

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**Studium radioaktivního značení receptorově – specifického peptidu ze
skupiny derivátů gastrinu I**

Diplomová práce

**Study of radiolabelling of receptor – specific peptide from the group of
gastrin derivatives I**

Diploma Thesis

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Ing. Stanislav Ďoubal, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc.

Hradec Králové, 2011

Jana Zeithamová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 11. 5. 2011

.....
podpis autora

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. za vedení diplomové práce a také za její nemalou podporu, mnoho podnětných rad, trpělivost a čas, který mi věnovala při pomoci s vypracováním této práce.

Můj dík rovněž patří rodině a všem blízkým za podporu při studiu a tvorbu potřebného zázemí.

Obsah

1 Abstrakt.....	6
2 Zadání práce.....	7
3 Úvod.....	8
4 Teoretická část.....	9
4.1 Úvod do radiofarmak.....	9
4.1.1 Definice	9
4.1.2 Požadavky na radiodiagnostika.....	9
4.1.3 Základní rozdělení radiofarmak.....	9
4.1.4 Historie	10
4.1.5 Radioterapeutika.....	11
4.1.6 Použití.....	11
4.2 Peptidy.....	14
4.3 Minigastriny.....	16
4.3.1 Rozdělení receptorů.....	16
4.3.2 Radioaktivní značení.....	16
4.3.3 Možné problémy minigastrinů.....	19
4.3.4 Minigastriny značené techneciem.....	21
4.3.5 Chemická a farmakologická stránka minigastrinů.....	21
4.4 Analytické metody používané v radiofarmacii.....	24
4.4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	24
4.4.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	27
4.4.2.1 Instantní tenkovrstvá chromatografie (ITLC-SG).....	27
4.4.3 Gelová chromatografie.....	28
5 Experimentální část.....	30
5.1 Příprava minigastrinů	30
5.2 Použité chemikálie a materiál.....	30
5.3 Použité analytické metody pro analýzu minigastrinů.....	32
5.3.1 HPLC analýza.....	32
5.3.1.1 Příprava vzorku pro analýzu.....	32
5.3.2 Tenkovrstvá chromatografie (ITLC-SG).....	33
6 Výsledky.....	34

6.1 Minigastrin 46.....	34
6.1.1 Radioaktivní značení peptidu.....	34
6.1.2 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 46 pomocí metody ITLC-SG.....	34
6.1.3 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 46 pomocí metody HPLC.....	47
6.2 Minigastrin 47.....	51
6.2.1 Radioaktivní značení peptidu.....	51
6.2.2 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 47 pomocí metody ITLC-SG.....	51
6.2.3 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 47 pomocí metody HPLC.....	57
6.3 Minigastrin 48.....	59
6.3.1 Radioaktivní značení peptidu.....	59
6.3.2 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 48 pomocí metody ITLC-SG.....	59
6.3.3 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 48 pomocí metody HPLC.....	63
7 Diskuse.....	66
8 Shrnutí závěrů práce.....	69
9 Seznam použité literatury.....	70

1 Abstrakt

Tato práce se zabývá studiem radioaktivního značení minigastrinů pomocí izotopu ^{111}In . K experimentálním účelům byly použity minigastriny 46, 47 a 48 lišící se sekvencí aminokyselin. Byla zkoumána především radiochemická čistota po označení $^{111}\text{InCl}_3$, jelikož tento parametr je velmi důležitý pro další možné použití.

Dalším zkoumaným parametrem bylo sledování stability radioaktivně označených minigastrinů. Výsledky byly zjišťovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která předkládá jasné důkazy o znečištění a o možných rozkladných produktech. Druhou použitou metodou byla instantní tenkovrstvá chromatografie prováděná v několika rozdílných prostředích. Cílem práce bylo zjistit závislost čistoty produktu na čase jak v krátkodobém, tak dlouhodobém časovém intervalu.

Abstract

This work studies the radiolabeling of minigastrins using ^{111}In . For experimental purposes minigastrins 46, 47 and 48 were used with different amino acids sequences. It was made especially for radiochemical purity $^{111}\text{InCl}_3$ sign, since this parameter is very important for possible future use of these labeled peptides.

Another parameter investigated was the monitoring of the stability of radioactively labeled minigastrins. Results were measured using high performance liquid chromatography, the clear evidence of pollution and possible degradation products. The second applied method was performed by instant thin-layer chromatography in several different environments. The objective was to determine the dependence on the purity of the product over time in both short and long time intervals.

2 Zadání práce

Cílem této práce bylo radioaktivně označit vybrané komerčně získané deriváty gastrinu modifikované pomocí chelátoru DOTA radionuklidem ^{111}In a stanovit radiochemickou čistotu značeného produktu pomocí dostupných technik. Dalším cílem bylo stanovit stabilitu radioaktivně označených minigastrinů při uchování značeného produktu při 4°C u vzorků s dostatečnou aktivitou, písemně a rovněž graficky zpracovat výsledky. Cílem práce bylo také prostudovat a připravit přehled literatury zabývající se využitím derivátů gastrinu v radiofarmacii.

3 Úvod

Cílená distribuce (targeting) selektivních molekul je v onkologii považována za slibnou strategii ať pro diagnostické, tak i terapeutické využití. Pro tento účel jsou velmi významnými vektory regulační peptidy. Zájem o ně trvá relativně krátkou dobu – poslední dvě desetiletí. Dnes se setkávají se zájmem, který někteří vědci odvážně srovnávají s cílenou terapií pomocí protilátek.

Peptidy mají ve srovnání s protilátkami řadu výhod: malou velikost molekuly, která je důvodem rychlé orgánové distribuce a dostupnosti, nejsou antigenní a jsou relativně snadno syntetizovatelné. Z chemické stránky jsou peptidy kombinací aminokyselin spojených peptidovou vazbou, a právě přirozeně vyskytující se peptidy, jejichž velikost se pohybuje od několika spojených aminokyselin až po několik desítek spojených aminokyselin, jsou terčem zájmu posledních několika let v diagnostice nádorů. Jedná se o skupinu peptidů, které se fyziologicky vyskytují v živém organismu a vykazují řadu farmakologických účinků. Své funkce zprostředkovávají pomocí vysoce specifických receptorů obvykle spojených s G proteiny. Ve zdravých orgánech je hustota těchto receptorů podstatně nižší než u patologických stavů. Na druhé straně je ovšem vysoká hustota peptidových receptorů na buňkách některých typů nádorů. Několika příklady vysoké hustoty gastrinových receptorů umožňujících využití receptorově-specifických peptidů jsou buňky malobuněčného plicního nádoru, medulárního karcinomu, některých nádorů prsu a další.

Prvním příkladem využití peptidových receptorů v nukleární medicíně jsou somatostatinové receptory, které byly v endokrinně řízených nádorech zaznamenány již v roce 1984. Důsledkem tohoto poznání byl vývoj prvního peptidového radiodiagnostika, kterým byl oktreotid s navázaným chelátorem DTPA pro vazbu izotopu ^{111}In vyvinutý v Univerzitní nemocnici v Rotterdamu, a komerčně dodávaný firmou Mallinckrodt pod názvem OctreoScan®.

Tento peptid byl dále různě modifikován i pro vazbu $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Označená látka se po intravenózním podání distribuuje v těle pacienta, a pokud má pacient nádor, který exprimuje tyto specifické receptory v dostatečném množství, značený peptid se na tyto receptory naváže. Následuje skenování gama kamerou či pozitronovou emisní tomografií (v případě značení receptorově-specifických farmak pomocí krátkodobých radionuklidů emitujících pozitrony). Citlivost zobrazení umožňuje obvykle zachycení nádoru o velikosti několika milimetrů. Vysoká specifita a citlivost, to jsou hlavní důvody, proč se staly tyto regulační peptidy tak zajímavé a důležité při výzkumu zobrazování rakoviny v posledních letech.

4 Teoretická část

4.1 Úvod do radiofarmak

4.1.1 Definice

Radiofarmakum je radioaktivní léčivo, které slouží při diagnostice a rovněž terapii lidských onemocnění. Lékařským oborem, který využívá radioaktivní zářiče k výše jmenovaným činnostem, je nukleární medicína. Základem diagnózy je nejčastěji detekce ionizujícího záření vycházejícího z těla pacienta, které vzniká radioaktivní přeměnou radionuklidů.

Radiofarmaka se skládají ze dvou částí: neaktivního léčiva (nosiče), na němž je navázán vhodný radionuklid, jenž je zdrojem ionizujícího záření. Pohyb v těle je určen povahou radionuklidu, fyzikálně-chemickými vlastnostmi a způsobem podání. O vhodnosti použitého radiofarmaka rozhoduje jeho distribuce v těle, způsob vylučování nebo vychytávání v konkrétním orgánu. Nejčastěji se setkáme s parenterálním podáním, příkladem mohou být pravé roztoky či koloidní disperze. Uplatňuje se také inhalace ve formě plynů či aerosolů. Formou k aplikaci per os jsou roztoky, emulze, tuhé látky. Můžeme se setkat i s přípravky topickými. Nakonec je radiofarmakum z těla vyloučeno močí, potem nebo stolicí. [1]

4.1.2 Požadavky na radiodiagnostiku

Mezi hlavní požadavky patří pronikavost záření, které musí procházet tělem pacienta. Pronikavost záření závisí na jeho energii. Ideální je co nejčistší gama záření. Optimální energie emitovaných fotonů z hlediska scintigrafie je v rozmezí 100-150 keV. Pokud jsou zde přítomné i složky alfa a beta, dochází zbytečně k větší radiační zátěži. Záření gama proniká do tkání hlouběji než alfa či beta.

Neméně důležitý je fyzikální poločas radionuklidu. Volí se přiměřeně době, která je potřebná k vyšetření. Dalším požadavkem je nárok na produkt rozpadu, kterým má být stabilní nuklid. [2]

4.1.3 Základní rozdělení radiofarmak

Dle přípravy dělíme radiofarmaka na dvě skupiny. První tvoří radiofarmaka, jež jsou vyráběna hromadně v určitých centrech a na oddělení nukleární medicíny jsou dodávána hotová. Nespornou výhodou takto připravených látek jsou nejen nižší náklady a možnost

automatizace procesu výroby, ale především zajištění jednotnosti výrobků. Využití mají především v těch případech, kdy je poločas přeměny radionuklidu delší, než je doba nutná k převedení radionuklidu do lékové formy a dopravu přípravku k odběrateli. Na druhé straně je však třeba dodržovat mnoho požadavků – na kvalifikaci pracovníků, pracovní prostory a zařízení, hygienu práce, dokumentaci, skladování. Přísná bezpečnostní opatření vycházejí z možného rizika patrného ze složení radiofarmak. Mezi hromadně vyráběná radiofarmaka řadíme obvykle ta, která obsahují radioaktivní prvky ^{131}I , ^{201}Tl , ^{67}Ga , ^{169}Yb . [2]

Do druhé skupiny pak patří radiofarmaka připravovaná magistraliter na odděleních nukleární medicíny. Pro jejich přípravu jsou k dispozici speciálně upravené neradioaktivní soupravy, tzv. kity, jež jsou vyráběny farmaceutickými firmami. Tyto obsahují lyofilizovanou neaktivní část radiofarmaka, obvykle volný ligand. Na pracovišti se k nim přidá radionuklid, následuje rozpuštění a promíchání složek soupravy. Poslední fází je inkubace preparátu při vhodné teplotě po předepsanou dobu. I zde platí přísné směrnice správné výrobní praxe, jež zajišťují kontrolu a přípravu radiofarmak s jejich zamýšleným použitím. [2], [3]

4.1.4 Historie

Prvním radionuklidem, který našel uplatnění v nukleární medicíně, byl radiojód s poločasem přeměny 8 dní. Jeho hlavní indikací byla diagnostika a terapie štítné žlázy. Podával se perorálně, ve formě ^{131}J -jodidu sodného. Jód je nositelem vysoké energie gama záření a navíc má ve spektru složku beta, které zvyšuje radiační zátěž. V šedesátých a sedmdesátých letech byl postupně nahrazen $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Dnes se jód využívá ke značkování protilátek a fibrinogenu pro lokalizaci trombů. [2]

Vůbec nejčastěji používanou látkou je technecium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Získává se beta rozpadem molybden-99 (^{99}Mo). Má výhodné fyzikální a chemické vlastnosti, emituje záření gama o energii 140 keV. Poločas radioaktivní přeměny je 6 hodin. Tento fakt je velmi výhodný, jelikož radiační zátěž organismu je malá a diagnostické informace jsou dostatečně kvalitní. Přímé značení $^{99\text{m}}\text{Tc}$ je provedeno relativně jednoduchou redukcí kovu. Značená sloučenina však musí obsahovat vhodné funkční skupiny, jako například disulfidové můstky v sekvenci peptidů nebo vhodné funkční skupiny v chelátoru. Tato metoda trpí některými problémy, jako je nespecifické spojení radioizotopu či příprava nepříliš stabilních komplexů. Alternativou je použití bifunkčního chelátoru. Získem je stabilní a specifická vazba radionuklidu k receptorově-specifické sloučenině. [3], [4]

Radioizotopy indium-111 (^{111}In) a gallium-68 (^{68}Ga) jsou slibné látky pro farmaceutickou aplikaci. Jsou široce využívány, a to díky ideálním fyzikálním a chemickým vlastnostem. Navíc jsou poměrně rychle a stabilně připojeny k peptidu, obvykle pomocí vhodného bifunkčního chelátoru (viz dále).

Radionuklid ^{111}In se přeměňuje elektronovým záchytem. Jeho poločas přeměny je 67,2 hodiny. Přípravuje se na cyklotronu ozařováním ^{111}Cd protony. Nejčastěji se využívá ve formě $^{111}\text{InCl}_3$. Na oddělení nukleární medicíny je obvykle dodáván ve formě $^{111}\text{InCl}_3$ v roztoku 0.04M – 0.05M HCl. V současnosti se používá k zobrazování endokrinně řízených nádorů prostřednictvím radioaktivně označených receptorově-specifických peptidů ze skupiny derivátů somatostatinu. [4]

Fyzikální poločas pozitronového zářiče ^{68}Ga je 1,1 h. Je získáváno z komerčně dostupného generátoru ^{68}Ge - ^{68}Ga . V poslední době byla publikována řada prací o možnostech využití tohoto zářiče ke značení receptorově-specifických farmak. [2], [28], [29], [30]

Dalším pozitronovým zářičem s vhodnými fyzikálními parametry pro využití v nukleární medicíně je fluor-18 (^{18}F) s poločasem 1,83 hodiny. Přípravuje se v cyklotronu nebo lineárním urychlovači částic ozařováním kyslíku-18 (^{18}O). V současné době existuje řada rychlých i několika krokových halogenačních postupů pro značení jednoduchých organických sloučenin. Radionuklid ^{18}F se nejvíce využívá v PET centrech pro značení deoxyglukózy. [4], [31]

4.1.5 Radioterapeutika

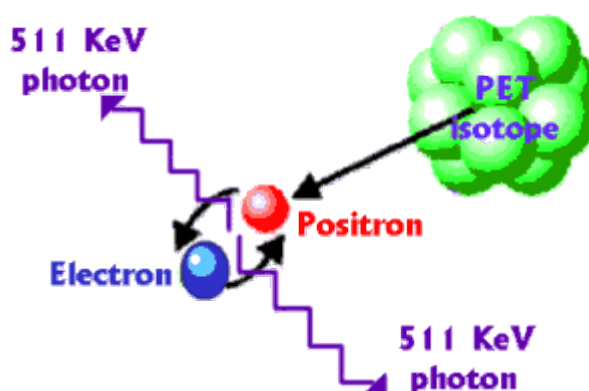
Čistý beta zářič s poločasem přeměny 64,1 hodiny je yttrium-90 (^{90}Y). Spolu s dalším beta zářičem luteciem-177 (^{177}Lu) je využíván k radioterapii různých typů rakoviny. ^{90}Y je v nukleární medicíně používáno podstatně déle než ^{177}Lu a našlo využití nejen při nádorové terapii, jmenovitě u non Hodkinova lymfomu, rakovině mozku, jater, prsu, vaječníků či prostaty, ale i při jiných aplikacích, jako je ozařování hypertrofického synovia kolenního kloubu u revmatoidní artritidy. Proces se nazývá radionuklidová synovektomie. Radionuklid ^{90}Y zde najdeme ve formě sterilní koloidní suspenze citronanu yttritického, jehož pH se pohybuje v rozmezí 5,5 – 7,5. [4]

4.1.6 Použití

Jak bylo v úvodu naznačeno, radiofarmaka se mohou využít k vyšetřování – tedy k diagnostice různých patologických stavů nebo k jejich léčbě. Svým zářením totiž ovlivňují patologicky změněné tkáně.

Základní zobrazovací metodou nukleární medicíny je scintigrafie. Tato metoda zobrazí prostorové rozložení radiofarmaka v těle. Toho dosáhneme podáním látky, která je radioaktivní. Může se podat jakákoli látka, která se běžně nachází v našem těle, jen se určitý atom této látky vymění za atom radioaktivní. Po podání radiofarmaka do těla pacienta dochází k emisi záření, protože radioaktivní atom je v čase nestabilní a přemění se na atom o nižší energii. Nadbytek energie se u látek používaných při scintigrafii vyzáří v podobě záření gama, jež je zachycováno detektorem scintilační kamery. Na základě těchto výsledků se zjistí fyziologická funkce orgánu a případné patologické změny. Mohou se odhalit buňky, které zvolenou látku hromadí zvýšeně, nebo naopak buňky, jež nejsou schopny absorbovat danou látku. Rozlišujeme dva základní typy metody, a to scintigrafii statickou a dynamickou. Jak napovídá název – u scintigrafie statické se provede pouze jeden snímek, případně více snímků, ale v delším časovém rozmezí. Naopak u scintigrafie dynamické se provádí více snímků během krátkého časového rozmezí, a tím se zobrazí průchod látky tělem a její metabolismus. [5]

Jednou z nejmodernějších metod diagnostiky v nukleární medicíně je pozitronová emisní tomografie (PET). Jako pozitron se označuje elementární částice o stejné hmotnosti a velikosti náboje jako elektron, avšak s opačným nábojem. Principem metody je detekce dvou anihilačních fotonů v gama oblasti spektra, jež vznikají ve tkáni interakcí pozitronu s elektronem (Ilustrace 1). Zmíněné dva fotony vznikají ve stejný okamžik, mají stejnou energii 511 KeV a rozletí se po přímce v opačných směrech, tedy v úhlu 180 stupňů, do okolí a dopadnou na dva protilehlé detektory, kterými jsou zachyceny. Pro tuto reakci je nutné dostat do těla pacienta pozitronový (β^+) zářič. Zářiče jsou připraveny uměle, obvykle přímo na odděleních v cyklotronu. Nejčastěji se využívají radionuklidy ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F . Pacientovi se aplikuje injekce s látkou, následuje kratší časová prodleva, aby došlo k akumulaci látky



Ilustrace 1: Princip metody PET [27]

v cílovém místě. Detektorem je PET kamera, zářičem je pacient. Nashromážděná data vyhodnotí počítač a vytvoří obrázky. Může být vyšetřován jeden orgán, nebo naopak celé tělo.

[6]

Neméně důležitou diagnostickou metodou je počítačová tomografie (CT). Tato vyšetřovací metoda využívá rentgenových paprsků a tím umožňuje detailní zobrazení jednotlivých částí těla. Nevýhodou metody je vystavení pacienta ionizujícímu záření, proto může být prováděna, jen pokud to vyžaduje zdravotní stav pacienta. Celková dávka záření je závislá na druhu vyšetření, stejně jako na rozsahu vyšetřované oblasti. Lze konstatovat, že dávka při CT vyšetření je prokazatelně vyšší než při standartním RTG snímku. Je však srovnatelná s dávkou RTG záření při pořizování většího množství snímků. [7]

4.2 Peptidy

Peptidy jsou receptorově-specifické molekuly, které hrají velmi důležitou roli nejen v diagnóze a terapii nádorových onemocnění, ale i v patogenezi dalších chorob. Tento fakt vyvolal velký zájem na poli nukleární medicíny a podnítil další vývoj jejich strukturálních obměn s lepšími farmakologickými vlastnostmi. Jsou složeny z různých aminokyselin spojených amidovou vazbou. Peptidy obvykle snadno přežívají podmínky chemické reakce, které jsou někdy vyžadovány v úvodu značení. Díky relativně malé molekule jsou snadno distribuovatelné v biologickém systému, kromě toho se, na rozdíl od velkých protilátek a jejich fragmentů, lépe kumulují v cíleném nádoru s lepším poměrem aktivity v cílovém místě k pozadí (v literatuře „tumor to background ratio“). Důvodem je mimojiné rychlé uvolnění z plazmy, což je další vlastnost peptidů. Je třeba zmínit menší imunogenitu peptidů oproti proteinům. Nicméně existuje i řada nevýhod peptidových hormonů, jako je jejich limitovaná biologická dostupnost nebo možné nežádoucí účinky (toxicita). Navíc orální aplikace není možná. Další problém vyvstává během identifikace a charakterizace nových peptidových hormonů díky rychlé metabolické degradaci zapříčiněné rychlou proteolytickou degradací endogenních peptidáz. Přirozené peptidy jsou obvykle téměř kompletně degradovány během několika minut. Existuje řada možností, jak zvýšit metabolickou stabilitu, je to např.: přidavek nepřirozených aminokyselin (D-aminokyselin, N-methylaminokyselin), amidace C-konce, částečná či kompletní cyklizace, fosforylace aminokyselin a dále včlenění aminoalkoholů do řetězce. Je tedy nezbytné najít správnou rovnováhu mezi rychlou a pomalou degradací. Pokud je degradace příliš rychlá, akumulace v nádoru je nedostatečná. Na druhé straně pokud je stabilita peptidů vysoká, doba retence radioizotopu v organismu bude také vysoká, a to díky pomalému uvolnění peptidu z místa účinku do cirkulace, což způsobí zpomalení exkrece z řečiště. Pro *in vivo* aplikaci musí být radioaktivně značené peptidy dostatečně stabilní ve vodném roztoku. Cílem je dosáhnout rychlé a vysoké zadrže v nádorové tkáni a co nejnižší akumulace peptidu ve zdravé tkáni. Dnes je známo více než 850 peptidů s mnoha rozličnými funkcemi. Zastoupení mají jako hormony, neurotransmitery, neuromodulátory, cytokiny, inhibiční růstové hormony. Některé peptidy jsou schopné proliferativních funkcí, jiné apoptotických. Mimoto jsou produkovány řadou maligních lidských nádorů. Tento fakt ukazuje na vzrůstající klinický význam těchto struktur umožňujících vysoce specifické receptorové směřování (targeting) při zobrazování a terapii. Prvními peptidovými receptory využívanými k těmto cílům byly somatostatinové receptory. Podkladem bylo zjištění, že gastroenteropankreatické neuroendokrinní nádory exprimují

somatostatinové receptory ve velkém množství. A proto tento typ nádorů mohl být velmi efektivně scintigraficky zobrazen radioaktivním analogem somatostatinu – OctreoScanem®. Jedná se o oktreotid spojený s DTPA (viz dále). [4]

V některých studiích byl zaznamenán poznatek, že pro některé trojmocné terapeutické radionuklidy (^{90}Y , ^{177}Lu) má DTPA jako chelátor nižší kinetickou stabilitu vedoucí k nespecifické zadrži v játrech a kostní dřeni. Zajímavostí je fakt, že připojením DTPA dojde ke změně farmakokinetiky - hepatobiliární exkrece se změní na renální, aniž by se změnila afinita peptidu k příslušnému receptoru. Dnes tato metoda tvoří základ diagnostiky u vybraných pacientů a je běžně využívána pro detekci nádorů exprimující somatostatinové receptory. Další peptidy, jmenovitě neurotensin, bombesin a vasoaktivní intestinální peptid, jsou v preklinickém zkoušení. [4], [8]

Na základě dobrých zkušeností cílené terapie se somatostatinovými receptory se objevily další velmi důležité poznatky ohledně nových receptorů peptidů. Slibným kandidátem jsou cholecystokininové receptory (viz dále).

Nezbytným předpokladem pro úspěšný in vivo receptorový targeting nádorů je přítomnost dostatečného množství receptorů v nádorové tkáni. Neméně důležitou podmínkou je adekvátní dostupnost specifického senzitivního radioligandu s vysokou afinitou k tomuto receptoru. Z tohoto důvodu se řada pracovišť zabývá vyhledáváním a modifikací nebo syntézou příslušných receptorových vektorů. [4]

Peptid	První zmínka	Počet aminokyselin	Nádor
Somatostatin	1973	14	neuroendokrinní nádor, neuroblastom, malobuněčná rakovina plic, rakovina prsu, prostaty, nádor mozku
Bombesin	1971	14	rakovina prostaty, prsu, malobuněčná rakovina plic, rakovina tlustého střeva, rakovina žaludku
Gastrin	1979	27	rakovina prostaty, prsu, malobuněčná rakovina plic, melanom
VIP	1970	28	rakovina plic, žaludku, tlustého střeva, konečníku, prsu, prostaty, slinivky, jater, močového měchýře
Neuropeptid Y	1982	36	neuroblastom, glioblastom, rakovina prsu, adenokarcinom vaječníku, rakovina ledvin, paragangliom, feochromocytom
Neurotensin	1973	lineární tridekapeptid	malobuněčná rakovina plic, tlustého střeva, štítné žlázy, prsu, meningiom, astrocytom
α -MSH	1955	lineární tridekapeptid	melanom
Substance P	1931	11	malobuněčná rakovina plic, nádor mozku
CCK	1968	33	kolorektální karcinom, rakovina slinivky, malobuněčná rakovina plic, rakovina dřeně štítné žlázy, některé druhy rakoviny vaječníků

Tabulka 1: Potenciální nádorová terapie a diagnostika (tumor targeting) pomocí peptidových hormonů [4]

4.3 Minigastriny

4.3.1 Rozdělení receptorů

Jako minigastriny se označují skupiny peptidů odvozených z lidského gastrinu, jenž je tvořen 34 aminokyselinami. Tento peptid je zodpovědný za regulaci sekrece kyseliny v žaludku a proliferaci žaludeční mukózy. Gastriny jsou produkovány G buňkami jako prekurzory, z kterých posléze vznikají finální účinné hormony. Velmi důležitou vlastností minigastrinů je jejich vazba na cholecystokininové receptory (CCK), konkrétně na cholecystokininové receptory typu B (CCKB známé také jako CCK2), které jsou fyziologicky přítomné v parietálních a enterochromafinních buňkách. CCKA receptory (označované také jako CCK1) byly poprvé objeveny v pankreatických acinárních buňkách a najdeme je nejvíce na periférii. Všechny cholecystokininové receptory řadíme do skupiny receptorů spojených s G proteiny. Skládají se ze sedmi transmembránových domén a po vazbě ligandu na receptor a jeho internalizaci aktivují cestu druhých posílů. [9]

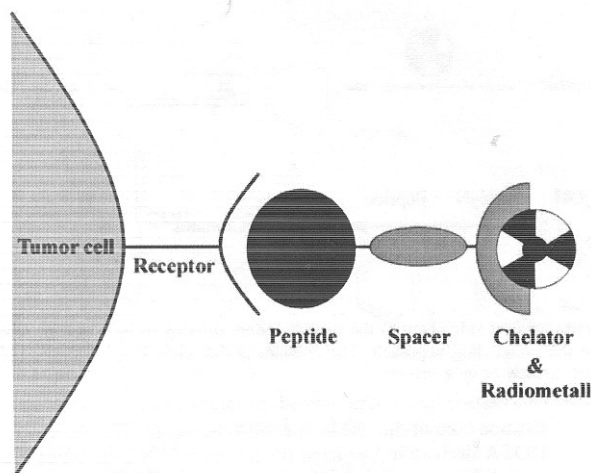
Z výsledků výzkumu vyplývá, že gastriny vykazují menší afinitu k receptorům, jež jsou přítomny ve žlučníku, v hladkém svalstvu žaludku, ve slinivce a v periferním nervovém systému. Naopak vysoká afinita k receptorům byla zjištěna v žaludeční mukóze, endokrinním pankreatu a mozku. Cholecystokininové receptory však můžeme najít i u některých nádorů. Příkladem může být medulární karcinom, malobuněčný plicní nádor, rakovina ovaria, gastrointestinální adenokarcinom či neuroendokrinní nádory. Několik cholecystokininových nebo gastrinových analogů již bylo po radioaktivním označení úspěšně použito v klinické praxi k detekci těchto typů nádorů a jejich metastáz. [10], [26]

V roce 2000 byl objeven třetí typ CCK receptorů. Jedná se o receptor označovaný jako CCK2i4sv, jenž je spojen s CCK2. Byl objeven u kolorektálního karcinomu a u některých nádorů pankreatu, kde pravděpodobně stimuluje růst buněk. V normální kolorektální mukóze nebyl objeven. Nicméně množství receptorů v nádorové tkáni nedosahuje hladiny, kdy lze dostatečně zobrazit nádor pomocí radioaktivně značeného peptidu. [9]

4.3.2 Radioaktivní značení

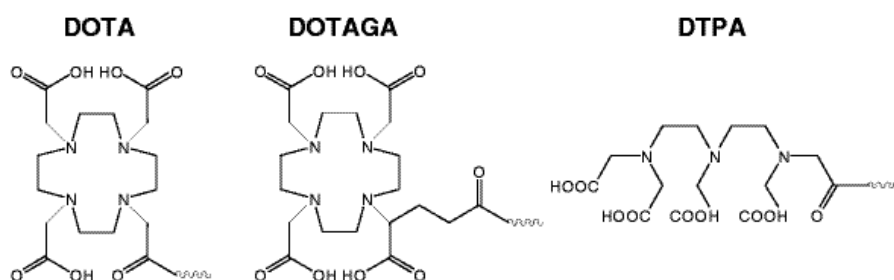
Pro radioaktivní značení minigastrinů jsou používány jak diagnostické zářiče ^{131}I a $^{99\text{m}}\text{Tc}$, tak zářiče terapeutické jako ^{90}Y , ^{177}Lu , případně ^{131}I . [4]

Pro radioaktivní značení peptidů pomocí kovových radionuklidů je třeba peptid modifikovat pomocí chelátorů (bifunkčních chelatačních činidel).



Ilustrace 2: Typická vazba značeného peptidu na receptor nádorové buňky, tumor cell – nádorová buňka, spacer – spojovník, chelator & radiometall – chelatační činidlo a radioaktivní látka [4]

Mezi nejčastější chelatační činidla patří DTPA (diethylentriaminpentaoctová kyselina), DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina) či DOTAGA [1-(*-*karboxy-3-karboxy-propyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová kyselina]. Nejprve dochází ke vzniku aduktu mezi peptidem a bifunkčním chelátorem. Vzniklý komplex poté může být označen vazbou vhodného radionuklidu do chelátu. Cyklické chelátory tvoří s kovovým radionuklidem velmi pevné komplexy, avšak pomalá kinetika tvorby komplexu vyžaduje zahřátí reakční soustavy, které může poškodit nebo zničit peptid. [10]



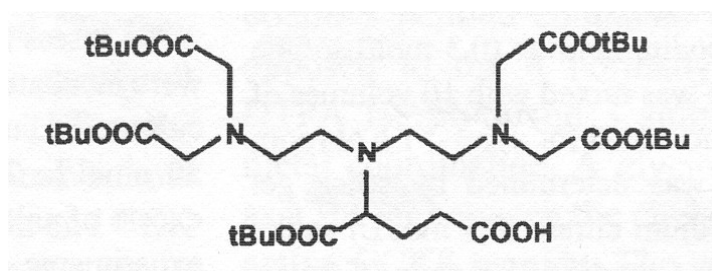
Ilustrace 3: Strukturální vzorce používaných chelátorů [10]

Důležitou měřenou veličinou při značení je radiochemická čistota. Je definována jako poměr aktivity daného radioaktivního nuklidu v požadované chemické formě a celkové aktivity radionuklidu v preparátu. Vyjadřuje se v procentech. Pro používaná radiofarmaka jsou hodnoty čistoty uvedeny v platném lékopise. Nečistoty u radiofarmak jsou někdy důsledkem rozkladu požadované chemické formy vlivem rozpouštědla, teploty či světla. Nečistota však

může vzniknout také jako důsledek vazebného spojení radionuklidu na chemickou nečistotu v přípravku. Stanovení radiochemických nečistot v preparátu je velmi důležité, jelikož nečistoty mohou být zodpovědné za zkreslení scintigrafického zobrazení a zbytečné radiační dávky v necílovém orgánu. Příčinou může být nízká kumulace radioaktivity v cílovém orgánu, nečistota může také změnit biodistribuci radiofarmaka [2], [9]

Studie s chelatačními činidly ukázaly, že komplexy s DTPA značené ^{90}Y nejsou dostatečně stabilní pro cílenou terapii. Obměna molekuly chelatačního činidla na DTPAGlu vedla ke zvýšení stability komplexu. Nespornou výhodou je i snadná syntéza tohoto derivátu. DTPAGlu je pentaester, který má pět karboxylových skupin chráněných terc-butylem. Tato obměna přináší výhodu v podobě pěti karboxylových skupin vhodných ke konjugaci. Původní DTPA konjugáty mají jen čtyři tyto skupiny. [26]

Mezi novější chelátory řadíme DOTA, jenž vykazuje vyšší stabilitu v porovnání s acyklickými chelátory, a DOTAGA s rychlejší kinetikou značení. [10]



Ilustrace 4: Strukturální vzorec DTPAGlu [26]

Zjištění vysoké hustoty receptorů CCKB u medulárního karcinomu štítné žlázy vedlo k rychlému vývoji nových receptorově-specifických obdob gastrinu a cholecystokininu B s cílenou distribucí u vybraných skupin pacientů.

První generace sloučenin byla založena na nesulfátovaných CCK analogiích s navázanými chelátory DTPA či DOTA. První výsledky těchto struktur značených ^{111}In a použitých u krysích buněk byly velmi slibné. Problém však nastal po aplikaci pacientům s rakovinou štítné žlázy. Radioligandy sice dokázaly označit rakovinné léze, nicméně nedošlo k dostatečné akumulaci v nádoru tak, aby mohly být použity v praxi. [12]

Pracovní skupiny však současně vyvinuly deriváty gastrinu se stejným záměrem – označit nádory produkující CCKB receptory. Nejstarší používaný minigastrin 0 v komplexu s DTPA značený ^{111}In prokázal vysoký uptake v žaludku a lézích dřeně štítné žlázy. Rizika a nežádoucí projevy této sloučeniny však převýšily jeho výhody. [12]

Vychytání peptidu v cílovém místě se odehrává během několika minut po injekci radiofarmaka, pak následuje retence uvnitř nádoru. Částečné vymizení či výplach radioaktivity z nádoru je patrný během 48 hodin. Z toho plyne, že nejčistší zobrazování a tomografie je možná do 48 hodin po aplikaci injekce. Vysoká retence nastává částečně díky internalizaci radiofarmaka do jádra buňky a ne pouze do buněčné cytoplazmy. [11], [12]

4.3.3 Možné problémy minigastrinů

Stinnou stránkou některých radioaktivně značených gastrinů je jejich delší renální retence, což komplikuje radionuklidovou terapii v důsledku zvýšeného rizika nefrotoxicity. S tímto jevem se setkáme například u minigastrinu 0 a jiných starších minigastrinů. U nověji vyvinutých peptidů je obvykle pozorována nižší renální retence. V radionuklidové terapii založené na peptidech je rychlá clearance radioaktivně značených peptidů z krve a nízký záchyt v ledvinách velmi důležitý. Minimalizují se tak radiační dávky ve zdravých tkáních, zejména ledvinách. Malé peptidy a proteiny jsou však částečně zachytávány v ledvinách, a to v důsledku tubulární reabsorpce. Jedná se o vícestupňový proces. Po glomerulární filtraci se peptidy a proteiny v ultrafiltrátu váží na endocytické receptory na luminární straně proximálního tubulu buňky a jsou internalizovány. Následně jsou přeneseny do lyzozomů a degradovány na aminokyseliny. Ty jsou poté transportovány zpět do krevního oběhu. Část sekvence peptidů modifikovaná radioaktivně označeným chelátorem je polapena v tubulárních buněčných lyzozomech. Protože umělé chelátory jsou nebiogenní, ledvinná buňka je nedokáže transportovat ven a částice setrvávají v ledvinách. Výsledkem jsou vysoké radiační dávky, které poškozují ledvinné buňky. Detailní mechanismus renální reabsorpce peptidů není dosud znám, ale probíhají intenzivní studie. Některé z nich poukazují na roli megalinu. Což je multiligandový receptor patřící do skupiny receptorů lipoproteinů o nízké hustotě. Megalin váže strukturně odlišné typy proteinů – albumin, β -2 mikroglobulin, aprotinin a mnoho dalších. Zjistilo se, že velmi důležitým faktem vazebnosti sloučenin k megalinu je počet a stejně tak náboj ligandů. Například renální reabsorpci ligandů vázajících se na megalin pomocí svých kationaktivních poloh můžeme blokovat přidávkem kationaktivních sloučenin. Dalším zajímavým zjištěním bylo, že renální uptake různých radioaktivně značených peptidů může být redukován současným přidáním základních aminokyselin nesoucích v postranním řetězci kladný náboj, například lysinu či argininu. Po aplikaci vysokých dávek těchto peptidů se ale mohou objevit nežádoucí reakce zahrnující nauzeu, arytmií či hyperkalémii. Další možností je aplikace albuminu jako substrátu pro megalin, jímž by se měl snížit renální záchyt peptidů. Albumin je protein o molekulové

hmotnosti 67 kDa. Přes glomerulární membránu však projde jen malé množství intaktního albuminu, výhodnější by měly být jeho fragmenty. Studie dokonce ukázaly, že fragmenty albuminu o molekulové hmotnosti 3-50 kDa byly ve snížení renálního uptake stejně efektivní jako dávka 80 mg lysinu. Další studie snad přinesou informace o tom, jaké specifické fragmenty albuminu jsou za toto zodpovědné. Dobře definované fragmenty albuminu byly získány pomocí bromkyanu a kyseliny mravenčí. Bromkyan štěpil peptid v místě karboxylové skupiny metioninu, kyselina mravenčí pak rozštěpila vazbu asparagové kyseliny a prolinu. Renální reabsorpce peptidů u zvířat byla rovněž efektivně snížena pomocí Gelofusinu. Jedná se o 4% koloidní infuzní roztok modifikované želatiny, který je využíván jako expandér plazmy. [13], [33]

Problém vysoké renální retence se týká hlavně radioligandů odvozených od minigastrinu 0. Výsledky posledních studií ukázaly souvislost mezi počtem glutamových kyselin a renální retencí. Pravděpodobným původcem těchto problémů jsou záporné náboje aminokyselin. Současnou injekční aplikací polyglutamových kyselin se renální kumulace minigastrinů snížila. Problém s vysokým renálním zachytem zkoumalo mnoho výzkumných týmů, probíhaly pokusy se substitucí pentaglutamátových kyselin hexahistidinem. Zjistilo se však, že renální kumulace je sice nižší, stejně tak je bohužel nižší zachyt radiofarmaka v nádoru. Dihistidinová analoga rovněž nepřinesla žádaný úspěch, měla sice nižší kumulaci v ledvinových buňkách, ale radioaktivní značení vyžadovalo teplotu kolem 100°C, což vedlo ke zvýšené oxidaci metioninu. V současné době probíhají rozsáhlé výzkumy a vývoj nových gastrinů (tzv. druhé generace), jejichž renální zachyt by byl prokazatelně nižší. Možným řešením se stalo zkrácení gastrinů o sekvenci pěti glutamových kyselin v pozici 2-6. Nejenže se dosáhlo nižší ledvinové kumulace, ale byla zachována jejich kumulace v nádorové tkáni. Problém však nastal se stabilitou. Tyto nové radioligandy vykazovaly nižší stabilitu *in vitro* a rychlou enzymatickou degradaci *in vivo*, pravděpodobně vedoucí ke zhoršeným zobrazovacím charakteristikám. Navíc byla zaznamenána částečná oxidace metioninu ve vazebné sekvenci, zvláště v průběhu zahřívání při radiochemickém značení. Výsledkem byla snížená afinita k CCKB receptorům a nižší buněčná internalizace *in vitro* a nádorová kumulace *in vivo*. Oxidace se však dá do jisté míry omezit, a to optimálními reakčními podmínkami. Otázka stability je však velmi složitá a vyžaduje další studie. [14]

4.3.4 *Minigastriny značené techneciem*

Dalšími slibnými strukturami jsou deriváty gastrinu značené ^{99m}Tc . Jako pomocná látka se zde používá bifunkční chelátor HYNIC (6-hydrazinopyridin-3-karboxylová kyselina). Jelikož HYNIC je schopen jen částečné koordinace, jež se vyžaduje, je třeba přidavku dalších látek, tzv koligandů. Nejvíce našly využití tricin a EDDA (etylendiamindioctová kyselina). Možnost měnit koligandy, a tím následně fyzikálně chemické vlastnosti formovaného komplexu je jednou z předností tohoto systému. HYNIC-peptid s koligandem EDDA vytváří s ^{99m}Tc komplexy, jež ukázaly *in vitro* i *in vivo* stabilitu. Preparáty jsou homogenní, jelikož se vytváří pouze jedna chemická forma a afinita k nádoru je vysoká. Radioaktivní značení však vyžaduje zahřátí soustavy, což limituje využití u polypeptidů s terciární strukturou. Použití tricinu jako koligandu při značení HYNIC-peptidů je při pokojové teplotě rychlé a efektivní, vytváří však komplexy, které mají nižší stabilitu. Navíc analýza pomocí HPLC pravidelně ukazuje přítomnost rozmanitého množství izomerů. Gastriny s přidavkem koligandů vykazují vysokou efektivitu – velmi dobře interagují s CCKB receptory, a to jak *in vitro*, tak i u zvířecích modelů. Mimoto vykazují sníženou renální retenci. [15]

Dalšími nadějnými deriváty gastrinu u pacientů s rakovinou štítné žlázy jsou peptidy pocházející z řeckého ústavu Demokritos, tzv. Demogastriny. Demogastrin je sloučenina, která nese na svém N konci tetraamin (tetraazaundekan) připojený buď přímo (Demogastrin 1), nebo pomocí vmezežené molekuly (Demogastrin 2 a 3). Demogastrin (modifikovaný tímto tetralinem) tvoří s ^{99m}Tc stabilní komplexy *in vivo* s vysokým záchytem v nádoru a nízkou retencí v ledvinách. [15], [16]

4.3.5 *Chemická a farmakologická stránka minigastrinů*

Všechny uvedené radioligandy jsou agonisté – jsou schopny spouštět internalizaci receptor-ligand, a proto dovolují aktivní kumulaci radioaktivní látky uvnitř nádoru. Nicméně některé studie se somatostatinovými receptory přinesly neočekávané výsledky. Ukázalo se, že antagonisté receptorů mohou přinést lepší výsledky na poli radiofarmacie, a tím změnit dosavadní názory. Antagonisté se sice špatně internalizují do nádorových buněk, přesto je *in vivo* distribuce u zvířecích nádorů stejná, někde dokonce lepší než ta odpovídající agonistům. Tyto studie jsou však zatím na počátku. [10], [12]

Co se týče chemické stránky, peptidy patřící do skupiny derivátů gastrinu a cholecystokininu mají společnou vazebnou sekvenci Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. Obě skupiny peptidů můžeme odlišit umístěním jejich tyrozinového zbytku vzhledem k již zmíněné

karboxylovou skupinou do cyklu. Výsledkem je laktamový můstek mezi aminoskupinou postranního řetězce D-lysinu a α -karboxylovou skupinou D-glutamové kyseliny. K zabránění nežádoucí oxidace struktury se využila výměna metioninu za umělý norleucin v pozici 11. Vazba na receptory byla v důsledku cyklizace mírně zhoršená, pravděpodobně následkem horší flexibility nově vzniklé struktury. Částečná stabilizace získaná cyklizací pak výrazně nezlepšila farmakokinetické vlastnosti. [14]

4.4 Analytické metody používané v radiofarmacii

Jedná se o různé druhy chromatografií. Mezi ostatními analytickými metodami má chromatografie ojedinělé postavení, jelikož nám dovoluje stanovit mnoho látek v jediném vzorku, stejně tak i oddělit je od sebe bez jejich narušení. Za objevitele chromatografie je považován ruský botanik Michail Semjonovič Cvět, její zrod je datován 21.březnem 1903. Významným zlomem v historii se považuje objev rozdělovací chromatografie Martinem a Syngem. Ve své práci roku 1941 uvádějí myšlenku, že mobilní fáze nemusí být kapalina, ale lze použít permanentní plyn. [18], [34]

4.4.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tato metoda je ve světové literatuře nazývána high performance liquid chromatography. Jejím principem je separace – oddělují se při ní složky obsažené ve vzorku. Zkoumaný vzorek je vnesen mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá a je tvořena kapalinou. Pohybující se mobilní fáze unáší vzorek přes stacionární fázi, přičemž složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány a při pohybu se zdrží. Čím silněji jsou složky poutány stacionární fází, tím se zdrží déle. Takto se od sebe postupně oddělí jednotlivé složky. Na konec stacionární fáze se dostávají složky méně zadržované. O separaci složek vzorku rozhodují interakce se stacionární fází, stejně tak je však velmi výrazně ovlivněna i použitou mobilní fází. Jako možné mechanismy separace se uplatňují adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna. Nespornou výhodou kapalinové chromatografie je možnost použití i u tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. Vzorek se totiž nemusí převádět na plyn, tak jako je tomu u plynové chromatografie. K tomu, aby separace částic byla účinná, je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu. Ty kladou prostupující kapalině určitý odpor. Je tedy nezbytné pracovat při vysokém tlaku. Můžeme rozlišit dva typy chromatografie – „normální“ a systém obrácených fází (zkráceně RP, z anglického reversed phase). Při „normálním“ uspořádání chromatografie je mobilní fáze nepolární. Nejčastějšími rozpouštědly jsou heptan, cyklohexan, tetrachlormethan. Stacionární fáze je naopak polární, tvořena například nemodifikovaným silikagelem. Pokud se jedná o RP HPLC, mobilní fázi tvoří vysoce polární látky, obvykle je fáze tvořena směsí složenou z vody a organické složky smíchávané v různých objemových poměrech. Vhodnými zástupci mobilních fází jsou alkoholy (methanol), nitrily (acetonitril) a ethery (tetrahydrofuran, dioxan). Tyto eluenty mají obvykle velkou eluční sílu, a proto se využívají ve směsi s vodou. Je třeba upozornit, že

mobilní fáze používané při HPLC musí být velmi čisté a zbavené rozpuštěných plynů probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku za vakua. Stacionární fáze je naproti tomu vysoce nepolární. Je tvořena silikagelem s navázanou uhlovodíkovou skupinou (oktyl, fenyl, metyl). Základní součásti přístroje jsou uvedeny níže.

Čerpadlo může být membránové nebo pístové. Jeho funkcí je čerpat kapalinu do kolony. Materiál, z kterého je čerpadlo vyrobeno, nesmí být narušováno mobilní fází. Čerpadlo do mobilní fáze rovněž nesmí uvolňovat žádné látky. Nejčastějším materiálem je nerezová ocel, keramika nebo plast.

Směšovací zařízení může připravovat směs kapalin stálého složení, to se tedy nemění v čase a tento styl je známý pod termínem izokratická eluce. Zařízení však může řídit změny ve složení mobilní fáze během separace. Tento postup se nazývá gradientová eluce. Využívá se zde zásobníků různých kapalin a naprogramováním se připraví jejich směs.

Dávkovací zařízení může být dvojího typu. Původnější injekční přináší určité nevýhody z hlediska udržení tlaku a vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Injekční zařízení může být ovládáno ručně či automaticky a musí být zhotoveno z inertních materiálů. Příkladem je nerezová ocel, titan a některé polymery. Novější způsob nahrazuje injekční systémy dávkováním obtokovým dávkovacím kohoutem. Na něj je připojena smyčka plněná pomocí injekční stříkačky. Obsah smyčky je pro preparativní chromatografii do několika μl .

Kolony se používají pouze náplňové. Jsou to trubice naplněné sorbenty nebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Obvykle jsou zhotoveny z nerezové oceli. Pro analytické použití jsou kolony relativně krátké - zpravidla 10, 15 nebo 25 cm. Vnitřní průměr činí od 3 do 7 mm. Za běžných podmínek eluent protéká rychlostí 1-2 ml za minutu. Pro rychlé separace jsou vhodné krátké analytické kolony (délky 3 cm). Jsou finančně výhodnější a spotřebují menší množství mobilní fáze, účinnost separace je však nižší. Velmi často jsou využívány tzv. předkolony. Jejich funkcí je ochrana hlavní kolony před nečistotami a nerozpustnými materiály. Jsou umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu.

Velká většina separací probíhá za laboratorní teploty a nevyžaduje termostatování. Některé separace se však mohou významně zlepšit zvýšením teploty, většina nových chromatografů již toto umožňuje.

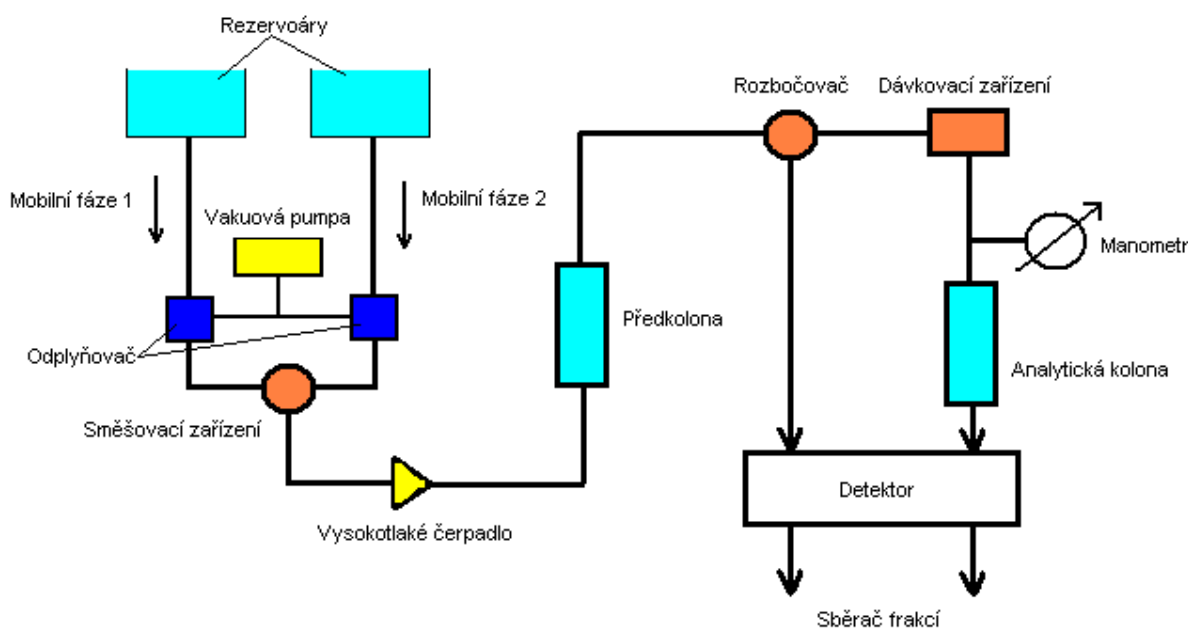
Optimální detektor by měl být selektivní pro stanovované analyty a málo citlivý na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést nejen tlak mobilní fáze, ale musí udržet i těsnost. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční.

Fotometrické detektory jsou nejběžnější. Měří absorbanci eluátu, který vychází z kolony. Jednodušší typy měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti, složitější umožňují nastavit vlnové délky pomocí monochromátoru.

Refraktometrický detektor změří rozdíl mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní složky. Pokud obsahuje eluát složku, objeví se výchylka. Tento typ je velmi univerzální, není však příliš citlivý a v průběhu jeho použití je třeba udržovat konstantní teplotu. Detekční limit je $10^{-7} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Fluorescenční detektor funguje na principu fluorescence nebo-li schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a následně vysílat záření o vyšší vlnové délce. Toto záření se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Detekční limit je $10^{-12} \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ analytu. Je vysoce selektivní, lze ho kombinovat s fotometrickým detektorem.

Chromatografický záznam se nazývá chromatogram a poskytuje jak kvalitativní informace (retenční čas), tak informace kvantitativní (plocha a výška píku). HPLC je jednou z nejrozšířenějších separačních metod, a to již od roku 1965. [18], [19]



Ilustrace 7: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

K detekci radioaktivity v HPLC systémech se využívají scintilační detektory. Nejčastěji používanou látkou pro detekci je jodid sodný aktivovaný thaliem NaI(Tl). Záření interaguje s krystalem NaI(Tl) a dochází k excitaci elektronů. Výsledkem je produkce světla (scintilace), která je měřena fotonásobičem. Získáme elektrický impuls o velikosti úměrné

energii jaderného záření. Tento typ detektoru je využíván pro detekci gama záření. U β zářičů se do mobilní fáze přidávají scintilátory, a tím odpadá problém samoabsorpce. Vzorek je ze všech stran obklopen molekulami scintilátoru a při radioaktivní přeměně vzniklý elektron β interaguje se scintilátorem a vzniká světelný záblesk. [2], [23]

4.4.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Název pochází z anglického termínu thin layer chromatography, což v překladu znamená chromatografie na tenké vrstvě. Rozlišujeme typ kapalina – kapalina, nebo kapalina – pevná látka. Stacionární fází tedy může být buď kapalina, zakotvená v tenké vrstvě na podložním materiálu, nebo pevná látka, označovaná jako adsorbent, v podobě tenké vrstvy. Stacionární fáze je nanášena na skleněné desce nebo hliníkové folii. Mezi nejpoužívanější adsorbenty řadíme silikagel a oxid hlinitý, lze však použít křemeliny, křemičitany, uhličitany a oxidu hořečnatého nebo vápenatého.

Jako mobilní fáze se používá cyklohexan, isopropanol, hexan, voda a další látky. Vzorky se rozpouštějí v těkavém rozpouštědle a nanáší se v podobě malé skvrny na start chromatogramu. Chromatogram se vyvíjí v chromatografické komoře, která je uzavřená a nasycena parami mobilní fáze. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou, hnací silou jsou kapilární síly. Rychlost mobilní fáze závisí na velikosti pórů stacionární fáze.

Detekce chromatogramu se může provádět pod UV lampou – a to v případě, že vrstva sorbentu obsahuje příměs fluorescenční látky, přičemž skvrny analyzovaných látek se na chromatogramu zobrazí jako tmavé skvrny (fluorescenci zhasíjí). Druhou možností detekce je postřík chromatogramu detekčními činidly. V případě stanovení radiochemické čistoty radiofarmak je možno využít k určení čistoty značeného produktu radiodetektorů různých typů podle použitého radionuklidu. Základní identifikační charakteristika TLC je hodnota R_f . Jedná se o poměr vzdálenosti start – střed skvrny : start – čelo mobilní fáze. Při porovnání analyzovaného vzorku a standardu látky se hodnoty R_f musí shodovat. [20], [21], [24]

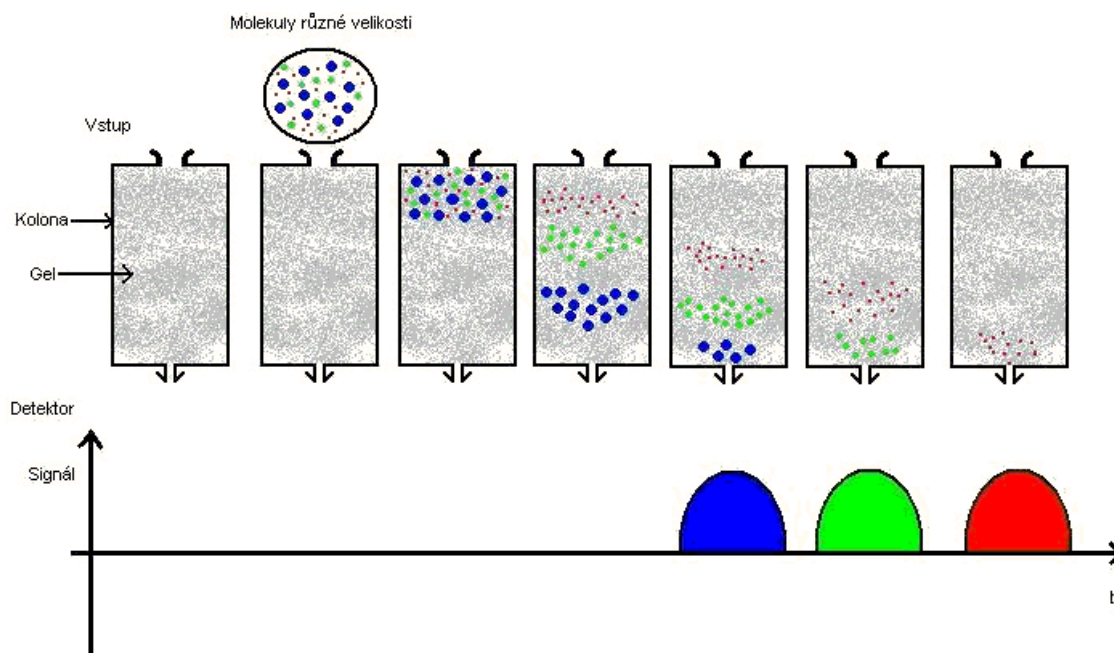
4.4.2.1 Instantní tenkovrstvá chromatografie (ITLC-SG)

Tato metoda je poměrně nová a představuje vhodnou a rychlou alternativu k tenkovrstvé chromatografii. Čas, který je zapotřebí k vyvíjení, je mnohdy menší než 20 minut. Vrstvy, na něž se nanese malé množství vzorku, jsou tvořeny skleněnými vlákny impregnovanými amorfním silikagelem. Vrstvy lze snadno nařezat na malé proužky.

K tomuto účelu se využívá ostrý nůž ukotvený na podložce. Nařezané proužky tenké vrstvy se po nanesení vzorku pomocí pipety a usušení ponoří do vyvíjecí nádoby s mobilní fází, jejíž polarita se volí podle vlastností separovaných sloučenin. Ponoření tenké vrstvy se provádí tak, aby kapka naneseného vzorku zůstala nad hladinou mobilní fáze. Ta vzlíná tenkou vrstvou, a tím dochází k transportu a dělení vzorku směsí. Vzorek můžeme vysušit volně na vzduchu nebo v proudu vzduchu. Metoda se v radiofarmacii používá ke stanovení radiochemické čistoty značené látky, tedy k oddělení vlastní značené látky od volného radionuklidu. [21], [22]

4.4.3 Gelová chromatografie

Při této technice jsou molekuly separovány podle své velikosti. Kolona u tohoto typu chromatografie je tvořena molekulovým sítím, jež tvoří stacionární fázi, a příslušným rozpouštědlem jako fáze, která protéká. Molekulové síto obvykle tvoří tuhé látky s prostorově zesítenou strukturou vytvářející otvory určité velikosti. Do těchto otvorů mohou pronikat



Ilustrace 8: Princip gelové chromatografie

pouze částice srovnatelných nebo menších rozměrů. Čím jsou částice menší, tím snadněji pronikají do síta. Pokud do kolony vneseme směs látek různé molekulové hmotnosti, látky se rozdělí mezi obě fáze. Po eluci rozpouštědlem zůstávají větší molekuly v pohyblivé fázi, menší molekuly naopak mohou pronikat do nitra síta a jsou zde zadrženy. Nejdříve tedy z kolony vycházejí molekuly velké a pak dle rozdělovacích poměrů molekuly menší. Pokud

chceme rozdělit danou směs co nejlépe, hlavním bodem je vhodné zvolení stacionární fáze s optimálním rozsahem velikosti otvorů. Stacionární fáze by také neměla interagovat se složkami směsi.

Gel se volí podle vlastností rozdělovaných látek. Pro látky, jež jsou ve vodě rozpustné, se využívají hydrofilní gely. Příkladem může být Sephadex, což je dextran zesítný epichlorhydrinem (1-chlor-2,3-epoxypropan). Jako mobilní fáze se dá využít voda, případně voda s přídavkem organického rozpouštědla. Mobilní fáze se vždy musí zvolit tak, aby neovlivňovala ostatní složky. Pro látky nerozpustné ve vodě se používají gely hydrofobní. Zástupcem této skupiny gelů je Styragel. Jedná se o kopolymer styrenu a divinylbenzenu. Mezi zástupce, jež lze využít jako mobilní fázi, patří aromatické, chlorované a některé heterocyklické uhlovodíky. Pro separaci hydrofilních i hydrofobních látek jsou vhodné univerzální gely na bázi silikagelu (Porasil) a porézních skel (Bio-Glass).

Využívají se kolony o průměru až 8 mm o délce několika desítek cm. Při práci se používají nižší tlaky než v rozdělovací či absorpční chromatografii, jelikož gely jsou stlačitelné. Tato metoda se s oblibou využívá pro analyty o relativní molekulové hmotnosti větší než 500, i když se dají separovat molekuly od molekulové hmotnosti 100. Často se využívá pro separaci biopolymerů, například proteinů. [18], [20]

5 Experimentální část

5.1 Příprava minigastrinů

Vzhledem k velmi nízké stabilitě uměle připravených receptorově-specifických peptidů ze skupiny derivátů gastrinu se tyto peptidy uchovávají v exsikátoru v mrazničce. Pro radioaktivní značení je třeba připravit vždy čerstvý roztok peptidu v superčisté vodě. Chelátor DOTA použitý k modifikaci receptorově-specifických minigastrinů váže sice trojmocné radio-lanthanoidy, případně další trojmocné radionuklidy, jako yttrium nebo indium, velmi pevnou vazbou, avšak kinetika tvorby komplexu je za normální teploty pomalá. Reakční soustavu je potřeba zahřát téměř k varu na zhruba 30 minut. Při volbě reakčních podmínek, jako je pH, přítomnost pufru, teplota, je třeba zvážit dvě protichůdné podmínky. Pro dostatečně rychlou tvorbu komplexu je vhodné vyšší pH, při němž jsou karboxyly chelátoru ionizované, naproti tomu pro stabilitu trojmocných kovů v roztoku (zabránění tvorby koloidní formy kovového radionuklidu) je potřeba pH nižší. Problém řeší vysoká koncentrace acetátového pufru o pH kolem 5, který udrží radiokov v iontové formě.

Vlastní radioaktivní značení

Do zvoleného objemu acetátového pufru o koncentraci 0.4 mol/l a pH 5,03 byl přidán určitý objem čerstvě připraveného roztoku peptidu o koncentraci 1 μ g/ μ l ve vodě. Po zamíchání byl přidán zvolený objem roztoku ¹¹¹In v HCl o koncentraci 0.05 mol/l (podle požadované aktivity a stáří radionuklidu). Aktivita se pohybovala v rozmezí 0,2 – 1mCi. Soustava byla zahřívána na 95°C po dobu 30 minut. Poté byl roztok značeného peptidu ponechán zhruba 20-30 minut při pokojové teplotě, kdy probíhalo doreagování chelatace.

5.2 Použité chemikálie a materiál

V seznamu chemikálií je vždy uvedena látka, firma, jež ji vyrobila, popřípadě země jejího původu a číslo šarže (č.š).

Chemikálie

chlorid sodný injekční roztok – Braun, Německo, č.š. 8021614

0.4M acetátový pufr pH 5 – vznikl smícháním roztoku superčistého CH₃COONa (Merck) a roztoku CH₃COOH, který vznikl přečistěním koncentrované kyseliny octové p.a. (Lachema) izotermickou destilací do superčisté vody (z Millipore systému)

hydroxid amonný – Lachema Neratovice, Česká republika, č.š. 30134-0200

methanol – Chromservis, č.š. 13721

octan amonný – Penta Chrudim, č.š. 290306

EDTA (ethyldiaminoctová kyselina) – SigmaAldrich, č.š. 077K0132

DTPA (diethylentriaminpentaoctová kyselina) - SigmaAldrich, č.š. 121K5310

acetonitril – SigmaAldrich, č.š. 9100S

trifluoroctová kyselina – SigmaAldrich, č.š. STBB2758

¹¹¹In - InCl₃ byl získán od dvou dodavatelů:

- GE Healthcare, UK, objemová aktivita 1mCi/0.1 ml 0.04M HCl
- PerkinElmer, USA, objemová aktivita 10mCi/5-10 μl 0.05M HCl

voda čištěná destilací a reverzní osmózou, systém Millipore

Vlastní zkoušené látky a jejich struktura

minigastriny 46, 47, 48 – Pichem, Rakousko

MG 46

DOTA-dGln-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Batch-Nr: S59-091101

MG 47

DOTA-dGln-dGln-dGln-dGln-dGln-dGln-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Batch-Nr: S60 091101

MG 48

DOTA-dGlu-dGlu-dGlu-dGlu-dGlu-dGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Batch-Nr: S61 09110

Přístroje

Tenká vrstva ITLC-SG (silikagel na skleněných vláknech) – 5x17 cm, výrobce Pall, USA, č.š. 6450

HPLC Agilent System 1100 Series s radioaktivní detekcí, scintilační sondou a radiometrem Polon, Typ URL 2 a registrací pomocí chromatografické stanice Data Apex Clarity

Kolona: Lichrocart Lichnosphere 100 RP-18 3x150 mm

Měřič radiochromatogramů RITA STAR firmy Raytest, Rakousko

Vyhřívací plotna na zkumavky Eppendorf

Automatické nastavitelné pipety Eppendorf objemů 1, 10 a 100 µl a 1 a 5 ml.

Magnetické míchadlo Laboratorní přístroje Praha

5.3 Použité analytické metody pro analýzu minigastrinů

5.3.1 HPLC analýza

Po stabilizaci peptidu při pokojové teplotě (zhruba 30 minut) byla radiochemická čistota produktu stanovena RP-HPLC analýzou na přístroji Agilent 1100 Series s UV a radioaktivní detekcí. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, s gradientem uvedeným níže. Doba analýzy peptidu byla 30 minut.

5.3.1.1 Příprava vzorku pro analýzu

Do vialek pro Agilent Systém byl vložen plastový polypropylenový insert 0.2 ml, do něhož bylo postupně napipetováno podle aktivity vzorku:

30 µl mobilní fáze A

2-10 µl vzorku značeného peptidu

2 µl roztoku DTPA o koncentraci 10^{-3} mol/l pH 5

Radioaktivní detekce probíhala pomocí scintilační sondy a radiometru URL-2 Polon. Profil eluční křivky byl zaznamenán programem Data Apex Clarity. Cílem bylo zjistit potenciální použití radioaktivně značených minigastrinů po delší časové prodlevě po označení, byla zkoumána závislost čistoty produktu na čase jak v krátkodobém, tak dlouhodobém časovém intervalu.

doba eluce (min)	složení mobilní fáze
0 – 5	100 % A (0 % B)
5 – 25	100 – 20% A (0 – 80 % B)
25 – 30	20 – 100 % A (80 – 0 % B)
30 – 35	100 % A (0 % B)

Tabulka 2: Jednotlivé gradienty mobilní fáze, kde A je 0,1% trifluoroctová kyselina ve vodě, B je 0,1% trifluoroctová kyselina v acetonitrilu

5.3.2 Tenkovrstvá chromatografie (ITLC-SG)

Tato metoda je velmi vhodná pro rychlé změření radiochemické čistoty radiofarmaceutických preparátů využívaná především pro rychlou kontrolu kvality radiofarmak na odděleních nukleární medicíny. Na nařezané malé proužky tenké vrstvy ITLC-SG byl nanesen 1 μ l směsi radioaktivně značeného minigastrinu tak, aby byl vzorek nad hladinou mobilní fáze vyvíjecí soustavy. Po vysušení naneseného vzorku byla chromatografie provedena v několika soustavách [32]:

1. 10% octanu amonného + methanolu (1:1 V/V)
2. 10% hydroxidu amonného + methanolu (1:1 V/V)
3. 0,1M octan amonný pH 5,5 s 10 mM EDTA

Vyvíjení trvalo pouze několik minut a zhruba 1,5 cm před horním koncem chromatogramu se tento vyjmul. Poté se dal chvíli vysušit. Po vysušení chromatogramu byl profil záznamu stanoven na radiochromatografu (RITA STAR firmy Raytest), program GINA STAR pak výsledky převedl do podoby grafu. Měření probíhalo v různých soustavách a obvykle ve stejných časových intervalech jako HPLC analýzy.

6 Výsledky

6.1 Minigastrin 46

6.1.1 Radioaktivní značení peptidu

K 12 μl roztoku peptidu v superčisté vodě o koncentraci $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bylo přidáno 50 μl acetátového pufru o koncentraci 0.4 mol/l a 20 μl InCl_3 v 0.04M HCl odpovídající aktivitě 0,2 mCi. (GE Healthcare, UK).

6.1.2 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 46 pomocí metody ITLC-SG

Na následující sérii obrázků jsou výsledky měření $^{111}\text{InMG}$ 46 pomocí instantní tenkovrstvé chromatografie. Podmínky měření jsou vždy uvedeny v popisku. Samotné měření probíhalo ve dvou různých soustavách: 10% octan amonný + methanol (Ilustrace 8-13), 10% hydroxid amonný + methanol (Ilustrace 14-19). Na ilustracích je vidět změna radiochemické čistoty radioaktivně značeného minigastrinu 46 v závislosti na čase. Výsledky jsou uvedeny v čase nula od počátku měření, za jednu hodinu, za šest hodin, za dvacet tři hodin, dvacet tři a půl a dvacet šest hodin.

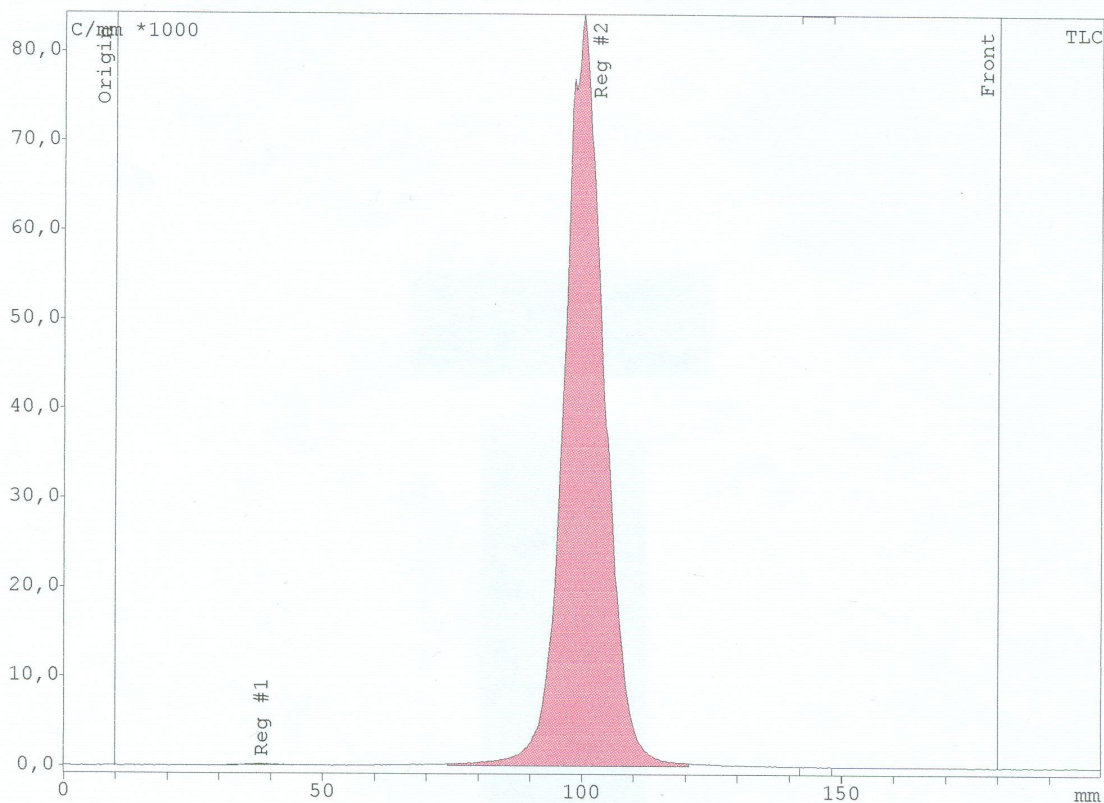
V případě prostředí 10% octanu amonného s methanolem peptid (a pravděpodobně i volné indium) putují s čelem mobilní fáze, zatímco koloid zůstává na startu. Radiochemická čistota i po šestadvaceti hodinách je relativně vysoká, 99,54% problémem je, že soustava nedovoluje stanovit volný nehydrolyzovaný radiokov, který zřejmě díky přítomnému acetátu zůstává ve formě slabého komplexu v roztoku a putuje současně s peptidem.

V soustavě 10% hydroxidu amonného a methanolu peptid rovněž putuje s čelem mobilní fáze, koloid a volné indium však zůstávají na startu a jsou patrné jako menší pík s R_f 0 - 0.3. Radiochemická čistota v čase posledního měření ($t = 26$ h) zde byla dokonce vyšší než v prvních hodinách měření.

Soustava	Radiochemická čistota v čase [%]					
	0 h	1 h	6 h	23 h	23,5 h	26 h
10% octan amonný + methanol	99,9	99,91	99,74	99,27	99,61	99,54
10% hydroxid amonný + methanol	99,07	99,39	99,26	99,04	99,78	99,72

Tabulka 3: Stabilita $^{111}\text{InMG}$ 46

V tabulce č.3 jsou k dispozici výsledky měření radiochemické čistoty minigastrinu 46 v různých prostředích a různých časových intervalech.



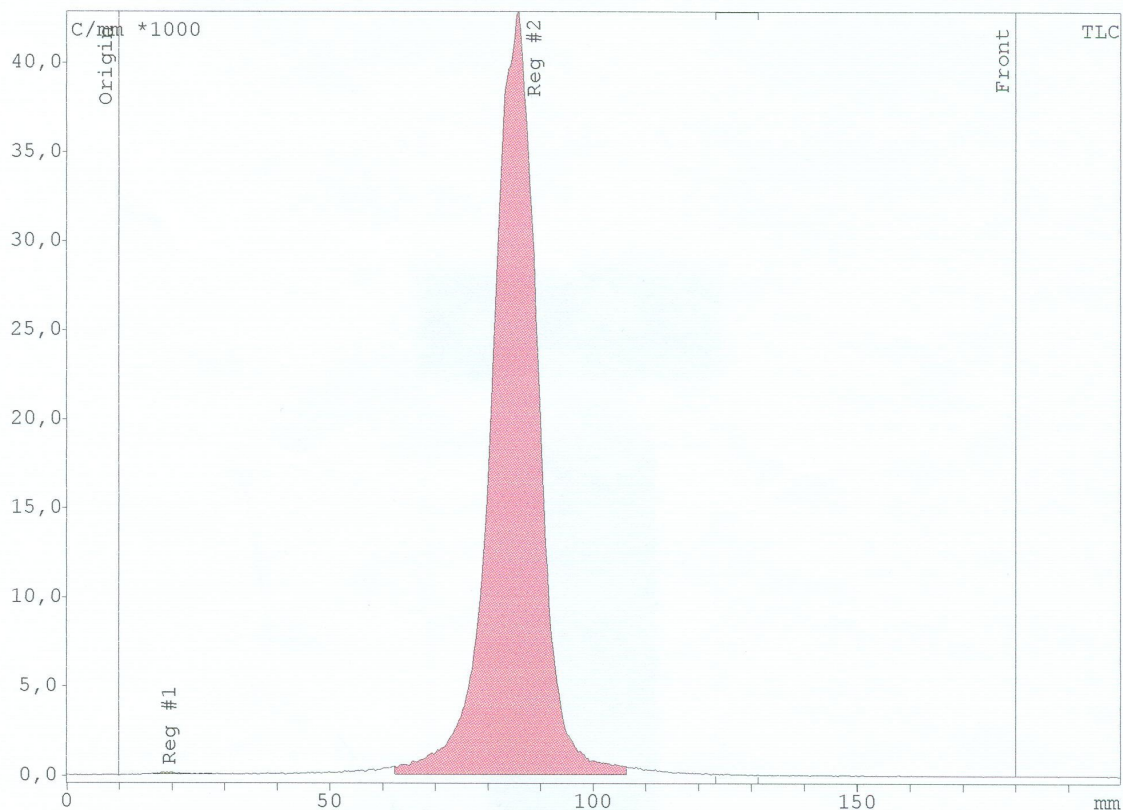
Sample description

Measurement: 111 In MG46 octan-meta.rta, started: 22.9.2010 10:03
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,164	0,10	DD	763,5	0,10
Reg #2	0,530	99,93	DD	749980,1	99,90
Sum in ROI				750743,6	
Total area				750523,9	
Area RF				752583,4	
BKG1				87,59	
Remainder RF				1839,82	0,24
Remainder (Tot)				-219,71	-0,03

Ilustrace 9: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 0 h)



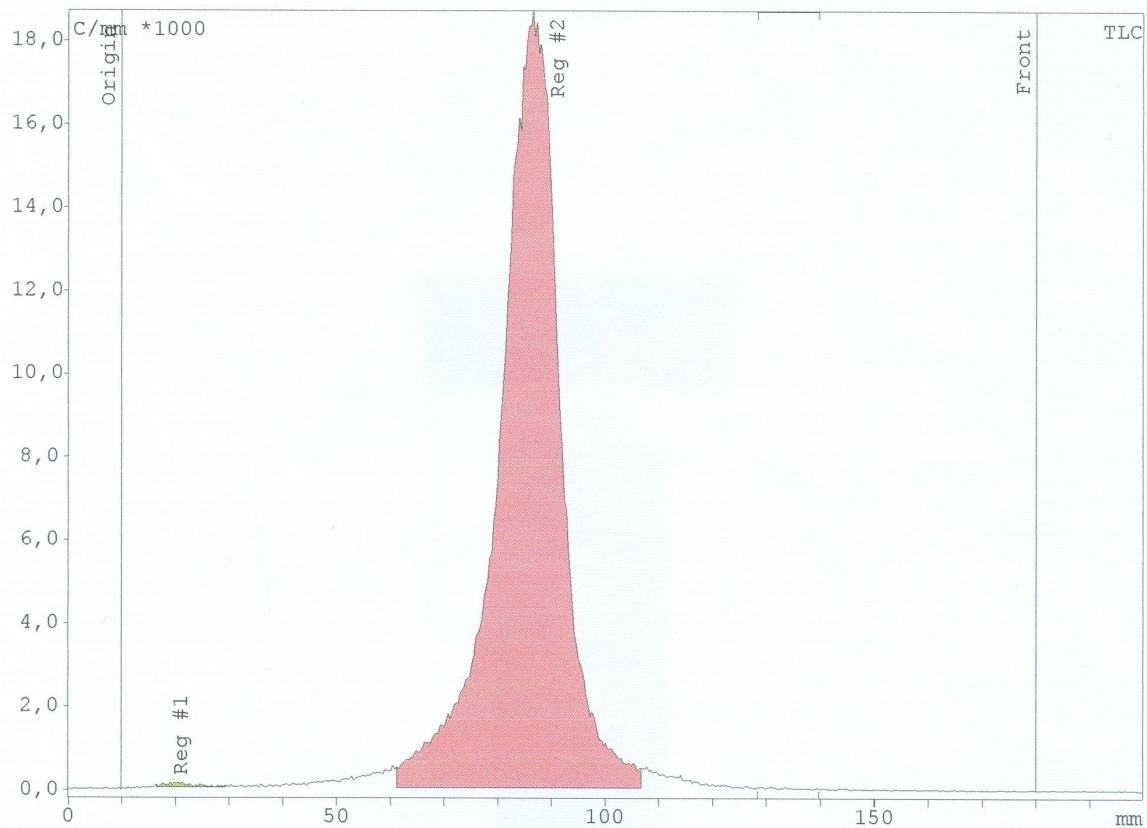
Sample description

Measurement: 111 In MG46 octan-met 1 hod.rta, started: 22.9.2010 11:3
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,054	0,09	DD	409,3	0,09
Reg #2	0,444	99,63	DD	437388,6	99,91
Sum in ROI				437797,9	
Total area				438994,2	
Area RF				441023,7	
BKG1				94,46	
Remainder RF				3225,82	0,73
Remainder (Tot)				1196,27	0,27

Ilustrace 10: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 1 h)



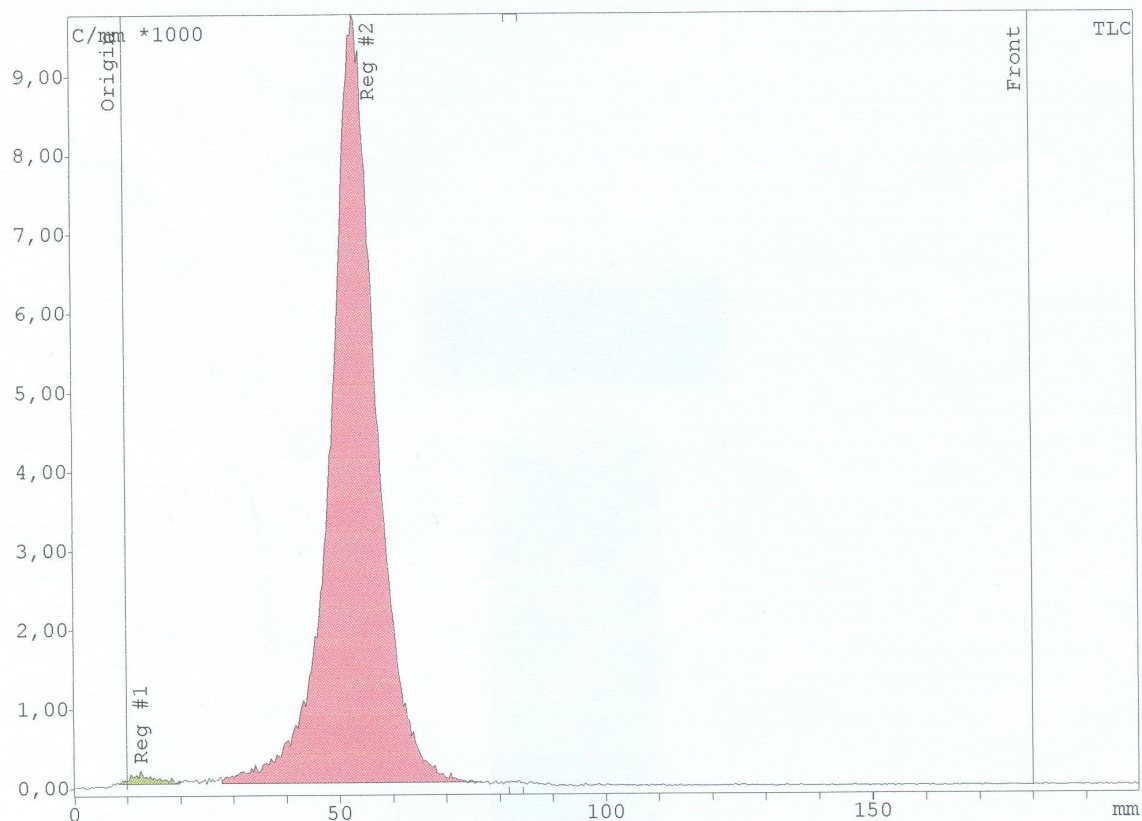
Sample description

Measurement: 111 InMG46 octan-met 6h.rta, started:22.9.2010 14:40
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,063	0,25	DD	636,8	0,26
Reg #2	0,450	97,60	DD	245471,0	99,74
Sum in ROI				246107,8	
Total area				251512,5	
Area RF				252858,8	
BKG1				64,93	
Remainder RF				6751,03	2,67
Remainder (Tot)				5404,71	2,15

Ilustrace 11: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 6 h)



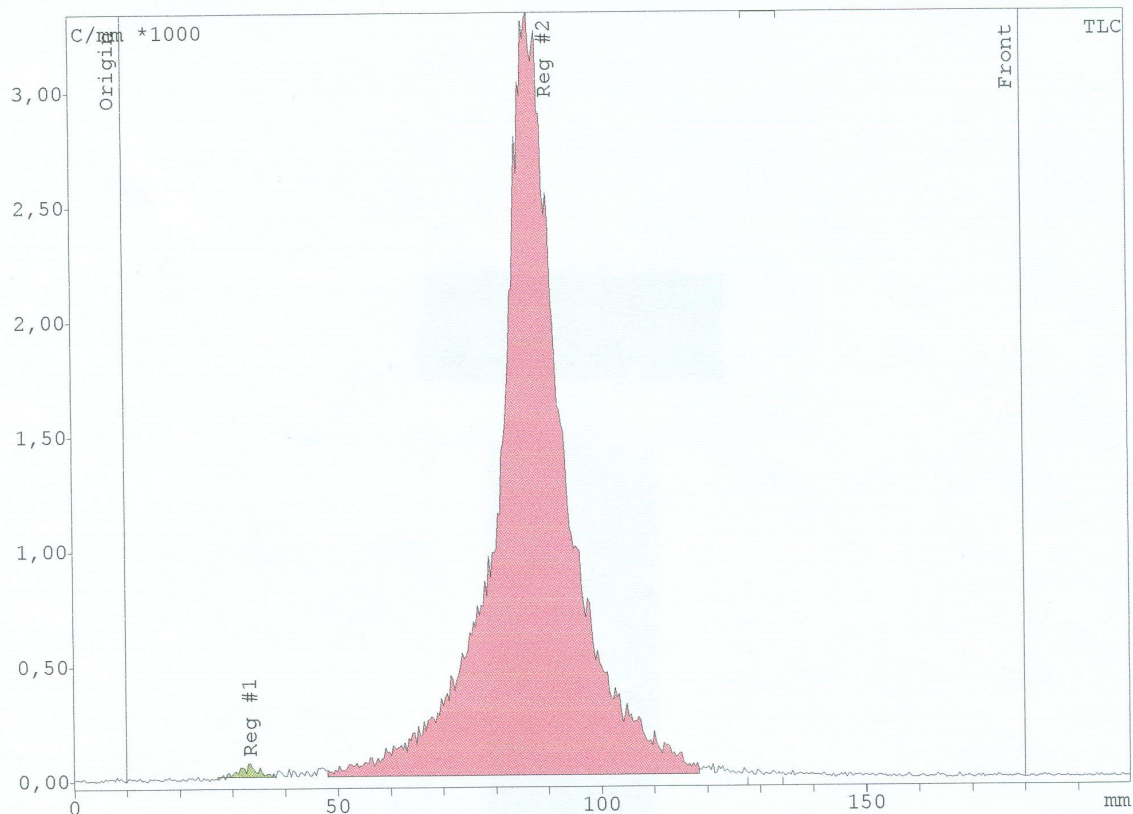
Sample description

Measurement: 111 InMG46 octan-met 23 h.rta, started: 23.9.2010 9:11
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,013	0,78	DD	707,86	0,73
Reg #2	0,254	106,02	DD	95967,00	99,27
Sum in ROI				96674,86	
Total area				90520,71	
Area RF				91927,57	
BKG1				61,948	
Remainder RF				-4747,29	-5,16
Remainder (Tot)				-6154,14	-6,80

Ilustrace 12: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 23 h)



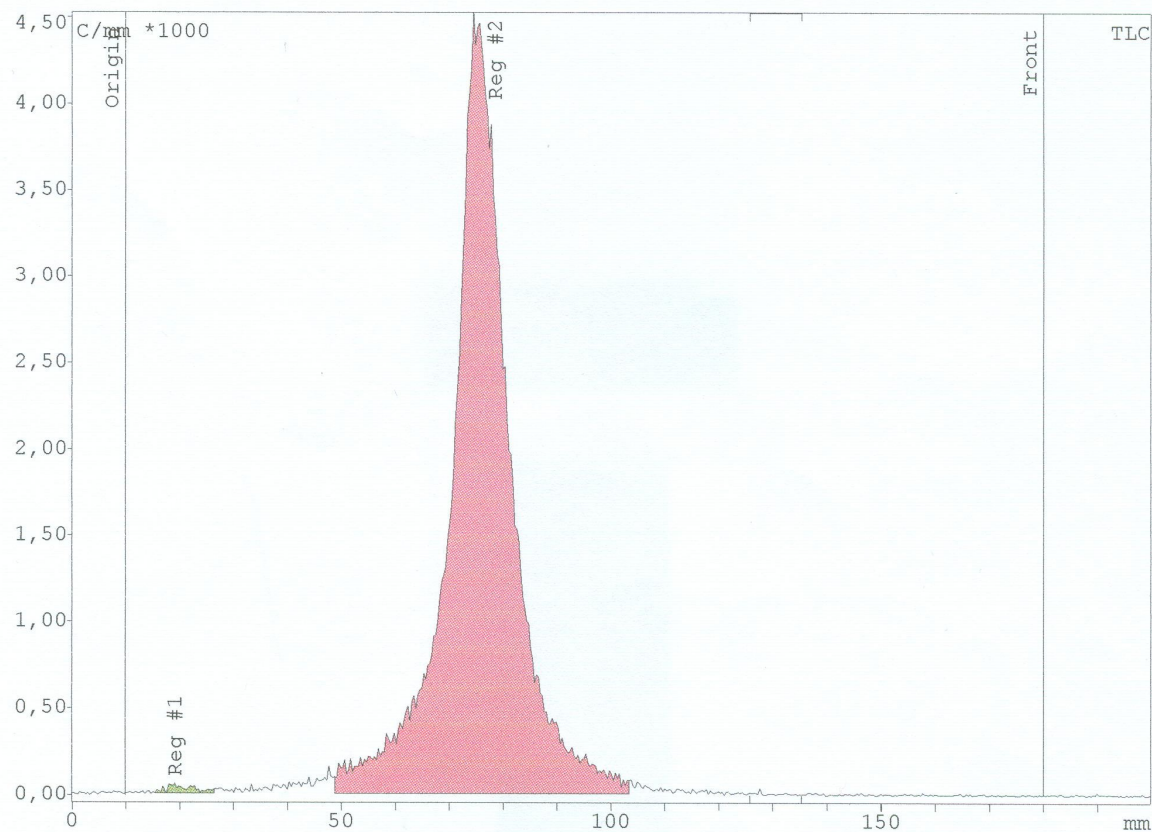
Sample description

Measurement: 111-In MG 46 30 min.rta, started: 23.9.2010 9:31
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,136	0,40	DD	188,28	0,39
Reg #2	0,450	101,64	DD	47907,67	99,61
Sum in ROI				48095,94	
Total area				47135,94	
Area RF				47625,44	
BKG1				20,758	
Remainder RF				-470,50	-0,99
Remainder (Tot)				-960,00	-2,04

Ilustrace 13: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 23,5 h)



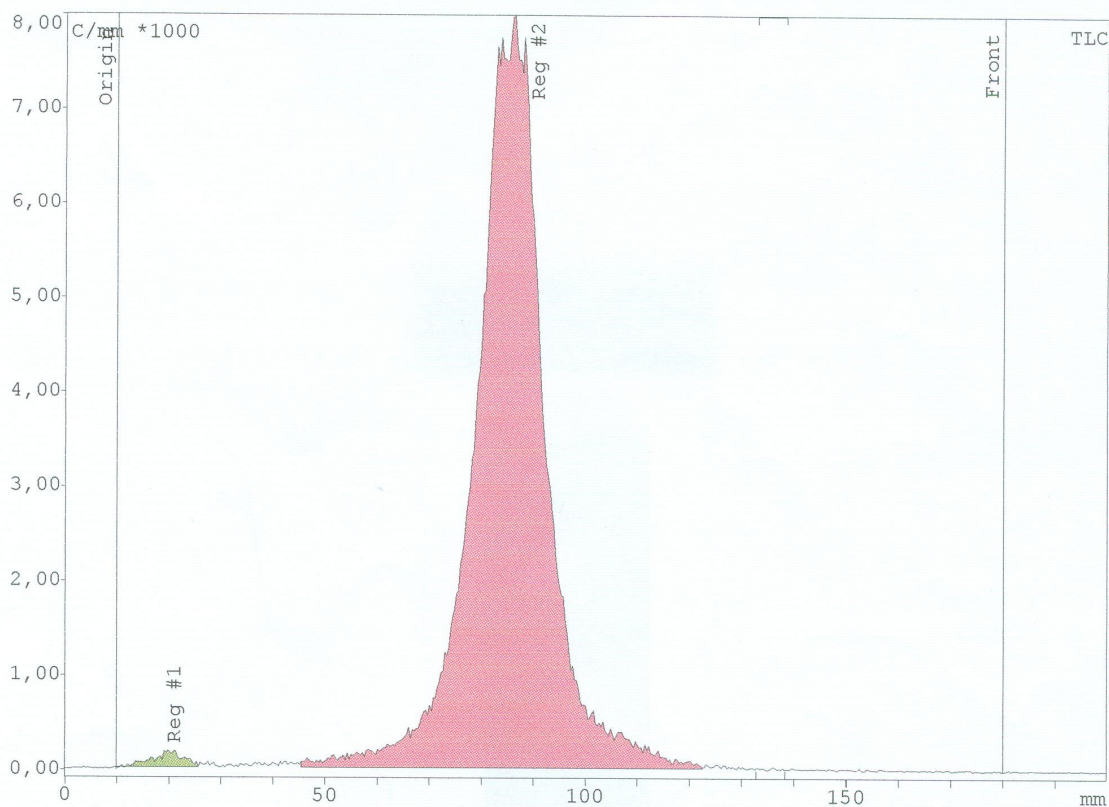
Sample description

Measurement: 111 InMG46 octan-met.3h.rta, started:23.9.2010 13:01
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,052	0,46	DD	262,92	0,46
Reg #2	0,384	97,84	DD	56344,38	99,54
Sum in ROI				56607,31	
Total area				57586,77	
Area RF				57719,08	
BKG1				10,280	
Remainder RF				1111,77	1,93
Remainder (Tot)				979,46	1,70

Ilustrace 14: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 26 h)



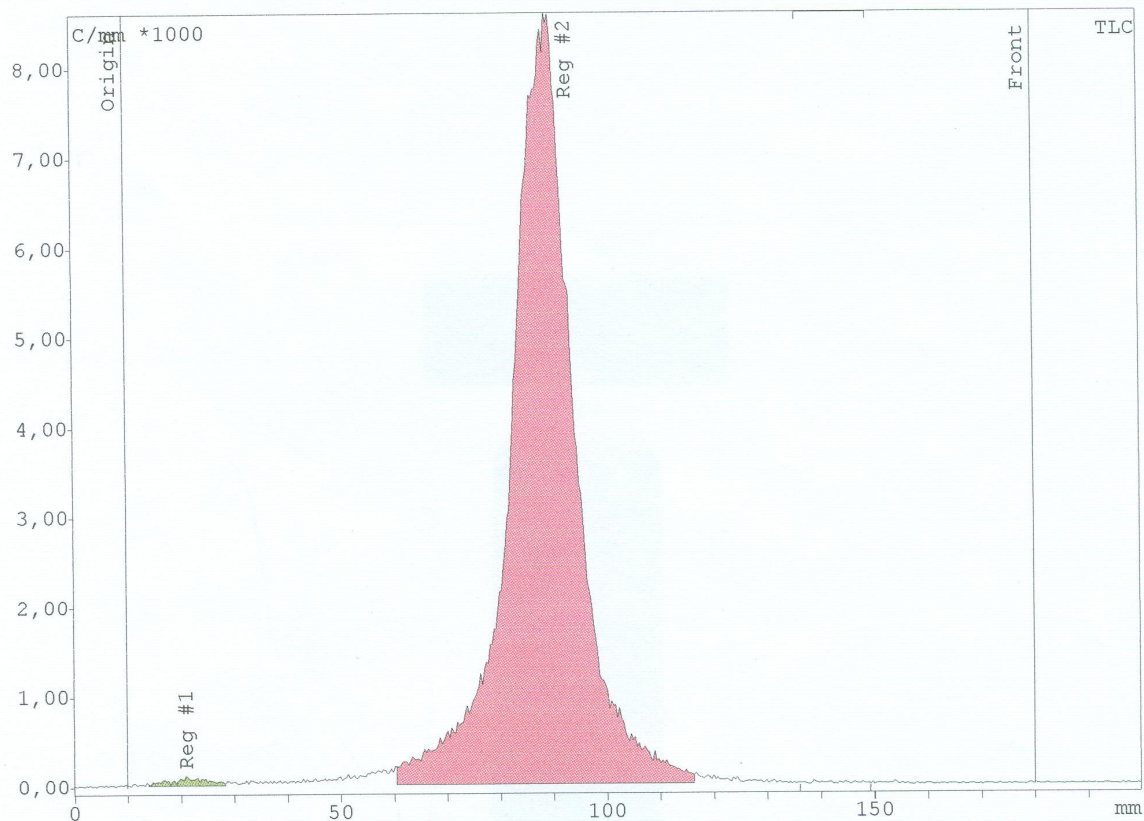
Sample description

Measurement: 111 InMG46 hydroxid-met.rta, started:22.9.2010 10:22
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,063	0,93	DD	1158,5	0,93
Reg #2	0,446	99,31	DD	123610,0	99,07
Sum in ROI				124768,5	
Total area				124470,3	
Area RF				124991,7	
BKG1				26,55	
Remainder RF				223,27	0,18
Remainder (Tot)				-298,13	-0,24

Ilustrace 15: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% hydroxid amonný + methanol, v čase t = 0 h)



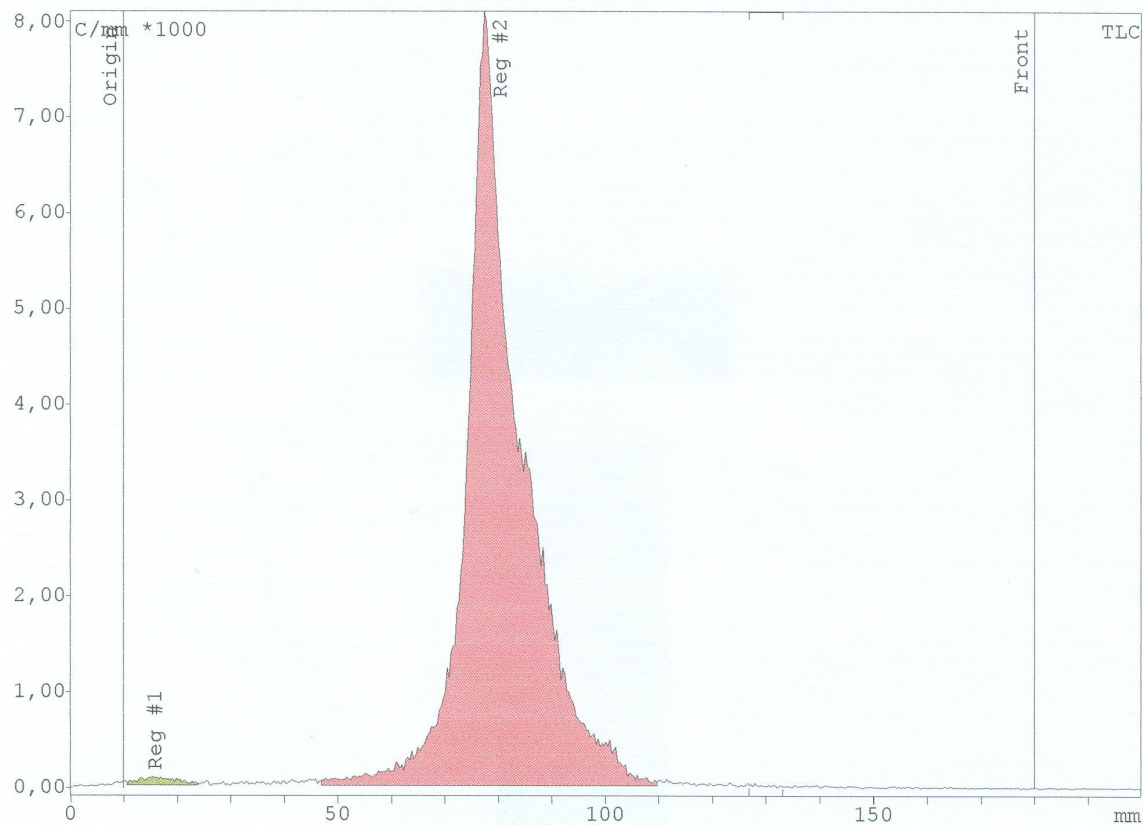
Sample description

Measurement: 111 In MG46 hydroxid-met 1 hod.rta, started: 22.9.2010 11:3
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,063	0,60	DD	726,9	0,61
Reg #2	0,466	97,71	DD	118633,4	99,39
Sum in ROI				119360,4	
Total area				121418,5	
Area RF				121776,8	
BKG1				23,71	
Remainder RF				2416,42	1,98
Remainder (Tot)				2058,17	1,70

Ilustrace 16: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% hydroxid amonný + methanol, v čase t = 1 h)



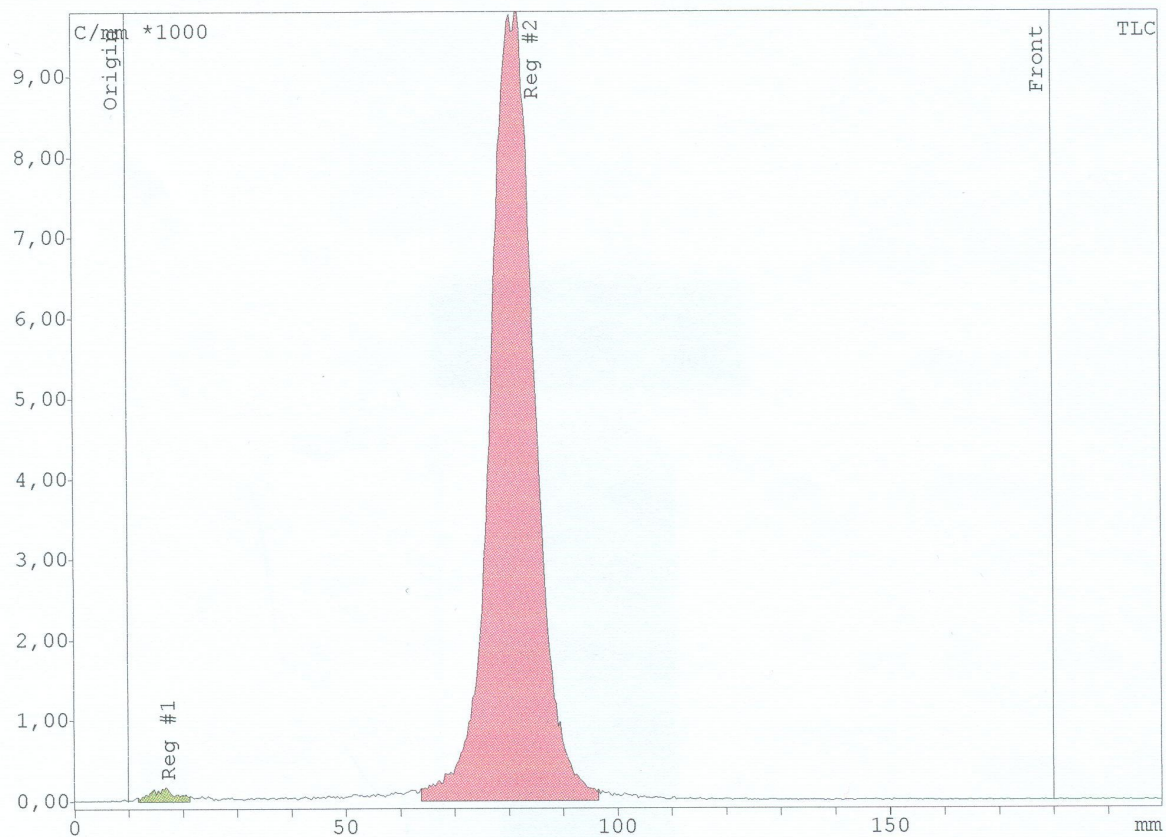
Sample description

Measurement: 111 InMG46 hydroxid-met 6h.rta, started: 22.9.2010 14:4
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,032	0,75	DD	709,41	0,74
Reg #2	0,397	99,45	DD	94667,71	99,26
Sum in ROI				95377,12	
Total area				95191,71	
Area RF				95651,53	
BKG1				28,075	
Remainder RF				274,41	0,29
Remainder (Tot)				-185,41	-0,19

Ilustrace 17: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% hydroxid amonný + methanol, v čase t = 6 h)



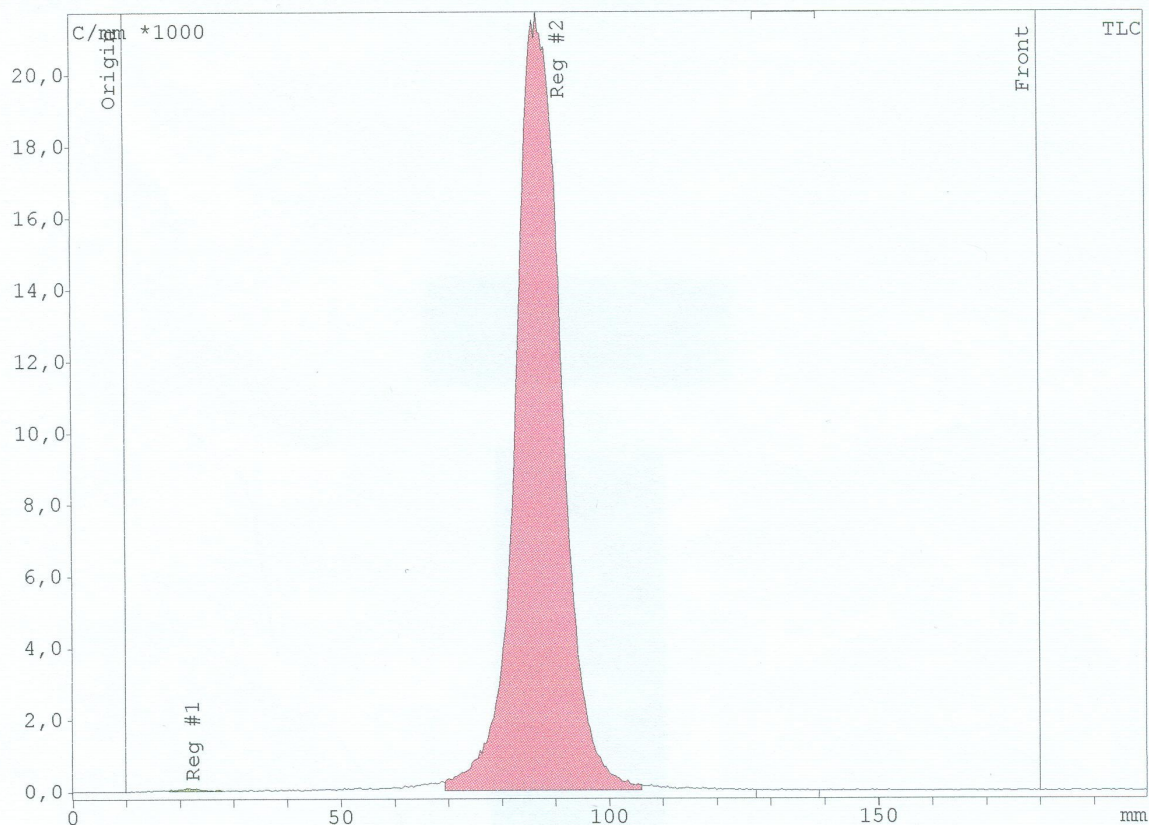
Sample description

Measurement: 111 InMG 46 hydroxid-met 23h.rta, started: 23.9.2010 9:16
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,041	0,92	DD	904,00	0,96
Reg #2	0,420	95,34	DD	93609,00	99,04
Sum in ROI				94513,00	
Total area				98180,00	
Area RF				98067,00	

Ilustrace 18: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% hydroxid amonný + methanol, v čase t = 23 h)



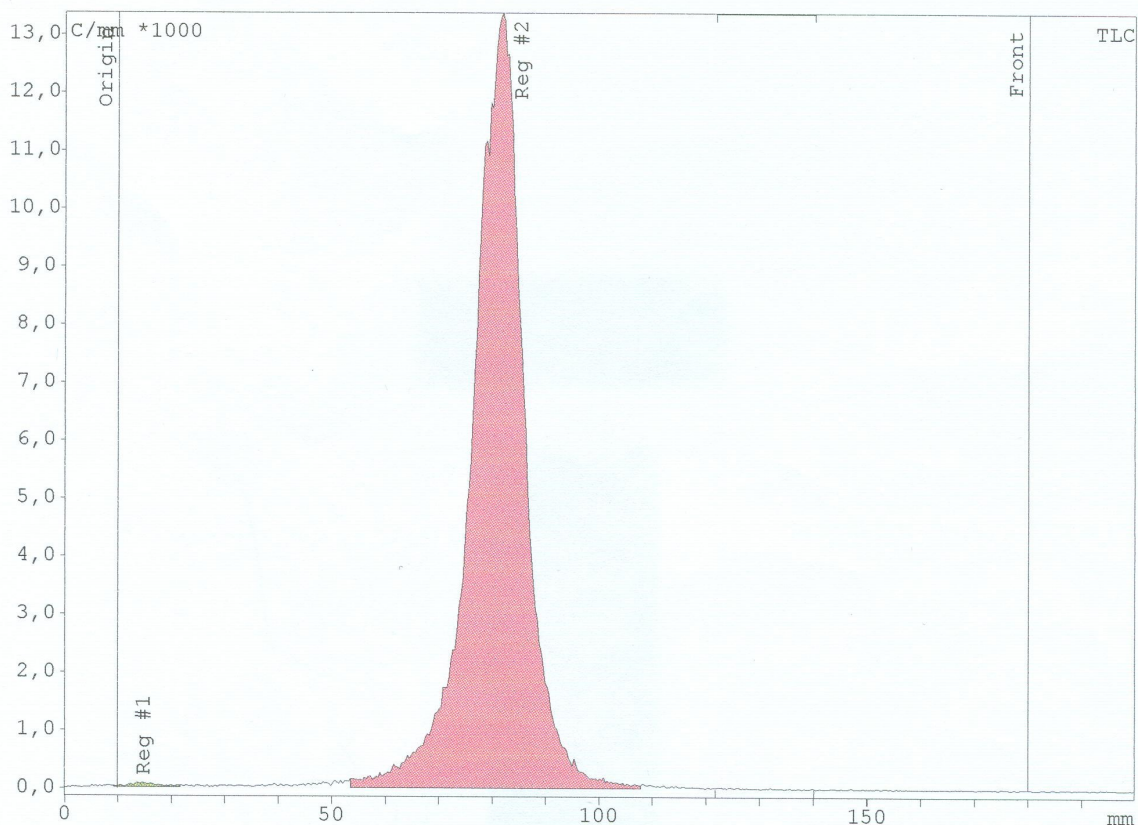
Sample description

Measurement: 111 InMG 46 hydroxid-met 30m.rta, started: 23.9.2010 9:37
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,071	0,22	DD	480,7	0,22
Reg #2	0,453	98,46	DD	216007,9	99,78
Sum in ROI				216488,5	
Total area				219395,5	
Area RF				219856,5	
BKG1				23,27	
Remainder RF				3367,97	1,53
Remainder (Tot)				2906,94	1,32

Ilustrace 19: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% hydroxid amonný + methanol, v čase t = 23,5 h)



Sample description

Measurement: 111 InMG46 hydroxid-met 3h.rta, started: 23.9.2010 13:1
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

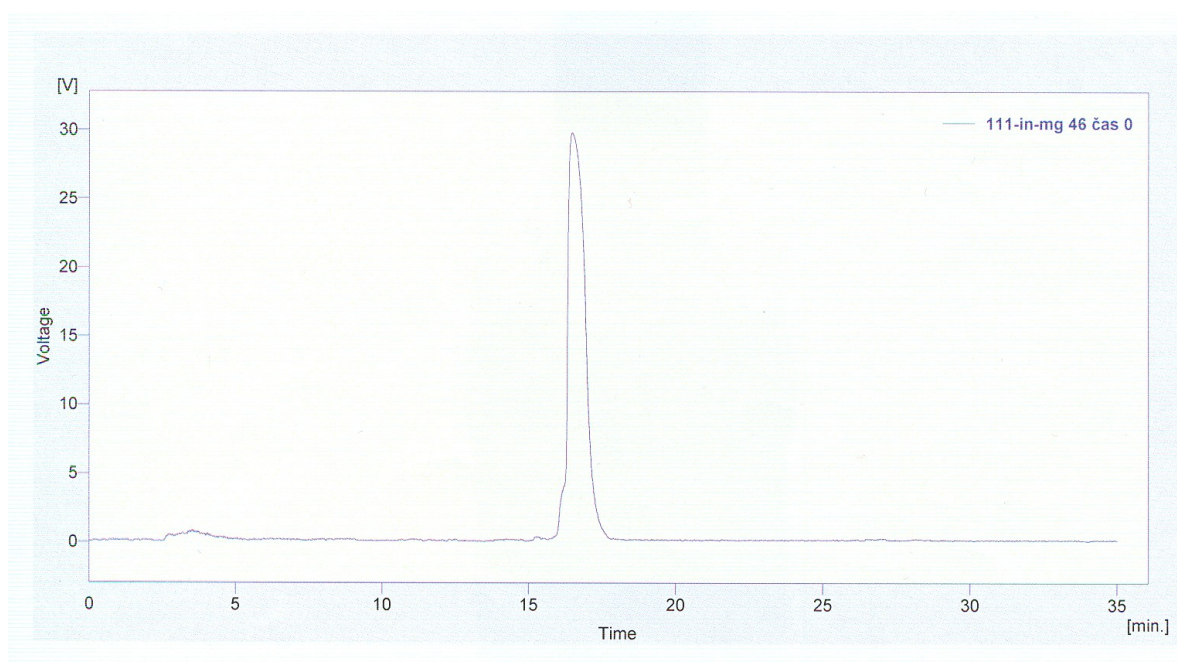
Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,026	0,27	DD	416,8	0,28
Reg #2	0,420	99,11	DD	150280,7	99,72
Sum in ROI				150697,5	
Total area				151630,8	
Area RF				151872,0	
BKG1				20,07	
Remainder RF				1174,48	0,77
Remainder (Tot)				933,32	0,62

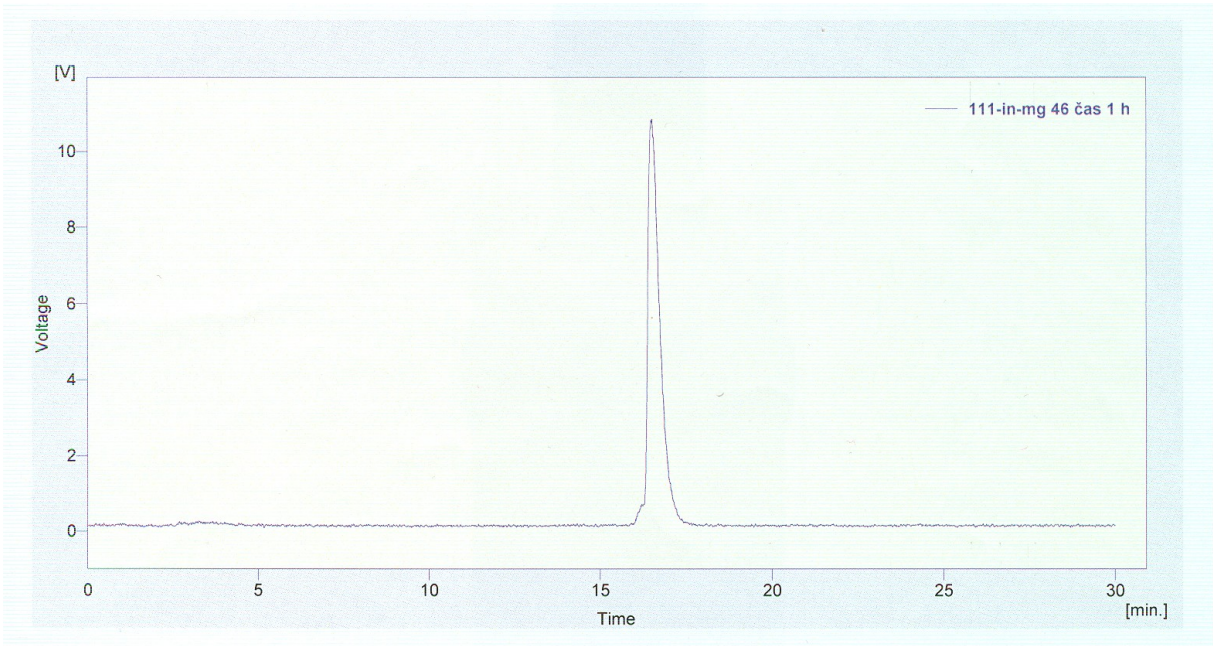
Ilustrace 20: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou ITLC-SG (10% hydroxid amonný + methanol, v čase t = 26 h)

6.1.3 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 46 pomocí metody HPLC

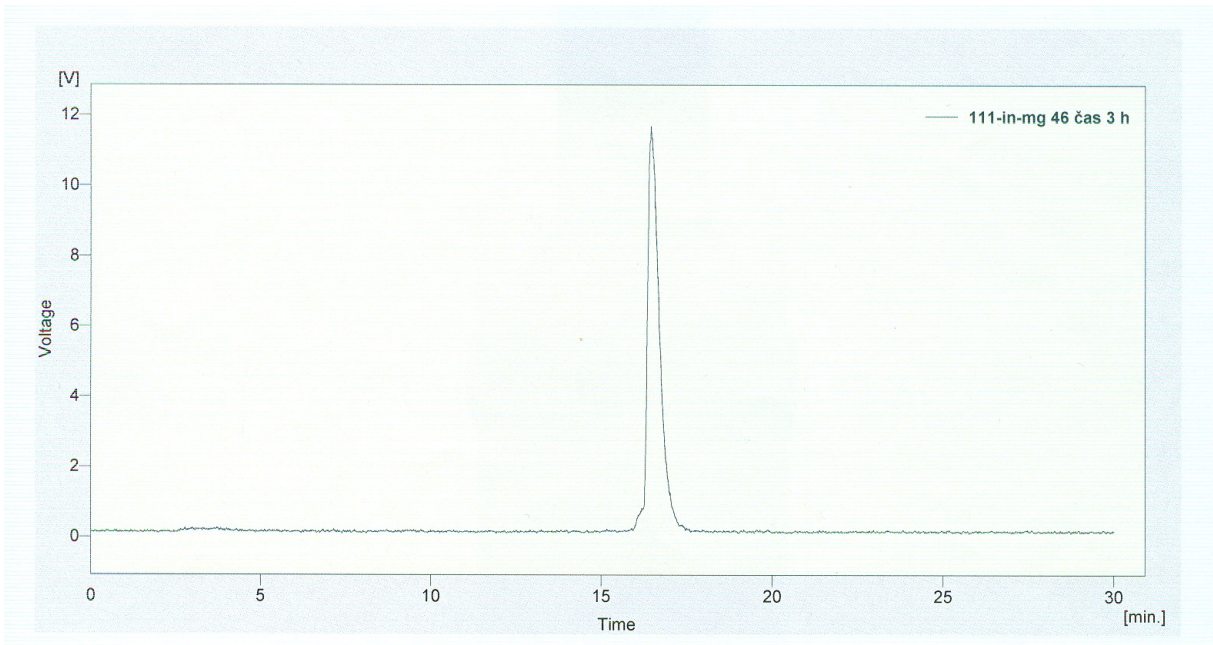
Na následující sérii ilustrací jsou zobrazeny výsledky měření radiochemické čistoty minigastrinu 46 pomocí metody HPLC. Tato analýza probíhala souběžně s měřením pomocí ITLC-SG. Doba analýzy byla 30 minut. První drobný pík objevující se před pátou minutou značí polární nízkomolekulární nečistoty. Velmi drobný pík kolem patnácté minuty značí rozklad části peptidu, pravděpodobně se jedná o oxidovanou formu. Hlavní pík viditelný kolem šestnácté minuty charakterizuje peptid. S přibývajícím časem od značení je možno vidět vzrůstající pík nečistot.



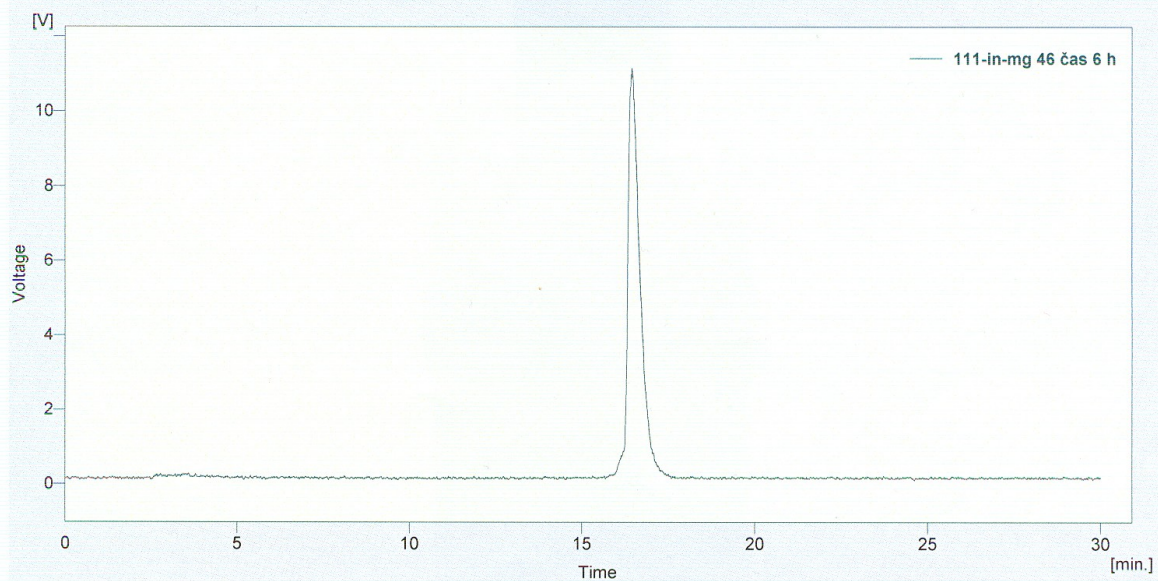
Ilustrace 21: Výsledek měření čistoty $^{111}\text{InMG 46}$ metodou HPLC v čase $t = 0$ h



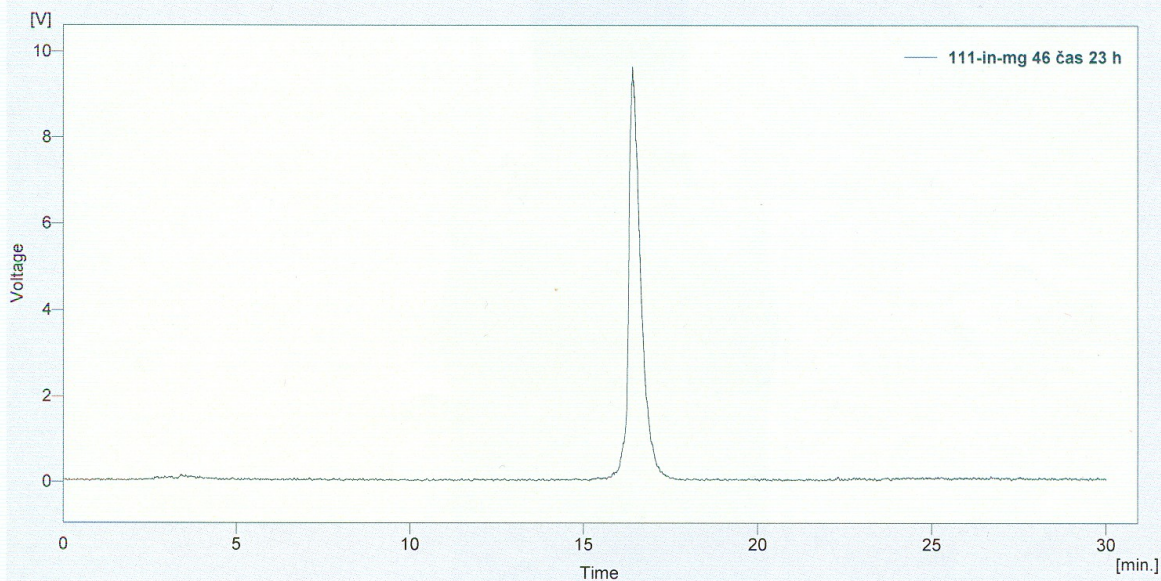
Ilustrace 22: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou HPLC v čase $t = 1$ h



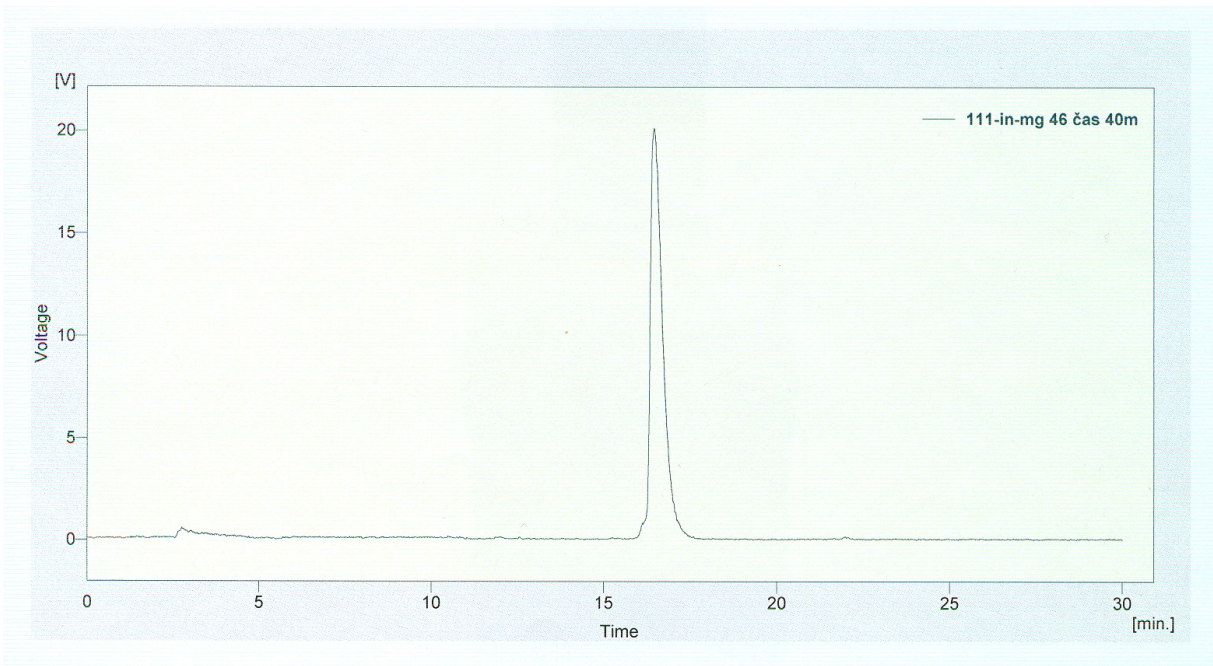
Ilustrace 23: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou HPLC v čase $t = 3$ h



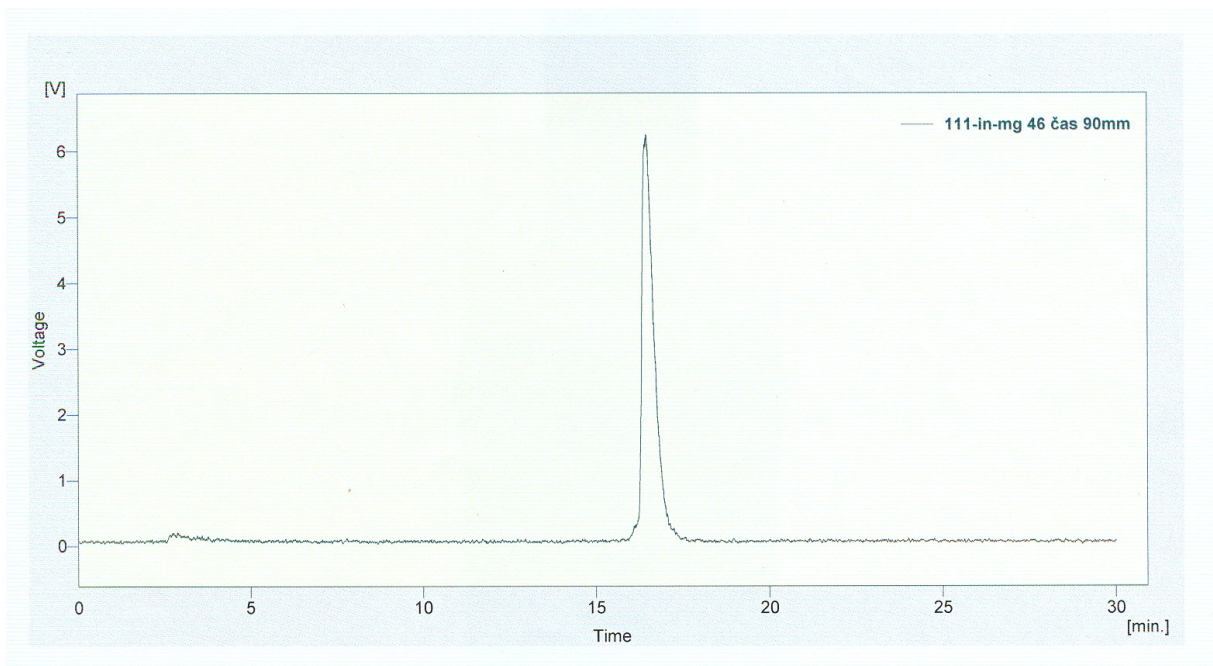
Ilustrace 24: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou HPLC v čase $t = 6$ h



Ilustrace 25: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou HPLC v čase $t = 23$ h



Ilustrace 26: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou HPLC v čase t = 24 h



Ilustrace 27: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 46 metodou HPLC v čase t = 26 h

6.2 Minigastrin 47

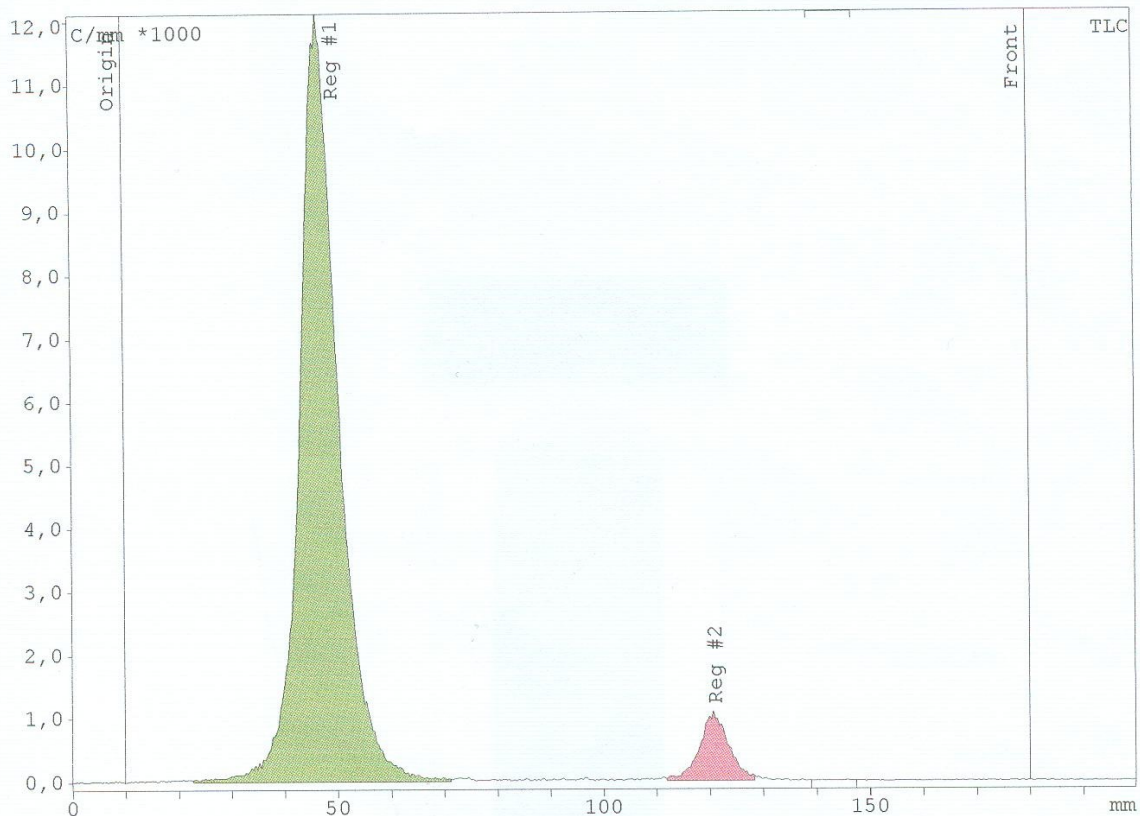
6.2.1 Radioaktivní značení peptidu

K 18 μl roztoku peptidu v superčisté vodě o koncentraci $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bylo přidáno 90 μl acetátového pufru o koncentraci 0.4 mol/l a 0,8 μl InCl_3 v 0,05M HCl odpovídající aktivitě 1 mCi. (PerkinElmer, USA).

6.2.2 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 47 pomocí metody ITLC-SG

Při zjišťování radiochemické čistoty MG 47 byly použity tři rozdílné soustavy. Dvě byly stejné jako v předchozím případě – tedy 10% octan amonný – methanol a 10% hydroxid amonný – methanol. Nově byla použita soustava 0,1M octan amonný s 10mM EDTA. Postup práce při značení minigastrinu 47, rovněž i postup měření radiochemické čistoty pomocí ITLC-SG i HPLC probíhal stejně jako v případě minigastrinu 46.

Tenkvrstvá chromatografie v soustavě 0,1M octan amonný s 10 mM EDTA ukázala menší radiochemickou čistotu. Je zde však možné stanovit volné indium, které zde putuje, na rozdíl od ostatních forem, s čelem mobilní fáze. V tomto případě je čistý peptid blíže ke startu, zatímco indium (v iontové formě i ve formě koloidu) i EDTA putují s čelem mobilní fáze.



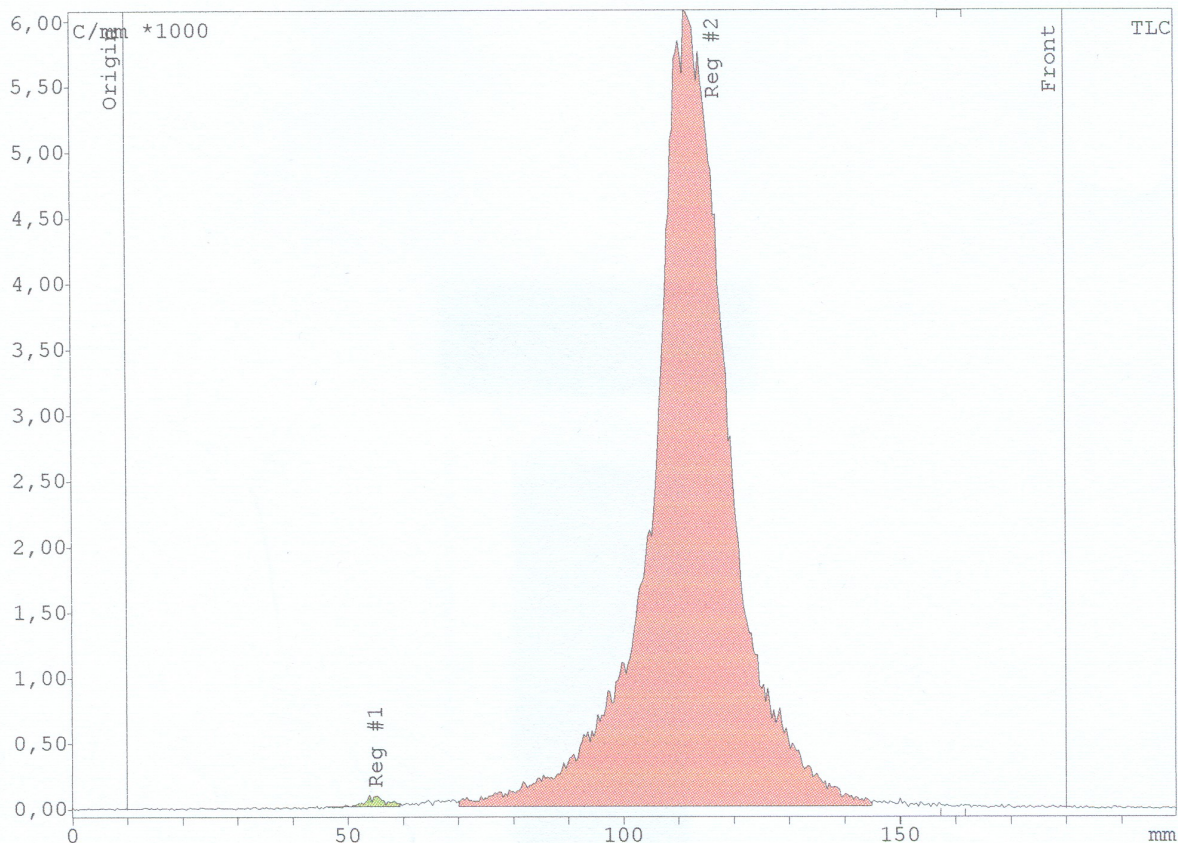
Sample description

Measurement: ¹¹¹In-MG 47 (4.3.).rta, started: 4.3.2010 9:39
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,216	92,77	DD	101832,5	93,79
Reg #2	0,651	6,14	DD	6740,1	6,21
Sum in ROI				108572,6	
Total area				109773,6	
Area RF				109833,7	
BKG1				8,42 C/mm	
Remainder RF				1261,04	1,15
Remainder (Tot)				1201,00	1,09

Ilustrace 28: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 47 metodou ITLC-SG (0,1M octan amonný s 10mM EDTA, v čase t = 1 h)



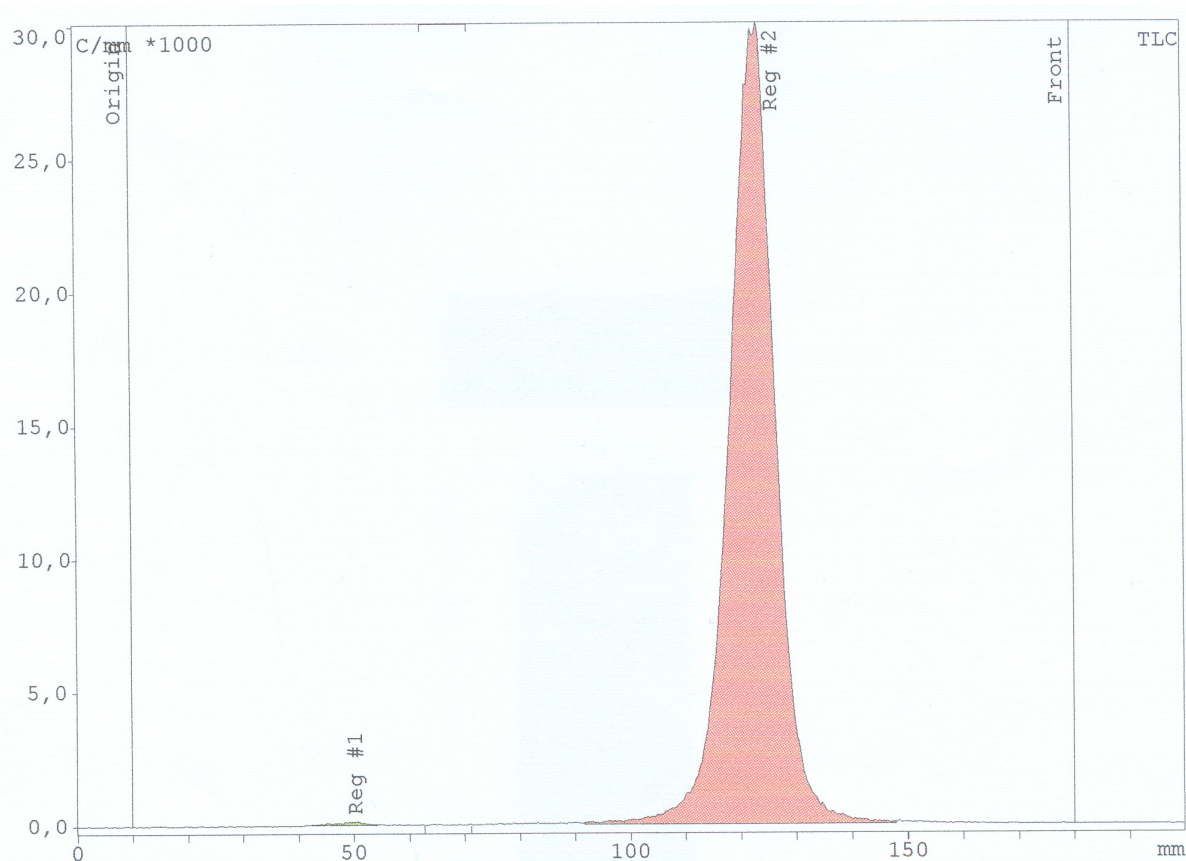
Sample description

Measurement: In-MG47 acetat-met.rta, started: 27.5.2010 8:44
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,263	0,32	DD	311,00	0,32
Reg #2	0,601	100,30	DD	97755,00	99,68
Sum in ROI				98066,00	
Total area				97463,92	
Area RF				97946,67	
BKG1				22,955	
Remainder RF				-119,33	-0,12
Remainder (Tot)				-602,08	-0,62

Ilustrace 29: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 47 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 90 min)



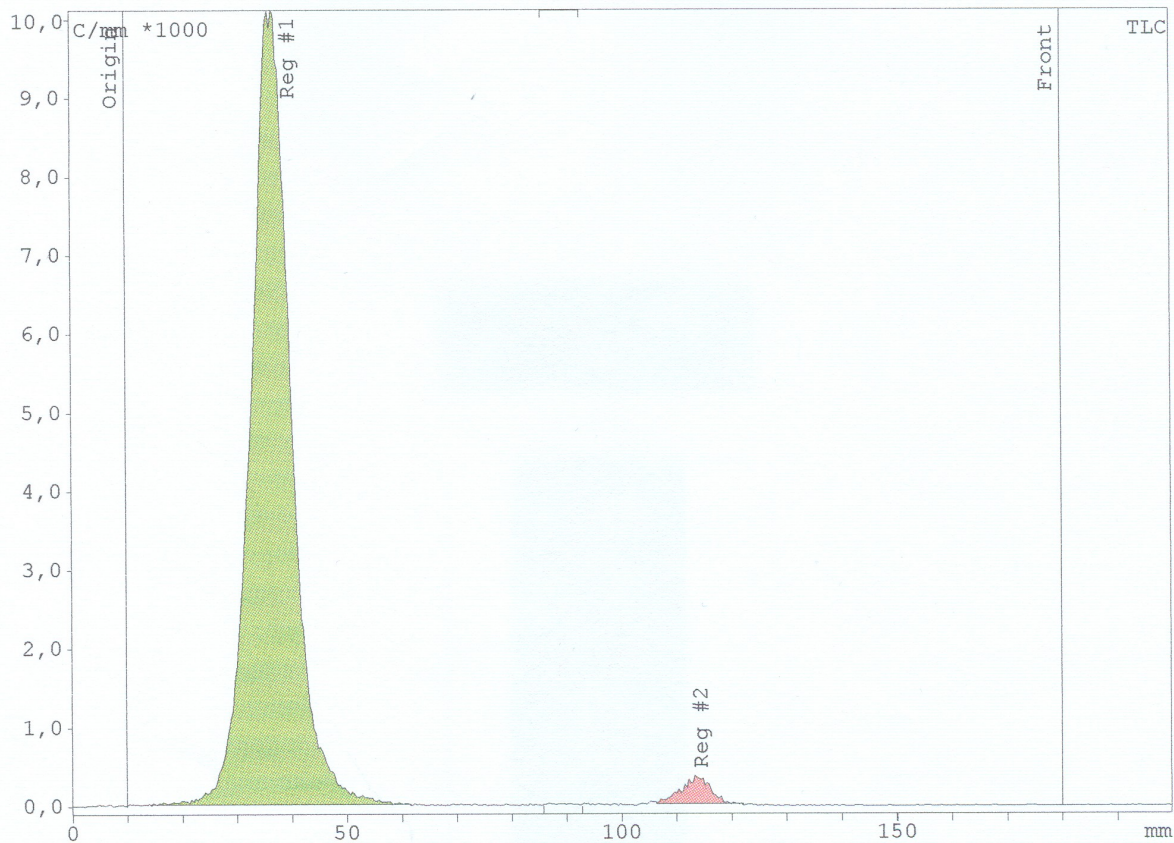
Sample description

Measurement: In-MG47 amon-met.rta, started: 27.5.2010 8:41
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,235	0,22	DD	635,7	0,22
Reg #2	0,666	100,34	DD	289350,5	99,78
Sum in ROI				289986,1	
Total area				288375,0	
Area RF				289416,3	
BKG1				47,55	
Remainder RF				-569,87	-0,20
Remainder (Tot)				-1611,09	-0,56

Ilustrace 30: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 47 metodou ITLC-SG (10% hydroxid amonný + methanol, v čase t = 90 min)



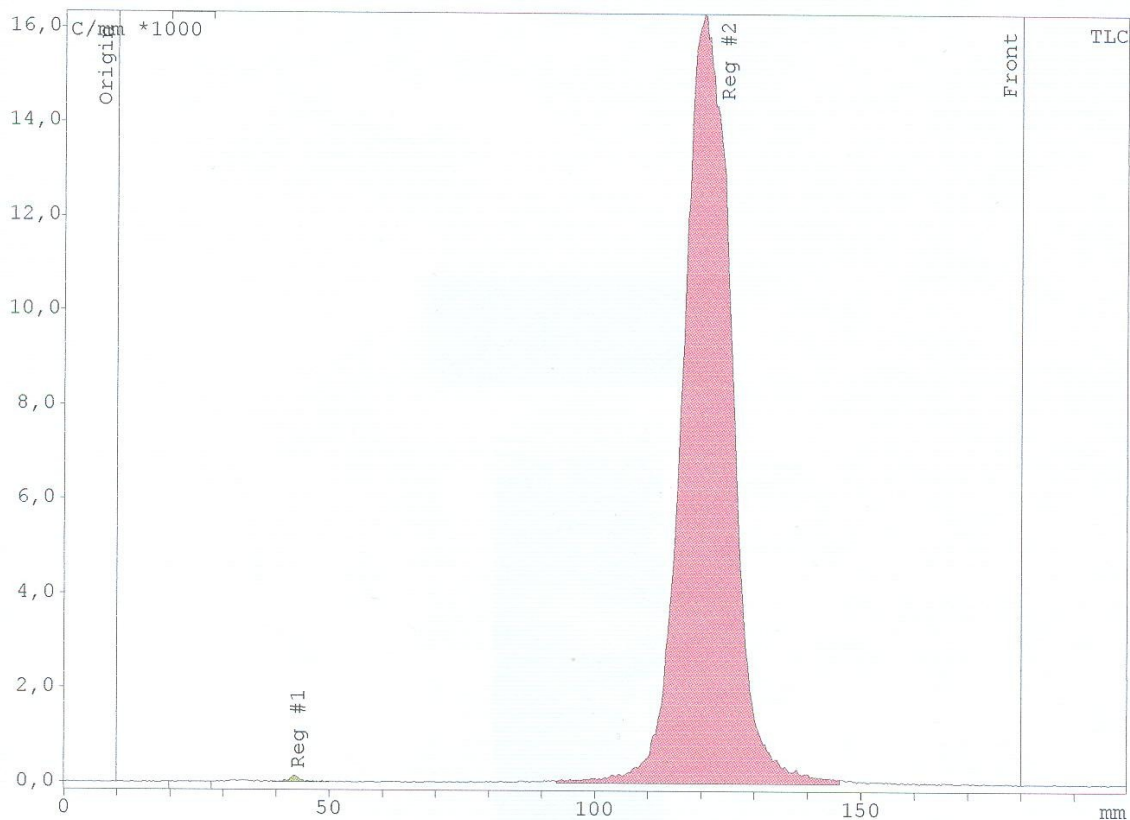
Sample description

Measurement: 111In-MG-47 (EDTA).rta, started: 3.3.2010 10:22
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,155	100,15	DD	85902,32	97,63
Reg #2	0,612	2,43	DD	2084,11	2,37
Sum in ROI				87986,42	
Total area				85772,47	
Area RF				86382,37	
BKG1				26,124	
Remainder RF				-1604,05	-1,86
Remainder (Tot)				-2213,95	-2,58

Ilustrace 31: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 47 metodou ITLC-SG (0,1M octan amonný s 10mM EDTA, v čase t = 3 h)



Sample description

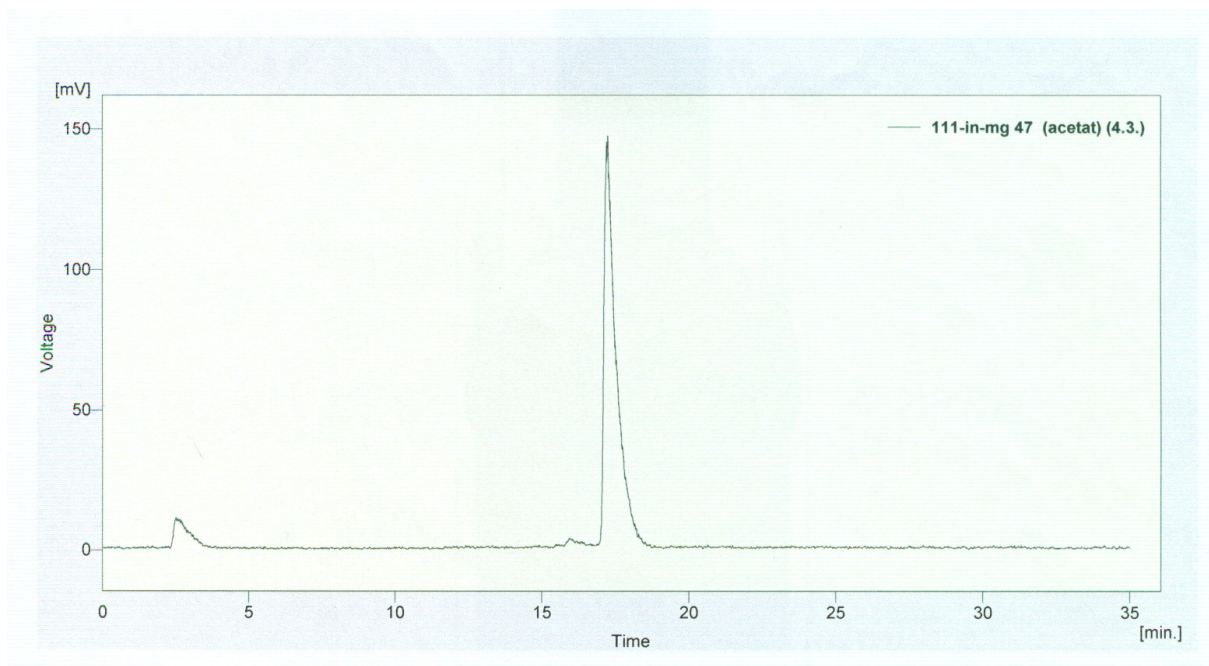
Measurement: 111In-MG47(4.3.83).rta, started: 4.3.2010 10:09
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

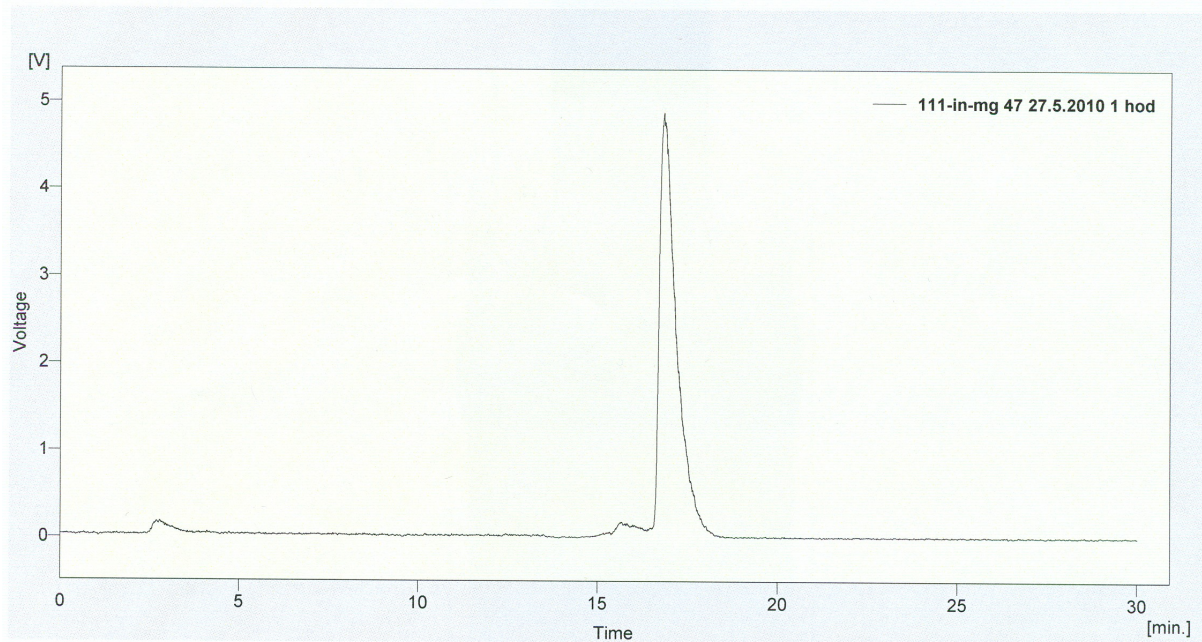
Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,198	0,21	DD	368,5	0,21
Reg #2	0,649	98,88	DD	174768,5	99,79
Sum in ROI				175137,0	
Total area				176740,5	
Area RF				176769,0	
BKG1				6,82 C/mm	
Remainder RF				1632,00	0,92
Remainder (Tot)				1603,50	0,91

Ilustrace 32: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 47 metodou ITLC-SG (10% hydroxid amonný + methanol, v čase t = 1 h)

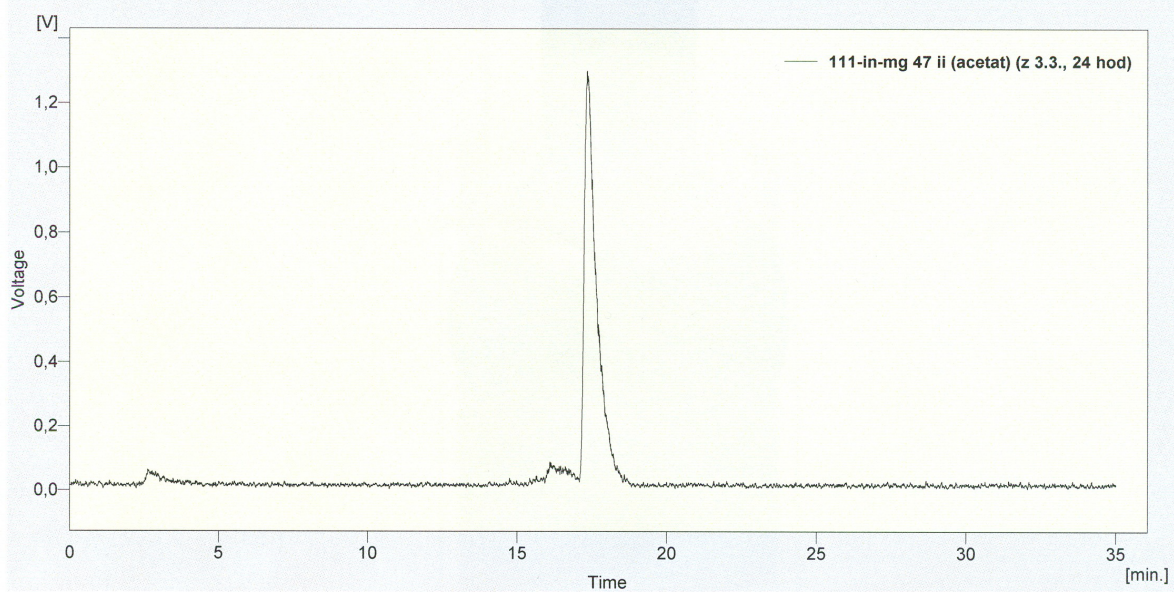
6.2.3 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 47 pomocí metody HPLC



Ilustrace 33: Výsledek měření čistoty $^{111}\text{InMG 47}$ metodou HPLC v čase $t = 0 \text{ h}$



Ilustrace 34: Výsledek měření čistoty $^{111}\text{InMG 47}$ metodou HPLC v čase $t = 1 \text{ h}$



Ilustrace 35: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 47 metodou HPLC v čase $t = 24$ h

6.3 Minigastrin 48

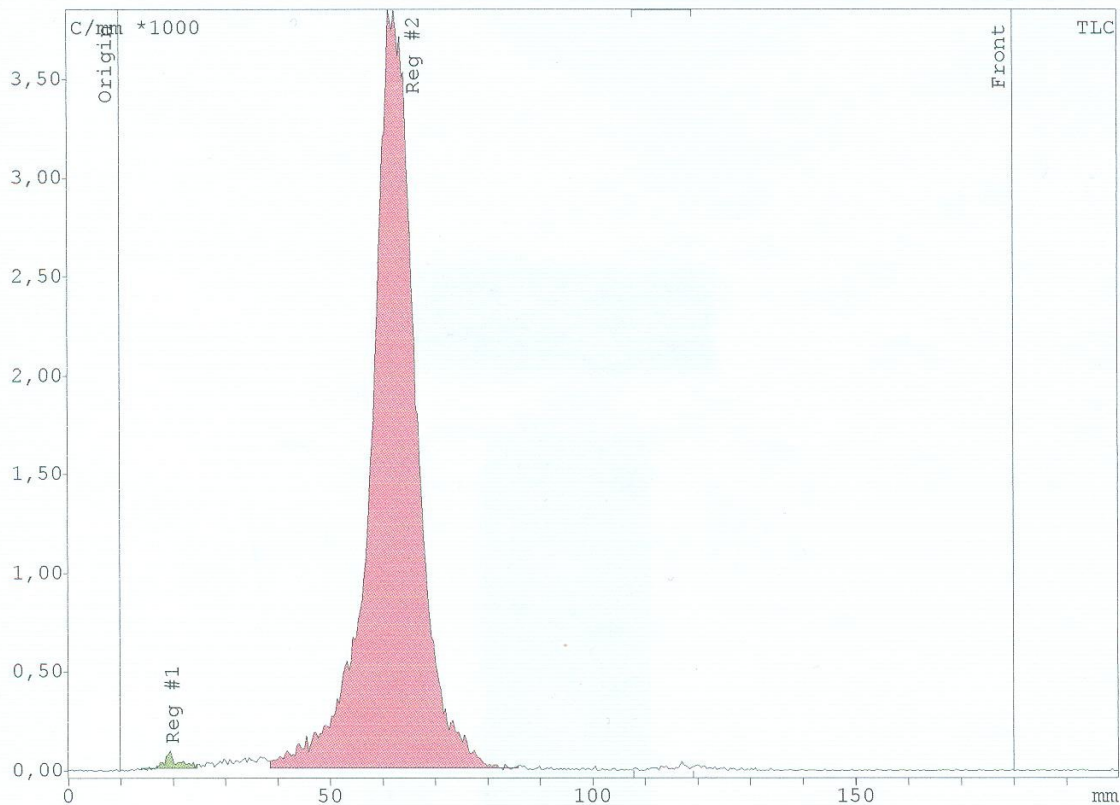
6.3.1 Radioaktivní značení peptidu

Ke 40 μl acetátového pufru o koncentraci 0,4 mol/l a pH 5,03 bylo přidáno 10 μl roztoku peptidu a 0,7 μl InCl_3 v 0,05M HCl odpovídající aktivitě 0,5 mCi. (PerkinElmer, USA).

6.3.2 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 48 pomocí metody ITLC-SG

Rozpouštění minigastrinu 48 bylo možné ve slabě alkalickém roztoku. K naváženému množství peptidu, ke kterému byla přidána superčistá voda, byl postupně přidáván (v objemech desetin mikrolitru) roztok přečištěného hydroxidu amonného o koncentraci 6 mol/l a vzniklý čirý roztok byl dále doředěn vodou na požadovanou koncentraci peptidu 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Výsledné pH roztoku bylo 5-6. Možnost vzniku sedimentu látky je patrná ze struktury měřeného minigastrinu (viz strana 30). Struktura je mimojiné tvořena velkým množstvím glutamových kyselin, kvůli kterým se peptid chová jako špatně rozpustná slabá kyselina.

Měření radiochemické čistoty minigastrinu 48 metodou ITLC-SG i HPLC pak probíhalo stejně jako v případě minigastrinu 46.



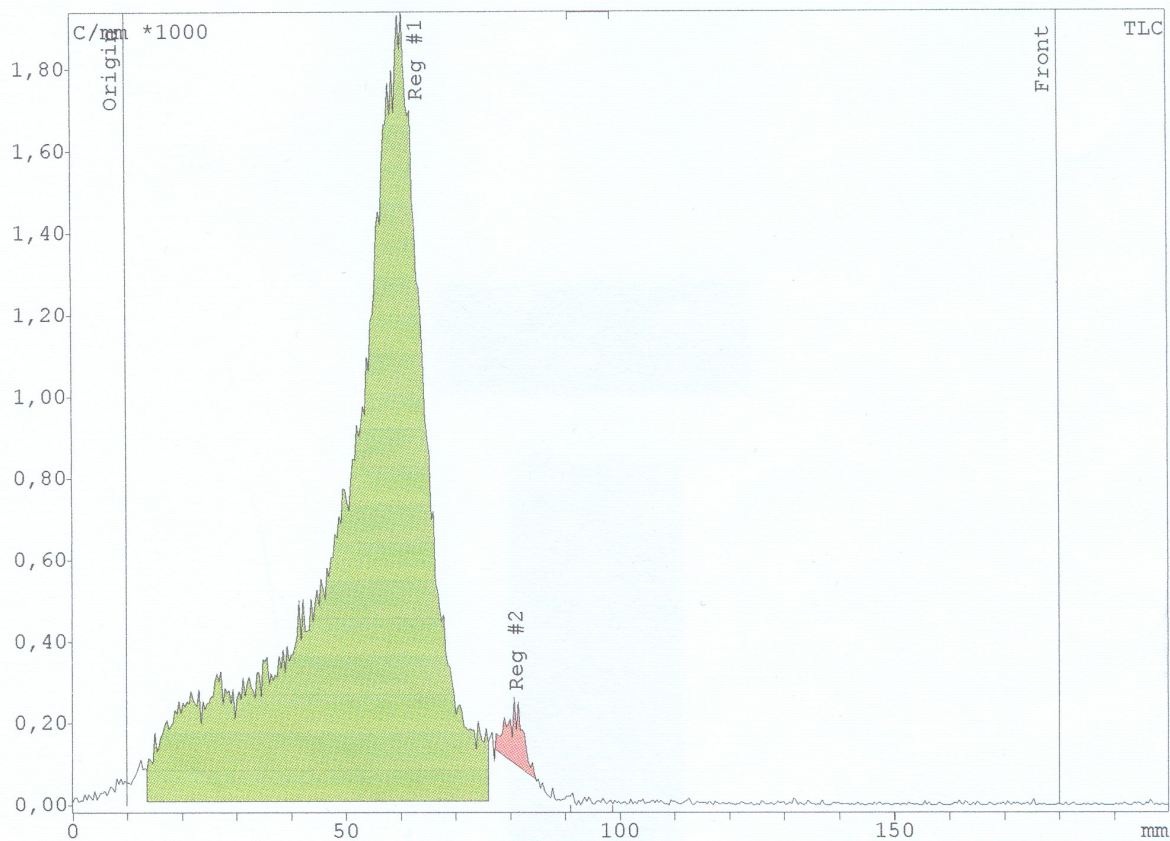
Sample description

Measurement: In-MG48 acet-met.rta, started: 28.5.2010 8:10
 Method: In111
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 High voltage: 1615,0 V
 Radio detector: raytest RITA

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,056	0,59	DD	222,87	0,58
Reg #2	0,306	101,22	DD	37997,32	99,42
Sum in ROI				38220,19	
Total area				37540,16	
Area RF				37900,94	
BKG1				13,460	
Remainder RF				-319,26	-0,84
Remainder (Tot)				-680,03	-1,81

Ilustrace 36: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 48 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 0 h)



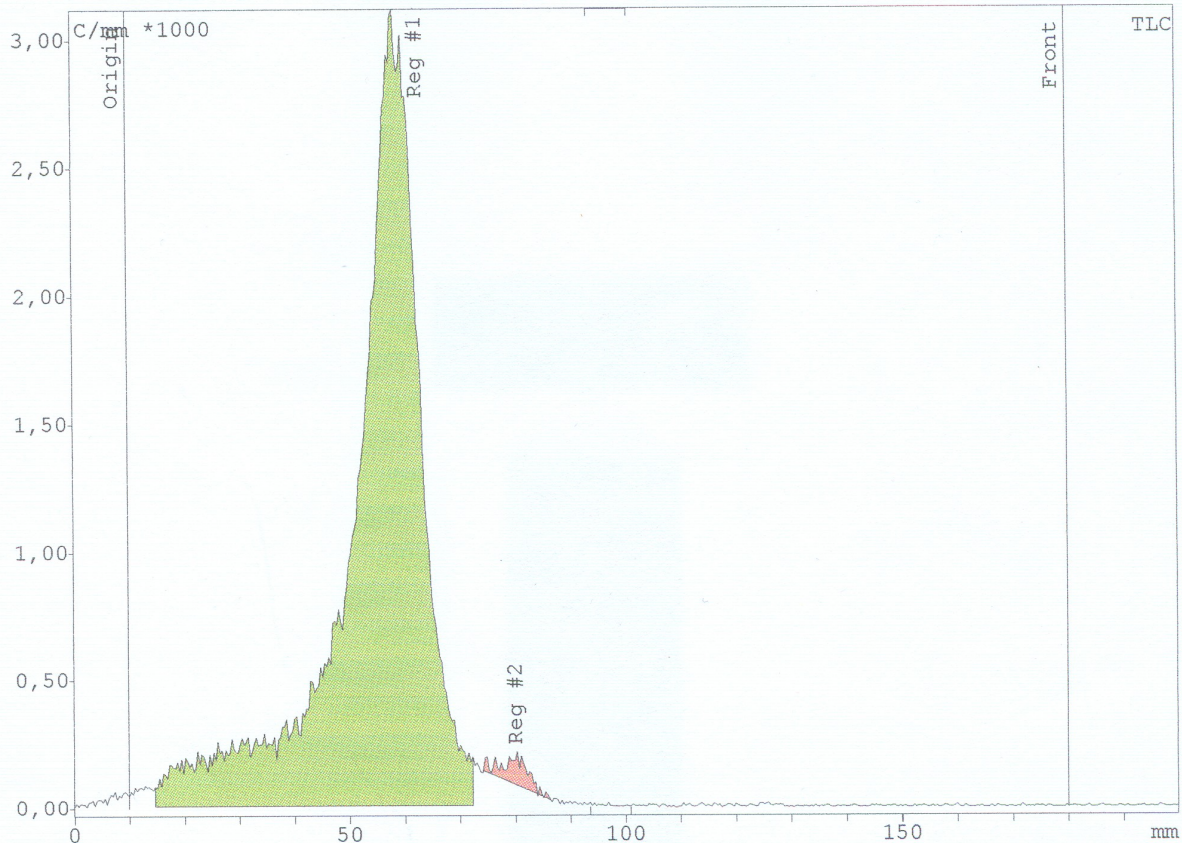
Sample description

Measurement: MG 48 amon-met.rta, started: 28.5.2010 8:22
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,295	96,60	DD	35167,57	98,55
Reg #2	0,416	1,42	BB	517,45	1,45
Sum in ROI				35685,03	
Total area				36404,71	
Area RF				36372,57	
BKG1				10,130	
Remainder RF				687,55	1,89
Remainder (Tot)				719,69	1,98

Ilustrace 37: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 48 metodou ITLC-SG (0,1M octan amonný s 10mM EDTA, v čase t = 0 h)



Sample description

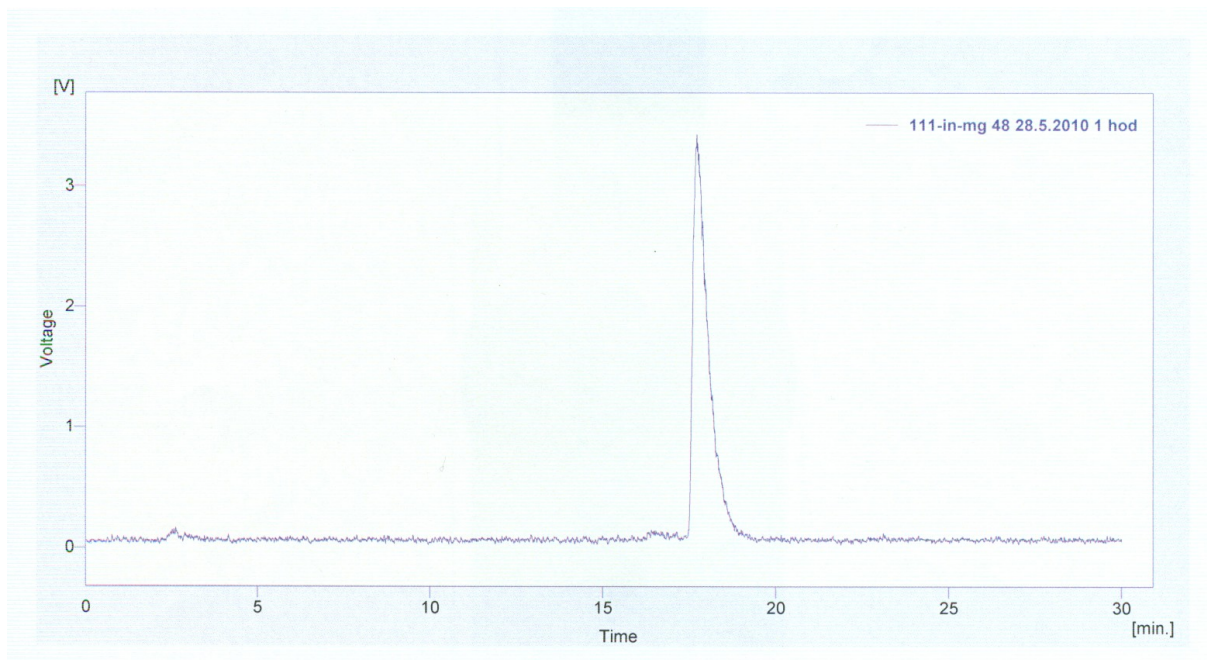
Measurement: In MG48 amon-acet.rta, started: 28.5.2010 11:49
 Method: In111 from: 1.1.2000
 Origin: 10 mm Front 180 mm
 Meas. time: 1,0 min Resolution: 0,4 mm
 Radio detector: raytest Ramona-90

Integration TLC

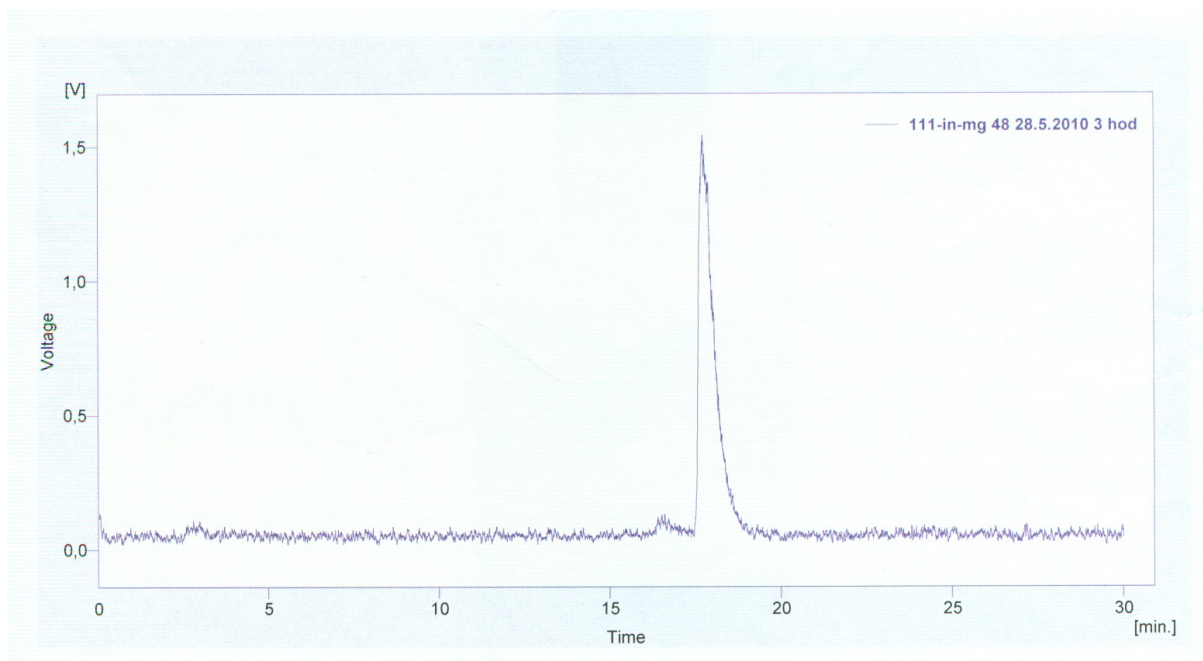
Substance	R/F	%Total	Type	Area	%Area
		%		Counts	%
Reg #1	0,282	95,28	DD	43828,55	98,59
Reg #2	0,409	1,36	BB	627,57	1,41
Sum in ROI				44456,12	
Total area				45997,75	
Area RF				45866,60	
BKG1				7,773	
Remainder RF				1410,48	3,08
Remainder (Tot)				1541,63	3,35

Ilustrace 38: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 48 metodou ITLC-SG (10% octan amonný + methanol, v čase t = 3 h)

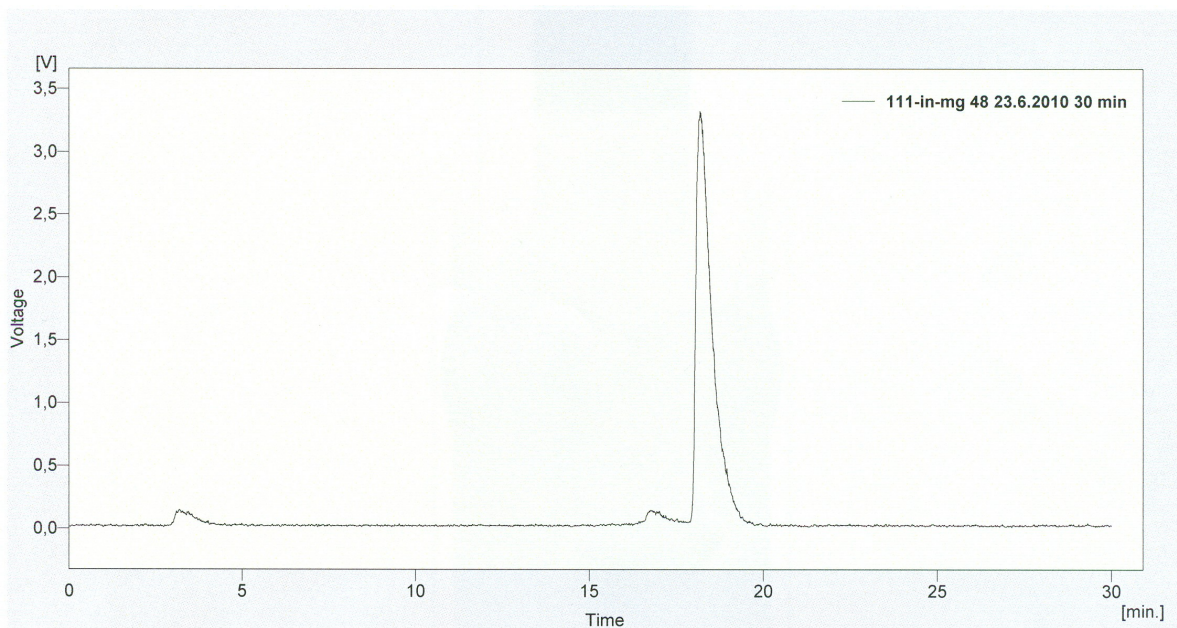
6.3.3 Měření radiochemické čistoty minigastrinu 48 pomocí metody HPLC



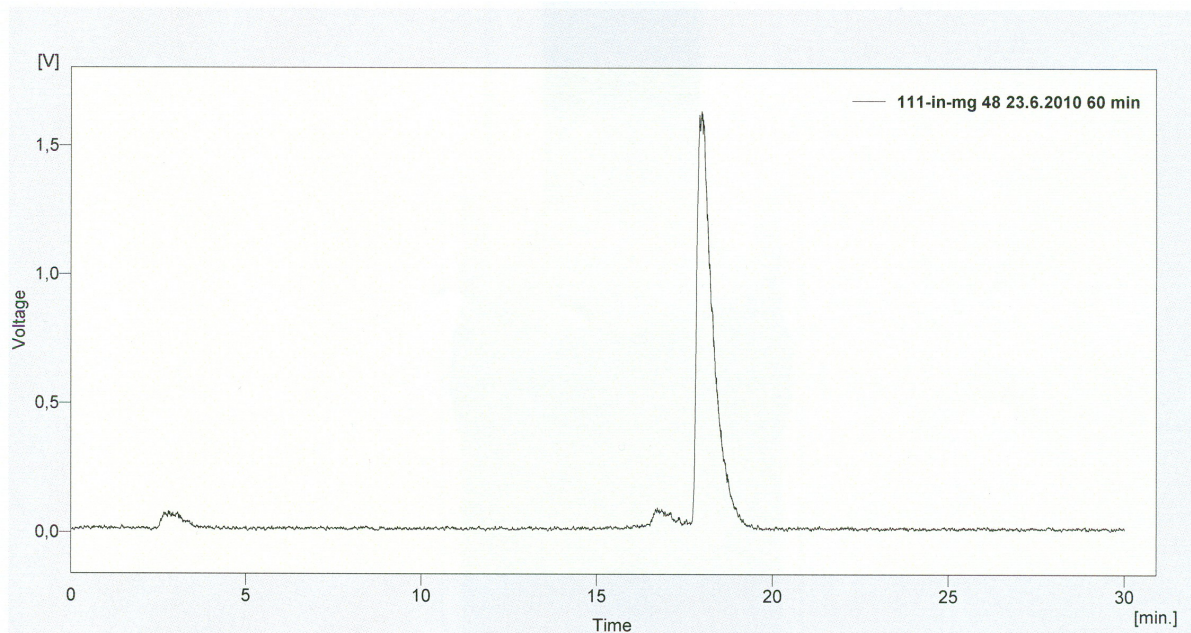
Ilustrace 39: Výsledek měření čistoty $^{111}\text{InMG}$ 48 metodou HPLC v čase $t = 1$ h



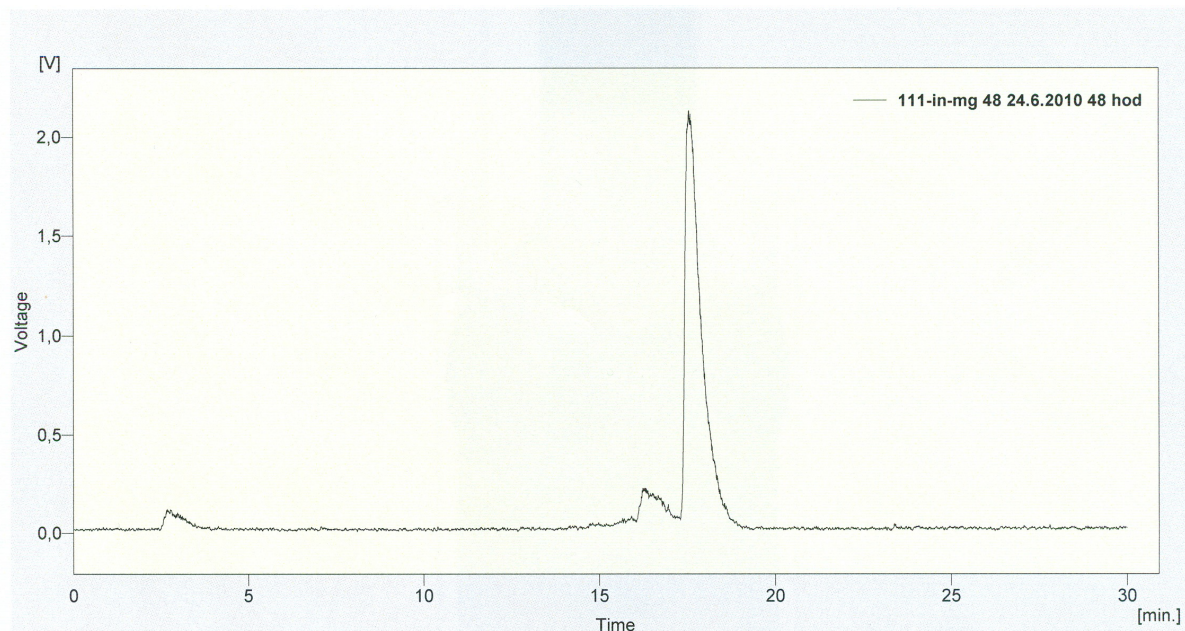
Ilustrace 40: Výsledek měření čistoty $^{111}\text{InMG}$ 48 metodou HPLC v čase $t = 3$ h



Ilustrace 41: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 48 metodou HPLC v čase $t = 30$ min



Ilustrace 42: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 48 metodou HPLC v čase $t = 1$ h



Ilustrace 43: Výsledek měření čistoty ¹¹¹InMG 48 metodou HPLC v čase t = 48 h

7 Diskuse

Radioaktivně značené deriváty gastrinu, označované jako minigastriny, představují novou skupinu receptorově-specifických peptidů, které pravděpodobně mají vedle somatostatinových derivátů velký potenciál využití při radioterapii nádorových onemocnění. Tyto peptidy vykazují malou stabilitu, naopak jejich výhodou je vysoká afinita k jiným typům receptorů, než vykazují somatostatinové deriváty, a tedy i k jiným, častěji se vyskytujícím typům nádorů. Pro vyzkoušení a studium jejich radioaktivního značení jsme zvolili jako dodavatele těchto peptidů firmu PiChem se sídlem v Grazu v Rakousku, kde je možné si za velmi rozumnou cenu nechat syntetizovat různé peptidové sekvence modifikované různými typy chelátorů podle zamýšleného radioaktivního značení.

Jako peptidové sekvence jsme zvolili tři minigastriny se základní receptorově-specifickou strukturou (Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) lišící se sekvencí ve spaceru, do kterých byly z důvodu zvýšení stability *in vivo* zabudovány D-aminokyseliny:

MG 46

DOTA-D-Gln-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

MG 47

DOTA-D-Gln-D-Gln-D-Gln-D-Gln-D-Gln-D-Gln-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

MG 48

DOTA-D-Glu-D-Glu-D-Glu-D-Glu-D-Glu-D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Poslední uvedená sekvence (minigastrin 48) vykazuje kvůli šesti zbytkům glutamové kyseliny (D-Glu) podstatně sníženou rozpustnost ve vodě, což jsme vyřešili při rozpouštění mírným zalkalizováním roztoku přídatkem malého množství hydroxidu amonného.

Pro vazbu v současnosti nepoužívanějších terapeutických kovových radionuklidů ¹⁷⁷Lu a ⁹⁰Y se ukazuje jako nejvhodnější uzavřený cyklický komplexan DOTA, který tvoří s uvedenými kovy velmi pevné termodynamicky stabilní cheláty. Pevná vazba radiokovu do komplexu je u radioterapeutik základním požadavkem. Při nedostatečném navázání radiokovu do komplexu tento volný trojmocný radionuklid následuje při intravenózním podání distribuci iontů železa do kostní dřeně. Pokud by byl pacientovi intravenózně podán peptid značený těmito kovy s malou radiochemickou čistotou nebo s malou stabilitou vazby radiokovu, může dojít k poškození krevetvorby. Z hlediska koordinační chemie je těmto trojmocným kovům velmi podobné indium, jehož izotop - elektronozáchytové ¹¹¹In se používá jako diagnostický

zářič. Tento radionuklid byl proto, ale také díky své nižší ceně, zvolen pro značení minigastrinů modifikovaných chelátorem DOTA.

Pro radioaktivní značení námi vybraných peptidů radionuklidem ^{111}In byla zvolena klasická metoda značení prováděná v silně koncentrovaném acetátovém pufru při teplotě blízké se bodu varu vody, která se běžně používá pro značení somatostatinových derivátů trojmocnými radiokovy. Metodu jsme pouze mírně upravili, použitá teplota byla o něco málo vyšší (95°C) a zahřívací interval byl o 5 minut delší (30 minut) než v případě značení derivátů somatostatinu.

Všechny studované peptidy se podařilo úspěšně radioaktivně označit zvoleným radionuklidem. Výsledná radiochemická čistota stanovená tenkovrstvou chromatografií v soustavě 10% octanu amonného s methanolem a v soustavě 10% hydroxidu amonného s methanolem byla v případě minigastrinu 46 vyšší než 99% a peptid byl při daném způsobu uchování stabilní až do 26 hodin od přípravy. Tento výsledek potvrdila i analýza pomocí HPLC.

V případě minigastrinu 47 jsme použili kromě dvou předchozích soustav ještě tenkovrstvou analýzu v soustavě 0,1M octan amonný s 10mM EDTA. Radiochemická čistota v tomto prostředí byla v rozmezí 93% - 98%. Této hodnotě ale bohužel neodpovídala radiochemická čistota stanovená v soustavě 10% octan amonný – methanol, kde byla stanovená radiochemická čistota vyšší (kolem 99%). Analýza pomocí HPLC odpovídala nižší stanovené radiochemické čistotě.

Minigastrin 48 byl měřen v soustavě 10% octanu amonného a methanolu, kde stanovená radiochemická čistota byla více než 99%, a v soustavě 0,1M octanu amonného s 10mM EDTA. Zjištěná radiochemická čistota zde byla opět trochu nižší – 98%. HPLC analýza potvrzuje nižší radiochemickou čistotu tohoto ^{111}In značeného peptidu.

Z porovnání jednotlivých způsobů analýzy radiochemické čistoty značených minigastrinů je možno konstatovat, že nejprůkaznější metodou je HPLC analýza, u níž ale program neumožnil, kvůli tvaru pozadí, integraci píků a určení procentuálního zastoupení jednotlivých přítomných forem aktivity. Další z použitých technik, která odpovídá výsledkům HPLC analýzy, je metoda měření v soustavě 0,1M octanu amonného a 10mM EDTA, která umožňuje stanovení obou forem volného india (tedy koloidu i jako iontové formy) v jednom píku. Další průkaznou metodou je soustava 10% hydroxidu amonného s methanolem, kdy lze stanovit koncentraci koloidní formy. Tenkovrstvá chromatografie v soustavě 10% octan

amonný – methanol má zřejmě nejmenší vypovídací hodnotu z hlediska dělení jednotlivých forem aktivity. Rozdíly ve stanovené radiochemické čistotě například mezi touto metodou a HPLC analýzou jsou pravděpodobně dány chováním volného radiokovu, který je v této soustavě, díky přítomné vysoké koncentraci acetátu, stabilizován v iontové formě a putuje současně se značeným peptidem s čelem rozpouštědla. Podle očekávání by měl radiokov zůstat hydrolyzovaný ve formě sraženiny, a to z důvodu vysoké koncentrace methanolu v této mobilní fázi.

8 Shrnutí závěrů práce

- 1) Byl vypracován přehled současných poznatků o receptorově-specifických peptidech, rovněž byl nastíněn jejich význam pro biodistribuční studie a klinický výzkum.
- 2) Bylo provedeno úspěšné radioaktivní označení tří receptorově-specifických peptidů ze skupiny derivátů gastrinu modifikované pomocí chelátoru DOTA radionuklidem ^{111}In .
- 3) Byla stanovena radiochemická čistota značených receptorově-specifických peptidů HPLC analýzou a potvrzena metodou tenkovrstvé chromatografie, která byla provedena v několika soustavách.
- 4) V případě minigastrinu 46 byla stanovena i stabilita produktu při uchovávání při 4°C . Peptid vykazoval při daném způsobu uchovávání stabilitu minimálně 26 hodin od přípravy.
- 5) Při porovnání dvou separačních metod pro analýzu radiochemické čistoty značených minigastrinů je možno konstatovat, že nejprůkaznější metodou je HPLC analýza. Metoda tenkovrstvé chromatografie v soustavě 0,1M octan amonný a 10mM EDTA odpovídá výsledkům získaných HPLC analýzou. Průkaznou metodou je rovněž soustava 10% hydroxidu amonného s methanolem.

9 Seznam použité literatury

- [1] Radiofarmaka a jejich uplatnění v nukleární medicíně jednička v diagnostice in vivo pomocník v terapii. *Číselník IVLP* [online]. 2000, podskupina 13, [cit. 2010-10-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.vzp.cz/cms/internet/cz/Lekari/Ciselniky/630/IVLP/radiofarmaka.html>>.
- [2] LÁZNÍČEK, Milan ; KOMÁREK, Pavel . *Základy radiofarmacie*. Vyd.1. Praha : Karolinum, 1998. Příprava radiofarmak, s. 27-29, 36-39, 42, 72 ISBN 80-7184-781-X.
- [3] KRAFT, Otakar. *Základy radiofarmacie - definice a přehled radiofarmak, způsob přípravy, uskladňování a kontroly radiofarmak pro vyšetření a léčbu v NM*. [online]. 2007, [cit. 2010-10-5]. Dostupný z WWW: <http://eng.fno.cz/documents/2007_06_28_006.pdf>.
- [4] ZWANZIGER, D.; BECK-SICKINGER, A.G. Radiometal targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones. *Current Pharmaceutical design*. 2008, 14, 24, s. 2385-2400.
- [5] *Vitalion* [online]. 2010 [cit. 2010-11-02]. Scintigrafie. Dostupné z WWW: <<http://vysetreni.vitalion.cz/scintigrafie/>>.
- [6] SCHMITT, Michal. Pozitronová emisní tomografie. *3.pól* [online]. 28.02.2004, 4, 1/2004, [cit. 2010-11-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.tretpol.cz/download/12/13.pdf>>.
- [7] *Nemocnice Na Homolce* [online]. c2010 [cit. 2010-11-02]. CT-výpočetní (počítačová) tomografie. Dostupné z WWW: <<http://www.homolka.cz/cs-CZ/oddeleni/radiodiagnosticke-oddeleni-rdg/vysetrovaci-a-intervencni-metody/ct-vypocetni-pocitacova-tomografie.html>>.
- [8] AKIZAWA, Hiromichi; UEHARA, Tomoya; ARANO, Yasushi. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Advanced drug delivery reviews*. 2008, 60, s. 1319-1328.
- [9] ROOSENBERG, Susan, et al. Radiolabeled CCK/gastrin peptides for imaging and therapy of CCK2 receptor-expressing tumors. *Amino Acids*. 2010, 38, 3, s. 1-10.
- [10] GOOD, Stephan, et al. Macrocyclic chelator - coupled gastrin - based radiopharmaceuticals for targeting of gastrin receptor - expressing tumours. *The Journal of nuclear medicine* . 2008, 35, s. 1868-1877
- [11] BUSCOMBE, John R. Radiopeptides from diagnosis to therapy. *Brazilian archives of biology and technology*. 2002, 45, s. 91-96. ISSN 1516-8913
- [12] REUBI, Jean Claude. Targeting CCK receptors in human cancers. *Current topics in medicinal chemistry*. 2007, 7, 12, s. 1239-1242.

- [13] VEGT, Erik, et al. Reducing renal uptake of radiolabeled peptides using albumin fragments. *The Journal of nuclear medicine*. 2008, 49, 9, s. 1506-1511.
- [14] GUGGENBERG, Elisabeth, et al. Cyclic minigastrin analogues for gastrin receptor scintigraphy with technecium - 99m: Preclinical evaluation. *Journal of medicinal chemistry* . 2009, 52, 15, s. 4786-4793.
- [15] KING, Robert, et al. ^{99m}Tc-HYNIC-Gastrin peptides: Assisted coordination of ^{99m}Tc by amino acid side chains results in improved performance both in vitro and in vivo. *The Journal of nuclear medicine*. April 2009, 50, 4, s. 591-598.
- [16] NOCK, Berthold A., et al. CCK - 2 / gastrin receptor - targeted tumor imaging with ^{99m}Tc - labeled minigastrin analogs. *The Journal of nuclear medicine*. October 2005, 46, 10, s. 1727-1736.
- [17] LAVERMAN, Peter, et al. Two technetium - 99m - labeled cholecystokinin - 8 (CCK8) peptides for scintigraphic imaging of CCK receptors. *Bioconjugate Chem.*. 2004, 15, 3, s. 561-568.
- [18] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. Kapalinová chromatografie, s. 25-26.
- [19] KARLÍČEK, Rolf, et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha : Karolinum, 2007. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC), s. 276-281.
- [20] ZÝKA, Jaroslav, et al. *Analytická příručka*. Praha : Nakladatelství technické literatury, 1973. Chromatografie na tenké vrstvě adsorbentu, s. 92-94.
- [21] *Výukové materiály* [online]. Praha: 3. LF UK, 15.9.2004 [cit. 2010-11-09]. Chromatografie. Dostupné z WWW: <http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc>.
- [22] *Krackeler Scientific Inc.* [online]. 2009 [cit. 2010-11-05]. Gelman ITLC™ Media. Dostupné z WWW: <<http://www.krackeler.com/products/1375-supplies/23123-Gelman-ITLC-Media>>.
- [23] ULLMANN, Vojtěch. *Jaderná fyzika a fyzika ionizujícího záření* [online]. 2002 [cit. 2011-01-03]. Detekce a spektrometrie ionizujícího záření. Dostupné z WWW: <<http://astronuklfyzika.cz/DetekceSpektrometrie.htm>>.
- [24] KLIMEŠ, Jiří, et al. *Kontrola léčiv I.* Praha : Karolinum, 2008. Důkazy léčiv pomocí fyzikálních a fyzikálně chemických metod, s. 27-28.
- [25] BEHR, Thomas M., et al. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1998, 4, s. 424 - 430.

- [26] ALOJ, Luigi, et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of ^{111}In -DTPAGlu-G-CCK8 for Cholecystokinin-B Receptor Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2004, 3, s. 485 - 494.
- [27] *Nuclear Medicine, PET & Bone Densitometry* [online]. 2009 [cit. 2011-03-24]. Positron Emission Tomography (PET) - General information. Dostupné z WWW: <http://www.rah.sa.gov.au/nucmed/PET/pet_info.htm>.
- [28] YANG, David J.; AZHDARINIA, Ali; KIM, Edmund E. Tumor specific imaging using Tc-99m and Ga-68 labeled radiopharmaceuticals. *Current Medical Imaging Reviews*. 2005, 1, s. 25-34.
- [29] SCHULTZ, Michael .K, et al. Development of Gallium-68 Labeled Neuropeptide Analogs for Imaging NET by Positron Emission Tomography. *Pancreas*. 2010, 39, s. 275-280
- [30] HOFMANN, M, et al. Clinical application of radiopeptide receptor PET and PET/CT in sstr2 positive tumors. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2006, 47, s. 444.
- [31] LE BARS, Didier. Fluorine-18 and medical imaging: Radiopharmaceuticals for positron emission tomography. *Journal of Fluorine Chemistry*. 2006, 127, s. 1488-1493.
- [32] SOSABOWSKI, Jane K; MATHER, Stephen J. Conjugation of DOTA-like chelating agents to peptides and radiolabeling with trivalent metallic isotopes. *Nature protocols*. 2006, 1, 2.
- [33] VEGT, Erik, et al. Albumin-derived peptides efficiently reduce renal uptake of radiolabelled peptides. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2009, 37, s. 226-234.
- [34] FUCHSOVÁ, Hana . *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi* [online]. Brno, 2007. 16 s. Referát. Masarykova univerzita v Brně. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/195604/prif_b/Samostatny_projekt_HPLC.pdf>.