear Medicine **2014**; 55:650-656.

IF_{2014/5-letni} = **6,160**/6,893; MNiSzW₂₀₁₄ = 45 pkt; TC: 28/28/31

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu badań, które obejmowały: syntezę organiczną grupy prostetycznej [¹²⁵I]SGMIB i jej prekursora, radiojodowanie nanociała 5F7GGC trzema metodami, wykonanie badań kontroli jakości otrzymanych grup prostetycznych i radiofarmaceutyków (analizy HPLC, LCMS, ITLC, TCA-strącanie, SDS-PAGE, immunoreaktywność); analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu; przygotowaniu Supplemental Materials i odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na **50%**.*

Publikacja została wyróżniona nagrodą Alavi-Mandell od Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.

[H3] Pruszyński M, Koumarianou E, Vaidyanathan G, Chitneni S, Zalutsky MR*.

D-amino acid peptide residualizing agents bearing *N*-hydroxysuccinimido- and maleimido-functional groups and their application for trastuzumab radioiodination.

Nuclear Medicine and Biology **2015**; 42:19-27.

IF_{2015/5-letni}: **2,429**/2,186; MNiSzW₂₀₁₅ = 30 pkt; TC: 2/2/3

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu badań, które obejmowały: syntezę organiczną nowej grupy prostetycznej NHS-[¹²⁵I]B-D-EEEG i jej prekursora, radiojodowanie trastuzumabu dwiema metodami, wykonanie badań kontroli jakości otrzymanych grup prostetycznych i radiofarmaceutyków (analizy RP-HPLC, LCMS, ITLC, TCA-strącanie, SDS-PAGE, immunoreaktywność); analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu; przygotowaniu odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na **65%**.*

[H4] Pruszyński M*, Kang CM, Koumarianou E, Vaidyanathan G, Zalutsky MR*.

D-amino acid peptide residualizing agents for protein radioiodination: effect of aspartate for glutamate substitution.

Molecules **2018**; 23:1223.

IF_{2018/2017/5-letni}: brak/**3,098**/3,268; MNiSzW₂₀₁₇ = 30 pkt; TC: 0/0/0

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu badań, które obejmowały: syntezę organiczną nowej grupy prostetycznej [*I]IB-Mal-D-GDDDK i jej prekursora, radiojodowanie nanociała 5F7GGC dwiema metodami, wykonanie badań kontroli jakości otrzymanych grup prostetycznych i radiofarmaceutyków (analizy RP-HPLC, SEC-HPLC, LCMS, ITLC, TCA-strącanie, SDS-PAGE, immunoreaktywność); analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu; przygotowaniu Supplemental Materials i odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na **65%**.*

[H5] Pruszyński M*, D'Huyvetter M, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Lahoutte T.

Evaluation of an anti-HER2 nanobody labeled with ^{225}Ac for targeted α -particle therapy of cancer.

Molecular Pharmaceutics **2018**; 15:1457-1466.

IF_{2018/2017/5-letni}: brak/**4,556**/4,785; MNiSzW₂₀₁₇ = 45 pkt TC: 1/1/2

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu wszystkich badań związanych z otrzymywaniem biokoniugatu nanociała 2Rs15d z ligandem p-SCN-Bn-DOTA i jego charakterystyce fizykochemicznej oraz znakowaniu biokoniugatu radionuklidem ^{225}Ac i wykonaniu kontroli jakości otrzymanego radiofarmaceutyku (ITLC, HPLC, SDS-PAGE, stabilność, immunoreaktywność); wykonaniu wszystkich badań in vitro na komórkach; udział w badaniach ex vivo na zwierzętach; analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu i jego opublikowaniu; przygotowaniu Supplemental Materials i odpowiedzi recenzentom; korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na **75%**.*

Praca powstała w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki SONATA 5, którego byłem kierownikiem.

Sumaryczny IF z roku opublikowania/5-letni: **18,651**/19,318; średnio na pracę: **3,730**/3,864

Sumaryczna ilość punktów MNiSzW z roku opublikowania: **180**; średnio na pracę: **36**

Sumaryczna liczba cytowań wg *Web of Science/Scopus/Google Scholar* z dnia 01.10.2018: **71**/69/87; średnio na pracę: **14,2**/13,8/17,4

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

I. WPROWADZENIE

W ciągu ostatniej dekady znacząco wzrosła liczba zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi, pomimo postępu i rozwoju różnych form diagnostyki i terapii. Według danych uzyskanych z Cancer Research UK (www.cancerresearchuk.org), w samym 2012 roku zdiagnozowano na świecie 14,1 mln nowych przypadków zachorowań na nowotwory, a najnowsze prognozy szacują, że w 2030 roku będzie ich aż 23,6 mln rocznie. Obecnie w leczeniu nowotworów, poza wycięciem guza, powszechnie stosowane są chemio- oraz radioterapia. Obie metody charakteryzują się jednak małą selektywnością. Chemioterapia oddziałuje na cały organizm, a zwłaszcza na szybko dzielące się komórki (także zdrowe), stąd jej duża toksyczność i bardzo uciążliwe efekty uboczne. W przypadku zewnętrznej radioterapii, niebezpieczeństwo uszkodzenia zdrowych tkanek powoduje, że stosuje się dawki poniżej optymalnych wartości. W związku z tym stale obserwuje się duże zainteresowanie nowymi metodami leczenia, zwłaszcza takimi, które będą oddziaływać wybiórczo na komórki nowotworowe. Dlatego coraz częściej mówi się o medycynie spersonalizowanej, m.in. wykorzystującej leki ukierunkowane na dany receptor znajdujący się na komórkach nowotworowych (tzw. terapia celowana). Większość prac w tej dziedzinie skupia się na znalezieniu substancji chemicznych działających molekularnie, na zasadzie blokowania lub pobudzania odpowiednich receptorów na komórkach nowotworowych. Receptory to cząsteczki białka znajdujące się na powierzchni błony komórkowej, bądź wewnątrz komórki. Rozpoznają i wiążą one różne związki, co w efekcie prowadzi w komórce do aktywacji sygnałów odpowiedzialnych za jej wzrost, podział, a także śmierć (apoptotyczną, czyli zaprogramowaną przez organizm lub nekrotyczną, czyli niekontrolowaną). Stąd receptory i związki w nie celujące mają ogromne znaczenie w medycynie, bowiem mogą być nowymi lekami oraz wyznaczać nowe kierunki diagnostyki i terapii.

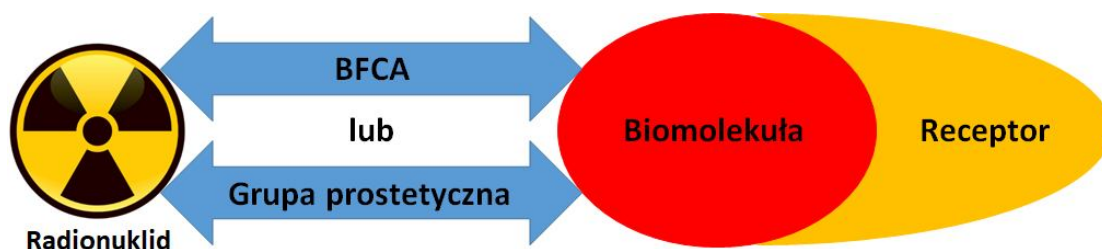
Receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2, zwany w skrócie HER2 (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2*), jest jednym z czterech receptorów kinazy tyrozynowej znajdujących się na większości komórek [1]. Pozostałe trzy receptory to odpowiednio: HER1 (znany także jako EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*), HER3 i HER4. Odpowiadają one za wzrost, różnicowanie, podział, proliferację i cykl komórkowy. Receptor HER2 to białko o masie 185 kDa (1 kDa = 1000 g/mol), składające się z części zewnątrzkomórkowej rozpoznającej i wiążącej odpowiedni związek, lipofilnej części transbłonowej oraz z fragmentu wewnętrznego posiadającego aktywność kinazy tyrozynowej [2]. Zaburzenie pewnych ścieżek sygnałowych w komórce prowadzi do nadmiernej aktywacji HER2 (nadekspresji białka, amplifikacji genu lub jego mutacji) i w efekcie do powstania nowotworu. Nadekspresja receptorów to występowanie nadmiernej ilości danego białka na powierzchni komórki. Termin amplifikacja oznacza, że jądro komórkowe produkuje nadmierną

ilość kopii genu kodującego dany receptor. Zwiększenie ilości HER2 sprzyja rozwojowi bardziej agresywnej formy nowotworu, charakteryzującej się gwałtownym wzrostem guza, zajęciem węzłów chłonnych oraz szybkim tworzeniem przerzutów [1, 2]. Nowotwory z nadekspresją receptora HER2 są bardziej odporne na terapię hormonalną, radioterapię oraz większość stosowanych obecnie chemioterapeutyków [3]. Stąd u pacjentów obserwuje się krótkie okresy remisji choroby, a nawrót raka następuje stosunkowo szybko. Nadekspresja receptora HER2 występuje w dużym stopniu w przypadku raka piersi, jajnika, a także wielu nowotworów gastrycznych, np. żołądka lub jelita grubego [4].

U kobiet najczęściej diagnozowanym nowotworem jest rak piersi, który jest chorobą niejednorodną, bowiem składa się z kilku podtypów. Dlatego jego wykrycie we wczesnym stadium rozwoju i prawidłowe rozpoznanie rodzaju jest jednym z najważniejszych zadań współczesnej onkologii. Określenie statusu HER2 jest konieczne ze względu na wysoką złośliwość tego typu nowotworu, a także nieefektywne leczenie konwencjonalnymi metodami. Obecnie oszacowania ilości HER2 dokonuje się głównie przy pomocy dwóch metod diagnostycznych: immunohistochemicznej (*ImmunoHistoChemistry*, IHC) określającej ilość receptora HER2 na powierzchni komórki oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) określającej liczbę kopii genu HER2 w jądrze komórkowym [5]. Obie metody są inwazyjne, bowiem wymagają pobrania materiału tkankowego z guza poprzez biopsję cienkoigłową lub operacyjną. Niestety, niejednorodna budowa guza oraz niejednorodne rozmieszczenie receptora może spowodować, że pobrany fragment tkanki nie będzie wykazywać nadekspresji HER2. Źródłem rozbieżności lub niejednoznaczności w określaniu statusu HER2 w badanych preparatach może być również ich nieprawidłowe przygotowanie oraz subiektywna ocena diagnosty. W przypadku potwierdzenia statusu nowotworu jako HER2-dodatniego stosuje się leczenie ukierunkowane na zahamowanie jego aktywności. Obecnie w leczeniu celowanym wykorzystuje się leki należące do dwóch grup: przeciwciała monoklonalne (trastuzumab, pertuzumab), które wiążą się z częścią receptora występującą na powierzchni komórki oraz inhibitory kinazy tyrozynowej (np. lapatinib), które wiążą się odwracalnie lub nieodwracalnie z wewnątrzkomórkową częścią receptora HER2 [6]. Często stosowana jest terapia skojarzona polegająca na podawaniu mieszaniny wszystkich trzech preparatów, niekiedy w połączeniu z chemioterapeutykami. Niestety, pomimo początkowych pozytywnych wyników terapii, w wielu przypadkach obserwuje się nawrót choroby, najprawdopodobniej wynikający z uodpornienia się komórek nowotworowych na stosowane leki [7]. Dlatego obecnie trwają intensywne badania nad znalezieniem innych terapii ukierunkowanych na receptor HER2.

Medycyna nuklearna z wykorzystaniem radiofarmaceutyków molekularnych aktywnych względem receptora HER2, może przyczynić się do lepszej diagnostyki i terapii tych nowotworów. Radiofarmaceutyki molekularne (Schemat 1) to najczęściej związki koordynacyjne, w których radionuklid, będący kationem pierwiastka metalicznego, związany jest w trwały i inertny kompleks za pomocą dwufunkcyjnego łącznika (*BiFunctional Coupling Agent*, BFCA). BFCA to z reguły połączenie łańcuchowego lub makrocyclicznego ligandu

chelatuującego (który trwale kompleksuje kation radionuklidu) i grupy funkcyjnej umożliwiającej przyłączenie kompleksu radionuklidu do cząsteczki biologicznie czynnej. W przypadku radionuklidów pierwiastków niemetalicznych (fluor, brom, jod itd.) zamiast BFCA zazwyczaj stosuje się odpowiednie grupy prostetyczne, czyli związki organiczne, umożliwiające ich trwałe przyłączenie do biomolekuły. Biomolekuła spełnia tutaj jedynie rolę nośnika, wybiórczo dostarczającego odpowiedni radionuklid diagnostyczny lub terapeutyczny wyłącznie do komórek rakowych. Radiofarmaceutyk molekularny, po podaniu dożylnym pacjentowi, wraz z krwią rozchodzi się po całym organizmie i łączy z komórkami wykazującymi obecność danego receptora. Zastosowanie radionuklidu emitującego w trakcie rozpadu promieniowanie gamma (γ) lub pozytony (β^+) pozwala na rejestrację sygnału, a tym samym na ustalenie miejsca gromadzenia się radiofarmaceutyku. Może to umożliwić nieinwazyjną, w porównaniu z obecnie stosowanymi metodami, detekcję statusu HER2 *in vivo*. Takie obrazowanie molekularne można prowadzić z wykorzystaniem tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu (*Single Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) lub pozytonowej tomografii emisyjnej (*Positron Emission Tomography*, PET). Obie metody pozwalają na szybką i bezpośrednią ocenę występowania receptorów HER2 w trakcie jednego skanu całego ciała pacjenta w celu identyfikacji guza pierwotnego i potencjalnych przerzutów. Badanie to może zapobiec uzyskiwaniu fałszywie negatywnych lub fałszywie pozytywnych rezultatów, wynikających ze zróżnicowania budowy tkanki nowotworowej. Zastosowanie radiofarmaceutyków na bazie radionuklidów terapeutycznych, emitujących w trakcie rozpadu cząstki α , β^- lub elektrony Auger'a o różnym zasięgu w tkankach, pozwala z kolei na precyzyjne dostarczenie adekwatnej letalnej dawki promieniowania jonizującego jedynie do komórek nowotworowych, oszczędzając komórki zdrowe otaczające guz. Co więcej, dostarczenie odpowiedniego radionuklidu gwarantuje, że nawet komórki nowotworowe uodpornione na stosowane obecnie leki, także zostają zniszczone. Aktualnie opracowuje się coraz więcej radiofarmaceutyków molekularnych do tzw. zastosowań teranostycznych, czyli takich, w których jedna i ta sama biomolekuła znakowana jest radionuklidami diagnostycznymi (np. ^{18}F , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{89}Zr) oraz radionuklidami terapeutycznymi (np. ^{90}Y , ^{131}I , ^{177}Lu). Ponieważ każdy z wymienionych powyżej radionuklidów to inny pierwiastek chemiczny, wymaga on także opracowania innej metody jego trwałego związania z biomolekułą. Zatem projektowanie radiofarmaceutyków jest procesem złożonym, wymagającym podejścia interdyscyplinarnego z pogranicza czterech wielkich nauk: fizyki (dobór radionuklidu o odpowiednich właściwościach rozpadu promieniotwórczego), chemii (opracowanie i optymalizacja metod trwałego związania radionuklidu z biomolekułą), biologii (znalezienie lub opracowanie biomolekuły oddziałującej z odpowiednim receptorem na komórkach nowotworowych) oraz medycyny (weryfikacja w warunkach *in vivo* na pacjentach działania opracowanych radiofarmaceutyków).



Schemat 1. Budowa i oddziaływanie radiofarmaceutyków molekularnych z receptorem.

II. CEL PODJĘTYCH BADAŃ

Głównym celem podjętych przeze mnie badań było otrzymanie i scharakteryzowanie właściwości nowych radiofarmaceutyków molekularnych, które mogłyby znaleźć zastosowanie zarówno w diagnostyce, jak i w terapii nowotworów z nadekspresją receptora HER2. W prowadzonych badaniach wykorzystałem następujące biomolekuły celujące w receptor HER2: komercyjne przeciwciało monoklonalne (trastuzumab) oraz dwa rodzaje nanociał (5F7GGC i 2Rs15d). Jako radionuklidy diagnostyczne i terapeutyczne zastosowałem radionuklidy jodu (^{125}I i ^{131}I) oraz radionuklid aktynu (^{225}Ac) emitujący w trakcie rozpadu cząstki α .

Zakres podjętych przeze mnie badań obejmował następujące zagadnienia:

- optymalizacja efektywnych metod znakowania biomolekuł radionuklidami jodu i ^{225}Ac . W skład tych badań wchodziło: dobór odpowiednich istniejących lub opracowanie nowych grup prostetycznych do trwałego przyłączania radionuklidów do biomolekuł, tak aby uzyskać produkt o wysokiej czystości radiochemicznej oraz trwały w warunkach *in vivo*. Bardzo ważnym aspektem optymalizacji metody znakowania było, aby zastosowany łącznik nie wpłynął na zmniejszenie lub całkowity zanik oddziaływania biomolekuły z receptorem HER2. Równie ważnym punktem było dobranie takiej metody znakowania biomolekuły, aby farmakokinetyka uzyskanego radiofarmaceutyku pozwoliła na jego wysokie gromadzenie się w guzie nowotworowym, przy równoczesnej niskiej retencji w pozostałych zdrowych organach.
- charakterystyka właściwości otrzymanych radiofarmaceutyków w warunkach *in vitro* na ludzkich liniach komórek nowotworowych charakteryzujących się nadekspresją receptora HER2 (HER2-pozytywne). W skład tych badań wchodziło: oszacowanie specyficzności i powinowactwa opracowanych radiofarmaceutyków do łączenia się z receptorem HER2 oraz stopnia ich wnikania (internalizacji) do wnętrza komórek nowotworowych.
- charakterystyka właściwości opracowanych radiofarmaceutyków w warunkach *in vivo*, poprzez zbadanie ich biodystrybucji narządowej na mysich modelach posiadających podskórne ksenografty ludzkich komórek nowotworowych wykazujących nadekspresję receptora HER2. Badania w warunkach *in vitro* i *in vivo* miały na celu weryfikację właściwości otrzymanych radiobiokoniugatów, jako potencjalnych radiofarmaceutyków.

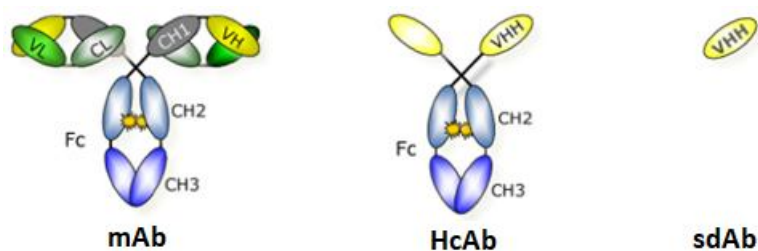
III. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW I MOŻLIWOŚCI ICH WYKORZYSTANIA

W prowadzonych przeze mnie badaniach wykorzystałem białka celujące w receptor HER2, charakteryzujące się jednak odmiennymi właściwościami. Przede wszystkim różniące się masą cząsteczkową, co ma znaczący wpływ na ich farmakokinetykę, czyli gromadzenie się w organach, usuwanie z krwi oraz z całego organizmu. Wybranie tak różniących się między sobą biomolekuł poszerzyło zakres badań, co w przyszłości może umożliwić wybór najlepszej w danym układzie biomolekuły nadającej się do otrzymywania radiofarmaceutyków diagnostycznych i terapeutycznych.

Trastuzumab to rekombinowane, humanizowane przeciwciało monoklonalne IgG1 o masie cząsteczkowej 145 kDa. Uzyskiwane metodami inżynierii genetycznej z kultur tkankowych komórek jajnika chomika chińskiego. Ma zdolność specyficznego łączenia się z powierzchniową częścią receptora HER2, a dokładniej z jego fragmentem, domeną (epitopem) IV [8]. Działanie tego przeciwciała opiera się na blokowaniu sygnału wzrostowego w komórkach nowotworowych, co powoduje zahamowanie ich nadmiernej proliferacji. W 1998 roku trastuzumab został zatwierdzony przez FDA (*Food and Drug Administration*), a w 2000 roku przez EMA (*European Medicines Agency*), jako lek onkologiczny do leczenia nowotworów piersi z nadekspresją receptora HER2. Obecnie stosowany jest także w terapii HER2-dodatniego przerzutowego raka żołądka lub połączenia żołądkowo-przełykowego. Może być stosowany w monoterapii, jak również w terapii skojarzonej z chemioterapeutykami (doksorubicyna, paklitaksel, docetaksel, *Kadcyla*®), innymi przeciwciałami monoklonalnymi (pertuzumab - *Perjeta*®) lub inhibitorem kinazy tyrozynowej (*Lapatinib*®). Produkowany jest przez firmy Genentech (USA) oraz Roche (Szwajcaria) i sprzedawany pod nazwą handlową *Herceptin*®.

Nanociała (*Nanobodies*®, Nbs - nazwa opatentowana przez firmę Ablynx, Belgia), znane także jako jednodomenowe przeciwciała (*single-domain Antibody*, sdAb) lub fragmenty V_HH (*variable heavy*), to małe fragmenty przeciwciał zbudowanych tylko z łańcucha ciężkiego (*Heavy chain Antibody*, HcAb) (Schemat 2). W 1993 roku w krwi wielbłąda odkryto przeciwciała HcAb. Pomimo braku łańcucha lekkiego wykazują one takie samo powinowactwo względem receptorów jak pełne przeciwciała monoklonalne (*monoclonal Antibody*, mAb) [9]. Nanociało jest najmniejszym fragmentem (12-15 kDa), który zachowuje pełną funkcjonalność przeciwciała HcAb. Ponadto, może przyłączać się do miejsc wiążących (epitopów) receptora, które są niedostępne dla dużych przeciwciał. Nanociała dobrze rozpuszczają się w wodzie, a ich agregacja jest znacznie ograniczona. Wykazują także dużą stabilność i trwałość podczas przechowywania oraz odporność na wyższą temperaturę (do 80°C) i zmiany pH (4-10), co daje większe możliwości ich chemicznej modyfikacji i znakowania. Nanociała produkowane są w bioreaktorach przez mikroorganizmy, tj. bakterie *Escherichia coli*, drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, czy *Pichia pastoris* [9]. Jest to znacznie bardziej wydajna, prostsza i tańsza metoda, która nie sprawdza się w przypadku przeciwciał. Nanociała ze względu na małą masę cząsteczkową charakteryzują się dobrą farmakokinetyką, dzięki czemu szybciej docierają do

komórek nowotworowych i lepiej wnikają do ich wnętrza, a także szybciej usuwane są z krwi oraz bardzo ukrwionych zdrowych narządów. Dlatego nanociała są atrakcyjnymi biomolekułami, które mogą być wykorzystane w medycynie nuklearnej do diagnostyki i terapii chorób nowotworowych. Nanociało 5F7GGC (wersja nanociała 5F7 zawierająca cysteinę przy C-terminalnym zakończeniu) otrzymałem dzięki uprzejmości i współpracy z dr Hilde Revets (Ablynx NV, Ghent, Belgia), natomiast nanociało 2Rs15d otrzymałem dzięki uprzejmości i współpracy z prof. Tony Lahoutte (Vrije Universiteit Brussel, Bruksela, Belgia).



Schemat 2. Przeciwciało monoklonalne (mAb), przeciwciało wielbłąda pozbawione łańcucha lekkiego (HcAb), nanociało (sdAb) [9].

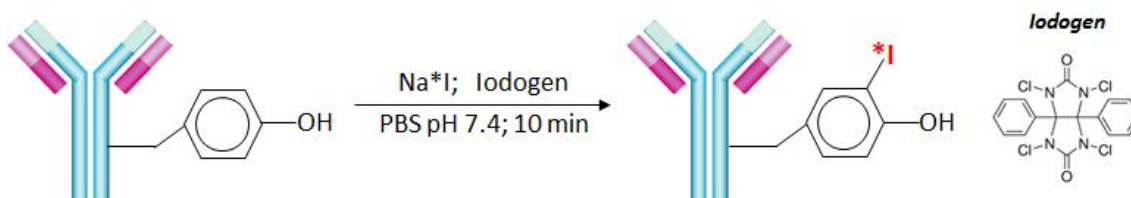
Jak wspomniałem wcześniej, medycyna teranostyczna jest stosunkowo nowym terminem opisującym integrację funkcji diagnostycznych i terapeutycznych w ramach jednej i tej samej biomolekuły znakowanej różnymi radionuklidami (np. ^{18}F , ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu). Jednak każdy z tych radionuklidów wymaga innej grupy prostetycznej lub BFCA do jego trwałego związania z biomolekułą. Najnowsze badania wskazują, że zastosowana metoda znakowania ma istotny wpływ na biodystrybucję narządową otrzymanego radiofarmaceutyku [10]. Znaczne różnice w biodystrybucji zaobserwowano nawet w przypadku biomolekuły znakowanej radionuklidami pierwiastków leżących w tej samej grupie okresowej [11, 12]. Dlatego też w swoich badaniach, biomolekuły aktywne względem receptora HER2 postanowiłem znakować radionuklidami jodu. Jod posiada szereg radionuklidów o zróżnicowanych właściwościach rozpadu, które są odpowiednie do obrazowania z zastosowaniem tomografii SPECT (^{123}I), PET (^{124}I), a także celowanej radioterapii z wykorzystaniem cząstek β^- (^{131}I) i elektronów Auger'a (^{123}I , ^{125}I). Stąd radionuklidy jodu idealnie wpasowują się w ideę teranostyki, która w tym wypadku pozwala na stosowanie nie tylko tej samej biomolekuły, ale także chemii znakowania zarówno do celów diagnostycznych i terapeutycznych. Radionuklidy jodu stanowią również atrakcyjną alternatywę dla radionuklidów pierwiastków metalicznych ze względu na ich łatwą dostępność za rozsądną cenę. Grupy prostetyczne opracowane do radiojodowania biomolekuł mogą być również stosowane do znakowania ich radionuklidem astatu (^{211}At), emitującym cząstki α , ze względu na podobieństwo chemii tych dwóch pierwiastków leżących w grupie fluorowców.

^{225}Ac jest jednym z nielicznych radionuklidów emitującym cząstki α , o potencjalnym zastosowaniu w celowanej terapii radionuklidowej. Ze względu na czas połowicznego rozpadu wynoszący 10 dni oraz emisję 4 cząstek α w trakcie kaskadowego rozpadu do stabilnego

nuklidu, radiofarmaceutyki na jego bazie wydają się być obiecujące w terapii małych guzów, przerzutów lub nowotworów w postaci pojedynczych komórek. Radionuklid ten otrzymałem dzięki uprzejmości i współpracy z prof. Alfredem Morgensternem (Instytut Pierwiastków Transuranowych, Karlsruhe, Niemcy).

Znakowanie nanociała 5F7GGC radionuklidami jodu (*publikacje H1, H2, H4*)

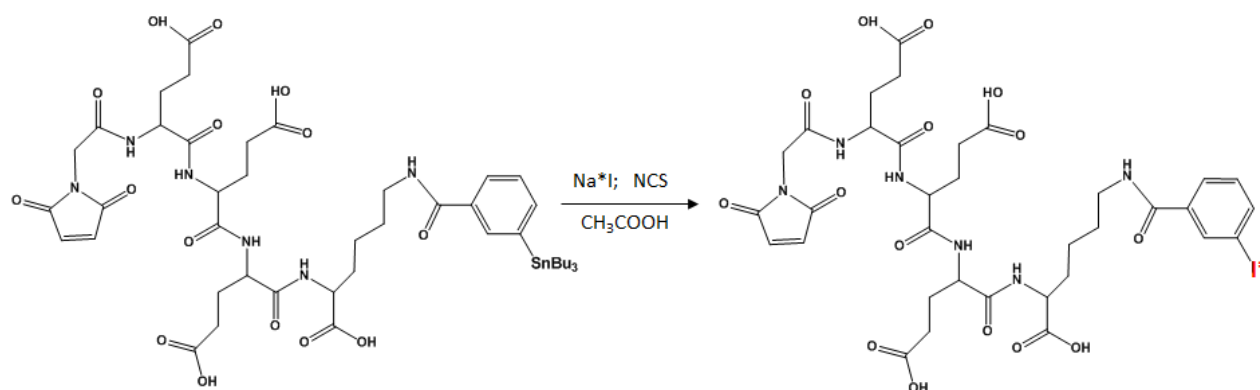
W początkowych badaniach nad otrzymywaniem radiofarmaceutyków molekularnych skupiłem się na zastosowaniu nowego nanociała 5F7GGC, jako wektora celującego w receptor HER2 [H1]. Ponieważ były to pierwsze próby znakowania tej biomolekuły radionuklidami, niewiele było wiadomo o jej właściwościach i charakterze. Wyniki uzyskane w trakcie otrzymywania tego nanociała wskazywały, że ma ono charakter konkurencyjny w stosunku do trastuzumabu, bowiem przyłączanie 5F7GGC do HER2 można było w znacznym stopniu zablokować poprzez dodanie nadmiaru tego przeciwciała monoklonalnego [H1]. Pozwoliło to postawić hipotezę, że 5F7GGC łączy się z tym samym epitopem HER2 co trastuzumab, a tym samym po przyłączeniu się do receptora ulega procesowi szybkiej internalizacji do wnętrza komórki. Jest to bardzo ważna informacja, ponieważ ma duży wpływ na wybór metody radiojodowania tego nanociała. Najczęściej stosowaną metodą radiojodowania białek jest bezpośrednie elektrofilowe przyłączenie jodu do tyrozyny (znajdującej się w białku) w obecności czynnika utleniającego, np. Iodogenu (Schemat 3). Jest to metoda prosta, szybka i wysoce wydajna. Niemniej już wcześniej wykazano, że nie nadaje się ona do stosowania w przypadku biomolekuł internalizujących, które po wnikięciu do komórek podlegają degradacji w lizosomach, a powstały metabolit radiojodotyrozyna jest szybko usuwana poza komórkę i ponownie trafia do krwioobiegu [13]. Powoduje to, że kumulacja dostarczanego radionuklidu w komórkach nowotworowych jest znikoma, a tym samym nie ma on zastosowania diagnostycznego lub terapeutycznego. Co więcej, radiojodotyrozyna i wolny jod, jako produkt jej degradacji, mogą kumulować się w znacznym stopniu w zdrowych tkankach, takich jak: tarczyca, żołądek lub śledziona, co może prowadzić do ich uszkodzenia [14].



Schemat 3. Reakcja radiojodowania przeciwciała w obecności Iodogenu.

Dlatego w przypadku biomolekuł internalizujących konieczne jest radiojodowanie poprzez specjalne grupy prostetyczne, zwane także grupami rezydującymi, gdyż powstałe z nich metabolity są zatrzymywane wewnątrz lizosomów komórek nowotworowych [15-17]. Wpływa to na zwiększenie kumulacji radioaktywności w guzie, co przekłada się na lepszy efekt

diagnostyczny i terapeutyczny. Jedną z takich grup jest opracowana wcześniej N^{ϵ} -(3-[125 I]jodobenzoilo)-Lys⁵- N^{α} -maleimido-Gly¹-D-GEEEEK ([125 I]IB-Mal-D-GEEEEK) przedstawiona na schemacie 4 [18]. Jest to peptyd składający się z pięciu D-aminokwasów odpornych na działanie enzymów proteolitycznych, oraz z grupy benzylovej, do której przyłączony jest radionuklid jodu. Radiojodowanie białek z wykorzystaniem tej, a także innych grup prostetycznych wykonuje się zazwyczaj w dwóch etapach. Najpierw przyłącza się radionuklid jodu poprzez prekursor cynowy i otrzymaną radiojodowaną grupę prostetyczną wydziela się metodą chromatografii w układzie odwróconych faz (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) (Schemat 4). Następnie cały radiojodowany związek łączy się poprzez maleinową (Mal-) grupę funkcyjną z biomolekułą, na której znajdują się wolne grupy tiolowe (-SH), tworząc trwałe wiązanie tioeterowe. Otrzymany radiofarmaceutyk należy następnie wydzielić z mieszaniny reakcyjnej i oczyścić metodą chromatografii wykluczenia (*Size Exclusion Chromatography*, SEC-HPLC). Obecność w stosowanej grupie prostetycznej trzech kwasów glutaminowych (E), posiadających ujemny ładunek przy pH fizjologicznym, powoduje że powstały w trakcie degradacji radiofarmaceutyku metabolit zatrzymywany jest wewnątrz komórki nowotworowej, co zostało potwierdzone we wcześniejszych badaniach z użyciem internalizujących przeciwciał monoklonalnych i ich fragmentów [18, 19].



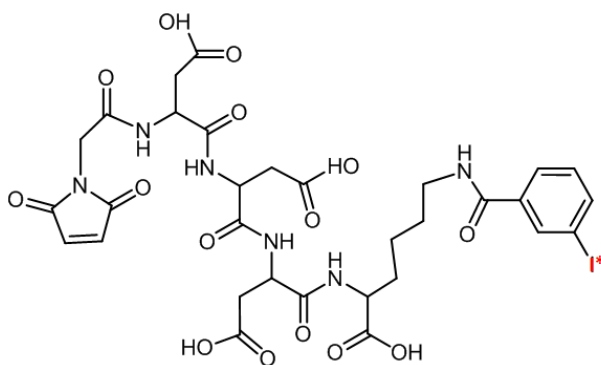
Schemat 4. Otrzymywanie grupy prostetycznej [125 I]IB-Mal-D-GEEEEK poprzez radiojodowanie jej cynowego prekursora.

Przystępując do pracy z nanociałem 5F7GGC postanowiłem wyznaczyć je radionuklidami 125 I i 131 I z użyciem opisanych powyżej obu metod: bezpośredniej z zastosowaniem Iodogenu oraz poprzez grupę prostetyczną [125 I]IB-Mal-D-GEEEEK [**H1**]. W przypadku metody z wykorzystaniem Iodogenu, wydajność reakcji znakowania nanociała była na poziomie około 80%. W przypadku radiojodowania grupy prostetycznej wydajność znakowania była wysoka (>90%), natomiast reakcja jej sprzężenia z nanociałem przebiegała z wydajnością już tylko 60-70%. Należy przy tym zaznaczyć, że czystość radiochemiczna obu otrzymanych preparatów była wysoka (>90%), co zostało potwierdzone metodami chromatografii cienkowarstwowej (*Instant Thin Layer Chromatography*, ITLC) oraz strącania

kwasem trichlorooctowym (TCA). Następnie otrzymane potencjalne radiofarmaceutyki, [^{125}I]-5F7GGC oraz [^{131}I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC, oceniałem pod kątem ich aktywności biologicznej. Badania *in vitro* były prowadzone na linii komórkowej ludzkiego nowotworu piersi (BT474M1) charakteryzującej się wysoką nadekspresją HER2. Uzyskane wyniki wykazały, że oba radiobiokoniugaty mają duże powinowactwo do receptora HER2 oraz łączą się z nim specyficznie (Rysunek 3, [H1]). Oznacza to, że zastosowane przeze mnie metody radiojodowania nie wpłynęły na osłabienie immunoreaktywności biomolekuły. Dalsze badania pokazały także sporą (~60%) kumulację obu radiofarmaceutyków wewnątrz komórek nowotworowych już po 1 h inkubacji (Rysunek 4C, [H1]). Potwierdziło to wcześniejszą hipotezę, że nanociało 5F7GGC po przyłączeniu do receptora HER2 ulega internalizacji do wnętrza komórki i że jest to proces bardzo szybki. Inkubacja w okresie 24 h ujawniła, iż ilość [^{131}I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC wewnątrz komórek pozostawała praktycznie na tym samym poziomie (~60%), podczas gdy dla [^{125}I]-5F7GGC obserwowano ciągły spadek skumulowanej w komórkach radioaktywności (Rysunek 4C, [H1]) i jednocześnie jej wzrost w pożywce, w której były hodowane komórki (Rysunek 4A, [H1]). Otrzymane wyniki sugerowały, że [^{125}I]-5F7GGC po internalizacji ulegał wewnątrzkomórkowej degradacji lizosomalnej, a powstałe metabolity były niestety usuwane poza komórki nowotworowe. Potwierdziła to analiza pożywki (supernatantu) pobranej w czasie badań internalizacji na hodowlach komórkowych. Aktywność próbek supernatantu (zawierającego metabolity o małej masie cząsteczkowej, rozpuszczalne w kwasie trichlorooctowym - TCA) w czasie 24 h wzrastała z poziomu 6% do 53% dla [^{125}I]-5F7GGC, podczas gdy dla [^{131}I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC wzrosła zaledwie w zakresie 4-18% [H1]. Badania biodystrybucji obu preparatów zostały przeprowadzone na samicach myszy z wszczepionymi podskórnie komórkami BT474M1 (ksenografty HER2). Rezultaty doświadczeń *ex vivo* potwierdziły, że oba preparaty kumulują się w nowotworze specyficznie, bowiem ich wychwyt przez komórki nowotworowe blokowany był w obecności niewyznakowanego trastuzumabu (Tabela 1, [H1]). Ponadto, przez cały okres prowadzenia badań biodystrybucji, retencja preparatu [^{131}I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC w guzie była na znacznie wyższym poziomie niż preparatu [^{125}I]-5F7GGC (Tabela 1, Rysunek 5, [H1]), co dobrze koreluje z trendem obserwowanym w badaniach *in vitro*. Spadek kumulacji radioaktywności pochodzącej od [^{125}I]-5F7GGC w nowotworze w czasie 24 h świadczy o degradacji tego preparatu do jodotyrozyny oraz wolnego jodu, które następnie usuwane są do krwioobiegu, skąd niestety trafiają do innych organów, w tym głównie do żołądka i tarczycy, bowiem w tych narządach zaobserwowano wzrost radioaktywności w czasie (Tabela 1, Rysunek 6, [H1]). Uzyskane przeze mnie dane są dowodem, że stosowanie grup prostetycznych o właściwościach rezydujących (np. [^{131}I]IB-Mal-D-GEEEEK) ma kluczowe znaczenie w procesach znakowania radionuklidami jodu, zwłaszcza w przypadku tak szybko i wysoce internalizujących biomolekuł jak nanociało 5F7GGC.

Opisane w mojej pracy badania to pierwsze doniesienie literaturowe na temat znakowania nanociał radionuklidami jodu [H1]. Wyniki opisane w tej pracy pozwalają wyciągnąć wniosek, że radiojodowane nanociało 5F7GGC wydaje się być dobrym

radiofarmaceutykiem do diagnostyki i terapii nowotworów z nadekspresją receptora HER2. Świadczy o tym wysoka kumulacja w nowotworze już po 1 h od podania dożylnego, co w przyszłości może umożliwić szybką diagnostykę. W przypadku preparatu [^{131}I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC wysoki stosunek radioaktywności w guzie do radioaktywności w poszczególnych organach (*Tumor/Normal Tissue*, T/NT) (Rysunek 7, [H1]) wskazuje na diagnostyczne możliwości zastosowania tego radiofarmaceutyku. Pewnym zaskoczeniem jednak była dość wysoka kumulacja [^{131}I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC w nerkach (Tabela 1, Rysunek 5, [H1]). Co prawda w przypadku nanociał teoretycznie mogło to być do przewidzenia, gdyż wszystkie biomolekuły o masie cząsteczkowej <60 kDa wykazują wysoką retencję w nerkach, związaną z ich usuwaniem poprzez ten organ oraz ich reabsorpcją w kanalikach nerkowych [20]. Podobne zachowanie odnotowano dla peptydów, innych badanych nanociał, a także jeszcze mniejszych sztucznie uzyskiwanych cząsteczek "affibody" [21-23]. Jednak wychwyt obserwowany w nerkach dla [^{131}I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC był znacznie wyższy niż dla [^{125}I]-5F7GGC (Tabela 1, Rysunek 5, [H1]). Najprawdopodobniej związane jest to z zastosowaną metodą radiojodowania, a dokładniej z grupą prostetyczną, w której obecne są trzy cząsteczki kwasu glutaminowego (E). Prace innych autorów nad zastosowaniem prostych L-aminokwasów znakowanych radionuklidami $^{11/14}\text{C}$ do obrazowania lub terapii guzów neuroendokrynnych, wykazały mniejszą kumulację [$^{11/14}\text{C}$]-kwasu asparaginowego (D) w nerkach niż w przypadku [$^{11/14}\text{C}$]-kwasu glutaminowego (E) [24, 25]. Wskazuje to na istnienie w nerkach różnych czynników i mechanizmów odpowiedzialnych za wychwytywanie i przetwarzanie wymienionych powyżej aminokwasów [26]. Wyniki tych badań zainspirowały mnie do podjęcia działań w kierunku syntezy nowej grupy prostetycznej do radiojodowania biomolekuł, będącej analogiem poprzedniej, ale zawierającej w swojej budowie trzy reszty kwasu asparaginowego [$^*\text{I}$]IB-Mal-D-GDDDK (Schemat 5) [H4].



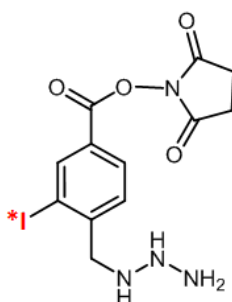
Schemat 5. Rezydująca grupa prostetyczna [$^*\text{I}$]IB-Mal-D-GDDDK.

Należy jednak zaznaczyć, że wspomniane powyżej badania były prowadzone dla pojedynczych L-aminokwasów (D i E) i w przypadku grup prostetycznych złożonych z kilku D-aminokwasów, jak stosowanej już [$^*\text{I}$]IB-Mal-D-GEEEEK czy zaproponowanej przeze mnie [$^*\text{I}$]IB-Mal-D-GDDDK, zachodzące w nerkach mechanizmy nie muszą prowadzić do podobnego

zachowania się tych preparatów. Dlatego zaplanowałem wstępne badania biodystrybucji radiojodowanych peptydów D-[¹²⁵I]YDDDD i D-[¹³¹I]YEEEE na zdrowych myszach Balb/c [H4]. Uzyskane wyniki *ex vivo* wykazały ponad 7-krotnie niższą retencję D-[¹²⁵I]YDDDD w nerkach niż jego analogu D-[¹³¹I]YEEEE już po 2 h od podania dożylnego (Tabela S1, [H4]). Bazując na tych obiecujących wynikach, zaplanowałem wieloetapową syntezę prekursora cynowego do otrzymywania nowej grupy prostetycznej [*I]IB-Mal-D-GDDDK. Przeprowadziłem również w skali wagowej syntezę tej grupy z przyłączonym nieradioaktywnym jodem. Związek IB-Mal-D-GDDDK służył jako standard odniesienia do porównywania czasów retencji w trakcie przeprowadzania metodami chromatograficznymi (RP-HPLC) kontroli jakości radiojodowanej grupy prostetycznej. Szczegóły syntezy organicznej tych związków, wraz z ich analizą fizykochemiczną, opisałem w pracy [H4]. Następnie do nanociała 5F7GGC przyłączyłem odpowiednio radiojodowane grupy [¹²⁵I]IB-Mal-D-GEEEK i [¹³¹I]IB-Mal-D-GDDDK. Właściwości biologiczne otrzymanych radiobiokoniugatów scharakteryzowałem w warunkach *in vitro* na linii komórkowej BT474M1. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że oba radiobiokoniugaty [¹²⁵I]IB-Mal-D-GEEEK-5F7GGC i [¹³¹I]IB-Mal-D-GDDDK-5F7GGC mają podobne powinowactwo do receptora HER2 oraz w jednakowym stopniu ulegają internalizacji do komórek (Rysunek 3 i 4, [H4]). Oznacza to, że wymiana kwasu glutaminowego (E) na kwas asparaginowy (D) nie zmieniła właściwości rezydujących nowej grupy prostetycznej oraz, że przynajmniej w warunkach *in vitro*, nanociało znakowane poprzez grupę [*I]IB-Mal-D-GDDDK zachowuje się identycznie jak w przypadku użycia [*I]IB-Mal-D-GEEEK. Badania biodystrybucji narządowej na myszach z podskórnie wszczepionymi komórkami SKOV3 (komórki ludzkiego nowotworu jajnika wykazujące nadekspresję receptora HER2) potwierdziły, że kumulacja obu radiobiokoniugatów w guzie była wysoka i na jednakowym poziomie już po 1 h od wstrzyknięcia do żyły ogonowej (Tabela 1, [H4]). Analiza statystyczna wykazała różnicę kumulacji obu radioznaczników w wątrobie, śledzionie i płucach, niemniej największą różnicę zaobserwowano w nerkach (Tabela 1, Rysunek 5, [H4]). W przypadku [¹²⁵I]IB-Mal-D-GDDDK-5F7GGC była ona 2-krotnie niższa niż dla [¹³¹I]IB-Mal-D-GEEEK-5F7GGC już po 1 h od podania i utrzymywała się przez następne 4 h, po czym zaczynała maleć. Wyniki z przeprowadzonych badań potwierdziły postawioną przeze mnie wcześniej hipotezę, że prosta wymiana kwasu glutaminowego (E) na kwas asparaginowy (D), prowadząca do powstania nowej grupy prostetycznej [*I]IB-Mal-D-GDDDK, może przyczynić się do znacznej redukcji wychwytu radioaktywności w nerkach, a jednocześnie nie pogarsza jej właściwości rezydujących i nie zmniejsza retencji radiofarmaceutyku (otrzymanego na bazie nanociała 5F7GGC) w guzie nowotworowym.

W dalszych etapach skupiłem się na poszukiwaniu innych grup prostetycznych o charakterze rezydującym, które mógłbym wykorzystać do radiojodowania nanociała 5F7GGC. Zaproponowałem zastosowanie znanego już z danych literaturowych 4-guanidynometylo-3-[^{*}I]jodobenzoesanu *N*-sukcynoimidylu, oznaczanego w skrócie jako [*I]SGMIB (Schemat 6). Jego właściwości rezydujące wynikają z obecności jednego ładunku dodatniego występującego na reszcie guanidynowej [27]. Co prawda, opublikowane dane

pokazują, że internalizujący fragment przeciwciała monoklonalnego (scFv-Fc DM), radiojodowany przy użyciu tej grupy charakteryzuje się, zarówno w badaniach *in vitro* na komórkach, jak i w badaniach *ex vivo* na myszach, znacznie niższą kumulację w nowotworze niż w przypadku zastosowania [¹²⁵I]IB-Mal-D-GEEEEK [19]. Ponieważ jednak właściwości (tj. farmakokinetyka, kumulacja w nowotworze i innych organach oraz droga eliminacji z organizmu) nowo opracowywanych radiofarmaceutyków to w dużej mierze efekt wypadkowy wynikający z właściwości samej biomolekuły oraz zastosowanej metody jej radiojodowania, założyłem, że rezydujące grupy prostetyczne, które wpływają na dobre lub złe wyniki biodystrybucji preparatów opartych na dużych przeciwciałach monoklonalnych nie zawsze muszą mieć podobny wpływ na właściwości biologiczne preparatów zawierających mniejsze związki internalizujące, jak stosowane przeze mnie nanociało 5F7GGC. Dlatego też postanowiłem porównać właściwości nanociała radiojodowanego poprzez wspomnianą grupę [¹²⁵I]SGMIB i – jako punkty odniesienia – znakowanego przy użyciu stosowanej już wcześniej grupy prostetycznej [¹²⁵I]IB-Mal-D-GEEEEK oraz znakowanego metodą bezpośrednią z wykorzystaniem Iodogenu [H2].



Schemat 6. Rezydująca grupa prostetyczna [¹²⁵I]SGMIB.

Wstępne wyniki *in vitro* na komórkach BT474M1 wykazały, że radiobiokoniugat [¹²⁵I]SGMIB-5F7GGC wykazuje nieco lepsze powinowactwo do receptora HER2 niż [¹²⁵I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC lub [¹²⁵I]-5F7GGC (Rysunek S1, [H2]). Jak się spodziewałem, rezultaty internalizacji potwierdziły znacznie większe gromadzenie się preparatu [¹³¹I]SGMIB-5F7GGC wewnątrz komórek niż w przypadku preparatu [¹²⁵I]-5F7GGC (Rysunek 1A, [H2]). Wynika to oczywiście z degradacji [¹²⁵I]-5F7GGC przez enzymy lizosomalne i usuwania z komórki powstających metabolitów [H1, H2]. Dużym zaskoczeniem były jednak wyniki uzyskane z bezpośredniego porównania internalizacji radiobiokoniugatów [¹²⁵I]SGMIB-5F7GGC i [¹³¹I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC (Rysunek 1C, [H2]). Preparat [¹²⁵I]SGMIB-5F7GGC wykazywał o ponad 20% większą kumulację w komórkach BT474M1 niż [¹³¹I]IB-Mal-D-GEEEEK-5F7GGC i to już po 1 h inkubacji. Różnica ta utrzymywała się przez okres następnych 6 h. Wyniki otrzymane podczas biodystrybucji narządowej na myszach z guzami BT474M1 potwierdziły wysoką specyficzność łączenia się wszystkich trzech radioznaczników z receptorem HER2, gdyż wstrzyknięcie nadmiaru nieznakowanego trastuzumabu blokowało ich przyłączanie

i wpływało na znacznie niższą kumulację w guzie (Tabela 1, [H2]). Retencja preparatu [^{131}I]SGMIB-5F7GGC w zdrowych organach była wielokrotnie niższa niż preparatu [^{125}I]-5F7GGC (Tabela S1, [H2]), co w połączeniu z dużym wychwytem w guzie wpływało na wysokie wartości stosunku aktywności w guzie do aktywności w zdrowych tkankach (*Tumor/Normal Tissue*, T/NT) (Rysunek S2, [H2]). Kolejny eksperyment wykazał, że [^{125}I]SGMIB-5F7GGC ma prawie 2-krotnie większą kumulację w nowotworze niż [^{131}I]IB-Mal-D-GEEK-5F7GGC (Tabela S2, Rysunek 2C, [H2]), co również wpłynęło na uzyskanie wysokich wartości T/NT (Rysunek 3, [H2]). Na szczególne podkreślenie zasługuje tu fakt, że obserwowane w obu eksperymentach wysokie gromadzenie się w guzie nowotworowym preparatu [$^{125}/^{131}\text{I}$]SGMIB-5F7GGC - na poziomie 15-25%ID/g - nie było odnotowane wcześniej dla żadnego innego nanociała znakowanego różnymi radionuklidami [28-33]. Tak dobrych wyników nie osiągnięto również w przypadku zastosowania innych mniejszych biomolekuł, także celujących w receptor HER2 [34]. Jednak największym osiągnięciem prowadzonych przeze mnie badań było uzyskanie wyjątkowo małego wychwytu preparatu [^{125}I]SGMIB-5F7GGC w nerkach. Poziom ten był ponad 2-krotnie niższy już po 1 h od podania dożylnego, a po 24 h ponad 50-krotnie niższy niż w przypadku preparatu [^{131}I]IB-Mal-D-GEEK-5F7GGC (Tabela S2, Rysunek 2D, [H2]). Co więcej, badania biodystrybucji *ex vivo* po 24 h wykazały także prawie 5-krotnie mniejszą kumulację [^{131}I]SGMIB-5F7GGC w nerkach niż [^{125}I]-5F7GGC (Tabela S1, Rysunek 2B, [H1]). Sugeruje to, że zaproponowana przeze mnie grupa [$^*\text{I}$]SGMIB może wpływać na sposób wychwytu w nerkach znakowanego nią nanociała 5F7GGC i powstawanie z niego różnych radioaktywnych metabolitów, aczkolwiek mechanizm tych procesów nie jest obecnie poznany. Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają jak skomplikowaną dziedziną jest projektowanie i otrzymywanie radiofarmaceutyków, gdyż każda biomolekuła i każda metoda znakowania tworzą unikalny układ, którego właściwości biologiczne trudno przewidzieć bazując na danych uzyskanych wcześniej dla poszczególnych składników oddzielnie. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że rezydująca grupa prostetyczna [$^*\text{I}$]IB-Mal-D-GEEK, która jest najbardziej optymalna do znakowania dużych przeciwciał monoklonalnych, jest nieodpowiednia do znakowania mniejszych biomolekuł, jak nanociała. Pozwala mi to stwierdzić, że warto stosować, badać i porównywać różne rezydujące grupy prostetyczne, nawet jeśli wcześniej, w innym układzie, wykazywały one gorsze właściwości - jak np. grupa prostetyczna [$^*\text{I}$]SGMIB w przypadku radiojodowania dużych przeciwciał.

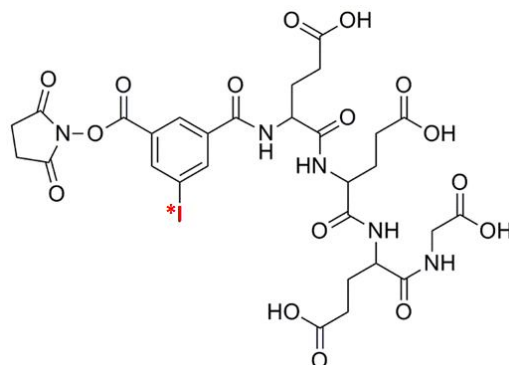
Obiecujące wyniki opisane w pracy H2 zainspirowały nas do opracowywania lepszych analogów grupy [$^*\text{I}$]SGMIB do znakowania biomolekuł radionuklidami jodu i fluoru [35, 36] – w pracach tych brałem czynny udział, aczkolwiek ze względu na wskaźnik mojego udziału poniżej 50% nie włączyłem ich w cykl publikacji stanowiący moje osiągnięcie naukowe. Wyniki opisane w pracy H2 stały się także podstawą do przeprowadzenia bardzo wnikliwych badań (w których także uczestniczyłem) o charakterze aplikacyjnym z nanociałem 2Rs15d radiojodowanym przy użyciu zaproponowanej przeze mnie grupy prostetycznej [$^*\text{I}$]SGMIB [37]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że były to pierwsze badania opisujące teranostyczny radiofarmaceutyk oparty na nanociałach, który obecnie jest już gotowy do translacji klinicznej.

Radiofarmaceutyk [^{131}I]SGMIB-2Rs15d z powodzeniem zastosowano jako środek obrazujący nowotwór HER2 u myszy przy użyciu kamery mikro-SPECT/CT [37] – pracy tej, z wyżej podanego powodu, także nie włączyłem w cykl publikacji stanowiący moje osiągnięcie naukowe. Wyniki badań przedklinicznych na myszach, wykazały również duży efekt terapeutyczny tego radiofarmaceutyku w stosunku do guzów z nadekspresją receptora HER2 [37]. Uzyskane obiecujące wyniki doprowadziły do rozpoczęcia w 2016 roku pierwszych badań klinicznych z udziałem pacjentów zdrowych i z nowotworem piersi, (I faza badań klinicznych - NCT02683083). Obecnie trwają przygotowania do II fazy badań klinicznych radiofarmaceutyku [^{131}I]SGMIB-2Rs15d.

Znakowanie przeciwciała monoklonalnego trastuzumab radionuklidami jodu (*publikacja H3*)

Trastuzumab to humanizowane przeciwciało monoklonalne stosowane jako preparat leczniczy w terapii nowotworu piersi, obecnie także nowotworów gastrycznych, z wykrytą nadekspresją receptora HER2. Od kilku lat trwają intensywne badania nad znakowaniem tego przeciwciała radionuklidami diagnostycznymi i terapeutycznymi [38, 39]. Dlatego, w swoich badaniach nad otrzymywaniem potencjalnych radiofarmaceutyków molekularnych, postanowiłem wykorzystać je jako wektor dostarczający radionuklidy jodu do komórek nowotworowych. Białko to ulega szybkiej internalizacji, stąd konieczność jego radiojodowania poprzez rezydujące grupy prostetyczne. Grupa [$^*\text{I}$]IB-Mal-D-GEEEEK wydawała się być najbardziej optymalna do znakowania trastuzumabu, biorąc pod uwagę satysfakcjonujące wyniki uzyskiwane z internalizującymi przeciwciałami monoklonalnymi radiojodowanymi z jej udziałem [18, 19]. Ponieważ grupa ta zawiera maleinową grupę funkcyjną (Mal-), przeprowadzenie reakcji sprzęgania z trastuzumabem wymaga wytworzenia wolnych grup tiolowych (-SH) na białku. Traktowanie przeciwciała odczynnikiem Traut'a (2-iminotiolan) jest najczęściej stosowaną i najbardziej optymalną metodą wytwarzania grup tiolowych w porównaniu z metodą redukcji wewnętrznych wiązań pomiędzy cysteinami, która może doprowadzić do zniszczenia trzeciorzędowej struktury białka [19]. Generowanie grup tiolowych na białku przeprowadza się tuż przed reakcją łączenia z grupą maleinową, aby uniknąć tworzenia się form multimerycznych powstających w trakcie ich utleniania. Jednak całkowity czas przygotowania białka z grupą -SH i jego sprzężenie z [$^*\text{I}$]IB-Mal-D-GEEEEK może zająć nawet do kilku godzin. Jest to szczególnie niekorzystne w przypadku stosowania radionuklidów o krótkim okresie półrozpadu, jak ^{123}I ($t_{1/2} = 13,2$ h) lub ^{211}At ($t_{1/2} = 7,2$ h). Wykorzystanie grup prostetycznych zawierających aktywny ester *N*-hydroksysukcynoimidylu (NHS-) nie wymaga modyfikacji biomolekuły. Przyłączanie następuje bowiem w wyniku wytworzenia bardzo trwałego wiązania amidowego z pierwszorzędowymi grupami aminowymi (-NH₂), pochodzącymi od lizyn powszechnie obecnych na powierzchni większości białek [40]. Reakcja sprzęgania zachodzi szybko i w łagodnych dla biomolekuły warunkach, co ma wpływ na zachowanie jej immunoreaktywności i powinowactwa do receptora. Dlatego

zapropnowałem stworzenie nowej grupy prostetycznej NHS-[*I]IB-D-EEEG (Schemat 7). Wieloetapową syntezę cynowego prekursora tej grupy oraz jej standardu z nieradioaktywnym jodem, a także scharakteryzowanie ich właściwości fizykochemicznych, opisałem szczegółowo w pracy [H3].



Schemat 7. Rezydująca grupa prostetyczna NHS-[*I]IB-D-EEEG.

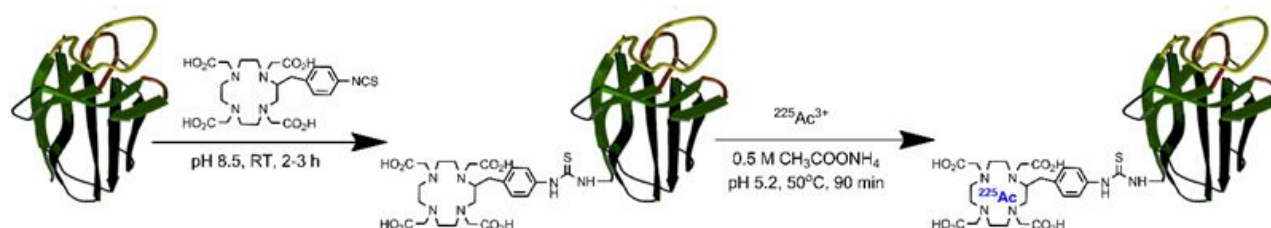
Wytworzenie grup tiolowych na trastuzumabie, jego sprzężenie z [¹²⁵I]IB-Mal-D-GEEEK i wydzielenie finalnego radiofarmaceutyku z mieszaniny reakcyjnej zajmowało aż do 4 h, podczas gdy przyłączanie NHS-[*I]IB-D-EEEG do przeciwciała wraz z oczyszczaniem produktu trwało mniej niż 1 h [H3]. Znaczne skrócenie całej procedury jest bardzo istotne z punktu widzenia produkcji przyszłych radiofarmaceutyków. Właściwości biologiczne trastuzumabu radiojodowanego poprzez nową, opracowaną przeze mnie grupę NHS-[*I]IB-D-EEEG oraz przez grupę [*I]IB-Mal-D-GEEEK porównałem w badaniach *in vitro* na linii komórkowej BT474M1. Wysokie powinowactwo do receptora HER2 zostało zachowane w przypadku obu otrzymanych radiofarmaceutyków (Rysunek 1, [H3]). Badania internalizacji ujawniły, że oba radioznaczniki w równie dużym i szybkim stopniu wnikają do wnętrza komórek oraz że aktywność utrzymuje się na wysokim poziomie przez okres 24 h (Rysunek 2, [H3]). Uzyskane rezultaty potwierdziły, że zaproponowana i zsyntezowana przeze mnie nowa grupa prostetyczna posiada tak samo dobre właściwości rezydujące jak grupa [*I]IB-Mal-D-GEEEK. Badania biodystrybucji narządowej wykazały, iż oba radiobiokoniugaty gromadzą się w podobnym stopniu w większości tkanek, przy czym kumulacje aktywności w tkankach w przypadku stosowania grupy NHS-[*I]IB-D-EEEG były nieznacznie niższe (Tabela 1, [H3]). Kumulacja w guzie dla trastuzumabu radiojodowanego poprzez NHS-[*I]IB-D-EEEG była o około 30% mniejsza niż w przypadku zastosowania grupy [¹²⁵I]IB-Mal-D-GEEEK (Rysunek 3A, [H3]), niemniej nie wpłynęło to znacząco na uzyskiwane wartości sygnału T-NT (guz-zdrowa tkanka) (Rysunek 4, [H3]). Największą, korzystną i bardzo istotną różnicę zaobserwowano w wychwycie obu radioznaczników w nerkach (Rysunek 3B, [H3]). Retencja trastuzumab-NHS-[*I]IB-D-EEEG była 3-krotnie niższa po 4 h od podania dożylnego, a po 6 dniach była niższa aż 8-krotnie niż w przypadku trastuzumab-[*I]IB-Mal-D-GEEEK. Jest to bardzo interesujący

wynik, sugeruje bowiem, że zastosowanie zaproponowanej przeze mnie grupy prostetycznej zawierającej NHS-, może wpływać na powstawanie innych form radioaktywnych metabolitów, których stopień reabsorpcji w nerkach jest znacznie mniejszy niż w przypadku grup prostetycznych zawierających Mal-. Wyniki uzyskane w ramach tej pracy wskazały nowy kierunek badań nad rezydującymi grupami prostetycznymi opartymi na D-aminokwasach. Pozwolą one zidentyfikować składniki strukturalne grup prostetycznych wpływające na maksymalizację wychwytu danego preparatu (radioaktywności) w guzie przy jednoczesnym zminimalizowaniu retencji tego preparatu w nerkach. Prowadzone badania ukierunkowane są na poszukiwanie takich analogów grup NHS-[¹²⁵I]IB-D-EEEG i [¹²⁵I]IB-Mal-D-GDDDK, które mogą być wykorzystane nie tylko do znakowania przeciwciał, ale także mniejszych biomolekuł jak nanociała. Opracowywanie kolejnych, nowych grup prostetycznych opartych na D-aminokwasach kontynuuję nadal w ramach współpracy z prof. Michael Zalutsky z Duke University Medical Center (Durham, USA).

Znakowanie nanociała 2Rs15d radionuklidem ²²⁵Ac (publikacja H5)

Radioimmunoterapia z zastosowaniem radionuklidów emitujących cząstki β^- , których zasięg przenikania w tkankach wynosi 1-10 mm, jest przydatna w leczeniu dużych, heterogenicznych guzów, gdzie ważny jest tzw. efekt „cross-fire” oddziaływania promieniowania. Emitowane w trakcie rozpadu cząstki α , charakteryzują się wysoką wartością współczynnika liniowej energii przekazu (LET ~ 100 keV/ μ m) i krótkim zasięgiem (40-80 μ m), dlatego wydają się być bardziej skuteczne w terapii małych guzów lub przerzutów we wczesnym etapie rozwoju. Celowana α -terapia (*Targeted Alpha Therapy*, TAT) może być także korzystną strategią eliminowania komórek nowotworowych pozostałych po wcześniejszym leczeniu (np. po chirurgicznym usunięciu guza), gdyż wybiórczo uśmierca pojedyncze komórki nowotworowe (z nadekspresją receptora), a jednocześnie nie niszczy sąsiednich komórek zdrowych (bez nadekspresji receptora). Badania kliniczne z zastosowaniem radionuklidów ²¹³Bi i ²²⁵Ac, emitujących w trakcie rozpadu cząstki α , wykazały imponującą odpowiedź terapeutyczną u pacjentów z nowotworem prostaty, neuroendokrynnym lub glejakiem mózgu [41-43]. Udowodniły także, iż zastosowanie w TAT małych biomolekuł i peptydów, jako wektorów naprowadzających, może być skuteczne w leczeniu zmian pierwotnych, przerzutowych, a także opornych na celowaną radioimmunoterapię z użyciem emiterów cząstek β^- . Dotychczas przeprowadzono tylko dwa badania przedkliniczne z użyciem (innych niż stosowane przeze mnie) nanociał znakowanych radionuklidami emitującymi cząstki α , ²¹³Bi i ²¹¹At [44, 45]. Niestety, krótki okres połowicznego rozpadu ²¹³Bi ($t_{1/2} = 46$ min) wymaga użycia dużych radioaktywności, co komplikuje wytwarzanie radiofarmaceutyków do użytku klinicznego. Radionuklid ²¹¹At ($t_{1/2} = 7,2$ h) ma korzystniejszy czas połowicznego rozpadu, ale jego zastosowanie jest ograniczone ze względu na możliwość jego produkcji jedynie w dużych cyklotronach. Radionuklid ²²⁵Ac ma 10-dniowy okres połowicznego rozpadu, a każdy rozpad prowadzi do kaskadowej emisji 4 cząstek α , co objawia się zwiększoną skutecznością

w porównaniu z innymi α -emiterami. Badania przedkliniczne wykazały, że peptydy i przeciwciała znakowane ^{225}Ac miały 700-1000 razy wyższą aktywność terapeutyczną w porównaniu do ich analogów znakowanych innymi radionuklidami, α -emiterami (^{213}Bi , ^{211}At) lub β -emiterami (^{90}Y , ^{177}Lu) [46-48]. Doniesienia te stanowiły przekonujące uzasadnienie do podjęcia przeze mnie prób znakowania nanociała 2Rs15d α -emiterem ^{225}Ac i oceny biologicznej otrzymanego nowego radiofarmaceutyku ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d [H5].



Schemat 8. Reakcja sprzęgania ligandu *p*-SCN-Bn-DOTA z nanociałem 2Rs15d oraz znakowanie otrzymanego biokoniugatu radionuklidem ^{225}Ac . RT - temperatura pokojowa.

Radionuklid ^{225}Ac występuje w roztworze w formie trójładunkowego kationu, tak więc jego przyłączenie do biomolekuły może nastąpić jedynie poprzez zastosowanie dwufunkcyjnego łącznika (*BiFunctional Coupling Agent*, BFCa). Jako łącznika, zdecydowałem się użyć komercyjnie dostępnego makrocyclicznego ligandu DOTA (kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowy) w aktywowanej chemicznie formie *p*-SCN-Bn-DOTA, bowiem z przeglądu literaturowego wynika, że jest to obecnie jedyny ligand, z którym $^{225}\text{Ac}^{3+}$ tworzy bardzo trwałe kompleksy. Sprzęganie tego ligandu z biomolekułą następuje poprzez pierwszorzędowe grupy aminowe, pochodzące od lizyn obecnych w większości białek, z wytworzeniem bardzo trwałego wiązania tiomocznikowego (Schemat 8). Ponieważ stosowane przeze mnie nanociało 2Rs15d posiada w swojej strukturze sześć lizyn, możliwe jest przyłączenie maksymalnie aż sześciu łączników *p*-SCN-Bn-DOTA. Z jednej strony im więcej ligandów jest przyłączonych do biomolekuły, tym więcej kationów radionuklidu może być skompleksowanych. W ten sposób można uzyskać większą aktywność właściwą radiofarmaceutyku, co przekłada się na jego lepsze efekty diagnostyczne lub terapeutyczne. Niestety, zbyt duża liczba przyłączonych chelatorów może również spowodować spadek powinowactwa otrzymanych radiobiokoniugatów do receptorów na komórkach nowotworowych. Wyniki z wcześniejszych badań wykazały, że optymalna liczba przyłączonych ligandów chelatujących do nanociała 2Rs15d nie powinna być większa niż dwa BFCa na jedną cząsteczkę nanociała, bowiem przy ich większej liczbie obserwowałem spadek immunoreaktywności i powinowactwa receptorowego otrzymanego radiobiokoniugatu względem receptora HER2. Dlatego zoptymalizowałem warunki reakcji sprzęgania tak, aby za każdym razem otrzymywać biokoniugat DOTA-2Rs15d o powtarzalnych właściwościach fizykochemicznych. Następnie wykonałem badania kinetyki znakowania biokoniugatu DOTA-

2Rs15d radionuklidem ^{225}Ac (Rysunek 2A, [H5]). Najwyższą wydajność (>90%) reakcji znakowania uzyskiwałem, gdy 100 μg biokoniugatu było inkubowane z ^{225}Ac przez około 75 min w 50°C. Radiobiokoniugat ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d wydzielałem z mieszaniny reakcyjnej metodą chromatografii wykluczenia (SEC), uzyskując finalny produkt o wysokiej czystości radiochemicznej (>95%), co potwierdziłem zarówno metodami chromatograficznymi (ITLC), strącania z kwasem trichlorooctowym (TCA) oraz metodą elektroforezy żelowej (SDS-PAGE) (Rysunek S2, [H5]). Otrzymany przeze mnie nowy radiofarmaceutyk charakteryzował się dużą stabilnością w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) oraz ludzkim osoczu krwi, zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w 37°C (Rysunek 2B, [H5]).

Właściwości biologiczne otrzymanego preparatu ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d zbadałem *in vitro* na komórkach ludzkiego nowotworu jajnika SKOV3 (HER2-pozytywne) oraz ludzkiego gruczolakoraka piersi MDA-MB-231 (HER2-negatywne). Otrzymane wyniki wykazały wysoką immunoreaktywność (>80%) otrzymanego radioznacznika (Rysunek 2C/D, [H5]) oraz jego duże powinowactwo do HER2 (Rysunek 3A, [H5]). Stwierdziłem także jego znacznie większą kumulację w komórkach SKOV3 niż w przypadku komórek MDA-MB-231 (Rysunek 3B, [H5]). Dane te wskazują na dużą specyficzność (wybiórczość) łączenia się preparatu ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d z receptorem HER2, potwierdzoną także w eksperymentach z receptorem zablokowanym w wyniku dodania 100-krotnego nadmiaru niewyznakowanego nanociała 2Rs15d. W ramach pracy wykazałem również, że radiobiokoniugat ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d łączy się z innym epitopem receptora HER2 niż trastuzumab, gdyż nie zaobserwowałem efektu blokowania przy 100-krotnym nadmiarze nieznakowanego trastuzumabu (Rysunek 3B, [H5]). Badania internalizacji w czasie 24 h ujawniły, iż poziom radioaktywności wewnątrz komórek pozostawał na poziomie około 30%, co sugeruje, że nanociało 2Rs15d jest znacznie mniej internalizującą biomolekułą niż stosowane wcześniej nanociało 5F7GGC (Rysunek 3C, [H5]; [H1], [H2], [H4]). Wykonane przeze mnie badania wykazały wysokie działanie toksyczne preparatu ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d wobec komórek SKOV3 w porównaniu ze związkiem kontrolnym ^{225}Ac -DOTA (kompleks radionuklidu nie połączony z biomolekułą) (Rysunek 4A/B, [H5]). Obserwowana cytotoksyczność preparatu ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d była bezpośrednio związana z obecnością nanociała 2Rs15d, wektora doprowadzającego radionuklid do receptora HER2, ponieważ przeżywalność komórek SKOV3 (z nadekspresją receptora HER2) była znacznie niższa niż komórek MDA-MB-231 (bez nadekspresji receptora HER2) (Rysunek 4A/C, [H5]), a wyznaczone wartości IC_{50} (*Inhibitory Concentration*, IC, stężenie związku hamujące w 50% wzrost komórek) wynosiły odpowiednio dla związków ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d i ^{225}Ac -DOTA 10,2 kBq/ml oraz 322,1 kBq/ml. Badania biodystrybucji narządowej na myszach z podskórnie wszczepionymi komórkami nowotworowymi, potwierdziły specyficzne łączenie się ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d do receptora HER2 w warunkach *in vivo*, bowiem kumulacja w komórkach guza SKOV3 była znacznie wyższa niż w przypadku komórek MDA-MB-231 (Tabela 1, [H5]). Retencja preparatu w pozostałych tkankach, z wyjątkiem wątroby i śledziony, była na bardzo niskim poziomie, co pozwoliło na uzyskanie wysokich wartości sygnału T-NT (guz-zdrowa tkanka) (Rysunek 5, [H5]). Wychwyt w nerkach był stosunkowo mały jak na

nanociało (Tabela 1, [H5]), a jednocześnie podanie dożylnie ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d z *Gelofusine*[®] (płynna modyfikowana żelatyna stosowana jako zamiennik osocza krwi) spowodowało jeszcze prawie 3-krotny spadek retencji preparatu (radioaktywności) w nerkach, bez wpływu na jego kumulację w guzie i innych organach (Rysunek 6, [H5]).

Wyniki uzyskane w ramach prowadzonej pracy wskazują, że zaprojektowany przeze mnie preparat ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d jest nowym obiecującym radiofarmaceutykiem o dużych możliwościach zastosowania w celowanej α -radioimmunoterapii (TAT). Należy zaznaczyć, że jest to pierwsze doniesienie literaturowe opisujące próbę znakowania nanociała radionuklidem ^{225}Ac . Prace nad zastosowaniem ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d w radiofarmacji są przeze mnie kontynuowane i doprowadziły do uzyskania preparatu o jeszcze lepszych parametrach biodystrybucji, większej kumulacji w guzie oraz mniejszej retencji w wątrobie, śledzionie i nerkach (wyniki nieopublikowane). Wykonałem również badania biodystrybucji tego preparatu na myszach w znacznie dłuższym okresie czasu (aż do 168 h) w celu oszacowania sumarycznych dawek kumulowanych w poszczególnych organach do momentu całkowitego wydalenia preparatu z organizmu (wyniki nieopublikowane). Przeprowadziłem także początkowe badania terapii indukowanych dootrzewnowo guzów HER2 u myszy, które potwierdziły wysoki efekt terapeutyczny otrzymanego potencjalnego radiofarmaceutyku ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d (wyniki nieopublikowane). Są to wyniki wstępne, które będą podstawą ubiegania się o grant europejski na kontynuowanie bardziej szczegółowych prac nad preparatem ^{225}Ac -DOTA-2Rs15d. Badania te prowadzę w ramach współpracy z prof. Tony Lahoutte z Vrije Universiteit Brussel (Bruksela, Belgia) oraz prof. Alfredem Morgensternem z Instytutu Pierwiastków Transuranowych (Karlsruhe, Niemcy).

IV. PODSUMOWANIE

Wyniki uzyskane i opisane w stanowiącym moje osiągnięcie naukowe cyklu publikacji, potwierdzają możliwość otrzymywania teranostycznych radiofarmaceutyków molekularnych na bazie białek celujących w receptor HER2. Badania te utwierdzają w przekonaniu, jak ważne jest stosowanie rezydujących grup prostetycznych do radiojodowania biomolekuł w dużym stopniu i szybko internalizujących, takich jak trastuzumab oraz nanociało 5F7GGC. Pragnę podkreślić, że moje prace dotyczące znakowania nanociał radionuklidami jodu są pierwszymi doniesieniami literaturowymi w tej tematyce. Uzyskane przeze mnie wyniki zwracają przede wszystkim uwagę na znacznie lepszą farmakokinetykę nanociał w porównaniu z dużymi przeciwciałami. Maksymalna kumulacja w guzie radiofarmaceutyków na bazie nanociał obserwowana była już po 1-2 h od podania dożylnego (H1, H2, H4, H5), podczas gdy dla radiojodowanego trastuzumabu dopiero po 48 h (H3). Dlatego radiojodowane nanociała idealnie nadają się do celów diagnostycznych, do obrazowania pierwotnych guzów nowotworowych oraz ich przerzutów, trudnych do zdiagnozowania stosowanymi obecnie technikami. Ponadto, mogą one znaleźć zastosowanie w monitorowaniu postępu choroby lub jej regresji w wyniku zastosowania terapii ukierunkowanych na zahamowanie aktywności

receptora HER2. Nanociała znakowane terapeutycznymi radionuklidami ^{131}I (emiter cząstek β^-) lub $^{123/125}\text{I}$ (emitery elektronów Auger'a) mogą być także znakomitymi nośnikami letalnej dawki promieniowania jonizującego, toksycznego i niszczącego wybiórczo komórki nowotworowe.

Moim osiągnięciem naukowym w ramach prowadzonych badań było również zaproponowanie i zsyntezowanie dwóch nowych grup prostetycznych, $[\text{*I}]\text{IB-Mal-D-GDDDK}$ i $\text{NHS-}[\text{*I}]\text{IB-D-EEEEG}$, do radiojodowania biomolekuł internalizujących. Wyniki eksperymentalne potwierdziły ich wysokie właściwości rezydujące, nie odbiegające od pierwowzoru, którym była grupa $[\text{*I}]\text{IB-Mal-D-GEEEEK}$. Co więcej, wykazałem że prosta wymiana aminokwasu (E na D) lub grupy sprzęgającej (Mal- na NHS-) może w znaczący sposób wpłynąć na mniejszą kumulację radiojodowanych biomolekuł lub ich metabolitów w nerkach. Ma to duże znaczenie w diagnozowaniu nowotworów pierwotnych lub ich przerzutów w okolicach nerek. Jest to również bardzo ważne z punktu widzenia przyszłych zastosowań terapeutycznych, ze względu na możliwość zredukowania kumulacji dawki w zdrowych organach, a w szczególności zminimalizowania nefrotoksyczności preparatu. Szczególnie interesujące rezultaty na tym polu uzyskałem z zastosowaniem nanociał znakowanych grupą $[\text{*I}]\text{SGMIB}$, która nie tylko kilkudziesięciokrotnie zmniejszyła dawkę dostarczaną do nerek w porównaniu z dotychczas stosowanymi metodami znakowania radionuklidami, ale także z wielokrotnością jej kumulację w guzie. Zastosowanie zaproponowanych przeze mnie grup prostetycznych pozwala na wykorzystanie nanociał jako wektorów dla terapeutycznych radionuklidów jodu, zwłaszcza ^{131}I (pierwsze próby kliniczne na pacjentach z zastosowaniem $[\text{*I}]\text{SGMIB-2Rs15d}$ zostały już podjęte). Jest to mierzalnym podsumowaniem prowadzonych przeze mnie badań i uważam to za jedno z moich najważniejszych osiągnięć naukowych. Jako moje duże osiągnięcie naukowe uważam także otrzymanie preparatu $^{225}\text{Ac-DOTA-2Rs15d}$ (nanociało 2Rs15d znakowane radionuklidem ^{225}Ac). Jest to radioznacznik ukierunkowany na terapię nowotworów małych, w postaci pojedynczych komórek, we wczesnym etapie rozwoju oraz tych komórek nowotworowych, które są odporne nawet na celowaną radioimmunoterapię z zastosowaniem emiterów cząstek β^- . Obiecujące wyniki osiągnięte w badaniach przedklinicznych na myszach wskazują, że może to być kolejny preparat dobrze rokujący na zakwalifikowanie do badań klinicznych na pacjentach.

V. LITERATURA

- [1] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2001**;2:127–137.
- [2] Milanezi F, Carvalho S, Schmitt FC. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn.* **2008**;8:417–434.
- [3] Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Eng J Med.* **2005**;353:1652–1654.
- [4] Agus DB, Bunn PA Jr, Franklin W, Garcia M, Ozols FR. HER-2/neu as a therapeutic target in non-small cell lung cancer, prostate cancer, and ovarian cancer. *Semin Oncol.* **2000**;27:53–63.
- [5] Allred DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol.* **2010**;23:S52–59.
- [6] Mendes D, Alves C, Alfonso N, Cardoso F, Passos-Coelho JL, Costa L, Andrade S, Batel-Marques F. The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer - a systematic review. *Breast Cancer Res.* **2015**;17:140–154.
- [7] Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res.* **2014**;16:209–220.
- [8] Rockberg J, Schwenk JM, Uhlen M. Discovery of epitopes for targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) with antibodies. *Mol Oncol.* **2009**;3:238–247.
- [9] Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E, Kinne J, Leonhardt H, Magez S, Ngyuen VK, Revets H, Rothbauer U, Stijlemans B, Tillib S, Wernery U, Wyns L, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Saerens D. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol.* **2009**;128:178–183.
- [10] Tolmachev V, Stone-Elander S. Radiolabelled proteins for positron emission tomography: Pros and cons of labelling methods. *Biochim Biophys Acta.* **2010**;1800:487–510.
- [11] Garmestani K, Milenic DE, Plascjak PS, Brechbiel MW. A new and convenient method for purification of ⁸⁶Y using a Sr(II) selective resin and comparison of biodistribution of ⁸⁶Y and ¹¹¹In labeled Herceptin. *Nucl Med Biol.* **2002**;29:599–606.
- [12] Helisch A, Förster GJ, Reber H, Buchholz HG, Arnold R, Göke B, Weber MM, Wiedenmann B, Pauwels S, Haus U. Pre-therapeutic dosimetry and biodistribution of ⁸⁶Y-DOTA-Phe¹-Tyr³-octreotide versus ¹¹¹In-pentetreotide in patients with advanced neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2004**;31:1386–1392.
- [13] Geissler F, Anderson SK, Press O. Intracellular catabolism of radiolabeled anti-CD3 antibodies by leukemic T cells. *Cell Immunol.* **1991**;137:96–110.
- [14] Garg PK, Harrison CL, Zalutsky MR. Comparative tissue distribution in mice of the α -emitter ²¹¹At and ¹³¹I as labels of a monoclonal antibody and F(ab')₂ fragment. *Cancer Res.* **1990**;50:3514–3520.

- [15] Stein R, Govindan SV, Mattes MJ, Chen S, Reed L, Newsome G, McBride BJ, Griffiths GL, Hansen HJ, Goldenberg DM. Improved iodine radiolabels for monoclonal antibody therapy. *Cancer Res.* **2003**;63:111–118.
- [16] Foulon CF, Reist CJ, Bigner DD, Zalutsky MR. Radioiodination via D-amino acid peptide enhances cellular retention and tumor xenograft targeting of an internalizing anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody. *Cancer Res.* **2000**;60:4453–4460.
- [17] Shankar S, Vaidyanathan G, Affleck D, Welsh PC, Zalutsky MR. *N*-succinimidyl 3-^[131I]iodo-4-phosphonomethylbenzoate (^[131I]SIPMB), a negatively charged substituent-bearing acylation agent for the radioiodination of peptides and mAbs. *Bioconjugate Chem.* **2003**;14:331–341.
- [18] Vaidyanathan G, Alston KL, Bigner DD, Zalutsky MR. *N*^ε-(3-^[*I]Iodobenzoyl)-Lys⁵-*N*^α-maleimido-Gly¹-GEEEEK (^[*I]IB-Mal-D-GEEEEK): a radioiodinated prosthetic group containing negatively charged D-glutamates for labeling internalizing monoclonal antibodies. *Bioconjugate Chem.* **2006**;17:1085–1092.
- [19] Vaidyanathan G, Jestin E, Olafsen T, Wu AM, Zalutsky MR. Evaluation of an anti-p185^{HER2} (scFv-C_H2-C_H3)₂ fragment following radioiodination using two different residualizing labels: SGMIB and IB-Mal-D-GEEEEK. *Nucl Med Biol.* **2009**;36:671–680.
- [20] Vegt E, De Jong M, Wetzels JFM, Masereeuw R, Melis M, Oyen WJG, Gotthardt M, Boerman OC. Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J Nucl Med.* **2010**;51:1049–1058.
- [21] Bison SM, Konijnenberg MW, Melis M, Pool SE, Bernsen MR, Teunissen JJM, Kwekkeboom DJ, de Jong M. peptide receptor radionuclide therapy using radiolabeled somatostatin analogs: focus on future developments. *Clin Transl Imaging.* **2014**;2:55–66.
- [22] Huang L, Gainkam LOT, Cavelliers V, Vanhove C, Keyaerts M, De Baetselier P, Bossuyt A, Revets H, Lahoutte T. SPECT imaging with ^{99m}Tc-labeled EGFR-specific nanobody for *in vivo* monitoring of EGFR expression. *Mol Imaging Biol.* **2008**;10:167–175.
- [23] Tran T, Engfeldt T, Orlova A, Widström C, Bruskin A, Tolmachev V, Karlström AE. *In vivo* evaluation of cysteine-based chelators for attachment of ^{99m}Tc to tumor-targeting affibody molecules. *Bioconjugate Chem.* **2007**;18:549–558.
- [24] Koch MR, Khalil FL, Lea MA. Decreased uptake of ¹⁴C-labeled dicarboxylic amino acids in rapidly growing hepatomas. *Cancer Res.* **1980**;40:4053–4058.
- [25] Wu F, Örlfors H, Bergström M, Antoni G, Omura H, Eriksson B, Watanabe Y, Långström B. Uptake of ¹⁴C- and ¹¹C-labeled glutamate, glutamine and aspartate *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res.* **2000**;20:251–256.
- [26] Verrey F, Ristic Z, Romeo E, Ramadan T, Makrides V, Dave MH, Wagner CA, Camargo SMR. Novel renal amino acid transporters. *Annu Rev Physiol.* **2005**;67:557–572.

- [27] Vaidyanathan G, Affleck DJ, Bigner DD, Zalutsky MR. Improved xenograft targeting of tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III antibody labeled using N-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-iodobenzoate. *Nucl Med Biol.* **2002**;29:1–11.
- [28] D'Huyvetter M, Vincke C, Xavier C, Aerts A, Impens N, Baatout S, De Raeve H, Muyldermans S, Caveliers V, Devoogdt N, Lahoutte T. Targeted radionuclide therapy with a ^{177}Lu -labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics* **2014**;4:708–720.
- [29] Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, Muyldermans S, Lahoutte T, Caveliers V. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J.* **2011**;25:2433–2446.
- [30] D'Huyvetter M, Aerts A, Xavier C, Vaneycken I, Devoogdt N, Gijs M, Impens N, Baatout S, Ponsard B, Muyldermans S, Caveliers V, Lahoutte T. Development of ^{177}Lu -nanobodies for radioimmunotherapy of HER2-positive breast cancer: evaluation of different bifunctional chelators. *Contrast Media Mol Imaging.* **2012**;7:254–264.
- [31] Xavier C, Vaneycken I, D'Huyvetter M, Heemskerk J, Keyaerts M, Vincke C, Devoogdt N, Muyldermans S, Lahoutte T, Caveliers V. Synthesis, preclinical validation, dosimetry, and toxicity of ^{68}Ga -NOTA-anti-HER2 nanobodies for iPET imaging of HER2 receptor expression in cancer. *J Nucl Med.* **2013**;54:776–784.
- [32] Vosjan MJ, Perk LR, Roovers RC, Visser GW, Stigter-van Walsum M, van Bergen En Henegouwen PM, van Dongen GA. Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor nanobody with ^{68}Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2011**;38:753–763.
- [33] Gainkam LOT, Caveliers V, Devoogdt N, Vanhove C, Xavier C, Boerman O, Muyldermans S, Bossuyt A, Lahoutte T. Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. *Contrast Media Mol Imaging.* **2011**;6:85–92.
- [34] Heskamp S, Laverman P, Rosik D, Boschetti F, van der Graaf WT, Oyen WJ, van Laarhoven HW, Tolmachev V, Boerman OC. Imaging of human growth factor receptor type 2 expression with ^{18}F -labeled affibody molecule $Z_{\text{HER2}:2395}$ in a mouse model for ovarian cancer. *J Nucl Med.* **2012**;53:146–153.
- [35] Choi J, Vaidyanathan G, Koumariou E, McDougald D, **Pruszyński M**, Osada T, Lahoutte T, Lysterly HK, Zalutsky MR. N-succinimidyl guanidinomethyl iodobenzoate protein radiohalogenation agents: influence of isomeric substitution on radiolabeling and target cell residualization. *Nucl Med Biol.* **2014**;41:802–812.
- [36] Vaidyanathan G, McDougald D, Choi J, **Pruszyński M**, Koumariou E, Zhou Z, Zalutsky MR. N-succinimidyl 3-((4-(4-[(^{18}F]fluorobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-5-(guanidinomethyl) benzoate ([(^{18}F]SFBTMGMB): a residualizing label for ^{18}F -labeling of internalizing biomolecules. *Org Biomol Chem.* **2016**;14:1261–1271.
- [37] D'Huyvetter M, De Vos J, Xavier C, **Pruszyński M**, Sterckx YGJ, Massa S, Raes G, Caveliers V, Zalutsky MR, Lahoutte T, Devoogdt N. ^{131}I -labeled anti-HER2 camelid sdAb as a theranostic tool in cancer treatment. *Clin Cancer Res.* **2017**;23: 6616–6628.

- [38] Akabani G, Carlin S, Welsh P, Zalutsky MR. In vitro cytotoxicity of ^{211}At -labeled trastuzumab in human breast cancer cell lines: effect of specific activity and HER2 receptor heterogeneity on survival fraction. *Nucl Med Biol.* **2006**;33:333–347.
- [39] Ray GL, Baidoo KE, Keller LMM, Albert PS, Brechbiel MW, Milenic DE. Pre-clinical assessment of ^{177}Lu -labeled trastuzumab targeting HER2 for treatment and management of cancer patients with disseminated intraperitoneal disease. *Pharmaceuticals.* **2012**;5:1–15.
- [40] Fichna J, Janecka A. Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. *Bioconjugate Chem.* **2003**;14:3–17.
- [41] Kratochwil C, Giesel FL, Bruchertseifer F, Mier W, Apostolidis C, Boll R, Murphy K, Haberkorn U, Morgenstern A. ^{213}Bi -DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2014**;41:2106–2119.
- [42] Kratochwil C, Bruchertseifer F, Rathke H, Bronzel M, Apostolidis C, Weichert W, Haberkorn U, Giesel FL, Morgenstern A. Targeted α therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with ^{225}Ac -PSMA-617: dosimetry estimate and empiric dose finding. *J Nucl Med.* **2017**;58:1624–1631.
- [43] Krolicki L, Morgenstern A, Kunikowska J, Koziara H, Krolicki B, Jakucinski M, Pawlak D, Apostolidis C, Bruchertseifer F. Alpha therapy with ^{213}Bi -DOTA-substance P in recurrent glioblastoma multiforme. *J Nucl Med.* **2016**;57(Suppl 2):632.
- [44] Choi J, Vaidyanathan G, Koumariou E, Kang CM, Zalutsky MR. Astatine-211 labeled anti-HER2 5F7 single domain antibody fragment conjugates: radiolabeling and preliminary evaluation. *Nucl Med Biol.* **2018**;56:10–20.
- [45] Nonnekens J, Chatalic KL, Molkenboer-Kuenen JD, Beerens CE, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Veldhoven-Zweistra J, Schottelius M, Wester HJ, van Gent DC, van Weerden WM, Boerman OC, de Jong M, Heskamp S. ^{213}Bi -labeled prostate-specific membrane antigen-targeting agents induce DNA double-strand breaks in prostate cancer xenografts. *Cancer Biother Radiopharm.* **2017**;32:67–73.
- [46] Graf F, Fahrner J, Maus S, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Venkatachalam S, Fottner C, Weber MM, Huelsenbeck J, Schreckenberger M, Kaina B, Miederer M. 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:e88239.
- [47] Essler M, Gärtner FC, Neff F, Blechert B, Senekowitsch-Schmidtke R, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Seidl C. Therapeutic efficacy and toxicity of ^{225}Ac -labelled vs. ^{213}Bi -labelled tumour-homing peptides in a preclinical mouse model of peritoneal carcinomatosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2012**;39:602–612.
- [48] Song H, Hobbs RF, Vajravelu R, Huso DL, Esaias C, Apostolidis C, Morgenstern A, Sgouros G. Radioimmunotherapy of breast cancer metastases with alpha-particle emitter ^{225}Ac : comparing efficacy with ^{213}Bi and ^{90}Y . *Cancer Res.* **2009**;69:8941–8948.

5. OPIS POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

W latach 1997-2002 studiowałem na jednolitych studiach magisterskich na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku, które ukończyłem z wynikiem bardzo dobrym. W ramach pracy magisterskiej prowadziłem badania nad otrzymaniem i zastosowaniem membranowej elektrody jonoselektywnej, zawierającej parę jonową LD-TPhB (L-dopa – tetrafenyloboran) do oznaczania L-dopy w preparatach farmaceutycznych w warunkach stacjonarnych oraz przepływowo-wstrzykowych. W wyniku przeprowadzonych badań opracowałem nową metodę pozwalającą na proste i szybkie oznaczanie L-dopy z wysoką precyzją pomiarów, a także na uzyskiwanie powtarzalnych i odtwarzalnych wyników. Ponadto zaproponowana metoda umożliwiała selektywne oznaczanie L-dopy w obecności innych katecholamin, zarówno w pomiarach stacjonarnych, jak i przepływowych. Wyniki z tych badań były prezentowane na trzech konferencjach naukowych oraz zostały opublikowane w artykule A2.

W grudniu 2002 roku rozpocząłem pracę w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Pracę doktorską wykonałem pod kierunkiem prof. Aleksandra Bilewicza. Jej tematyka związana była z badaniami właściwości chemicznych astatu oraz jego zastosowaniem w medycynie nuklearnej, w terapii przeciwnowotworowej. Celem pracy było opracowanie nowej, wydajnej metody znakowania biomolekuł radionuklidem ^{211}At , emitującym w trakcie rozpadu cząstki α . W badaniach zastosowałem oryginalną metodę polegającą na przyłączeniu anionu $^{211}\text{At}^-$ do miękkiego kationu metalu skompleksowanego przez chelatujący ligand i otrzymaniu związku, który po przyłączeniu do biomolekuły utworzy ostateczny radiofarmaceutyk. Jako kationy miękkiego metalu zostały wybrane Rh^{3+} i Ir^{3+} , które tworzą silne połączenia z anionami chlorowców, a ponadto, ze względu na niskospinową konfigurację d^6 , tworzą kompleksy o wyjątkowo dużej inercyjności. Jako chelatujący ligand zastosowałem tioeterowy makrocykl 1,5,9,13-tetratiocykloheksadekan-3,11-diol (16aneS₄-diol), ligand silnie wiążący kationy rodów irydu oraz łatwo ulegający reakcjom funkcjonalizowania, w celu wytworzenia ligandu bifunkcyjnego (BFCA). W ramach prowadzonych badań zoptymalizowałem warunki syntezy tych kompleksów i przyłączania do nich radionuklidów jodu (^{123}I , ^{125}I i ^{131}I) oraz ^{211}At , opracowałem także metodę ich wydzielania z mieszaniny reakcyjnej oraz zbadałem stabilność otrzymanych kompleksów w roztworze PBS i ludzkiej surowicy krwi, jak również przeprowadziłem badania biodystrybucji narządowej na myszach. Uzyskane wyniki wykazały, że otrzymane kompleksy charakteryzowały się dużą stabilnością w warunkach *in vivo*, co pozwoliło na kontynuowanie badań nad przyłączaniem do nich biomolekuł. Badania nad otrzymywaniem potencjalnych radiofarmaceutyków na bazie radionuklidu ^{211}At kontynuowałem także po obronie doktoratu. Ze względu na konieczność otrzymywania radionuklidu ^{211}At w cyklotronie, badania były prowadzone we współpracy z naukowcami z wielu ośrodków: Instytut Fizyki Jądrowej PAN (Kraków), Zjednoczony Instytut Badań Jądrowych (Dubna, Rosja), Duke University Medical Center (Durham, USA – stypendium Polsko-Amerykańskiej Fundacji Fulbrighta). Wyniki z tych badań zostały przedstawione na

licznych krajowych i zagranicznych konferencjach oraz opublikowane w recenzowanych czasopismach, powstały także prace przeglądowe dotyczące chemii astatu oraz produkcji radionuklidu ^{211}At i jego zastosowania w medycynie nuklearnej (A1, A3, A13, A15, A16, A21, A22, A23, A24, A26).

W kręgu moich zainteresowań naukowo-badawczych jest także otrzymywanie potencjalnych radiofarmaceutyków diagnostycznych, w tym opracowywanie nowych sposobów otrzymywania radionuklidów diagnostycznych. W ramach 4-miesięcznego stypendium Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej współpracowałem z prof. Ondrejem Lebedą (Instytut Fizyki Jądrowej Czeskiej Akademii Nauk, Řež, Republika Czeska) nad alternatywną cyklotronową metodą produkcji najpopularniejszego w medycynie nuklearnej radionuklidu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (A5). Radionuklid $^{99\text{m}}\text{Tc}$ eluowany jest z generatora $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, a radionuklid ^{99}Mo otrzymywany jest w zaledwie kilku najbardziej wydajnych reaktorach jądrowych na świecie. Niestety ze względu na starzejące się reaktory, ich awarie, bądź modernizacje, w ostatnich latach nastąpił poważny kryzys w dostarczaniu ^{99}Mo do otrzymywania generatora dla $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Stąd bardzo duże zainteresowanie alternatywnymi metodami bezpośredniej produkcji $^{99\text{m}}\text{Tc}$ w wyniku bombardowania protonami tarczy wzbogaconego molibdenu, zwłaszcza że na świecie istnieje ponad 500 cyklotronów, w których możliwa jest jego produkcja. W przeprowadzonych badaniach wyznaczono przekroje czynne i funkcje wzbudzenia dla danych reakcji jądrowych zachodzących podczas bombardowania protonami tarczy ^{nat}Mo oraz oszacowania możliwości otrzymywania $^{99\text{m}}\text{Tc}$ w reakcji $^{100}\text{Mo}(p,2n)$ (A5).

Podczas dwóch staży naukowych w ramach programu badawczego Marie Curie Host Fellowships for Transfer of Knowledge (4 miesiące) oraz EU COST Action BM0607 "Targeted Radionuclide Therapy" (2 miesiące) brałem udział w opracowaniu unikalnego na skalę światową generatora $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ do elucji radionuklidu ^{44}Sc . W trakcie rozpadu radionuklidu ^{44}Sc emitowany jest pozyton (β^+), który po zderzeniu z elektronem ulega anihilacji emitując dwa kwanty gamma. Dlatego radionuklid ^{44}Sc idealnie nadaje się do zastosowania w medycynie nuklearnej do diagnostyki za pomocą techniki Pozytonowej Tomografii Emisyjnej (PET). Ze względu na dłuższy czas połowicznego rozpadu ($t_{1/2} = 3,9 \text{ h}$) oraz wysoki stopień emisji pozytonów (95%) jest alternatywą dla stosowanego obecnie radionuklidu ^{68}Ga ($t_{1/2} = 68 \text{ min}$). W ramach przeprowadzonych badań opracowałem prostą i wydajną metodę zatężania i oczyszczania eluatu ^{44}Sc , działającą w systemie on-line (jednoczesna elucja z generatora radionuklidu ^{44}Sc i jego zatężanie na małej kolumnie wypełnionej żywicą kationowymienną). Ostatecznie radionuklid ^{44}Sc otrzymywany był w 3 ml 0,25 M buforu octanu amonu o $\text{pH} = 4,0$ i mógł być zastosowany bezpośrednio do znakowania biomolekuł. Przeprowadziłem także optymalizację warunków reakcji znakowania radionuklidem ^{44}Sc peptydu DOTATOC, będącego analogiem somatostatyny. Dzięki tym badaniom po raz pierwszy otrzymano radiofarmaceutyk na bazie ^{44}Sc (^{44}Sc -DOTATOC), który był zastosowany u pacjentów do diagnostyki guzów neuroendokrynnych (prof. Baum, Bad-Berka, Niemcy). Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacjach A4, A6, A25.

6. WYKAZ OPUBLIKOWANYCH PRAC NAUKOWYCH ORAZ INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, WSPÓŁPRACY NAUKOWEJ I POPULARYZACJI NAUKI

a) Podsumowanie dorobku naukowego – dane na dzień 01.10.2018:

- Liczba publikacji: **28**
- Liczba prac opublikowanych przed doktoratem: **7**
- Liczba prac opublikowanych po doktoracie: **21**
- Liczba publikacji z bazy *Journal Citation Reports (JCR)*: **20**
- Sumaryczny *Impact Factor (IF)* z roku opublikowania/5-letni: **56,654/57,296**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSzW z roku opublikowania: **613**
- Sumaryczna liczba cytowań (TC): wg *Web of Science* **299** (bez autocytowań - **267**); wg *Scopus* **310** (bez autocytowań - **283**); wg *Google Scholar* **436** (bez autocytowań - **384**)
- Autor i współautor komunikatów naukowych (postery, komunikaty ustne, wykłady): **72**
- *Hirsch Index (HI)*: wg *Web of Science* **8**; wg *Scopus* **9**; wg *Google Scholar* **10**

b) Lista wszystkich publikacji:

Publikacje (JCR) przed doktoratem:

- A1. **Pruszyński M**, Bilewicz A, Wąs B, Petelenz B. Formation and stability of astatide-mercury complexes. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2006**; 268:91-94.
IF_{2006/5-letni}: **0,509/1,123** (MNiSzW₂₀₀₆ = 15); TC: 6/8/12
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu badań, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu artykułu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.
- A2. Wołyniec E, Wysocka M, **Pruszyński M**, Kojło A. Batch and flow-injection determination of catecholamines using ion selective electrodes. *Instrumentation Science and Technology* **2007**; 35:241-253.
IF_{2007/5-letni}: **0,417/0,876** (MNiSzW₂₀₀₇ = 15); TC: 1/4/5
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu jonoselektywnej elektrody z membraną PVC do potencjometrycznego oznaczania L-dopy w preparatach farmaceutycznych, scharakteryzowaniu parametrów elektrody, opracowaniu i interpretacji wyników. Mój udział procentowy szacuję na 15%.
- A3. **Pruszyński M**, Bilewicz A, Zalutsky MR. Preparation of Rh[16aneS₄-diol]²¹¹At and Ir[16aneS₄-diol]²¹¹At complexes as potential precursors for astatine radiopharmaceuticals. Part I: Synthesis. *Bioconjugate Chemistry* **2008**; 19:958-965.
IF_{2008/5-letni}: **4,584/4,416** (MNiSzW₂₀₀₈ = 24); TC: 22/23/31

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i ich wykonaniu, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu artykułu, przygotowaniu odpowiedzi recenzentom i korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

Publikacje (JCR) po doktoracie:

- A4. **Pruszyński M**, Loktionova NS, Filosofov DV, Rösch F. Post-elution processing of $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generator-derived ^{44}Sc for clinical application. *Applied Radiation and Isotopes* **2010**; 68:1636-1641.

IF_{2010/5-letni}: **0,999/1,144** (MNiSzW₂₀₁₀ = 32); TC: 38/37/59

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i ich wykonaniu, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu artykułu oraz odpowiedzi recenzentom i korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

- A5. Lebeda O, **Pruszyński M**. New measurement of excitation functions for (p,x) reactions on ^{nat}Mo with special regard to the formation of ^{95m}Tc , $^{96m+g}\text{Tc}$, ^{99m}Tc and ^{99}Mo . *Applied Radiation and Isotopes* **2010**; 68:2355-2365.

IF_{2010/5-letni}: **0,999/1,144** (MNiSzW₂₀₁₀ = 32); TC: 40/42/55

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w zaplanowaniu badań i ich wykonaniu, opracowaniu części wyników, przygotowaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

- A6. **Pruszyński M**, Majkowska-Pilip A, Loktionova NS, Eppard E, Rösch F. Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter ^{44}Sc . *Applied Radiation and Isotopes* **2012**; 70:974-979.

IF_{2012/5-letni}: **1,179/1,144** (MNiSzW₂₀₁₂ = 25); TC: 28/32/43

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i ich wykonaniu, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu artykułu oraz odpowiedzi recenzentom i korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

- A7. **[H1] Pruszyński M**, Koumariannou E, Vaidyanathan G, Revets H, Devoogdt N, Lahoutte T, Zalutsky MR. Targeting breast carcinoma with radioiodinated anti-HER2 Nanobody. *Nuclear Medicine and Biology* **2013**; 40:52-59.

IF_{2013/5-letni}: **2,408/2,186** (MNiSzW₂₀₁₃ = 30); TC: 40/38/51

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu badań, które obejmowały: syntezę organiczną grupy prostetycznej [^{125}I]IB-Mal-D-GEEK i jej prekursora, radiojodowanie nanociała 5F7GGC dwiema metodami, wykonanie badań kontroli jakości otrzymanych grup prostetycznych

i radiofarmaceutyków (analizy HPLC, LCMS, ITLC, TCA-strącanie, SDS-PAGE, immunoreaktywność, analiza radiofarmaceutyków i ich metabolitów w moczu); analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu; przygotowaniu odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

- A8. **[H2] Pruszyński M**, Koumariou E, Vaidyanathan G, Revets H, Devoogdt N, Lahoutte T, Lierly HK, Zalutsky MR. Improved tumor targeting of anti-HER2 nanobody through N-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-iodobenzoate radiolabeling. *Journal of Nuclear Medicine* **2014**; 55:650-656.

IF_{2014/5-letni}: **6,160**/6,893 (MNI_{SzW}₂₀₁₄ = 45); TC: 28/28/31

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu badań, które obejmowały: syntezę organiczną grupy prostetycznej [¹²⁵I]SGMIB i jej prekursora, radiojodowanie nanociała 5F7GGC trzema metodami, wykonanie badań kontroli jakości otrzymanych grup prostetycznych i radiofarmaceutyków (analizy HPLC, LCMS, ITLC, TCA-strącanie, SDS-PAGE, immunoreaktywność); analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu; przygotowaniu Supplemental Materials i odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

- A9. Koumariou E, Slastnikova TA, **Pruszyński M**, Rosenkranz AA, Vaidyanathan G, Sobolev AS, Zalutsky MR. Radiolabeling and in vitro evaluation of ⁶⁷Ga-NOTA-modular nanotransporter – A potential Auger electron emitting EGFR-targeted radiotherapeutic. *Nuclear Medicine and Biology* **2014**; 41:441-449.

IF_{2014/5-letni}: **2,412**/2,186 (MNI_{SzW}₂₀₁₄ = 30); TC: 16/15/25

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań kontrolnych otrzymanego radiobiokoniugatu i opracowaniu części wyników. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- A10. Filipowicz B, **Pruszyński M**, Krajewski S, Bilewicz A. Adsorption of ¹³⁷Cs on titanate nanostructures. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2014**; 301:889-895.

IF_{2014/5-letni}: **1,034**/1,123 (MNI_{SzW}₂₀₁₄ = 25); TC: 8/9/8

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dyskusji wyników i pracy nad częścią manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 15%.

- A11. Choi J, Vaidyanathan G, Koumariou E, McDougald D, **Pruszyński M**, Osada T, Lahoutte T, Lierly HK, Zalutsky MR. N-succinimidyl guanidinomethyl iodobenzoate protein radiohalogenation agents: Influence of isomeric substitution on radiolabeling and target cell residualization. *Nuclear Medicine and Biology* **2014**; 41:802-812.

IF_{2014/5-letni}: **2,412**/2,186 (MNI_{SzW}₂₀₁₄ = 30); TC: 7/7/7

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu części badań znakowania biomolekuł, opracowaniu części wyników i przygotowaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- A12. **[H3] Pruszyński M**, Koumarianou E, Vaidyanathan G, Chitneni S, Zalutsky MR.

D-amino acid peptide residualizing agents bearing N-hydroxysuccinimido- and maleimido-functional groups and their application for trastuzumab radioiodination. *Nuclear Medicine and Biology* **2015**; 42:19-27.

IF_{2015/5-letni}: **2,429/2,186** (MNiSzW₂₀₁₅ = 30); TC: 2/2/3

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu badań, które obejmowały: syntezę organiczną nowej grupy prostetycznej NHS-[¹²⁵I]IB-D-EEEG i jej prekursora, radiojodowanie trastuzumabu dwiema metodami, wykonanie badań kontroli jakości otrzymanych grup prostetycznych i radiofarmaceutyków (analizy RP-HPLC, LCMS, ITLC, TCA-strącanie, SDS-PAGE, immunoreaktywność); analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu; przygotowaniu odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

- A13. **Pruszyński M**, Łyczko M, Bilewicz A, Zalutsky MR. Stability and in vivo behavior of Rh[16aneS4-diol]²¹¹At complex: A potential precursor for astatine radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine and Biology* **2015**; 42:439-445.

IF_{2015/5-letni}: **2,429/2,186** (MNiSzW₂₀₁₅ = 30); TC: 5/5/6

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i ich wykonaniu, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu artykułu, przygotowaniu odpowiedzi recenzentom i korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

- A14. Vaidyanathan G, McDougald D, Choi J, **Pruszyński M**, Koumarianou E, Zhou Z, Zalutsky MR. N-succinimidyl 3-((4-(4-[¹⁸F]fluorobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-5-(guanidinomethyl) benzoate ([¹⁸F]SFBTMGMB): a residualizing label for ¹⁸F-labeling of internalizing biomolecules. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**; 14:1261-1271.

IF_{2016/5-letni}: **3,564/3,138** (MNiSzW₂₀₁₆ = 35); TC: 6/5/6

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu części badań znakowania biomolekuł, opracowaniu części wyników i przygotowaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- A15. Dziawer Ł, Koźmiński P, Męczyńska-Wielgosz S, **Pruszyński M**, Łyczko M, Wąs B, Celichowski G, Grobelny J, Jastrzębski J, Bilewicz A. Gold nanoparticle bioconjugates labelled with ²¹¹At for targeted alpha therapy. *RSC Advances* **2017**; 7:41024-41032.

IF_{2017/5-letni}: **2,936/3,096** (MNiSzW₂₀₁₇ = 35); TC: 3/3/3

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu części badań znakowania nanocząstek i opracowaniu wyników, napisaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- A16. Lyczko M, **Pruszyński M**, Majkowska-Pilip A, Bilewicz A, Lyczko K, Was B, Męczyńska-Wielgosz S, Kruszewski M, Szkliniarz K, Jastrzębski J, Stolarz A. ²¹¹At labelled Substance P (5-11) as potential radiopharmaceutical for glioma treatment. *Nuclear Medicine and Biology* **2017**; 53:1-8.

IF_{2017/5-letni}: **2,203**/2,186 (MNiSzW₂₀₁₇ = 30); TC: 2/2/2

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na syntezie biokoniugatu siarkowego ligandu makrocyclicznego z peptydem Substancją P, opracowaniu części wyników i napisaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 15%.

- A17. D'Huyvetter M, De Vos J, Xavier C, **Pruszyński M**, Sterckx YGJ, Massa S, Raes G, Caveliers V, Zalutsky MR, Lahoutte T, Devoogdt N. ¹³¹I-labeled anti-HER2 Camelid sdAb as a theranostic tool in cancer treatment. *Clinical Cancer Research* **2017**; 23:6616-6628.

IF_{2017/5-letni}: **10,199**/9,697 (MNiSzW₂₀₁₇ = 45); TC: 8/11/12

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu metody znakowania biomolekuł dużymi aktywnościami radionuklidu ¹³¹I poprzez użycie grupy prostetycznej [¹³¹I]SGMIB, napisaniu części manuskryptu, udział w jego redagowaniu i przygotowaniu odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- A18. Cedrowska E, **Pruszyński M**, Majkowska-Pilip A, Męczyńska-Wielgosz S, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Bilewicz A. Functionalized TiO₂ nanoparticles labelled with ²²⁵Ac for targeted alpha radionuclide therapy. *Journal of Nanoparticle Research* **2018**; 20:83.

IF_{2018/2017/5-letni}: brak/**2,127**/2,333 (MNiSzW₂₀₁₇ = 30); TC: 0/0/1

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dyskusji wyników i pracy nad częścią manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- A19. **[H4] Pruszyński M**, Kang CM, Koumarianou E, Vaidyanathan G, Zalutsky MR.

D-amino acid peptide residualizing agents for protein radioiodination: effect of aspartate for glutamate substitution. *Molecules* **2018**; 23:1223.

IF_{2018/2017/5-letni}: brak/**3,098**/3,268 (MNiSzW₂₀₁₇ = 30); TC: 1/1/2

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu badań, które obejmowały: syntezę organiczną nowej grupy prostetycznej [^{}I]IB-Mal-D-GDDDK i jej prekursora, radiojodowanie nanociała 5F7GGC dwiema metodami, wykonanie badań kontroli jakości otrzymanych grup prostetycznych i radiofarmaceutyków (analizy RP-HPLC, SEC-HPLC, LCMS, ITLC, TCA-strącanie, SDS-PAGE, immunoreaktywność); analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu; przygotowaniu Supplemental Materials i odpowiedzi recenzentom. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

- A20. **[H5] Pruszyński M**, D'Huyvetter M, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Lahoutte T. Evaluation of an anti-HER2 nanobody labeled with ²²⁵Ac for targeted α-particle therapy of cancer. *Molecular Pharmaceutics* **2018**; 15:1457-1466.

IF_{2018/2017/5-letni}: brak/**4,556**/4,785 (MNiSzW₂₀₁₇ = 45); TC: 0/0/0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentów; wykonaniu wszystkich badań związanych z otrzymywaniem biokoniugatu nanociała 2Rs15d z ligandem p-SCN-Bn-DOTA i jego charakterystyce fizykochemicznej oraz znakowaniu biokoniugatu radionuklidem ²²⁵Ac i wykonaniu kontroli jakości otrzymanego radiofarmaceutyku (ITLC, HPLC, SDS-PAGE, stabilność, immunoreaktywność); wykonaniu wszystkich badań in vitro na komórkach; udział w badaniach ex vivo na zwierzętach; analizie i interpretacji otrzymanych wyników; przygotowaniu rysunków i tabel oraz napisaniu artykułu i jego opublikowaniu; przygotowaniu Supplemental Materials i odpowiedzi recenzentom; korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

Pozostałe publikacje:

- A21. **Pruszyński M**, Bilewicz A. Izotopy astatu w medycynie. *Postępy Techniki Jądrowej* **2003**;46:22-26.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na napisaniu artykułu i korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

- A22. **Pruszyński M**. Alfa emitery w medycynie. *Biuletyn Nukleoniczny* **2003**;3/4:2-3.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na napisaniu artykułu i korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 100%.

- A23. **Pruszyński M**, Bilewicz A. Astat w chemii i medycynie. *Wiadomości Chemiczne*, **2004**;59:403-425.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na napisaniu artykułu i korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

- A24. Nourse YuV, Bilewicz A, **Pruszyński M**. ²¹¹At-Rh(16-S4-diol) as a starting complex for preparing an astatine-labeled radiopharmaceutical. *Radiochemistry* **2008**; 50:208-212.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu części badań, interpretacji i opracowaniu wyników. Mój udział procentowy szacuję na 25%.

- A25. Loktionova N, Filosofov DV, **Pruszyński M**, Majkowska A, Baum RP, Rösch F. ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc generator and synthesis of ⁴⁴Sc-DOTA-TOC. In: *Technetium and other radiometals in chemistry and medicine*. Mazzi, U, Eckelman, WC, Volkert, WA (eds). SGE Editoriali, Padova **2010**; 459-464.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu części badań, interpretacji i opracowaniu wyników. Mój udział procentowy szacuję na 20%.

- A26. Zalutsky MR, **Pruszyński M**. Astatine-211: production and availability. *Current Radiopharmaceuticals* **2011**; 4:177-185. TC: 38/38/58

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeglądzie literaturowym, zebraniu informacji i danych oraz przedstawieniu ich w formie tabel, pracy nad częścią manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

- A27. Filipowicz B, Blicharska M, Bartoś B, Łyczko M, Koźmiński P, **Pruszyński M**, Bilewicz A. Rozwój technik i technologii w zakresie zmniejszania radiotoksyczności odpadów promieniotwórczych, w tym metodami radiochemicznymi (The development of techniques and technologies for reducing radiotoxicity of nuclear waste, including radiochemical methods). W: Rozwój technik i technologii wspomagających gospodarkę wypalonym paliwem i odpadami promieniotwórczymi. Red. nauk. Fuks, L. Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa **2014**, 167-170.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na pracy nad częścią manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

- A28. Bartoś B, Majkowska-Pilip A, Walczak R, **Pruszyński M**, Bilewicz A. New separation method of no-carrier-added ^{47}Sc from titanium targets. In: Report on the 1st Research Coordination Meeting on "Therapeutic Radiopharmaceuticals Labelled with New Emerging Radionuclides (^{67}Cu , ^{189}Re , ^{47}Sc) IAEA Reports **2016**; 459-464.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na pracy nad częścią manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 10%.

c) Udział w grantach i projektach badawczych:

- 2016–2019 – projekt Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (IAEA) – CYKSKAND: *Cyklotronowa metoda otrzymywania ^{47}Sc i opracowanie metody jego przyłączania do przeciwciał monoklonalnych* – RC-20488 – kierownik: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz; wykonawca
- 2014–2018 – projekt Narodowego Centrum Nauki (NCN) – SONATA 5: *Nanociała znakowane emiterami alfa jako potencjalne radiofarmaceutyki w celowanej radioimmunoterapii* – 2013/09/D/ST4/03791 – kierownik projektu
- 2014–2018 – projekt Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) – PET-SKAND: *Otrzymywanie radiofarmaceutyków opartych na radionuklidach skandu dla pozytonowej tomografii emisyjnej* – PBS3/A9/28/2015 – kierownik: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz; wykonawca
- 2014–2018 – projekt Narodowego Centrum Nauki (NCN) – OPUS: *Nanocząstki złota, siarczku złota pokrytego złotem i tlenku tytanu modyfikowanego tellurem jako nośniki At-211 w celowanej terapii promieniowaniem alfa* – 2013/11/B/ST4/00516 – kierownik: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz; wykonawca

- 2010–2015 – projekt National Institutes of Health i National Cancer Institute (NIH/NCI) - *Astatine and Iodine Radiolabeled Monoclonal Antibodies* – CA042324 – kierownik: prof. Michael Rod Zalutsky; wykonawca
- 2008–2010 – projekt Department of Energy (DoE): *Astatine-211 Radiochemistry: Development/Methodologies-High Activity Level Synthesis* – DE-FG02-08ER64697 – kierownik: prof. Michael Rod Zalutsky; wykonawca
- 2009–2011 – projekt Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR): *Znakowanie biomolekuł radionuklidem ^{211}At - otrzymywanie radiofarmaceutyków terapeutycznych dla medycyny nuklearnej* – NR05 0056 06 – kierownik projektu
- 2006–2008 – Komitet Badań Naukowych (KBN) grant promotorski: *Kompleksy astatu-211 z metalami jako potencjalne prekursor radiofarmaceutyków* – N204 081 31/1939 – autor projektu i główny wykonawca
- 2004–2008 – projekt w ramach 6 PR Unii Europejskiej, akcji Mobility – Marie Curie Host Fellowships for Transfer of Knowledge (ToK): *Chemical studies for design and production of new radiopharmaceuticals* (akronim: POL-RAD-PHARM) – MTKD-CT-2004-509224 – wykonawca

d) Staże i stypendia naukowe:

- *In Vivo Cellular and Molecular Imaging Laboratory, Vrije Universiteit Brussel, Bruksela, Belgia*
– badania nad znakowaniem nanociał radionuklidami diagnostycznymi i terapeutycznymi – **2017, 2016 i 2015** – 2-tygodniowe wizyty i staże
- *The Institute of Cancer Research, Londyn, Wielka Brytania*
– badania nad znakowaniem biomolekuł Affibodies-EGFRvIII radionuklidem ^{177}Lu – stypendium Haddow Fund – **2016** – 1 miesiąc
- *Instytut Chemii Organicznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa, Polska*
– synteza makrocyclicznych i łańcuchowych ligandów siarkowych na potrzeby medycyny nuklearnej – **2009** – 3 miesiące
- *Department of Radiology, Duke University Medical Center, Durham, USA*
– znakowanie biomolekuł radionuklidami $^{123/124/125/131}\text{I}$, ^{67}Ga i ^{211}At – staż podoktorski – **2010-2013** – 3 lata
– otrzymywanie nowych prekursorów do znakowania biomolekuł radionuklidem ^{211}At – stypendium Polsko-Amerykańskiej Fundacji Fulbrighta – **2006** – 6 miesięcy
- *Institut für Kernchemie, Johannes Gutenberg Universität, Moguncja, Niemcy*
– badania nad otrzymaniem preparatu ^{44}Sc -DOTATOC do diagnostyki guzów neuroendokrynnych metodą PET – EU COST Action BM0607 "Targeted Radionuclide Therapy" – **2009** – 2 miesiące

- badania nad opracowaniem generatora $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ do elucji PET-diagnostycznego radionuklidu ^{44}Sc – 6 PR Unii Europejskiej, Action Mobility – Marie Curie Host Fellowships for Transfer of Knowledge – **2008** – 4 miesiące
- *Nuclear Physics Institute of the CAS, Řež koło Prahy, Republika Czeska*
 - badania nad nową metodą cyklotronowej produkcji radionuklidu diagnostycznego $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – stypendium Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (IAEA) – **2007** – 4 miesiące
 - badania nad chemią ^{211}At – **2005** – 2 tygodnie
- *Zjednoczony Instytut Badań Jądrowych, Dubna, Rosja*
 - badania nad chemią ^{211}At i otrzymywaniem nowych prekursorów do znakowania biomolekuł – stypendium Infelda-Bogolubova – **2005, 2004** – 2 wizyty 2-miesięczne, 1 wizyta 3-tygodniowa
- *Institute for Transuranium Elements, Joint Research Centre, Karlsruhe, Niemcy*
 - szkolenie w zakresie chemii aktynowców – **2003, 2004** – 2 wizyty 1-tygodniowe
- *Instytut Fizyki Jądrowej Polskiej Akademii Nauk, Kraków, Polska*
 - doświadczenia na cyklotronie AIC-144 nad otrzymywaniem radionuklidu ^{211}At i badaniem jego związków z metalami – **2003, 2004, 2005** – wielokrotne wizyty około 1-tygodniowe

e) Otrzymane nagrody i wyróżnienia:

- **2016** – nagroda zespołowa za osiągnięcie *“The therapeutic radiopharmaceutical based on astatine-211-labelled gold nanoparticles and method of its preparation”* – Platinum Medal – Show IWIS 2016, Warszawa, Polska, 10-12.10.2016
- **2016** – nagroda zespołowa za osiągnięcie *“The therapeutic radiopharmaceutical based on astatine-211-labelled gold nanoparticles and method of its preparation”* – Diploma and Special Award of the Romanian Inventors Forum – Show IWIS 2016, Warszawa, Polska, 10-12.10.2016
- **2015** – nagroda Alavi-Mandell od *Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* za publikację *“Improved tumor targeting of anti-HER2 nanobody through N-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-iodobenzoate radiolabeling”* opublikowaną w 2014 r. w czasopiśmie *Journal of Nuclear Medicine*
- **2014** – nagroda zespołowa Dyrektora Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej za najlepszą serię publikacji w latach 2012-2013
- **2008** – druga nagroda w konkursie im. Grzegorza Białkowskiego organizowanego przez Towarzystwo Popierania i Krzewienia Nauk w konkursie na najlepszą pracę doktorską z zakresu chemii – Warszawa, 2008
- **2006** – otrzymanie od Polsko-Amerykańskiej Fundacji Fulbrighta stypendium na 6 miesięczny pobyt w Duke University Medical Center, Durham, USA

- **2006** – nagroda za wystąpienie ustne w sesji Młodych Naukowców podczas konferencji *International Conference on Application of Radiotracers in Chemical, Environmental and Biological Sciences* (ARCEBS'06), Saha Institute of Nuclear Physics, Kalkuta, Indie
- **2005** – uznanie przez Kierownika Zakładu Radiochemii uzyskanych wyników w ramach prowadzonych badań za najważniejsze osiągnięcie zakładu w 2005 roku
- **2003 i 2004** – otrzymanie nagrody Dyrektora Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie za najlepsze prezentacje podczas sesji doktorantów IChTJ

f) Patenty i zgłoszenia patentowe:

Radiofarmaceutyk terapeutyczny oparty na znakowanych astatem-211 nanocząstkach złota oraz sposób jego wytwarzania (*Therapeutic radiopharmaceutical based on gold nanoparticles labelled with astatine-211 and a method for its preparation*) – Janiszewska Ł; Koźmiński P; **Pruszyński M**; Majkowska A; Bilewicz A. Zgłoszenie patentowe P-411258

g) Osiągnięcia w zakresie działalności dydaktycznej i opieki naukowej nad studentami:

- promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr. inż. Rafała Walczaka „*Radionuklidy skandu dla radiofarmaceutyków teranostycznych*” realizowanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie pod kierunkiem prof. dr. hab. Aleksandra Bilewicza
- promotor pomocniczy pracy doktorskiej mgr Edyty Cędrowskiej „*Biokoniugaty nanocząstek tlenków metali jako nośniki emiterów cząstek alfa w celowanej terapii radionuklidowej*” realizowanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie pod kierunkiem prof. dr. hab. Aleksandra Bilewicza
- pomysłodawca tematu pracy, promotor i opiekun w miejscu wykonania (IChTJ) pracy magisterskiej Pani Magdaleny Rodak „*Nanociało HER2 znakowane ^{177}Lu jako potencjalny radiofarmaceutyk terapeutyczny*” obronionej w 2017 r. na Wydziale Fizyki, Uniwersytetu Warszawskiego; promotorzy: dr Marek Pruszyński (IChTJ), dr hab. Maciej Jan Kamiński (UW)
- pomysłodawca tematu pracy, promotor i opiekun w miejscu wykonania (IChTJ) pracy magisterskiej Pani Justyny Małgorzaty Kiec „*Badanie powinowactwa receptorowego radiobiokoniugatu Trastuzumabu na komórkach z nadekspresją receptora HER2*” obronionej w 2016 r. na Wydziale Fizyki, Uniwersytetu Warszawskiego; promotorzy: dr Marek Pruszyński (IChTJ), dr hab. Maciej Jan Kamiński (UW)
- opiekun naukowy z ramienia IChTJ nad pracą magisterską Pani Urszuli Koss „*Otrzymywanie beznosnikowego Re-186 z naświetlonych neutronami tarcz $\text{Re}_2(\text{CO})_{10}$ i $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ z wykorzystaniem efektu Szilarda-Chalmersa*” obronionej w 2009 r. na Wydziale Chemii, Uniwersytetu Warszawskiego; promotor: prof. dr hab. Andrzej Czerwiński (UW); opiekunowie naukowci: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz (IChTJ), dr Marek Pruszyński (IChTJ)

- opieka naukowa nad stażystą Panem Pierre Kitten z IMT Atlantique, Francja (w 2018 r.) w ramach podpisanej umowy *Engineering Internship Agreement – "Radiolabeling of biomolecules with beta and alpha emitters as potential new radiopharmaceuticals for targeted radionuclide therapy"* 13.06 - 24.08.2018
- opieka naukowa nad trzema stażystkami (Joanna Gołąb, Joanną Piechocińską, Martą Rogowską) z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (w 2015 r.) w ramach projektu „Praxis – wzrost kompetencji studentów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego kluczem do osiągnięcia sukcesu na rynku pracy” współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Priorytet IV. Szkolnictwo wyższe i nauka – 01.07 - 31.08.2015
- opieka naukowa nad praktykantkami: Justyną Małgorzatą Kiec (10.03 - 10.06.2015) oraz Magdaleną Rodak (w 2016 r.), studentkami V roku studiów Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego na kierunku Zastosowania Fizyki w Biologii i Medycynie, specjalność: Fizyka Medyczna
- opieka naukowa nad praktykantką Agnieszką Tofil, studentką III roku studiów Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego na kierunku Zastosowania Fizyki w Biologii i Medycynie, specjalność: Fizyka Medyczna, w ramach projektu „Fizyka wobec wyzwań XXI w.” Nr PKOL.04.01.01-00-150/09-02 realizowanego na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007-2013 – 24.03 - 31.05.2014
- dwa wykłady na temat medycyny nuklearnej prowadzone dla studentów kierunku Energetyka Jądrowa i Chemia Jądrowa Uniwersytetu Warszawskiego w ramach cyklu wykładów „Chemia Jądrowa” prowadzonych przez prof. dr hab. Aleksandra Bilewicza w latach 2016-2017
- dwumiesięczne praktyki w szkole podstawowej, gimnazjum i szkole średniej prowadzone w trakcie studiów magisterskich

h) Osiągnięcia w zakresie upowszechniania nauki, działalności popularyzatorskiej:

- w latach 2003–2008 czynny udział w Pikniku Naukowym oraz Festiwalu Nauki jako przedstawiciel Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie
- w dniu 2 grudnia 2009 roku wieczorna audycja w Programie 3 Polskiego Radia na temat zastosowania radionuklidów w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych
- wykład „Promieniowanie – wróg czy sojusznik?” w ramach IX Festiwalu Filozofii „Filozofia i technika”, Olsztyn, Polska, (07-09.09.2016)
- wykład popularyzujący zastosowanie promieniowania do diagnostyki i terapii chorób „Krótki wykład z medycyny nuklearnej” w ramach II Akademickiego Forum Energii Jądrowej (II AFEJ), Kraków, Polska (17-19.05.2017)

- cykl zajęć o promieniowaniu prowadzonych w szkole średniej im. Aleksandra Fredry Nr 81 w Warszawie oraz zorganizowanie wizyt uczniów w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie w latach 2016-2017

i) Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych:

Autor wniosku habilitacyjnego recenzował prace naukowe w następujących czasopismach:

- *Applied Radiation and Isotopes* (3); *Theranostics* (2); *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2); *Current Radiopharmaceuticals* (1); *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* (1); *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* (1); *International Journal of Molecular Sciences* (1); *Open Chemistry* (1)
- recenzja i kwalifikacja około 20 abstraktów w ramach konferencji 12th Annual Meeting of European Society of Molecular Imaging - *European Molecular Imaging Meeting* (EMIM), Kolonia, Niemcy (05-07.04.2017)

j) Członkostwo w radach naukowych, organizacjach i towarzystwach naukowych:

- Członek Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej (2015-2017)
- Członek Komisji Organizacyjno-Ekonomicznej Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej (2015-obecnie)
- Członek Polskiego Towarzystwa Nukleonowego (2008-obecnie)
- Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego (2003-2008)
- Członek European Society of Molecular Imaging (2016-obecnie)

k) Współpraca naukowa:

- Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski – Dr hab. Zbigniew Rogulski, Dr Krzysztof Kilian
- Camel-IDS NV/SA, Bruksela, Belgia – Prof. Tony Lahoutte, Dr Jens de Vos
- Ablynx NV, Ghent, Belgia – Dr Hilde Revets
- Duke University Medical Center, Durham, USA – Prof. Michael Rod Zalutsky, Prof. Ganesan Vaidyanathan
- Institut für Kernchemie, Johannes Gutenberg Universität, Moguncja, Niemcy – Prof. Frank Roesch
- Nuclear Physics Institute of the CAS, Řež koło Pragi, Republika Czeska – Prof. Ondrej Lebeda
- Vrije Universiteit Brussel, Bruksela, Belgia – Prof. Tony Lahoutte, Prof. Nick Devoogt, Dr Matthias D'Huyvetter
- Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Niemcy – Prof. Alfred Morgenstern, Dr Frank Bruchertseifer
- The Institute of Cancer Research, Londyn, UK – Dr hab. Gabriela-Kramer Marek, Dr Graham Smith
- Universitair Ziekenhuis Brussel, Bruksela, Belgia – Prof. Vicky Caveliers, Dr Marleen Keyaerts

I) Komunikaty naukowe (postery, komunikaty ustne, wykłady):

Osoby prezentujące zostały zaznaczone podkreśloną czcionką.

Przed doktoratem:

1. Pruszyński, M.; Bilewicz, A.; Wąs, B.; Petelenz, B. Zastosowanie kompleksów zawierających mostek metal-²¹¹At jako nowej metody otrzymywania radiofarmaceutyków astatowych (Use of metal-²¹¹At complexes as a new method for preparation of astatine radiopharmaceuticals). *IV Krajowa Konferencja Radiochemii i Chemii Jądrowej*, Kraków-Przegorzały, Polska (09-11.05.2005) – **REFERAT**.
2. Pruszyński, M.; Bilewicz, A.; Wąs, B.; Petelenz, B. Badanie kompleksów At⁻ z niektórymi metalami. *I Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików (ChemSession'04)*, Warszawa, Polska (14.05.2004) – **POSTER**.
3. Pruszyński, M.; Bilewicz, A.; Wąs, B.; Petelenz, B. Use of metal-²¹¹At complexes as a new method for preparation of astatine radiopharmaceuticals. *Sixth International Conference on Nuclear and Radiochemistry (NRC-6)*, Akwizgran, Niemcy (29.08-03.09.2004) – **POSTER**.
4. Pruszyński, M.; Bilewicz, A. Radionuclides for nuclear medicine. *Kick-off Workshop on the Project „Chemical Studies for Design and Production of New Radiopharmaceuticals (POL-RAD-PHARM)”*, Warszawa, Polska (04-06.12.2004) – **REFERAT**.
5. Pruszyński, M.; Bilewicz, A.; Wąs, B.; Petelenz, B.; Norseev, Yu.V. Binding of ²¹¹At-Rh(16-S₄-diol) complexes to biomolecules – a new tool for preparation of astatine radiopharmaceuticals. *International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals (ISTR-2005)*, Wiedeń, Austria (14-18.11.2005) – **POSTER**.
6. Pruszyński, M.; Bilewicz, A. Binding of ¹³¹I to rhodium(III) complexes: model studies on attaching ²¹¹At to metal complexes. *Application of radiotracers in chemical, environmental and biological sciences (ARCEBS 06)*, Kalkuta, Indie (23-27.01.2006) – **REFERAT**.
7. Pruszyński, M. Binding of ¹³¹I to rhodium(III) and iridium(III) complexes – model studies on attaching ²¹¹At to metal complexes. *Duke University Medical Center*, Durham, USA (09.08.2006) – **WYKŁAD**.
8. Pruszyński, M. Przyłączanie ²¹¹At do biomolekuł za pomocą mostka metalicznego (Attaching ²¹¹At to biomolecules by means of a metal bridge). *Wspólne Seminarium Radiofarmaceutyczne Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej oraz Instytutu Energii Atomowej Ośrodka Izotopów POLATOM (Common Radiopharmaceutical Seminar of the Institute of Nuclear Chemistry and Technology and the Institute of Atomic Energy, Radioisotope Centre POLATOM)*, Świerk, Polska (23.02.2007) – **REFERAT**.
9. Pruszyński, M.; Bilewicz, A.; Zalutsky, M.R. Rh(16aneS₄)²¹¹At and Ir(16aneS₄)²¹¹At complexes as possible precursors for astatine radiopharmaceuticals. *17th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences*, Akwizgran, Niemcy (30.04-04.05.2007). – **REFERAT**.
10. Pruszyński, M.; Bilewicz, A.; Zalutsky, M.R. Synthesis of Rh[16aneS₄]²¹¹At and Ir[16aneS₄]²¹¹At complexes – new prosthetic groups for labelling with astatine. *Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine*, Kopenhaga, Dania (13-17.10.2007) – **REFERAT**.
11. Pruszyński, M.; Bilewicz, A.; Zalutsky, M.R. Complexes of ²¹¹At with Rh³⁺ and Ir³⁺ as precursors of therapeutic radiopharmaceuticals. *Workshop on Radionuclides and their Carriers for Medical and Industrial Applications*, Warszawa, Polska (26.11.2007) – **REFERAT**.

Po doktoracie:

12. Pruszyński, M. New methods for astatination of biomolecules by metal cation bridge. *The Final Workshop in the Frame of the Marie Curie Host Fellowships for Transfer of Knowledge: Chemical*

Studies for Design and Production of new Radiopharmaceuticals (POL-RAD-PHARM), Warszawa, Polska, (16-17.05.2008) – REFERAT.

13. **Pruszyński, M.**; Bilewicz, A.; Zalutsky, M.R. Synthesis and stability studies of Rh[16aneS4-diol]²¹¹At⁺ and Ir[16aneS4-diol]²¹¹At⁺ complexes – possibility new agents for labelling biomolecules with ²¹¹At. *NRC7: 7th International Conference on Nuclear and Radiochemistry*, Budapeszt, Węgry (24-29.08.2008) – POSTER.
14. **Pruszyński, M.**; Bilewicz, A.; Zalutsky, M.R. Synthesis of Rh[16aneS4-diol]²¹¹At and Ir[16aneS4-diol]²¹¹At complexes – possibly new precursors for labeling with astatine. *International Conference on Recent Developments and Applications of Nuclear Technologies*, Białowieża, Polska (15-17.09.2008) – REFERAT.
15. **Pruszyński, M.**; Loktionova, N.S.; Filosofov, D.V.; Rösch, F. Processing of generator-produced ⁴⁴Sc for medical application. *COST Action D38 "Metal-Based Systems for Molecular Imaging Applications – Joint Working Group Meeting"*, Ateny, Grecja (03-04.10.2008) – REFERAT.
16. **Pruszyński, M.**; Loktionova, N.S.; Filosofov, D.V.; Rösch, F. Design and performance of a 5 mCi ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc radionuclide generator. *COST Action D38 "Metal-Based Systems for Molecular Imaging Applications – Annual Workshop"*, Warszawa, Polska (25-27.04.2009) – REFERAT.
17. **Majkowska, A.**; **Pruszyński, M.**; Loktionova, N.S.; Riss, P.; Rösch, F.; Bilewicz, A. Labelling and stability of tri- and tetraaza-macrocyclic complexes of ⁴⁴Sc. *COST Action D38 "Metal-Based Systems for Molecular Imaging Applications – Annual Workshop"*, Warszawa, Polska (25-27.04.2009) – REFERAT.
18. **Pruszyński, M.**; **Bilewicz, A.** Radiolabeling of DOTATOC with ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc generator-derived ⁴⁴Sc. *1st TARCC International Workshop on targeted radionuclide therapy "Advances in targeted radionuclide therapy"*, Nantes; Francja (25-26.05.2009) – REFERAT.
19. **Loktionova, N.S.**; Filosofov, D.V.; **Pruszyński, M.**; Roesch, F. Post-processing of ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc-radionuclide-generator for medical application. *18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences*, Edmonton, Kanada (12-17.07.2009) – POSTER.
20. **Loktionova, N.S.**; **Pruszyński, M.**; Majkowska, A.; Riss, P.; Roesch, F. Labelling and stability studies of ⁴⁴Sc-DOTATOC. *18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences*, Edmonton, Kanada (12-17.07.2009) – POSTER.
21. **Pruszyński, M.** Zastosowanie radioizotopów w diagnostyce i terapii medycznej. *Konferencja Młodzi – kreatywni i innowacyjni*, Lubiczów k. Warszawy, Polska (02.12.2009) – REFERAT.
22. **Loktionova, N.**; Filosofov, D.; **Pruszyński, M.**; Roesch, F. Design and performance of a novel 5 mCi ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc-radionuclide generator. *2010 Society of Nuclear Medicine Annual Meeting*, Salt Lake City, Utah, USA (05-09.06.2010) – POSTER.
23. **Loktionova, N.S.**; Filosofov, D.V.; **Pruszyński, M.**; Roesch, F. Postprocessing of a novel 5 mCi ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc-radionuclide generator for synthesizing ⁴⁴Sc-DOTATOC. *Society of Nuclear Medicine Annual Meeting*, Salt Lake City, Utah, USA (05-09.06.2010) – POSTER.
24. **Pruszyński, M.**; **Loktionova, N.**; Majkowska, A.; Roesch, R. Radiolabeling of DOTATOC with ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc generator-derived ⁴⁴Sc. *2010 Society of Nuclear Medicine Annual Meeting*, Salt Lake City, Utah, USA (05-09.06.2010) – POSTER.
25. **Majkowska-Pilip, A.**; **Pruszyński, M.**; Bilewicz, A.; Loktionova, N.; Rösch, F. Labeling and stability of ⁴⁶Sc-DOTATATE and ⁴⁴Sc-DOTATATE radiobioconjugates. *COST D38 Action: Metal-Based Systems for Molecular Imaging Applications. Annual Meeting*, Saloniki, Grecja (20-22.06.2010) – REFERAT.

26. Łyczko, M.; **Pruszyński, M.**; Łyczko, K.; Bilewicz, A. Kompleksy rodu z ligandami bifunkcyjnymi znakowane radionuklidami ^{131}I oraz ^{211}At – otrzymywanie radiofarmaceutyków terapeutycznych dla medycyny nuklearnej. *I Ogólnopolska Konferencja Radiofarmaceutyczna*, Łódź, Polska (12-13.05.2011) – REFERAT.
27. Łyczko, M.; Łyczko, K.; **Pruszyński, M.**; Bilewicz, A. Rhodium complexes with organic bifunctional ligands labelled with ^{131}I and ^{211}At as precursors for therapeutic radiopharmaceuticals. *7th Symposium on Targeted Alpha Therapy*, Berlin, Niemcy (17-19.07.2011) – REFERAT.
28. **Pruszyński, M.**; Majkowska, A.; Loktionova, N.S.; Filosofov, D.V.; Eppard, E.; Rösch, F. Application of positron emitter ^{44}Sc in nuclear medicine. *COST Action D38 "Metal-Based Systems for Molecular Imaging Applications – Final Group Meeting"*, Oxford, Wielka Brytania (13-15.09.2011) – REFERAT.
29. Eppard, E.; **Pruszyński, M.**; Mikołajczak, R.; Koumarianou, E.; Miederer, M.; Baum, R.; Roesch, F. ^{44}Sc -labelled octreotides: Synthesis, stability, in vitro, ex vivo, and in vivo behavior. *2012 Society of Nuclear Medicine Annual Meeting*, Miami Beach, Floryda, USA (09-13.06.2012) – REFERAT.
30. Koumarianou, E.; Slastnikova, T.; **Pruszyński, M.**; Zhao, X.G.; Rosenkranz, A.; Vaidyanathan, G.; Sobolev, A.; Zalutsky, M. Modular nanotransporters: A flexible platform forward for targeted Auger electron therapy. *2012 Society of Nuclear Medicine Annual Meeting*, Miami Beach, Floryda, USA (09-13.06.2012) – POSTER.
31. Zalutsky, M.; **Pruszyński, M.** Radiochemistry of astatine-211: application to alpha particle targeted radiotherapeutics. *EuCheMS 8th International Conference on Nuclear and Radiochemistry*, Como, Włochy (16-21.08.2012) – REFERAT.
32. D'Huyvetter, M.; **Pruszyński, M.**; Koumarianou, E.; Cavaliers, V.; Xavier, C.; Devoogdt, N.; Vaidyanathan, G.; Lahoutte, T.; Zalutsky M. Evaluation of bivalent antiHER2 Nanobody constructs for improved cellular retention and in vivo tumor targeting. *World Molecular Imaging Conference (WMIC)*, Dublin, Irlandia (05-08.09.2012) – REFERAT.
33. Bilewicz, A.; Kasperek, A.; Leszczuk, E.; Łyczko, M.; **Pruszyński, M.** Radiofarmaceutyki oparte na emiterach alfa. *XIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Medycyny Nuklearnej*, Kielce, Polska (19-22.09.2012) – REFERAT.
34. Choi, J.; Vaidyanathan, G.; Koumarianou, E.; **Pruszyński, M.**; Lahoutte, T.; Zalutsky, M.R. Isomeric *N*-succinimidyl 3-guanidinomethyl-5- ^{131}I iodobenzoate (*iso*- ^{131}I SGMIB): A guanidine-containing residualizing agent for radiohalogenation of internalizing biomolecules. *20th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences*, Jeju, Korea Południowa, (12-17.05.2013) – REFERAT.
35. Vaidyanathan, G.; McDougald, D.; **Pruszyński, M.**; Koumarianou, E.; Hens, M.A.; Lahoutte, T.; Zalutsky, M.R. SFBTMGMB (*N*-succinimidyl 3-((4-(4-fluorobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)-5-(guanidinomethyl)benzoate): An SGMIB analogue for labeling internalizing biomolecules with ^{18}F . *20th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences*, Jeju, Korea Południowa, (12-17.05.2013) – REFERAT.
36. D'Huyvetter, M.; **Pruszyński, M.**; Koumarianou, E.; Cavaliers, V.; Xavier, C.; Devoogdt, N.; Vaidyanathan, G.; Lahoutte, T.; Zalutsky, M.R. Evaluation of bivalent anti+HER2 nanobody constructs for improved cellular retention and in vivo tumor targeting. *20th BEFY Symposium*, Vrije Universiteit Brussel, Bruksela, Belgia (20.05.2013) – REFERAT.
37. Krajewski, S.; Bilewicz, A.; Laszuk, E.; **Pruszyński, M.**; Garnuszek, P.; Mikołajczak, R.; Karczmarczyk, U.; Wojdowska, W. Chemical and biological studies on ^{105}Rh -labelled tetrathioethers conjugated to TATE. *17th Radiochemical Conference*, Marjańskie Łaźnie, Republika Czeska (11-16.05.2014) – POSTER.

38. Janiszewska, L.; Łyczko, M.; **Pruszyński, M.**; Wąs, B.; Bilewicz, A. Gold nanoclusters as ^{211}At carriers for alpha radiotherapy. *COST TD1004 Action Theragnostics Imaging and Therapy: An Action to Develop Novel Nanosized Systems for Imaging-Guided Drug Delivery, Annual Meeting, Istanbul, Turcja* (03-04.10.2014) – **POSTER**.
39. Janiszewska, Ł.; Koźmiński, P.; **Pruszyński, M.**; Bilewicz, A.; Jastrzębski, J.; Choiński, J.; Stolarz, A.; Trzcińska, A.; Szkliniarz, K.; Zipper, W. Gold Nanoparticle–Substance P(5-11) Conjugate as a Carrier for ^{211}At in Alpha Particle Therapy. *9th Symposium on Targeted Alpha Therapy, Warszawa, Polska* (19-22.05.2015) – **REFERAT**.
40. Łyczko, M.; **Pruszyński, M.**; Łyczko, K.; Wąs, B.; Męczyńska, S.; Kruszewski, M.; Bilewicz, A.; Jastrzębski, J.; Choiński, J.; Sitarz, M.; Stolarz, A.; Trzcińska, A.; Szkliniarz, K.; Zipper, W. Nowy potencjalny radiofarmaceutyk terapeutyczny oparty na At-211. *III Międzynarodowa Konferencja Radiofarmaceutyczna, Łódź, Polska* (28-29.05.2015) – **REFERAT**.
41. Koźmiński, P.; Janiszewska, Ł.; **Pruszyński, M.**; Stolarz, A.; Trzcińska, A.; Szkliniarz, K.; Wąs, B.; Bilewicz, A.; Bouziotis, P. Gold nanoparticle bioconjugates labelled with ^{211}At – new radiopharmaceuticals for alpaimmunotherapy. *COST TD 1004 Final Annual Meeting, Belgrad, Serbia* (10-11.09.2015) – **REFERAT**.
42. Bilewicz, A.; Janiszewska, Ł.; Kozminski, P.; Łyczko, M.; **Pruszyński, M.**; Jastrzebski, J.; Choinski, J.; Stolarz, A.; Trzcińska, A.; Szkliniarz, K.; Zipper, W. Gold Nanoparticles-Substance P(5-11) Conjugate as a Carrier for 211At in Alpha Particle Therapy. *28th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine EANM'15, Hamburg, Niemcy* (10-14.10.2015) – **REFERAT**.
43. Vaidyanathan, G.; McDougald, D.; Choi, J.; Koumariannou, E.; **Pruszyński, M.**; Osada, T.; Lyster, H.K.; Lahoutte, T.; Zalutsky, M.R. An Anti-HER2 Nanobody Labeled with ^{18}F Using a Residualizing Label for Assessing HER2 Status. *28th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine EANM'15, Hamburg, Niemcy* (10-14.10.2015) – **REFERAT**.
44. Dziawer, Ł.; Koźmiński, P.; **Pruszyński, M.**; Wąs, B.; Bilewicz, A. Gold nanoparticle-substance P(5-11) conjugate as a carrier for ^{211}At in alpha particle therapy. *12th CYCLEUR Workshop and 2nd Bern Cyclotron Symposium, Berno, Szwajcaria* (23-24.06.2016) – **REFERAT**.
45. Bartoś, B.; Majkowska-Pilip, A.; Walczak, R.; **Pruszyński, M.**; Bilewicz, A. New separation method of separation no-carrier-added ^{47}Sc from titanium targets. *IAEA Coordination Meeting Therapeutic Radiopharmaceuticals Labelled with New Emerging Radionuclides (^{67}Cu , ^{186}Re , ^{47}Sc), Wiedeń, Austria* (05-09.09.2016) – **REFERAT**.
46. **Pruszyński, M.** Promieniowanie – wróg czy sojusznik? (Radiation – enemy or ally?). *IX Festiwal Filozofii „Filozofia i technika”, Olsztyn, Polska*, (07-09.09.2016) – **WYKŁAD**.
47. **Pruszyński, M.** Nanobodies labelled with α -emitting ^{225}Ac as potential new therapeutic radiopharmaceutical. *Vrije Universiteit Brussel, Bruksela, Belgia* (07.10.2016) – **WYKŁAD**.
48. Bilewicz, A.; Dziawer, L.; Kozminski, P.; **Pruszyński, M.**; Majkowska-Pilip, A.; Stolarz, A.; Szkliniarz, K.; Jastrzebski, J.; Celichowski, G.; Grobelny, J.; Tomaszewska, E. Gold nanoparticles labelled with ^{211}At conjugated to substance P and trastuzumab – new radiopharmaceuticals for alpha particle therapy. *29th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine EANM'16, Barcelona, Hiszpania* (15-19.10.2016) – **REFERAT**.
49. **Pruszyński, M.**; Cędrowska, E.; Radchenko, V.; John, K.D.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; D'Huyvetter, M.; Lahoutte, T. Anti HER2 Nanobody Labeled with ^{225}Ac as a Potential

- Radiopharmaceutical for TRT. 29th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine EANM'16, Barcelona, Hiszpania (15-19.10.2016). – REFERAT.
50. **Pruszyński, M.** Nanobodies – new probe for cancer diagnosis and therapy. The Institute of Cancer Research, Londyn, Wielka Brytania (28.11.2016) – WYKŁAD.
51. Cędrowska, E.; **Pruszyński, M.**; Bilewicz, A.; Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F. Multimodal nanoparticles labelled with ²²⁵Ac for targeted radionuclide therapy and hyperthermia. 22nd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS 2017), Drezno, Niemcy (14-19.05.2017) – POSTER.
52. Walczak, R.; Bilewicz, A.; Misiak, R.; **Pruszyński, M.**; Choiński, J.; Sitarz, M.; Stolarz, A.; Jastrzębski, J. Cyclotron production of theranostic pair radionuclides ⁴³Sc-⁴⁷Sc on calcium targets. 22nd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS 2017), Drezno, Niemcy (14-19.05.2017) – REFERAT.
53. Dziawer, Ł.; Koźmiński, P.; Męczyńska, S.; **Pruszyński, M.**; Łyczko, M.; Wąs, B.; Celichowski, G.; Bilewicz, A. Bioconjugates of gold nanoparticles with trastuzumab labeled with ²¹¹At for internal alpha therapy. 22nd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS 2017), Drezno, Niemcy (14-19.05.2017) – REFERAT.
54. **Pruszyński, M.** Krótki wykład z medycyny nuklearnej. II Akademickie Forum Energii Jądrowej (II AFEJ), Kraków, Polska (17-19.05.2017) – WYKŁAD.
55. **Pruszyński, M.**; D'Huyvetter, M.; Cędrowska, E.; Lahoutte, T.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A. Preclinical evaluation of anti-HER2 2Rs15d nanobody labeled with ²²⁵Ac. 10th International Symposium on Targeted Alpha Therapy (10th TAT), Kanazawa, Japonia (30.05-01.06.2017) – REFERAT.
56. **Pruszyński, M.**; Cędrowska, E.; Bilewicz, A.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A. Radiochemical separation of ²²⁴Ra from ²³²U or ²²⁸Th sources for ²²⁴Ra/²¹²Pb/²¹²Bi generator. 10th International Symposium on Targeted Alpha Therapy (10th TAT), Kanazawa, Japonia (30.05-01.06.2017) – POSTER.
57. Cędrowska, E.; Maliszewska, W.; **Pruszyński, M.**; Bouziotis, P.; Bilewicz, A. Magnetic nanoparticles labelled with ²²⁵Ac. Synthesis, *in vitro* and *in vivo* studies. 10th International Symposium on Targeted Alpha Therapy (10th TAT), Kanazawa, Japonia (30.05-01.06.2017) – POSTER.
58. Koźmiński, P.; Janiszewska, Ł.; **Pruszyński, M.**; Wąs, B.; Jastrzębski, J.; Choiński, J.; Stolarz, A.; Sitarz, M.; Szkliniarz, K.; Grobelny, J.; Celichowski, G.; Bilewicz, A. Gold nanoparticle-conjugates as a carrier for ²¹¹At in alpha particle therapy. 10th International Symposium on Targeted Alpha Therapy (10th TAT), Kanazawa, Japonia (30.05-01.06.2017) – REFERAT.
59. **Pruszyński, M.**; Walczak, R.; Bilewicz, A. Scandium radionuclides in nuclear medicine application. 2nd Jagiellonian Symposium on Fundamental and Applied Subatomic Physics; Kraków, Polska (04-09.06.2017) – REFERAT.
60. Cędrowska, E.; **Pruszyński, M.**; Bilewicz, A.; Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F. Koniugaty magnetycznych nanocząstek z przeciwciałami monoklonalnymi jako nośniki dla ²²⁵Ac w celowanej terapii radionuklidowej i hipertermii. XIV Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików (ChemSession'17), Warszawa, Polska (09.06.2017) – POSTER.
61. Walczak, R.; **Pruszyński, M.**; Misiak, R.; Bilewicz, A. Radionuklidy skandu dla radiofarmaceutyków teranostycznych. XIV Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików (ChemSession'17), Warszawa, Polska (09.06.2017) – POSTER.
62. Łyczko, M.; Walczak, R.; Dziawer, Ł.; Gumieła, M.; Gniazdowska, E.; Koźmiński, P.; Majkowska, A.; **Pruszyński, M.**; Krajewski, S.; Bilewicz, A. Application of Accelerator Produced Isotopes in Nuclear

- Medicine – INCT Research Activity. *International Conference on Development and Applications of Nuclear Technologies NUTECH 2017*, Kraków, Polska (13-13.09.2017) – **REFERAT**.
63. Bilewicz, A.; Walczak, R.; **Pruszyński, M.** Cyclotron production of scandium radionuclides (^{43}Sc , ^{44}Sc and ^{47}Sc) for theranostic application. *Portuguese National Nuclear Medicine Congress*, Lizbona, Portugalia (25-26.11.2017) – **REFERAT**.
64. Bilewicz, A.; Walczak, R.; **Pruszyński, M.** Production and application of theranostic pair $^{43}\text{Sc}/^{44}\text{Sc}$ - ^{47}Sc . *1st Joint CNRS/PAN Workshop Nuclear Medicine & Radiochemistry*, Gif-sur-Yvette, Francja (11-12.12.2017) – **REFERAT**.
65. Walczak, R.; Bilewicz, A.; **Pruszyński, M.**; Misiak, R. New cyclotron method for ^{47}Sc production and conjugation of ^{47}Sc to monoclonal antibodies. *2nd Research Coordination Meeting on „Therapeutic Radiopharmaceuticals labelled with New Emerging Radionuclides (^{67}Cu , ^{186}Re , ^{47}Sc)”*, Legarno, Włochy (5-9.03.2018) – **REFERAT**.
66. Bilewicz, A.; Walczak, R.; **Pruszyński, M.** Theranostic radionuclides: from production to radiochemistry. *VII Congresso Nazionale Gruppo Interdisciplinare di Chimica dei Radiofarmaci*, Ferrara, Włochy (11-12.05.2018) – **REFERAT**.
67. **Pruszyński, M.**; Rodak, M.; Walczak, R.; D’Huyvetter, M.; Cędrowska, E.; Lahoutte, T.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A. Anti-HER2 nanobody labeled with ^{225}Ac as a potential radiopharmaceutical for Targeted Alpha Therapy. *Symposium Narodowego Centrum Badań Jądrowych w Ramach Europejskiego projektu Teaming (NOMATEN)*, Świerk, Polska (16.05.2018) – **REFERAT**.
68. Walczak, R.; **Pruszyński, M.**; Rodak, M.; Cędrowska, E.; Bilewicz, A.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A. Separacja radionuklidu ^{224}Ra od ^{232}U lub ^{228}Th dla generatora $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$. *Konferencja Fizyka Medyczna Farmacja Fizyczna 2018*, Warszawa, Polska (24.05.2018) – **POSTER**.
69. Rodak, M.; **Pruszyński, M.**; D’Huyvetter, M.; Walczak, R.; Cędrowska, E.; Lahoutte, T.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A. Badania przedkliniczne nanociała anty-HER2 wyznakowanego ^{225}Ac . *Konferencja Fizyka Medyczna Farmacja Fizyczna 2018*, Warszawa, Polska (24.05.2018) – **POSTER**.
70. Walczak, R.; **Pruszyński, M.**; Rodak, M.; Cędrowska, E.; Bilewicz, A.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A. Separacja radionuklidu ^{224}Ra od ^{232}U lub ^{228}Th dla generatora $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$. *XV Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików ChemSession’18*, Warszawa, Polska (08.06.2018) – **POSTER**.
71. Walczak, R.; Misiak, R.; **Pruszyński, M.**; Majkowska-Pilip, A.; Sitarz, M.; Jastrzębski, J.; Bilewicz, A. Production of ^{47}Sc on ^{48}Ca targets. *The Third International Symposium on Technetium and Other Radiometals in Chemistry and Medicine*, Bressanone, Italy (26-29.09.2018) – **POSTER**.
72. Dziawer, Ł.; Majkowska-Pilip, A.; **Pruszyński, M.**; Wąs, B.; Jastrzębski, J.; Gawęł, D.; Bilewicz, A. Bioconjugates of gold nanoparticles with trastuzumab labelled with ^{211}At for alpha nanobrachytherapy. *The Third International Symposium on Technetium and Other Radiometals in Chemistry and Medicine*, Bressanone, Włochy (26-29.09.2018) – **POSTER**.

Marek Pruszyński