

RADIOBIOKONIUGATY ZNAKOWANE EMITERAMI ELEKTRONÓW AUGERA W CELOWANEJ TERAPII RADIONUKLIDOWEJ

RADIOBIOCONIUGATES LABELED WITH AUGER ELECTRON EMITTERS IN TARGETED RADIONUCLIDE THERAPY

Kamil Wawrowicz, Aleksander Bilewicz*

*Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa
e-mail: a.bilewicz@ichtj.waw.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Elektrony Augera w nowoczesnej celowanej radioterapii
 - 1.1. Działanie biologiczne elektronów Augera
 - 1.2. Cytotoksyczne działanie elektronów Augera
2. Emitery elektronów Augera w celowanej radioterapii
3. Radiobiokoniugaty znakowane emiterami Augera
 - 3.1. Radiobiokoniugaty wiążące się do nici DNA
 - 3.2. Radiobiokoniugaty nie interkalujące do DNA
 - 3.2.1. Małe cząsteczki biologicznie aktywne znakowane emiterami Augera
 - 3.2.2. Peptydy
 - 3.2.3. Polipeptydy, przeciwciała monoklonalne i ich fragmenty
 - 3.3. Radiobiokoniugaty oparte na nanostrukturalnych platformach

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Kamil Wawrowicz jest doktorantem Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich RadFarm w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej. Ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, uzyskując tytuł inżyniera w 2018 roku, a następnie tytuł magistra w 2019 roku w specjalności Technologia Chemiczna i Kataliza. Jego zainteresowania naukowe związane są z syntezą oraz badaniami *in vitro* nowych radiobiokoniugatów opartych na emiterach elektronów Augera, potencjalnych radiofarmaceutykach dla terapii nowotworów piersi, jajników oraz wątroby.



<https://orcid.org/0000-0003-3818-5840>



Prof. dr hab. Aleksander Bilewicz ukończył studia na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Warszawskiego w 1976 roku. Po studiach rozpoczął pracę w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie, gdzie obecnie jest zatrudniony na stanowisku profesora. W 1986 roku obronił pracę doktorską, której tematyka dotyczyła wymiany jonowej na nieorganicznych sorbentach. W 1998 roku uzyskał stopień doktora habilitowanego na podstawie pracy o wpływie efektów relatywistycznych na własności transaktynowców. W 2007 roku otrzymał tytuł profesora. Aktualnie jego zainteresowania naukowe koncentrują się na syntezie nowych radiofarmaceutyków opartych na nanostrukturach o potencjalnym zastosowaniu α -radioimmunoterapii oraz terapii elektronami Augera.



<https://orcid.org/0000-0003-2490-3303>

ABSTRACT

In contrast to the radiation therapy methods, that use an external ion beam source, the internal radiotherapy is performed by the direct administration of radionuclides conjugated to a targeting vector. Crucial criteria for the use of radiopharmaceuticals at a selective localization and retention in the tumor lesion are biological or biochemical differences between tumor and non-tumor tissue. Auger electron emitters that can target cancer cells are an attractive agents for internal radiation therapy. Besides of α emitters, radionuclides that decay with the emission of very low energy Auger electrons are well suited for the treatment of small tumors, micrometastases or residual tumor after surgical resection of a primary lesion. In contrast to α radiation, however, Auger emitters have low toxicity when decaying outside the cell during blood transport and they are therefore interesting candidates for targeted radionuclide therapy. However, due to nanometers range of Auger electrons the challenge is to target cancer cells specifically and achieve intracellular and intranuclear uptake for maximum DNA damage. So far, no system has been developed to allow for selective delivery of the Auger electron emitter to the cancer cell and next delivering it to cell nucleus, near the DNA strand. An overview of Auger radiation therapy approaches of the past decade shows several research directions and various targeting vehicles. The latter include small molecules, aptamers, hormones, halogenated nucleotides, peptides oligonucleotides and monoclonal antibodies and their fragments. In present article we discuss the basic principles of Auger electron therapy as compared with targeted α and β^- radionuclide therapy, characteristic of used Auger emitters and briefly the main advantages and disadvantages of the different targeting modalities that are under investigation.

Keywords: radiopharmacy, targeted radionuclide therapy, Auger electron emitters

Słowa kluczowe: radiofarmacja, celowana terapia radionuklidowa, emitory elektronów Augera

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AML	– Ostra białaczka szpikowa (ang. <i>Acute Myeloid Leukemia</i>)
DSB	– Dwuniciowe uszkodzenia DNA (ang. <i>Double - Strand Breaks</i>)
IARC	– Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. <i>International Agency for LET</i> – Liniowy przekaz energii (ang. <i>Linear Energy Transfer</i>)
MCP	– Polimer chelatujący metale (ang. <i>Metal - Chelating Polymer</i>)
MN	– Przerzutowy nerwiak zarodkowy (ang. <i>Metastatic Neuroblastoma Research on Cancer</i>)
MNT	– Nanotransporter modułowy (ang. <i>Modular Nanotransporter</i>)
MPM	– Złośliwy międzybłoniak opłucnej (ang. <i>Malignant Pleural Mesotheliom</i>)
NET	– Guz neuroendokryny (ang. <i>Neuroendocrine Tumor</i>)
NLS	– Sekwencja Lokalizacji Jądrowej (ang. <i>Nuclear Localisation Sequence</i>)
NMR	– Magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PC, BC	– Nowotwór piersi/prostaty (ang. <i>Prostate/Breast Cancer</i>)
PET	– Pozytonowa tomografia emisyjna (ang. <i>Positron Emission Tomography</i>)
PSMA	– Antygen błony komórkowej komórek stercza (ang. <i>Prostate Specific Membrane Antigen</i>)
ROS	– Reaktywne formy tlenu (ang. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SSTR	– Receptor somatostatyny (ang. <i>Somatostatine Receptor</i>)
TRT	– Celowana Radioterapia (ang. <i>Targeted Radionuclide Therapy</i>)

WPROWADZENIE

Nowotwory, według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia, stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów na świecie. Najczęściej diagnozowanymi tego typu schorzeniami są nowotwory: płuc, piersi, jelita grubego oraz prostaty. Dotychczasowe raporty pokazują, że wśród kobiet dominują są nowotwory piersi (24,2%) oraz jelita grubego (9,5%). natomiast u mężczyzn przeważają zachorowania na nowotwory płuc (14,5%) oraz prostaty (13,5%) [1].

Szacunkowe prognozy przygotowywane na lata 2020 – 2040 przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC - ang. International Agency for Research on Cancer) przewidują wzrost zachorowalności na nowotwory z 18 mln przypadków rocznie do blisko 30 mln zachorowań w roku 2040 i utrzymanie około 50% śmiertelności. Duże zróżnicowanie komórek nowotworowych i towarzyszące temu różne sposoby przebiegu choroby sprawiają, że niemożliwe jest znalezienie jednej, uniwersalnej metody, pozwalającej na prowadzenie skutecznej terapii. Z tego względu leczenie onkologiczne wymaga łączenia ze sobą kilku procedur terapeutycznych w celu osiągnięcia oczekiwanego efektu. Obecnie, podstawę terapii chorób nowotworowych stanowią zabiegi operacyjne, a następnie radioterapia oraz terapia systemowa, polegająca na podawaniu leków cytotoksycznych.

Często jednak, klasyczne metody napotykać na ograniczenia, które nie pozwalają na wdrożenie lub kontynuowanie danego typu terapii. Metoda chirurgiczna, będąca jedną z podstawowych i najczęściej wykorzystywanych, nie jest możliwa do zastosowania w przypadku mikroprzerzutów. Chemioterapia, ze względu na równoczesne oddziaływanie na zdrowe tkanki wywołuje częste i ostre działania niepożądane, obejmujące śluzówki, szpik kostny i cebulki włosów, prowadzące także do zwiększonej podatności na infekcje wskutek obniżenia odporności, a hormonoterapia i immunoterapia stosowane są jako leczenie uzupełniające. W związku z tymi ograniczeniami konieczne jest poszukiwanie alternatywnych dróg leczenia [2]. Taką drogą może być szerokie zastosowanie m.in. medycyny nuklearnej, zarówno do diagnostyki, jak i leczenia chorób nowotworowych.

Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) definiuje medycynę nuklearną jako „specjalność, która obejmuje wszystkie zastosowania materiałów promieniotwórczych w diagnostyce, leczeniu oraz badaniach medycznych, z wyjątkiem użycia zamkniętych źródeł promieniotwórczych w radioterapii” [3]. Zgodnie z przedstawioną definicją, medycyna nuklearna to samodzielny dział bazujący na wykorzystaniu otwartych źródeł promieniowania do celów diagnostycznych lub terapeutycznych. W medycynie nuklearnej radioizotopy przyłączane są do innych cząsteczek chemicznych, tworząc radiofarmaceutyki. Są to radioaktywne substancje, które metabolizując się gromadzą się w chorobowo zmienionych tkankach organizmu. Medycyna nuklearna wykorzystuje tę właściwość do terapii oraz obrazowania rozmiarów i postępów choroby. Następujący w ostatnich dwóch dziesięcioleciach

gwałtowny rozwój metod diagnostyki medycznej, szczególnie komputerowej tomografii, funkcjonalnego fMRI (funkcjonalny rezonans magnetyczny) i pozytonowej tomografii PET (pozytonowa tomografia emisyjna), pozwala wykrywać zmiany nowotworowe w bardzo wczesnym stadium ich rozwoju, a zatem rozpoczynać leczenie znacznie wcześniej niż przy stosowaniu klasycznych metod diagnostycznych. Niestety, za ogromnym postępem w diagnostyce nowotworów nie podąża skuteczność terapii. Największym problemem jest oporność lekowa i radiacyjna komórek nowotworowych. Konieczne staje się wykorzystanie nowych metod terapeutycznych oraz jednoczesnego stosowania kilku metod leczenia. W ostatnich latach intensywnie wzrasta zainteresowanie radionuklidami, które mogą znaleźć zastosowanie w terapii. Stosowanie radioizotopów ^{131}I w leczeniu tarczycy, ^{89}Sr , ^{223}Ra czy bisfosfonianów znakowanych ^{153}Sm w paliatywnej terapii nowotworów kości stało się powszechną praktyką. W praktyce medycznej systematycznie wdrażane są również radiofarmaceutyki do tzw. celowanej radioterapii, oparte na znakowanych radionuklidami przeciwciałach monoklonalnych, ich fragmentach, bądź peptydach i małych cząsteczkach wykazujących powinowactwo do receptorów na komórkach nowotworowych (rys. 1).



Rysunek 1. Schemat działania radiofarmaceutyku receptorowego
Figure 1. Receptor radiopharmaceutical action

Radiofarmaceutyki stosowane w tej metodzie składają się z radionuklidu emitującego promieniowanie α , β lub elektrony Augera, chelatora wiążącego radionuklid, wektora dedykowanego do konkretnego celu molekularnego oraz linkera. Główną zaletą celowanej terapii jest wysoka specyficzność osiągnięta poprzez zaprojektowanie leku w taki sposób, aby był on zdolny do oddziaływania tylko na zmienione nowotworowo komórki, a jednocześnie możliwie jak najmniej wpływał na otaczające nowotwór zdrowe tkanki [4]. Aktualnie w celowanej terapii zarejestrowane są trzy radiofarmaceutyki. W terapii chłoniaków wykorzystuje się Zevalin[®] i Bexxar[®] - oparte na przeciwciałach monoklonalnych radiobiokoniugaty znakowane emiterami

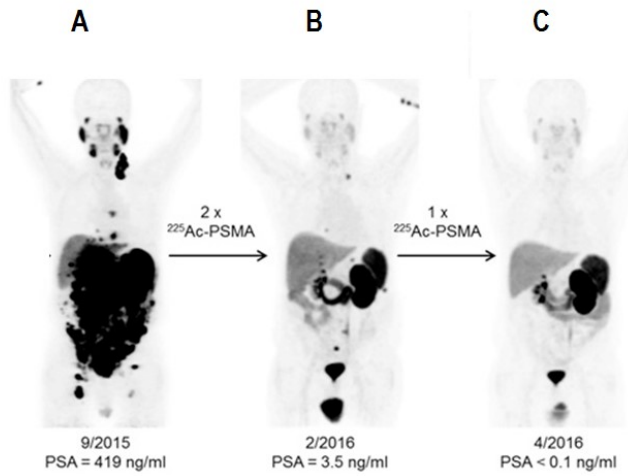
β^- ^{131}I i ^{90}Y oraz znakowany ^{177}Lu peptyd, analog somatostatyny - Lutathera[®], który powszechnie stosowany jest do terapii rozsiańcych nowotworów neuroendokrynych. Efekt terapeutyczny w celowanej radioterapii jest następstwem działania promieniowania jonizującego emitowanego przez radionuklid. Wyróżnia się 2 mechanizmy, które odpowiedzialne są za śmierć komórki. Pierwszym z nich jest mechanizm bezpośredni, w którym efekt terapeutyczny osiągnąć jest wskutek dwuniciowego uszkodzenia DNA (ang. DSB - Double-Strand Breaks) wywołanego promieniowaniem. Ten rodzaj działania jest dominujący w przypadku promieniowania o wysokim LET (ang. Linear Energy Transfer), a więc dla promieniowania α i elektronów Augera. Wygenerowanie dwuniciowego uszkodzenia jest warunkiem koniecznym, ponieważ mechanizmy obronne komórek są w stanie dokonać naprawy w przypadku uszkodzenia tylko jednej z nici.

Drugim mechanizmem jest działanie pośrednie, będące następstwem oddziaływania promieniowania na cząsteczki wody i generowanie reaktywnych rodników OH^\bullet i H^\bullet oraz cząsteczek H_2O_2 . Wolne rodniki, ze względu na obecność niesparowanego elektronu, są cząsteczkami wysoce reaktywnymi i ich oddziaływanie na DNA również powoduje jego uszkodzenia. Szacuje się, że ze względu na wysoką zawartość wody w komórkach to właśnie ten mechanizm dominuje w celowanej radioterapii [5]. Poza radiolizą wody, działanie pośrednie może być także wzmocnione wskutek wytworzenia reaktywnych form azotu [6].

Powstające reaktywne formy tlenu (ROS – ang. *Reactive Oxygen Species*), azotu oraz nadtlenek wodoru różnią się właściwościami. Większość ROS cechuje się stosunkowo krótkim okresem półtrwania, podczas gdy H_2O_2 dzięki dłuższemu $t_{1/2}$ ma możliwość przemieszczania się w cytoplazmie, co skutkuje generowaniem uszkodzeń DNA na dużych odległościach [7].

W zależności od wielkości zmiany chorobowej radionuklid dobiera się w taki sposób, aby efekt terapeutyczny był optymalny. Dla dużych guzów nowotworowych najbardziej odpowiednie okazały się radionuklidy emitujące wysokoenergetyczne promieniowanie β^- (^{90}Y i ^{188}Re) bowiem peptydy i przeciwciała monoklonalne znakowane tymi radionuklidami są coraz częściej stosowane w celowanej terapiach. Istnieje jednak ogromne zapotrzebowanie na radiofarmaceutyki wykazujące efekt terapeutyczny w stosunku do małych zmian nowotworowych rozsiańcych na dużej powierzchni tkanki, przerzutów nowotworowych lub nowotworów we wczesnym stadium rozwoju. Te warunki mogą spełniać emitery miękkiego promieniowania β^- , elektronów Augera oraz emitery promieniowania α . Zaletą emiterów α jest duża wartość liniowego przekazu energii $\text{LET}_\alpha \approx 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$, co stanowi wartość optymalną dla celów terapeutycznych. Oznacza to, że cząstki α tracą swoją energię na małym obszarze, a ich zasięg w tkance wynosi tylko 40-100 μm , co odpowiada grubości kilku warstw komórek. Wykazują więc dużą efektywność w niszczeniu małych nowotworów ograniczonych do niewielkich skupisk komórek, a tym samym w mniejszym stopniu oddziałują na zdrowe komórki otaczające nowotwór. Ponadto duża wartość LET_α

powoduje, że cząstki α mają zdolność do indukowania dwuniciowych pęknięć w DNA. W jednym z najnowszych badań klinicznych uzyskano spektakularne wyniki w leczeniu przerzutów nowotworowych spowodowanych nowotworem prostaty dla znakowanej emiterem α - ^{225}Ac małej cząsteczki PSMA-617 [8]. Jak przedstawiono na rys. 2, dwukrotne podanie radiofarmaceutyku ^{225}Ac -PSMA-617 spowodowało całkowite wyleczenie pacjenta, mimo wcześniejszej oporności na pozostałe metody leczenia.



Rysunek 2. Skany wykonane techniką PET obrazujące terapię nowotworu prostaty za pomocą radiofarmaceutyku ^{225}Ac -PSMA-617 [8]

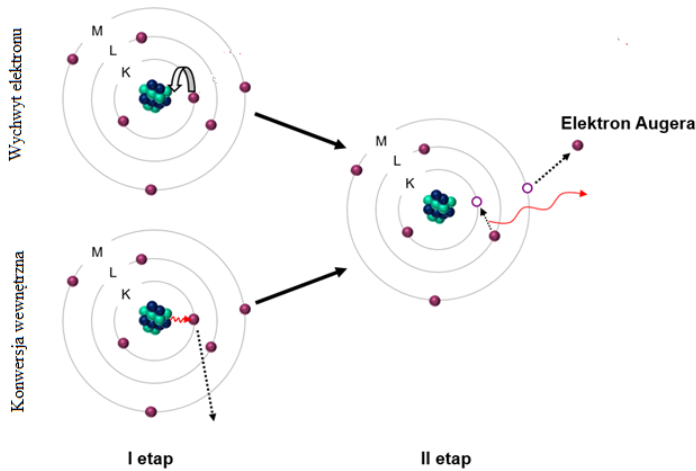
Figure 2. PET scans of prostate cancer therapy with the ^{225}Ac -PSMA-617 radiopharmaceutical

Niestety na drodze do szerokiego zastosowania emiterów α w terapii stoi bardzo mała dostępność radionuklidów będących emiterami promieniowania α oraz ich własności chemiczne utrudniające (^{211}At) lub uniemożliwiające (^{223}Ra) ich związanie z naprowadzającą cząsteczką. W związku z tym, coraz większe zainteresowanie naukowców skupia się na emiterach elektronów Augera. Elektrony Augera, podobnie jak cząstki α , charakteryzują się bardzo krótkim zasięgiem (efektywny 1-20 nm). Deponując na swojej drodze bardzo dużą dawkę energii powodują podwójnie niciowe pęknięcia struktury DNA. Ich unikatowe właściwości pozwalają zaprojektować leki przeznaczone do leczenia bardzo małych zmian nowotworowych, niekiedy w postaci pojedynczych komórek, np. nowotwory krwi czy mikroprzerzuty. Charakterystyka elektronów Augera, stawia jednak przed naukowcami wiele ograniczeń, takich jak wymóg syntezy leku w taki sposób, aby internalizował on do wnętrza komórki a następnie przechodził do jądra komórkowego, lokalizując się możliwe jak najbliżej DNA. Jest to spowodowane wyjątkowo krótkim zasięgiem elektronów Augera

i związaną z tym koniecznością wprowadzenia leku dostatecznie blisko materiału genetycznego komórki [9-11].

1. ELEKTRONY AUGERA W NOWOCZESNEJ CELOWANEJ RADIOTERAPII

Elektrony Augera emitowane są z atomu w wyniku efektu Augera oraz przejść Coster-Kroniga i super Coster-Kroniga. Zjawisko to związane jest z generowaniem luki elektronowej na niskiej powłoce elektronowej, powstającej w wyniku wychwytu elektronu przez jądro, jego wybitcia kwantem promieniowania elektromagnetycznego lub w następstwie konwersji wewnętrznej jądra atomowego. Wychwyt elektronowy występuje w atomach o jądrach posiadających nadmiar protonów i w jego efekcie proton ulega przemianie do neutronu i neutrino elektronowego, co dotyczy zazwyczaj orbitalu 1s i rzadziej 2s. Elektrony na obu orbitalach mają określoną gęstość elektronową w jądrze. Drugą przemianą jądrową prowadzącą również do emisji elektronów Augera jest konwersja wewnętrzna. W tym przypadku, powstawanie luki na niższej powłoce związane jest z przekazaniem energii z metastabilnego, wzbudzonego jądra elektronowi na niskiej powłoce, co powoduje wybitcie elektronu [12, 13]. Mechanizm powstawania elektronów Augera przedstawiono na rysunku 3.



Rysunek 3. Mechanizm powstawania elektronów Augera

Figure 3. Mechanism of Auger electron formation

Przyczyną pojawienia się luki na niskich powłokach mogą być także czynniki zewnętrzne, takie jak wybitcie elektronu przez inną cząstkę, kwant promieniowania rentgenowskiego lub promieniowania γ . Powstająca luka jest zapełniana elektronem

pochodzącym z wyższej powłoki z uwolnieniem energii w postaci promieniowania X lub energia przekazywana jest do elektronów z wyższych powłok, czego następstwem jest emisja elektronu, a proces ten propagowany jest aż do powłoki walencyjnej. Takie elektrony nazwano, od nazwiska ich odkrywcy, elektronami Augera. Emisje elektronów mogą następować także w wyniku przejść Coster-Kroniga i super Coster-Kroniga. Przejście Coster-Kronig polega na wypełnieniu luki na niższej podpowłoce tej samej powłoki elektronowej i wybiciu elektronu z wyższej powłoki, natomiast przejście typu super Coster-Kronig odbywa się na różnych podpowłokach tej samej powłoki i zachodzi dla powłok bardziej oddalonych od jądra, najczęściej M i N [12]. W literaturze opisującej medyczne zastosowania niskoenergetycznych elektronów pod pojęciem elektronów Augera występują wszystkie wymienione wyżej elektrony: Augera, Coster-Kroniga, super Coster-Kroniga oraz elektrony konwersji, taką nomenklaturę zastosowano także w dalszej części pracy.

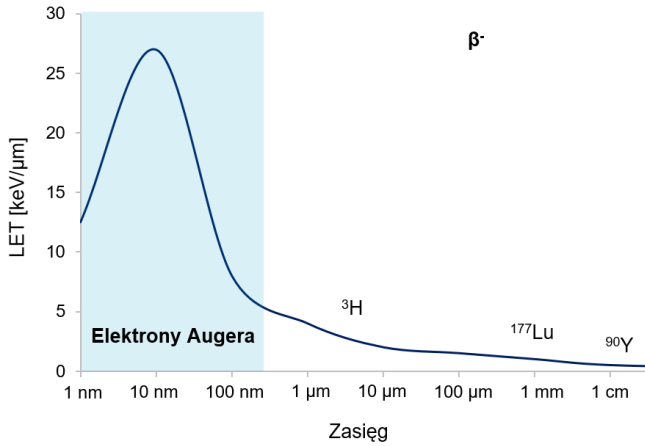
Elektrony emitowane z powłok znajdujących się bliżej jądra mają największe energie i w związku z tym, mogą pokonywać najdłuższy dystans. Zazwyczaj jednak elektronów tych w trakcie jednego rozpadu emitowanych jest najmniej, a większość stanowią elektrony pochodzące z powłok bardziej oddalonych od jądra [11]. W trakcie jednego rozpadu jądra atomowego emitowanych jest od kilku do kilkudziesięciu elektronów Augera.

1.1. DZIAŁANIE BIOLOGICZNE ELEKTRONÓW AUGERA

Oddziaływanie biologiczne jest wynikiem jonizacji powodowanej przez emitowane, niskoenergetyczne elektrony. Mogą one bezpośrednio uszkadzać nici DNA oraz inne istotne struktury komórkowe, do których zalicza się m.in. mitochondria oraz błonę komórkową. Działanie pośrednie natomiast jest następstwem generowania reaktywnych form tlenu oraz – co jest charakterystyczne tylko dla efektu Augera – neutralizacją powstającego po emisji elektronów Augera wysoce dodatniego kationu. Proces ten zachodzi poprzez pobieranie elektronów z cytoplazmy, której ponad 80% stanowi woda. W jego trakcie, wskutek pobrania elektronów, generowane są kolejne rodniki, których obecność wzmacnia działanie cytotoksyczne [14, 15].

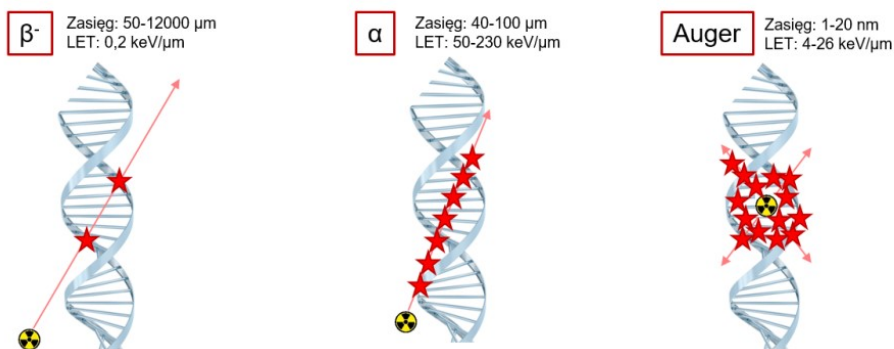
Elektrony Augera charakteryzują się wysokim, blisko 20-krotnie większym LET w porównaniu do β^- (rys. 4), co przekłada się na większą liczbę generowanych dwuniciowych uszkodzeń DNA. Skuteczność promieniowania o wysokim LET związana jest głównie z bezpośrednim oddziaływaniem elektronów, a w mniejszym stopniu z generacji ROS, i w związku z tym, jest niezależna od poziomu utleniania tkanki. Jest to niewątpliwa zaleta w porównaniu do cząstek β^- , które mają znacznie większą energię, ale ze względu na duży zasięg i niski LET

dominującym mechanizmem jest działanie pośrednie poprzez generację ROS, w wyniku czego ich efektywność istotnie zależy od poziomu utlenowania tkanki. Szczególnie ważną rolę odgrywa to w przypadku komórek nowotworowych, które bardzo często wykazują stan niedotlenienia (hipoksji) [16, 17].



Rysunek 4. Porównanie LET elektronów Augera i promieniowania beta minus
Figure 4. Comparison of LET for Auger electrons and beta minus radiation

Elektrony Augera mają bardzo krótki zasięg w tkance, wynoszący 1-500 nm (rys. 5). Jednak obszar ich największej efektywności, czyli o najwyższym LET, wynosi jedynie 1-20 nm. Oznacza to, że są one zdolne do wygenerowania dwuniciowych uszkodzeń DNA na dystansie równym długości kilku nukleotydów. Stanowi to istotne ograniczenie narzucające możliwość stosowania emiterów Augera w terapii tylko bardzo małych zmian nowotworowych, składających się z pojedynczych komórek. W związku z tym ważne jest zaprojektowanie leku w taki sposób, aby nie tylko precyzyjnie docierał on do konkretnej komórki w organizmie pacjenta, ale miał również możliwość internalizacji do jej wnętrza. W takim przypadku możliwe jest uzyskanie dużego efektu terapeutycznego jako następstwa działania mechanizmu bezpośredniego i pośredniego [10, 18]. Zasięg elektronów Augera oraz promieniowania α i β przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Zasięg elektronów Augera w porównaniu do zasięgu promieniowania alfa i beta
 Figure 5. Comparison of Auger electrons range with the range of alpha and beta radiation

Ważną zaletą terapeutycznego wykorzystania emiterów elektronów Augera jest ich oddziaływanie jedynie z komórką, do której się przyłączył radionuklid. Pozwala to, na precyzyjną terapię ograniczającą się do patologicznie zmienionych komórek nie uszkadzając zdrowych. W przypadku powszechnie stosowanych emiterów promieniowania β , którego zasięg wynosi od 1 do 10 mm, obserwuje się w trakcie terapii uszkodzenia zdrowych tkanek, szczególnie promieniowrażliwego szpiku kostnego [19]. Ogromnym wyzwaniem jest zatem połączenie emiterów elektronów Augera z cząsteczką biologicznie aktywną, która precyzyjnie rozpozna komórkę nowotworową i dodatkowo internalizuje do jej wnętrza, lokalizując się w okolicy DNA.

1.2. CYTOTOKSYCZNE DZIAŁANIE ELEKTRONÓW AUGERA

Śmierć komórki, będąca następstwem bezpośredniego lub pośredniego działania elektronów Augera, może być indukowana bezpośrednio, poprzez przyłączenie się emitera elektronów Augera do DNA w jądrze komórkowym, a także uszkodzeniem mitochondrialnego RNA oraz zniszczeniem błony komórkowej.

Pierwszy z mechanizmów jest najbardziej efektywny i szeroko opisywany w literaturze, gdyż wprowadzenie emitera elektronów Augera do nici DNA powoduje uszkodzenie materiału genetycznego już przez jeden rozpad radionuklidu. Bezpośredni mechanizm obejmuje oddziaływanie na DNA poprzez wbudowanie się w jego strukturę, najczęściej na zasadzie powinowactwa do jednej z zasad azotowych. Stwierdzono, że emitery elektronów Augera ^{123}I i ^{125}I skoniugowane z jododeoksyurydyną (IUdR), która jest inkorporowana bezpośrednio do DNA, wyraźnie zmniejszają przeżycie komórek ssaków [26]. Śmiertelna dawka promieniowania dla ^{125}I -IUdR była 7-krotna niższa niż promie-

niowania X, wskazując na wysoką cytotoksyczność dla elektronów Augera emitowanych przez ^{125}I inkorporowany do DNA. Nie stwierdzono jednak istotnego działania cytotoksycznego dla ^{125}I zlokalizowanego w cytoplazmie, związanego z błoną komórkową lub będącego poza komórką. Tak więc rozpad emitera elektronów Augera w bliskiej odległości od jądrowego DNA jest konieczny do pełnego wykorzystania wysokiej wartości LET tych elektronów [26]. Efekt ten można także uzyskać przez zastosowanie znakowanych emiterami Augera oligopetydów, aptamerów, akrydyny, antracyklin, peptydów transportujących do jądra komórkowego (ang. *Nuclear Location Sequence*, NLS) czy kompleksów interkalujących do jądra, jak *cis*-platyna. Poszczególne związki zostały opisane szerzej w punkcie 3.1.

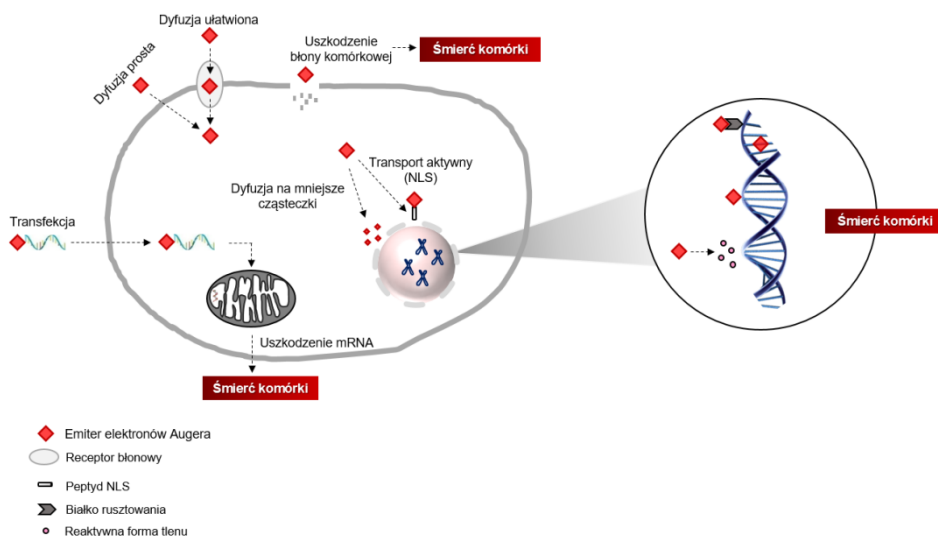
Zastosowanie tego podejścia, mimo licznych badań, w tym klinicznych, jednak nie zakończyło się sukcesem. Aby wykorzystać cytotoksyczne działanie elektronów Augera, konieczne jest w pierwszej kolejności selektywne dostarczenie emitera Augera do komórki nowotworowej. Niestety, żadne stosowane dotychczas wektory naprowadzające, takie jak peptydy czy przeciwciała monoklonalne nie wykazują zdolności do wbudowania się w strukturę DNA, a przyłączenie wektorów do znanych interkalatorów upośledza ich zdolność do wiązania się z DNA. Przyłączenie metalicznych emiterów Augera do interkalatorów wymaga także zastosowania dużych ligandów chelatujących, które również mogą istotnie wpływać na zdolność do wiązania się interkalatora z DNA. W tym przypadku konieczne jest ograniczenie się do reakcji jodowania radionuklidami ^{123}I i ^{125}I . Jednak takie połączenia są stosunkowo nietrwałe *in vivo*, ulegając enzymatycznej dehalogenizacji. W ostatnich latach rozpoczęto zatem szersze badania nad możliwością uzyskania efektu cytotoksycznego bez konieczności stosowania interkalujących do DNA radiofarmaceutyków. Do takich alternatywnych celów zalicza się błonę komórkową oraz cytoplazmę.

Konieczność internalizacji do jądra komórkowego radiofarmaceutyków znakowanych emiterami elektronów Augera zakwestionowali Pouget i wsp. [20], którzy porównali cytotoksyczność elektronów Augera emitowanych przez ^{125}I w jądrze komórkowym oraz na błonie komórkowej. Chociaż zlokalizowany w jądrze ^{125}I był najbardziej cytotoksyczny ze względu na bezpośrednie oddziaływanie elektronów Augera z DNA, to zaobserwowano destrukcyjny wpływ elektronów Augera na błonę komórkową. Uszkodzenie błony komórkowej powoduje szereg zmian w fizjologii komórki. W wyniku działania elektronów Augera dochodzi do przerywania ciągłości błony komórkowej skutkującego destrukcją organelli, m.in. polirybosomów i lizosomów. Depolaryzacja błony komórkowej przyczynia się do zaburzenia transportu elektronów i związanego z tym spadku poziomu ATP. Dochodzi także do biernego napływu wody i jonów (głównie Ca^{2+} i Na^{+}), co skutkuje dezintegracją jądra komórkowego. Wszystkie te

procesy powodują pęcznienie komórki i jej rozpad [21]. Stwierdzono także, że generacja dużych ilości ROS w cytoplazmie w okolicach jądra komórkowego może spowodować ich dyfuzję do jądra komórkowego i zniszczenie jądrowego DNA oraz DNA umieszczonego w mitochondriach (mtDNA) [22]. Defekty mtDNA wywołane działaniem elektronów Augera powodują uszkodzenie ważnego elementu genetycznego, zawierającego informację o sekwencji aminokwasów w białku i indukują śmierć komórki. Uszkodzenia mtDNA można stymulować prowadząc proces transfekcji (wprowadzenie obcego DNA) z wykorzystaniem aptameru znakowanego emitery elektronów Augera [23, 24]. Aptamery to fragmenty kwasów nukleinowych zwykle o długości od kilkunastu do kilkudziesięciu nukleotydów, które wykazują, podobnie jak przeciwciała monoklonalne, powinowactwo do celów molekularnych na komórkach nowotworowych. Charakteryzują się jednak znacznie mniejszym rozmiarem – ciężar cząsteczkowy aptameru, to 8-15 kDa, natomiast przeciwciała około 150 kDa, co przyczynia się do znacznie lepszej farmakokinetyki.

Ciekawy efekt zaobserwowano dla małej cząsteczki ^{125}I -DCIBzL (ang. 2-[3-[1-carboxy-5-(4- ^{125}I -iodo-benzoylamino)-pentyl]-ureido]-pentanedioic acid) wykazującej wysokie powinowactwo do receptorów PSMA na komórkach raka prostaty [25]. Przy użyciu mikroskopii konfokalnej z fluorescencyjnym analogiem DCIBzL wykazano, że czynnik ten w dużym stopniu lokalizuje się w obszarze pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną membraną jądra komórek z nadekspresją PSMA. Dla związku znakowanego ^{125}I stwierdzono wysoką cytotoksyczność, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. Autorzy stwierdzili zatem, że źródło tej cytotoksyczności jest związane z mechanizmem procesu mitozy (podziału jądra komórkowego), podczas którego, w trakcie anafazy, emiter elektronów Augera zbliża się do materiału genetycznego znajdującego się w biegunach komórki. Ponieważ efekt ten związany jest z szybkością dzielenia się komórek nie obserwuje się go w promieniowrażliwych nerkach, które wykazują także ekspresję PSMA, ale mają niski indeks mitotyczny. Różne mechanizmy cytotoksycznego działania radiokoniugatów znakowanych emitery elektronów Augera przedstawiono na rysunku 6.

W przypadku radioterapii, a szczególnie w α terapii oraz terapii elektronami Augera, należy podkreślić występowanie tzw. efektu widza lub efektu sąsiedztwa (ang. Bystander Effect) [26,27]. Jest on indukowany przez substancje wysyłane przez komórki bezpośrednio napromieniowane, które są transportowane do sąsiadujących komórek nie wystawionych na działanie promieniowania jonizującego.



Rysunek 6. Mechanizmy cytotoksycznego działania radiokoniugatów znakowanych emiterami elektronów Augera

Figure 6. Various mechanisms of cytotoxic action of radioconjugates labeled with Auger electron emitters

Czynniki te powodują obniżenie przeżycia tych komórek, generowanie uszkodzeń cyto-genetycznych, wzrost odsetka apoptozy i zmian biochemicznych [28]. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze wyjaśniony. Przypuszcza się, że molekularne czynniki sygnalizacyjne uwalniane przez komórki napromieniowane do przestrzeni pozakomórkowej są odpowiedzialne za wzrost apoptozy i zmian fizjologicznych w sąsiadujących komórkach, które nie zostały napromienione. Badania *in vivo* na modelach zwierzęcych wykazują, że efekt ten może pojawiać się także w tkankach odległych od miejsca napromienienia. Efekt sąsiedztwa może mieć zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki w przypadku radioterapii. Jeżeli komórki nowotworowe bezpośrednio pochłaniające energię promieniowania jonizującego będą, wysyłając sygnały, uszkadzały sąsiadujące komórki nowotworowe lub będą inicjowały różnicowanie tych komórek będzie to efekt pożądany. Jeżeli natomiast uszkodzeniu ulegną komórki prawidłowe (komórki nabłonkowe, śródbłonkowe, leukocyty etc.), wówczas może to niekorzystnie zwiększać działania niepożądane w postaci powikłań popromiennych i nowotworów wtórnych [28, 29].

2. EMITERY ELEKTRONÓW AUGERA W CELOWANEJ RADIOTERAPII

W odróżnieniu od emiterów promieniowania α , wśród których jedynie 9 ma własności pozwalające na zastosowanie w celowanej terapii, liczba emiterów

elektronów Augera jest znacznie większa. Także dostępność emiterów α jest ograniczona, w przeciwieństwie do emiterów elektronów Augera, które mogą być wyprodukowane na dostępnych cyklotronach w dużych aktywnościach. Cena emiterów α jest także wielokrotnie większa. Aby emiter elektronów Augera mógł znaleźć zastosowanie terapeutyczne powinien posiadać następujące własności:

- emitować dużą liczbę elektronów,
- okres połowicznego rozpadu musi być na tyle długi, aby umożliwić dotarcie leku do celu, a jednocześnie na tyle krótki, aby nie eksponować niepotrzebnie organizmu na działanie promieniowania jonizującego. W przypadku elektronów Augera kryterium to nie jest aż tak istotne, jak dla daleko oddziaływującego promieniowania β^- czy silnie jonizującego promieniowania α ,
- rozpad jądra macierzystego musi prowadzić do powstania długożyciowego lub stabilnego jądra, co jest warunkiem koniecznym w trakcie prowadzenia każdego rodzaju wewnętrznej radioterapii,
- radionuklid powinien być łatwy do wyprodukowania i wydzielenia z tarczy, a cały proces być stosunkowo tani
- nie powinien zawierać nieradioaktywnego nośnika,
- powinna istnieć łatwa metoda przyłączenia radionuklidu do naprowadzającej biomolekuły.

Bardzo ważna z punktu widzenia efektywności terapii jest charakterystyka promieniowania emitowanego przez radionuklid. Uważa się, że emiter elektronów Augera nie powinien być źródłem innego promieniowania, np. β^- , choć w przypadku emitera β^- ^{161}Tb uznano emisję elektronów Augera za zjawisko korzystne dla terapii [30]. Podobnie jest w przypadku emisji promieniowania γ , które może pozwolić na jednoczesne monitorowanie postępów terapii. Z drugiej strony najczęściej stosowane emitery Augera (^{111}In , ^{125}I , ^{201}Tl , ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), emitują kwanty gamma z dużą wydajnością i są powszechnie stosowane w diagnostycznej technice SPECT (ang. Single Photon Emission Computer Tomography). Dawki promieniowania stosowane w terapii elektronami Augera wielokrotnie przekraczają jednak te, które stosowane są w diagnostyce dlatego emitowane przenikliwe promieniowanie może być znacznym obciążeniem radiacyjnym dla krytycznych organów pacjenta. Dlatego warto zwrócić uwagę na te emitery elektronów Augera, gdzie emisja promieniowania γ jest najmniejsza, np. ^{135}La , $^{197,197\text{m}}\text{Hg}$ czy $^{193\text{m},195\text{m}}\text{Pt}$.

Istotnym parametrem w kontekście oczekiwanych efektów terapii jest energia elektronów Augera i liczba emitowanych elektronów konwersji, których zasięg jest większy niż niskoenergetycznych elektronów Augera. Mogą one powodować śmierć komórki, lokalizując się na jej powierzchni bez konieczności internalizacji i translokacji do jądra. Mogą również generować występowanie efektu krzyżowego

polegającego na działaniu na sąsiednie komórki w bliskiej odległości od miejsca rozpadu.

W tabeli 1 przedstawiono emitery elektronów Augera, które są lub mogą być w przyszłości stosowane w celowanej radioterapii [18, 31-33]. Pogrubioną czcionką zaznaczono radionuklidy, które zdaniem Autorów mają szanse na szersze zastosowanie. Ich metody otrzymywania oraz zalety zostaną omówione szerzej poniżej.

Tabela 1. Charakterystyka radionuklidów które mogą znaleźć zastosowanie w celowanej radioterapii
Table 1. Characteristics of radionuclides that can be used in targeted radiotherapy

Radionuklid	Okres półtrwania	Liczba emitowanych e ⁻	Rozpad	Energia γ [keV]	Metoda produkcji
⁵¹ Cr	27,70 d	4,68	EC	320	Reaktor
⁶⁷Ga	78,28 h	7,03	EC	93,185,300	Cyklotron
⁷⁷ Br	57,04 d	4,96	EC	239	Cyklotron
⁹⁴ Tc	4,88 h	6,42	EC	511	Cyklotron
^{99m} Tc	6,01 h	4,67	IT	141	Cyklotron
¹¹¹In	2,82 d	6,05	EC	171,245	Cyklotron
^{114m} In	49,51 d	7,74	EC	558	Reaktor
^{115m} In	4,49 h	5,04	IT	336	Reaktor
¹²³ I	13,20 h	12,6	EC	159	Cyklotron
¹²⁴ I	4,18 d	8,6	EC	511	Cyklotron
¹²⁵I	59,40 d	21,0	EC	-	Cyklotron
¹³⁵ La	19,5 h	10,9	EC	485,5	Cyklotron
¹⁶⁷ Tm	9,25 d	11,4	EC	207,8	Cyklotron
^{193m}Pt	4,33 d	27,0	IT	-	Reaktor/cyklotron
^{195m}Pt	4,03 d	37,0	IT	98,9	Reaktor/cyklotron
¹⁹⁷ Hg	64,14 h	23,2	EC	134	Cyklotron
^{197m} Hg	23,8 h	19,4	IT/EC	77	Cyklotron
²⁰¹ Tl	73,01 j	36,9	EC	68-80	Cyklotron
²⁰³ Pb	51,92 h	23,3	EC	279,2	Cyklotron

Najszerzej dotychczas stosowanym emitery elektronów Augera jest radionuklid jodu ¹²⁵I stosowany w diagnostyce tarczycy do znakowania przeciwciał monoklonalnych w metodzie SPECT, a także w brachyterapii. Jego duże aktywności otrzymywane są w reaktorze przez naświetlanie gazowego ksenonu

w reakcji $^{124}\text{Xe}(n,\gamma)\rightarrow^{125\text{m}}\text{Xe}$ (57s) $\rightarrow^{125}\text{I}$. Radionuklidy ^{111}In , ^{67}Ga i ^{201}Tl są również dostępne handlowo i powszechnie stosowane w diagnostyce SPECT, ^{111}In w diagnostyce receptorowej jak np. Octreoscan™ (^{111}In -pentetreotid), ^{67}Ga w postaci cytrynianu galu, a ^{201}Tl w radiofarmaceutykach perfuzyjnych np. $^{201}\text{TlCl}$. Otrzymywane są one cyklotronowo w reakcjach: $^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$ z wydajnością $72\text{ MBq } \mu\text{A}^{-1}\text{ h}^{-1}$ dla energii 15-0 MeV, $^{67}\text{Zn}(p,n)^{67}\text{Ga}$ z wydajnością $87\text{ MBq } \mu\text{A}^{-1}\text{ h}^{-1}$ i $^{203}\text{Tl}(p,3n)^{201}\text{Pb}\rightarrow^{201}\text{Tl}$ z wydajnością $78,5\text{ MBq } \mu\text{A}^{-1}\text{ h}^{-1}$. Pozwala to otrzymać aktywności powyżej 20 GBq, które wystarczają na przeprowadzenie terapii elektronami Augera.

W naszym zespole zwrócono także uwagę na inne emitery elektronów Augera, które w odróżnieniu do opisanych powyżej nie emitują lub emitują małe ilości przenikliwego promieniowania γ . Radionuklid ^{135}La może być łatwo otrzymany cyklotronowo w reakcji $^{135}\text{Ba}(p,n)^{135}\text{La}$ z wydajnością $80\text{ MBq } \mu\text{A}^{-1}\text{ h}^{-1}$ dla wzbogaconej izotopowo tarczy ^{135}Ba , co pozwala otrzymywać duże dawki terapeutyczne [34]. Dodatkową zaletą tego radionuklidu jest jego łatwość skompleksowania powszechnie stosowanymi w radiofarmacji liniowymi lub cyklicznymi ligandami aminokarboksylowymi.

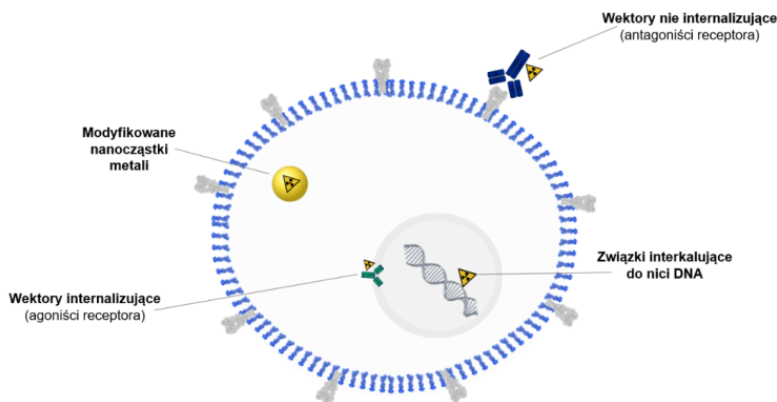
Zaletą radionuklidów platyny $^{193\text{m}}\text{Pt}$ i $^{195\text{m}}\text{Pt}$ jest emisja dużej liczby elektronów Augera, odpowiednio 27 i 37 oraz możliwość ich zastosowania w postaci znakowanej soli $\text{PtCl}_2(\text{NH}_2)_2$ - *cis*-platyny. Ten prosty związek kompleksowy ma zdolność internalizacji do jądra komórkowego oraz interkalacji do nici DNA. Zastąpienie atomów Pt poprzez radionuklidy $^{193\text{m},195\text{m}}\text{Pt}$ powinno z wielokrotnie zwiększyć zdolności terapeutyczne *cis*-platyny. Jednak znane do niedawna reaktorowe metody otrzymywania $^{193\text{m},195\text{m}}\text{Pt}$ pozwalały wyprodukować nieduże aktywności tych radionuklidów o małej aktywności właściwej. W ostatnim czasie opracowano metodę otrzymywania $^{193\text{m}}\text{Pt}$ poprzez bombardowanie cząstkami α tarczy ^{192}Os w reakcji $^{192}\text{Os}(\alpha,3n)^{193\text{m}}\text{Pt}$, która pozwala na otrzymanie znacznych aktywności $^{193\text{m}}\text{Pt}$ [35]. Duże nadzieje można także łączyć z otrzymywaniem ultra małych nanocząstek Pt o średnicy 2 nm. Mają one zdolność do rozpuszczania się w cytoplazmie niektórych komórek nowotworowych o dużym potencjale utleniającym np. w raku wątrobowokomórkowym (ang. Hepatocellular carcinoma). Synteza takich nanocząstek zawierających $^{193\text{m}}\text{Pt}$ pozwoliłaby zrealizować koncepcję selektywnej interkalacji emitera Augera do nici DNA.

Radionuklidy ^{197}Hg i $^{197\text{m}}\text{Hg}$ mają również bardzo atrakcyjne własności z punktu widzenia ich zastosowania w wewnętrznej radioterapii. Otrzymywane mogą być w znacznych aktywnościach w reakcji $^{197}\text{Au}(p,n)^{197\text{m},197}\text{Hg}$. Radionuklid $^{197\text{m}}\text{Hg}$ obok elektronów Augera emituje elektrony konwersji o stosunkowo wysokiej energii 127 keV, znacznie wyższej niż w przypadku ^{111}In czy ^{125}I [35]. Dzięki temu nie jest wykluczone jego oddziaływanie na większe odległości. Ponieważ związanie Hg w kompleksach chelatowych nie jest prostym procesem

zaproponowano zastosowanie małych nanocząstek złota pokrytych amalgamatem $^{197,197m}\text{Hg}(\text{Au})$. Także w tym przypadku można spodziewać się rozpuszczenia $^{197,197m}\text{Hg}$ w cytoplazmie komórek nowotworowych o dużym potencjale utleniającym.

3. RADIOBIOKONIUGATY ZNAKOWANE EMITERAMI AUGERA

Wybór wektora naprowadzającego, który jest stosowany do syntezy radiobiokoniugatu podyktowany jest rodzajem celu molekularnego, do którego emiter Augera ma być przetransportowany. Jeżeli celem molekularnym są nici jądrowego DNA, radiofarmaceutyk musi zawierać elementy nakierunkowujące go do jądra komórkowego w okolicie DNA, najlepiej o zdolnościach interkalujących. Gdy celem ma być cytoplazma komórki powinien być to wektor (peptyd, przeciwciało monoklonalne) internalizujący do wnętrza komórki (tzw. agonista receptora). W przypadku gdy celem molekularnym ma być tylko błona komórkowa najlepsze będą wektory łączące się do receptora komórkowego, nie ulegające przy tym internalizacji (tzw. antagoniści receptora) [11, 36, 37].

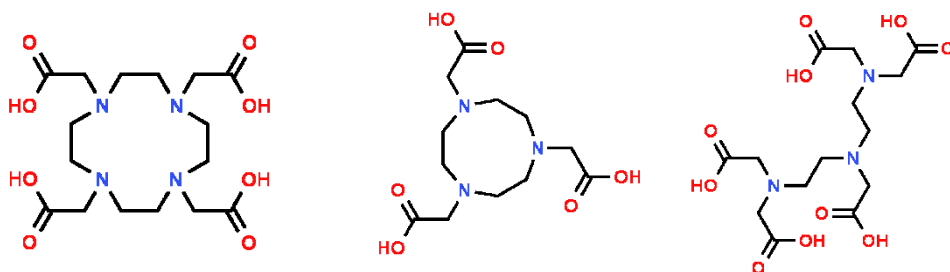


Rysunek 7. Działanie radiobiokoniugatów znakowanych emiterami elektronów Augera w zależności od zastosowanego wektora

Figure 7. Cytotoxic action of radiobioconjugates labeled with Auger electron emitters depending on the vector used

Emitory elektronów Augera w postaci kationów metali przyłączane są do wektorów naprowadzających za pomocą powszechnie stosowanych w radiofarmacji multidentnych związków chelatujących, takich jak DOTA (kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowy), NOTA (kwas 1,4,7-triazacyklononano-1,4,7-trioctowy) czy DTPA (kwas dietylenotriaminopenta-

octowy) (kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowy). Struktury tych chelatorów przedstawiono na rysunku 8.



Rysunek 8. Struktury chelatorów DOTA, DTPA i NOTA (na podstawie bazy Chemspider)
Figure 8. Chemical structures of DOTA, DTPA i NOTA chelators (on Chemspider base)

W przypadku halogenowych emiterów elektronów Augera ^{77}Br czy $^{123,124,125}\text{I}$ metodą ich przyłączania do biomolekuł jest reakcja halogenizacji polegająca na elektrofilowym podstawieniu tyrozyny w peptydach i białkach. W porównaniu do chelatowania metoda jodowania charakteryzuje się znacznie niższą wydajnością wynoszącą jedynie 40-60%. Ponadto, stabilność tego typu związków w warunkach *in vivo* jest niska, ze względu na obecność enzymu dehalogenazy, odczepiającego radioaktywny brom czy jod [11].

Ostatnim z podstawowych rozwiązań stosowanych w syntezie radiofarmaceutyków znakowanych emiterami elektronów Augera jest wykorzystanie nanocząstek jako nośników. Metoda ta znajduje coraz szersze zastosowanie, ze względu na unikatowe właściwości nanocząstek, które dzięki swoim niewielkim rozmiarom, mogą wnikać do wnętrza komórki, co przekłada się na zwiększenie efektywności dostarczania leku. Wykorzystanie nanocząstek może polegać na chemisorpcji radionuklidu na powierzchni [38] lub przyłączeniu skompleksowanego radionuklidu do powierzchni nanocząstki poprzez łącznik polimerowy [22].

3.1. RADIOBIOKONIUGATY WIĄŻĄCE SIĘ DO NICI DNA

Dotychczasowe badania nad nowymi radiofarmaceutykami o potencjalnym zastosowaniu w celowanej radioterapii elektronami Augera dotyczyły głównie radiobiokoniugatów znakowanych dwoma radionuklidami: ^{111}In oraz ^{125}I . Było to spowodowane ich dużą dostępnością na rynku, a także możliwością łatwego przyłączenia do biomolekuł. W ostatnich latach opublikowano także prace dotyczące efektywnej i prostej metody otrzymywania dwóch atrakcyjnych emiterów elektronów Augera - ^{135}La i $^{197}\text{Hg}/^{197\text{m}}\text{Hg}$, które prowadzone są w kilku

ośrodkach pod kątem ich zastosowania w celowanej radioterapii. Jednakże dotychczas nie opublikowano wyników prac, w których zastosowano by te radionuklidy do syntezy radiofarmaceutyków. W tabeli 2 zebrano prowadzone od 2013 lat badania z użyciem radiobiokoniugatów znakowanych emiterami elektronów Augera. Pod tabelą omówiono niektóre radiobiokoniugaty oparte na małych cząsteczkach, nukleozydach, peptydach, polipeptydach i przeciwciałach monoklonalnych. Szczególną uwagę zwrócono na mechanizm ich terapeutycznego działania.

Tabela 2. Wykaz wybranych prac dotyczących celowanej radioterapii elektronami Augera opublikowanych w ostatnich 7 latach

Table 2. List of selected studies on targeted Auger electron radiotherapy published in the last 7 years

Radionuklid	Radiobiokoniugat	Wektor	Cel molekularny	Etap	Rok publikacji [autorzy]
^{58m}Co	^{58m}Co -DOTATATE	Analog somatostatyny	NET	<i>In vitro, in vivo</i>	2014 [39]
^{67}Ga	^{67}Ga -Nimotuzumab	Przeciwciało	MPM	<i>In vitro, in vivo</i>	2018 [40]
^{67}Ga	^{67}Ga -NOTA-MNT	MNT	EGFR+	<i>In vitro, in vivo</i>	2014 [41]
^{67}Ga	^{67}Ga -Trastuzumab	Przeciwciało	HER2+	<i>In vitro</i>	2020 [42]
^{67}Ga	^{67}Ga -pBR322	Plazmid	PC, BC	<i>In vitro</i>	2017 [43]
^{99m}Tc	^{99m}Tc -HYNIC-DAPI	DAPI	Plazmid DNA	<i>In vitro</i>	2014 [44]
^{111}In	^{111}In -Bn-DTPA-Nimotuzumab	Przeciwciało	EGFR+	<i>In vitro</i>	2020 [45]
^{111}In	^{111}In -AuNP-EGF	Białko	EGFR+	<i>In vitro</i>	2016 [46]
^{111}In	^{111}In -AuNP-Trastuzumab	Przeciwciało	HER2+	<i>In vitro, in vivo</i>	2016 [47]
^{111}In	^{111}In -DTPA-NLS-Trastuzumab	Przeciwciało	HER2+	<i>In vitro</i>	2013 [48]
^{111}In	^{111}In -MCP-Panitumumab	Przeciwciało	EGFR+	<i>In vitro, in vivo</i>	2018 [49]
^{111}In	^{111}In -DTPA-hEGF	Białko	EGFR+	<i>Badania kliniczne</i>	2014 [50]
^{111}In	^{111}In -hEGF-PLGA	Białko	EGFR+	<i>In vitro</i>	2018 [51]
^{111}In	^{111}In -DTPA-Oktretyd	Analog somatostatyny	NET	<i>Badania kliniczne</i>	2015 [52]
^{111}In	^{111}In -NOTA-MNT	MNT	EGFR+	<i>In vitro, in vivo</i>	2018 [53]
^{111}In	^{111}In -NOTA-MNT _{Aficialo}	MNT+Afficiało	EGFR+	<i>In vitro</i>	2020 [54]
^{111}In	^{111}In -DTPA-NLS-CSL360	Przeciwciało	AML	<i>In vitro</i>	2015 [55]
^{111}In	^{111}In -NOTA-MNT	MNT	EGFR+	<i>In vitro, in vivo</i>	2017 [56]
^{111}In	^{111}In -DTPA-Fab-PEG ₂₄ -EGF	Przeciwciało+białko	EGFR+,HER2+	<i>In vitro, in vivo</i>	2016 [57]
^{111}In	^{111}In -Trastuzumab-NLS	Przeciwciało	HER2+	<i>In vitro</i>	2015 [58]
^{111}In	^{111}In -hEGF	Białko	EGFR+	<i>In vitro, in vivo</i>	2015 [59]
^{111}In	^{111}In -Trastuzumab-MCP	Przeciwciało	HER2+	<i>In vitro</i>	2015 [60]

¹¹¹ In	¹¹¹ In-NLS-7G3	Przeciwciało	AML	<i>In vitro</i>	2014	[61]
¹²⁴ I	¹²⁴ I-Omburtamab	Przeciwciało	MN	<i>Badania kliniczne</i>	2019	[62]
¹²⁵ I	¹²⁵ In-Tyr ³ -Oktreotydyd	Analog somatostatyny	NET	<i>In vitro</i>	2016	[63]
¹²⁵ I	¹²⁵ I-mAb-425	Przeciwciało	EGFR+	<i>Badania kliniczne</i>	2013	[64]
¹²⁵ I	¹²⁵ I-DCIBzL	Białko	PSMA	<i>In vitro, in vivo</i>	2015	[65]
¹²⁵ I	¹²⁵ I-KX1	Zw. małowzrast.	Neuroblastoma	<i>In vitro, in vivo</i>	2019	[66]
¹²⁵ I	¹²⁵ I-DCIBzL	Białko	PSMA	<i>In vitro, in vivo</i>	2020	[67]

ANALOGI NUKLEOZYDÓW – DEOKSYNUKLEOTYDY I OLIGONUKLEOTYDY

Analogi nukleozydów stanowią grupę związków interkalujących do DNA na zasadzie wbudowywania się w miejsce określonych zasad azotowych. Najszerzej przebadanym związkiem jest analog tyminy – 5-jodo-2'-deoksyurydyna (IdUR), znakowana zazwyczaj ^{123/125}I. Zaletą tego ligandu jest jego wbudowywanie się w DNA poprzez zastąpienie tyminy. Pomimo szybkiego wydalania ¹²⁵I-IdUR z organizmu i stosunkowo niskiego wychwytu w nowotworze, udowodniono wysoką skuteczność terapii u pacjentów. W ramach wielu przeprowadzonych eksperymentów analizowano zarówno wpływ radionuklidu, porównując działanie także ⁷⁷Br oraz ¹³¹I, jak i różnych modyfikacji struktury podstawowej, na przykład [¹²³I]5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny. Wadą analogów nukleozydów, jak i innych interkalatorów DNA, jest bardzo mała selektywność w stosunku do komórek nowotworowych i związane z tym oddziaływanie również na komórki zdrowe. Próby przyłączenia wektorów naprowadzających nukleotydy na receptory na komórkach nowotworowych nie dały dobrych wyników, ponieważ nukleotydy z przyłączonymi wektorami traciły własności interkalujące. Ponadto, wadą tej grupy związków jest ograniczenie ich działania jedynie do komórek będących w fazie S cyklu komórkowego, w związku z czym jedynie niewielka liczba komórek w danym czasie może być podatna na działanie tego związku. Pomimo szeregu zalet, obecne zainteresowanie tą grupą wektorów jest stosunkowo niskie, co spowodowane jest istotnymi ograniczeniami tej grupy związków [68, 69].

Także krótkie fragmenty kwasów nukleinowych (oligonukleotydy) mogą być wykorzystywane jako wektor zarówno do bezpośredniego oddziaływania na określone sekwencje DNA, jak i oddziaływania na znajdujące się w cytoplazmie mRNA. Przykładem oligonukleotydu badanego pod kątem stosowania w terapii Augera jest 2'O-methyl RNA (2'OMeRNA) znakowany ¹¹¹In. Związek ten wykazał wysoką selektywność względem komórek z nadekspresją telomerazy oraz bezpoś-

rednie oddziaływanie na DNA ocenione na podstawie analizy dwuniciowych uszkodzeń [70].

AKRYDYNY

Dobrze znanymi interkalującymi do DNA związkami są akrydyny–heterocykliczne, trójpierścieniowe związki, wiążące się z DNA poprzez oddziaływanie między parami zasad, w szczególności guaniną i cytozyną. Podczas badań połączenia tego typu związków, m.in. jodem-125, wykazano skuteczną interkalację, jednak efektywność generowania DSB była około 25% niższa niż w przypadku znakowanej ^{125}I jododeokurydyny. Akrydyny są związkami o niewielkiej masie cząsteczkowej, zatem duże znaczenie w skuteczności ich działania związane jest z miejscem przyłączenia radioaktywnego jodu, ponieważ stosunkowo duży atom może utrudniać interkalację, stąd ważne jest odpowiednie przeprowadzenie reakcji syntezy [71, 72].

CIS-PLATYNA

Cis-platyna to jeden z najważniejszych cytostatyków, składający się z kationu Pt^{2+} otoczonego dwoma atomami chloru i dwiema grupami aminowymi. Wiąże się ona z nicią DNA poprzez oddziaływanie z guaniną jednego łańcucha pomiędzy guaninami sąsiednich łańcuchów lub guaniną i innymi zasadami lub białkami.

Analizowano możliwość podstawienia nieradioaktywnego atomu platyny emiterami Augera $^{193\text{m}/195\text{m}}\text{Pt}$ oraz radionuklidem ^{191}Pt . Wykazano wyższą efektywność biologiczną w stosunku do $^{125}\text{I}[\text{IdUR}]$, $^{77}\text{Br}[\text{BrdUR}]$ oraz $^{125}\text{I}[\text{I-akrydyny}]$. Niestety, ograniczeniem tej metody była niska aktywność właściwa dostępnych radionuklidów platyny [73, 74]. Inne próby znakowania *cis*-platyny emiterem elektronów Augera polegały na zastąpieniu atomów chloru w kompleksie radionuklidem ^{125}I , jednak wyniki badań pokazały stosunkowo niską akumulację w guzie, przy jednocześnie wysokim gromadzeniu w wątrobie i śledzionie [75].

ANTRACYKLINY

Szeroką grupę leków przeciwnowotworowych stanowią antybiotyki z grupy antracyklin, spośród których najczęściej w terapii nowotworowej wykorzystywane są doksorubicyna i daunorubicyna. Badania krystalograficzne wykazały, że daunorubicyna i doksorubicyna tworzą interkalacyjne kompleksy z DNA, a miejscem oddziaływania są sekwencje 5'-GC-3', 5'-CG-3' [76]. Zdolność interkalacji do DNA antracyklin zainspirowała prace badawcze nad ich zastosowaniem w terapii elektronami Augera, które obejmowały m.in. znakowanie

pochodnych daunorubicyny ^{125}I . Zaobserwowano wysoką cytotoksyczność takiego radiobiokoniugatu, jednak istotnym ograniczeniem tej metody jest nasilenie skutków ubocznych w stosunku do nieznakowanej daunorubicyny przy zachowaniu takiej samej dawki antybiotyku [77]. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie liposomów jako nośników leku, a sama obecność emitera elektronów Augera w strukturze leku może przyczynić się do zmniejszenia wymaganej dawki antybiotyku i zredukowania licznych działań niepożądanych [78].

Jak wspomniano, wszystkie przedstawione powyżej związki interkalujące znakowane emiterni elektronów Augera działają silnie cytotoksycznie, nie są jednak specyficzne dla komórek nowotworowych. Poniżej przedstawiono wektory, które specyficznie naprowadzają emitery Augera, jednak bez zdolności interkalowania do DNA.

3.2. RADIOBIOKONIUGATY NIE INTERKALUJĄCE DO DNA

Jak zauważył Pouget i wsp. [79] w 2008 r. interkalacja do DNA biokoniugatu znakowanego emiterni elektronów Augera nie jest warunkiem koniecznym do zniszczenia komórki. Od tego czasu większość opublikowanych prac skupiała się na znalezieniu wektora, który selektywnie wiązałby się z receptorami na komórkach nowotworowych oraz miał zdolność do internalizacji i ewentualnie przejścia do jądra komórkowego. Takie własności mają niektóre małe molekuly z dużym dopasowaniem do receptora, peptydy oraz przeciwciała monoklonalne i ich fragmenty.

3.2.1. Małe cząsteczki biologicznie aktywne znakowane emiterni Augera

MIBG

Znakowana $^{123/125/131}\text{I}$ meta-jodo-benzylguanidyna (MIBG) jest wektorem stosowanym w przypadku guzów chromochłonnych, neuroblastomy (pozaczaskowych guzów litych) i rakowiaków. Wysoką selektywność wychwytu przez komórki nowotworowe osiąga się poprzez działanie transporterów noradrenaliny, przy jednocześnie relatywnie niskim wychwycie przez komórki zdrowe. MIBG znakowany emiterni β^- , czyli ^{131}I jest powszechnie stosowany w terapii neuroblastomy, jednak ze względu na wykorzystywanie emiterni β^- wykazuje niską skuteczność w terapii mikroprzerzutów, co zainspirowało wielu naukowców do badań MIBG znakowanego emiterni elektronów Augera $^{123,125}\text{I}$ [66, 80-82].

PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen)

Do chwili obecnej opracowano i przetestowano w badaniach przedklinicznych tylko dwa ligandy ukierunkowane na receptor PSMA znakowane emiterami elektronów Augera. W 2015 r. Kiess wraz ze współpracownikami [65] opracował i zbadał wysoce specyficzny małowcząsteczkowy radiobiokoniugat, znakowany ^{125}I ukierunkowany na PSMA, kwas 2-[3-[1-karboksy-5-(4- ^{125}I -jodo-benzoiloamino)-pentylo]-ureido]-pentanodiowy (^{125}I -DCIBzL). Badanie *in vitro* radiobiokoniugatu wykazało wysoce specyficzny wychwyty komórkowy i cytotoksyczność oraz skuteczność w indukcji uszkodzenia DNA i opóźnienia wzrostu guza u myszy z heteroprzeszczepami komórek nowotworu PSMA+. Potwierdzono także wysoką internalizację ^{125}I -DCIBzL do wnętrza komórki i oddziaływanie elektronów Augera w procesie mitozy komórki. Mechanizm ten szerzej opisano w pkt. 1.2.

W ostatnim czasie Müller i wsp. [30] badali w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* kompleks radionuklidu ^{161}Tb (emiter promieniowania β^- oraz elektronów Augera) z małą pochodną mocznika, peptydomimetykiem skoniugowanym z chelatorem DOTA, (PSMA-617). Zauważyli oni zwiększone działanie terapeutyczne ^{161}Tb w porównaniu do ^{177}Lu , który nie emituje elektronów Augera. Zgodnie z obliczeniami dozymetrycznymi, ^{161}Tb -PSMA-617 był do 3 razy bardziej skuteczny niż ^{177}Lu -PSMA-617. Badania *in vivo* pokazały, że ^{161}Tb -PSMA-617 wykazuje dużo lepsze działanie terapeutyczne w stosunku do pojedynczych komórek rakowych oraz drobnych przerzutów nowotworowych

STEROIDY

Celem molekularnym steroidów jest szeroka grupa receptorów steroidowych, w skład której wchodzi receptory estrogenowe (ER), progesteronowe (PR), androgenowe (AR) oraz glikokortykoidowy (GR). Związanie odpowiedniego ligandu z receptorem powoduje jego dimeryzację i zmiany konformacyjne, co prowadzi do ujawnienia sygnału NLS umożliwiającego internalizację do jądra, a następnie wbudowanie w strukturę DNA poprzez rozpoznanie specyficznych sekwencji. Nadekspresja receptorów estrogenowych ma miejsce na przykład w nowotworach piersi. Szczególnie interesujący wydaje się być wpływ receptorów androgenowych w przypadku potrójnie ujemnego nowotworu piersi (ER $^-$, PR $^-$ i HER2 $^-$). Wyniki badań klinicznych pokazują, że obecność AR powoduje zmniejszoną liczbę nawrotów, odległych przerzutów i zredukowanie śmiertelności [83]. Dotychczas badano skuteczność steroidów znakowanych ^{123}I , głównie estrogenu i potwierdzono generowanie jedno- i dwuniciowych uszkodzeń DNA [23, 84].

3.2.2. Pepetydy

ANALOGI SOMATOSTATYNY

Duże zainteresowanie analogami somatostatyny jest wynikiem występowania nadekspresji receptora somatostatyny typu 2 (SSTR2) na powierzchni komórek guzów neuroendokrynych. Możliwość zastosowania tych wektorów w terapii elektronami Augera związana jest z dużą specyficnością wiązania tych peptydów przez komórki nowotworowe oraz następującej po związaniu z receptorem ich internalizacji do wnętrza komórki i częściowego transportu radiobiokoniugatu do jądra komórkowego. Badano skuteczność terapii z wykorzystaniem radiofarmaceutyku ^{111}In -DTPA-Oktreotyd (OktreoscanTM) stosowanego powszechnie w diagnostyce nowotworów neuroendokrynych. Zaobserwowano dobrą korelację efektu cytotoksycznego ze stopniem ekspresji receptora, hamowanie tworzenia się mikroprzerzutów w modelu guza wątroby szczura oraz znacznego wydłużenia czasu ich przeżycia [85-87]. W innych badaniach zastąpiono ^{111}In radionuklidami $^{57/58\text{m}}\text{Co}$ i potwierdzono zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* wysoki wychwyty radiobiokoniugatu. Ponadto, stwierdzono większą efektywność terapii koniugatem $^{58\text{m}}\text{Co}$ -DOTATATE w porównaniu do tego samego peptydu znakowanego ^{111}In i ^{177}Lu [39].

BOMBEZYNA

Jest peptydem zbudowanym z 14 aminokwasów. Została pierwotnie wyizolowana ze skóry płaza kumaka nizinnego (*Bombina bombina*) z rodziny kumakowatych. Stwierdzono jej wysokie powinowactwo do receptorów uwalniających gastrynę α (GRP-r), nadekspresję których obserwuje się w raku prostaty i przerzutach do węzłów chłonnych. Bombezyina jest antagonistą receptora GRP-r nie internalizującym do wnętrza komórki. Aby spowodować internalizację, bombezyina została zmodyfikowana przez Tat (49-57), który jest peptydem pochodzącym z transaktywatora białka transkrypcyjnego wirusa HIV-1, mającego domenę translokacji błonowej i sekwencję odpowiadającą za lokalizację w jądrze. W badaniach komórkowych wykazano, że $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N₂S₂-Tat-(49-57)-Lys³-bombezyina jest wysoce internalizowana w jądrach komórek raka piersi i prostaty [88]. Badania te kontynuowano, wprowadzając bombezyinę modyfikowaną TAT oraz kompleks HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na nanocząstkach złota. Uzyskano multimodalny radiofarmaceutyk działający poprzez emisję elektronów Augera oraz hipertermię po naświetleniu laserem [89].

EKSENDYNA

Eksendyna, peptyd łączący się z receptorem glukopodobnego peptydu 1 (GLP-1) jest stosowany w terapii guzów neuroendokrynnych powstających z komórek trzustki. Badane były połączenia eksendyny z ^{111}In jako potencjalnego terapeutycznego, jednak podawanie w zwiększonych dawkach, powodowało znaczące uszkodzenie nerek, wynikające z mechanizmu biodystrybucji eksendyny, wykazującej wysoką kumulację w nerkach. Jest to istotny problem, który sprawia, że pochodne eksendyny nie mają obecnie zastosowania praktycznego [90].

3.2.3. Polipeptydy, przeciwciała monoklonalne i ich fragmenty

Szereg nowotworów charakteryzuje się występowaniem nadekspresji określonych receptorów na powierzchni błony komórkowej i związanym z tym agresywniejszym przebiegiem choroby. Do receptorów ulegających najczęstszej nadekspresji zalicza się:

- **receptor nabłonkowego czynnika wzrostu** (EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor), odpowiedzialny za proliferację komórek. Rodzina tych receptorów obejmuje również receptory HER1, HER2, HER3 i HER4,
- **receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego** (VEGFR - Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), biorący udział w tworzeniu naczyń krwionośnych,
- **receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1** (IGFR-1 - Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor), czyli receptor transbłonowy należący do dużej klasy receptorów kinazy tyrozynowej, który jest aktywowany przez hormon zwany insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 1 (IGF-1). [23,91-93].

Do powyższych receptorów zsyntetyzowano cząsteczki polipeptydów oraz białek (przeciwciała monoklonalne), które wiążą się z nimi wybiórczo. Analizowano działanie radiobiokoniugatów nakierowanych zarówno na EGFR, jak i VEGF, znakowanych głównie radionuklidem ^{111}In . W przypadku biokoniugatów nakierowanych na receptor EGFR (HER1) bardzo obiecujące wyniki uzyskano dla znakowanej ^{111}In cząsteczki hEGF. Jest to produkowany przez bakterie humanizowany polipeptyd o bardzo wysokim powinowactwie receptorowym. W prowadzonych badaniach komórkowych radiobiokoniugat ^{111}In -DTPA-hEGF został związany, zinternalizowany i przeniesiony do jądra komórek ludzkiego raka piersi MDA-MB-468, wykazujących nadekspresję receptora EGFR ($\sim 10^6$ EGFR/komórka), gdzie silnie hamował wzrost tych komórek [94]. Kolejne badania wykazały, że $>98\%$ komórek nie przeżyło po ekspozycji na ^{111}In -DTPA-hEGF. Potwierdzono także zależność efektów terapii od stopnia nadekspresji receptorów,

czasu inkubacji oraz aktywności właściwej związku. Nie stwierdzono toksyczności ^{111}In -DTPA-hEGF w stosunku do innych narządów, a także wpływu na skład krwi oraz funkcje wątroby i nerek [45,95-97]. Mimo iż wyniki te były obiecujące, w dalszych badaniach porównawczych na myszach, zauważono, że przeciwciało monoklonalne mAb anty-EGFR 528 znakowane ^{111}In wykazuje 10-krotnie większą akumulację w nowotworze - 21,6% ID/g, podczas gdy dla polipeptydu ^{111}In -DTPA-hEGF wynosiła ona tylko 2,2% ID/g. Wyższy wychwyty do guza przeciwciała ^{111}In -mAb 528 w porównaniu do ^{111}In -DTPA-hEGF sugeruje, że radioimmunoterapia nowotworów z receptorami EGFR przeciwciałami monoklonalnymi może być bardziej skuteczna niż celowana radioterapia oparta na wektorach peptydowych [98].

Nadekspresję receptorów HER2 obserwuje się w około 25% przypadkach raka piersi. Nadekspresja tych receptorów jest związana z bardziej agresywnym rozrostem raka piersi i gorszym rokowaniem u pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych.

Z drugiej strony występowanie receptora umożliwiło selektywne leczenie przeciwciałami monoklonalnymi, takimi jak trastuzumab, pertuzumab oraz immunokoniugat: przeciwciało-lek (ADC) składający się z trastuzumabu i emtansyny [99]. Stwierdzono, że trastuzumab promuje internalizację receptora HER2, który jest jednym z proponowanych mechanizmów działania leku [100]. Niestety już w ciągu roku u prawie wszystkich pacjentek z przerzutowym rakiem piersi HER2+ rozwijała się oporność na lek, dlatego można spodziewać się, że radioimmunoterapia może być jedną z kilku szans, która poprawi odpowiedź na leczenie trastuzumabem i przezwyciężyć oporność na lek.

Obok licznych badań *in vitro* i *in vivo*, w tym klinicznych z trastuzumabem znakowanym emiterami β^- oraz α prowadzono także badania możliwości zastosowania emiterów elektronów Augera do terapii drobnych przerzutów nowotworowych raka piersi i jajnika. Badania dotyczyły radiobiokoniugatów znakowanych ^{111}In i ^{67}Ga [75], w których większy wychwyty zaobserwowano dla radiobiokoniugatu znakowanego ^{67}Ga , nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w internalizowanych dawkach badanych związków. Dla obydwu radiobiokoniugatów zauważono spadek przeżywalności komórek, przy czym dla tych samych dawek aktywności większa była cytotoksyczność koniugatów znakowanych ^{67}Ga niż ^{111}In [42]. Autorzy wiążą większą cytotoksyczność ^{67}Ga w stosunku do ^{111}In różnym rozkładem energii emitowanych elektronów. W przypadku ^{111}In przeważająca emisja elektronów o krótkim, nanometrowym zasięgu w wyniku czego, cytotoksyczność może nastąpić tylko przy lokalizacji wewnątrz jądra komórkowego.

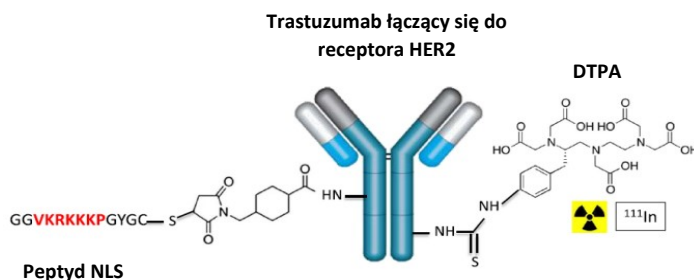
Innym przeciwciałem monoklonalnym badanym pod kątem zastosowania w terapii Augera jest internalizujący mAb-425 znakowany ^{125}I stosowany w terapii

gwiazdziaaka aplastycznego, którego progresja prowadzi bezpośrednio do glejaka wielopostaciowego. Obiecujące wyniki badań *in vitro* oraz *in vivo* przyczyniły się do wprowadzenia leku w II fazę badań klinicznych - analizując działanie leku na grupie 80 pacjentów zaobserwowano wydłużenie czasu przeżycia i brak efektów niepożądanych [64].

Prowadzone badania radiobiokoniugatów opartych na przeciwciałach monoklonalnych wykazały ich dużą akumulację w komórkach nowotworowych oraz internalizację badanych radiobiokoniugatów. Nie stwierdzono jednak ich wnikania do wnętrza jądra komórkowego, co jest warunkiem bardziej skutecznej terapii.

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE SKONIUGOWANE Z PEPTYDAMI TRANSLOKACJI JĄDROWEJ (NLS) W TERAPII ELEKTRONAMI AUGERA

Ponieważ cytotoksyczne działanie elektronów Augera jest zależne od ich lokalizacji w pobliżu jądrowego DNA podczas transportu mAb do jądra komórkowego wykorzystano ostatnio otrzymane i zbadane peptydy translokacji jądrowej (NLS). [88–90]. Te 13-merowe peptydy (CGYGPKKRKVGG) zawierają NLS SV-40, duży antygen T (podkreślony), który uczestniczy w transporcie mAb przez błonę jądrową (rys. 9) [101, 102].



Rysunek 9. Internalizujący do jądra radiobiokoniugat zawierający ^{111}In -trastuzumab oraz peptyd translokacji jądrowej (NLS)

Figure 9. Nuclear internalizing radiobioconjugate containing ^{111}In -trastuzumab and a nuclear translocation peptide (NLS)

Przeprowadzono badania cytotoksyczności radiobiokoniugatu ^{111}In -VEGF, które zawierały i nie zawierały odpowiednio peptydu NLS. Dla ^{111}In -DTPA-VEGF-2K-NLS wykazano większą internalizację do jądra komórkowego niż dla analogicznego związku bez NLS. Następstwem tego była zwiększona cytotoksyczność tego związku, będąca skutkiem wygenerowania dwuniciowych

uszkodzeń DNA [103]. Ze względu na bardzo małe rozmiary nowotworów z nadekspresją VEGFR elektrony Augera wykazują większą skuteczność niż tradycyjnie stosowane w terapii radiobiokoniugaty znakowane emiterami β^- .

W porównawczym badaniu działania radiobiokoniugatów ^{111}In -NLS-Numotuzumab i ^{111}In -Numotuzumab na komórki oporne na leczenie trastuzumabem nowotworu piersi z nadekspresją receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR), zaobserwowano wyższy wychwyty związku zawierającego NLS w stosunku do radiobiokoniugatu bez tego peptydu. Wykazano również wpływ ilości receptora EGFR na komórce na wydajność internalizacji, sugerując jego pośredniczącą rolę w tym procesie. Analizując rozkład radiofarmaceutyku w poszczególnych strukturach komórkowych zauważono, że największe jego stężenie w obydwu przypadkach występuje na błonie komórkowej. Jednak w przypadku biokoniugatu z NLS wykazano znacznie większą zawartość związku w jądrze i związaną z tym większą liczbę dwuniciowych uszkodzeń DNA, jak również jego szybszą eliminację z krwi [65].

W badaniach radiobiokoniugatów trastuzumabu znakowanego ^{111}In również stwierdzono istotny wpływ obecności peptydu NLS w strukturze związku na stopień internalizacji do jądra komórkowego i cytotoksyczność w stosunku do opornych na działanie trastuzumabu komórek nowotworowych (Rys. 6) [60, 104]. Radiobiokoniugat ^{111}In trastuzumab-NLS był 5-razy bardziej cytotoksyczny (cytotoksyczność $>90\%$) na komórki ludzkiego raka piersi SK-BR-3 z nadekspresją HER2 (10^6 receptorów/komórkę) niż ^{111}In -trastuzumab bez NLS, podczas gdy nieznakowany trastuzumab zmniejszył przeżycie tych komórek tylko 1,5-krotnie. Ponadto zauważono, że ^{111}In -trastuzumab-NLS wykazuje cytotoksyczność w stosunku do ludzkich komórek raka piersi TrR1 opornych na trastuzumab mimo dużej ekspresji receptora HER2 [105]. Wyniki te sugerują, że celowana terapia elektronami Augera może pokonać oporność nowotworów HER2+ raka piersi na trastuzumab.

3.3. RADIOBIOKONIUGATY OPARTE NA NANOSTRUKTURALNYCH PLATFORMACH

Pomimo zachęcających wyników uzyskanych dla przeciwciał monoklonalnych znakowanych emiterami elektronów Augera istotnym ograniczeniem była niska aktywność właściwa radiobiokoniugatów. Wynosiła ona w przypadku ^{111}In -trastuzumab 0,24 MBq/ μg co wskazywało, że tylko 1 na 50 cząsteczek trastuzumabu była wyznakowana ^{111}In . Powodowało to, że wysoki odsetek receptorów HER2 w raku piersi oddziaływał z nieradioaktywnym koniugatem, znacznie ograniczając działanie cytotoksyczne. Aby zwiększyć aktywność właściwą radiobiokoniugatów przyłączono do trastuzumabu polimer skoniugowany

z dużą ilością ligandu DTPA kompleksującego ^{111}In . Polimer składał się ze szkieletu poliglutamidowego z 24 lub 29 bocznymi grupami DTPA i był zmodyfikowany lub nie peptydem NLS [106]. Aktywność właściwa radiobiokoniugatów wzrosła 90-krotnie, co powodowało, że liczba pęknięć podwójnieniowych DNA w komórkach SK-BR-3 zwiększyła się 6-krotnie a cytotoksyczność przekraczała 98%, natomiast radiobiokoniugat o niskiej aktywności właściwej ^{111}In -trastuzumab zmniejszał przeżycie komórek tylko 3-krotnie. Zwiększoną cytotoksyczność w stosunku do komórek HER2+ raka piersi zaobserwowano dla trastuzumabu związanego z poliamidoaminą (PAMAM), dendrymerem funkcjonalizowanym wieloma ligandami DTPA [48] oraz dla miceli w kopolimerze blokowym (BCM) zmodyfikowanym fragmentami trastuzumabu oraz peptydem NLS [107,148]. Radiobiokoniugat ^{111}In -BCM-trastuzumab-NLS wiązał się specyficznie z receptorem HER2 raka piersi i przechodził do jądra komórkowego, selektywnie niszcząc komórki SK-BR-3 i MDA-MB-361 z nadekspresją receptorów HER2.

W dalszych badaniach wykorzystano nanocząstki złota jako platformy dla ^{111}In . Do nanocząstek złota przyłączono cząsteczki ligandów DTPA oraz trastuzumab, co pozwoliło znacznie zwiększyć aktywność właściwą radiobiokoniugatu. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że ^{111}In -AuNP-trastuzumab został selektywnie związany przez HER2 komórki raka piersi, zinternalizowany i ulokowany w przestrzeni okołojądrowej. Emisja elektronów Augera powodowała nieodwracalne podwójnie-niciowe rozerwanie DNA, co znacznie obniżyło przeżywalność komórek. W badaniach *in vivo* na modelu mysim zaobserwowano zahamowanie wzrostu guza u myszy z podskórnymi wszczepionymi klastrami komórek nowotworowych z receptorami HER2 bez widocznej toksyczności w stosunku do innych organów [47]. W innej pracy Song i wsp. [46] badali znakowany ^{111}In radiobiokoniugat nanocząstek złota z przeciwciałem EGR. Przeciwciało przyłączono do powierzchni złota bezpośrednio poprzez mostek dwusiarczkowy. Stwierdzono internalizację radiobiokoniugatu na poziomie 15% do wnętrza komórek MDA-MB-468, przy czym mała część radiobiokoniugatu zlokalizowała się w jądrze komórkowym. Zdolność do internalizacji rosła wraz z liczbą przeciwciał przyłączonych do nanocząstki złota i najlepsze wyniki uzyskano dla stosunku molowego przeciwciało:nanocząstka równego 160. W badaniach cytotoksyczności stwierdzono prawie liniową korelację pomiędzy internalizacją a cytotoksycznością zsyntezowanych koniugatów.

UWAGI KOŃCOWE

Emitory elektronów Augera dzięki swojej unikalnej charakterystyce stanowią idealną grupę radionuklidów mogących znaleźć zastosowanie w celowanej radioterapii

ukierunkowanej na leczenie małych zmian nowotworowych, mikroprzerzutów czy pojedynczych komórek rakowych. Jednakże, ze względu na krótki zasięg elektronów Augera konieczne jest ukierunkowanie radiobiokoniugatów w bezpośrednie sąsiedztwo celu molekularnego, którego zniszczenie ma zapoczątkować apoptozę komórki. Elektrony Augera są szczególnie zabójcze dla komórek rakowych, gdy są emitowane wewnątrz jądra komórkowego, a zwłaszcza jeśli emiter elektronów Augera włącza się bezpośrednio do DNA (np. ^{125}I -IUdR). Jednak najlepsze efekty terapeutyczne można osiągnąć poprzez sprzężanie internalizujących przeciwciał monoklonalnych z peptydami transportu jądrowego (NLS) np. ^{111}In -NLS-trastuzumab. Przeciwciało monoklonalne zapewnia selektywne dostarczenie radiobiokoniugatu do wnętrza komórki nowotworowej, a peptyd NLS odpowiada za jego lokalizację w jądrze.

Dotychczas przeprowadzono kilka badań klinicznych związanych z zastosowaniem elektronów Augera w terapii przeciwnowotworowej. Badano radiobiokoniugaty ^{125}I -IUdR, ^{111}In -DTPA-oktreotyd i ^{125}I -mAb425, dla których osiągnięto remisję guza lub wydłużenie czasu przeżycia pacjentów. Ostatnie osiągnięcia biologii molekularnej w syntezie biomolekuł ukierunkowanych na komórki rakowe, szczególnie humanizowanych i w pełni ludzkich, mAb stwarza możliwości zaprojektowania nowatorskiej radioterapii opartej na emiterach elektronów Augera. Także synteza radiobiokoniugatów opartych na radionuklidach emitujących większą liczbę elektronów Augera i elektronów konwersji niż dotychczas stosowane ^{125}I i ^{111}In powinna poprawić skuteczność terapii. Za 5 lat przypada setna rocznica publikacji Pierre'a Augera o odkryciu elektronów noszących jego imię ale z całą pewnością, nie przewidywał on możliwości ich zastosowania do skutecznego leczenia raka za pomocą terapii celowanej.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy dziękują za wsparcie finansowe w ramach grantu OPUS Narodowego Centrum Nauki nr rejestracyjny 2019/35/B/ST4/01433. Mgr inż. Kamil Wawrowicz dziękuje za wsparcie finansowe w ramach projektu nr POWR.03.02.00-00-I009/17-00 (Projekt operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego przez Europejski Fundusz Społeczny).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, CA. Cancer J. Clin., 2018, **68**, 394.
- [2] A. Świeboda-Sadlej, Chir. Pol., 2011, **13**, 59.
- [3] World Health Organization, Technical Report 492, Genewa. 1972.
- [4] G. Kramer-Marek J. Capala, Tumor Biol., 2012, **33**, 629.
- [5] O. Desouky, N. Ding, G. Zhou, J. Radiat. Res. Appl. Sci., 2015, **8**, 247.
- [6] P. Wardman, Br. J. Radiol., 2009, **82**, 89.
- [7] M.V. Sokolov, J.S. Dickey, W.M. Bonner, O.A. Sedelnikova, Cell cycle, 2007, **6**, 2210.

- [8] C. Kratochwil et al., *J. Nucl. Med.*, 2016, **57**, 1941.
- [9] A.I. Kassis, *J. Nucl. Med.*, 2003, **44**, 1479.
- [10] F. Buchegger, F. Perillo-Adamer, Y.M. Dupertuis, A. Bischof Delaloye, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2006, **33**, 1352.
- [11] A. Ku, V.J. Facca, Z. Cai, R. M. Reilly, *EJNMMI Radiopharm. Chem.*, 2019, **4**, 1.
- [12] H. Lundqvist, B. Stenerlöv, L. Gedda, *Targeted Radionuclide Tumor Therapy*, Springer, 2008.
- [13] H. Albar, in *Use of Gamma Radiation Techniques in Peaceful Applications*, 2019.
- [14] S.M. Larson, J.A. Carrasquillo, N.K.V. Cheung, O.W. Press, *Nat. Rev. Cancer*, 2015, **15**, 347.
- [15] V.A. Shepherd, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2006, **75**, 171.
- [16] D.S. Chang, F.D. Lasley, I.J. Das, M.S. Mendonca, J.R. Dynlacht, *Basic Radiotherapy Physics Biology*, Springer, 2014.
- [17] W. Graboń, D. Otto-słusarczyk, A. Barańczyk-kuźma, *Postepy Med. Hig. Dosw. (Online)*, 2018, **72**, 481.
- [18] A.I. Kassis S.J. Adelstein, *J. Nucl. Med.*, 2005, **46**, 1.
- [19] S. Aghevlian, A.J. Boyle, R.M. Reilly, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, **109**, 102.
- [20] J.P. Pouget, C. Lozza, E. Deshayes, V. Boudousq, I. Navarro-Teulon, *Front. Med.*, 2015, **2**, 12.
- [21] A. Stepień, M. Izdebska, A. Grzanka, *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, 2007, **61**, 420.
- [22] Z. Cai et al., *Nucl. Med. Biol.*, 2016, **43**, 818.
- [23] B. Cornelissen K. A Vallis, *Curr. Drug Discov. Technol.*, 2010, **7**, 263.
- [24] B.J. Hicke et al., *J. Nucl. Med.*, 2006, **47**, 668.
- [25] A.P. Kiess et al., *J. Nucl. Med.*, 2015, **56**, 1401.
- [26] L.Y. Xue, N. J. Butler, G. M. Makrigrigorgos, S. J. Adelstein, A. I. Kassis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 13765.
- [27] H.A. Sawal, K. Asghar, M. Bureik, N. Jalal, *Onco. Targets. Ther.*, 2017, **10**, 3925.
- [28] M. Wideł, W. Przybyszewski, *J. Rzeszowska-wolny, Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, 2009, **63**, 377.
- [29] A.B. Heeran, H.P. Berrigan, J. O'Sullivan, *Radiat. Res.*, 2019, **192**, 668.
- [30] C. Müller et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2019, **46**, 1919.
- [31] M.C. Cantone C. Hoeschen, *Radiation Physics for Nuclear*, SPRINGER, 2011.
- [32] S.M. Qaim, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2015, **305**, 233.
- [33] J. Fonslet et al., *Phys. Med. Biol.*, 2018, **63**, 1.
- [34] E. Aluicio-Sarduy et al., *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 1.
- [35] M.S. Uddin, B. Scholten, A. Hermanne, S. Sudár, H.H. Coenen, S.M. Qaim, *Appl. Radiat. Isot.*, 2010, **68**, 2001.
- [36] A. Hyatt, *Advancing nuclear medicine through innovation - National Research Council Institute of Medicine of the National Academies* The National Academies Press, Joseph Henry Press; 2009.*
- [37] A.S. Sobolev, *Front. Pharmacol.*, 2018, **9**, 1.
- [38] A.-M. Chacko, J. Mikitsh, X. Ye, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2013, **56**, 239.
- [39] H. Thisgaard, B.B. Olsen, J.H. Dam, P. Bollen, J. Mollenhauer, P.F. Høilund-Carlson, *J. Nucl. Med.*, 2014, **55**, 1311.
- [40] V. Izquierdo-Sánchez et al., *Molecules*, 2018, **23**, 1.
- [41] E. Koumariou et al., *Nucl. Med. Biol.*, 2014, **41**, 441.
- [42] M.F. bin Othman et al., *Nucl. Med. Biol.*, 2020, **80**, 57.
- [43] M.F. bin Othman, N.R. Mitry, V.J. Lewington, P.J. Blower, S.Y.A. Terry, *Nucl. Med. Biol.*, 2017, **46**, 12.
- [44] J. Kotzerke et al., *PLoS One*, 2014, **9**, 8.
- [45] C. Chan, H. Fonge, K. Lam, R.M. Reilly, *Nucl. Med. Biol.*, 2020, **80**, 37.
- [46] L. Song, N. Falzone, K.A. Vallis, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2016, **92**, 716.

- [47] Z. Cai et al., *Nucl. Med. Biol.*, 2016, **43**, 818.
- [48] C. Chan, Z. Cai, R. M. Reilly, *Pharm. Res.*, 2013, **30**, 1999.
- [49] S. Aghevlian, Y. Lu, M.A. Winnik, D.W. Hedley, R.M. Reilly, *Mol. Pharm.*, 2018, **15**, 1150.
- [50] K.A. Vallis et al., *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2014, **4**, 181. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24753984> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3992211>.
- [51] M.R. Gill et al., *Nanoscale*, 2018, **10**, 10596.
- [52] G.S. Limouris et al., *Clin. Nucl. Med.*, 2016, **41**, 194.
- [53] A.A. Rosenkranz et al., *Front. Pharmacol.*, 2018, **9**, 1.
- [54] T.S. Karyagina et al., *Front. Pharmacol.*, 2020, **11**, 1.
- [55] C. Gao, J.V. Leyton, A.D. Schimmer, M. Minden, R.M. Reilly, *Appl. Radiat. Isot.*, 2016, **110**, 1.
- [56] T.A. Slastnikova et al., *Int. J. Nanomedicine*, 2017, **12**, 395.
- [57] E.J. Razumienko, J.C. Chen, Z. Cai, C. Chan, R.M. Reilly, *J. Nucl. Med.*, 2016, **57**, 444.
- [58] H.K. Li et al., *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2015, **30**, 349.
- [59] C. Panosa et al., *Nucl. Med. Biol.*, 2015, **42**, 931.
- [60] G. Ngo Ndjock Mbong et al., *Mol. Pharm.*, 2015, **12**, 1951.
- [61] A. Zereshkian, J.V. Leyton, Z. Cai, D. Bergstrom, M. Weinfeld, R.M. Reilly, *Nucl. Med. Biol.*, 2014, **41**, 377.
- [62] N. Pit-Taskar et al., *J. Nucl. Med.*, 2019, **60**, 12.
- [63] J.A. Violet, G. Farrugia, C. Skene, J. White, P. Lobachevsky, R. Martin, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2016, **92**, 707.
- [64] J.H. Kim et al., *J. Radiat. Oncol.*, 2013, **2**, 7.
- [65] A. Kies, *J. Nucl. Med.*, 2015, **59**, 401.
- [66] H. Lee et al., *J. Nucl. Med.*, 2019.
- [67] C.J. Shen et al., *Theranostics*, 2020, **10**, 2888.
- [68] S.J. Adelstein, A.I. Kassis, L. Bodei, G. Mariani, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2003, **18**, 301.
- [69] H. Thisgaard et al., *Theranostics*, 2016, **6**, 2278.
- [70] M.R. Jackson et al., *Cancer Res.*, 2019, **79**, 4627.
- [71] K. Onizuka et al., *Nucleic Acids Res.*, 2019, **47**, 6578.
- [72] S.K. Sahu, Z.P. Kortylewicz, J. Baranowska-Kortylewicz, R.A. Taube, S.J. Adelstein, A.I. Kassis, *Radiat. Res.*, 1997, **147**, 401.
- [73] M. Crul, R.C.A.M. van Waardenburg, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, *Cancer Treat. Rev.*, 2002, **28**, 291.
- [74] R.W. Howell et al., *Radiat. Res.*, 1994, **140**, 55.
- [75] P. Garnuszek I. Licińska, *Nucl. Med. Rev.*, 2002, **5**, 145.
- [76] J. B. Chaires, J.E. Herrera, M.J. Waring, *Biochemistry*, 1990, **29**, 6145.
- [77] L. M. Ickenstein, K. Edwards, S. Sjöberg, J. Carlsson, L. Gedda, *Nucl. Med. Biol.*, 2006, **33**, 773.
- [78] A. Fondell, K. Edwards, L.M. Ickenstein, S. Sjöberg, J. Carlsson, L. Gedda, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2010, **37**, 114.
- [79] J.-P. Pouget et al., *Radiat. Res.*, 2008, **170**, 192.
- [80] A. Shinohara et al., *Ann. Nucl. Med.*, 2018, **32**, 114.
- [81] W.H.Y. Roa et al., *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2013, **12**, 79.
- [82] Z.P. Kortylewicz, D.W. Coulter, G. Han, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2020.
- [83] M.C. Louie M.B. Sevigny, *Am. J. Cancer Res.*, 7, 8, 1617–1636, 2017.
- [84] T. Fischer, K. Schomäcker, H. Schicha, *Int. J. Radiat. Biol.*, 84, 12, 1112–1122, 2008.
- [85] L. Giovanella, *Nuclear Medicine Therapy: Side Effects Complications*. Springer, 2019.

- [86] A. Capello, E. Krenning, B. Bernard, J.C. Reubi, W. Breeman, M. De Jong, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2005, **32**, 1288.
- [87] A. Capello, E. Krenning, W. Breeman, B. Bernard, M. de Jong, *J. Nucl. Med.*, 2003, **44**, 98.
- [88] C. Santos-Cuevas et al., *Int. J. Pharm.*, 2009, **375**, 75.
- [89] N. Jiménez-Mancilla et al., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2013, **56**, 663.
- [90] T.J.P. Jansen et al., *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2019, **62**, 656.
- [91] P.S. Marek Z. Wojtukiewicz, E. Sierko, *Onkol. w Prakt. Klin. Via Medica*, 2010, **6**, 217.
- [92] A.M.U. Pudelko, R. Partyka, I. Jałowicka, M. Żerdziński, *Ann. Acad. Med. Siles.*, 2014, **68**, 457.
- [93] L. Laviola, A. Natalicchio, F. Giorgino, *Curr. Pharm. Des.*, 2007, **13**, 663.
- [94] R.M. Reilly et al., *J. Nucl. Med.*, 2000, **41**, 429.
- [95] Z. Cai, Z. Chen, K.E. Bailey, D.A. Scollard, R.M. Reilly, K.A. Vallis, *J. Nucl. Med.*, 2008, **49**, 1353.
- [96] K.E. Bailey et al., *J. Nucl. Med.*, 2007, **48**, 1562.
- [97] R.M. Reilly, P. Chen, J. Wang, D. Scollard, R. Cameron, K.A. Vallis, *J. Nucl. Med.*, 2006, **47**, 1023.
- [98] S. Aghevlian, A.J. Boyle, R.M. Reilly, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, **109**, 102.
- [99] C.L. Arteaga, M.X. Sliwkowski, C.K. Osborne, E.A. Perez, F. Puglisi, L. Gianni, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2012, **9**, 16.
- [100] J. Baselga, J. Albanell, *Ann. Oncol.*, 2001, **12**, 35.
- [101] D.L. Costantini, M. Hu, R.M. Reilly, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2008, **23**, 3.
- [102] D.L. Costantini, C. Chan, Z. Cai, K. A. Vallis, R. M. Reilly, *J. Nucl. Med.*, 2007, **48**, 1357.
- [103] C. Chan, Z. Cai, R. Su, R.M. Reilly, *Nucl. Med. Biol.*, 2010, **37**, 105.
- [104] D.L. Costantini, K. Bateman, K. McLarty, K. A. Vallis, R.M. Reilly, *J. Nucl. Med.*, 2008, **49**, 1498.
- [105] J.M. Du Manoir et al., *Clin. Cancer Res.*, 2006, **12**, 904.
- [106] Y. Lu et al., *Biomacromolecules*, 2014, **15**, 2027.
- [107] B. Hoang, R.M. Reilly, C. Allen, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 455.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 lipca 2020 r.