

# Synteza preparatów medycznych opartych na peptydowych inhibitorach neuropiliny-1 (NRP-1) do diagnostyki i terapii nowotworów

*(Synthesis and study of radiolabelled peptide-based inhibitors of VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1 complex for diagnosis and therapy of pathological angiogenesis associated with early stages of malignant tumors)*

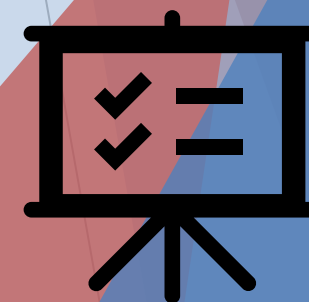
mgr Katarzyna Masłowska

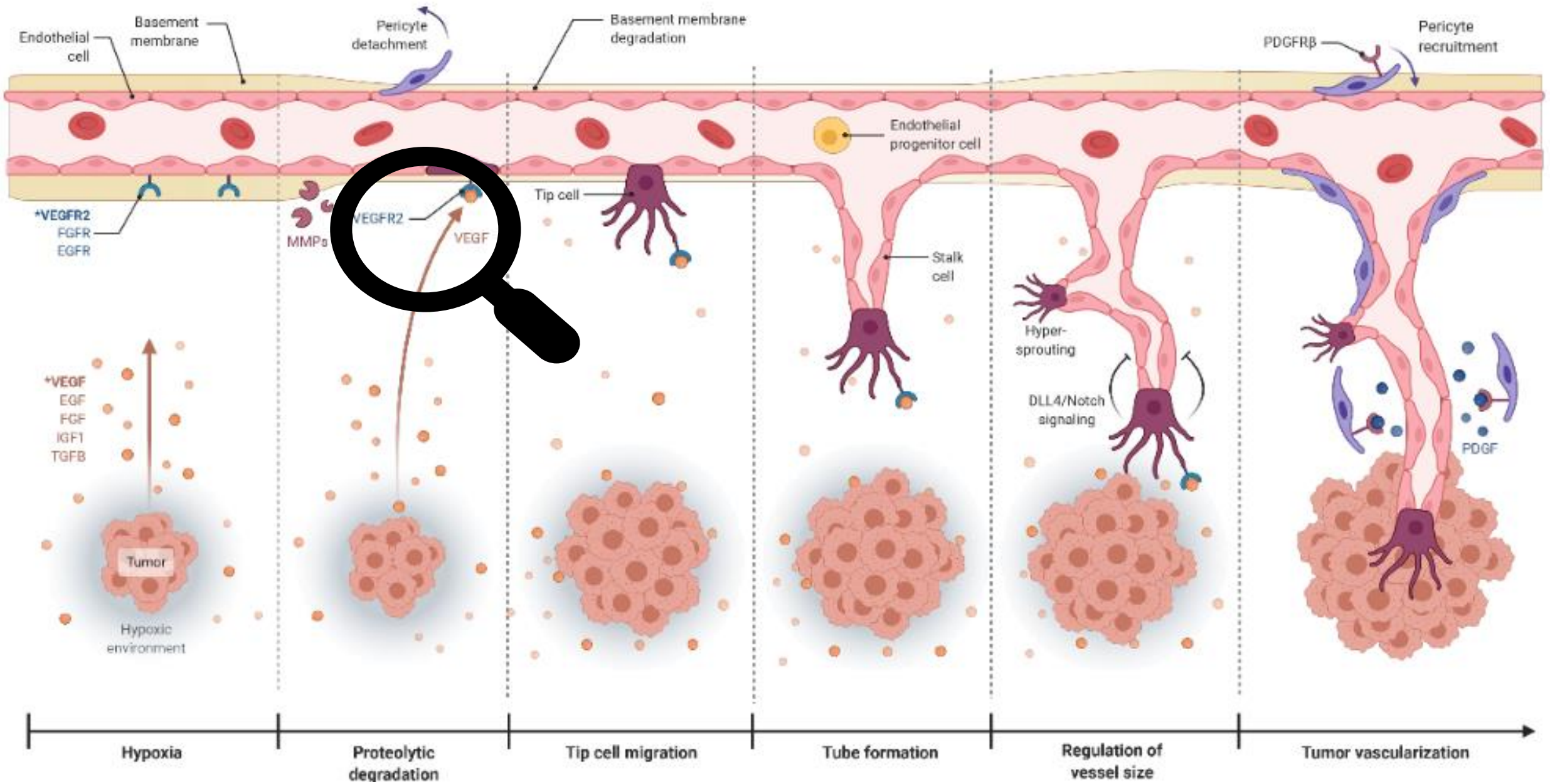
Promotor UW - prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik  
Promotor IChTJ - dr hab. Ewa Gniazdowska, prof. IChTJ



## Cel pracy

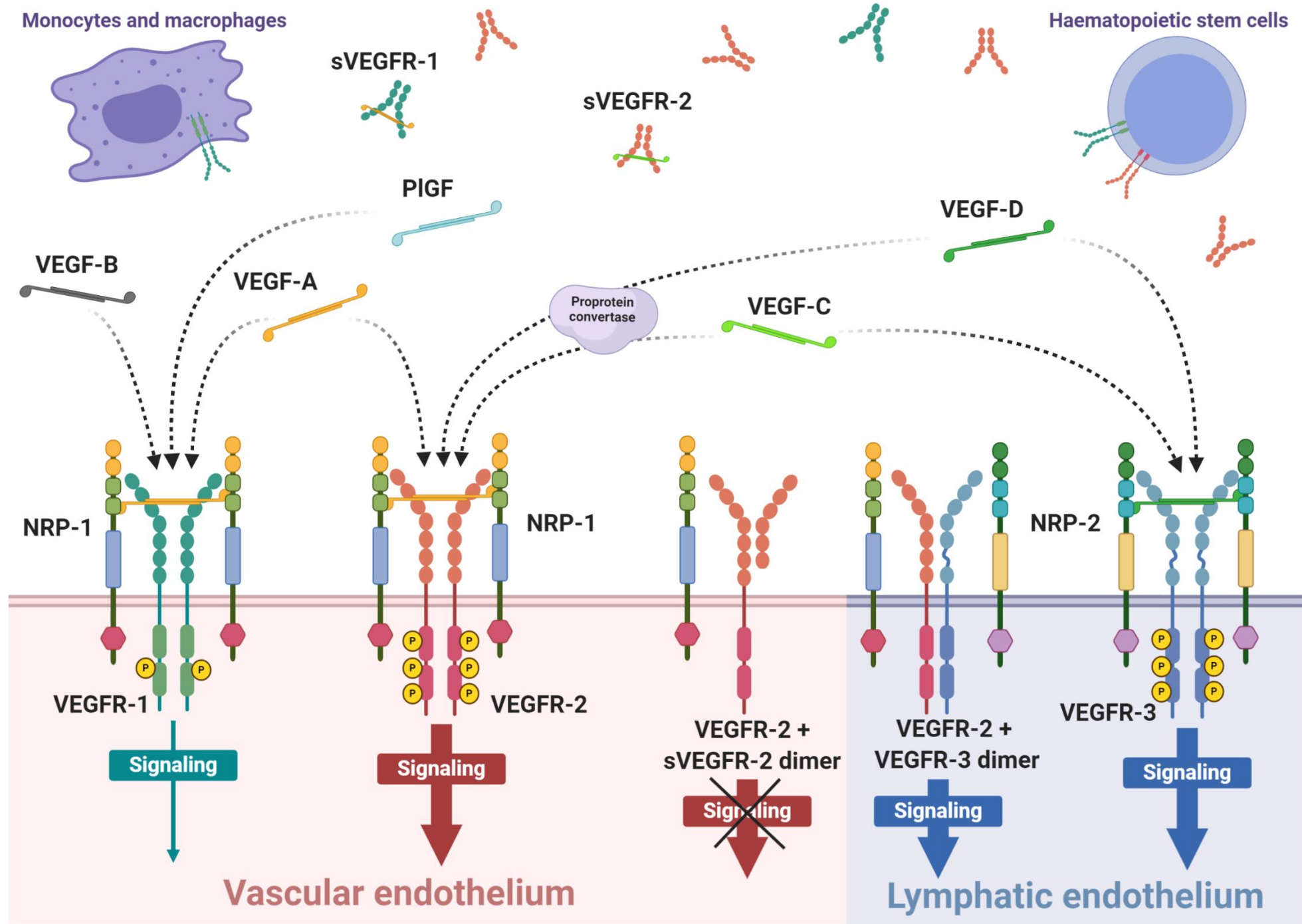
Projektowanie, synteza, znakowanie oraz badania fizykochemiczne i/lub biologiczne nowych peptydomimetycznych inhibitorów kompleksu VEGF- $A_{165}$ /NRP-1 pod kątem ich zastosowania jako radiofarmaceutyki do obrazowania i terapii patologicznej angiogenezy związanej z wczesnymi stadiami formowania się nowotworów złośliwych





Monocytes and macrophages

Haematopoietic stem cells



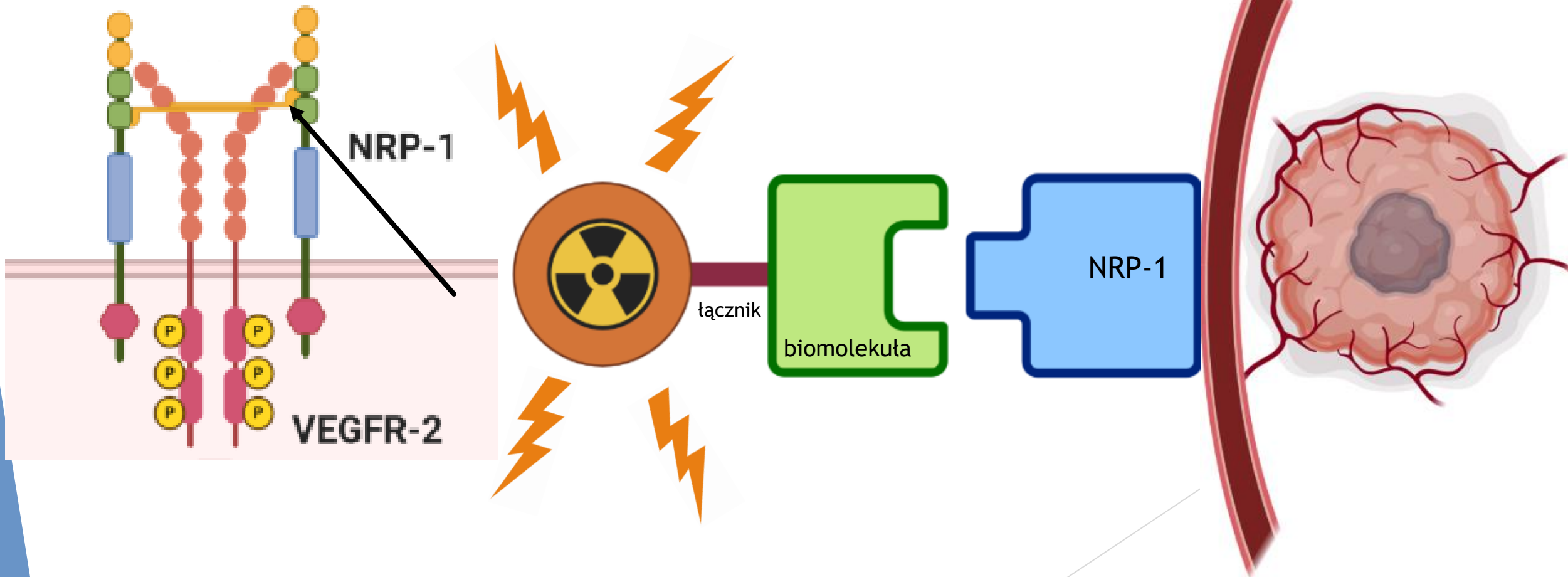
Vascular endothelium

Lymphatic endothelium

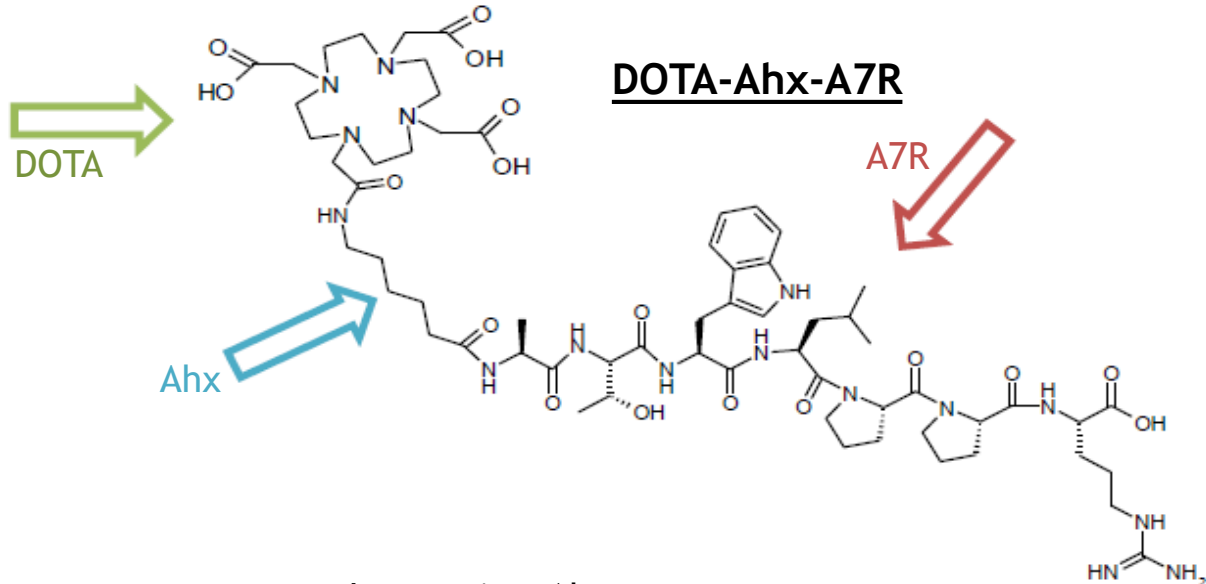
Inhibitory kompleksu VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1 + celujące w NRP-1 na powierzchni nowotworów

→ Peptydomimetyki jako radiofarmaceutyki receptorowe (diagnoza + terapia)

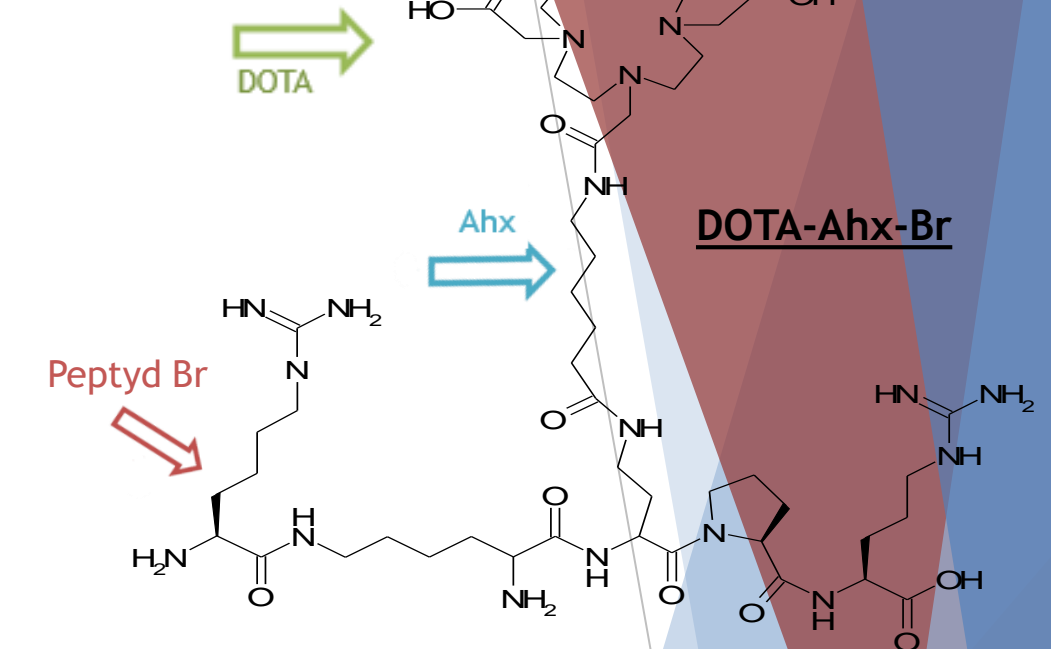
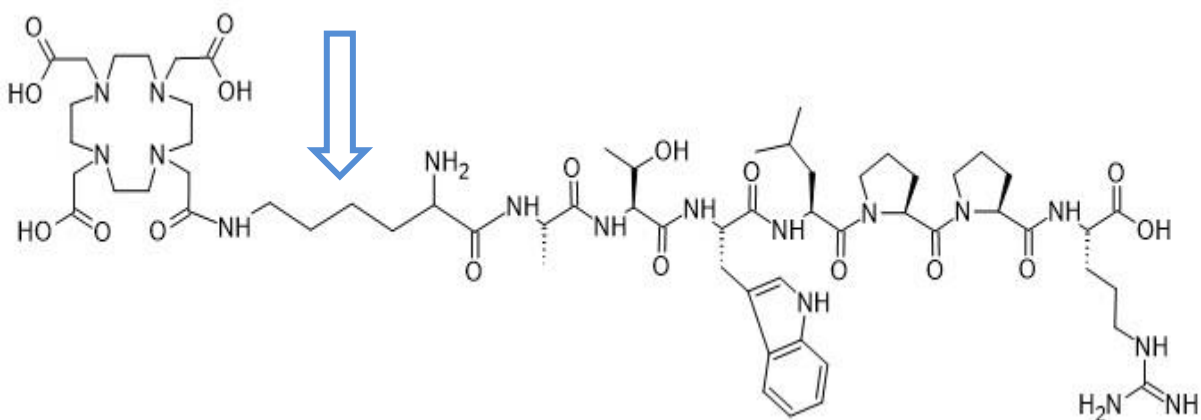
- A7R (Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg)
- Rozgałęzione Lys(hArg)-Dab-Pro-Arg (peptyd Br)
- Retro-inverso dA7R (<sup>D</sup>Arg-<sup>D</sup>Pro-<sup>D</sup>Pro-<sup>D</sup>Leu-<sup>D</sup>Trp-<sup>D</sup>Thr-<sup>D</sup>Ala)
- Ze zredukowanym wiązaniem Lys(hArg)-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-hArg



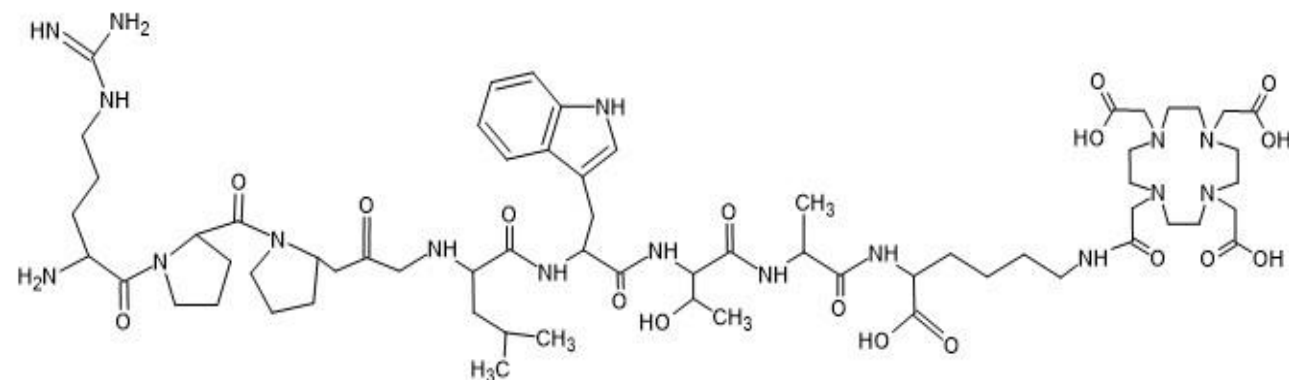
- Metoda syntezy na podłożu stałym SPPS, żywica Wang, Synteza manualna wg opracowanego protokołu
- Strategia Fmoc, metoda sprzęgania karbodiimidowa, Dołączanie linkera i chelatora DOTA na żywicy
- Test na obecność wolnych grup aminowych - test Kaisera i chloranilowy



Lys zamiast Ahx  
**Lys(DOTA)-A7R**



<sup>L</sup>A7R zamienione na <sup>D</sup>R7A  
**dR7A-Lys(DOTA)**



## Stabilized Heptapeptide A7R for Enhanced Multifunctional Liposome-Based Tumor-Targeted Drug Delivery

Man Ying,<sup>†</sup> Qing Shen,<sup>†,‡</sup> Yu Liu,<sup>†</sup> Zhiqiang Yan,<sup>§</sup> Xiaoli Wei,<sup>†,||</sup> Changyou Zhan,<sup>†,⊥</sup> Jie Gao,<sup>†</sup> Cao Xie,<sup>†</sup> Bingxin Yao,<sup>†</sup> and Weiyue Lu<sup>\*,†,‡,||</sup>

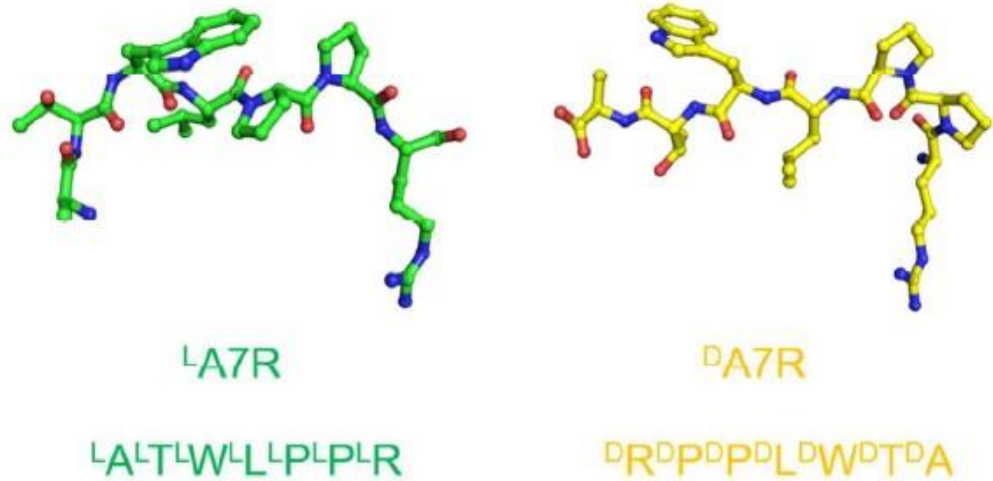
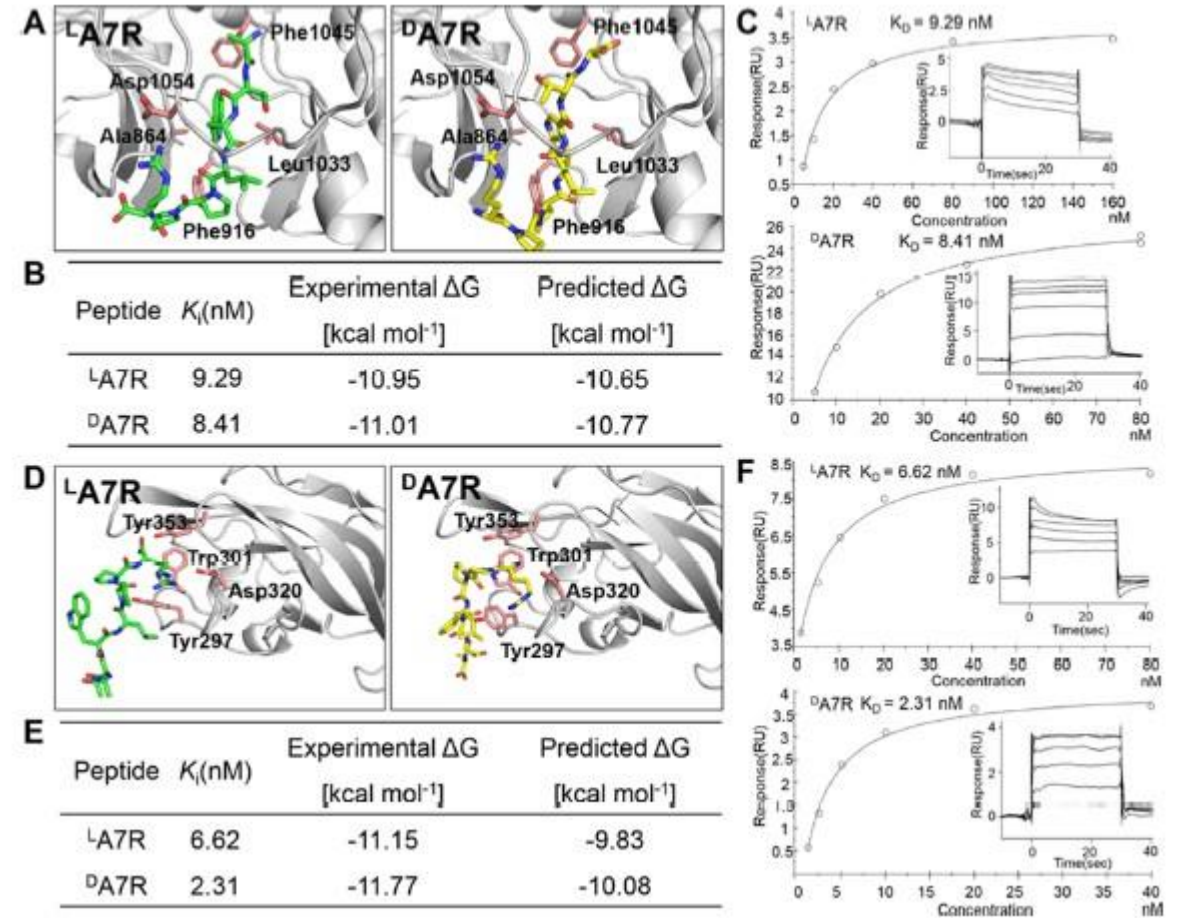
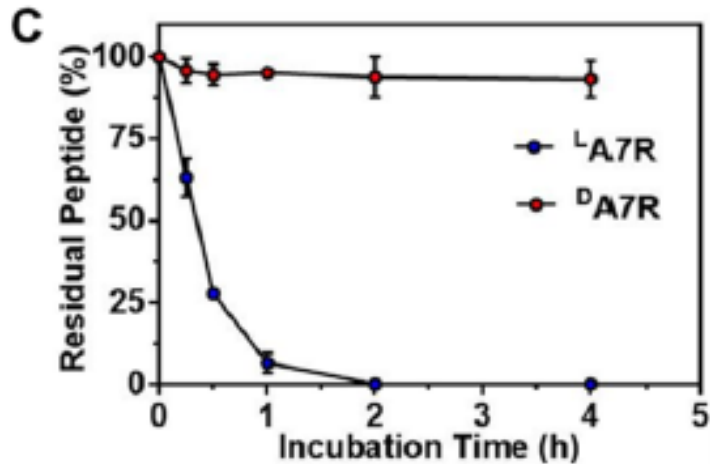
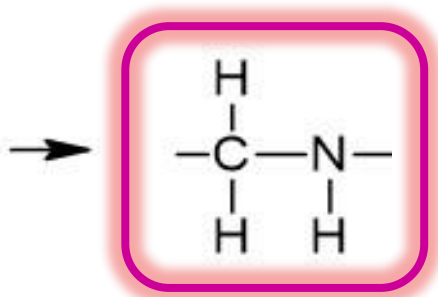
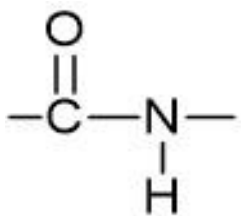


Figure S1. 3D structure model of L<sup>A</sup>7R (green) and D<sup>A</sup>7R (yellow).



## Związki ze zredukowanym wiązaniem



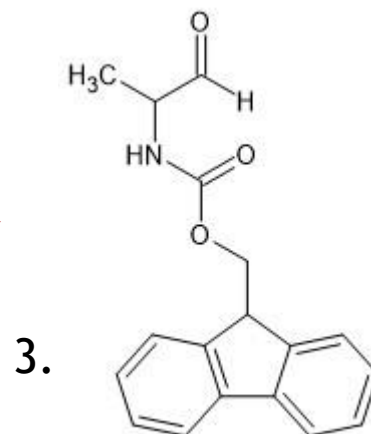
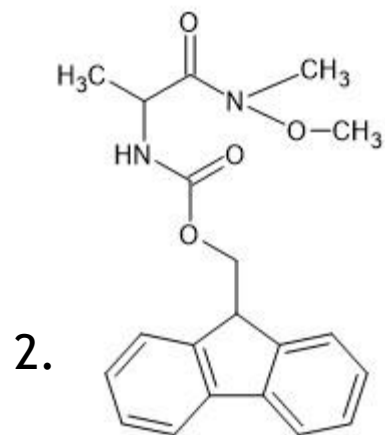
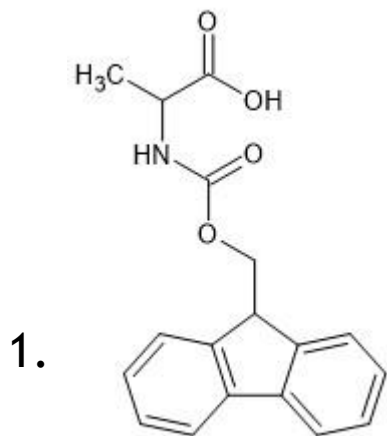
- DOTA-Ahx-Lys(hArg)-Ala-Ala-hArg-OH
- DOTA-Ahx-Lys(hArg)-Ala-Ala-hArg-OH
- DOTA-Ahx-Lys(hArg)-Ala-Ala-hArg-OH

## Otrzymanie wiązania zredukowanego:

1. Fmoc-Ala-OH  $\xrightarrow{\text{DIPEA} + \text{TBTU} + \text{N-metoksy-N-Metyloamina} * \text{HCl}}$  2. Fmoc-AlaNMe(OMe)

2. Fmoc-AlaNMe(OMe)  $\xrightarrow{\text{Redukcja LiAlH}_4 \text{ w THF}}$  3. Fmoc-Ala-CHO

3. Fmoc-Ala-CHO  $\xrightarrow{\text{Aminowanie redukcyjne na żywicy z NaBH}_3\text{CN}}$  -Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-AA





Fmoc-Lys(Alloc)-Wang

↓ Ściągnięcie Fmoc + aminowanie redukcjne z Fmoc-Ala-CHO

Fmoc-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Lys(Alloc)-Wang

↓ Ściągnięcie Fmoc + aminowanie redukcjne z Fmoc-Ala-CHO

Fmoc-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Lys(Alloc)-Wang

↓ Ściągnięcie Fmoc + Fmoc-Lys(Mtt)-OH

Fmoc-Lys(Mtt)-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Lys(Alloc)-Wang

↓ Ściągnięcie Mtt + Boc-Lys(Alloc)-OH

Fmoc-Lys(Boc-Lys(Alloc))-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Lys(Alloc)-Wang

↓ Ściągnięcie Alloc + guanylacja w dwóch miejscach

Fmoc-Lys((Boc<sub>2</sub>)hArg)-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-hArg(Boc<sub>2</sub>)-Wang

↓ Ściągnięcie Fmoc + Fmoc-Ahx-OH (+ściągnięcie części związku z żywicy)

Fmoc-Ahx-Lys((Boc<sub>2</sub>)hArg)-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-hArg(Boc<sub>2</sub>)-Wang

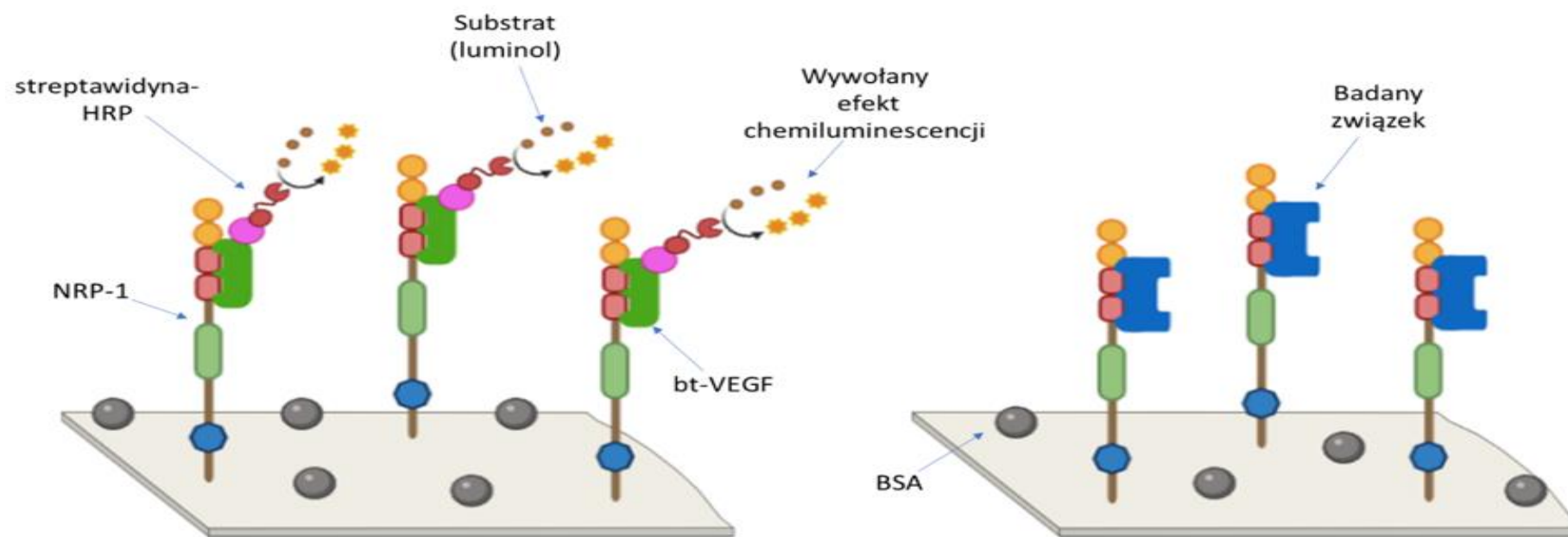
↓ Ściągnięcie Fmoc + DOTA-tris(tBu)-NHS

DOTA-tris(tBu)-Ahx-Lys((Boc<sub>2</sub>)hArg)-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-hArg(Boc<sub>2</sub>)-Wang

↓ Ściągnięcie z żywicy TFA/PhOH/H<sub>2</sub>O/TIPS

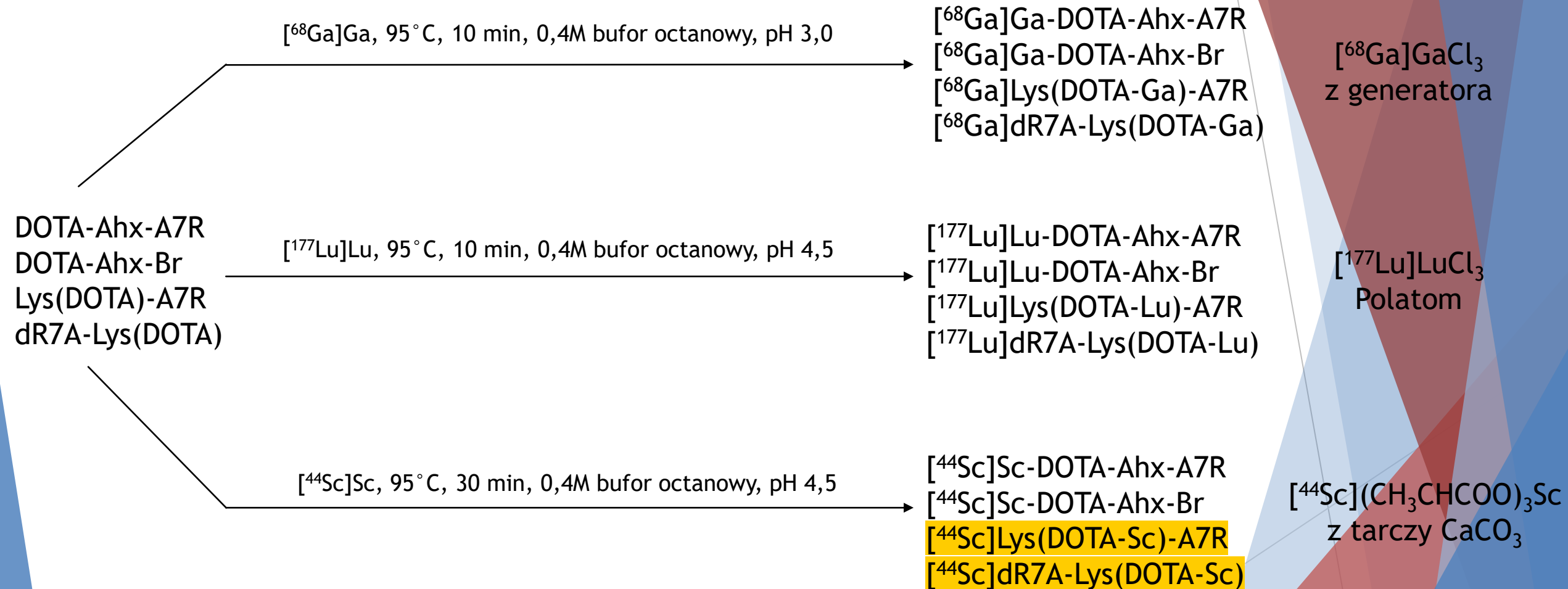
DOTA-Ahx-Lys(hArg)-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-Ala[CH<sub>2</sub>-NH]-hArg

## Testy inhibicji - ELISA typu kompetencyjnego



Badany związek	% inhibicji wiązania bt-VEGF/NRP-1 [%]					IC <sub>50</sub> [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
Peptyd rozgałęziony (Br)	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-Br	78,00 ± 1,21	66,75 ± 9,58	51,40 ± 15,20	38,47 ± 8,81	22,91 ± 14,96	17,93 ± 1,80

## Znakowanie $^{68}\text{Ga}$ , $^{177}\text{Lu}$ i $^{44}\text{Sc}$



## Znakowanie $^{68}\text{Ga}$ , $^{177}\text{Lu}$ i $^{44}\text{Sc}$

$^{68}\text{Ga}$  Ga, 95 °C, 10 min, 0,4M bufor octanowy, pH 3,0

$^{68}\text{Ga}$  Ga-DOTA-Ahx-A7R  
 $^{68}\text{Ga}$  Ga-DOTA-Ahx-Br  
 $^{68}\text{Ga}$  Lys(DOTA-Ga)-A7R  
 $^{68}\text{Ga}$  dR7A-Lys(DOTA-Ga)

$^{68}\text{Ga}$  GaCl<sub>3</sub>  
 z generatora

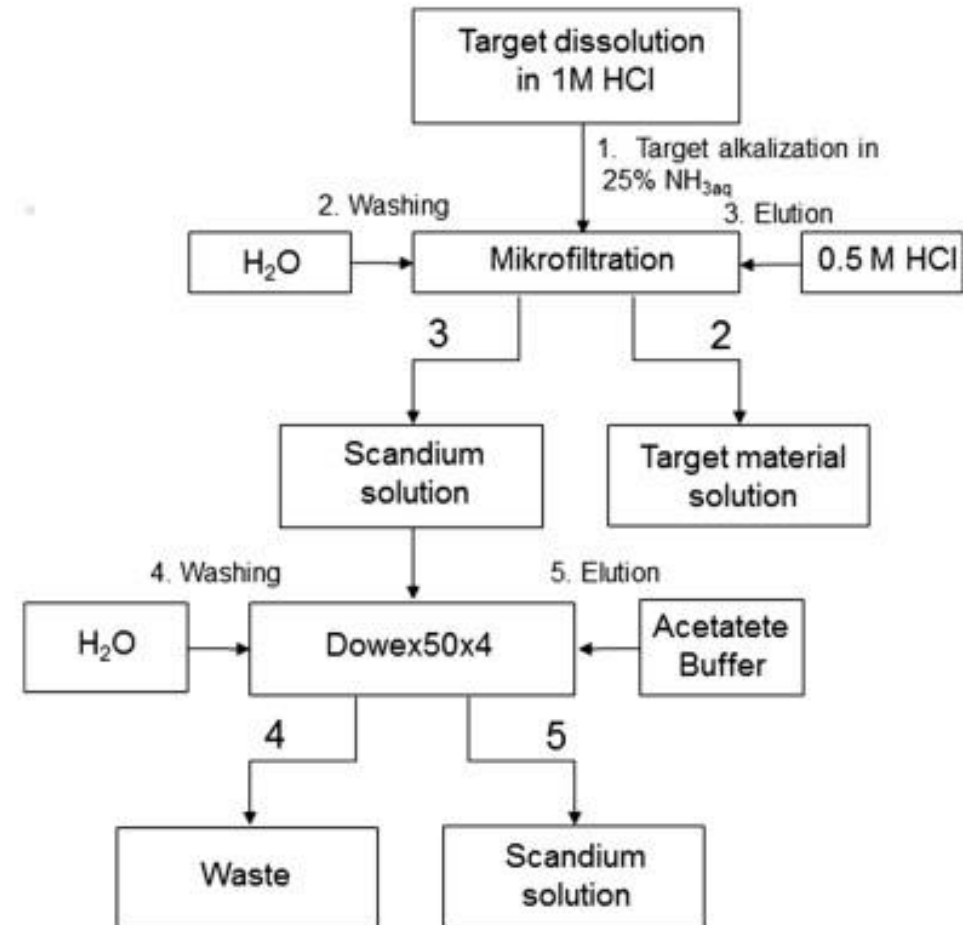
DOTA-Ahx-A7R  
 DOTA-Ahx-Br  
 Lys(DOTA)-A7R  
 dR7A-Lys(DOTA)

$^{177}\text{Lu}$  Lu, 95 °C, 10 min, 0,4M bufor octanowy, pH 4,5

$^{177}\text{Lu}$   
 $^{177}\text{Lu}$   
 $^{177}\text{Lu}$   
 $^{177}\text{Lu}$

$^{44}\text{Sc}$  Sc, 95 °C, 30 min, 0,4M bufor octanowy, pH 4,5

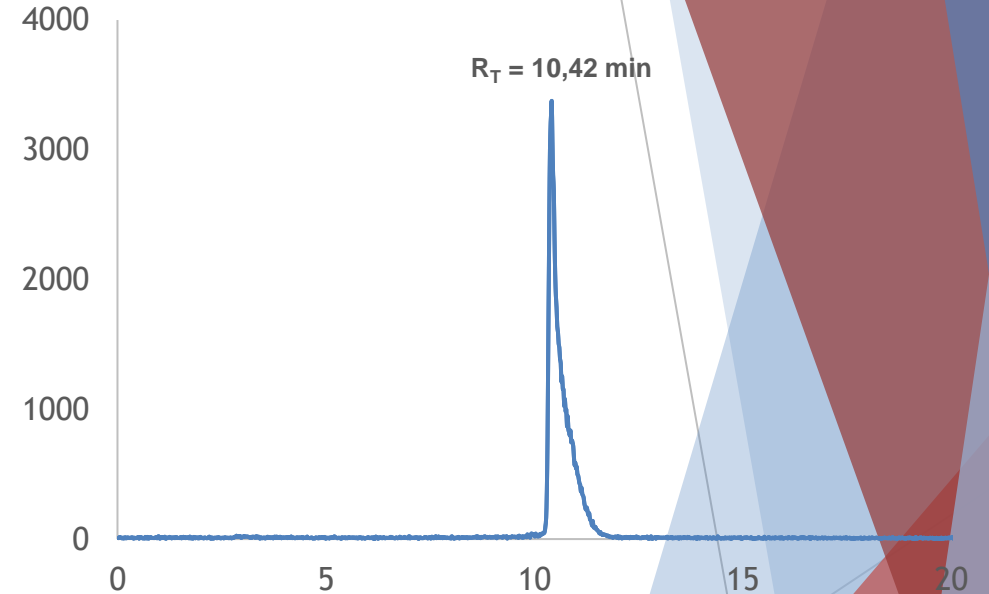
$^{44}\text{Sc}$   
 $^{44}\text{Sc}$   
 $^{44}\text{Sc}$   
 $^{44}\text{Sc}$



## Lipofilowość

Radiocompound	R <sub>T</sub> [min]	logP ± SD
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-Ahx-A7R	11.27	-3.92 ± 0.03
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-Ahx-Br	10.63	-4.57 ± 0.05
[ <sup>68</sup> Ga]Lys(DOTA-Ga)-A7R	10.32	-4.18 ± 0.07
[ <sup>68</sup> Ga]R7A-Lys(DOTA-Ga)	10.72	-4.11 ± 0.06
[ <sup>177</sup> Lu]Lu-DOTA-Ahx-A7R	11.08	-3.40 ± 0.14
[ <sup>177</sup> Lu]Lu-DOTA-Ahx-Br	10.78	-3.75 ± 0.08
[ <sup>177</sup> Lu]Lys(DOTA-Lu)-A7R	10.38	-4.45 ± 0.03
[ <sup>177</sup> Lu]R7A-Lys(DOTA-Lu)	10.28	-4.48 ± 0.05
[ <sup>44</sup> Sc]Sc-DOTA-Ahx-A7R	10.88	-3.44 ± 0.02
[ <sup>44</sup> Sc]Sc-DOTA-Ahx-Br	10.03	-2.57 ± 0.02
[ <sup>44</sup> Sc]Lys(DOTA-Sc)-A7R	...	...
[ <sup>44</sup> Sc]R7A-Lys(DOTA-Sc)	...	...

HPLC fazy wodnej po lipofilowości



- Określono w standardowym układzie (roztwór PBS and *n*-oktanol)
- Pomiar aktywności faz za pomocą automatycznego licznika gamma WIZARD<sup>2</sup>
- Teoretycznie wyznaczona lipofilowość peptydu A7R wynosi około -1,5 (MarvinSketch)
- HPLC fazy wodnej po lipofilowości

- Wzór na lipofilowość:  $L = \log P = \log \frac{a_o}{a_w}$   
 $a_o$  - aktywność fazy organicznej  
 $a_w$  - aktywność fazy wodnej

- cysteinie CYS } tzw. challenge experiments
- histydynie HIS }
- surowicy ludzkiej HS

Radiocompound	CYS	HIS	HS	
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-Ahx-A7R	3.5h	3.5h	10min (ok.50%)	4.5h (ok.40%)
[ <sup>68</sup> Ga]Ga-DOTA-Ahx-Br	3.5h	3.5h	10min (ok.20%)	4.5h (b.mały ślad)
[ <sup>68</sup> Ga]Lys(DOTA-Ga)-A7R	3h (60%)	3h	10min (ok.2%)	1h brak
[ <sup>68</sup> Ga]R7A-Lys(DOTA-Ga)	4h	4h	10min (ok.15%)	4h (ok.15%)
[ <sup>177</sup> Lu]Lu-DOTA-Ahx-A7R	do 2.5d	do 2.5d	10min (ok.40%)	4d (b.mały ślad)
[ <sup>177</sup> Lu]Lu-DOTA-Ahx-Br	12d	12d	10min (ok.2%)	1d brak
[ <sup>177</sup> Lu]Lys(DOTA-Lu)-A7R	do 13d (ok.60%)	do 1.5h	10min (ok.2%)	1h brak
[ <sup>177</sup> Lu]R7A-Lys(DOTA-Lu)	14d	14d	10min (ok.60%)	14d (ok.15%)
[ <sup>44</sup> Sc]Sc-DOTA-Ahx-A7R	4.5h	4.5h	10min (ok.50%)	4h (ok.50%)
[ <sup>44</sup> Sc]Sc-DOTA-Ahx-Br	3h	3h	10min (ok.30%)	4.5h (b.mały ślad)
[ <sup>44</sup> Sc]Lys(DOTA-Sc)-A7R	...	...	...	...
[ <sup>44</sup> Sc]R7A-Lys(DOTA-Sc)	...	...	...	...

Ilość radiokoniugatu w supernatancie i osadzie:

$$\frac{\Sigma \text{radioaktywność fazy wodnej}}{\Sigma \text{radioaktywność fazy wodnej} + \Sigma \text{radioaktywność osadu}} \cdot 100\%$$

## Staż zagraniczny

Instytut Naukowo-Badawczy Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf,  
Zakład Teragnostyki Radionukliowej, 18.07-07.08.2021

## Konferencje





- Druga Edycja Wirtualnej Konferencji Naukowej Kampusu Ochota - poster „Radioizotopowo znakowane peptydomimetyczne inhibitory kompleksu VEGF/NRP-1 do obrazowania patologicznej angiogenezy związanej z wczesnymi stadiami formowania się nowotworów złośliwych”, 21.09.2021
- VIII Ogólnopolska Konferencja Studentów Fizyki Medycznej „FIZYKA DLA MEDYKA” - udział bierny, 17-18.04.2021
- IV Ogólnopolskie Forum Pielęgniarek i Techników Elektroradiologii Bayer&Canon - udział bierny, 26-27.11.2021

## Publikacja (styczeń 2022)



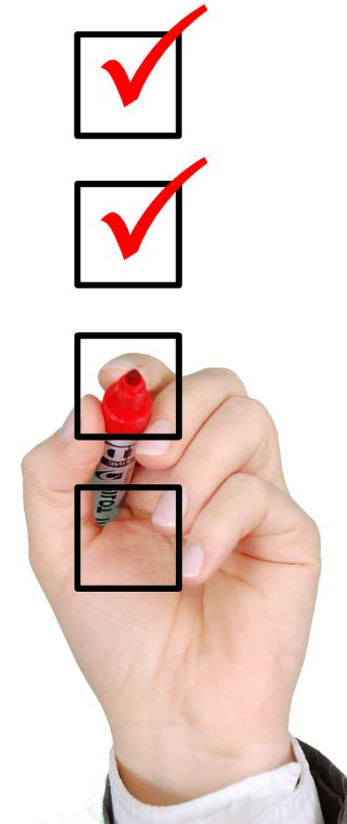
Article

### Synthesis, Physicochemical and Biological Study of Gallium-68- and Lutetium-177-Labeled VEGF-A<sub>165</sub>/NRP-1 Complex Inhibitors Based on Peptide A7R and Branched Peptidomimetic

Katarzyna Masłowska<sup>1,\*</sup>, Ewa Witkowska<sup>2</sup>, Dagmara Tymecka<sup>2</sup> , Paweł Krzysztof Halik<sup>1</sup> ,  
Aleksandra Misicka<sup>2,\*</sup>  and Ewa Gniazdowska<sup>1</sup> 

## Dalsze plany

- Znakowanie skandem-44 i badania fizykochemiczne
  - Lys(DOTA)-A7R
  - R7A-Lys(DOTA)
- Synteza peptydomimetyków ze zredukowanym wiązaniem
  - Znakowania ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ )
  - Badania fizykochemiczne
  - ELISA?
  - Badania komórkowe?
- Badania komórkowe radiopeptydów?
- Trzecia publikacja





Dziękuję za uwagę

Warszawa, 20.05.2022 r.