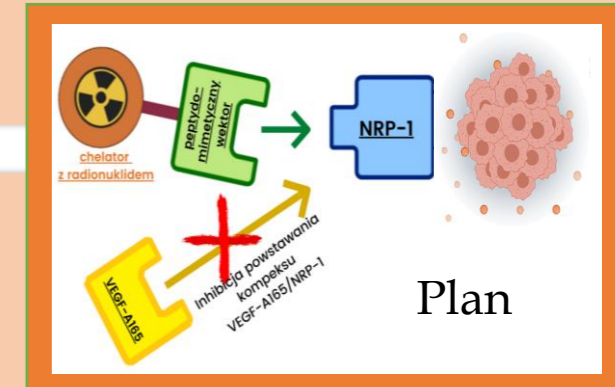


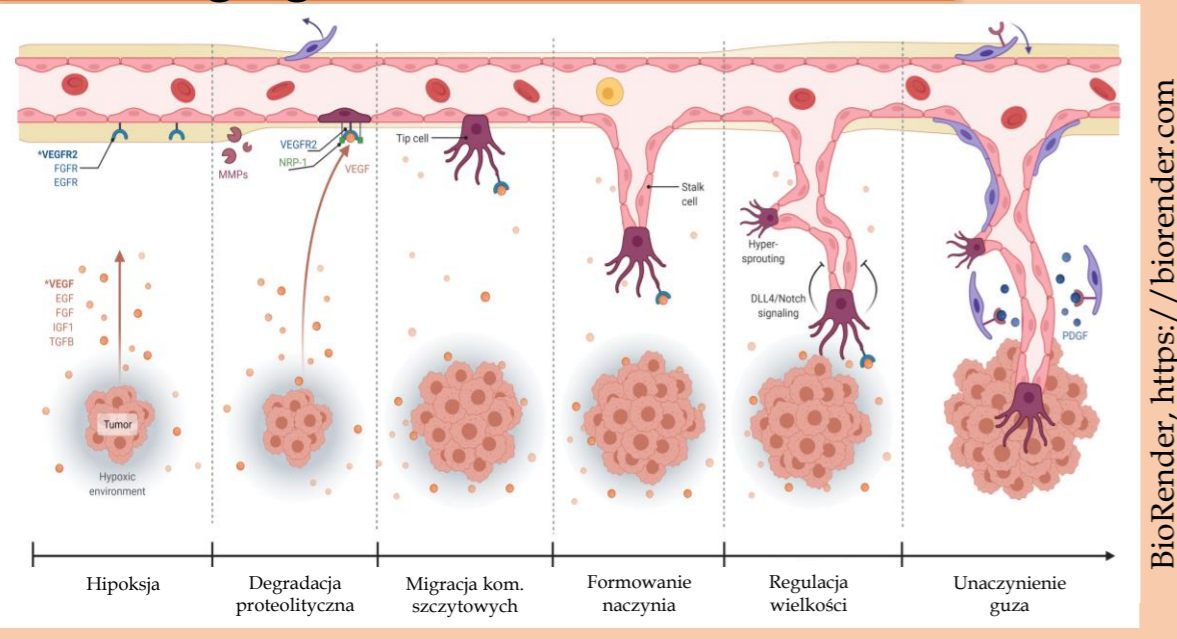
Synteza preparatów medycznych opartych na peptydowych inhibitorach powstawania kompleksu VEGF/NRP-1 dla diagnostyki i terapii wczesnych etapów patologicznej angiogenezy

Mgr Katarzyna Masłowska

Promotorzy: prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik UW
dr hab. Ewa Gniazdowska, prof. ICHTJ



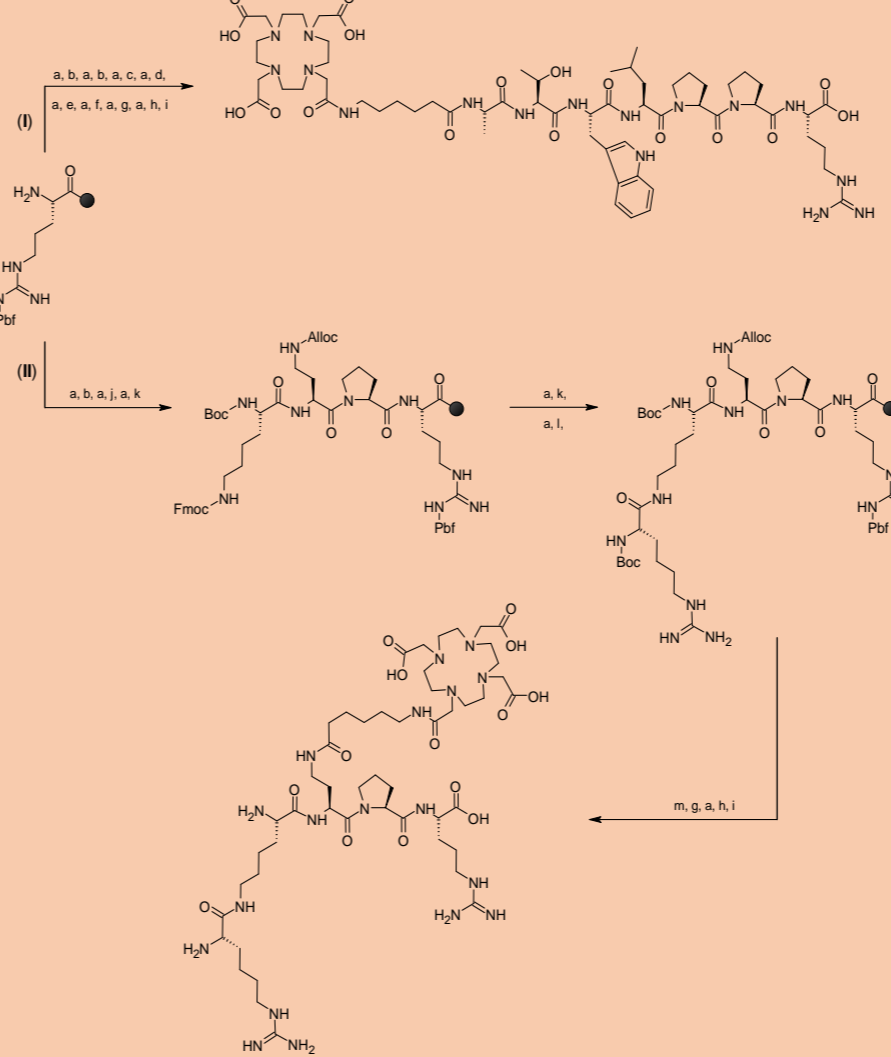
Neoangiogeneza



BioRender, <https://biorender.com>

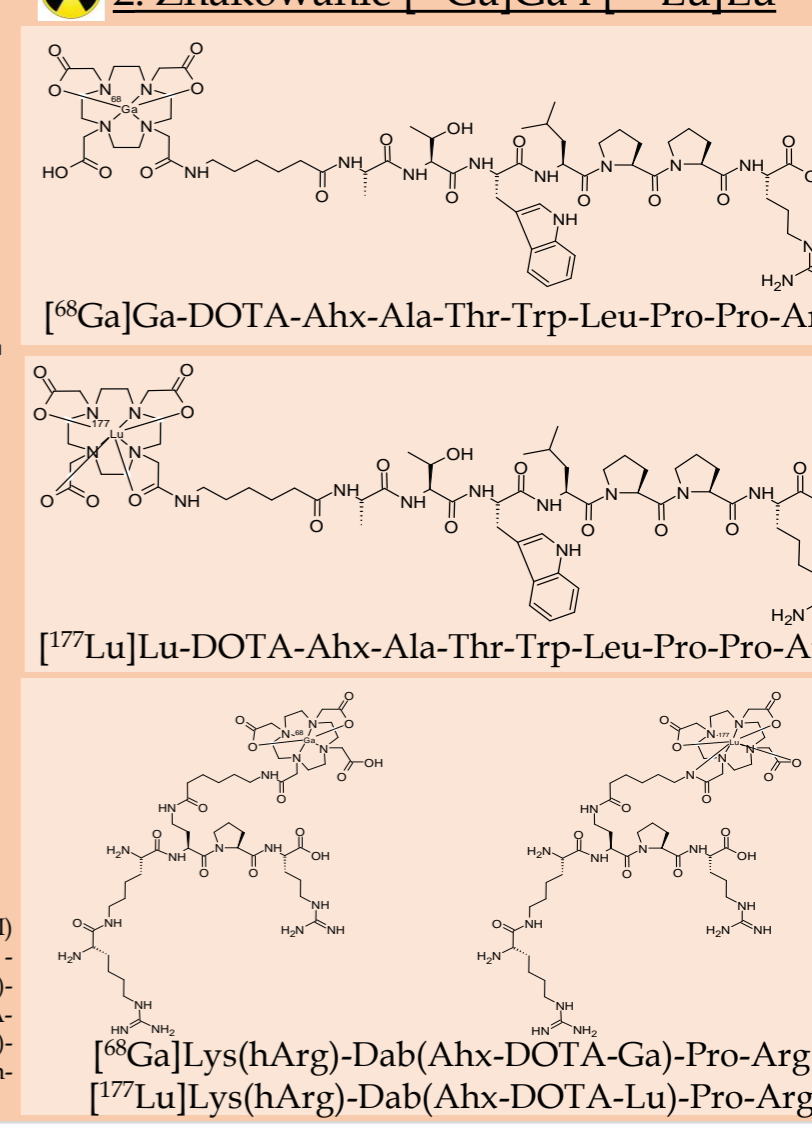
Antyangiogenne radiokoniugaty

1. Synteza DOTA-Ahx-A7R i DOTA-Ahx-KM1

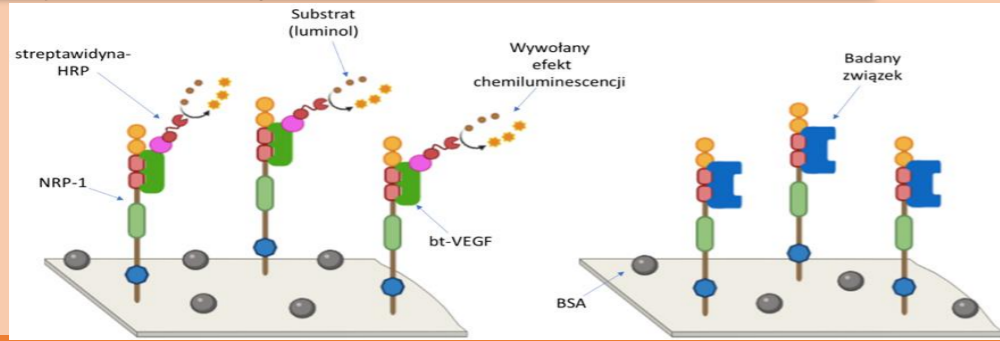


Strategia syntezy koniugatów DOTA-Ahx-A7R (ścieżka I) i DOTA-Ahx-KM1 (ścieżka II) wykonano metodą SPPS. a - 30% piperydyna w DMF, b - Fmoc-Pro-OH:DIC:HOBT, c - Fmoc-Leu-OH:DIC:HOBT, d - Fmoc-Trp(Boc)-OH:DIC:HOBT, e - Fmoc-Thr(tBu)-OH:DIC:HOBT, f - Fmoc-Ala-OH:DIC:HOBT, g - Fmoc-Ahx-OH:DIC:HOBT, h - DOTA-tris(tBu)-NHS:trietyloamina, i - TFA/PhOH/H₂O/TIPS, j - Fmoc-L-Dab(Alloc)-OH:DIC:HOBT, k - Boc-Lys(Fmoc)-OH:DIC:HOBT, l - di-Boc-S-metyloizotiomocznik:n-butylamina:DCM, m - fenylsolan:tetrakis(trienylfosfino)palladu:DCM

2. Znakowanie [68Ga]Ga i [177Lu]Lu



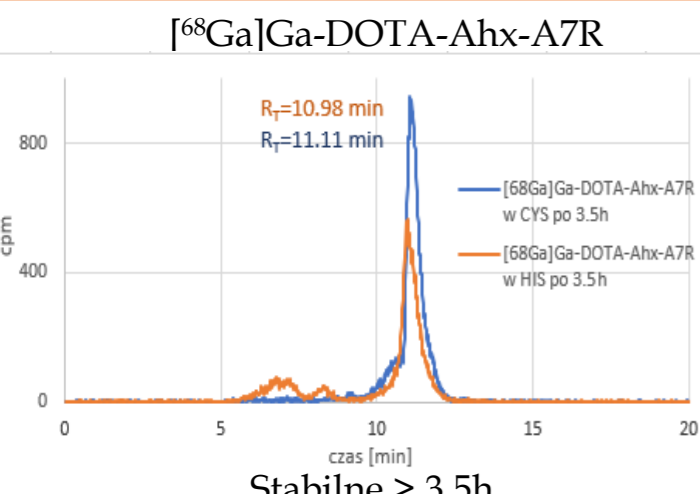
Testy inhibicji - ELISA



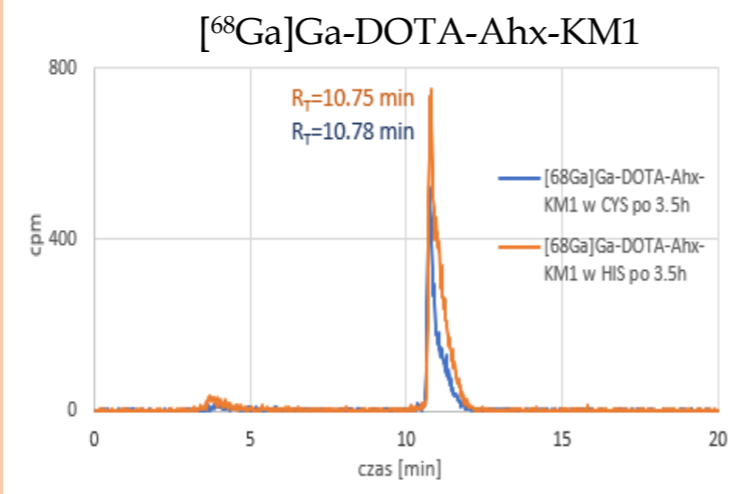
Badany związek	% inhibicji wiązania bt-VEGF/NRP-1 [%]					IC ₅₀ [μM]
	100 [μM]	50 [μM]	25 [μM]	12,5 [μM]	6,75 [μM]	
A7R	80,58 ± 3,60	70,92 ± 0,97	61,06 ± 2,18	45,57 ± 4,41	28,55 ± 7,13	14,68 ± 5,83
Sc-DOTA-Ahx-A7R	67,36 ± 6,53	59,42 ± 12,21	49,10 ± 17,45	35,57 ± 12,62	28,73 ± 12,18	22,48 ± 6,56
KM1	98,27 ± 0,72	95,30 ± 1,71	91,14 ± 2,73	80,30 ± 1,59	65,52 ± 2,43	4,83 ± 0,25
Sc-DOTA-Ahx-KM1	78,00 ± 1,21	66,75 ± 9,58	51,40 ± 15,20	38,47 ± 8,81	22,91 ± 14,96	17,93 ± 1,80

Badania fizykochemiczne radiokoniugatów

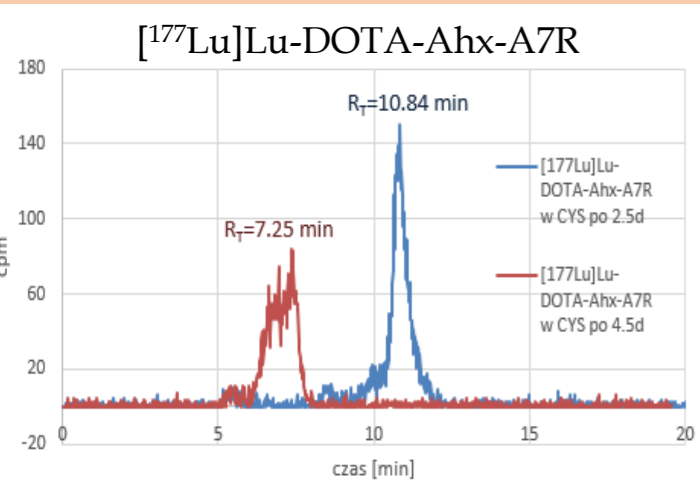
Stabilność w cystynie (CYS) i histydynie (HIS)



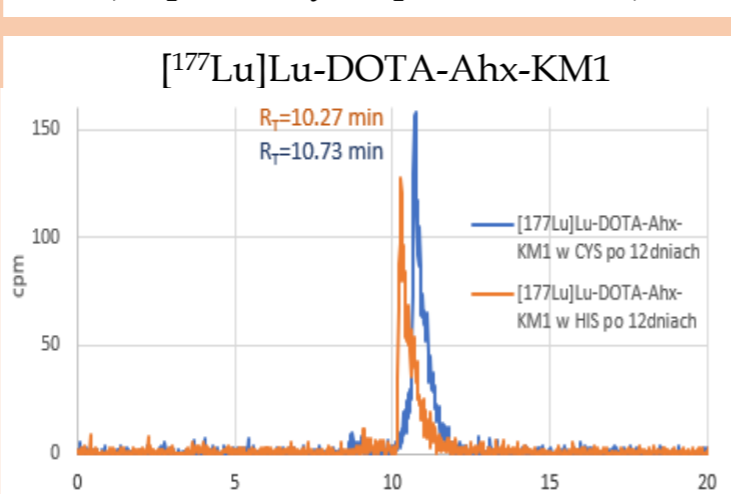
Stabilne > 3.5h (>3 półokresy rozpadu [68Ga]Ga)



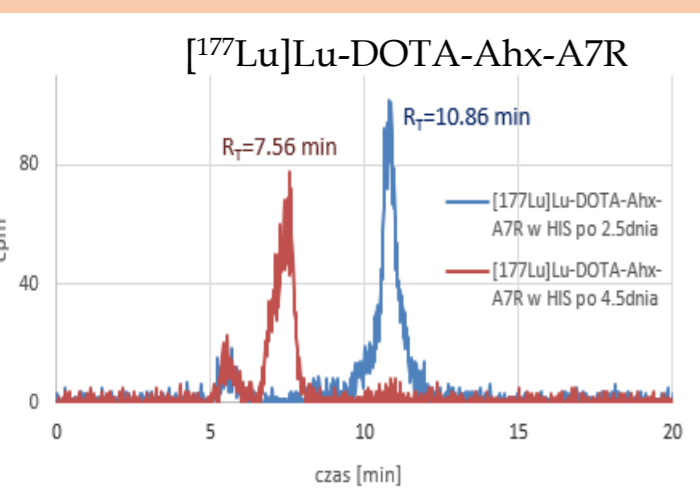
Stabilne > 3.5h (>3 półokresy rozpadu [68Ga]Ga)



Stabilne do 2.5 dnia



Stabilne > 12dni (>2 półokresy rozpadu [177Lu]Lu)



Stabilne do 2.5 dnia

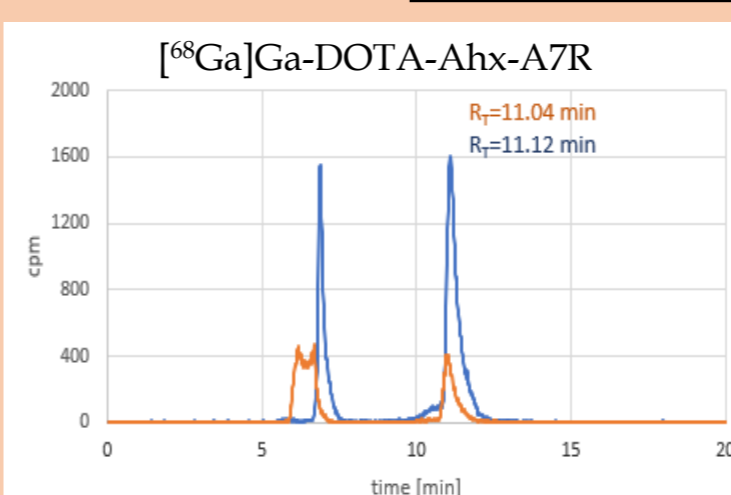
Radiokoniugat	logP ± SD
[68Ga]Ga-DOTA-Ahx-A7R	-3.92 ± 0.03
[177Lu]Lu-DOTA-Ahx-A7R	-3.40 ± 0.14
[68Ga]Ga-DOTA-Ahx-KM1	-4.57 ± 0.05
[177Lu]Lu-DOTA-Ahx-KM1	-3.75 ± 0.08

Lipofilowość obliczono według wzoru: $L = \log P = \log A_o / A_w$, gdzie A_o - radioaktywność fazy organicznej, A_w - radioaktywność fazy wodnej; analiza RP-HPLC fazy wodnej.

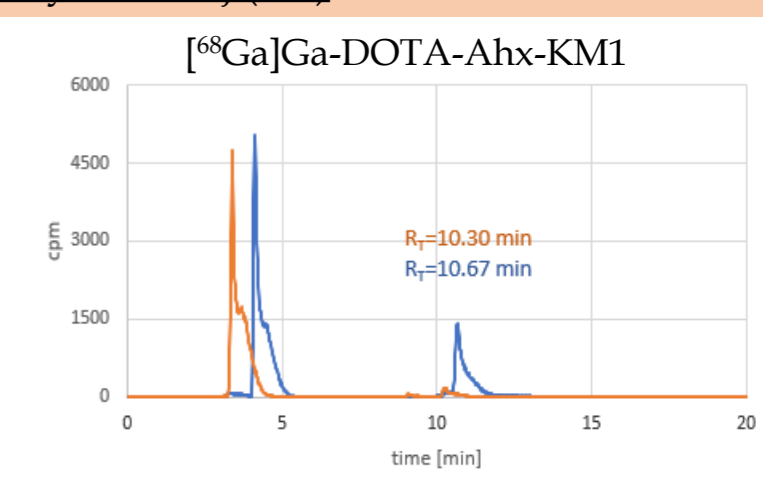
Stabilność w roztworach CYS i HIS - radiokoniugat inkubowano w 37°C w 1 mM roztworach o stężeniu 1000x wyższym niż stężenie radiokoniugatu + RP-HPLC.

Stabilność w surowicy ludzkiej - radiokoniugat inkubowano w 37°C z HS. Wytrącano składniki białkowe (osad) oddzielając je od supernatantu. Dla supernatantu wykonywano RP-HPLC. Ilość radiokoniugatu w supernatancie i osadzie obliczano wg wzoru: $\frac{\Sigma \text{radioaktywność fazy wodnej}}{\Sigma \text{radioaktywność fazy wodnej} + \Sigma \text{radioaktywność osadu}} \cdot 100\%$

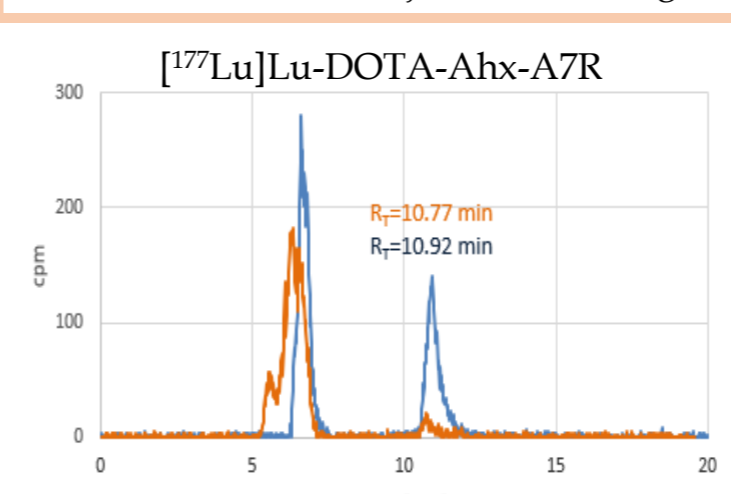
Stabilność w surowicy ludzkiej (HS)



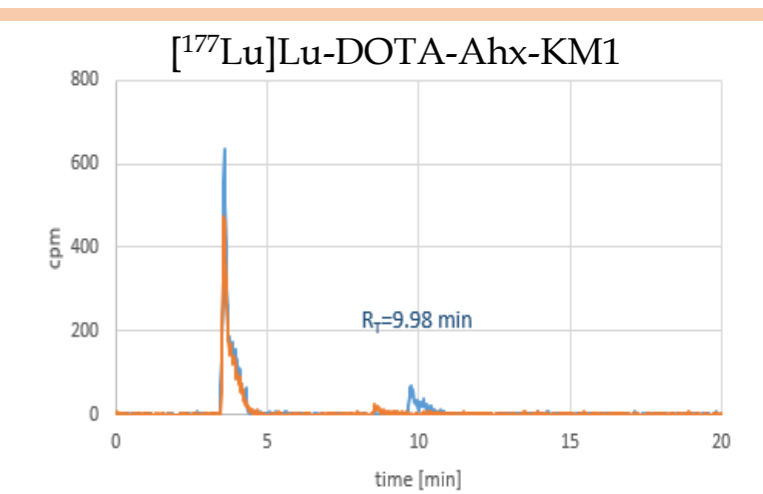
Niestabilne, ale >4.5h jest radiokoniugat



Niestabilne, ale >4.5h jest ślad radiokoniugatu



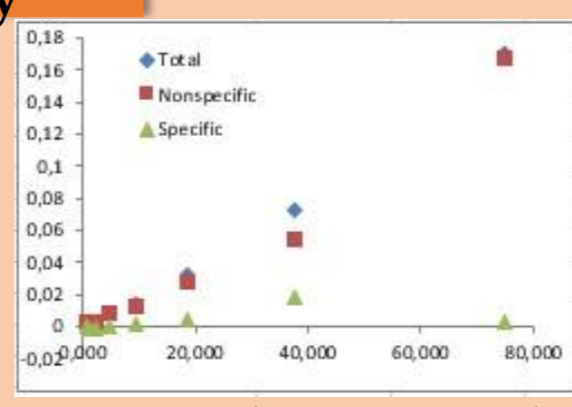
Niestabilne, ale >4d jest ślad radiokoniugatu



Niestabilne, >1d brak radiokoniugatu

Badania komórkowe - pierwsze próby

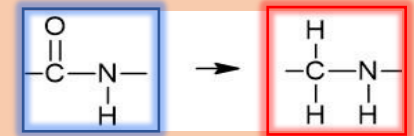
Badania komórkowe [177Lu]Lu-DOTA-Ahx-A7R rozpoczęto od badania wysycenia receptorowego (saturation assay) na dwóch liniach komórkowych - U 373 MG i MDA-MB-231, które były używane do badań wiązania się peptydu A7R z NRP-1 [1-5] (inkubacja - 1h (MDA-MB-231) i 2.5h (U 373 MG) w 37°C, jako bloker użyto „zimnego” peptydu A7R). W obu przypadkach nie uzyskano pozytywnych wyników oddziaływania badanego związku z NRP-1 (rysunek obok), co jest sprzeczne z wynikami uzyskanymi za pomocą testu ELISA. Powodem negatywnych wyników jest najprawdopodobniej mała nadekspresja receptorów NRP-1 na zastosowanych liniach komórkowych. W kolejnych próbach badań komórkowych zastosowana zostanie linia komórkowa U 87 MG i/lub linia komórek endotelialnych (np. HUVEC).



Dalsze plany

Synteza bardziej stabilnych na działanie enzymów proteolitycznych związków (dla nich bad. fizykochemiczne, ELISA, zimne związki, stabilność w HS dla koniugatów).

a) Synteza związków z wiązaniem zredukowanym, które jest bardziej stabilne na działanie enzymów (prace są w trakcie wykonywania) np. DOTA-Ahx-Lys(hArg)-Ala-Ala-hArg-OH



b) Synteza/zakup peptydów retro-inverso - składają się z D-aminokwasów w odwróconej sekwencji i są w pełni odporne na proteolizę, ponieważ D-aminokwasy nie są rozpoznawane przez enzymy [6]

