

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY  
Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ**



**Opracowanie multimodalnej sondy  
molekularnej do obrazowania receptora  
końcowych produktów zaawansowanej glikacji  
(RAGE)**

---

Rozprawa Doktorska

**Marcin Woźniak**

Promotor:

Prof. dr hab. Leszek Kalinowski

Promotor pomocniczy:

Prof. Lawrence W. Dobrucki

Praca wykonana w:

Katedrze Analityki Klinicznej, Zakładzie Medycznej  
Diagnostyki Laboratoryjnej - Biobank, Gdańsk Uniwersytet

Medyczny

i

Experimental Molecular Imaging Laboratories  
Beckman Institute for Advanced Science and Technology,  
University of Illinois, Urbana-Champaign, IL, USA

Gdańsk 2018

## STRESZCZENIE

Obrazowanie molekularne i specyficzne sondy molekularne stanowią potężne narzędzie służące do badania powiązań między skomplikowanymi procesami biologicznymi, zarówno w wymiarze przestrzennym jak i czasowym - dając jednocześnie możliwość dokładnej diagnostyki i prowadzenia ukierunkowanej terapii farmakologicznej np. w odniesieniu do procesu nadmiernej glikacji białek i patofizjologicznego znaczenia receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji (*receptor for advanced glycation end-products*, RAGE). Receptor RAGE jest wieloligandowym, transbłonowym białkiem należącym do nadrodziny immunoglobulin. W warunkach homeostazy ekspresja RAGE znajduje się na niskim poziomie jednak w wielu stanach patologicznych podlega znacznej indukcji, co ma miejsce między innymi w chorobie tętnic obwodowych (*peripheral artery disease*, PAD).

Wzrost zainteresowania technikami obrazowania, a tym samym ich intensywny rozwój, dostarcza zupełnie nowych możliwości diagnostycznych, dlatego celem niniejszej rozprawy doktorskiej była konstrukcja multimodalnej sondy molekularnej (*Multimodal Imaging Agent*; MMIA) opartej o strukturę chemiczną dendrymeru, sprzęgniętego z ligandem specyficznym dla RAGE – ludzką albuminą (*human serum albumin*, HSA) zmodyfikowaną N(6)-Karboksymetylolizyną (*carboxymethyllysine*, CML), umożliwiając obrazowanie receptora RAGE przy użyciu zarówno hybrydowych technik radioizotopowych jak i optycznych.

Strukturę uzyskanego produktu scharakteryzowano przy pomocy Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Określenie wydajności i komórkowej specyficzności sondy charakterystycznej dla RAGE (MMIA-CML) w stosunku do znacznika kontrolnego (MMIA-HSA), wykonano w oparciu o linię komórkową ludzkiego śródbłonna naczyniowego płodowej żyły pępowinowej z indukowaną nadekspresją RAGE. Dalszą optymalizację obejmującą badania *in vivo* z wykorzystaniem obrazowania PET-CT określającą kinetykę, biodystrybucję i specyficzność MMIA-CML i MMIA-HSA przeprowadzono w mysim modelu choroby naczyń obwodowych (niedokrwienia tylnej kończyny).

Określono wysoką komórkową specyficznością MMIA-CML, a wyliczona stała wiązania wyniosła 340 nM. MMIA-CML wykazał zadowalającą biodystrybucję oraz 3,4-krotnie zwiększoną retencję w niedokrwionej kończynie w stosunku do MMIA-HSA. Zaprezentowane wyniki wskazują na wzrost ekspresji RAGE

w niedokrwionej kończynie i umożliwiają wykorzystanie multimodalnego znacznika do obrazowania receptorów RAGE zarówno w modelach eksperymentalnych *in vitro* jak i *in vivo*, pozwalając na analizę zmian strukturalnych i funkcjonalnych w sposób nieinwazyjny.

## ABSTRACT

Molecular Imaging and specific molecular probes are a powerful tool for studying the links between complex biological processes, both spatial and temporal - while giving the opportunity to accurately diagnose and conduct targeted pharmacotherapy, eg. in relation to the process of extended glycation of proteins and the pathophysiological significance of the receptor advanced glycation end-products (RAGE). The RAGE receptor is a multiligand, transmembrane protein belonging to the immunoglobulin superfamily. In homeostasis, RAGE expression is at a low level, but in many pathologies it is significantly upregulated, e.g. in peripheral artery disease (PAD).

The increase interest in imaging techniques, and their intensive development, provides new diagnostic possibilities, therefore the purpose of this dissertation was to develop a Multimodal Imaging Agent (MMIA) based on the chemical structure of dendrimer, conjugated with a RAGE-specific ligand - human albumin (HSA) modified with N (6)-carboxymethyllysine (CML), enabling RAGE receptor imaging using both radioisotope and optical techniques.

MMIA structure was characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Cellular binding evaluation of the RAGE targeted (MMIA-CML) and non-targeted probe (MMIA- HSA) was performed on the human umbilical vein endothelial cells with RAGE overexpression. Further optimization including *in vivo* studies using PET-CT imaging determining the kinetics, biodistribution and specificity of MMIA-CML and MMIA-HSA was performed in a murine model of peripheral vascular disease (hind limb ischemia).

RAGE target probe demonstrated high cellular specificity, calculated binding constant was 340 nM. MMIA-CML showed satisfactory biodistribution and a 3.4 times increased uptake in ischemic hindlimb than the non-targeted probe. Presented results indicate increased expression of RAGE in the ischemic hindlimb and enable the use of MMIA- CML in both *in vitro* and *in vivo* experimental models, giving the feasibility for structural and functional changes analysis with a molecularly RAGE targeted tracer non-invasively.