

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
TÄPPIS- JA NANOMEDITSIINI LABORATOORIUM

**Proteolüütiliselt aktiveeritud kasvajaspetsiifiliste peptiidide identifitseerimine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Kristina Rabi

Juhendajad  
professor Tambet Teesalu, PhD  
professor Juhan Sedman, Biol. knd

TARTU 2024

## **„Proteolüütiliselt aktiveeritud kasvajaspetsiifiliste peptiidide identifitseerimine“**

Paljudel vähiravimitel puudub selektiivsus kasvajate suhtes ja need tekitavad kõrvaltoimeid normaalsetes kudedes. Kasvajaspetsiifilised peptiidid suurendavad vähiravimitega keemiliselt konjugeerituna ravimite akumulatsiooni kasvajakudedes ja võimendavad seeläbi ravimite kasvjavastast aktiivust. Mõningate kasvajaspetsiifiliste peptiidide (näiteks peptiidi PL3) puhul põhjustab nende C-terminaalne neuropiliiniga seonduv järjestus (CendR-element) akumulatsiooni normaalsetes kudedes, eeskätt kopsus. Üheks võimaluseks selliste peptiidide koedistributsiooni ja kasvajaselektiivsust parandada on maskeerida peptiidi CendR-element C-terminaalse jätkujärjestusega, mis on substraadiks kasvajas üleekspresseeritud proteaasidele. Käesolevas bakalaureusetöös viidi läbi faagidisplei sõeluuring leidmaks kasvajates üleekspresseeritud proteaasiga urokinaasi-tüüpi plasminogeeni aktivaatori (uPA-ga) aktiveeritud CendR-peptiide. Töö tulemusena leiti uudne paranenud kasvajaselektiivsusega PL3-peptiidist tuletatud peptiid.

**Märksõnad:** proteaas, faagidisplei, kullerpeptiidid, neuropiliin-1, tenastiin-c

**CERCS kood:** B200 Tsütoloogia, onkoloogia, kantseroloogia

## **„Identification of proteolytically activated tumor-homing peptides“**

Many cancer drugs lack selectivity and cause side effects in normal tissues. Tumor-homing peptides conjugated with anticancer drugs increase drug accumulation in tumor tissues and thereby enhance the antitumoral activity of drugs. In some tumor-homing peptides, such as PL3, the C-terminal sequence binding to neuropilin-1 (CendR element) causes their accumulation in normal tissues, especially in the lungs. One approach to improve the tissue distribution and tumor selectivity of those peptides is to mask the CendR element of the peptide with a C-terminal extension sequence, which would serve as a substrate for overexpressed proteases in the tumor. As a part of this bachelor's thesis, phage display screens were conducted to find CendR peptides activated by the tumor-specific protease urokinase-type plasminogen activator (uPA). A novel tumor-homing peptide derived from the PL3 peptide with reduced off-target accumulation was identified.

**Keywords:** protease, phage display, homing peptides, neuropilin-1, tenascin-c

**CERCS code:** B200 Cytology, oncology, cancerology

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	5
1.1 Veresoonte postiindeksid ja kullerpeptiidid.....	5
1.2 Faagidisplei meetod.....	6
1.3 Vähkipenetreerivad peptiidid ja CendR-element.....	8
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	9
2.1 Töö eesmärgid .....	9
2.2 Materjal ja meetodika.....	10
2.2.1 Peptiid-faagiraamatukogu amplifitseerimine ja puhastamine.....	10
2.2.2 Faagi tiirimine.....	12
2.2.3 Faagi amplifitseerimine tassidel.....	12
2.2.4 Faagi raamatukogu eeltötlus uPA-ga .....	13
2.2.5 Rakuvaba faagidisplei .....	13
2.2.6 Faagide klonereerimine .....	14
2.2.7 Individuaalsete faagi kloonide seondumiskatse magnetkerakestel .....	16
2.2.8 Loomkatsed .....	17
2.2.9 Ion Torrent sekveneerimine ja andmeanalüüs .....	19
2.3 Tulemused ja arutelu.....	19
2.3.1 Rakuvaba faagidisplei PL3-X4 faagiraamatukoguga.....	20
2.3.2 Kandidaatpeptiidide seondumine NRP-1 b1- ja TNC-C-valguga.....	22
2.3.3 <i>In vivo</i> faagidisplei .....	24
KOKKUVÕTE .....	27
SUMMARY .....	28
KASUTATUD KIRJANDUS .....	29
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	35
LISAD .....	36
LIHTLITSENTS.....	86

## KASUTATUD LÜHENDID

BSA – veise seerumalbumiin (*Bovine serum albumin*)

CendR – C-terminaalse otsa reegel (ingl k *C-end Rule*)

HTS – suure läbilaskevõimega sekveneerimine (*high-throughput sequencing*)

LB – Luria-Bertani

MQ – Milli-Q deioniseeritud vesi

Ni-NTA – nikkel-nitriilotriäädikhape (*Nickel-Nitriloacetic acid*)

NRP-1 – neuropiliin-1 (*neuropilin-1*)

PEG – Polüetüleenglükool

PSMA- eesnäärme spetsiifilise membraani antigeen (*Prostate-specific membrane antigen*)

TNC-C – tenastiin C C-domeen (*tenascin C C-domain*)

uPA – urokinaasi-tüüpi plasminogeeni aktivaator (ingl k *urokinase-type plasminogen activator*)

WT – metsiktüüp (*wild type*)

## SISSEJUHATUS

Maailma Tervishoiu Organisatsiooni (ingl k *World Health Organization, WHO*) prognoos näitab, et aastaks 2050 jõuab aastane vähijuhtumite arv 35 miljoni juhtumini, mis on 77% kõrgem kui 2022. aastal. Kasvajalised haigused on oluline rahvatervise ja majanduslik probleem ning investeeringud vähiravi arendamisse võivad parandada miljonite vähipatsientide väljavaateid tulemuslikule ravile ning tuua kaasa majanduslikku kasu (Bray jt., 2024). Vähiravis on suur vajadus toksiliste vähiravimite täppis-suunamise järele, et sihtida kasvajaid ning vähendada samal ajal kõrvaltoimeid (Mathijssen jt., 2014). Paljudel vähivastastel ravimitel puudub selektiivsus kasvajate suhtes (Mathijssen jt., 2014; Simón-Gracia jt., 2018). Kasvajaspetsiifiliste kullerpeptiidide kasutamine pakub potentsiaali vähiravimite efektiivsuse suurendamiseks, vähendades samal ajal kahju tervetele kudedele (Gerber, 2008; Teesalu jt., 2013).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on leida faagidisplei meetodil krüptiline peptiid varasemalt avaldatud peptiidi PL3 põhjal, mis säilitab seondumise tenastiin-C (TNC) C-domeeniga ning seondub neuropiliin-1-ga (NRP-1) alles pärast proteolüütilist lõikamist. Lisaks uurida leitud krüptilise peptiidi seondumist 4T1 rinnavähi ja WT GBM glioblastoomi hiire haigusmudelites. Bakalaureusetöö koostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna bio- ja siirdemeditsiini instituudi täppis- ja nanomeditsiini laboratooriumis.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1 Veresoonte postiindeksid ja kullerpeptiidid

Vaskulaarsed postiindeksid on defineeritud kui „koe- ja haigusspetsiifilised erinevused veresoontes“ (Ruoslahti, 2011). Vaskulaarsete postiindeksite kaardistamine agnostiliste meetoditega nagu *in vivo* faagidisplei ja erinevad proteoomika-põhised lähenemised loob võimalused süsteemselt manustatud ravimite suunamiseks erinevatesse normaalsetesse organitesse ja haiguskolletesse (Ruoslahti, 2006; Thorpe ja Ran, 2002). Tavaliselt on nii kasvaja algkoldes kui ka metastaasides üleekspresseeritud angiogeensed integriinid ( $\alpha\beta3$  ja  $\alpha\beta5$ ), endoteliaalse kasvufaktori retseptorid, mitmesugused rakuvälise maatriksi molekulid (nt laminiini, tenastiini, fibronektiini ja versikaani isovormid), rakupinna proteoglykaanid ja proteaasid (erinevad maatriks-metalloproteinaasid, plasminogeeni aktivaatorid) (Ruoslahti, 2002). Lisaks angiogeneesiga seotud molekulidele üleekspresseeritakse kasvajaveresoontes

sageli molekule, mis sõltuvad vähitüübist, selle arenguetapist ja asukohast (näiteks PSMA eesnäärmevähis ja CD13 rinnavähis). Kasvajate veresoonte markerid, mis eristavad neid normaalsetest veresoontest, võivad olla sihtmärgiks kasvajaselektiivsetele afiinsusligandidele (peptiidid, antikehad, aptameerid), mida saab rakendada selleks, et suurendada ravimite efektiivsust ja vähendada kahjustusi tervetele kudedele (Hunt jt., 2015; Rafii jt., 2003; Scodeller ja Ascitto, 2020). Antikehad on ulatuslikult kasutatavad afiinsusligandid tänu nende spetsiifilisusele ja kõrgele afiinsusele, kuid nende suurus, tundlikkus keskkonnateguritele (temperatuur ja ensüümid) ja mõningatel juhtudel immunogeensus võivad piirata nende kasutamist. Peptiidide eeliseks on hea koepenetratsioon, stabiilsus ning valmistamise kuluefektiivsus ja skaleeritavus. Aptameeridel on kõrge tundlikkus ja spetsiifilisus, madal immunogeensus ning sarnaselt peptiididega on nende tootmine lihtne ja odav. Piiranguks on lõhustamine nukleaaside poolt, mis võib mõjutada nende plasma tsirkulatsiooniaega (Adam ja Weiner, 2005; Li ja Cho, 2012; Mi jt., 2019).

Kullerpeptiidid on 2–10 aminohapest koosnevad molekulid, milles aminohapped on omavahel peptiididemetega ühendatud nii, et ühe aminohappe karboksüülrühma ühendavad peptiididemed järgneva aminohappe  $\alpha$ -aminorühmaga. Peptiide kasutatakse laialdaselt kullermolekulidena tänu nende spetsiifilisusele, kudede ning rakkude läbimise võimele ning lihtsale ja kulutõhusale sünteesile (Teesalu jt., 2013; Ruoslahti 2017). Individuaalsete sihtmärkrakkude või -kudedega seonduvaid peptiide saab identifitseerida *in vivo* faagidisplei meetoodika abil, mille töötasid välja Pasqualini ja Ruoslahti (1996).

## 1.2 Faagidisplei meetod

Bakteriofaagid (faagid) on viirused, mis nakatavad baktereid (Campbell, 2003; Zhang jt., 2022). Faagid on morfoloogiliselt heterogeensed, need võivad olla polüeedrilised, filamentsed või pleomorfsed ning jaotuvad vastavalt paljunemisstrateegiale kas virulentseteks või mõõdukateks faagideks (McGrath ja Van Sinderen, 2007). Virulentsed faagid kasutavad paljunemiseks lüütilist nakatumistsükli, mille käigus toimub nukleiinhappe replikatsioon, faagiosakeste struktuurvalkude süntees ja monteerimine, ning seejärel rakkude lüüsumine ja faagide vabanemine keskkonda (Campbell, 2003; McGrath ja Van Sinderen, 2007). Mõõdukate faagide puhul siseneb osa nakatunud rakke lüütilisse tsükliisse, samas kui osa rakke jäävad peale nakatumist ellu. Sellised lüsogeensed rakud kannavad faagi genoomi stabiilses vormis (Campbell, 2003; McGrath ja Van Sinderen, 2007).

Faagidisplei meetodika töötas välja George Smith, muutes filamentse bakteriofaagi kattevalku kodeerivaid geene, et võimaldada eksogeensete peptiidide või valkude ekspresseerimist faagiosakeste pinnal (Smith, 1985). Sellistes geneetiliselt muundatud faagides on säilinud füsioloogilised funktsioonid (Anand jt., 2021). Seos genotüübi (ligandi kodeerivate nukleiinhapete) ja fenotüübi (faagide pinnavalkudega fusioonis ekspresseeritavad peptiidid) vahel võimaldab kindlate seondumisomadustega faagide rikastamist faagidisplei meetodi abil (Hoogenboom jt., 1998; Smith ja Petrenko, 1997; Teesalu jt., 2012; Willats, 2002). Faagidispleis kasutatakse kõige sagedamini filamentset M13-faagi ning lüütilist T7-faagi (Hoogenboom jt., 1998; McGrath ja Van Sinderen, 2007). Filamentne M13 on lüsogeenne faag, mis sisaldab üheaheelalist DNA-d. Lüütilise T7-faagi pärilikkusekandjaks on kaheaheelaline DNA, milles esineb replikatsiooni käigus vähem mutatsioone ning mida on lihtne manipuleerida. Nanoosakeste suunamiseks sobivate peptiidide identifitseerimisel on T7-faagi kasutamise üheks eeliseks see, et erinevalt filamentsetest faagidest on T7-faagiosakesed mõõtmelt ja kujult sarnased kliiniliste nanoosakestega (Kügler jt., 2013; Smith ja Petrenko, 1997; Teesalu jt., 2012; Zhang jt., 2022).

Faagidispleid saab kasutada selektsioonideks erinevatel märklaudadel (André jt., 2022; Johns jt., 2000; Liu jt., 2017). Tavaliselt kasutatakse faagidispleid madala kompleksusega märklaudadega seonduvate peptiidide identifitseerimiseks. Sellisteks bioloogilisteks sihtmärkideks on näiteks erinevad makromolekulid ja anorgaanilisteks sihtmärkideks näiteks metallid, sulamid, pooljuhid ja polümeersed materjalid (Anand jt., 2021). *In vitro* faagidisplei meetodi puhul on võimalik kasutada elueeritud faagi otse, ilma amplifitseerimata, mis võib vähendada taustamüra ja mittespetsiifiliselt seonduvate faagide arvu selektsiooni protsessi käigus (Willats, 2002). Lisaks *in vitro* rakendustele on faagidisplei meetodit rakendatud ka elusloomades, et leida kullerpeptiide, mis põhjustavad faagiosakeste selektiivset akumulatsiooni haiguskolletes või huvipakkuvates normaalsetes kudedes (Pasqualini ja Ruoslahti, 1996). Sellise, *in vivo* faagidispleiks nimetatud meetodika puhul süstitakse faagiraamatukogu süsteemsesse vereringesse, millele järgneb seondumata faagide eemaldamine, sihtmärk- ja kontrollkudedes olevate faagide kvantifitseerimine ning amplifitseerimine järgmise seondumisvooruga (Teesalu jt., 2012). Järjestikuste selektsioonivoorude käigus suureneb algselt väga mitmekesisel faagipopulatsioonis sihtmärgiga seonduvate faagide esindatus (Hoogenboom jt., 1998; Willats, 2002). *In vivo* faagidisplei arvestab elusorganismide heterogeensust ja keerukust ning võimaldab

kullerpeptiidide agnostilist tuvastamist (Pasqualini ja Ruoslahti, 1996). Lisaks positiivsele selektsioonile märklaudkoos, eemaldatakse *in vivo* faagidisplei puhul tsirkulatsiooni käigus mittespetsiifiliselt seonduvad peptiidid (Arap, 2005).

Esmakordselt kasutati *in vivo* faagidisplei meetodit koespetsiifiliste kullerpeptiidide avastamiseks juba 1996. aastal (Pasqualini ja Ruoslahti, 1996). *In vivo* faagidisplei on aidanud leida kullerpeptiide, mis on spetsiifilised normaalsete kudede või haiguskollete suhtes, ning viinud paljude retseptor-ligand paaride tuvastamiseni (Arap, 2005; Teesalu jt., 2012). Lisaks on *in vivo* faagidispleid kasutatud kasvajaspetsiifiliste erinevuste kaardistamiseks lümfisüsteemi veresoontes ning selle abil on avastatud kullerpeptiide, mis on akumulatsiooniga selektiivselt kasvajate lümfisõlmedes (Laakkonen jt., 2008).

### **1.3 Kasvajaspetsiifilised peptiidid ja CendR-element**

Soliidtuumorid vajavad kasvuks toitaineid ja hapnikku ning seetõttu stimuleerivad nad uute veresoonte moodustumist ehk angiogeneesi (Sherwood jt., 1971). Kasvajate veresooned erinevad normaalsetest veresoontest nii molekulaarselt kui ka morfoloogiliselt – need on ebaregulaarse ehitusega, lekkivad, nende diameeter on ebaühtlane ning seinte paksus on õhuke (Teesalu jt., 2012; Ruoslahti 2004). Need morfoloogilised tunnused on osalt tingitud peritsüütide puudulikkusest või nende funktsiooni häiretest (Hellström jt., 2001). Nii kasvajaveresooned kui ka maliigsetes kudedes paiknevad lümfisooned ekspresseerivad kasvajaspetsiifilisi markereid, mis võimaldab luua kasvajatele suunatud täppisdiagnostika vahendeid ja ravimeid (Ruoslahti 2002; Ruoslahti 2004; Teesalu jt., 2012). Kasvajaspetsiifilisi kullerpeptiide ehk kasvajale suunatud peptiide kasutatakse selleks, et suurendada vähiravimite kasvajasse jõudmist ja vähendada nende akumulatsiooni teistes kudedes (Lingasamy ja Teesalu, 2021). Kasvajaspetsiifilised peptiidid on rühm kasvajaselektiivseid kullerpeptiide, mis mitte ainult ei seondu kasvajaveresoontega, vaid ka väljuvad neist ja tungivad sügavale kasvajakoe parenhüümi. Kasvajaspetsiifilised peptiidid, nagu kliinilistes uuringutes olev iRGD-peptiid, suurendavad vähiravimite selektiivset akumulatsiooni ja ekstravasatsiooni kasvajakoes, kuid mitte normaalsetes kudedes (Dean jt., 2022; Sugahara jt., 2010; Sugahara jt., 2015). Need peptiidid koosnevad mitmest funktsionaalsest moodulist, sealhulgas aminohappelisest järjestusest, mis seondub üleekspresseeritud rakupinnamolekulidega kasvajaveresoontes. Kasvajaspetsiifiliste peptiidide ainulaadsed koopenetratsiooni omadused tulenevad nn CendR-

motiivist (ingl k *C-end Rule*; konsensus: R/K-X-X-R/K), mis seondub endoteelirakkudel ekspresseeritud NRP-1-ga põhjustades selektiivset tuumoriveresoonte lekkimist ja koopenetratsiooni pärast kasvajakoes toimuvat proteolüütilist aktiveerimist. Rakupinnareseptor NRP-1 on ekspresseeritud paljudes normaalsetes kudedes ning üleekspresseeritud enamikes soliidtuumorites. NRP-1 on pleiotroopne retseptor, mis mängib olulist rolli angiogeneesis, vaskulaarse läbilaskvuse reguleerimises ja närvisüsteemi arengus (Roche jt., 2002; Säälk jt., 2019; Teesalu jt., 2009). Oluline on, et CendR-motiivi seondumine NRP-1-ga toimub ainult juhul, kui CendR-motiiv paikneb peptiidis C-terminaalselt. Seega on CendR-elementi näol sisuliselt tegu lülitiga, mille saab välja lülitada motiivile C-terminaalsete aminohapete lisamisega ja sisse lülitada neid aminohappeid proteolüütiliselt eemaldades. Üldjuhul aktiveeritakse kasvajaspetsiifiliste peptiidide CendR-motiiv proteolüütiliselt tuumori mikrokeskkonnas. Samas mõningatel juhtudel, näiteks tenastiin-C-ga seonduva PL3 peptiidi puhul (järjestus: AGRGRLVR, CendR-järjestus allajoonitud), on CendR-motiiv juba algselt C-terminaalne ega vaja aktivatsiooni. Selliste peptiidide akumulereerumise vältimiseks tervetes kudedes (näiteks kopsudes, kus NRP-1 on samuti ekspresseeritud) on võimalik tekitada krüptilisi CendR-peptide, milles CendR-motiiv on varjatud proteaasi lõikamiskoha motiiviga (Teesalu jt., 2009; Teesalu jt., 2013). Braun ja kolleegid (2016) kasutasid oma uuringus urokinaasi-tüüpi plasminogeeni aktivaatorit (uPA), mis aktiveerib CendR-motiiviga kasvajasse tungivat peptiidi. Nad nimetasid sellise uPA-st sõltuva CendR-motiivi uCendR-iks (järjestus: RPARSGR↓SAGGSVA, ↓ näitab lõikamiskohta). Ka Sharma ja kolleegid (2017) kasutasid uPA-ga lõikamist oma uuringus ning nägid CendR-motiiviga lineaarse TT1-peptiidi (LinTT1, järjestus: AKRGARSTA) seondumist NRP-1-ga alles pärast uPA töötlust. uPA ja selle kõrge afiinsusega retseptor (uPAR) on seotud angiogeneesi, kasvaja invasiooni ja metastaasidega, samas kui tervetes elundites esineb uPA-t tavaliselt vähesel määral (Braun jt., 2016; Lingasamy ja Teesalu, 2021; Sharma jt., 2017).

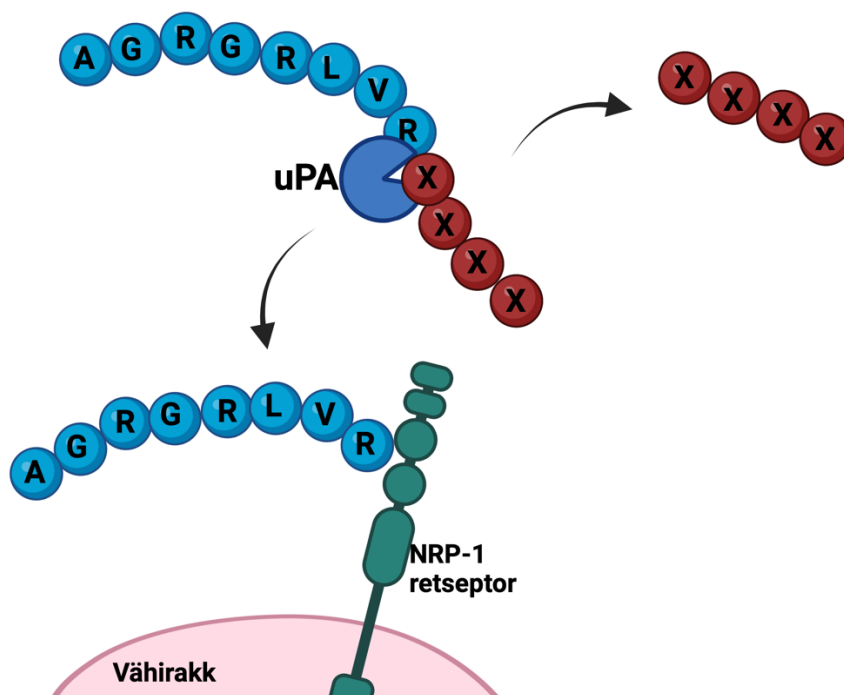
## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1 Töö eesmärgid**

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli leida faagidisplei meetodil urokinaasi-tüüpi plasminogeeni aktivaatori (uPA) aktiveeritud krüptilisi variante varasemalt avaldatud peptiidi PL3 (järjestus: AGRGRLVR) põhjal, mis säilitavad seondumise TNC C-domeeniga ning seonduvad NRP-1-ga alles pärast uPA poolt lõikamist (kujutatud joonisel 1). Lisaks uuriti

leitnud krüptilise peptiidi seondumist 4T1 rinnavähi ja WT GBM glioblastoomi hiire haigusmudelites.

Sarnast uuenduslikku lähenemisviisi võib tulevikus kasutada selliste CendR-peptiidide empiiriliseks tuvastamiseks, mis on aktiveeritud mitmesuguste kasvajaga seotud proteaaside (s.h. detailselt iseloomustamata substraadispetsiifilisusega proteaaside) poolt.



### Joonis 1. PL3-peptiididit tuletatud krüptilise peptiidi lõikamine proteaasiga uPA .

Joonisel on kujutatud peptiidi AGRGRLVR-XXXX seondumist NRP-1 retseptoriga peale proteolüütilist aktiveerimist. Proteaas uPA lõikab peptiidi spetsiifilisest lõikamiskohast, mis paljastab CendR-motiivi ning tänu millele antud peptiid seondub NRP-1 retseptoriga. Joonis on muudatustega Tobi ja kolleegide artiklist (Lisa 1) ning selle tegemiseks on kasutatud Biorender programmi (BioRender.com).

## 2.2 Materjal ja meetodika

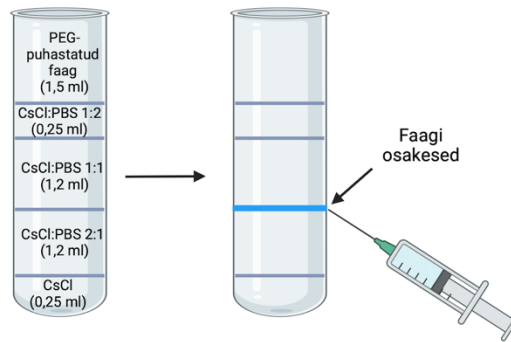
### 2.2.1 Peptiid-faagiraamatukogu amplifitseerimine ja puhastamine

Antud töös kasutati täppis ja- ja nanomeditsiini laboratooriumis konstrueeritud PL3-X4 raamatukogu, milles PL3-peptiidi järjestusele järgnes neli juhuslikku aminohapet C-terminuses (järjestus: AGRGRLVRXXXX, kus X on juhuslik aminohape). Faagiraamatukogu paljundamine ja puhastamine viidi läbi vastavalt Põšnograjeva ja kolleegide juhendile (Põšnograjeva jt., 2022).

*E. coli* tüvi BLT5403 (Novagen, USA) külvati ampitsiliiniga (50 µg/ml) LB-tardsöötme tassile ning kasvatati üleöö 37°C inkubaatoris. Järgmisel päeval võeti agari tassilt üks BLT5403 koloonia ning inokuleeriti 20 ml LB-vedelsöötmesse, millele oli lisatud karbenitsilliin (100 µg/ml). Kultuuri kasvatati bakteriloksutis (Eppendorf, USA) 100 ml Erlenmeyeri kolvis üleöö temperatuuril 37 °C ja kiirusel 200 pööret minutis (p/min). Järgmisel hommikul tehti kultuurist 100-kordne lahjendus eelsojendatud LB-söötmega, millele oli lisatud karbensilliin ja inkubeeriti loksutis temperatuuril 37 °C ja 200 pööret minutis kuni optilise tiheduseni  $OD_{600} = 0,5$  (ingl *optical density*, OD). Optilist tihedust mõõdeti spektrofotomeetriga (BioPhotometer Plus, Eppendorf, USA).

Amplifikatsiooniks inokuleeriti bakteri kultuur faagi lahusega nakatumissuhtega 0,01 ning inkubeeriti 90 minutit loksutis temperatuuril 37 °C ja kiirusel 200 pööret minutis, kuni lüüsilahus selgines ning seal oli näha surnud bakterite kogumeid. Lüsaat jahutati jääl ning jaotati 50 ml Falconi tuubidesse, igasse katsutisse 26 ml lüsaati. Seejärel lisati 3 ml NaCl (lõppkontsentratsioon 0.5M) ning segati Vortex masinal. Lüsaat puhastati bakteritest tsentrifuugimisel 10 minutit temperatuuril 4 °C ja kiirusel 8000 g (Eppendorf 5810R, rootor F-34-6-38). Supernatant valati uude 50 ml Falcon tuubi. Faagi sadestamiseks lisati 8,4 ml 20% polüetüleenglükooli (PEG) lahust ning inkubeeriti jääl vähemalt 30 minutit. Segusid tsentrifuugiti 10 minutit temperatuuril 4 °C ja kiirusel 12 000 g , et faag sadeneks tuubi põhja. Supernatant kõrvaldati ja tuubid kuivatati tagurpidi paberist salvrätikul 15 minutit. Faagi sade resuspendeeriti 1,9 ml PBS-s (Pan-Biotech, Saksamaa).

Faagide puhastamiseks endotoksiinidest kasutati tihedusgradiendi meetodit. 62,5% CsCl lahusest PBS-s, valmistati lahjendused ning need pipeteeriti ultratsentrifuugi tuubi alustades kõige tihedamast lahusest (Joonis 2). CsCl gradiendi peale pipeteeriti 1,5 ml PEG-iga puhastatud faagi raamatukogu. Tuube ultratsentrifuugiti 45 minutit SW60Ti pendelrootoriga (Beckman Coulter) kiirusel 40 000 pööret minutis ja temperatuuril 22 °C. Faagi raamatukogu moodustas helesinise riba, mis koguti süstlasse. Faagi raamatukogu dialüüsiti dialüüsikassetti (Thermo Fisher Scientific, USA) abil PBS-i vastu toatemperatuuril 1 tund, puhver vahetati ja dialüüsiti veel 1 tund.



**Joonis 2. CsCl tihedusgradient ultratsentrifuugi tuubis.** Tihedusgradient pipeteeritakse ettevaatlikult ultratsentrifuugi tuubi, alustades kõige tihedamast lahusest (CsCl) ning lõpetades PEG-puhastatud faagi lisamisega. Peale tsentrifugimist tekitavad faagiosakesed helesinise joone teise ja kolmanda kihi vahele, mis võetakse süstlaga välja. Joonis on muudatustega artiklist Põšnograjeva jt. (2022) ning selle tegemiseks on kasutatud Biorender programmi (BioRender.com).

### 2.2.2 Faagi tiirimine

Üksikute faagide või faagisegude tiitri määramiseks lahuses valmistati 10-kordsete lahjenduste rida LB-söötmes vahemikus  $10^2$ - kuni  $10^{10}$ -kordne lahjendus. 15 ml Falcon tuubi pipeteeriti 500  $\mu$ l *E. coli* BLT5615 bakterikultuuri, 100  $\mu$ l lahjendatud faagisegu ning 5 ml top-agarit (0,7% agari lahus LB söötmes), millele oli lisatud isopropüül- $\beta$ -tiogalaktosiidi (IPTG, lõppkontsentratsioon 2 mM). Segu valati LB tardsöötme tassile ning tassi inkubeeriti 16–18 h toatemperatuuril, seejärel loeti kokku faagi lüüsilaigud ning arvutati faagi või faagisegu tiiter.

### 2.2.3 Faagi amplifitseerimine tassidel

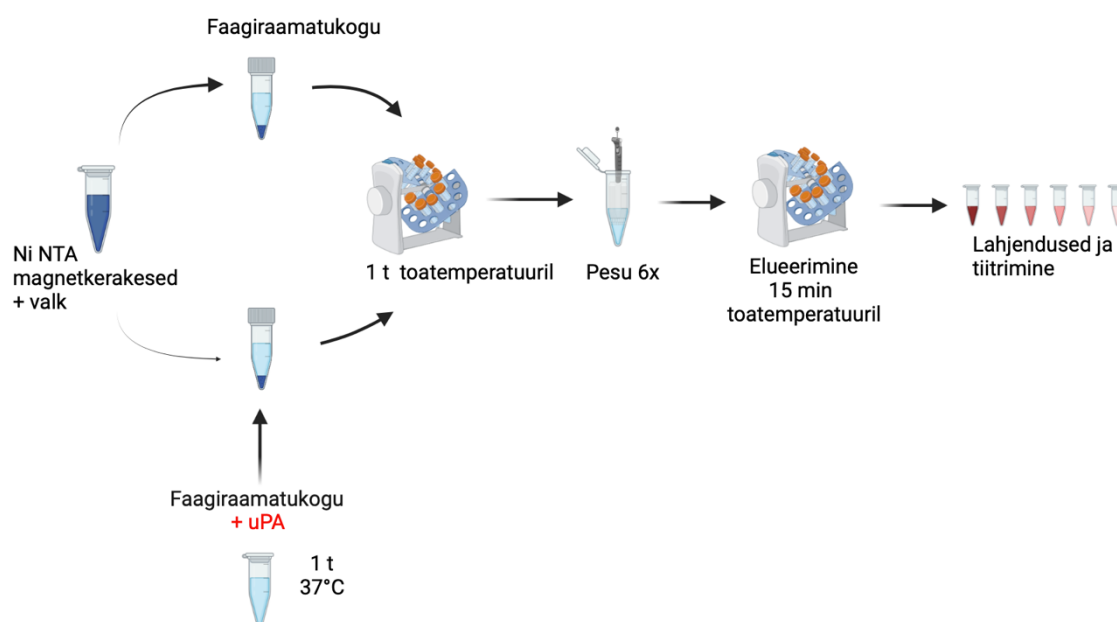
Faage amplifitseeriti tardsöötme tassidel, et vähendada erinevusi erineval kiirusel amplifitseerivate faagikloonide vahel. Selleks pipeteeriti 15 ml Falcon tuubi 5 ml *E. coli* bakteritüve BLT5403 ( $OD_{600} = 0,5$ ), 900  $\mu$ l faagi lahust ja 25 ml top-agarit. Segu valati välja viiele LB-tardsöötme tassile, umbes 6 ml segu iga tassi kohta, ning inkubeeriti üleöö 16–18 h. Seejärel pipeteeriti igale tassile 3 ml elueerimispuhvrit (20mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl ja 6mM  $MgSO_4$ ). Tassid inkubeeriti temperatuuril 4 °C üleöö. Seejärel puhastati faag, nagu kirjeldatud peatükis 2.2.1. Puhastamise etapis jäid lahuste suhted samaks, muudeti kasutatud lahuste kogust vastavalt elueeritud faagi kogusele.

## 2.2.4 Faagi raamatukogu eeltöötlus uPA-ga

50 µL faagi raamatukogule kontsentratsiooniga  $1 \times 10^9$  pfu/ml lisati 20 ühikut uPA-t reaktsiooni kohta (10 000 U/ml; #672112; Calbiochem) ning inkubeeriti 1 tund temperatuuril 37 °C.

## 2.2.5 Rakuvaba faagidisplei

Rakuvaba faagidisplei viidi läbi, et leida PL3-peptiidi (järjestus: AGRGRLVR) krüptilisi variante, mis seonduvad sekundaarse sihtmärgiga, rekombinantse neuropiliin-1-ga (NRP-1) alles pärast urokinaasi-tüüpi plasminogeeni aktivaatori (uPA) poolt lõikamist. Rakuvaba faagidisplei skeem on välja toodud joonisel 3.



**Joonis 3. Skemaatiline ülevaade käesolevas töös kasutatud rakuvaba faagidisplei meetodist.** Ni-NTA magnetkerakesed inkubeeriti kõigepealt NRP-1 b1 valguga ning seejärel uPA eeltöötlemisega või eeltöötlemata PL3-X4 faagiraamatukoguga, et faagid seonduksid sihtmärgile. Seonduvaid faagid eemaldatakse pesudega ning seonduvaid faagid elueeritakse ja tiitritakse. Elueeritud faagid paljundatakse tardsöötme tassidel, tiitritakse ja saadud eluaat on algmaterjaliks uuele seonduvaringile. Joonis on tehtud Biorender programmis (BioRender.com).

Rakuvabas faagidispleis jaotus PL3-X4 faagi raamatukogu kahte gruppi: uPA-ga eeltöödeldud ning eeltöötlemata. Seonduvuskatses kasutati nikkel-nitriloäädikhappega (Ni-NTA) magnetilisi agaroskerakesi (#36113, Qiagen GmbH, Hilden, Germany), mida pesti magnetilisel eraldajal pesupuhvriga (50 mM Tris-HCl, 5 mM imidasool, 1 M NaCl, 0,05% Igepal CA-630; kõik Thermo Scientific Inc.). Seejärel lisati kerakestele 15 µg rekombinantse NRP-1 valgu b1

domeeni (puhastatud Nanomeditsiini laboris), mis on liidetud heksahistidiini märgisega (His-6X) pöörleva segamisega toatemperatuuril 1 tund. Seandumata valgu eemaldamiseks pesti kerakesi 3 korda pesupuhvriga, kuhu oli lisatud 0,1% veiseseerumi albumiini (BSA; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Valguga kaetud magnetilised kerakesed inkubeeriti uPA-ga eeltöödeldud või töötlemata faagi raamatukoguga ( $5 \times 10^8$  pfu/ml) pöörleva segamisega toatemperatuuril 1 tund. Seejärel pesti kerakesi 0,1% veiseseerumit sisaldava pesupuhvriga kuus korda, et eemaldada seandumata faagid. Valguga seotud faagide elueerimiseks lisati kerakestele elueerimispuhvrit (400 mM imidasool, 300 mM NaCl, 0,05% Igepal CA-630 ja 0,1% BSA PBS-is). Elueeritud faagi raamatukogu tiitriti (kirjeldatud peatükis 2.2.2), sekveneeriti Sanger meetodil ning amplifitseeriti (kirjeldatud peatükis 2.2.3) järgmiseks vooruks. Seandumiskatset korrati neli korda, iga järgneva vooru sisendiks oli eelneva vooru amplifitseeritud faagi kogum. Iga korra lõpus tiitriti, sekveneeriti Sangeri meetodil ning amplifitseeriti saadud eluaat.

### 2.2.6 Faagide klonereimine

Peptiide kodeerivad nukleotiidsed järjestused klooniti T7 415-1b (Novagen, USA) bakteriofaagi genoomi, et neid peptiide ekspresseeritaks bakteriofaagi pinnal. Klonereimiseks kasutatud oligonukleotiidid on toodud tabelis 1. Kõigepealt lahjendati komplementaarsed oligonukleotiidid milli-Q (MQ) vees 100 nM kontsentratsioonini ning kuumutati termoblokkis (Biosan TDB-120, Läti) temperatuuril 95 °C 5 minutit. Seejärel lülitati termoblokk välja ja sellele lasti aeglaselt toatemperatuurini jahtuda.

**Tabel 1. Komplementaarsed oligonukleotiidid faagide klonereimiseks.**

Number	Järjestus	Senss oligonukleotiid	Antisenss oligonukleotiid
1	AGRGRLVRTPV	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC ACCCCGGTGTA	AGCTTACACCGGGGTG CGCACCAGGCGGCCGC GGCCCGCAG
2	AGRGRLVRSPDR	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC AGCCCGGATCGCTA	AGCTTAGCGATCCGGG CTGCGCACCAGGCGGC CGCGGCCCGCAG
3	AGRGRLVRAPDV	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC GCGCCGGATGTGTA	AGCTTACACATCCGGC GCGCGCACCAGGCGGC CGCGGCCCGCAG

4	AGRGRLVRVEKG	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC GTGGAAAAGGCTA	AGCTTAGCCTTTTTCCA CGCGCACCAGGCGGCC GCGGCCCCGCAG
5	AGRGRLVRSKLG	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC AGCAAAGTGGGCTA	AGCTTAGCCAGTTTG CTGCGCACCAGGCGGC CGCGGCCCCGCAG
6	AGRGRLVRDDSN	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC GATGATAGCAACTA	AGCTTAGTTGCTATCAT CGCGCACCAGGCGGCC GCGGCCCCGCAG
7	AGRGRLVREASR	AATTCTGCCGGCAGG GGCAGGCTGGTGAG GGAGGCCAGCAGGT A	AGCTTACCTGCTGGCC TCCCTCACCAGCCTGC CCCTGCCGGCAG
8	AGRGRLVRADV	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC GCGGATGTGCGCTA	AGCTTAGCGCACATCC GCGCGCACCAGGCGGC CGCGGCCCCGCAG
9	AGRGRLVRPTEF	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC CCGACCGAATTTTA	AGCTTAAAATTCGGTC GGGCGCACCAGGCGGC CGCGGCCCCGCAG
10	AGRGRLVRDDEV	AATTCTGCGGGCCGC GGCCGCCTGGTGCGC GATGATGAAGTGTA	AGCTTACACTTCATCAT CGCGCACCAGGCGGCC GCGGCCCCGCAG

Hübridiseerunud oligonukleotiidid lahjendati kontsentratsioonini 0,25 pmol / $\mu$ l.

Oligonukleotiidide ligeerimiseks faagi genoomi segati jää peal kokku ligeerimissegu, mis on välja toodud tabelis 2. Viimasena lisati ligeerimissegule 5  $\mu$ l (0,015 pmol) hübridiseerunud oligonukleotiidid. Segu jäeti ligeerima toatemperatuurile kaheks tunniks.

**Tabel 2. Ligeerimissegu.**

Reagent	1 reaktsiooni kohta
T7vektor 415-1b vector arms (Novagen) (lahjendamata:0,05 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10X Ligaasi puhver (Novagen)	1 $\mu$ l

T4 DNA Ligaas (Novagen)	1 µl
MQ vesi	2 µl

Peale ligeerimist segati 1,5 ml Eppendorf tuubis kokku 0,5 µl ligeeritud segu ning 2,5 µl pakkimissegu (Novagen), segati ettevaatlikult ning inkubeeriti 2 tundi toatemperatuuril.

Pakkimissegule lisati 200 µl karbentsilliiniga LB-söödet, valmistati lahjenduste rida ja tiitriti. Järgmisel päeval sekveeriti iga faagiklooni kohta 4 plaagi/lüüsilaigu DNA. Selleks võeti pipetiotsikuga tassil olev lüüsilaik ning otsik asetati 30 µl 1 × PBS-i. Valmistati ette reaktsioonisegu, mis sisaldas vastavalt 1 reaktsiooni kohta: 3 µl 5 × HOT FIREPOL Blend Master Mix (Solis BioDyne, Eesti), 0,075 µl Forward T7 upstream praimer (järjestus 5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3'), 0,075 µl Reverse T7 downstream praimer (järjestus 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCG G- 3') (mõlemad Integrated DNA Technologies, Belgia), 10,85 µl MQ vesi. Lõpuks lisati 1 µl faagi DNA-d PBS-is. Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) läbiviimiseks kasutati termotsüklerit (Eppendorf Master Cycler Nexus, USA) ja antud programmi:

95°C	12 min	} 20 tsükli
95°C	20 sek	
62°C	20 sek	
72°C	10 sek	
72°C	10 min	
4°C	Stopp	

Proovid sekveeriti Sangeri meetodil Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaboris.

### 2.2.7 Individuaalsete faagi kloonide seondumiskatse magnetkerakestel

Individuaalsete faagide kloonidega rakuvabad seondumiskatsed Ni-NTA magnetilistel agaroskerakestel viidi läbi nagu kirjeldatud peatükis 2.2.5. Seondumiskatsed viidi läbi TNC-C, NRP-1 b1 ja NRP-1 b1 mutantse valguga ning kõiki seondumiskatseid korrati kolmel korral (n = 3). Seondumiskatsed viidi läbi peatükis 2.2.5 kirjeldatud tingimustel, kuid TNC-C puhul kasutati erinevat seondumispuhvrit (PBS, 0,05% Igepal CA-630), pesupuhvrit (PBS, 1% BSA, 0,05% Igepal CA-630) ja elueerimispuhvrit (PBS, 0,05% Igepal CA-630, 500 mM imidasool).

## 2.2.8 Loomkatsed

Lõputöö projekt omab loomkatsete läbiviimise luba nr 159 (Lisa 1) ning loomkatsed viisid läbi Maarja Haugas, Kristina Põšnograjeva ja Lorena Simón-Gracia. Katsete käigus kasutati üheksat emast Balb/C albiino immuunpuudulikku hiirt, kelle vanus (~ 6–8 nädalat) ning kehakaal (~ 25–30 g) katsetes varieerusid. Katsed teostati Tartu Ülikooli Bio- ja Siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskuses. Katseloomi hoiustati 12 tunni valguse/pimeduse tsükli tingimustel, vaba juurdepääsuga veele ja toidule.

### 2.2.8.1 *In vivo* playoff nahaaluse 4T1 rinnaavähi hiiremudelil

Kolmel emasel Balb/C albiino hiirel indutseeriti nahaalused kasvavad rinnavähi 4T1 rakuliiniga TÜ Nanomeditsiini uurimisgrupi teaduri Lorena Simón-Gracia poolt. Kasvaja indutseerimiseks süstiti  $1 \times 10^6$  vähirakku ortotoopselt neljanda rinnanäärme rasvapadjakesse (ingl k *mammary fat pad*).

*In vivo* faagidisplei läbiviimiseks kasutatud faagid on välja toodud tabelis 3. Faagid amplifitseeriti *E.coli* bakteritüves BLT5403, puhastati NaCl ja 50% PEG8000 sadestamisega. Faagid segati kokku võrdses molaarses suhtes ning viidi läbi CsCl gradiendi tsentrifuugimine ja dialüüs PBS-s (kirjeldatud peatükis 2.2.1).

**Tabel 3. *In vivo* playoffi faagisegus olevad peptiidfaagid.**

Peptiidi nimetus	Aminohapete järjestus	<i>In vivo</i> selektiivsus	Viide
Insertless	SSVDKLAAALE	Kontroll	
G7	CGGGGGGGC	Kontroll	Teesalu jt., 2009
PL1	PPRRGLIKLKTS	Erinevad soliidtuumorid, angiogeensed piirkonnad, endometrioosi kolded	Lingasamy jt., 2019
PL3	AGRGRLVR	Erinevad soliidtuumorid	Lingasamy jt., 2020
PL3uCendR	AGRGRLVRSAGGSVA		Avaldamisel
TT1	CKRGARSTC	Kasvajates aktiveeritud makrofaagid,	Paasonen jt., 2016

		pahaloomulised rakud, kasvaja veresoonte ja lümfisoonte endoteelium	
miniUNO	CSPGAK	M2 makrofaagid kasvajates	Scodeller jt., 2017
Cagalcy	CAGALCY	Ajuspetsiifiline peptiid	Fan jt., 2007
TPV	AGRGRLVRTPV		
SPDR	AGRGRLVRSPDR		
ADPV	AGRGRLVRADPV		
VEKG	AGRGRLVRVEKG		
SKLG	AGRGRLVRSKLG		
DDSN	AGRGRLVRDDSN		
EASR	AGRGRLVREASR		
ADVR	AGRGRLVRADVR		
PTEF	AGRGRLVRPTEF		
DDEV	AGRGRLVRDDEV		

Kõigepealt soojendati hiire saba soojas vees 2 minutit, seejärel süstiti hiire sabaveeni 140 µl puhastatud faagisegu ( $5 \times 10^9$  pfu), millel lasti tsirkuleerida 30 minutit. Seejärel teostati anesteesia 350 µl deksmedetomidini (0,1 mg/kg) ja ketamiini (75 mg/kg) süstimisega hiire kõhuõõnde. Hiir fikseeriti vahtpolüstüreenalusele ning avati kõhuõõs ja diafragma. Südame paremasse kambrisse tehti kääridega sisselõige ning vasakusse vatsakesse sisestati perfusiooninõel toasooja PBS lahusega. Perfusiooni viidi läbi kuni kõik koed, kaasaarvatud maks, muutusid heledaks. Hiirelt eemaldati aju, tükk maksast, tükk kopsust ja tuumor. Hiirte süstimine ja perfuseerimine viidi läbi Kristina Põšnograjeva poolt, järgnevad etapid viidi läbi antud töö autori poolt. Organid kaaluti ning asetati 1 ml LB + 1% Igepal CA-630 lahusesse. Organid ja tuumor homogeniseeriti mehaaniliselt koehomogenisaatoriga (OMNI International, USA) ning tiitriti. Seejärel viidi läbi proovide amplifikatsioon tassidel, nagu varem kirjeldatud (ptk 2.2.3). Kõik proovid saadeti sekveneerimisplatvormil Ion Torrent analüüsiks (kirjeldatud peatükis 2.2.9).

### **2.2.8.2 *In vivo* playoff glioblastoomi hiiremudelil**

Kolmele emasele Balb/C hiirele indutseeriti ortotoopsed glioblastoomid TÜ Nanomediitsiini uurimisgrupi teaduri Maarja Haugase poolt. Ortotoopiliste GBM-ksenograafi indutseerimiseks uinutati hiired, hiirte otsmikusse tehti väike sisselõige ning haav ja kolju puhastati. Seejärel puuriti nõela otsaga koljusse auk ning süstiti ettevaatlikult aju paremasse striatumisse  $7 \times 10^5$  WT GBM vähirakku (Marumoto jt., 2009). Kontrolliks oli kolm emast metsik-tüüpi (WT) Balb/C hiirt, kellele kasvajat ei indutseeritud.

Katseks amplifitseeriti uuesti faagid 1–10, Insertless (tühikontroll), PL3uCendR, PL3, CAGALCY, G7, mUNO, TT1 ja PL1 *E.coli* bakteritüves BLT5403 (kirjeldatud ptk 2.2.1), puhastati NaCl ja 50% PEG8000 sadestamisega. Faagid segati kokku võrdses molaarses suhtes ning viidi läbi CsCl gradiendi tsentrifuugimine ning dialüüs PBS-s (kirjeldatud ptk 2.2.1).

Loomkatse viidi läbi alapeatükis 2.2.8.1 kirjeldatud viisil Maarja Haugase poolt. Hiirte sabaveeni süstiti 100 µl puhastatud faagisegu ( $5 \times 10^9$  pfu) ning peale perfusiooni eemaldati aju, tükk maksast ja tükk kopsust. Jätkati töö autori poolt kudede homogeniseerimise, faagide amplifitseerimise ning puhastamisega (kirjeldatud ptk 2.2.8.1) ning kõik proovid analüüsiti sekveneerimisplatvormil Ion Torrent (ptk 2.2.9).

### **2.2.9 Ion Torrent sekveneerimine ja andmeanalüüs**

*In vivo* faagidispleist selekteeritud peptiide sekveneeriti kasutades kõrge läbilaskevõimega sekveneerimise (ingl k *High Throughput Sequencing*, HTS) sekveneerimisplatvormi Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). HTS-i kasutati erinevate peptiidide esindatuse hindamiseks hiirtesse süstitud sisendsegus, kasvajates ja kontrollorganites.

Proovide ettevalmistuse ja Ion Torrent platvormil analüüsi viis läbi TÜ Nanomediitsiini laborispetsialist Kaarel Kurm.

## **2.3 Tulemused ja arutelu**

Antud töö eesmärgiks oli leida PL3-peptiidist tuletatud krüptiline peptiid, mille CendR-motiiv oleks peidetud kuni proteolüütilise lõikamiseni. Varasemalt on leitud proteolüütiliselt aktiveeritud CendR-motiividega peptiide, millel on uPA äratundmis- ja lõikamiskoht (Braun jt.,

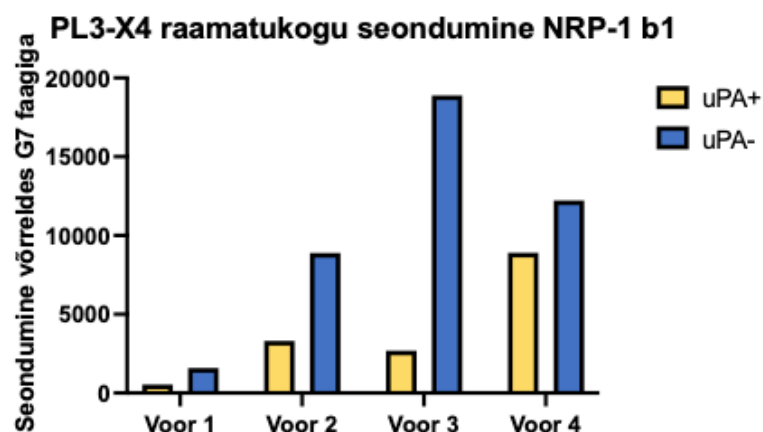
2016; Sharma jt., 2017). Antud bakalaureusetöö eksperimendid, tulemused ja analüüs on teostatud käesoleva töö autori poolt, mis on osa avaldatavast artiklist (Lisa 2).

Töö esimeses pooles otsiti võimalikke kandidaatpeptiide rakuvaba *biopanning* meetodi abil ning võrreldi nende seondumist TNC-C ja NRP-1 b1 valkudega. Sellele järgnevalt testiti kandidaatpeptiide koos kontrollpeptiididega 4T1 rinnavähi ja WT GBM glioblastoomi hiiremudelites.

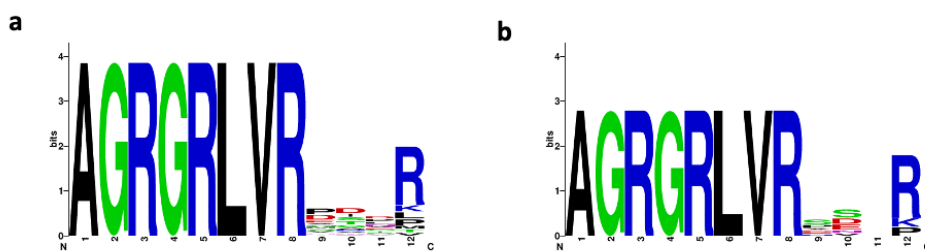
### **2.3.1 Rakuvaba faagidisplei PL3-X4 faagiraamatukoguga.**

Töö esimeses pooles otsiti võimalikke PL3-peptiidist tuletatud krüptilise CendR-motiiviga peptiidide, et vähendada mittespetsiifilist seondumist ning suurendada peptiidi seondumist sihtmärgiga, käesolevas katses NRP-1 b1- ja TNC-C-valgule. PL3-X4 faagiraamatukogu uPA eeltötluse eesmärk oli leida peptiidid, mis seonduksid vaid uPA-ga töötlemise järel ning ei seonduks ilma eeltötluseta.

Katse eesmärk oli kandidaatpeptiidide leidmine rakuvabal *biopanning* meetodil, mis oleksid aktiveeritavad urokinaas-tüüpi plasminogeeni aktivaatoriga (uPA) ning võrreldi nende seondumist TNC-C ja NRP-1 b1 valkudega. Tehti seondumiskatse magnetkerakestel uPA-ga eeltöödeldud ja eeltöötlemata PL3-X4 faagiraamatukogule, neljas voorus nähti voorude vahelist rikastumist. Esimese ja neljanda vooru vaheline rikastumine oli 16-kordne, mille põhjal valiti välja kõige paremini seonduvad kandidaatfaagid (Joonis 3). Iga vooru järel teostati ka Sangeri sekveneerimine, mille põhjal nähti neljandas voorus suures hulgas R- või K-lõpulisi järjestusi, mis seonduvad NRP-1-ga ka ilma uPA töötlemata (Joonis 4). Sellest tulenevalt otsustati teha sekveneerimine seadmega Ion Torrent ehk HTS sekveneerimine kolmanda vooru proovidele ning tulemuste põhjal valiti parimad 10 bakteriofaagi, võttes arvesse uPA eeltötlusega ning eeltötluseta rikastumise suhet (Tabel 4). Valiku kriteeriumiks oli, et faagil on vähemalt 20 lugemist kolmandas voorus. Lisaks pidi faag olema rikastunud uPA eeltötluse järel, kuid ei tohtinud olla rikastunud ilma eeltötluseta. Rikastumine arvutati kolmanda vooru lugemite arvu jagamisel naiivse raamatukogu lugemite arvuga. Rikastumise erinevus arvutati uPA eeltöödeldud rikastumise jagamisel uPA eeltöötlemata rikastumisega. Arvutuskäik ning 10 kõige suurema rikastumise erinevusega peptiidi on välja toodud joonisel 5.



**Joonis 3. PL3-X4 raamatukogu rikastumine biopanningu voorudes 1–4.** Katses kaeti Ni-NTA magnetkerakesed rekombinantse NRP-1 b1-domeeniga, inkubeeriti uPA eeltöödeldud või eeltöötlemata faagidega, pesti, elueeriti, mõõdeti tiitrid ja sekveneriti sekvenaatoriga Ion Torrent. Tulemused on esitatud G7 faagi suhtes.



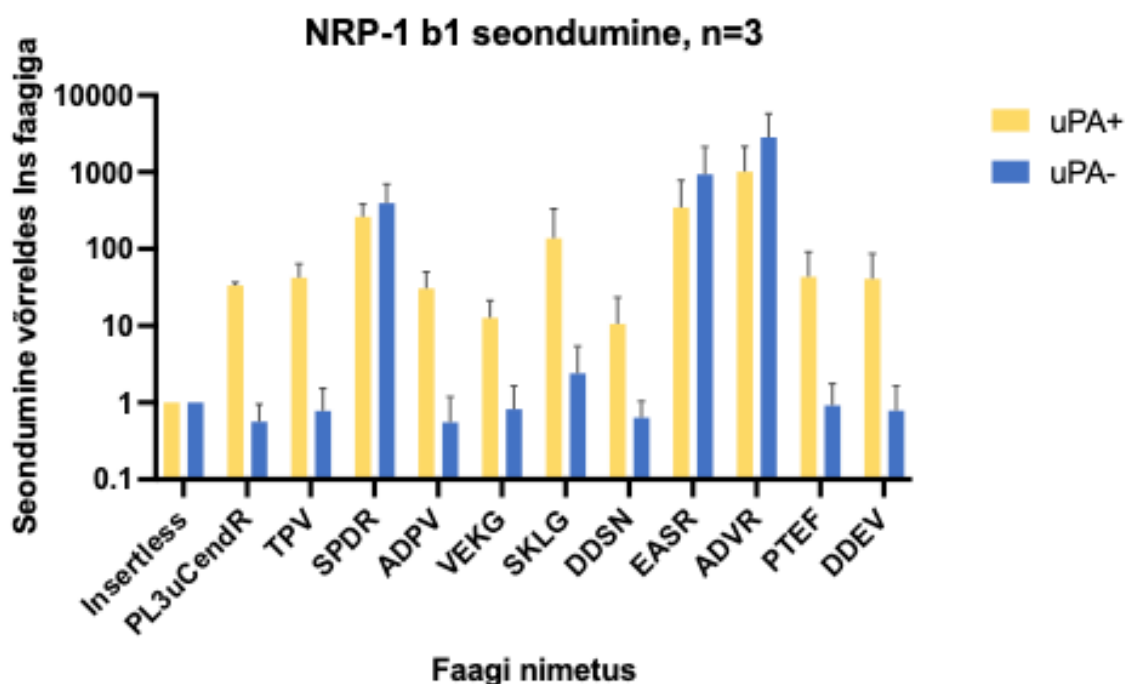
**Joonis 4. PL3-X4 faagi raamatukogu seondumiskatse neljanda vooru bakteriofaagide aminohapete esindatus uPA eeltöötletusega (a) ning uPA eeltöötletumata (b).** Kõige enam oli esindatud PL3-järjestus, mis tulenes sellest, et esimese PL3-X4 raamatukogu aminohappe asemel oli stopp-koodon. Enamus ülejäänud järjestusi on R- või K-lõpulised. Voorude 3 ja 4 sekveneritud järjestused on välja toodud Lisas 3. Joonise tegemiseks on kasutatud WebLogo programmi.

**Tabel 4. PL3-X4 biopanningu meetodil leitud kandidaatpeptiidid kolmandast selektsioonivoorust.** Kolmandast voorust valitud 10 kandidaatpeptiidi, nende lugemid iga vooru lõikes ning nende rikastumine võrreldes uPA eeltöötletusega.

Peptiid	Raamatukogu	uPA+			uPA-			Rikastumine		uPA+ rikastumine/ uPA- rikastumine
		Voor 1	Voor 2	Voor 3	Voor 1	Voor 2	Voor 3	uPA+	uPA-	
AGRGRLVRTPV	2	17	73	505	0	0	1	252,5	0,5	505
AGRGRLVRSPPDR	3	16	65	252	2	4	1	84	0,3	252
AGRGRLVRADPV	1	18	28	189	3	2	1	189	1	189
AGRGRLVREKEG	2	6	24	125	7	3	1	62,5	0,5	125
AGRGRLVRSKLG	2	2	9	94	0	5	1	47	0,2	94
AGRGRLVRRDDSN	5	5	8	75	5	1	1	15	1	75
AGRGRLVREASR	1	3	6	74	1	1	1	74	0,1	74
AGRGRLVRAADV	9	3	4	62	0	0	1	6,9	1	62
AGRGRLVRPTEF	1	2	4	46	0	0	1	46	1,3	46
AGRGRLVRRDDEV	3	2	5	158	2	1	4	52,7		39,5

### 2.3.2 Kandidaatpeptiidide seondumine NRP-1 b1- ja TNC-C-valguga.

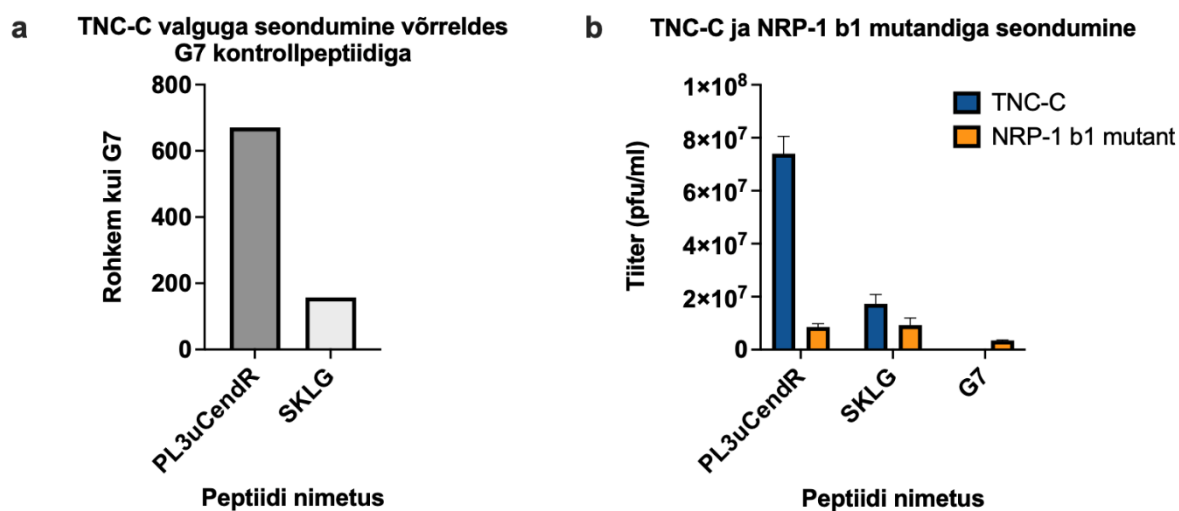
Leitud kandidaatpeptiididega ja kontrollpeptiididega viidi läbi seondumiskatse magnetkerakestel kolmel korral, saadud tulemused on esitatud joonisel 5. Kümnet kandidaatpeptiidi võrreldi Insertless (tühikontroll) faagiga, mis oli negatiivseks kontrolliks, ning PL3uCendR-peptiidiga, mis oli proteolüütiliselt aktiveeritav peptiid, mis disainiti meie töörühmas Braun ja kollegide (2016) töö põhjal (artikkel avaldamisel, Lisa 2) Jooniselt on näha, et enamus peptiide näitasid madalamat seondumist enne proteolüütilist eeltötlust ning tugevamat seondumist peale eeltötlust. Kolm peptiidi (AGRGRLVRSPDR, AGRGRLVREASR, AGRGRLVRADVR) seondusid sama hästi NRP-1 b1-valguga nii uPA eeltötlusega kui ka ilma eeltötluseta, mis tuleneb nende C-terminaalse otsa arginiinist (Teesalu jt., 2009). Need peptiidid elimineeriti edasistest analüüsides, sest katse eesmärk oli leida peptiidid, millel oleks peidetud CendR-motiiv, mis tuleks esile pärast proteolüütilist lõikamist, et vähendada peptiidide kuhjumist normaalsetesse kudedesse (Braun jt., 2016).



**Joonis 5. Individuaalsete PL3-peptiidist tuletatud krüptiliste peptiidide seondumine NRP-1 b1-domeeniga.** Katses võrreldi Ni-NTA magnetkerakeste seondumiskatsega kandidaatpeptiidide ja kontrollpeptiidide seondumist NRP-1 valgu b1-domeeniga enne ja pärast proteolüütilist lõikamist uPA-ga. Kandidaatpeptiidide nimed on välja toodud ainult C-

terminaalse otsa osana, mis tuleb pärast järjestust AGRGRLVR. Joonis on kujutatud logaritmilisel skaalal.

Tulemuste põhjal ei leitud ühtegi kandidaatpeptiidi, mis oleks olnud tunduvalt parem kui positiivne kontrollpeptiid PL3uCendR. Leitud kandidaatpeptiididest valiti edasisteks katseteks välja peptiid SKLG (järjestus: AGRGRLVRLVRSKLG), mis näitas küll kõrgemat seondumist kui teised proteolüütiliselt lõigatud peptiidid, kuid erinevused kolme katse vahel olid suured. SKLG peptiidiga viidi läbi seondumiskatsed Ni-NTA magnetkerakestel kontrollimaks seondumist valguga tenastiin-C (TNC) C-domeeniga ning kontrolliks võeti kõrvale NRP-1 b1 mutant (Joonis 6). Täheledata PL3uCendR-peptiidi seondumist TNC-C-valguga ning väiksemat seondumist NRP-1 b1 mutantse valguga, sarnast erinevust saab täheldada SKLG-peptiidi puhul, kuigi erinevus TNC-C- ja NRP-1 b1-valkudega seondumisel on väiksem. Kontrollpeptiid G7 (järjestus: CGGGGGGGC) näitas väga väikest või olematut seondumist kummagi valguga. Joonisel 6b on näha PL3uCendR-peptiidi ja SKLG-peptiidi paremat seondumist võrreldes kontrollpeptiidiga G7. G7 valiti kontrollpeptiidiks, sest teadaolevalt ei oma see mingit efekti biomolekulidega seondumisel *in vivo* (Sugahara jt., 2009; Teesalu jt., 2012). PL3uCendR seondus rohkem kui 600 korda paremini ning SKLG seondus 150 korda paremini kui kontrollpeptiid TNC-C valguga.



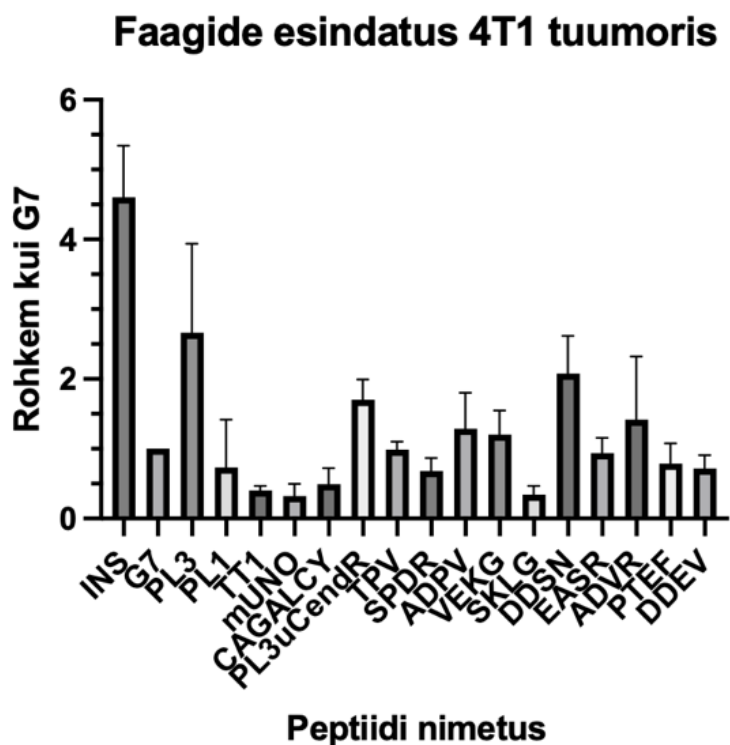
**Joonis 6. Peptiidide PL3, PL3uCendR ning SKLG seondumine valkudega TNC-C ja NRP-1 b1 mutantse variandiga.** Seondumiskatse viidi läbi Ni-NTA magnetkerakestel valguga TNC-C ning kontrollvalguga NRP-1 b1 mutantse variandiga. Joonisel 6a y-telg näitab kui mitu korda enam seondus antud peptiid valguga kui kontrollpeptiid G7 ning x-teljel on faagide pinnal kuvatud peptiidi nimetus. PL3uCendR seondus 600 korda rohkem TNC-C-valguga kui kontrollfaag G7 ja SKLG seondus 150-kordselt rohkem kui G7. Joonisel 6b on

näha peptiidide PL3uCendR, SKLG ja kontrollpeptiidi G7 seondumist TNC-C valguga ning mutantse kontrollvalgu NRP-1 b1; y-telg näitab faagi tiitrit peale seondumiskatset (pfu/ml) ning x-teljel on faagide pinnal kuvatud peptiidid.

### 2.3.3 *In vivo* playoff

*In vivo* katsetega sooviti hinnata kandidaatpeptiidide akumulereerumist kasvajas, mis viidi läbi kahes erinevas haigusmudelis. Esmalt kasutati nahaaluse 4T1-rinnavähi kasvajatega Balb/c hiiremudelit ning hiljem indutseeritud WT GBM-glioblastoomiga Balb/c hiiremudelit.

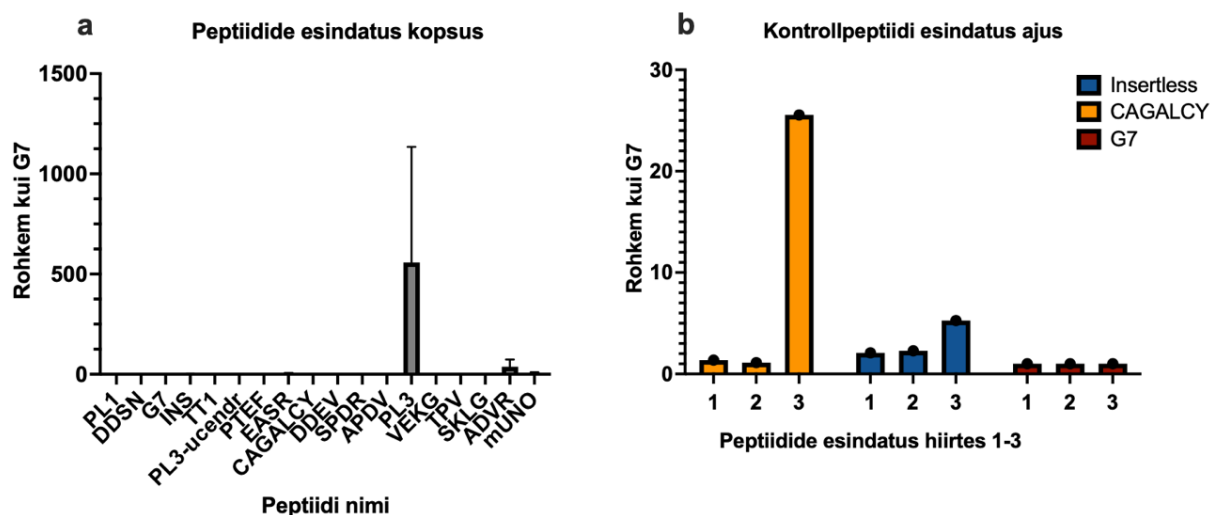
Kolme rinnavähi kasvajaga hiire sabaveeni süstiti  $5 \times 10^9$  pfu faagisegu. Faagisegus olid peptiidid Insertless ja G7 negatiivseteks kontrollpeptiidideks, CAGALCY ajuspetsiifiliseks kontrollpeptiidiks, kasvajaspetsiifilised peptiidid PL1, PL3, TT1 ja mUNO, kandidaatpeptiidid 1–10 ning PL3uCendR-peptiid. Faagide tsirkulatsiooniaeg oli 30 minutit, peale mida hiired anesteseeriti ning perfuseeriti PBS-iga. Hiirtelt eemaldati sihtmärkkude (kasvaja) ja kontrollkoed (aju, kops, tükk maksast), mis kaaluti ning asetati LB + 1% Igepal CA-630 lahusesse. Seejärel homogeniseeriti koed ja faagid kudede lüsaatidest amplifitseeriti ning puhastati, et saata need edasi sekveneerimisele seadmega Ion Torrent. Sekveneerimistulemuste põhjal hinnati faagide jaotust sihtmärk-kudedes ja kontrollkudedes (Lisa 3).



### Joonis 7. Peptiidide esindatus kasvajas võrreldes kontrollpeptiidiga G7.

Sekveneerimisplatvormiga Ion Torrent saadud peptiidide lugemid kasvajas, mis on läbi jagatud maksa lugemitega ning graafik näitab mitu korda enam oli peptiidi lugemeid kasvajakoes võrreldes G7 kontrollpeptiidiga.

Joonisel 7 on näha kõigi peptiidide esindatus sihtmärk koes ehk kasvajas. Ootamatult akumulereerub Insertless kasvajas 4,5 korda rohkem kui kontrollpeptiid G7. Siit katsest ei tulnud välja ühtegi head kasvajasse akumulereeruvat peptiidi. Katse edukust võib eeldada selle järgi, kas kontrollpeptiidid akumulereeruvad oodatavates sihtmärk kudedes. Kontrollkudede tulemustest tuleb välja, et kopsus olid ootuspärased tulemused (PL3-faagi kõrge akumulereerumine), kuid ajuspetsiifiline peptiid CAGALCY näitas kõrget tulemust vaid ühe hiire ajus (Joonis 8). Siit võib järeldada, et madal akumulereerumine võis olla põhjustatud halvasti läinud süstimisest või perfusioonist. Lisaks on võimalik, et see oli tingitud 4T1 kasvajate tugevalt angiogeensest olemusest. Nendele kasvajatele on iseloomulikud lekkivad sooned, mis põhjustavad suurenenud baastaseme akumulatsiooni kasvajas (Steenbrugge jt., 2021).



**Joonis 8. Kontrollpeptiidide esindatus kopsus (a) ja ajus (b) võrreldes kontrollpeptiidiga G7.** Ootuspäraselt on PL3 suurel määral akumulereerunud kopsu, kus on loomulikult kõrge NRP-1 ekspressioon (a). Ajupeptiid CAGALCY akumulereerus vaid ühe hiire ajus, mille üheks põhjuseks võib olla, et süstimised või perfusioon ei läinud ootuspäraselt (b).

Teine *in vivo* *playoff* katse viidi läbi kolmel metsiktüüpi glioblastoomiga (WT-GBM) hiirel ja kolmel metsiktüüpi (WT) hiirel. Töö käik oli sama nagu eelmises katses, kuid sel korral oli sihtkoeks aju (kasvajaga) ning kontrollkudedeks kops ja tükk maksast. Sekveneerimistulemused jagati läbi maksa lugemitega ning tehti andmeanalüüs nagu kirjeldatud Lisas 3. Tulemused näitasid, et kontrollpeptiidid käitusid ootuspäraselt – ajupeptiid

CAGALCY oli kõige rohkem esindatud normaalses ajus ja PL3-peptiidid kõige rohkem esindatud kopsus. Võrreldes GBM-kasvaja näituseid normaalse aju näitudega, siis suurimat erinevust näitas TT1-peptiid.

Katse eesmärk oli leida peptiidid, mis akumulereerus kasvajas ning ei akumulereerus kopsu, mille tõttu tehti arvutus, kus vaadati mitu korda on konkreetne peptiid esindatud rohkem kasvajas kui kopsus. Selle arvutusega näitas peptiid PL3uCendR kõrgemat seondumist kasvajas kui kopsus ning tuli esile peptiid SKLG. Kontrollpeptiid CAGALCY kõrge näit on tingitud selle akumulereumisest ajus ja ka ajukasvajas. Insertless on andnud kõrgeid lugemeid *in vivo* *playoff* katsetes, mis võib tuleneda sekveneerimistulemuste analüüsi meetodi artefaktidest. Tugevate kandidaatidena olid veel peptiidid TPV, VEKG ja DDSN. Andmeanalüüsi põhjal saab välja jätta madala suhtearvuga peptiidid SPDR, EASR ja ADVR, mis läheb kokku varasema seondumiskatse tulemustega, kus need samad peptiidid näitasid tugevat seondumist NRP-1-valguga ka ilma uPA töötluseta. Tulemused on välja toodud tabelis 5.

**Tabel 5. *In vivo* *playoff* tulemused WT GBM-glioblastoomi hiiremudelil.** Tabel näitab erinevate peptiidide spetsiifilist akumulatsiooni vähkkasvajas võrreldes kopsuga. Tulemused on läbi jagatud maksa lugemitega. Tulemused on arvatud selle järgi, kui mitu korda on konkreetset peptiidi kasvajas (GBM) rohkem kui kopsus. Punasega on esile tõstetud peptiidid SKLG ja PL3uCendR.

Peptiid	GBM/Kops
CAGALCY	17,92
mUNO	6,49
TT1	10,60
PL1	8,59
PL3	0,12
<b>PL3-uCendR</b>	13,32
TPV	11,62
SPDR	1,88
APDV	7,24
VEKG	11,39
<b>SKLG</b>	17,05
DDSN	11,64
EASR	1,86
ADVR	0,93
PTEF	9,18
DDEV	7,67
G7	9,28
Insertless	24,70

## KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli leida PL3-peptiidist tuletatud proteolüütiliselt aktiveeritavaid peptiide, mis seonduksid kasvajaga, kuid ei akumulējuks kopsudes. Selleks püüti leida varjatud CendR-motiiviga peptiide, mis seonduksid NRP-1 b1-domeeniga alles pärast proteolüütilist lõikamist ning millel säiliks võime seonduda TNC-C-valguga. Vähiravis on tähtis saavutada täpsus ja selektiivsus, näiteks saab seda teha suunatud kasvajat penetreerivate peptiididega, mis seonduvad sihtmolekulidega. CendR-motiiviga peptiidid tungivad küll kasvajasse, kuid avatud C-terminaalne ots võib põhjustada ka soovimatut akumulērumist normaalsetesse kudedesse, mis ekspresseerivad neuropiliin-1. Üks sellistest peptiididest on PL3, millest tuletatult valmistati faagi raamatukogu PL3-X4 (Braun jt., 2016; Lingasamy jt., 2020; Teesalu jt., 2009).

Antud bakalaureusetöö eksperimentaalses osas töödeldi PL3-X4 faagi raamatukogu uPA-ga ja kasutades rakuvaba faagidisplei meetodit sõeluti välja kandidaatpeptiidid. See katse demonstreeris, et rakuvaba faagidisplei meetodil on võimalik identifitseerida uusi proteolüütiliselt aktiveeritavaid kasvajaspetsiifilisi peptiide ning selle raames leiti krüptilisi peptiide, mis näitasid positiivseid tulemusi nii *in vitro* seondumiskatsetes kui ka *in vivo* *playoff* katsetes glioblastoomi hiiremudeliga.

Katsete tulemuste põhjal osutus kõige edukamaks peptiidiks SKLG. SKLG peptiid näitas 150-kordset seondumist rekombinantse NRP-1 b1-domeeniga ning samuti säilitas seondumise TNC-C-valguga. *In vivo* katsete keskkond on komplekssem kui rakuvabades või *in vitro* katsetes, mistõttu uuriti kõigi kandidaatpeptiidide biojaotuvust kahes hiiremudelis, kasutades *in vivo* *playoff* meetodit. See meetod võimaldab mitme kandidaatpeptiidi paralleelset hindamist samas loomas ja samal ajal. Läbiviidud uuringutega kinnitati uue peptiidi SKLG (järjestus: AGRGRLVRSKLG) efektiivsust ning näidati uPA-st tulenevat seondumist NRP-1-ga, vähendades seeläbi seondumist tervetesse NRP-1 ekspresseerivatesse kudedesse.

Sellist süsteemi on võimalik tulevikus kasutada nii olemasolevate mitme sihtmärgiga seonduvate peptiidide modifitseerimiseks, et ära hoida tervetesse kudedesse akumulērumist, kui ka uute proteolüütiliselt aktiveeritavate peptiidide avastamisel.

## SUMMARY

### Identification of proteolytically activated tumor penetrating peptides

Kristina Rabi

Targeted drug delivery is a promising approach in cancer treatment to minimize the side effects and enhance therapeutic efficacy. Many currently available cancer drugs lack selectivity, resulting in accumulation in healthy tissues (Mathijssen et al., 2014; Simón-Gracia et al., 2018). Tumor-homing peptides conjugated with anticancer drugs increase drug accumulation in tumor tissues and thereby enhance the antitumoral activity of drugs. In some tumor-homing peptides, such as PL3, the C-terminal sequence binding to neuropilin-1 (CendR element) causes their accumulation in normal tissues, especially in the lungs. One approach to improve the tissue distribution and tumor selectivity of those peptides is to mask the CendR element of the peptide with a C-terminal extension sequence, which would serve as a substrate for overexpressed proteases in the tumor (Lingasamy & Teesalu, 2021; Teesalu et al., 2013).

The aim of this bachelor's thesis was to identify proteolytically activated peptides derived from the PL3 peptide which would bind to the tumor but would not accumulate in the lungs. In other words, the aim was to find cryptic CendR peptides that would bind to the NRP-1 b1 domain only after proteolytic cleavage, and would retain binding to the TNC-C domain.

In the experimental part of this bachelor's thesis, the PL3-X4 phage library was treated with urokinase (uPA), and candidate peptides were screened using cell-free phage display. This experiment demonstrated the ability to identify new proteolytically activated tumor penetrating peptides via cell-free phage display, resulting in cryptic peptides. As a result, a number of cryptic peptides were identified which showed positive results in *in vitro* binding experiments as well as in *in vivo* payoff in a glioblastoma mouse model.

Based on the experimental results, This approach can be used in the future for modifying existing multi-targeting peptides to prevent accumulation in healthy tissues, as well as for discovering new proteolytically activated peptides based on the experimental results.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Anand, T., Virmani, N., Bera, B. C., Vaid, R. K., Vashisth, M., Bardajaty, P., Kumar, A., & Tripathi, B. N. (2021). Phage display technique as a tool for diagnosis and antibody selection for coronaviruses. *Current Microbiology*, 78(4), 1124–1134. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02398-9>

André, A., Moutinho, I., Dias, J., & Aires-Da-Silva, F. (2022). *In vivo* Phage Display: A promising selection strategy for the improvement of antibody targeting and drug delivery properties. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962124>

Arap, M. A. (2005). Phage display technology: applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28(1), 1–9. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572005000100001>

Braun, G. B., Sugahara, K. N., Yu, O. M., Kotamraju, V. R., Mölder, T., Lowy, A. M., Ruoslahti, E., & Teesalu, T. (2016). Urokinase-controlled tumor penetrating peptide. *Journal of Controlled Release*, 232, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.027>

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca*. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews. Genetics*, 4(6), 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>

Dean, A., Price, T., Sjoquist, K., ... Harris, M. (2022). 131TiP ASCEND: Randomized, double-blinded phase II study of gemcitabine and nab-paclitaxel with CEND-1 or placebo in untreated metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma - An Australasian Gastro-Intestinal Trials Group (AGITG) trial ACTRN12621001290886. *Annals of Oncology*, 33, S1483. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.167>

- Fan, X., Venegas, R., Fey, R., Van Der Heyde, H., Bernard, M. A., Lazarides, E., & Woods, C. M. (2007). An *in vivo* approach to structure activity relationship analysis of peptide ligands. *Pharmaceutical Research*, 24(5), 868–879. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9238-z>
- Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *PubMed*, 77(3), 311–319. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18297955>
- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., & Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 153(3), 543–554. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.543>
- Hoogenboom, H. R., De Bruïne, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R., Arends, J., & Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/s1380-2933\(98\)00007-4](https://doi.org/10.1016/s1380-2933(98)00007-4)
- Hunt, H., Säälük, P., Toome, K., Vetkas, A., Asser, A., Rätsep, T., Asser, T., & Teesalu, T. (2015). Hõbekuulid vähiteraapias: teel suunatud vähiravi poole. *Eesti Arst*. <https://doi.org/10.15157/ea.v0i0.11994>
- Johns, M., George, A. J., & Ritter, M. A. (2000). *In vivo* selection of sFv from phage display libraries. *Journal of Immunological Methods*, 239(1–2), 137–151. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00152-6](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00152-6)
- Kügler, J., Zantow, J., Meyer, T., & Hust, M. (2013). Oligopeptide M13 phage display in pathogen research. *Viruses*, 5(10), 2531–2545. <https://doi.org/10.3390/v5102531>
- Laakkonen, P., Zhang, L., & Ruoslahti, E. (2008). Peptide targeting of tumor lymph vessels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1131(1), 37–43. <https://doi.org/10.1196/annals.1413.003>

Li, Z. J., & Cho, C. H. (2012). Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery. *Journal of Translational Medicine*, *10*(S1). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-s1-s1>

Lingasamy, P., & Teesalu, T. (2021). Homing peptides for cancer therapy. *Advances in experimental medicine and biology* (pp. 29–48). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-58174-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-58174-9_2)

Lingasamy, P., Tobi, A., Haugas, M., Hunt, H., Paiste, P., Asser, T., Rätsep, T., Kotamraju, V. R., Bjerkgvig, R., & Teesalu, T. (2019). Bi-specific tenascin-C and fibronectin targeted peptide for solid tumor delivery. *Biomaterials*, *219*, 119373. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119373>

Lingasamy, P., Tobi, A., Kurm, K., Kopanchuk, S., Sudakov, A., Salumäe, M., Rätsep, T., Asser, T., Bjerkgvig, R., & Teesalu, T. (2020). Tumor-penetrating peptide for systemic targeting of Tenascin-C. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62760-y>

Liu, R., Li, X., Xiao, W., & Lam, K. S. (2017). Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *110–111*, 13–37. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.009>

Marumoto, T., Tashiro, A., Friedmann-Morvinski, D., Scadeng, M., Soda, Y., Gage, F. H., & Verma, I. M. (2009). Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. *Nature Medicine*, *15*(1), 110–116. <https://doi.org/10.1038/nm.1863>

Mathijssen, R. H., Sparreboom, A., & Verweij, J. (2014). Determining the optimal dose in the development of anticancer agents. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *11*(5), 272–281. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.40>

McGrath, S., & Van Sinderen, D. (2007). *Bacteriophage: genetics and molecular biology*. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA84099649>

Mi, P., Cabral, H., & Kataoka, K. (2019). Ligand-Installed Nanocarriers toward Precision Therapy. *Advanced Materials*, *32*(13). <https://doi.org/10.1002/adma.201902604>

Paasonen, L., Sharma, S., Braun, G. B., ... Teesalu, T. (2016). New p32/gC1qR Ligands for Targeted Tumor Drug Delivery. *ChemBioChem*, 17(7), 570–575. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500564>

Pasqualini, R., & Ruoslahti, E. (1996). Organ targeting *In vivo* using phage display peptide libraries. *Nature*, 380(6572), 364–366. <https://doi.org/10.1038/380364a0>

Pleiko, K., Põšnograjeva, K., Haugas, M., Paiste, P., Tobi, A., Kurm, K., Riekstiņa, U., & Teesalu, T. (2021b). *In vivo* phage display: identification of organ-specific peptides using deep sequencing and differential profiling across tissues. *Nucleic Acids Research*, 49(7), e38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1279>

Põšnograjeva, K., Pleiko, K., Haugas, M., & Teesalu, T. (2021). New tools for streamlined *in vivo* homing peptide identification. In *Methods in molecular biology* (pp. 385–412). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_25)

Rafii, S., Avcilla, S. T., & Jin, D. (2003). Tumor vasculature address book. *Cancer Cell*, 4(5), 331–333. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00278-2](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00278-2)

Roche, J., Drabkin, H. A., & Brambilla, É. (2002). Neuropilin and its ligands in normal lung and cancer. *Advances in experimental medicine and biology* (pp. 103–114). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0119-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0119-0_9)

Ruoslahti, E. (2002). Specialization of tumour vasculature. *Nature Reviews. Cancer*, 2(2), 83–90. <https://doi.org/10.1038/nrc724>

Ruoslahti, E. (2004). Vascular zip codes in angiogenesis and metastasis. *Biochemical Society Transactions*, 32(3), 397–402. <https://doi.org/10.1042/bst0320397>

Ruoslahti, E. (2006). Vascular Zip Codes and Nanoparticle Targeting. In: Ferrari, M., Desai, T., Bhatia, S. (eds) *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-25844-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-0-387-25844-7_7)

Ruoslahti, E. (2011). Homing Peptides and Vascular Zip Codes. In: Schwab, M. (eds) Encyclopedia of Cancer. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5\\_2792](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_2792)

Ruoslahti, E. (2017). Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 110–111, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.008>

Scodeller, P., & Ascitutto, E. K. (2020). Targeting tumors using peptides. *Molecules*, 25(4), 808. <https://doi.org/10.3390/molecules25040808>

Scodeller, P., Simón-Gracia, L., Kopanchuk, S., Tobi, A., ... Teesalu, T. (2017). Precision Targeting of Tumor Macrophages with a CD206 Binding Peptide. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14709-x>

Sharma, S., Kotamraju, V. R., Mölder, T., Tobi, A., Teesalu, T., & Ruoslahti, E. (2017). Tumor-Penetrating nanosystem strongly suppresses breast tumor growth. *Nano Letters*, 17(3), 1356–1364. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b03815>

Sherwood, L. M., Parris, E. E., & Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186. <https://doi.org/10.1056/nejm197111182852108>

Simón-Gracia, L., Hunt, H., & Teesalu, T. (2018). Peritoneal Carcinomatosis Targeting with Tumor Homing Peptides. *Molecules*, 23(5), 1190. <https://doi.org/10.3390/molecules23051190>

Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

Smith, G. P., & Petrenko, V. A. (1997). Phage display. *Chemical Reviews*, 97(2), 391–410. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>

Spénlé, C., Saupe, F., Midwood, K. S., Burckel, H., Noël, G., & Orend, G. (2015). Tenascin-C: Exploitation and collateral damage in cancer management. *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), 141–153. <https://doi.org/10.1080/19336918.2014.1000074>

Steenbrugge, J., Elst, N. V., Demeyere, K., De Wever, O., Sanders, N. N., Van Den Broeck, W., Ciamporcero, E., Perera, T., & Meyer, E. (2021). OMO-1 reduces progression and enhances cisplatin efficacy in a 4T1-based non-c-MET addicted intraductal mouse model for triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41523-021-00234-8>

Sugahara, K. N., Scodeller, P., Braun, G. B., ... Lowy, A. M. (2015). A tumor-penetrating peptide enhances circulation-independent targeting of peritoneal carcinomatosis. *Journal of Controlled Release*, 212, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.009>

Sugahara, K. N., Teesalu, T., Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Agemy, L., Girard, O. M., Hanahan, D., Mattrey, R. F., & Ruoslahti, E. (2009). Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors. *Cancer Cell*, 16(6), 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.10.013>

Sugahara, K. N., Teesalu, T., Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Agemy, L., Greenwald, D. R., & Ruoslahti, E. (2010). Coadministration of a Tumor-Penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*, 328(5981), 1031–1035. <https://doi.org/10.1126/science.1183057>

Säälik, P., Lingasamy, P., Toome, K., ... Teesalu, T. (2019). Peptide-guided nanoparticles for glioblastoma targeting. *Journal of Controlled Release*, 308, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.018>

Zhang, X., Zhang, X., Gao, H., & Qing, G. (2022). Phage display derived peptides for Alzheimer's disease therapy and diagnosis. *Theranostics*, 12(5), 2041–2062. <https://doi.org/10.7150/thno.68636>

Teesalu, T., Sugahara, K. N., & Ruoslahti, E. (2012). Mapping of vascular ZIP codes by phage display. *Methods in enzymology* (pp. 35–56). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-396962-0.00002-1>

Teesalu, T., Sugahara, K. N., & Ruoslahti, E. (2013). Tumor-Penetrating peptides. *Frontiers in Oncology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00216>

Teesalu, T., Sugahara, K. N., Kotamraju, V. R., & Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16157–16162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908201106>

Thorpe, P. E., & Ran, S. (2002). Mapping zip codes in human vasculature. *Pharmacogenomics Journal*, 2(4), 205-206. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500119>

Willats, W. G. (2002). Phage Display: Practicalities and Prospects. *Plant Molecular Biology*, 50(6), 837–854. <https://doi.org/10.1023/a:1021215516430>

## **KASUTATUD VEEBIAADDRESSID**

Biorender <https://www.biorender.com> (16.05.2024)

Maailma Tervishoiu Organisatsioon <https://www.who.int> (05.05.2024)

WebLogo <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> (20.11.2023)

# LISAD

## Lisa 1. Katselooma luba



MAAELUMINISTEERIUM

ASUTUSEISESEKS  
KASUTAMISEKS

Märge tehtud: 05.02.2020

Kehtib kuni: 05.02.2025

Alus: avaliku teabe seadus § 35 lg 1 p 17

Teabevaldaja: Maaeluministeerium

### LOOMKATSEPROJEKTI LOAKOMISJON

#### OTSUS

05.02.2020 nr 159

#### Loomkatseprojekti luba

Loomakaitseaduse § 45 lõike 2 alusel ning loomkatseprojekti loakomisjoni 03.02.2020. a toimunud istungi protokoll nr 103 kohasel otsustati järgmist:

Anda luba Tambet Teesalu (Ravila 14B, 50411 Tartu) loomkatseprojektile, kokkuvõtva nimetusega: „VÄHISELEKTIIVSETE KULLERPEPTIIDIDE VÄLJATÖÖTAMINE JA ISELOOMUSTAMINE“ järgmistel tingimustel:

1. loomkatseprojekti loa omanik, kavandaja ja vastutav isik: Tambet Teesalu (sünd. 24.01.1969, Ravila 14B, 50411 Tartu);
2. loomkatseprojekti kaasatud isikud: Maarja Haugas (sünd. 16.11.1980, Ravila 14B, 50411 Tartu), Pablo Scodeller (sünd. 03.07.1980, Ravila 14B, 50411 Tartu), Lorena Simon Gracia (sünd. 29.10.1982, Ravila 14B, 50411 Tartu), Allan Tobi (sünd. 14.08.1991, Ravila 14B, 50411 Tartu), Prakash Lingasamy (sünd. 02.03.1984, Ravila 14B, 50411 Tartu), Anni Lepland (sünd. 26.01.1993, Ravila 14B, 50411 Tartu), Valeria Skidorenko (sünd. 19.12.1994, Ravila 14B, 50411 Tartu);
3. loomkatseprojekti läbiviimise koht: Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditsiini instituudi katseloomakeskus, tegevusloa nr KL1210;
4. Katseloomade liik ja arv: Kasutatavaks loomaliigiks on hiired (2458 immuundefitsiitset Fox1/nude ja 1740 immuunkompetentset Balb/c hiirt). Kokku 4198 looma;
5. Loa kehtivus: 05.02.2020-05.02.2025
6. loomkatseprojekti hindamisest tulenevad eritingimused:
  - 6.1. Loomkatseprojekti tuleb kooskõlas loomakaitseaduse §-ga 51<sup>1</sup> järelehinna: Ei;
7. muud loomkatseprojekti läbiviimise tingimused:
  - 7.1. Loomkatse käik

#### Loomkatseprojekt koosneb järgnevatest osadest:

- a) Vähiudelilite genereerimine vähirakkude transplantatsioonil naha alla või sihtmärkorganitesse/ kõhuõõnde.
- b) *Ex vivo* ja *in vivo* faagidisplei (a) kasvajaga hiirtele kasvajaspetsiifiliste peptiidide leidmiseks, (b) tiinetele hiirtele platsentat penetreerivate peptiidide identifitseerimiseks ja (c) *wild-type* hiirtele hematoentsefaalbarjääri (HEB) läbivate peptiidide leidmiseks.
- c) Faagidispleiga leitud kandidaatpeptiidide omaduste (vähi/platsenta/HEB selektiivsuse, veresooni- ja kudepenetreerivate omaduste) analüüs. Terminaalsed

koedistributsiooni uuringud vähihiirtel/tiinetel/*wild-type* hiirtel ning *in vivo* angiogeneesi mudelitel (nahaaluse matrigeeeli neovaskularisatsiooni testid).

d) Kandidaatpeptiidide interaktsioonipartnerite (retseptorite) identifitseerimine kasutades afiinsuskromatograafiat ja proteoomikat, ning retseptorite ekspressiooni määramine. Vähiproovide/platsentade/*wild-type* kudede kogumine koeekstraktide valmistamiseks, terminaalset koedistributsiooni uuringud vähihiirtel/tiinetel/*wild-type* hiirtel retseptorite ekspressiooni või aktiivsuse modulatsiooni tingimustes.

e) Vähi penetreerivate peptiidide kasutamine vähiravimite selektiivsuse ja efektiivsuse võimendamiseks ning platsenta ja HEB suhtes selektiivsete kontrastainete välja töötamiseks.

### **Katse 1. Glioomi suhtes selektiivsete kullerpeptiidide väljatöötamine ja iseloomustamine**

#### *a) Glioomide indutseerimine.*

Glioomide indutseerimiseks kasutatakse nii emaseid kui isaseid Foxg1/nude hiiri. Vähirakkude kirurgilise implantatsiooni eel uinutatakse katseloomad anesteetikumiga DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitonaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Preoperatiivselt manustatakse loomadele ka valuvaigistit Carprofen (4 mg/kg), mida süstitakse naha alla. Operatsiooni ajal kaitstakse loomade silmi kuivamise eest silmageeliga. Vältimaks loomade alajahtumist, hoitakse loomi soojamatil (37°C). Glioomide indutseerimiseks ajus avatakse hiire peanahk lõikega, süstlanõelaga puuritakse koljuluusse auk ja glioomirakud ( $3 \times 10^5$  rakku PBS-s) sisestatakse stereotaktiliselt fikseeritud hiire paremasse striatumisse Hamiltoni süstlaga. Süstitava rakususpensiooni hulk on 2,5 µL ja süstimise kiirus 0,5 µL/min. Auk koljus suletakse luuvahaga ja nahahaav suletakse õmblustega. Postoperatiivselt süstitakse loomadele taastumisperioodi jooksul valuvaigistit Carprofeni (4 mg/kg) naha alla minimaalselt kolmel järjestikusel operatsioonijärgsel päeval. Vajadusel jätkatakse valuvaigisti manustamist pikema aja vältel 1 kuni 2 korda päevas.

Hiired, kellel kasvajat ei arene, surmatakse hiljemalt 30 päeva pärast kasvajamudeli arenguperioodi teadaolevat tähtaega.

Operatsioon teostatakse kõikidele puuris olevatele loomadele (enne operatsiooni planeeritakse hiirte arv puuris nii, et katsesse lähevad kõik loomad). Pärast operatsiooni jäävad loomad samasse puuri karjakaupa elama. Loomade üksikmajutust ei kasutata.

Vajaminev loomade arv: 932 Foxg1/nude looma

#### *b) In vivo ja ex vivo faagidisplei kasvajaga hiirtel.*

*In vivo* faagidispleiks süstitakse kasvajaga hiiri intravenoosselt bakteriofaage sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL; faag on eelnevalt PEG8000 sadestamise, tseesium gradient-tsentrifugimise ja dialüüsi abil puhastatud, et eemaldada lipopolüsahhariidid jt. kontaminandid). Faagi tsirkulatsiooni ajal katseloomalt proove ei võeta. Kuna üks osa projektist hõlmab ka skriine veres pikaajaliselt ringlevate peptiidide leidmiseks, toimuvad osad faagidisplei katsed pikema aja jooksul – kuni 24 h. Peale 10 min – 24 h kestvat faagi tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteesiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitonaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Ekssanguinatsioon viiakse läbi perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAga. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (vähk, kontrollkoed) rakususpensioon, mida kasutatakse faagide tiitri määramiseks. Faagi tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal

immuunvastust.

Loomade arv: 150 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud glioom, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel ja kasutame kolme glioomimudelit.

*Ex vivo* faagidisplei jaoks viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Sellele järgneb ekssanguinatsioon perfusioon teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAga. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (vähk, kontrollkoed) homogenaadid, mida inkubeeritakse faagi sisaldava lahusega, et leida sihtmärkoega seonduvaid spetsiifilisi peptiidijärjestusi.

Loomade arv: 150 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud glioom, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel ja kasutame kolme glioomimudelit.

*c) Kandidaatpeptiidide vähiselektiivsuse, veresooni- ja kudepenetreerivate omaduste analüüs.*

Kasvajaga loomi süstitakse intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL). Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min - 24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAga. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi või nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide/nanoosakeste koedistributsiooni, kasutades erinevaid analüütilisi meetodeid (mikroskoopia, ICP-MS, immuunanalüüsid).

Vajadusel hinnatakse raudoksiidi nanoosakestega liidetud peptiidide võimet kasvajasse liikuda, kasutades tuumamagnetresonantsi (MRI). Selleks pannakse hiir fikseeritult magnetvälja tekitava pooli ja raadiolaineid saatvate ja vastuvõtivate poolidega tunnelisse ja anesteseeritakse uuringu ajaks õhu-isofluoraaniseguga. Raadiolainete abil ergastunud vesiniku tuumad produtseerivad signaale, mis muudetakse kujutisteks. MRI on leebe raskusastmega loomkatse. Loomi kuvatakse korduvalt iga nädala möödudes alates tuumori indutseerimisest (kokku maksimaalselt neli kuvamist). Kumulatiivne mõju puudub, kuna katsete vahel on vähemalt üks nädal.

Loomade arv: 288 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud glioom, sest arvestuslikult plaanime analüüsida 15 kandidaatpeptiidi + kontrollpeptiid kolmes glioomimudelil ja statistilise usaldusväärsuse saamiseks kasutame 6 looma.

*d) Kandidaatpeptiidide interaktsioonipartnerite (retseptorid) identifitseerimine kasutades afinsuskromatograafiat ja proteoomikat ning retseptorite ekspressiooni määramine.*

Koedistributsiooni uuringute jaoks süstitakse kasvajaga loomi intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega, mille maht on 0.05-0.1 mL. Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min -24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse

anesteesiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happedetergendi lahusega või 4% PFAga. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi/nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide või nanoosakeste koedistributsiooni. Kudede kogumine koekstraktide valmistamiseks on taastumatu elutegevusega katse.

Loomade arv: 144 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud glioom, sest arvestuslikult plaanime retseptorid identifitseerida 5 kandidaatpeptiidi jaoks kahes tuumorimudelil ja biokeemiliseks analüüsiks piisava koekoguse saamiseks läheb vaja 6 individuaalset tuumorit (kokku 60 hiirt); identifitseeritud 3 retseptori ekspresioonianalüüsiks kasutame kokku 7 tuumorimudelit ja statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks on teste vaja korrata 4 loomaga (kokku: 84 hiirt).

*e) Vähi penetreerivate peptiidide kasutamine vähiravimite selektiivsuse ja efektiivsuse võimendamiseks.*

Kullerpeptiididega konjugeeritud ravimeid või ravimeid kandvad nanoosakesed (doxorubicin, utorubicin, abraxane, cisplatin jt. - täpne otsustamine toimub hiljem sõltuvalt sellest, millise ravimi keemiline konjugeerimine peptiididega osutub kõige efektiivsemaks ning konjugaatide *in vitro* aktiivsusest) manustatakse kasvajaga hiirtele režiimis, mis vastab konsensuslikule kliiniliselt rakendatavale doosile, sagedusele ja süstimisviisile (nahaalune, veenisine, kõhuõõnesine süstimine) ja mida me oleme kasutanud oma senistes uuringutes (Teesalu et al., 2009, Sugahara et al. 2009 ja 2010).

Vajaminev katseloomade arv: 200 Foxg1/nude, kellel on indutseeritud glioom. Katseloomade arvu oleme arvutanud järgmiselt: eksperimentaalteraapiaks moodustame 5 loomarühma ühe vähimudeli kohta. Rühmad moodustame järgnevalt:

1. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud käesoleva katse käigus identifitseeritud uue kullerpeptiidiga
2. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga (järjestus on uue kullerpeptiidi skrambleeritud versioon)
3. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDKGPDC (iRGD),
4. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDC,
5. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega PBS-i või ravimit, mis ei ole kullerpeptiidiga konjugeeritud

Teraapia viime läbi kahel vähimudelil ehk 10 rühmaga. Igas rühmas kasutame statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks 5 looma, seega ühe uue peptiidi analüüsimiseks kahel vähimudelil kasutame 50 looma. Viieaastase projekti käigus plaanime analüüsida 4 uut peptiidi, mis teeb loomade arvuks 200.

Katse kestus: Loomad, kellel on indutseeritud glioom, on katses 30-60 päeva, mis sõltub kasvaja indutseerimiseks kasutatud rakuliinist. Ühel glioomi kandval loomal kasutame ühte kirjeldatud protseduuri (b-e), mille lõpus loom hukatakse.

## **Katse 2. Eesnäärmevähi suhtes selektiivsete kullerpeptiidide väljatöötamine ja iseloomustamine**

*a) Ortotoopse eesnäärmevähi indutseerimine.*

Ortotoopsete eesnäärmevähi mudeli loomiseks kasutatakse isaseid Foxg1/nude hiiri.

Vähirakkude kirurgilise implantatsiooni eel uinutatakse katseloomad anesteetikumiga DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomiidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Preoperatiivselt manustatakse loomadele ka valuvaigistit Carprofen (4 mg/kg), mida süstitakse naha alla. Operatsiooni ajal kaitstakse loomade silmi kuivamise eest silmageeliga. Vältimaks loomade alajahtumist, hoitakse loomi soojamatil (37°C). Kasvajarakud süstitakse eesnäärme eessagarasse. Selleks avatakse laminaarkapi all steriilsetes tingimustes katselooma kõhuõõs ning süstitakse kasvajakud (5e5-5e6 raku PBSis, maht 5-50 µL) relevantssesse organisse. Kõhuõõne sein suletakse õmblustega, nahahaav suletakse õmblustega ja desinfitseeritakse. Postoperatiivselt süstitakse loomadele taastumisperioodi jooksul valuvaigistit Carprofeni (4 mg/kg) naha alla minimaalselt kolmel järjestikusel operatsioonijärgsel päeval. Vastavalt vajadusele manustatakse postoperatiivset valuvaigistit pikema aja vältel 1 kuni 2 korda päevas.

Hiired, kellel kasvajat ei arene, surmatakse hiljemalt 30 päeva pärast kasvajamudeli arenguperioodi teadaolevat tähtaega.

Operatsioon teostatakse kõikidele puuris olevatele loomadele (enne operatsiooni planeeritakse hiirte arv puuris nii, et katsesse lähevad kõik loomad). Pärast operatsiooni jäävad loomad samasse puuri karjakaupa elama. Loomade üksikmajutust ei kasutata.

Vajaminev loomade arv: 514 Foxg1/nude hiirt.

*b) In vivo ja ex vivo faagidisplei kasvajaga hiirtel.*

*In vivo* faagidispleiks süstitakse kasvajaga hiiri intravenoosselt bakteriofaage sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL; faag on eelnevalt PEG8000 sadestamise, tseesium gradient-tsentrifugimise ja dialüüsi abil puhastatud, et eemaldada lipopolüsahhariidid jt. kontaminandid). Faagi tsirkulatsiooni ajal katseloomalt proove ei võeta. Kuna üks osa projektist hõlmab ka skriine veres pikaajaliselt ringlevate peptiidide leidmiseks, toimuvad osad faagidisplei katsed pikema aja jooksul – kuni 24 h. Peale 10 min – 24 h kestvat faagi tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomiidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Ekssanguinatsioon viiakse läbi perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAga. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (vähk, kontrollkoed) rakususpensioon, mida kasutatakse faagide tiitri määramiseks. Faagi tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust.

Loomade arv: 100 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel ja kasutame kahte kasvajamudelit.

*Ex vivo* faagidisplei jaoks viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomiidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Sellele järgneb ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAga. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (vähk, kontrollkoed) homogenaadid, mida inkubeeritakse faagi sisaldava lahusega, et leida sihtmärkkoega seonduvaid spetsiifilisi peptiidijärjestusi.

Loomade arv: 100 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel ja kasutame kahte kasvajamudelit.

*c) Kandidaatpeptiidide vähiselektiivsuse, veresooni- ja kudepenetreerivate omaduste analüüs.*

Kasvajaga loomi süstitakse intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL). Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min - 24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi või nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide/nanoosakeste koedistributsiooni, kasutades erinevaid analüütilisi meetodeid (mikroskoopia, ICP-MS, immuunanalüüsid).

Vajadusel hinnatakse raudoksiidi nanoosakestega liidetud peptiidide võimet kasvajasse liikuda, kasutades tuumamagnetresonantsi (MRI). Selleks pannakse hiir fikseeritult magnetvälja tekitava pooli ja raadiolaineid saatvate ja vastuvõtivate poolidega tunnelisse ja anesteseeritakse uuringu ajaks õhu-isofluoraaniseguga. Raadiolainete abil ergastunud vesiniku tuumad produtseerivad signaale, mis muudetakse kujutisteks. MRI on leebe raskusastmega loomkatse. Loomi kuvatakse korduvalt iga nädala möödudes alates tuumori indutseerimisest (kokku maksimaalselt neli kuvamist). Kumulatiivne mõju puudub, kuna katsete vahel on vähemalt üks nädal.

Loomade arv: 72 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest arvestuslikult plaanime analüüsida 5 kandidaatpeptiidi + kontrollpeptiid kahes kasvajamudelil ja statistilise usaldusväärsuse saamiseks kasutame 6 looma.

*d) Kandidaatpeptiidide interaktsioonipartnerite (retseptorid) identifitseerimine kasutades afiinsuskromatograafiat ja proteoomikat ning retseptorite ekspressiooni määramine.*

Koedistributsiooni uuringute jaoks süstitakse kasvajaga loomi intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega, mille maht on 0.05-0.1 mL. Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min -24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi/nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide või nanoosakeste koedistributsiooni. Kudede kogumine koeekstraktide valmistamiseks on taastumatu elutegevusega katse.

Loomade arv: 92 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest arvestuslikult plaanime retseptorid identifitseerida 3 kandidaatpeptiidi jaoks kahes tuumorimudelil ja biokeemiliseks analüüsiks piisava koekoguse saamiseks läheb vaja 6 individuaalset tuumorit (kokku 36 hiirt); identifitseeritud 2 retseptori ekspressioonianalüüsiks kasutatame kokku 7 tuumorimodelit ja statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks on teste vaja korrata 4 loomaga (kokku: 56 hiirt).

*e) Vähki penetreerivate peptiidide kasutamine vähiravimite selektiivsuse ja*

*efektiivsuse võimendamiseks.*

Kullerpeptiididega konjugeeritud ravimeid või ravimeid kandvad nanoosakesed (doxorubicin, utorubicin, abraxane, cisplatin jt. - täpne otsustamine toimub hiljem sõltuvalt sellest, millise ravimi keemiline konjugeerimine peptiididega osutub kõige efektiivsemaks ning konjugaatide *in vitro* aktiivsusest) manustatakse kasvajaga hiirtele režiimis, mis vastab konsensuslikule kliiniliselt rakendatavale doosile, sagedusele ja süstimisviisile (nahaalune, veenisine, kõhuõõnesine süstimine) ja mida me oleme kasutanud oma senistes uuringutes (Teesalu et al., 2009, Sugahara et al. 2009 ja 2010).

Vajaminev katseloomade arv: 150 Foxg1/nude, kellel on indutseeritud kasvaja. Katseloomade arvu oleme arvutanud järgmiselt: eksperimentaalteraapiaks moodustame 5 loomarühma ühe vähimudeli kohta. Rühmad moodustame järgnevalt:

1. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud käesoleva katse käigus identifitseeritud uue kullerpeptiidiga

2. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga (järjestus on uue kullerpeptiidi skrambleeritud versioon)

3. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDKGPDC (iRGD),

4. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDC,

5. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega PBS-i või ravimit, mis ei ole kullerpeptiidiga konjugeeritud

Teraapia viime läbi kahel vähimudelil ehk 10 rühmaga. Igas rühmas kasutame statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks 5 looma, seega ühe uue peptiidi analüüsiks kasutame 50 looma. Viieaastase projekti käigus plaanime analüüsida 3 uut peptiidi, mis teeb loomade arvuks 150.

Katse kestus: Loomad, kellel on indutseeritud eesnäärme kasvaja, on katses 30-60 päeva, mis sõltub kasvaja indutseerimiseks kasutatud rakuliinist. Ühel kasvajat kandval loomal kasutame ühte kirjeldatud protseduuri (b-e), mille lõpus loom hukatakse.

### **Katse 3. Pankreasevähi suhtes selektiivsete kullerpeptiidide väljatöötamine ja iseloomustamine**

#### *a) Ortotoopse pankreasevähi indutseerimine.*

Ortotoopsete pankreasevähi mudeli loomiseks kasutatakse nii isaseid kui emaseid Foxg1/nude hiiri. Vähirakkude kirurgilise implantatsiooni eel uinutatakse katseloomad anesteetikumiga DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Preoperatiivselt manustatakse loomadele ka valuvaigistit Carprofen (4 mg/kg), mida süstitakse naha alla. Operatsiooni ajal kaitstakse loomade silmi kuivamise eest silmageeliga. Vältimaks loomade alajahtumist, hoitakse loomi soojamatil (37°C). Kasvajarakud süstitakse pankrease põrnasagarasse. Selleks avatakse laminaarkapi all steriilsetes tingimustes katselooma kõhuõõs ning süstitakse kasvajarakud (5e5-5e6 rakku PBSis, maht 5-50 µL) relevantssesse organisse. Kõhuõõne sein suletakse õmblustega, nahahaav suletakse õmblustega ja desinfitseeritakse. Postoperatiivselt süstitakse loomadele taastumisperioodi jooksul valuvaigistit Carprofeni (4 mg/kg) naha alla minimaalselt kolmel järjestikusel operatsioonijärgsel päeval. Vastavalt vajadusele manustatakse postoperatiivset valuvaigistit pikema aja vältel 1 kuni 2 korda päevas.

Hiired, kellel kasvajat ei arene, surmatakse hiljemalt 30 päeva pärast kasvajamudeli

arenguperioodi teadaolevat tähtaega.

Operatsioon teostatakse kõikidele puuris olevatele loomadele (enne operatsiooni planeeritakse hiirte arv puuris nii, et katsesse lähevad kõik loomad). Pärast operatsiooni jäävad loomad samasse puuri karjakaupa elama. Loomade üksikmajutust ei kasutata.

Vajaminev loomade arv: 514 Foxg1/nude hiirt.

*b) In vivo ja ex vivo faagidisplei kasvajaga hiirtel.*

*In vivo* faagidispleiks süstitakse kasvajaga hiiri intravenoosselt bakteriofaage sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL; faag on eelnevalt PEG8000 sadestamise, tseesium gradient-tsentrifugimise ja dialüüsi abil puhastatud, et eemaldada lipopolüsahhariidid jt. kontaminandid). Faagi tsirkulatsiooni ajal katseloomalt proove ei võeta. Kuna üks osa projektist hõlmab ka skriine veres pikaajaliselt ringlevate peptiidide leidmiseks, toimuvad osad faagidisplei katsed pikema aja jooksul – kuni 24 h. Peale 10 min – 24 h kestvat faagi tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Ekssanguinatsioon viiakse läbi perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (vähk, kontrollkoed) rakususpensioon, mida kasutatakse faagide tiitri määramiseks. Faagi tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust.

Loomade arv: 100 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel ja kasutame kahte kasvajamudelit.

*Ex vivo* faagidisplei jaoks viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Sellele järgneb ekssanguinatsioon perfusioon teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (vähk, kontrollkoed) homogenaadid, mida inkubeeritakse faagi sisaldava lahusega, et leida sihtmärkkoega seonduvaid spetsiifilisi peptiidijärjestusi.

Loomade arv: 100 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel ja kasutame kahte kasvajamudelit.

*c) Kandidaatpeptiidide vähiselektiivsuse, veresooni- ja kudepenetreerivate omaduste analüüs.*

Kasvajaga loomi süstitakse intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL). Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min - 24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi või nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide/nanoosakeste koedistributsiooni, kasutades erinevaid analüütilisi meetodeid (mikroskoopia, ICP-MS, immuunanalüüsid).

Vajadusel hinnatakse raudoksiidi nanoosakestega liidetud peptiidide võimet kasvajasse liikuda, kasutades tuumamagnetresonantsi (MRI). Selleks pannakse hiir fikseeritult magnetvälja tekitava pooli ja raadiolaineid saatvate ja vastuvõtivate poolidega tunnelisse ja anesteeritakse uuringu ajaks õhu-isofluoraaniseguga. Raadiolainete abil ergastunud vesiniku tuumad produtseerivad signaale, mis muudetakse kujutisteks. MRI on leebe raskusastmega loomkatse. Loomi kuvatakse korduvalt iga nädala möödudes alates tuumori indutseerimisest (kokku maksimaalselt neli kuvamist). Kumulatiivne mõju puudub, kuna katsete vahel on vähemalt üks nädal.

Loomade arv: 72 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest arvestuslikult plaanime analüüsida 5 kandidaatpeptiidi + kontrollpeptiidid kahes kasvajamudelid ja statistilise usaldusväärsuse saamiseks kasutame 6 looma.

*d) Kandidaatpeptiidide interaktsioonipartnerite (retseptorid) identifitseerimine kasutades afiinsuskromatograafiat ja proteoomikat ning retseptorite ekspressiooni määramine.*

Koedistributsiooni uuringute jaoks süstitakse kasvajaga loomi intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega, mille maht on 0.05-0.1 mL. Dooside suurus on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min -24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteesiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happedetergendi lahusega või 4% PFAga. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi/nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide või nanoosakeste koedistributsiooni. Kudede kogumine koeekstraktide valmistamiseks on taastumatu elutegevusega katse.

Loomade arv: 92 Foxg1/nude hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest arvestuslikult plaanime retseptorid identifitseerida 3 kandidaatpeptiidi jaoks kahes tuumorimudelid ja biokeemiliseks analüüsiks piisava koekoguse saamiseks läheb vaja 6 individuaalset tuumorit (kokku 36 hiirt); identifitseeritud 2 retseptori ekspressioonianalüüsiks kasutame kokku 7 tuumorimudelit ja statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks on teste vaja korrata 4 loomaga (kokku: 56 hiirt).

*e) Vähi penetreerivate peptiidide kasutamine vähiravimite selektiivsuse ja efektiivsuse võimendamiseks.*

Kullerpeptiididega konjugeeritud ravimeid või ravimeid kandvad nanoosakesed (doxorubicin, utorubicin, abraxane, cisplatin jt. - täpne otsustamine toimub hiljem sõltuvalt sellest, millise ravimi keemiline konjugeerimine peptiididega osutub kõige efektiivsemaks ning konjugaatide *in vitro* aktiivsusest) manustatakse kasvajaga hiirtele režiimis, mis vastab konsensuslikule kliiniliselt rakendatavale doosile, sagedusele ja süstimisviisile (nahaalune, veenisisene, kõhuõõnesisene süstimine) ja mida me oleme kasutanud oma senistes uuringutes (Teesalu et al., 2009, Sugahara et al. 2009 ja 2010).

Vajaminev katseloomade arv: 150 Foxg1/nude, kellel on indutseeritud kasvaja. Katseloomade arvu oleme arvutanud järgmiselt: eksperimentaalteraapiaks moodustame 5 loomarühma ühe vähimudeli kohta. Rühmad moodustame järgnevalt: 1. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisisese süstega ravimit, mis on konjugeeritud käesoleva katse käigus identifitseeritud uue kullerpeptiidiga

2. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisese süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga (järjestus on uue kullerpeptiidi skrambleeritud versioon)

3. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisese süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDKGPDC (iRGD),

4. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisese süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDC,

5. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisese süstega PBS-i või ravimit, mis ei ole kullerpeptiidiga konjugeeritud

Teraapia viime läbi kahel vähimudelil ehk 10 rühmaga. Igas rühmas kasutame statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks 5 looma, seega ühe uue peptiidi analüüsiks kasutame 50 looma. Viieaastase projekti käigus plaanime analüüsida 3 uut peptiidi, mis teeb loomade arvaks 150.

Katse kestus: Loomad, kellel on indutseeritud pankreasekasvaja, on katses 30-60 päeva, mis sõltub kasvaja indutseerimiseks kasutatud rakuliinist. Ühel kasvajat kandval loomal kasutame ühte kirjeldatud protseduuri (b-e), mille lõpus loom hukatakse.

#### **Katse 4. Subkutaanselt indutseeritud kasvajate suhtes selektiivsete kullerpeptiidide väljatöötamine ja iseloomustamine**

##### *a) Nahaaluste vähimudelite tekitamine.*

Vähirakud (5e5-5e6 rakku PBS-s, maht 5-50 µL) süstitakse nahaaluselt looma alaseljale või piimanäärmesse. Nahaalused kasvajakud indutseeritakse Foxg1/nude hiirtes, piimanäärme kasvajakud indutseerimiseks kasutatakse Balb/c hiiri.

Osadel juhtudel süstitakse vähirakud naha alla matrigeelis (5e5-5e6 rakku matrigeelis, maht 50 µL) looma alaseljale.

Osades kasutatavatest vähirakuliinidest on HIF1α ekspressioon alla surutud ning nende rakuliinide hiirtesse implanteerimisel on tulemuseks pärsitud angiogeneesi tuumorid.

Vajaminev katseloomade arv: 498 Foxg1/nude hiirt ja 698 Balb/c hiirt.

##### *b) In vivo ja ex vivo faagidisplei kasvajatega hiirtel.*

*In vivo* faagidispleiks süstitakse vähikasvajaga või kasvajata hiiri intravenoosselt bakteriofaage sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL; faag on eelnevalt PEG8000 sadestamise, tseesium gradient-tsentrifugimise ja dialüüsi abil puhastatud, et eemaldada lipopolüsahhariidid jt. kontaminandid). Faagi tsirkulatsiooni ajal katseloomalt proove ei võeta. Kuna üks osa projektist hõlmab ka skriini veres pikaajaliselt ringlevate peptiidide leidmiseks, toimuvad osad faagidisplei katsed pikema aja jooksul – kuni 24 h. Peale 10 min – 24 h kestvat faagi tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Ekssanguinatsioon viiakse läbi perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAga. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (vähk, kontrollkoed) rakususpensioon, mida kasutatakse faagide tiitri määramiseks. Faagi tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust.

Loomade arv: 100 Foxg1/nude hiirt, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel ja kasutame kahte kasvajamudelit ning 200 Balb/c hiirt, sest kasutame nelja kasvajamudelit.

*Ex vivo* faagidisplei jaoks viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Sellele järgneb ekssanguinatsioon perfusioon teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (vähk, kontrollkoed) homogenaadid, mida inkubeeritakse faagi sisaldava lahusega, et leida sihtmärkkoega seonduvaid spetsiifilisi peptiidijärjestusi. *Ex vivo* katsed on taastumatu elutegevusega. Loomade arv: 100 Foxg1/nude hiirt, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel ja kasutame kahte kasvajamudelit ning 200 Balb/c hiirt, sest kasutame nelja kasvajamudelit.

*c) Kandidaatpeptiidide vähiselektiivsuse, veresooni- ja kudepenetreerivate omaduste analüüs.*

Loomi süstitakse intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL). Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min - 24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi või nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide/nanoosakeste koedistributsiooni, kasutades erinevaid analüütilisi meetodeid (mikroskoopia, ICP-MS, immuunanalüüsid).

Vajadusel hinnatakse raudoksiidi nanoosakestega liidetud peptiidide võimet kasvajasse liikuda, kasutades tuumamagnetresonantsi (MRI). Selleks pannakse hiir fikseeritult magnetvälja tekitava pooli ja raadiolaineid saatvate ja vastuvõtivate poolidega tunnelisse ja anesteseeritakse uuringu ajaks õhu-isofluoraaniseguga. Raadiolainete abil ergastunud vesiniku tuumad produtseerivad signaale, mis muudetakс kujutisteks. MRI on leebe raskusastmega loomkatse. Loomi kuvatakse korduvalt iga nädala möödudes alates tuumori indutseerimisest (kokku maksimaalselt neli kuvamist). Kumulatiivne mõju puudub, kuna katsete vahel on vähemalt üks nädal.

Loomade arv: 72 Foxg1/nude hiirt ja 72 Balb/c hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest arvestuslikult plaanime analüüsida 5 kandidaatpeptiidi + kontrollpeptiid kahes kasvajamudelis ja statistilise usaldusväärsuse saamiseks kasutame 6 looma.

*d) Kandidaatpeptiidide interaktsioonipartnerite (retseptorid) identifitseerimine kasutades afiinsuskromatograafiat ja proteoomikat ning retseptorite ekspressiooni määramine.*

Koedistributsiooni uuringute jaoks süstitakse loomi intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega, mille maht on 0.05-0.1 mL. Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min -24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi

lahusega või 4% PFAga. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi/nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide või nanoosakeste koedistributsiooni. Kudede kogumine koeekstraktide valmistamiseks on taastumatu elutegevusega katse.

Loomade arv: 76 Foxg1/nude hiirt ja 76 Balb/c hiirt, kellel on indutseeritud kasvaja, sest arvestuslikult plaanime retseptorid identifitseerida 3 kandidaatpeptiidi jaoks kahes tuumorimudelil ja biokeemiliseks analüüsiks piisava koekoguse saamiseks läheb vaja 6 individuaalset tuumorit (kokku 36 hiirt); identifitseeritud 2 retseptori ekspresioonianalüüsiks kasutame kokku 5 tuumorimudelit ja statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks on teste vaja korrata 4 loomaga (kokku: 40 hiirt).

*e) Vähi penetreerivate peptiidide kasutamine vähiravimite selektiivsuse ja efektiivsuse võimendamiseks.*

Kullerpeptiididega konjugeeritud ravimeid või ravimeid kandvad nanoosakesed (doxorubicin, utorubicin, abraxane, cisplatin jt. - täpne otsustamine toimub hiljem sõltuvalt sellest, millise ravimi keemiline konjugeerimine peptiididega osutub kõige efektiivsemaks ning konjugaatide *in vitro* aktiivsusest) manustatakse kasvajaga hiirtele režiimis, mis vastab konsensuslikule kliiniliselt rakendatavale doosile, sagedusele ja süstimisviisile (nahaalune, veenisine, kõhuõõnesine süstimine) ja mida me oleme kasutanud oma senistes uuringutes (Teesalu et al., 2009, Sugahara et al. 2009 ja 2010).

Vajaminev katseloomade arv: 150 Foxg1/nude ja 150 Balb/c, kellel on indutseeritud kasvaja. Katseloomade arvu oleme arvutanud järgmiselt: eksperimentaalteraapiaks moodustame 5 loomarühma ühe vähimudeli kohta. Rühmad moodustame järgnevalt:

1. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud käesoleva katse käigus identifitseeritud uue kullerpeptiidiga
2. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga (järjestus on uue kullerpeptiidi skrambleeritud versioon)
3. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDKGPDC (iRGD),
4. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDC,
5. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega PBS-i või ravimit, mis ei ole kullerpeptiidiga konjugeeritud

Teraapia viime läbi kahel vähimudelil ehk 10 rühmaga. Igas rühmas kasutame statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks 5 looma, seega ühe uue peptiidi analüüsiks kasutame 50 looma. Viieaastase projekti käigus plaanime analüüsida 3 uut peptiidi, mis teeb loomade arvuks 150.

Katse kestus: Loomad, kellel on indutseeritud nahaalunekasvaja, on katses 30-60 päeva, mis sõltub kasvaja indutseerimiseks kasutatud rakuliinist. Ühel kasvajat kandval loomal kasutame ühte kirjeldatud protseduuri (b-e), mille lõpus loom hukatakse.

#### **Katse 5. Platsentat läbivate kullerpeptiidide väljatöötamine ja iseloomustamine** *a) Platsenta kogumine.*

Platsentad kogutakse järgnevat protseduuride (b-e) käigus emastelt Balb/c hiirtelt 18 päeva pärast paaritumist Balb/c isaste hiirtega.

Vajaminev loomade arv: 316 Balb/c emast hiirt.

*b) In vivo ja ex vivo faagidisplei*

*In vivo* faagidispleiks süstitakse hiiri intravenoosselt bakteriofaage sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL; faag on eelnevalt PEG8000 sadestamise, tseesium gradient-tsentrifugimise ja dialüüsi abil puhastatud, et eemaldada lipopolüsahhariidid jt. kontaminandid). Faagi tsirkulatsiooni ajal katseloomalt proove ei võeta. Kuna üks osa projektist hõlmab ka skriine veres pikaajaliselt ringlevate peptiidide leidmiseks, toimuvad osad faagidisplei katsed pikema aja jooksul – kuni 24 h. Peale 10 min – 24 h kestvat faagi tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Ekssanguinatsioon viiakse läbi perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (platsenta, kontrollkoed) rakususpensioon, mida kasutatakse faagide tiitri määramiseks. Faagi tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust.

Loomade arv: 50 Balb/c hiirt, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel.

*Ex vivo* faagidisplei jaoks viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Sellele järgneb ekssanguinatsioon perfusioon teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (platsenta, kontrollkoed) homogenaadid, mida inkubeeritakse faagi sisaldava lahusega, et leida sihtmärkoega seonduvaid spetsiifilisi peptiidijärjestusi. *Ex vivo* katsed on taastumatu elutegevusega.

Loomade arv: 50 Balb/c emast hiirt, sest faagidisplei skriinis on loomade vajaduseks 50 hiirt/mudel.

*c) Kandidaatpeptiidide selektiivsuse, veresooni- ja kudепенetreerivate omaduste analüüs.*

Loomi süstitakse intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL). Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min - 24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi või nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide/nanoosakeste koedistributsiooni, kasutades erinevaid analüütilisi meetodeid (mikroskoopia, ICP-MS, immuunanalüüsid).

Vajadusel hinnatakse raudoksiidi nanoosakestega liidetud peptiidide võimet platsentasse liikuda, kasutades tuumamagnetresonantsi (MRI). Selleks pannakse hiir fikseeritult magnetvälja tekitava pooli ja raadiolaineid saatvate ja vastuvõtivate poolidega tunnelisse ja anesteeseeritakse uuringu ajaks õhu-isofluoraaniseguga. Raadiolainete abil ergastunud vesiniku tuumad produtseerivad signaale, mis muudetakse kujutisteks. MRI on leebe raskusastmega loomkatse. Loomi kuvatakse katse jooksul maksimaalselt neli korda.

Loomade arv: Arvestuslikult plaanime analüüsida 10 kandidaatpeptiidi + kontrollpeptiidi. Statistilise usaldusväärsuse saamiseks kasutame ühe peptiidi analüüsimiseks 6 looma, mis teeb kokkuvõtvalt loomade arvuks 66 Balb/c emast hiirt.

*d) Kandidaatpeptiidide interaktsioonipartnerite (retseptorid) identifitseerimine kasutades afiinsuskromatograafiat ja proteoomikat ning retseptorite ekspressiooni määramine.*

Koedistributsiooni uuringute jaoks süstitakse loomi intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega, mille maht on 0.05-0.1 mL. Dooside suurus on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min -24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteesiasesse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi eksanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAga. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi/nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide või nanoosakeste koedistributsiooni. Kudede kogumine koeekstraktide valmistamiseks on taastumatu elutegevusega katse.

Loomade arv: 50 Balb/c emast hiirt, sest arvestuslikult plaanime retseptorid identifitseerida 7 kandidaatpeptiidi jaoks ja biokeemiliseks analüüsiks piisava koekoguse saamiseks läheb vaja 6 individuaalset platsentat (kokku 42 hiirt); identifitseeritud 2 retseptori ekspressioonianalüüsiks on teste vaja korrata 4 loomaga (kokku: 8 hiirt).

*e) Platsentat penetreerivate peptiidide kasutamine selektiivsuse ja efektiivsuse võimendamiseks.*

Kullerpeptiididega konjugeeritud ravimeid või ravimeid kandvad nanoosakesed (näiteks paklitaksel, doksorubiin ja gemtsitabiin; täpne otsustamine toimub hiljem sõltuvalt sellest, millise ravimi keemiline konjugeerimine peptiididega osutub kõige efektiivsemaks ning konjugaatide *in vitro* aktiivsusest) manustatakse hiirtele režiimis, mis vastab konsensuslikule kliiniliselt rakendatavale doosile, sagedusele ja süstimisviisile (nahaalune, veenisine, kõhuõõnesine süstimine).

Vajaminev katseloomade arv: 100 Balb/c hiirt. Katseloomade arvu oleme arvutanud järgmiselt: eksperimentaalteraapiaks moodustame 5 loomarühma. Rühmad moodustame järgnevalt:

1. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud käesoleva katse käigus identifitseeritud uue kullerpeptiidiga
2. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga (järjestus on uue kullerpeptiidi skrambleeritud versioon)
3. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDKGPDC (iRGD),
4. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDC,
5. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisise süstega PBS-i või ravimit, mis ei ole kullerpeptiidiga konjugeeritud

Igas rühmas kasutame statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks 5 looma, seega ühe uue peptiidi analüüsiks kasutame 25 looma. Viieaastase projekti käigus plaanime

analüüsida 4 uut peptiidi, mis teeb loomade arvaks 100.

Katse kestus: Loomad on katses kuni 18 päeva. Ühel loomal kasutame ühte kirjeldatud protseduuri (b-e), mille lõpus loom hukatakse.

**Katse 6. Hematoentsefaalbarjääri (HEB) läbivate kullerpeptiidide väljatöötamine ja iseloomustamine**

*a) Materjali kogumine.*

Antud katses kasutatakse Balb/c emaseid ja isaseid hiiri võrdsetl ning analüüsitakse nende loomade aju. Selles katses olevatel loomadel kasvajat ei indutseerita. Kasutame 8-20 nädala vanuseid, täiskasvanueas olevaid loomi.

Vajaminev loomade arv: 726 Balb/c hiirt.

*b) In vivo ja ex vivo faagidisplei.*

*In vivo* faagidispleiks süstitakse hiiri intravenooselt bakteriofaage sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL; faag on eelnevalt PEG8000 sadestamise, tseesium gradient-tsentrifugeerimise ja dialüüsi abil puhastatud, et eemaldada lipopolüsahhariidid jt. kontaminandid). Faagi tsirkulatsiooni ajal katseloomalt proove ei võeta. Kuna üks osa projektist hõlmab ka skriine veres pikaajaliselt ringlevate peptiidide leidmiseks, toimuvad osad faagidisplei katsed pikema aja jooksul – kuni 24 h. Peale 10 min – 24 h kestvat faagi tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Ekssanguinatsioon viiakse läbi perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (aju, kontrollkoed) rakususpensioon, mida kasutatakse faagide tiitri määramiseks. Faagi tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust.

Loomade arv: 200 Balb/c hiirt.

*Ex vivo* faagidisplei jaoks viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Sellele järgneb ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Seejärel teostatakse nekropsia ning tekitatakse kudedest (aju, kontrollkoed) homogenaadid, mida inkubeeritakse faagi sisaldava lahusega, et leida sihtmärkoega seonduvaid spetsiifilisi peptiidijärjestusi. *Ex vivo* katsed on taastumatu elutegevusega.

Loomade arv: 200 Balb/c hiirt.

*c) Kandidaatpeptiidide selektiivsuse, veresooni- ja kudepenetreerivate omaduste analüüs.*

Loomi süstitakse intravenooselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega (maht 0.05-0.1 mL). Dooside suurused on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min - 24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteessiasse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidiini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi ekssanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAGA. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi või nanoosakeste tsirkulatsiooni järel

viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide/nanoosakeste koedistributsiooni, kasutades erinevaid analüütilisi meetodeid (mikroskoopia, ICP-MS, immuunanalüüsid).

Vajadusel hinnatakse raudoksiidi nanoosakestega liidetud peptiidide võimet aju liikuda, kasutades tuumamagnetresonantsi (MRI). Selleks pannakse hiir fikseeritult magnetvälja tekitava pooli ja raadiolaineid saatvate ja vastuvõtivate poolidega tunnelisse ja anesteseeritakse uuringu ajaks õhu-isofluoraaniseguga. Raadiolainete abil ergastunud vesiniku tuumad produtseerivad signaale, mis muudetakse kujutisteks. MRI on leebe raskusastmega loomkatse. Loomi kuvatakse maksimaalselt neli korda.

Loomade arv: Arvestuslikult plaanime analüüsida 20 kandidaatpeptiidi + kontrollpeptiidi. Statistilise usaldusväärsuse saamiseks kasutame ühe peptiidi analüüsimiseks 6 looma, mis teeb kokkuvõtvalt loomade arvuks 126 Balb/c emast hiirt.

*d) Kandidaatpeptiidide interaktsioonipartnerite (retseptorid) identifitseerimine kasutades afiinsuskromatograafiat ja proteoomikat ning retseptorite ekspressiooni määramine.*

Koedistributsiooni uuringute jaoks süstitakse loomi intravenoosselt puhastatud peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakesi (raudoksiid, liposoomid, polümeersoomid, hõbenanoosakesed) sisaldava füsioloogilise lahusega, mille maht on 0.05-0.1 mL. Dooside suurus on sellised, mis varem läbiviidud katsete põhjal ei põhjusta toksilisust. Peale 10 min -24 h kestvat peptiidi või peptiididega konjugeeritud nanoosakeste tsirkulatsiooni viiakse loomad sügavasse anesteesiasesse kasutades anesteetikumi DexDomitor/BioKetan, mida süstitakse hiirele intraperitoneaalselt 0.1 mg/kg deksmedetomidini ja 75 mg/kg ketamiini. Seejärel viiakse läbi eksanguinatsioon perfusiooni teel 20 ml PBSga, happe-detergendi lahusega või 4% PFAga. Peptiidi ja nanoosakeste tsirkulatsiooni ajapunktid on optimeeritud varasemate katsete käigus ning ei põhjusta katseloomal immuunvastust. Peptiidi/nanoosakeste tsirkulatsiooni järel viiakse läbi nekropsia ning uuritakse peptiidide või nanoosakeste koedistributsiooni. Kudede kogumine koeekstraktide valmistamiseks on taastumatu elutegevusega katse.

Loomade arv: 100 Balb/c hiirt, sest arvestuslikult plaanime retseptorid identifitseerida 12 kandidaatpeptiidi jaoks ja biokeemiliseks analüüsiks piisava koekoguse saamiseks läheb vaja 6 individuaalset platsentat (kokku 72 hiirt); identifitseeritud 7 retseptori ekspressioonianalüüsiks on teste vaja korrata 4 loomaga (kokku: 28 hiirt).

*e) HEB penetreerivate peptiidide kasutamine selektiivsuse ja efektiivsuse võimendamiseks.*

Kullerpeptiididega konjugeeritud ravimeid või ravimeid kandvad nanoosakesed (täpne otsustamine toimub hiljem sõltuvalt sellest, millise ravimi keemiline konjugeerimine peptiididega osutub kõige efektiivsemaks ning konjugaatide *in vitro* aktiivsusest) manustatakse hiirtele režiimis, mis vastab konsensuslikule kliiniliselt rakendatavale doosile, sagedusele ja süstimisviisile (nahaalne, veenisine, kõhuõonesine süstimine).

Vajaminev katseloomade arv: 100 Balb/c emast hiirt. Katseloomade arvu oleme arvutanud järgmiselt: eksperimentaalteraapiaks moodustame 5 loomarühma. Rühmad moodustame järgnevalt:

1. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on konjugeeritud käesoleva katse käigus identifitseeritud uue kullerpeptiidiga
2. rühm – loomad, kellele manustatakse veenisise süstega ravimit, mis on

konjugeeritud kontrollpeptiidiga (järjestus on uue kullerpeptiidi skrambleeritud versioon)

3. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisisesest süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDKGPDC (iRGD),

4. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisisesest süstega ravimit, mis on konjugeeritud kontrollpeptiidiga CRGDC,

5. rühm - loomad, kellele manustatakse veenisisesest süstega PBS-i või ravimit, mis ei ole kullerpeptiidiga konjugeeritud

Igas rühmas kasutame statistiliselt usaldusväärse tulemuse saamiseks 5 looma, seega ühe uue peptiidi analüüsiks kasutame 25 looma. Viieaastase projekti käigus plaanime analüüsida 4 uut peptiidi, mis teeb loomade arvuks 100.

Katse kestus: Loomade katse olemise aeg varieerub vastavalt teostatavale protseduurile, mis on 10 minutist (minimaalne faagidisplay tsirkulatsiooniaeg) kuni mõne päevani (eksperimentaalteraapiaks kuluv aeg). Ühel loomal kasutame ühte kirjeldatud protseduuri (b-e), mille lõpus loom hukatakse.

## 7.2. Humaansed lõpp-punktid

1) Tööks vähimudelitega kasutatakse immunoloogiliselt nõrgestatud hiiri, kes võivad olla vastuvõtlikud nakkustele.

2) Kõigi katse olevate loomade heaolu hinnatakse iga päev. Seiresüsteem hõlmab kehahoiaku, kõnnaku, seisundi ja kasvaja suuruse hoolikat jälgimist ning loomade kaalumist ja palpeerimist iga päev.

3) Kõikide katsete puhul rakendatakse humaansete lõpp-punktide kriteeriumitena vastavat kumulatiivset skoorimissüsteemi (skoor 0-5, vt Tabel 1), sh. katseloom surmatakse viivitamatult, kui tema kaalukaotus on üle 20% või loom on liikumatu üle 24 tunni.

4) Humaanne lõpp-punkt teostatakse tservikaalse dislokatsiooni teel.

Tabel 1. Humaanse lõpp-punkti skoorimine

### 1.1 Katses olevate loomade välimuse hindamine

Seisund	Skoor
Normaalne < 5% kaalukaotus	0
5-10% kaalukaotus	1
11--15 % kaalukaotus	2
16--20% kaalukaotus	3
20% + kaalukaotus	5
Sugemise puudumine/karva halb seisund	1
Jäik nahk/dehüdratsioon	1
Piloereksioon	1
Kõhulahtisus	1
Veri väljaheidetes	5
Põletikuline haav	3

### 1.2 Katses olevate loomade käitumise hindamine

Seisund	Skoor
Letargia/apaatia	1
Liikumisprobleemid, immobiilsus <24h	3
Liikumisprobleemid, immobiilsus >24h	5
Kuuldavad vokalisatsioonid	2
Närviline tõstmisel/käsitsemisel	1

Kuuldavad spontaansed vokalisatsioonid liikumisel	3
---------------------------------------------------	---

## 1.3 Mida tehakse?

Sagedasem jälgimine; lisahooldus	1-2
Konsulterida loomaarstiga/loomade heaolu üksusega	3-4
Kohene humaanne lõpp-punkt	≥5

Käesolevat otsust on võimalik vaidlustada 30 päeva jooksul otsuse teatavaks tegemisest arvates, esitades vaide loomkatseprojekti loakomisjonile haldusmenetluse seaduses sätestatud korras või kaebuse halduskohtusse halduskohtumenetluse seadustikus sätestatud korras.

Kadri Kabel  
(allkirjastatud digitaalselt)  
Komisjoni esimees

## Protease-Activated CendR Peptides Targeting Tenascin-C: Mitigating Off-Target Tissue Accumulation

Allan Tobí<sup>1</sup>, Maarja Haugas<sup>1</sup>, Kristina Rabi<sup>1</sup>, Jhalak Sethi<sup>1</sup>, Kristina Põsnograjeva<sup>1</sup>, Päärn Paiste<sup>2</sup>, Toomas Jagomäe<sup>3</sup>, Karlis Pleiko<sup>1</sup>, Prakash Lingasamy<sup>4</sup>, Tambet Teesalu<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Precision and Nanomedicine, Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu, Ravila 14b, 50411 Tartu, Estonia.

<sup>2</sup> Department of Geology, University of Tartu, Ravila 14, 50411 Tartu, Estonia

<sup>3</sup> Laboratory Animal Centre, Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu, Ravila 14b, 50411 Tartu, Estonia.

<sup>4</sup> Competence Centre on Health Technologies, Ravila 19, 50411 Tartu, Estonia.

<sup>5</sup> Materials Research Laboratory, University of California, Santa Barbara, CA 93106, USA.

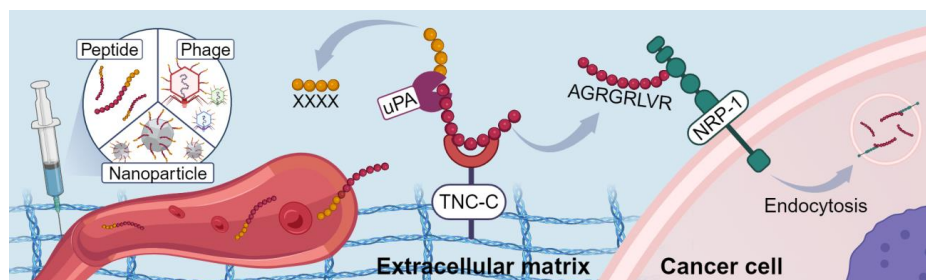
\*Corresponding author: T. Teesalu, Laboratory of Precision and Nanomedicine, Institute of Biomedicine, University of Tartu, Ravila 14b, 50411 Tartu, Estonia. E-mail address: [tambet.teesalu@ut.ee](mailto:tambet.teesalu@ut.ee).

Keywords: homing peptides, phage display, neuropilin-1, Tenascin C, silver nanoparticles, glioma

## Abstract

To achieve precision and selectivity, anticancer compounds and nanoparticles (NPs) can be targeted with affinity ligands that engage with malignancy-associated molecules in the blood vessels. While tumor-penetrating C-end Rule (CendR) peptides hold promise for precision tumor delivery, C-terminally exposed CendR peptides can accumulate undesirably in non-malignant tissues expressing neuropilin-1 (NRP-1), such as the lungs. One example of such promiscuous peptides is PL3 (sequence: AGRGRLVR), a peptide that engages with NRP-1 through its C-terminal CendR element, RLVR.

Here, we report development of PL3 derivatives that bind to NRP-1 only after proteolytic processing by urokinase plasminogen activator (uPA), while maintaining binding to the other receptor of the peptide, the C-domain of tenascin C (TNC-C). Through a rational design approach and screening of a uPA-treated peptide-phage library (PL3 peptide followed by four random amino acids) on the recombinant NRP-1, derivatives of the PL3 peptide capable of binding to NRP-1 only post-uPA processing were successfully identified. *In vitro* cleavage, binding, and internalization assays, along with *in vivo* biodistribution studies in orthotopic glioblastoma-bearing mice, confirmed the efficacy of two novel peptides, PL3uCendR (AGRGRLVR↓SAGGSVA) and SKLG (AGRGRLVR↓SKLG), which exhibit uPA-dependent binding to NRP-1, reducing off-target binding to healthy NRP-1-expressing tissues. Our study not only unveils novel uPA-dependent TNC-C targeting CendR peptides but also introduces a broader paradigm and establishes a technology for screening proteolytically activated tumor-penetrating peptides.



**Graphical abstract** Intravenously injected cryptic PL3-derived peptides, peptide-phages or peptide-nanoparticles home to GBM tumor with reduced accumulation in pulmonary tissue in mice.

## 1 Introduction

Most anti-cancer drugs lack selectivity and have dose-limiting side effects [1]. Drug delivery is particularly challenging for hard-to-reach tumors such as pancreatic cancer and glioblastoma (GBM), the most prevalent and deadliest malignant primary brain tumor [2,3]. Challenges in tumor delivery have spurred the search for tumor-specific targets to enable targeted drug delivery [4]. Systemically accessible molecular heterogeneity in tumors includes angiogenesis or malignancy-associated changes on the surface of cells or in the composition of extracellular matrix (ECM) [5,6]. Affinity ligands can be used to target disease-associated molecular signatures in tumors to concentrate drugs and enhance therapeutic efficacy while reducing damage to healthy tissues [7,8].

Tumor homing peptides are used for targeted delivery of different classes of payloads, in particular nanomaterials, where even low affinity ligands can dramatically enhance target-specific avidity through multivalent interactions [9]. Homing peptides are typically not species-specific as they engage functionally important binding pockets on target molecules, and these sites are conserved across species [10–12]. The potential of the targeting peptides is illustrated by translational efforts on the iRGD tumor penetrating peptide (TPP) undergoing clinical development as LSTA1 for potentiating the delivery of anticancer therapeutics to pancreatic cancer and several other solid tumors [13].

TPPs are defined by the presence of a consensus R/KXXR/K motif able to bind to neuropilin-1 (NRP-1), a pleiotropic cell surface receptor expressed in numerous normal organs and overexpressed in most solid tumors, including GBM [10,14,15]. Peptide interactions with NRP-1 activate the pathway for enhanced extravascular transport of conjugated and co-administered drugs [16,17]. A defining characteristic of tumor penetrating peptides and many of the natural ligands of NRP-1 (e.g., VEGFA165, Semaphorin-3) is that their specific interaction with NRP-1 is conditional and dependent on C-terminal exposure of the R/KXXR/K motif, leading to its designation as the C-end Rule (CendR) motif [18–20]. This specificity arises from the peptide's mode of interaction with the receptor: CendR peptides utilize their C-terminal arginine residue to engage with the interloop cleft formed by the L3 loop (also known as the “C-wall”) and the L5 loop within the b1 domain of NRP-1 [21]. In the case of iRGD [22], LinTT1 [23] and iNGR [24] peptides, the CendR motif is cryptic and remains inactive until proteolytic cleavage in the tumor environment, whereas some other TPPs such as tLyP1 [25,26] and PL3 [27] display C-terminal CendR motifs that do not require proteolytic activation. A drawback of the latter systems is the risk of off-target binding due to the expression of NRP-1 in healthy organs, particularly the lungs [28], potentially leading to adverse effects and compromised efficacy.

One strategy to mitigate off-target accumulation of TPP with C-terminal CendR motifs involves concealing the CendR sequence with a tumor-specific protease cleavable motif, thereby generating cryptic CendR peptides [29]. Among the > 100 proteases associated with various aspects of cancer development and progression, the serine protease urokinase-type plasminogen activator (uPA) with its functionally related molecules, including receptors and inhibitors, represents one of the most well-established cases [30]. uPA cleaves the ubiquitous zymogen plasminogen at the amino acid bond Arg (561)–Val (562), resulting in the generation of the broad-spectrum serine protease plasmin [31]. Upregulated expression of uPA and its high-affinity receptor (uPAR) is associated with tumor progression, invasion, and metastasis; correlations discovered between uPA/uPAR expression and poor patient prognosis suggest that uPA

levels could be used as a diagnostic or prognostic indicator [32–34]. Accordingly, the uPA/uPAR system has also been of interest as a potential drug target and activator of antitumor prodrugs [35]. To show the viability of the rational design approach for creating proteolytically activated CendR peptides for tumor targeting, we have previously engineered a uCendR peptide incorporating an optimal uPA cleavage site within the context of the CendR motif [36]. These proof-of-concept studies demonstrated that the uCendR peptide was effectively activated and exhibited robust *in vivo* tumor homing and penetration capabilities.

PL3 (sequence: AGRGRLVR) is a dual binding tumor-homing peptide [27]. Its primary target is a large modular ECM glycoprotein tenascin-C (TNC) associated with fetal development and malignancy, and it also engages NRP-1 via its C-terminal CendR motif RLVR [27]. Tumor ECM is an aberrant meshwork of polymeric proteins and accessory molecules that forms the non-cellular component of solid tumors [37]. Tenascin-C (TNC) and especially its isoform targeted by PL3 peptide, the C-domain of TNC (TNC-C), shows low expression in non-malignant tissues and a robust overexpression in cancerous tissues, including GBM [38–40]. Compared to receptors expressed on the surface of malignant cells, TNC-C is primarily deposited by genetically stable stromal cells and may thus provide a more stable and high-capacity target for targeting ligands [40]. However, the presence of the active C-terminal CendR motif in PL3 may result in promiscuous accumulation in non-malignant tissues as observed for other CendR peptides [25,26].

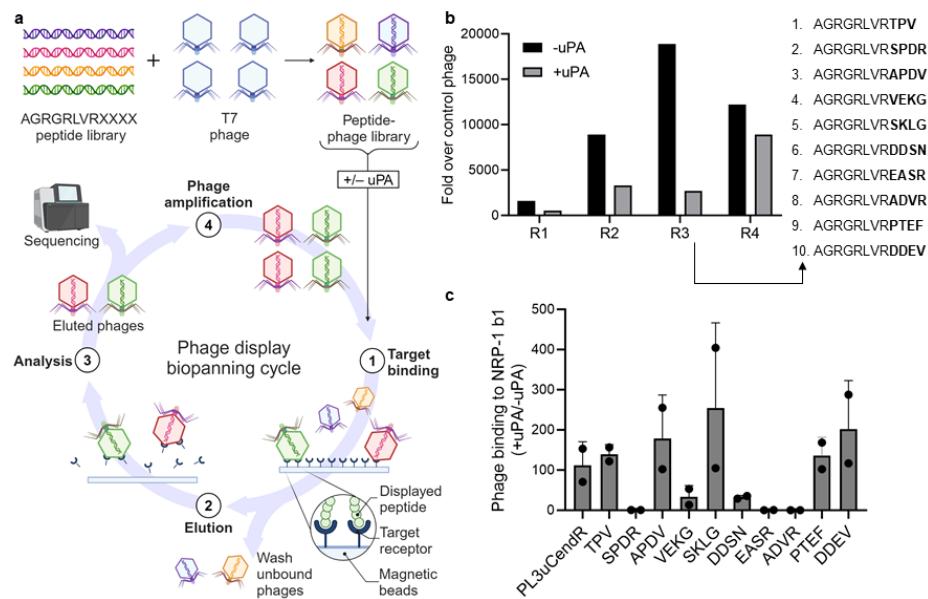
Here, we report development of derivatives of PL3 peptides that contain cryptic CendR motifs that can be activated by exposure to uPA. In quest for peptide discovery, we used both rational design and screening of combinatorial peptide library displayed on the T7 phage. Newly identified peptides showed uPA-dependent binding to NRP-1 and reduced off-target binding to healthy NRP-1-expressing pulmonary tissue. This study led to the discovery of a novel uPA-dependent CendR peptides and introduces a broader paradigm for screening proteolytically activated tumor-penetrating peptides.

## 2 Results and discussion

### 2.1 Identification of uPA cleavable derivatives of the PL3 peptide

Our demonstration of proteolytic activation of the CendR motifs embedded within uPA recognition and cleavage sequence suggested the feasibility of proteolytically activated screening using constrained peptide libraries containing cryptic CendR motifs [36]. Such innovative approach may be used for empirical identification of CendR peptides activated by various tumor-associated proteases, including those with poorly characterized substrate specificity.

To validate the potential of such a screening approach in a proof-of-concept study, we conducted peptide-phage biopanning screens specifically targeting PL3-derived peptides sensitive to uPA. We constructed a peptide-phage library in which the PL3 sequence was C-terminally followed by four random amino acids (configuration: AGRGRLVRXXXX, where X is a random amino acid). For biopanning (Fig. 1a), the library was divided into two parallel pools. One pool was treated with uPA, followed by incubation with magnetic beads coated with recombinant NRP-1 b1 domain to capture phages displaying conditionally active CendR peptides. The other pool was left non-treated to account for CendR peptides binding to NRP-1 b1 domain regardless of uPA activation. The evolution of the peptide landscape throughout the screening was monitored by titrating the bound phage and analyzing the peptide encoding region of the phage genome by high throughput sequencing (HTS). HTS-based assessment of the representation of peptides in the third round of selection (Table S1) led to 10 candidate peptides with the highest relative enrichment in the uPA-treated pool (Fig. 1b) were selected for individual testing. Additionally, we designed a cryptic PL3 peptide that integrates a previously published uPA cleavage site compatible with CendR activation [36] (referred to as "PL3uCendR": AGRGRLVR↓SAGGSVA, where ↓ denotes the cleavage site).



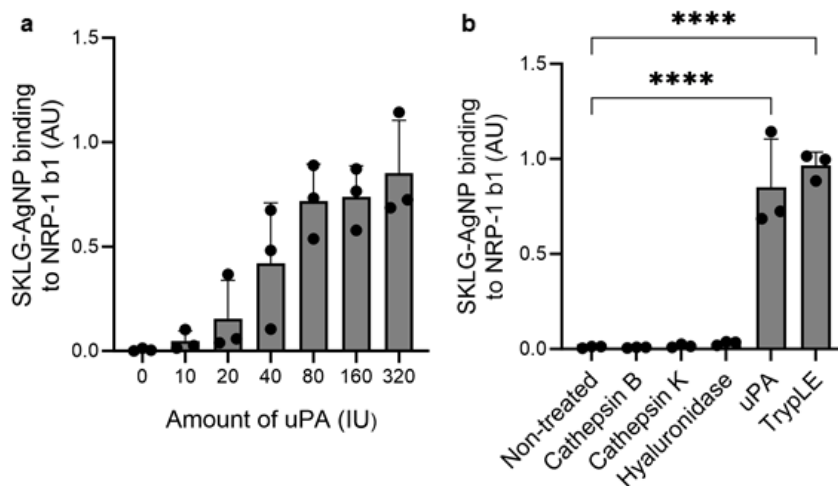
**Fig. 1** Discovery of uPA-dependent NRP-1 b1-binding PL3 derivative peptides. **(a)** Schematic of peptide-phage library design and biopanning screen. **(b)** Library enrichment through biopanning rounds 1–4 (R1–4). Ni-NTA magnetic agarose beads were coated with recombinant histidine-tagged b1 domain of NRP-1, incubated with phage pools with or without uPA pretreatment, washed, eluted, titered, and sequenced with HTS. Results are displayed as fold over control G7 phage ( $n = 1$ ). Peptide sequences of top 10 phage candidates from round 3 based on +/- uPA enrichment ratios are listed. **(c)** Conditional NRP-1 b1 domain binding of individual phage candidates. Experiment was conducted as in (b), except individual phages were used and no HTS was performed. Names on the x-axis refer to the C-terminal part of the homing peptide on phage with reference to (b); PL3uCendR = AGRGRLVRSAGGSVA. Results are displayed as a ratio of +/- uPA normalized to control insertless phage. Error bars show standard deviation (SD), scatter symbols individual measurements ( $n = 2$ ).

Subsequently, the candidate peptide-phages were studied individually to determine the uPA dependence of phage binding to recombinant NRP-1 b1 domain. After incubation with uPA, the phage displaying SKLG peptide exhibited a 255-fold mean increase in NRP-1 binding, while the PL3uCendR phage showed a 122-fold mean increase, ranking sixth among the tested peptide-phages (Fig. 1c). As anticipated, candidate peptides SPDR, EASR and ADVR, featuring C-terminal arginine residues, showed the highest NRP-1 binding in the absence of uPA treatment and the least enhancement following uPA treatment. Consequently, these peptides were excluded from further studies. Phages

with SKLG and PL3uCendR peptides demonstrated retention of binding to TNC-C at levels comparable to the parent PL3 peptide (Fig. S1).

We next studied whether uPA-actuated increase in NRP-1 binding can be also observed for AgNPs functionalized with synthetic SKLG peptide. uPA pretreatment of AgNPs coated with SKLG peptide (SKLG-AgNPs) activated the engagement of the particles with the recombinant b1 domain of NRP-1 in uPA concentration-dependent manner (Fig. 2a). To study the specificity of the enzymatically actuated NRP-1 binding, the SKLG-AgNPs were pre-incubated with cathepsins B and K (cysteine proteinases), hyaluronidase (endoglycosidase), and trypsin (serine proteinase), besides uPA. Cathepsins B and K as well as hyaluronidase failed to increase NRP-1 binding of the SKLG-AgNPs, whereas treatment with uPA and trypsin resulted in robustly induced NRP-1 binding (Fig. 2b). Trypsin is a broad-spectrum proteinase with cleavage specificity at the C-terminal side of basic amino acid residues, arginine and lysine [41]. Trypsin processing has been used to expose cryptic CendR elements in the past [22], and thus enhancement of binding of SKLG-AgNPs to NRP-1 was expected.

These studies demonstrated the feasibility of agnostic screening for proteolytically activated CendR peptides using cell-free selections on recombinant NRP-1 b1 domain and identified SKLG as a lead candidate peptide for uPA mediated activation.



**Fig. 2** uPA treatment enhances binding of SKLG-AgNPs to NRP-1 b1 domain. (a) Dose-dependent cleavage of SKLG peptide. Ni-NTA magnetic beads were coated with recombinant histidine-tagged b1 domain of NRP-1, incubated with SKLG-AgNPs, washed, and eluted. AgNP absorbance of bound SKLG-AgNPs was measured at 415 nm. AU = absorbance units; IU = international unit for enzymes; error bars show standard deviation (SD), scatter symbols

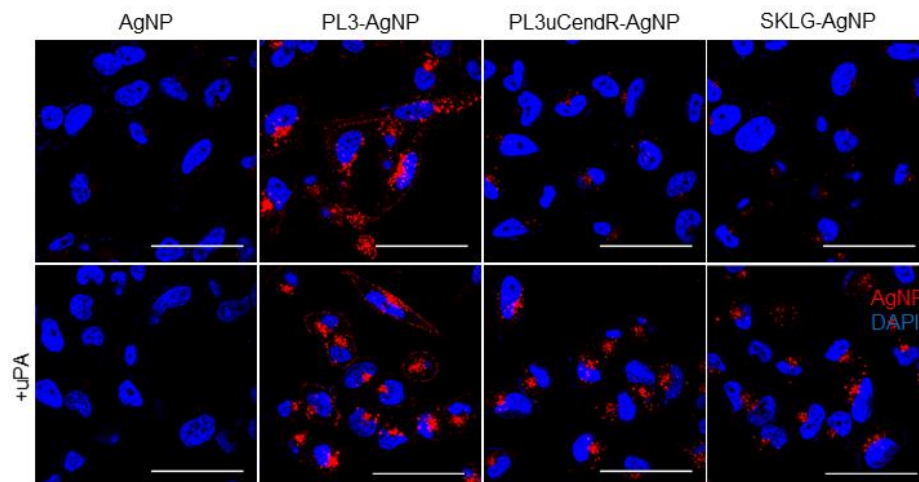
individual measurements ( $n = 3$ ). **(b)** uPA specifically cleaves SKLG peptide at target site to induce NRP-1 b1 binding along with trypsin. Experiment was conducted as in (a). AU = absorbance units; IU = international unit for enzymes; error bars show standard deviation (SD), scatter symbols individual measurements ( $n = 3$ ); \*\*\*\* = p-value < 0.0001, one-way ANOVA with Dunnett post-hoc.

## 2.2 Cellular uptake of nanoparticles equipped with PL3-derived cryptic CendR peptides is modulated by expression of receptors and uPA cleavage

The specificity profile of each tumor penetrating peptide is defined by an interplay of its primary recruitment receptor (e.g., in the case of iRGD the  $\alpha v$  integrins [22], and in the case of linTT1 cell surface receptor p32 [23]) and proteolysis-dependent engagement of the CendR element of a TPP with NRP-1.

To study the effect of cellular expression of peptide receptors on the binding of the PL3 derived cryptic CendR peptides, we performed a series of *in vitro* cell binding and internalization experiments on cells of known receptor expression status: U87-MG glioblastoma cells (TNC-C<sup>+</sup>, NRP-1<sup>+</sup>), PPC1 prostate cancer cells (TNC-C<sup>-</sup>, NRP-1<sup>+</sup>) and M21 melanoma cells (TNC-C<sup>-</sup>, NRP-1<sup>-</sup>) [27].

PL3, PL3uCendR and SKLG peptide-functionalized CF555-labeled AgNPs were incubated with cultured cells and used in confocal microscopy-based experiments. To assess cellular internalization, AgNP-treated cells were exposed to a biocompatible etching solution that dissolves extracellular AgNPs leaving intracellular nanoparticles intact [42]. Additionally, the nanoparticles were subjected to uPA pretreatment to activate the cryptic CendR peptides.



8

**Fig. 3** Internalization of CendR peptide-AgNPs in NRP-1-positive PPC1 cells. Prostate carcinoma (PPC1) cells were grown as a 2D culture, incubated with CF555-labeled AgNPs (red) optionally pretreated with uPA, washed, etched with a membrane-impermeable AgNP dissolving solution, fixed with  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  MeOH, counterstained with DAPI (blue; nuclei), and imaged. Representative images are shown ( $n = 3$ ). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

We observed that whereas the PPC1 cells showed robust binding (Fig. S2) and internalization (Fig. 3) of parent PL3 peptide-functionalized AgNPs, the binding of PL3uCendR- and SKLG-AgNPs was dependent on uPA treatment, and no uptake was evident in the case of non-peptide control AgNPs. In U87-MG cells, PL3-, PL3uCendR-, and SKLG-AgNPs showed similar binding and internalization, whereas control AgNPs remained negative (Fig. S3). AgNPs decorated with PL3uCendR and SKLG were retained by the U87-MG cells regardless of uPA treatment. We hypothesize that this may be due to turnover of TNC-C in these cells and processing by endogenous uPA, expressed in all tested cell lines (Fig. S4). Control M21 cells, negative for both TNC-C and NRP-1, did not bind nor internalize any of the tested AgNPs (Fig. S5).

These results show that cellular engagement of cryptic PL3 peptide equipped AgNPs can be modulated by proteolytic switching via uPA. In NRP-1-high PPC1 cells, AgNPs functionalized with cryptic PL3 variants PL3uCendR and SKLG bound to and internalized in strictly uPA-dependent manner. In contrast, in TNC-C-expressing U87-MG cells, promiscuous binding was observed for both nanoparticles coated with parent PL3 peptide as well as its cryptic uPA-sensitive versions.

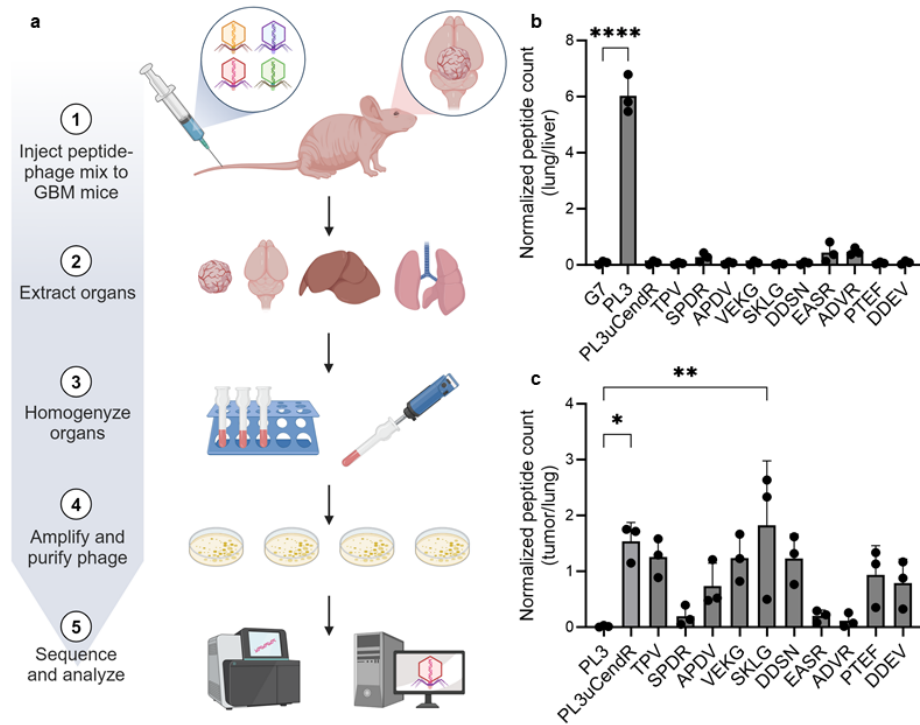
### 2.3 SKLG- and PL3uCendR-phages show improved tissue distribution in GBM mice

Cell-free studies and cellular binding experiments described in preceding sections underscore the success in developing cryptic variants of the PL3 peptide capable of binding to NRP-1 following proteolytic processing by uPA. Given the low expression of uPA in normal adults, confined primarily to sites of physiological and pathological tissue remodeling [33], these peptides are not anticipated to exhibit promiscuous accumulation observed in the pulmonary and cardiac vascular beds, as seen with PL3 and other peptides bearing C-terminally exposed CendR motif, like RPARPAR [20,36]. Nonetheless, systemic administration exposes nanoparticles and peptides to a milieu of factors absent in controlled cell-free/*in vitro* conditions—namely, plasma and tissue proteins, including a plethora of proteases and their regulatory molecules, alongside various other potentially interacting macromolecules. As these factors may affect the *in vivo* performance and specificity of the candidate peptides, we studied the biodistribution of the full panel of candidate peptides using *in vivo* peptide-phage playoff (Fig. 4a), a technique that allows comparative parallel evaluation of multiple candidate peptides in the same animal. An equimolar mixture of 10 candidate peptides from the biopanning screen, PL3uCendR and controls (G7 negative control, PL3) was intravenously (i.v.) injected into athymic nude mice bearing orthotopically implanted SV40 large T-antigen and H-ras transformed mouse astrocytoma

cell line (WT-GBM) xenografts expressing high levels of VEGF [43]. After 30 min of circulation the mice were perfused and retained phages in target and control tissues (tumor, brain, lungs, liver) were amplified and quantified with HTS.

In the lungs, PL3-phages were ~39 fold overrepresented compared to the cryptic candidate peptides (Fig. 4b). Phages displaying candidate peptides 2, 7 and 8 also showed higher pulmonary accumulation, which can be attributed to the presence of C-terminal arginine in the sequence of these peptides. This observation aligns with prior research indicating that whereas the presence of a C-terminal R/KXXR/K is required for optimal NRP-1 binding activity, even a single arginine residue can confer binding [20,44]. In brain tissue containing malignant lesions, the candidates exhibited modest accumulation (Fig. S6), possibly attributable to the highly angiogenic nature of WT-GBM tumors. These tumors are characterized by leaky blood vessels [45], which may lead to elevated baseline accumulation within the tumor.

When expressing the *in vivo* playoff data as a ratio of tumor over lung, SKLG and PL3uCendR were confirmed as the leading peptides with p-values of 0.0048 and 0.0274, respectively (Fig. 4c).



10

**Fig. 4** Auditioning candidate peptides by *in vivo* peptide-phage playoff. (a) Phages expressing peptide of interest or control peptide were mixed in an equimolar ratio and injected i.v. into WT-GBM-bearing female nude mice. After 30 min, mice were anesthetized and perfused, organs were harvested, homogenized, and tissue lysates were amplified, purified and sequenced with HTS. Results are shown as (b) peptide count in lung normalized to liver and (c) peptide count in WT-GBM tumor as a ratio of tumor over lung normalized to liver and control G7 phage. Error bars show standard deviation (SD), scatter symbols individual measurements ( $n = 3$ ); \* = p-value < 0.05, \*\* = p-value < 0.01, \*\*\*\* = p-value < 0.0001, one-way ANOVA with Dunnett post-hoc.

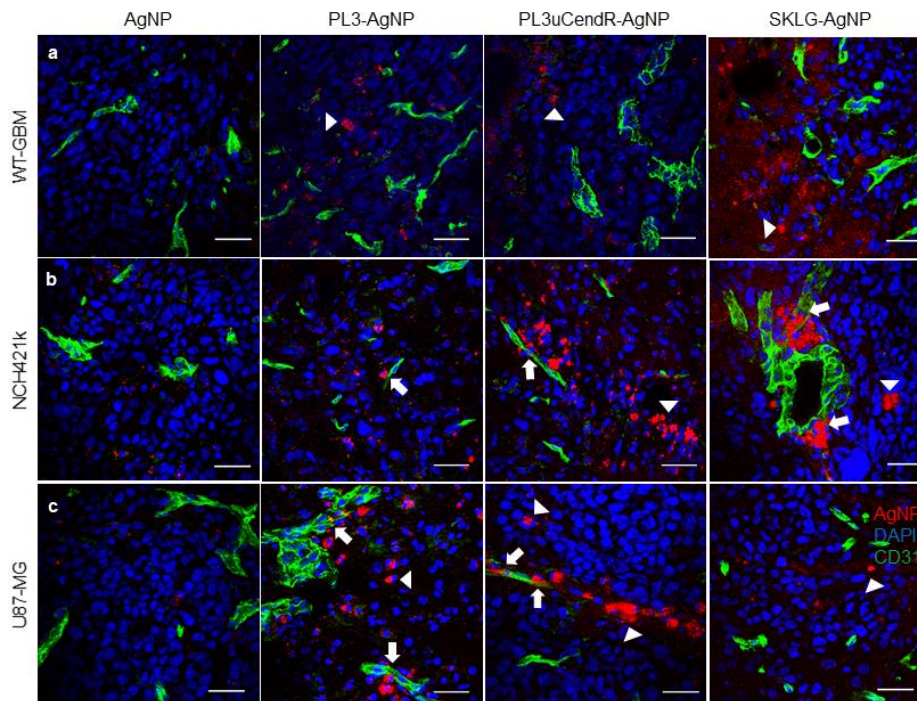
## 2.4 Synthetic SKLG and PL3uCendR show decreased pulmonary uptake in GBM mice while accumulating in the tumor

Previous section showed that the novel peptides decrease lung accumulation when displayed on the surface of the biological nanoparticles, bacteriophages. We next evaluated the *in vivo* performance of the synthetic peptides (as monomeric peptides and conjugated to nanoparticles) in GBM mice.

We first stratified a panel of orthotopic glioblastoma models (WT-GBM, NCH421k, U87-MG, and VEGF-KO) for the expression of TNC-C, NRP-1, and uPA using immunostaining and confocal imaging (Fig. S7 and S8). Whereas clear upregulation (in comparison to the normal brain tissue) of the immunoreactivities of TNC-C, NRP-1, and uPA was observed in WT-GBM, and U87-MG tumor lesions, VEGF-KO tumors (generated by implantation of the VEGF-negative derivative subline of WT-GBM that gives rise to infiltrative nonangiogenic GBM [46]) expressed very low levels of uPA and were excluded from subsequent tests. In line with previous studies [14], some NRP-1 signal was also present in the tumor-free part of the brain. To study brain NRP-1 expression relative to the blood vessels, a colocalization study with anti-NRP-1 and anti-CD31 (blood vessel marker) antibodies was performed (Fig. S8). The blood vessels in the tumor-free part of the brain did not show colocalization with NRP-1, indicating that NRP-1 in the tumor-free brain regions is inaccessible upon i.v. administration, whereas colocalization was evident across the WT-GBM tumor (Fig. S8, arrowheads).

For biodistribution studies, GBM mice were dosed with AgNPs coated with either PL3, PL3uCendR or SKLG peptides. After circulation, the animals were perfused and tissues were collected, sectioned, and used for confocal microscopy imaging. Confocal microscopy imaging of CF555-labeled AgNPs decorated with targeting peptides showed that in all three tested tumor models the targeted AgNPs accumulated after 3 h of circulation near the tumor blood vessels and appeared to extravasate outside the CD31-positive vessels into the tumor parenchyma (Fig. 5). Although control AgNPs without targeting peptide seemed to accumulate less in the tumor tissue, areas with higher accumulation could still be seen, especially for the leaky WT-GBM and U87-MG models (Fig. S9). Furthermore, the targeted AgNPs were more abundantly found at the rim of the tumors, potentially due to the elevated expression of TNC-C and NRP-1 in the actively proliferating and angiogenic outer layer of the tumors (Fig. S7).

In the pulmonary tissue, PL3-AgNPs showed higher accumulation than PL3uCendR-, SKLG- and control AgNPs (Fig. S10a). Hepatic tissue showed robust nonselective uptake of all types of AgNPs independent of the peptide functionalization (Fig. S10b).



**Fig. 5** Biodistribution of peptide-AgNPs in (a) WT-GBM, (b) NCH421k and (c) U87-MG GBM models. Orthotopic GBM-bearing nude mice were i.v. injected with CF555-labeled AgNPs (red). After 3 h of circulation the mice were anesthetized and perfused. Organs were harvested, sectioned, immunostained with anti-CD31 antibody (green; blood vessels), counterstained with DAPI (blue; nuclei). Representative images are presented ( $n = 3$ ). Arrows point to AgNPs in or near CD31-positive blood vessels, arrowheads to extravasated AgNPs. Scale bar: 100  $\mu$ m.

Subsequently, we employed isotopically barcoded peptide-AgNPs and control AgNPs for internally-controlled laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)-based quantitative mapping studies [11,47,48]. An equimolar mixture of  $^{109}\text{AgNP}$ -peptide and biotin-blocked control  $^{107}\text{AgNP}$ s was intravenously injected to orthotopic WT-GBM-bearing mice. Following tissue collection and sectioning, LA-ICP-MS was used to quantitatively map the 2D distribution of both types of NPs. In the lungs, PL3-AgNPs exhibited approximately 2.5

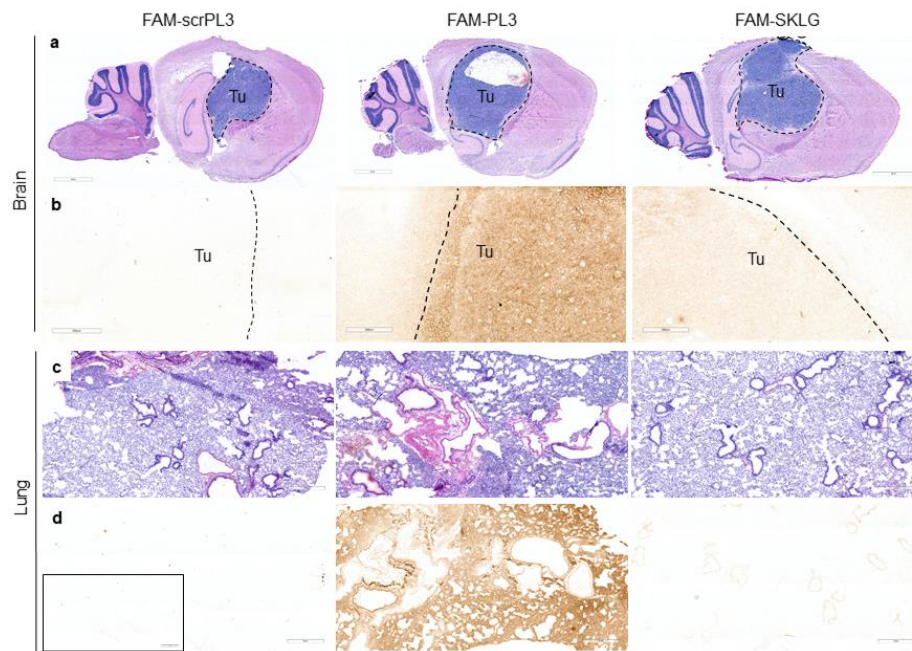
times higher accumulation compared to co-injected control AgNPs. Conversely, for PL3uCendR- and SKLG-AgNPs, the  $^{109}\text{Ag}/^{107}\text{Ag}$  ratio in the lungs approached 1 (Fig. S11). These studies showed that the newly identified cryptic PL3 variants exhibit decreased off-target binding to healthy lungs.

The accumulation of PL3-, PL3uCendR- and SKLG-AgNPs in tumors appeared similar to control AgNPs (Fig. S11). CendR peptides are known to trigger a bystander effect, activating bulk transport pathway to tumors, which could potentially limit the applicability of coadministration-based radiometric biodistribution analyses [49]. Here, CendR peptide-AgNPs may have triggered tumor transport of co-circulating control AgNPs. WT-GBM tumors are also highly angiogenic and contain dysfunctional and leaky neovessels [45], a factor that may have contributed to increased nonspecific retention of AgNPs the tumor tissue.

Whereas polyvalent targeting systems, such as bacteriophages and AgNPs used in previous sections, exploit multivalent interactions to enhance specificity and binding efficiency, monovalent targeting systems rely on single ligand-receptor interactions for targeted drug delivery [50]. The choice between these two approaches depends on affinity of the targeting ligand and the pharmacokinetic properties of the therapeutic agent. We next studied *in vivo* biodistribution of monomeric FAM-labeled SKLG, PL3, and scrambled PL3 control (scrPL3) peptides in WT-GBM tumor-bearing mice. The mice were dosed with FAM-labeled peptides followed by perfusion, tissue collection, sectioning, and detection of the peptides using immunohistochemistry with anti-FAM antibodies.

In pulmonary tissue, a robust and consistent accumulation of the PL3 peptide was evident, whereas cryptic SKLG and scrambled PL3 control peptides exhibited only a background signal comparable to that of the secondary antibody alone (Fig. 6d insert). Tumor signal does show somewhat ambiguous preferential accumulation for PL3 and SKLG compared to scrambled PL3 (scrPL3) (Fig. 6).

These findings align with the phage- and nanoparticle-based data previously presented, and underscore the importance of minimizing off-target binding of non-cryptic CendR-peptides, particularly in the lungs.



**Fig. 6** Biodistribution of monomeric FAM-labeled peptides in WT-GBM mice. Orthotopic GBM-bearing nude mice were i.v. injected with FAM-labeled scrambled PL3 control (scrPL3), PL3 or SKLG peptides. After 1 h of circulation the mice were anesthetized and perfused. Organs were harvested, sectioned, and parallel sections were immunostained with hematoxylin & eosin (H&E) staining or anti-FAM DAB staining. **(a)** H&E of WT-GBM tumor bearing brain tissue sections. **(b)** DAB staining of WT-GBM tumor region in the brain. **(c)** H&E staining of lung tissue sections. **(d)** DAB staining of lung tissue sections. Representative images are presented ( $n = 3$ ). Dashed lines outline tumor; Tu = tumor. Insert in (d) shows secondary antibody control for DAB staining. Scale bars: 3 mm for (a), 500  $\mu\text{m}$  for (b), 1 mm for (c, d).

### 3 Conclusion

We demonstrated that cell-free peptide-phage display can be used to identify novel proteolytically-activated tumor penetrating peptides. Two PL3 peptide derivatives, PL3uCendR (sequence: AGRGRLVRSAGGSVA) and SKLG (sequence: AGRGRLVRSKLG), that showed uPA dependent activation of binding to cell-free and cell surface-expressed NRP-1 were identified in this study. *In vivo*, both monomeric and nanoparticle-tethered uPA-actuated PL3-derivative peptides showed glioma homing and a robust reduction of pulmonary accumulation.

We envision the application of this system not only for modifying existing dual-binding homing peptides plagued by off-target accumulation but also discovering fully new target receptor binding protease-activated peptides, where the exact cleavage site may be initially unknown. The overexpression of various proteases in gliomas or other types of solid tumors enables the application of such protease-sensitive peptide targeting moieties for targeted delivery of cargo molecules and nanosystems.

## 4 Materials and methods

### 4.1 Phage cloning

Nucleotide sequences coding for candidate peptides were cloned into T7 415-1b phage (Novagen, EMD Biosciences, USA) genomic DNA to be expressed on the phage surface as C-terminal fusions to capsid protein. The cloning was performed using complementary oligonucleotides (Integrated DNA Technologies, USA) as shown in the following Table 1. Complementary oligonucleotides were diluted in milli-Q (MQ) water at 100 nM, heated at 80 °C for 10 min and slowly cooled to room temperature for annealing. The cloning was performed according to the manufacturer's protocol using the T7Select® 415-1 Cloning Kit (#70015-3, Millipore) with 1 µL of annealed oligonucleotides.

**Table 1.** Complementary oligos for peptide-phage cloning

Peptide sequence	Sense oligomer	Antisense oligomer
AGRGRVLRTPV	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCACCCCGGTGTA	AGCTTACACCGGGGTGCGCACCA GGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLRSPDR	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCAGCCCGGATCGCTA	AGCTTAGCGATCCGGGCTGCGCA CCAGGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLRAPDV	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCGCGCCGGATGTGTA	AGCTTACACATCCGGCGCGCGCA CCAGGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLRVEKG	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCGTGGAAAAAGGCTA	AGCTTAGCCTTTTTCCACGCGCA CCAGGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLRSKLG	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCAGCAAATGGGCTA	AGCTTAGCCCAGTTTGTGTCGCA CCAGGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLRDDSN	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCGATGATAGCAACTA	AGCTTAGTTGTATATCATCGCGCA CCAGGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLRREASR	AATTCTGCCGGCAGGGCAGGCT GGTGAGGGAGGCCAGCAGGTA	AGCTTACCTGCTGGCCTCCCTCA CCAGCTGCCCTGCCGGCAG
AGRGRVLRADVR	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCGGGATGTGCGCTA	AGCTTAGCGCACATCCGCGCGCA CCAGGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLRPTEF	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCCCGACCGAATTTA	AGCTTAAAATTCGGTCGGGCGCA CCAGGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLRDDEV	AATTCTGCGGGCCGCGCCGCCT GGTGCGCGATGATGAAGTGTA	AGCTTACACTTCATCATCGCGCA CCAGGCGGCCGCGGCCCGCAG
AGRGRVLR	AATTCTGCGGGCCGCGGACGTTG GTGCGCTA	AGCTTAGCGCACCAAACGTCCCGC GGCCCGCAG
AGRGRVLRVRSAGGSVA	AATTCTGCTGGGCGCGCCGTTT AGTGCGCTCAGCAGGGGGTCTG TTGCTTA	AGCTTAAGCAACAGACCCCTG CTGAGCGCACTAACGGCCGCGC CCAGCAG

AGRGRLVRRXXX	AATTCTGCGGGCCGCGGACGTTG GTGCGCNNKNNKNNKNNKTA	AGCTTAMNNMNNMNNMNNNGCG CACCAAACGTCCGCGGCCCGCAG
--------------	-------------------------------------------------	---------------------------------------------------

X = random amino acid.

## 4.2 Phage amplification and purification

As described by Pösnograjeva et al. [51], 20 mL of LB/carbenicillin medium (Sigma-Aldrich, USA) was inoculated with a single colony of *E. coli* strain BLT5615 (Novagen, EMD Biosciences) from a freshly streaked LB/ampicillin (Sigma-Aldrich, USA) agar (Neogen, USA) plate (Nerbe Plus, Germany). The culture was incubated in a 100 mL Erlenmeyer flask (Simax, Czech Republic) in a bacterial shaker (Innova 43, New Brunswick Scientific, USA) at 37 °C and 200 rpm overnight. Next morning, culture was diluted 1 : 100 in pre-warmed LB/carbenicillin (Sigma-Aldrich, USA) and incubated in the shaker at 37 °C and 200 rpm until  $OD_{600} = 0.5$ .

For preamplification, 1 mL of BLT5403 ( $OD_{600} = 0.1$ ) was inoculated with 10  $\mu$ L of phage in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; PAN Biotech, Germany) in 50 mL Falcon tubes (Sigma-Aldrich, USA) in a shaker at 37 °C and 200 rpm for 1 h. Next, 25 mL of BLT5403 ( $OD_{600} = 0.5$ ) was added.

For amplification, bacteria were inoculated with phage stock at a multiplicity of infection 0.001–0.01, and incubated in a shaker at 37 °C and 200 rpm for 1.5 h until solution became clear. The lysate was cooled on ice and divided into 50 mL Falcon tubes (Sigma-Aldrich, USA) 26 mL of lysate per tube. To each tube 3 mL of 5 M NaCl (Sigma-Aldrich, USA) was added, and mixed by vortexing. Lysate was cleared of bacterial debris by centrifugation at  $12,000 \times g$  and 4 °C for 10 min. Supernatant was carefully transferred into a new 50 mL tube. Phage was precipitated with 8.4 mL of 50% PEG8000 (Sigma-Aldrich, USA) in Phosphate Buffered Saline (PBS; Sigma-Aldrich, USA). The mixture was vortexed and incubated on ice for at least 30 min. Precipitated phage was pelleted by centrifugation at  $8,000 \times g$  and 4 °C for 10 min. Supernatant was discarded and the tubes were air-dried upside-down on a paper towel for 15 min. Phage pellet was resuspended in 1.5 mL of PBS.

For density gradient purification, 62.5% CsCl (Sigma-Aldrich, USA) solution in PBS was used to prepare 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 dilutions of CsCl : PBS, which were sequentially pipetted in the given order into a ultracentrifugation tube (0.25, 1.2, 1.2, 0.25 mL, respectively). On top of the CsCl gradient, 1.5 mL of PEG-purified phage was added. Tubes were centrifuged with a SW 60 Ti swing-out rotor (Beckman Coulter) at 40,000 rpm at 22 °C for 45 min. Phages form a light blue band, which was collected by puncturing the tube with a 21G needle and using a 1 mL syringe. Phage sample was dialyzed with a 3,500 MW cut-off Slide-A-Lyzer cassette (#66330, Thermo Fisher, USA) against PBS at RT for 1 h and again 1 h after changing the buffer.

### 4.3 Phage titering

As described by Põšnograjeva et al. [51], for titering T7 415-1b phage (Novagen, EMD Biosciences, USA), 20 mL of LB/carbenicillin medium (Sigma-Aldrich, USA) was inoculated with a single colony of *E. coli* strain BLT5615 (Novagen, EMD Biosciences, USA) from a freshly streaked LB/ampicillin (Sigma-Aldrich, USA) agar (Neogen, USA) plate (Nerbe Plus, Germany). The culture was incubated in a 100 mL Erlenmeyer flask (Simax, Czech Republic) in a bacterial shaker (Innova 43, New Brunswick Scientific, USA) at 37 °C and 200 rpm overnight. Next morning, culture was diluted 1 : 100 in pre-warmed LB/carbenicillin and incubated in the shaker at 37 °C and 200 rpm until  $OD_{600} = 0.5$ . Serial dilutions of phage in LB/carbenicillin were prepared and 100  $\mu$ L of diluted phage in 15 mL Falcon tubes (Sigma-Aldrich, USA) was combined with 500  $\mu$ L of BLT5615 culture. To each 15 mL tube, 5 mL of 50–60 °C top-agar containing 2 mM IPTG (Thermo Fisher, USA) was added. Tubes were vortexed and immediately plated on LB/ampicillin (Sigma-Aldrich, USA) agar (Neogen, USA) plate (Nerbe Plus, Germany). Plates were incubated overnight at RT. Formed phage plaques were visually counted, and phage concentration in the undiluted sample was calculated.

### 4.4 Cell-free phage display

To screen for uPA-cleavable cryptic PL3 peptide variants, we constructed a constrained phage library (configuration: AGRGRLVXXXXX, where X is a random amino acid). The phage library was cloned as described above, using partially randomized oligos (Table 1). Generated phage library pool was divided into two groups: non-treated and uPA pretreated. See below for uPA treatment protocol.

For cell-free phage display, 2 mg/mL of hexahistidine-tagged recombinant b1 domain of NRP-1 (in-house) was coated onto Ni-NTA magnetic agarose beads (#36113, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) by incubating with end-over-end mixing at RT for 1–1.5 h. Tris buffer (50 mM, pH 7.0) containing 5 mM imidazole, 1 M NaCl and 0.05% Igepal CA-630 (all from Thermo Scientific Inc.) was used for the dilutions; the same buffer with 0.1% bovine serum albumin (BSA; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was used for washes after the protein coating step. Protein-coated magnetic beads were incubated with phage library pools ( $5 \times 10^{-9}$  pfu/ml) with end-over-end mixing for 1 h, followed by six washes with the washing buffer, and the release of protein-bound fraction with imidazole elution buffer (400 mM imidazole, 300 mM NaCl, 0.1% BSA and 0.05% Igepal CA-630 in PBS). Eluted phages were titered as described above.

### 4.5 *In vivo* phage playoff

The HTS-based phage *in vivo* playoff method allows comparative internally controlled auditioning of tissue selectivity of systemic candidate peptide-phages. Phages expressing candidates 1–10, PL3uCendR (AGRGRLVRSAGGSVA), PL3 (AGRGRLVR) or G7 (CGGGGGGGC) peptides were amplified in *E. coli* strain BLT5403 (Novagen, EMD Biosciences), mixed in an equimolar ratio, purified by PEG8000 (Sigma-Aldrich, USA) precipitation, followed by

CsCl gradient centrifugation, and dialyzed against PBS.  $5 \times 10^9$  pfu of phage mix was injected i.v. into orthotopic WT-GBM-bearing female nude mice ( $n = 3$ ). After 30 min, the animals were anesthetized and perfused with PBS. The target and control organs (brain, lung, liver) were collected, the tissues were homogenized and phages in tissue lysates were amplified and purified by PEG8000 precipitation. The distribution of phages between target and control organs was determined by HTS as described below. Fold change of peptide count in an organ of interest was calculated according to the following general formula:

$$\text{Fold change} = \frac{\text{pep}_{\text{organ}}/\text{pep}_{\text{input}}}{G7_{\text{organ}}/G7_{\text{input}}}$$

where

$\text{pep}_{\text{organ}}$  = % of reads coming from the peptide of interest in particular organ sequencing dataset;

$\text{pep}_{\text{input}}$  = % of reads coming from the peptide of interest in input library sequencing dataset;

$G7_{\text{organ}}$  = % of reads coming from control G7 peptide in particular organ sequencing dataset;

$G7_{\text{input}}$  = % of reads coming from control G7 peptide in input library sequencing dataset.

## 4.6 Sequencing

As previously described by Pleiko et al. [52], peptide-encoding region of bacteriophage genome was amplified by PCR using Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (#F537L, Thermo Scientific) in 25  $\mu\text{L}$  reaction volume. Cycling conditions: denaturation at 98  $^{\circ}\text{C}$  for 30 s, followed by 25 amplification cycles (10 s at 98  $^{\circ}\text{C}$ , 21 s at 72  $^{\circ}\text{C}$ ), and final elongation (72  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min). Polymerase chain reaction (PCR) products were purified using AMPure XP Bead Based Next-Generation Sequencing Cleanup system (Beckmann Coulter, A63881) using 1.8  $\mu\text{L}$  of beads per 1  $\mu\text{L}$  of PCR products. Purified PCR products were quantified using Agilent Bioanalyzer 2100 Instrument using the High sensitivity DNA Kit (#5067-4626, Agilent). Ion Torrent Emulsion PCR and enrichment steps were performed using Ion PGM HiQ View OT2 kit (#A29900, Life Technologies). High throughput sequencing (HTS) was performed using Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (ION-PGM) using Ion PGM HiQ View sequencing kit (#A30044, Life Technologies) and Ion 316v2 chips (#448149, Life Technologies). The FASTQ sequence files were converted to text files and translated using in-house developed python scripts.

## 4.7 Enzyme/uPA pretreatment

Per 50  $\mu\text{L}$  of peptide-AgNPs (5.6 nM) or 50  $\mu\text{L}$  of phage ( $1 \times 10^{-9}$  pfu/ml) 2–32  $\mu\text{L}$  of uPA (10,000 U/mL; #672112, Sigma-Aldrich) was added and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 1 hour.

In enzymatic cleavage specificity experiments, AgNPs were treated with 2 mg/mL of cathepsin B (#SRP0289, Sigma-Aldrich), 1.3 mg/mL cathepsin K (in-house), 1 mg/mL hyaluronidase (#H3884, Sigma-Aldrich) or 1X TrypLE™

(#12604-019, Gibco) in addition to 32  $\mu$ L of uPA (10,000 U/mL; #672112, Sigma-Aldrich) in the same experimental conditions.

#### 4.8 Cell-free AgNP binding experiments

Cell-free binding studies were done as described in chapter 4.4 “Cell-free phage display”, except 2 mg/mL of hexahistidine-tagged recombinant b1 domain of NRP-1 (in-house) or C-domain of TNC (TNC-C; in-house) was used for coating. For NRP-1 b1, Tris buffer (50 mM, pH 7.0) containing 5 mM imidazole, 1 M NaCl and 0.05% Igepal CA-630 (all from Thermo Scientific Inc.), or for TNC-C and negative control NRP-1 b1 mutant (mut), PBS containing 0.05% Igepal CA-630 (Thermo Scientific Inc.), was used for the protein binding step. For incubations, 0.5 nM peptide-AgNPs were used, and eluted proteins with bound peptide-AgNPs were quantified by UV-vis spectrometry at 415 nm using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific Inc.).

#### 4.9 Peptides

All synthetic peptides used herein were ordered as powder with a purity of > 95%, and reconstituted in PBS; as an exception. Sequences of peptides are shown in Table 2 (all from TAG Copenhagen, Denmark).

**Table 2.** Synthetic peptides

Name	Sequence	MW (Da)
Biotin-PL3	Biotin-Ahx-AGRGRLLVR	1223.49
Biotin-PL3uCendR	Biotin-Ahx-AGRGRLLVRSAGGSVA	1753.04
Biotin-SKLG	Biotin-Ahx-AGRGRLLVRSKLG	1608.95
FAM-PL3	5'-FAM-Ahx-AGRGRLLVR	1458.64
FAM-scrPL3	5'-FAM-Ahx-RAGRGRLLV	1355.50
FAM-SKLG	5'-FAM-Ahx-AGRGRLLVRSKLG	1740.96

Ahx = aminohexanoic acid spacer.

#### 4.10 Synthesis and functionalization of AgNPs

Silver nanoparticles were synthesized according to the Lee and Meisel citrate method [53]. Surface functionalization of AgNPs was done as previously published [42,54]. Briefly, AgNO<sub>3</sub> (360 mg; #209139, Sigma-Aldrich Co., LLC, Darmstadt, Germany) or <sup>107</sup>AgNO<sub>3</sub> or <sup>109</sup>AgNO<sub>3</sub> (Isoflex USA, San Fransisco, CA, USA) was added to ultrapure Milli-Q (MQ) water (2 L; resistivity 18 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>) in a flask cleaned with a piranha solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Next, trisodium citrate hydrate (400 mg; #25114, Sigma-Aldrich Co., LLC) was dissolved in MQ water (40 mL) and added to the vessel. The solution was boiled for 30 min in dark. The resulting Ag-citrate was used directly in the next step.

Next, NeutrAvidin (NA; #31055, Thermo Scientific Inc., Washington, USA) was modified with a OPSS-PEG(5K)-SCM linker (OPSS; JenKem Technology USA Inc., Texas, USA) according to the procedure described by Braun *et al.* [42] Subsequently, NeutrAvidin-OPSS (3.9 mL, 2.9 mg/mL) was added to Ag-citrate (500 mL). After 2 min, 4-morpholineethanesulfonic acid hemisodium salt (5 mL, 0.5 M in MQ water; #M0164, Sigma-Aldrich Co., LLC) was added. The pH of the solution was adjusted to 6.0, and the solution was kept at 37 °C for 24 h. The solution was brought to room temperature (RT) and 10X phosphate buffered saline (50 mL; in-house) was added, followed by Tween® 20 (250 µL; #P9416, Sigma-Aldrich Co., LLC). The solution was centrifuged at 12,200 × g for 1 h at 4 °C, the supernatant was removed, and the particles were resuspended in PBST (0.005% Tween® 20 in PBS). Next, tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride solution (TCEP; #646547, Sigma-Aldrich Co., LLC) was added to a final concentration of 1 mM, followed by a 30 min incubation at RT. Then lipoic acid-PEG(1k)-NH<sub>2</sub> (#PG2-AMLA-1k, Nanocs Inc., New York, USA) was added to a final concentration of 5 µM, and the mixture was incubated at RT for 2.5 h. The solution was centrifuged at 17,200 × g for 20 min at 4 °C, the supernatant was removed and the particles were resuspended in PBST to half of the initial volume. The AgNP solution was filtered through a 0.45 µm filter and stored at 4 °C.

NHS-functionalized CF555 dye (#92130, Biotium Inc., California, USA) was coupled to the NH<sub>2</sub> groups on the AgNPs. For this, NHS-CF555 (5 µL, 2 mM) in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich Co., LLC) was added to AgNA (500 µL), followed by an overnight incubation at 4 °C. The particles were washed 3 times by centrifugation at 3,500 × g for 10 min at 4 °C, followed by resuspension of the particles in PBST. Next, biotinylated peptides were coupled to the particles by adding peptide (10 µL, 2 mM in MQ water) to AgNPs (500 µL), followed by incubation at RT for 30 min. The AgNPs were washed, 0.2 µm filtered and stored at 4 °C in the dark.

#### 4.11 Etching of AgNPs

To eliminate extracellular AgNPs, we exposed the cells to a cell membrane impermeable biocompatible etching solution (10 mM), 1 : 1 solution of tripotassium hexacyanoferrate(III) (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>; CAS# 13746-66-2, Sigma-Aldrich, Co., LLC) and sodium thiosulfate pentahydrate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; CAS# 10102-17-7, Sigma-Aldrich, Co., LLC) in PBS. After incubation with AgNPs cells were treated with the etching solution (400 µL, 10 mM) for 3 minutes at RT, followed by 2 washes with PBS. During etching the AgNPs are dissolved by oxidation with hexacyanoferrate, and the Ag<sup>+</sup> ions form a complex with the thiosulfate. After the treatment only membrane-protected intracellular AgNPs remain intact and detectable.

#### 4.12 Cell culture

Prostate carcinoma cells (PPC1; ATCC) and melanoma cells (M21; ATCC) were grown as attached cultures in tissue culture-treated flasks (Corning Inc., USA) in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza Ltd,

Basel, Switzerland) with added 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Scientific Inc.), penicillin (Thermo Scientific Inc.) and streptomycin (Thermo Scientific Inc.).

Glioblastoma cells (U87-MG; ATCC) were grown as attached cultures in tissue culture-treated flasks (Corning Inc., USA) in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza Ltd, Basel, Switzerland) containing 10% FBS (Thermo Scientific Inc.), 100 IU/mL penicillin (Thermo Scientific Inc.), 100 IU/mL streptomycin (Thermo Scientific Inc.), 1% sodium pyruvate (Sigma-Aldrich) and 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich).

WT-GBM and VEGF-KO-GBM cell lines [55], which were a gift from Gabriele Bergers (Leuven, Belgium), were cultured in MEM with Earl's salts (Capricorn Scientific, Germany) supplemented with 100 IU/mL penicillin (Thermo Scientific Inc.), 100 IU/mL streptomycin (Thermo Scientific Inc.), 1% sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 0.01 M HEPES, 0.6% glucose (Applichem, USA) and 5% of heat-inactivated fetal bovine serum (GE Healthcare, UK). NCH421k cells [56], also a gift from G. Bergers, were cultivated in neurobasal medium complemented with B27 neurobasal supplement (Thermo Fisher Scientific, USA), 100 IU/mL of penicillin/streptomycin (Thermo Scientific Inc.), 0.4 mM Glutamax, 20 ng/ml basic FGF, 20 ng/ml EGF and 40 µg/ml of heparin (all Sigma-Aldrich, USA).

All cell lines were cultured at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Before use, cells were rinsed with DPBS, dissociated with Cellstripper (Thermo Scientific Inc.), counted with a TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories AB, Sundryberg, Sweden), and diluted with supplemented medium or PBS as needed.

#### 4.13 *In vitro* experiments with AgNPs

Semiconfluent cells cultured on coverslips (d = 12 mm; Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) were incubated with CF555-labeled AgNPs (1.5 nM final concentration) at 37 °C for 1 h. Optionally, prior to adding the AgNPs, the AgNPs were pre-incubated with 2 µL of uPA (#672112, Sigma-Aldrich) reconstituted at 10,000 U/mL in MQ water per sample for 1 h at 37 °C in 1.5 mL Eppendorf tubes (Sigma-Aldrich). After incubation with the AgNPs and optional etching (see above), the cells were washed 3 times with 500 µL of DPBS, fixed with -20 °C methanol (MeOH; Sigma-Aldrich) for 1 min, washed 2 times with DPBS, and counterstained with DAPI (500 µL, 1 µg/mL; Thermo Scientific Inc.). For confocal microscopy imaging, microscopy slides (76 × 26 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG) were coverslipped using an aqueous mounting medium Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences).

#### 4.14 Animal work

Athymic nude mice were purchased from the Tartu University Laboratory Animal Centre (Estonia). Female mice were used in all *in vivo* experiments if not stated otherwise. For induction of orthotopic GBM xenografts in nude mice,  $7 \times 10^5$  (WT-GBM, VEGF-KO-GBM) or  $3 \times 10^5$  (NCH421k, U87-MG) cells were implanted intracranially in the right striatum of the brain (coordinates: 2 mm laterally and 2 mm posteriorly from bregma and at 2.5 mm depth). Intracranial

tumors were allowed to develop for 6–7 (WT-GBM), 12–14 (VEGF-KO-GBM, U87-MG), or ~30 (NCH421k) days before performing experiments, and mice were monitored for signs of tumor burden.

For AgNP and FAM-peptide biodistribution studies, tumor-bearing nude mice were i.v. injected with 100  $\mu$ L of AgNPs (11.3 nM) or FAM-peptide (200  $\mu$ g; TAG Copenhagen, Denmark). After 3 h (AgNP) or 1 h (FAM-peptide) of circulation, the mice were anesthetized with intraperitoneally (i.p.) injected 350  $\mu$ L of 0.1 mg/kg dexmedetomidine and 75 mg/kg ketamine dissolved in saline, and perfused with PBS. The brain, lungs and liver were collected, frozen in OCT (Leica Camera AG, Germany), sectioned with a Leica CM1520 (Leica Camera AG, Germany) at 15  $\mu$ m (for immunostaining) onto Superfrost Plus slides (Thermo Fisher, USA), and dried in a vacuum desiccator (Novus DN 200, Buch & Holm, Germany).

For LA-ICP-MS analysis, the  $^{107}$ AgNPs (functionalized with PL3, SKLG or PL3uCendR peptide) and control  $^{109}$ AgNPs (blocked with biotin) were mixed in equimolar ratio and i.v. injected into orthotopic WT-GBM-bearing nude mice (Envigo). In total, 100  $\mu$ L of AgNPs (11.3 nM) was injected per mouse. After 3 h of circulation, the mice were anesthetized with intraperitoneally (i.p.) injected 350  $\mu$ L of 0.1 mg/kg dexmedetomidine and 75 mg/kg ketamine dissolved in saline, and perfused with PBS. The brain, lungs and liver were collected, frozen in OCT (Leica Camera AG, Germany), sectioned with a Leica CM1520 (Leica Camera AG, Germany) at 30  $\mu$ m onto Superfrost Plus slides (Thermo Fisher, USA), and dried in a vacuum desiccator (Novus DN 200, Buch & Holm, Germany).

#### 4.15 Immunohistochemistry and immunofluorescence analyses

For uPA expression staining on 2D cultured cells, the cells were fixed in  $-20$  °C MeOH for 1 min, washed with PBS and blocked with 300  $\mu$ L of 5% blocking solution containing 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA), 5% fetal bovine serum (FBS), 5% bovine serum albumin (BSA), and 5% goat serum (all from GE Healthcare, USA) in PBS for 1 h. The sections were incubated for 1 h at RT with 300  $\mu$ L 0.9 mg/mL polyclonal rabbit anti-uPA IgG (#17968-1-AP, Proteintech Group, Inc., USA) as the primary antibody which was diluted 1 : 100 with 1% blocking solution. After washing with PBST, sections were incubated for 30 min at RT with 250  $\mu$ L of 2 mg/mL Alexa 647-conjugated goat anti-rabbit IgG (#A21245, Invitrogen, USA) as the secondary antibody, which was diluted 1 : 1000 in 1% blocking solution. After washing sequentially with PBST and PBS, nuclei were counterstained with 1  $\mu$ g/mL DAPI (Sigma-Aldrich, USA) in PBS.

For immunofluorescence analysis, cryosections (15  $\mu$ m) on Superfrost Plus slides were fixed in  $-20$  °C MeOH for 2 min, washed with PBS, and blocked with 300  $\mu$ L of 5% blocking solution containing 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA), 5% FBS, 5% BSA, and 5% goat serum (all from GE Healthcare, USA) in PBS for 1 h. The sections were incubated for 1 h at RT with 250  $\mu$ L of 0.5 mg/mL polyclonal rat anti-mouse CD31 (#553370, BD Biosciences, USA), 250  $\mu$ L of 1.2 mg/mL polyclonal rabbit anti-NRP-1 (in-house), 1.4 mg/mL polyclonal rabbit anti-TNC (in-house) or 0.9 mg/mL polyclonal rabbit anti-uPA IgG (#17968-1-AP, Proteintech Group, Inc., USA) as primary antibodies, which were diluted 1 : 200 with 1% blocking solution. After washing with PBST, sections were incubated for 30 min at RT with 250  $\mu$ L of 2 mg/mL Alexa 647-conjugated goat anti-rabbit IgG (#A21245, Invitrogen) or Alexa

546-conjugated goat anti-rat (#A11081, Invitrogen, USA) as the secondary antibody, which was diluted 1 : 1000 in 1% blocking solution. After washing sequentially with PBST and PBS, nuclei were counterstained with 1 mg/mL DAPI (Sigma-Aldrich, USA) in PBS.

For hematoxylin & eosin (H&E) staining, cryosections (15 µm) on Superfrost Plus slides were air-dried at RT, fixed in -20 °C MeOH for 2 min, and rinsed in MQ. Slides were stained with Mayer's hematoxylin (#180210, Reagent, Finland) for 5 min, rinsed with running cold tap water for 5 min, stained with 0.5% eosin (#230251, Sigma-Aldrich, USA) in 95% ethanol (EtOH, Sigma-Aldrich, USA) with 0.5% of acetic acid (Sigma-Aldrich, USA) for 5 min, and rinsed again with cold tap water and MQ for 5 min. After air-drying the sections, they were mounted with 130 µL of Depex (Merck Millipore, USA), and imaged with the Aperio VERSA 10 (Leica Biosystems, Germany).

For 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining, cryosections (15 µm) on Superfrost Plus slides were air-dried at RT, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma-Aldrich, USA) for 20 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 (AppliChem PanReac, USA) for 15 min. Sections were washed with 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) in PBS and blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, USA) in PBS on a rocking platform (SIA BioSan, Latvia) for 30 min at RT. After washing with PBS, sections were blocked with 5% heat-inactivated normal donkey serum (GE Healthcare) and 5% BSA (GE Healthcare), 0.3 M glycine in PBS for 60 min at RT. Sections were incubated overnight at +4 °C with 250 µL of 1 : 200 diluted 1 mg/mL rabbit anti-FAM IgG (#A889, Invitrogen, USA) in blocking buffer as the primary antibody. After washing with PBS, sections were incubated at RT for 1 h with 250 µL of 1 : 200 diluted donkey-anti-rabbit HRP (#406401, Biolegend, USA) as the secondary antibody. After washing with PBS, sections were incubated with 500 µL of ImmPACT DAB (#SK-4105, Vector Laboratories) for 1 min at RT. After washing with MQ for 30 min, sections were air-dried, mounted with 130 µL Depex (Merck Millipore, USA), and imaged with the Aperio VERSA 10 (Leica Biosystems, Germany).

#### 4.16 Microscopy

For H&E and DAB staining imaging, parallel tissue sections were immunostained with H&E and DAB as described above. Sections were imaged with a 10 × objective (HC PL FLUOTAR 10 ×/0.32; Leica Microsystems, Germany) mounted to an Aperio VERSA 10 Brightfield, Fluorescence FISH Digital Pathology Scanner (Leica Biosystems, Germany). Images were analyzed with Aperio ImageScope v. 12.4.3.5008 software (Leica Biosystems Pathology Imaging, Germany).

Confocal imaging was performed using an Olympus FV1200MPE confocal microscope (Olympus Europa SE & Co. KG), and images were analyzed with FluoView FV10-ASW 4.0 software (Olympus Europa SE & Co. KG).

#### 4.17 LA-ICP-MS analysis

Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) analysis of the tissue samples was performed using Agilent 8800 ICP-MS/MS coupled to a Cetac LSX-213 G2+ laser ablation unit equipped with HelEx II ablation cell and connected using ARIS (Aerosol Rapid Introduction System) sample introduction system. The system was tuned using NIST 610 glass. Ablation was performed as line scans using 65  $\mu\text{m}$  square spot, scan speed of 260  $\mu\text{m/s}$ , 20 Hz and fluence of 12  $\text{J/cm}^2$ . All tissue samples were fully ablated using 65  $\mu\text{m}$  spacing of ablation lines. ICP-MS was operated in single quad mode. Data collection was performed in TRA mode with dwell times of 9.5 ms on mass  $^{13}\text{C}$  and 14 ms on mass  $^{107}\text{Ag}$  and  $^{109}\text{Ag}$  corresponding to a total duty cycle of 50 ms. Data reduction of LA-ICP-MS raw data was performed using Iolite v3.62 and Microsoft Excel. Median with MAD error 2 SD outlier reject was used for data selection in Iolite. To remove non-tissue areas in the analytical data, signal masking based on  $^{13}\text{C}$  signal was employed. 2D  $^{109}\text{Ag}/^{107}\text{Ag}$  signal ratio maps were then constructed using Iolite v3.62 and exported as numeric maps for statistical analysis.

#### 4.18 Statistical analysis

To assess statistical significance, one- or two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey or Dunnett post-hoc test, as appropriate, was performed using GraphPad Prism Software v. 10.1.2 (GraphPad Software, LLC, CA, USA).

#### 4.19 Artwork and illustrations

The graphical abstract as well as Figs. 1a and 4a were created with BioRender.com software in accordance with the BioRender's Academic License to Allan Tobin. Microsoft Office PowerPoint was used to create the figure panels.

## 5 Ethics approval and consent to participate

All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed. Animal experimentation protocols were approved by the Committee of Animal Experimentation of Estonian Ministry of Agriculture (Permit #159). No human subjects or patient data was used in this study.

## 6 Consent for publication

Not applicable.

## 7 Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed, and non-commercial materials used in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## 8 Competing interests

Tambet Teesalu is an inventor of patents on CendR peptides and shareholder of Lisata Therapeutics, a company that develops iRGD peptide for cancer therapy. Prakash Lingasamy and Tambet Teesalu are patent holders for the PL3 peptide ("Bi-Specific Extracellular Matrix Binding Peptides and Methods of Use Thereof"; WO 2020/161602 A1) [57]. The rest of the authors declare that they have no competing interests.

## 9 Funding

Tambet Teesalu was funded by the Estonian Research Council (grants PRG230, PRG1788, and EAG79), EuronanomedIII projects ECM-CART and iNanoGun, and TRANSCAN3 project ReachGLIO. The study was further supported by the European Regional Development Fund through a Smart Specialization PhD Scholarship (to A. Tobi) as a part of the Estonian Research and Development and Innovation Strategy 2014–2020.

## 10 Author's contributions

Allan Tobi participated in the study design planning, wrote the manuscript, made the figures, synthesized and conjugated AgNPs, performed all *in vitro* experiments, assisted with *in vivo* experiments, performed immunofluorescence staining of tissues, performed the NRP-1 and CD31 colocalization experiments, performed or assisted in confocal microscopy imaging, conducted all statistical analyses (except for phage playoff), and performed or assisted in data analysis. Maarja Haugas performed the *in vivo* experiments, tissue sectioning and immunohistochemistry staining, and contributed to phage work. Kristina Rabi and Kristina Põsnograjeva performed all the phage work (phage display, phage binding experiments, phage playoff). Jhalak Sethi performed the AgNP cell-free binding experiments, uPA receptor staining on cells, and assisted with AgNP conjugation as well as cell culture work. Päärn Paiste performed the LA-ICP-MS analyses and relevant data analysis. Toomas Jagomäe performed slide scanner imaging of tissues. Karlis Pleiko analyzed the phage playoff data. Prakash Lingasamy contributed to the study design planning and provided advice on experiments. Tambet Teesalu supervised the study, participated in the study design planning and writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## 11 Acknowledgements

We would like to thank Kaarel Kurm for assistance with sequencing.

## 12 Data availability statement

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## 13 References

1. Mathijssen RHJ, Sparreboom A, Verweij J. Determining the optimal dose in the development of anticancer agents. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11:272–81.
2. Dimou A, Syrigos KN, Saif MW. Overcoming the stromal barrier: technologies to optimize drug delivery in pancreatic cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2012;4:271–9.
3. Shergalis A, Bankhead A, Luesakul U, Muangsin N, Neamati N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. Barker EL, editor. *Pharmacol Rev*. 2018;70:412–45.

4. Manzari MT, Shamay Y, Kiguchi H, Rosen N, Scaltriti M, Heller DA. Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nat Rev Mater*. 2021;6:351–70.
5. Henke E, Nandigama R, Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 1];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2019.00160>
6. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77:1745–70.
7. Mi P, Cabral H, Kataoka K. Ligand-Installed Nanocarriers toward Precision Therapy. *Adv Mater*. 2020;32:1902604.
8. Scodeller P, Ascitutto EK. Targeting Tumors Using Peptides. *Molecules*. 2020;25:808.
9. Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J Cell Biol*. 2010;188:759–68.
10. Lingasamy P, Laarmann A-H, Teesalu T. Tumor Penetrating Peptide-Functionalized Tenascin-C Antibody for Glioblastoma Targeting. *Curr Cancer Drug Targets*. 2021;21:70–9.
11. Lingasamy P, Tobi A, Haugas M, Hunt H, Paiste P, Asser T, et al. Bi-specific tenascin-C and fibronectin targeted peptide for solid tumor delivery. *Biomaterials*. 2019;219:119373.
12. Lingasamy P, Teesalu T. Homing Peptides for Cancer Therapy. In: Fontana F, Santos HA, editors. *Bio-Nanomedicine Cancer Ther* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2024 Apr 9]. p. 29–48. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-58174-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-58174-9_2)
13. Dean A, Price TJ, Sjoquist K, Aryal N, Mumford J, Day F, et al. 131I-TiP ASCEND: Randomized, double-blinded phase II study of gemcitabine and nab-paclitaxel with CEND-1 or placebo in untreated metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma - An Australasian Gastro-Intestinal Trials Group (AGITG) trial ACTRN12621001290886. *Ann Oncol*. 2022;33:S1483.
14. Osada H, Tokunaga T, Nishi M, Hatanaka H, Abe Y, Tsugu A, et al. Overexpression of the Neuropilin 1 (NRP1) Gene Correlated with Poor Prognosis in Human Glioma. *Anticancer Res*. 2004;24:547–52.
15. Säälik P, Lingasamy P, Toome K, Mastandrea I, Rousso-Noori L, Tobi A, et al. Peptide-guided nanoparticles for glioblastoma targeting. *J Controlled Release*. 2019;308:109–18.
16. Simón-Gracia L, Hunt H, Scodeller P, Gaitzsch J, Kotamraju VR, Sugahara KN, et al. iRGD peptide conjugation potentiates intraperitoneal tumor delivery of paclitaxel with polymersomes. *Biomaterials*. 2016;104:247–57.
17. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, et al. Coadministration of a Tumor-Penetrating Peptide Enhances the Efficacy of Cancer Drugs. *Science*. 2010;328:1031–5.
18. Antipenko A, Himanen J-P, van Leyen K, Nardi-Dei V, Lesniak J, Barton WA, et al. Structure of the semaphorin-3A receptor binding module. *Neuron*. 2003;39:589–98.
19. Parker MW, Xu P, Li X, Kooi CWV. Structural Basis for Selective Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Binding to Neuropilin-1 \*. *J Biol Chem*. 2012;287:11082–9.
20. Teesalu T, Sugahara KN, Kotamraju VR, Ruoslahti E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:16157–62.
21. Zanuy D, Kotla R, Nussinov R, Teesalu T, Sugahara KN, Alemán C, et al. Sequence dependence of C-end rule peptides in binding and activation of neuropilin-1 receptor. *J Struct Biol*. 2013;182:78–86.

22. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Girard OM, et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell*. 2009;16:510–20.
23. Paasonen L, Sharma S, Braun GB, Kotamraju VR, Chung TDY, She Z-G, et al. New p32/gC1qR Ligands for Targeted Tumor Drug Delivery. *ChemBioChem*. 2016;17:570–5.
24. Alberici L, Roth L, Sugahara KN, Agemy L, Kotamraju VR, Teesalu T, et al. De Novo Design of a Tumor-Penetrating Peptide. *Cancer Res*. 2013;73:804–12.
25. Ayo A, Laakkonen P. Peptide-Based Strategies for Targeted Tumor Treatment and Imaging. *Pharmaceutics*. 2021;13:481.
26. Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, Ruoslahti E. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nat Med*. 2002;8:751–5.
27. Lingasamy P, Tobi A, Kurm K, Kopanchuk S, Sudakov A, Salumäe M, et al. Tumor-penetrating peptide for systemic targeting of Tenascin-C. *Sci Rep*. 2020;10:5809.
28. Roche J, Drabkin H, Brambilla E. Neuropilin and Its Ligands in Normal Lung and Cancer. *Madame Curie Biosci Database Internet [Internet]*. Landes Bioscience; 2013 [cited 2024 Apr 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6324/>
29. Teesalu T, Sugahara K, Ruoslahti E. Tumor-Penetrating Peptides. *Front Oncol [Internet]*. 2013 [cited 2023 Feb 14];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2013.00216>
30. Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev*. 2008;34:122–36.
31. Parry MAA, Fernandez-Catalan C, Bergner A, Huber R, Hopfner K-P, Schlott B, et al. The ternary microplasmin–staphylokinase–microplasmin complex is a proteinase–cofactor–substrate complex in action. *Nat Struct Biol*. 1998;5:917–23.
32. Li J, Fan H, Zhou X, Xiang Y, Liu Y. Prognostic Significance and Gene Co-Expression Network of PLAU and PLAU in Gliomas. *Front Oncol [Internet]*. 2022 [cited 2023 Nov 22];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.602321>
33. Yamamoto M, Sawaya R, Mohanam S, Bindal AK, Bruner JM, Oka K, et al. Expression and Localization of Urokinase-Type Plasminogen Activator in Human Astrocytomas in Vivo. *Cancer Res*. 1994;54:3656–61.
34. Zhao Y, Lyons CE, Xiao A, Templeton DJ, Sang QA, Brew K, et al. Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: A potential role in glioblastoma invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369:1215–20.
35. Masucci MT, Minopoli M, Di Carluccio G, Motti ML, Carriero MV. Therapeutic Strategies Targeting Urokinase and Its Receptor in Cancer. *Cancers*. 2022;14:498.
36. Braun GB, Sugahara KN, Yu OM, Kotamraju VR, Mölder T, Lowy AM, et al. Urokinase-controlled tumor penetrating peptide. *J Controlled Release*. 2016;232:188–95.
37. Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. *Front Oncol [Internet]*. 2018 [cited 2023 Feb 1];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00431>
38. Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M, Borsi L, Urbini S, Nicolo G, et al. Identification of a Glioblastoma-Associated Tenascin-C Isoform by a High Affinity Recombinant Antibody. *Am J Pathol*. 1999;154:1345–52.

39. Silacci M, Brack SS, Späth N, Buck A, Hillinger S, Arni S, et al. Human monoclonal antibodies to domain C of tenascin-C selectively target solid tumors in vivo. *Protein Eng Des Sel.* 2006;19:471–8.
40. Yilmaz A, Loustau T, Salomé N, Poilil Surendran S, Li C, Tucker RP, et al. Advances on the roles of tenascin-C in cancer. *J Cell Sci.* 2022;135:jcs260244.
41. Tsuji K, Ojima M, Otabe K, Horie M, Koga H, Sekiya I, et al. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* 2017;26:1089–102.
42. Braun GB, Friman T, Pang H-B, Pallaoro A, de Mendoza TH, Willmore A-MA, et al. Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nat Mater.* 2014;13:904–11.
43. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D, et al. VEGF Inhibits Tumor Cell Invasion and Mesenchymal Transition Through a MET/VEGFR2 Complex. *Cancer Cell.* 2012;22:21–35.
44. Haspel N, Zanuy D, Nussinov R, Teesalu T, Ruoslahti E, Aleman C. Binding of a C-end rule peptide to the neuropilin-1 receptor: a molecular modeling approach. *Biochemistry.* 2011;50:1755–62.
45. Du R, Petritsch C, Lu K, Liu P, Haller A, Ganss R, et al. Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro-Oncol.* 2008;10:254–64.
46. Páez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell.* 2009;15:220–31.
47. A. Willmore A-M, Simón-Gracia L, Toome K, Paiste P, Ramana Kotamraju V, Mölder T, et al. Targeted silver nanoparticles for ratiometric cell phenotyping. *Nanoscale.* 2016;8:9096–101.
48. Toome K, A. Willmore A-M, Paiste P, Tobi A, N. Sugahara K, Kirsimäe K, et al. Ratiometric in vivo auditing of targeted silver nanoparticles. *Nanoscale.* 2017;9:10094–100.
49. Pang H-B, Braun GB, Friman T, Aza-Blanc P, Ruidiaz ME, Sugahara KN, et al. An endocytosis pathway initiated through neuropilin-1 and regulated by nutrient availability. *Nat Commun.* 2014;5:4904.
50. Montet X, Funovics M, Montet-Abou K, Weissleder R, Josephson L. Multivalent Effects of RGD Peptides Obtained by Nanoparticle Display. *J Med Chem.* 2006;49:6087–93.
51. Põšnograjeva K, Pleiko K, Haugas M, Teesalu T. New Tools for Streamlined In Vivo Homing Peptide Identification. In: Langel Ü, editor. *Cell Penetrating Pept Methods Protoc* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2022 [cited 2023 Dec 7]. p. 385–412. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1752-6_25)
52. Pleiko K, Põšnograjeva K, Haugas M, Paiste P, Tobi A, Kurm K, et al. In vivo phage display: identification of organ-specific peptides using deep sequencing and differential profiling across tissues. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:e38.
53. Lee PC, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J Phys Chem.* 1982;86:3391–5.
54. Tobi A, Willmore A-MA, Kilk K, Sidorenko V, Braun GB, Soomets U, et al. Silver Nanocarriers Targeted with a CendR Peptide Potentiate the Cytotoxic Activity of an Anticancer Drug. *Adv Ther.* 2021;4:2000097.
55. Marumoto T, Tashiro A, Friedmann-Morvinski D, Scadeng M, Soda Y, Gage FH, et al. Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. *Nat Med.* 2009;15:110–6.

56. Blouw B, Song H, Tihan T, Bosze J, Ferrara N, Gerber HP, et al. The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell*. 2003;4:133–46.
57. Teesalu T, Lingasamy P. Bi-Specific Extracellular Matrix Binding Peptides and Methods of Use Thereof [Internet]. 2020 [cited 2024 Apr 13]. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2020161602>

**Lisa 3. Vooru 3 ja 4 sekveneerimise tulemusel saadud peptiidjärjestused.** Punane on PL3-peptiidi järjestus (raamatukogu esimese aminohappe asemel on stopp-koodon).

3. voor uPA+		3. voor uPA-	
<b>6 AGRGRLVR</b>		<b>7 AGRGRLVR</b>	
1 AGRGRLVRSTPP	1 CGPRTFWCARLSGKLAAALE	1 AGRGRLVRTMER	
1 AGRGRLVRSTNL		1 AGRGRLVRPTAL	
1 AGRGRLVRPSER		1 AGRGRLVRPSHD	
1 AGRGRLVRPISS		1 AGRGRLVRGSDT	
1 AGRGRLVRL			
1 AGRGRLVREATR			

4. voor uPA+			4. voor uPA-
<b>65 AGRGRLVR</b>	1 AGRGRLVRPPAR	1 AGRGRLVREIPK	<b>85 AGRGRLVR</b>
1 AGRGRLVRVDAR	1 AGRGRLVRPDNR	1 AGRGRLVRDSIR	2 VGRGRLVR
1 AGRGRLVRVD	1 AGRGRLVRPDIK	1 AGRGRLVRDRVM	1 AGRGRLVRSSIP
1 AGRGRLVRTTDR	1 AGRGRLVRNSPP	1 AGRGRLVRDHNR	1 AGRGRLVRSNER
1 AGRGRLVRSIDR	1 AGRGRLVRMSER	1 AGRGRLVRDGSR	1 AGRGRLVRSDLR
1 AGRGRLVRSGPP	1 AGRGRLVRMIGV	1 AGRGRLVRDAVR	1 AGRGRLVRPSQR
1 AGRGRLVRQGDR	1 AGRGRLVRGTLT	1 AGRGRLVRDAQR	1 AGRGRLVRRPSEK
1 AGRGRLVRPVER	1 AGRGRLVRGDDR	1 AGRGRLVRANGL	1 AGRGRLVRHESK
1 AGRGRLVRPV	1 AGRGRLVRFDNR	1 AGRGRLVRAIPR	1 AGRGRLVREESR
1 AGRGRLVRPTLL	1 AGRGRLVRESSR	1 AGR	1 AGRGRLVRDVPR
1 AGRGRLVRPTL	1 AGRGRLVRER		1 AGRGRLVRADDR

**Lisa 3. Ion Torrenti sekveneerimisandmete muutuse kordsuse arvutamine.**

Muutuse kordsus arvutati järgnevalt:

$$\text{Muutuse kordsus} = \frac{\text{peptiid}_{\text{kude}}/\text{peptiid}_{\text{sisend}}}{\text{kontrollpeptiid}_{\text{kude}}/\text{kontrollpeptiid}_{\text{sisend}}}$$

kus

$\text{peptiid}_{\text{organ}}$  = huvipakkuva peptiidi lugemite % konkreetse koe sekveneerimise andmestikus;

$\text{peptiid}_{\text{sisend}}$  = huvipakkuva peptiidi lugemite % sisend raamatukogu sekveneerimise andmestikus;

$\text{kontrollpeptiid}_{\text{kude}}$  = kontrollpeptiidi lugemite % konkreetse koe sekveneerimise andmestikus;

$\text{kontrollpeptiid}_{\text{sisend}}$  = kontrollpeptiidi lugemite % sisend raamatukogu sekveneerimise andmestikus.

(Pleiko jt., 2021)

## LIHTLITSENTS

### **Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kristina Rabi,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „Proteolüütiliselt aktiveeritud kasvajaspetsiifiliste peptiidide identifitseerimine“ , mille juhendaja on Tambet Teesalu ja Juhan Sedman, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **22.05.2025** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Kristina Rabi*  
**22.05.2024**