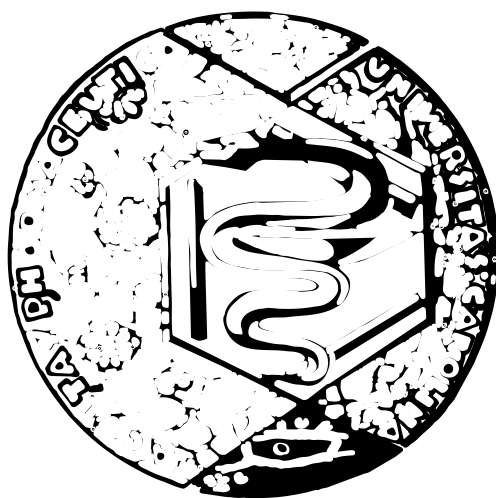


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Značení DOTA-Tyr(3)-oktreotátu oxidativní jodací

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

Hradec Králové 2007

Klára Tvrdíková

Děkuji Doc. Ing. Alici Lázníčkové, Csc. za odborné vedení a pomoc a dále všem, kteří byli nápomocni vypracování této diplomové práce.

1 Obsah

1. OBSAH	3
2. CÍL PRÁCE	5
3. TEORETICKÁ ČÁST	6
3.1 Úvod	7
3.2 Somatostatin	8
3.2.1 Vlastnosti	8
3.2.2 Využití	8
3.2.3 Analogy somatostatínu	9
3.3 Vývoj receptorově značených analogů somatostatínu v nukleární medicíně	12
3.3.1 Receptory somatostatínu	12
3.3.2 Radioaktivně značené peptidy v diagnostice	13
3.3.3 Radioaktivně značené peptidy v terapii	16
3.4 Teorie jodace	18
3.4.1 Radionuklidy jódu	18
3.4.2 Metody značení radioaktivním jódem	18
3.4.2.1 Nukleofilní substituce	19
3.4.2.2 Elektrofilní substituce	19
3.4.2.2.1 Oxidační činidla	20
3.4.2.2.2 Přímá elektrofilní jodace	23
3.4.2.2.3 Nepřímá elektrofilní jodace	24
3.4.2.3 Značení makromolekul radioaktivním jódem	25
3.4.2.3.1 Přímá jodace proteinů	25
3.4.2.3.2 Nepřímá jodace proteinů	27
3.5 Separační metoda Sep-Pak	31
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1 Materiály a přístroje	33
4.1.1 Přístroje	33
4.1.2 Chemikálie	33
4.2 Metodika	34
4.2.1 Označení DOTA-Tyr ³ -octreotátu izotopem jódu	34
4.2.1.1 Vlastní značení	34
4.2.1.2 Separace značeného peptidu pomocí HPLC	34
4.2.1.3 Stabilita DOTA-I ¹²⁵ -Tyr ³ -octreotátu	35
4.2.1.4 Separace značeného peptidu pomocí SPE	35
4.2.1.5 Farmakokinetická studie	36
4.3 Výsledky	37
5 DISKUSE	49
6 ZÁVĚR	52
7 SEZNAM LITERATURY	54

2 Cíl práce

- Prostudovat literaturu týkající se receptorově specifických peptidů ze skupiny somatostatinových derivátů a možnosti jejich použití v nukleární medicíně.
- Prostudovat způsoby radioaktivního značení peptidů jódem.
- Připravit radioaktivně značený derivát somatostatinu DOTA-Tyr³-octreotát metodou oxidativní jodace.

3 Teoretická část

3.1 Úvod

Nukleární medicína je významným lékařským oborem, který využívá radioaktivních izotopů ve formě radiofarmak k diagnostickým i léčebným účelům. Nukleární medicína je založena na podání radiofarmaka, což může být anorganická nebo organická sloučenina se záměrně včleněným radionuklidem, který je zdrojem ionizujícího záření, nebo také může jít o značené krevní buňky. Umožňuje získávat informace nejen o anatomické a morfológické struktuře, ale hlavně také o kinetice, orgánové distribuci, metabolismu a vylučování aplikovaných sloučenin. Významné je využití radioaktivně značených látek v onkologii.

Asi před 20 lety se v onkologii zdálo být velmi nadějně pro diagnostiku a léčbu nádorů využití specifických monoklonálních protilátek proti nádorovým buňkám. Nakonec se však jejich klinické použití setkalo s obtížemi, a to zejména pro jejich velké molekulové hmotnosti (150 kDa). Nevýhodou také bylo, že proti aplikovaným protilátkám, které jsou myšího původu, vznikají v organismu pacientů jako proti cizorodé bílkovině protilátky proti myším imunoglobulinům (tzv. HAMA). Ty při opakovaném vyšetření mohou zkreslovat výsledky imunoscintigrafie a vyvolávat alergickou reakci. Později se ukázaly být vhodnou alternativou k radioaktivně značeným protilátkám malé radioaktivně značené peptidy (1,5 kDa). Vysoká úroveň exprese peptidových receptorů na různých nádorových buňkách v porovnání s normálními tkáněmi a také výhodnější farmakokinetické vlastnosti daly základ pro jejich využití v nukleární medicíně. Využitím radioaktivního značení byly vyvinuty metody umožňující jednak vizualizaci primárních nádorů a metastáz a následně také jejich terapii. Označený peptid totiž přenese radioaktivní izotop přímo do rakovinných buněk (1, 2).

Pro tento účel byly zkoumány a testovány radioaktivně značené analogy různých peptidových hormonů, např. alfa-melanocyty stimulující hormon, neurotensin, vasoaktivní intestinální peptid, bombesin, substance P, gastrin a cholecystokinin. Nejčastěji využívaným se však stal somatostatin a zejména pak jeho analogy (3).

3.2 Somatostatin

3.2.1 Vlastnosti

Somatostatin je peptidový hormon, který se nachází v centrálním nervovém systému i

periferních tkáních. Existují dvě biologicky aktivní formy somatostatinu skládající se ze 14 (SS-14) a 28 (SS-28) aminokyselin, které vznikají proteolytickým štěpením z větších prekurzorů (4).

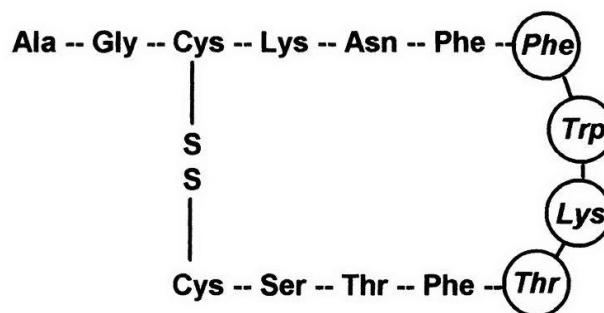
Somatostatin je v trávicím ústrojí produkován sekrečními buňkami enterické oblasti a zejména pak D-buňkami endokrinního pankreatu. Jeho hlavním účinkem v trávicím ústrojí je inhibice uvolňování glukagonu a inzulínu z pankreatu a výdeje většiny gastrointestinálních hormonů, redukuje kyselou gastrickou sekreci a má i mírné antiproliferativní účinky. Snižuje také žilní průtok splachnickou oblastí, čehož se využívá při léčbě akutního krvácení z gastroduodenálního vředu a u erozivních gastritid.

Somatostatin se rovněž tvoří v hypothalamu a dalších částech CNS („somatotropin-release-inhibiting factor“, SRIF). Tady na nejrůznější stimuly snižuje uvolňování růstového hormonu z předního laloku hypofýzy a také vyvolává pokles koncentrace tyreotropinu (5).

3.2.2 Využití

Klinické použití samotného somatostatinu je limitováno jeho velmi krátkým poločasem po parenterálním podání (2-3 min), proto se musí aplikovat kontinuální nitrožilní infúzí. Výhodnější farmakokinetické vlastnosti mají syntetické analogy somatostatinu, mezi něž patří především octreotid a lanreotid. Jde o dlouhodobě působící analogy s vyšší afinitou k receptorům, vyšší účinností a delším eliminačním poločasem.

Octreotid má širší indikace než somatostatin. Používá se k léčbě symptomů způsobených nadprodukcí hormonů neuroendokrinních nádorů (nádor secernující vasoaktivní intestinální peptid, karcinoidní tumor, glukagonom a pituitární adenom).



Je významným lékem pro terapii akromegalie, kde i při perorálním podávání signifikantně snižuje produkci růstového hormonu. Rovněž se uplatňuje při krvácení z ezofageálních varixů (5).

Zjištění, že řada nádorových buněk má na svém povrchu receptory pro somatostatin, vedlo k využití radioaktivně značených analogů somatostatinu pro jejich zobrazení - scintigrafií. Jedná se o citlivou a specifickou techniku vizualizace nádorů zejména neuroendokrinního původu a jejich metastáz. Dalším krokem pak bylo značení peptidů radionuklidy, které emitují α - nebo β - částice, a jejich využití pro receptorově zprostředkovanou terapii PRRT (peptide receptor radionuclide therapy).

3.2.3 Analogy somatostatinu

Jak již bylo zmíněno, klinické využití somatostatinu je díky jeho rychlé degradaci v organismu značně obtížné. Byla proto snaha najít nové obměněné sloučeniny, které by byly vůči těmto proteolytickým enzymům odolnější a přitom si zachovaly co nejvíce biologické aktivity originální molekuly.

Zkrácením molekuly na 8 aminokyselin a zavedením D-aminokyselin vznikly využívané somatostatinové analogy jako je octreotid, lanreotid a vapreotid (RC-160). Vyšší odolnosti vůči peptidázám bylo také dosaženo obměnou karboxylové skupiny na C-konci peptidu za vzniku amidu. V případě octreotidu šlo o redukci aminokyseliny threoninu a vzniku alkoholové skupiny (6).

Octreotid **D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)**

Lanreotid **β -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂**

β -Nal = beta-naphtyl

Vapreotid **D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂**

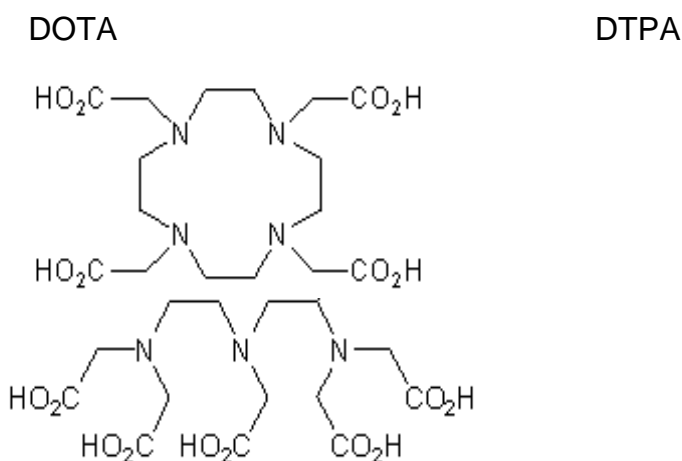
Pro využití v nukleární medicíně pak byly objeveny další analogy s výhodnějšími vlastnostmi, jako je lepší biodistribuce, vyšší vychytávání nádorovou tkání, afinita k některým typům somatostatinových receptorů, schopnost vázat určité radionuklidy. Mezi takové analogy patří např. [D-Phe¹, Tyr³]-octreotid a [Tyr³]-octreotát.

[Tyr³]octreotid **D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)**

[Tyr³]octreotát **D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-(OH)**

[Tyr³]-octreotid vznikl náhradou fenylalaninu v poloze 3 tyrosinem, tím došlo ke zvýšení polarity a umožnění radiojodace. U [Tyr³]-octreotátu byl dále threoninol na C-konci zaměněn za aminokyselinu threonin, čímž se prohloubilo buněčné vychytávání a zvýšením negativního náboje se ovlivnila clearance (6).

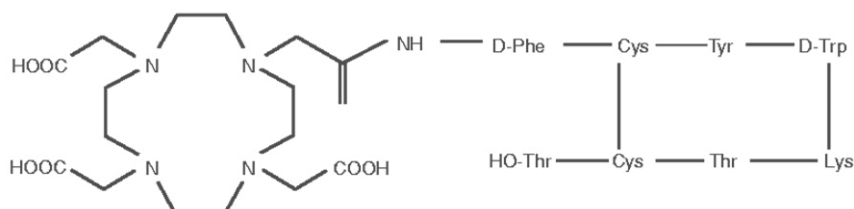
Pro vazebnou afinitu k somatostatinovým receptorům, zadržení radionuklidu cílovou buňkou bylo významné zavedení chelatačního činidla do molekuly. Připojením chelatonu ke sloučenině bylo umožněno pevně vázat radioizotopy kovů. Také se zlepšil biodistribuční profil a hlavní cestou exkrece se staly ledviny namísto vylučování gastrointestinálním traktem. Těmito chelátory jsou DTPA = diethylen-triamin-pentaoctová kyselina a DOTA = 1,4,7,10-tetraaza-cyklododekan-N',N'',N''',N''''-tetraoctová kyselina. K somatostatinovému analogu jsou nejčastěji vázány amidovou vazbou (2, 7).



Byly zkoumány různé analogy somatostatinu modifikované DTPA nebo DOTA chelatonem (3):

DTPAOC	DTPA-octreotid
DTPATATE	DTPA-[Tyr ³]-octreotát
DOTAOC	DOTA-octreotid
DOTATOC	DOTA-[Tyr ³]-octreotid
DOTAVAP	DOTA-vapreotid
DOTALAN	DOTA-lanreotid
DOTATATE	DOTA-[Tyr ³]-octreotát

DOTA-Tyr³-octreotát



DOTA-Tyr³-octreotát je významným somatostatinovým analogem, který je ve velké míře vychytáván nádorovou tkání bohatou na somatostatinové receptory. Je to zejména díky jeho vysoké afinitě k somatostatinovému subtypu receptoru sst2, který je často zastoupen. Vyznačuje se rychlou clearance z krve a rychlým vychytáváním receptorově pozitivními tkáněmi. Výhodná je nižší akumulace aktivity v játrech, slezině a ledvinách. Hlavní exkreační cestou je glomerulární filtrace v ledvinách.

Tento peptid může být značen různými radioaktivními izotopy s odlišnými vlastnostmi a podle toho pak může být využit v nukleární medicíně k diagnostickým nebo terapeutickým účelům.

Jódem značený DOTA-Tyr³-octreotát však snadněji v organismu podléhá degradačním procesům. To může ovlivnit kvalitu vyšetření, protože produkty této degradace mohou zvýšit radioaktivitu v pozadí. Také jsou ve větší míře vylučovány

hepatobiliárním systémem, čímž dochází k vyšší jaterní a intestinální akumulaci radioaktivity, to může zkreslit lokalizaci nádorů a metastáz v abdominální oblasti (8).

3.3 Vývoj receptorově značených analogů somatostatinu v nukleární medicíně

Využití značených peptidů v nukleární medicíně je založeno na jejich afinitě k peptidovým receptorům. Značené peptidy jsou pak tkáněmi s vysokou hustotou těchto receptorů vychytávány.

3.3.1 Receptory somatostatinu

Somatostatinové receptory se nachází ve zdravé tkáni centrální nervové soustavy, gastrointestinálního traktu, na buňkách neuroendokrinního původu, ale i na jiných buňkách jako např. lymfocytech. Pro využití v nukleární medicíně však bylo důležité objevení podstatně vyšší koncentrace somatostatinových receptorů na nádorových buňkách. Jedná se zejména o gastroenteropankreatické tumory, hypofyzární adenom, paragangliom, feochromocytom, malobuněčný karcinom plic, medulární thyroïdní karcinom, ale také nádor prsu nebo maligní lymfom (9).

Strukturálně tyto receptory patří do skupiny s G-proteinem spojených receptorů charakterizované sedmi transmembránovými doménami. Extracelulární část je zodpovědná za navázání ligandu, intracelulární pak přenáší signál do buňky, který tu ovlivňuje různé intracelulární efektorové systémy.

Pomocí různých studií bylo rozlišeno 5 subtypů somatostatinových receptorů, ty byly pojmenovány chronologicky podle objevení sst1-5. Každý subtyp receptoru je kódován jedním genem a každý gen je umístěn na různém chromozómu, což umožňuje orgánově specifickou regulaci jejich exprese a naznačuje rozmanitou funkci v různých orgánech (4, 6).

Většinou se všechny subtypy receptorů nachází současně, ale jejich zastoupení se u různých nádorů může také lišit. Ukázalo se, že u neuroendokrinních nádorů je nejčastěji se vyskytujícím receptorem sst2, zatímco u ostatních jsou

v převaze jiné. Například u intestinálního adenokarcinomu je častější spíše sst3 nebo sst4 (10).

Zatímco se somatostatin váže ke všem 5 subtypům receptorů se stejně nebo podobně vysokou afinitou, afinita somatostatinových analogů se značně liší, a tak bylo důležité stanovit afinitní profil jednotlivých radioligandů. Ukázalo se, že i malá strukturální obměna, substituce, například chelátorem nebo výměna radionuklidu může mít značný efekt na vazebnou afinitu (11).

Například octreotid si jako metabolicky stabilní analog somatostatinu zachoval vysokou afinitu k receptorovým subtypům sst2 a sst5, k receptoru sst3 zůstala středně vysoká, ale obměna molekuly oproti somatostatinu vedla ke ztrátě afinity k subtypům receptorů sst1 a 4 (7, 12).

Pro využití radioaktivně značených peptidů v nukleární medicíně je kromě navázání ligandu na receptor důležitá také schopnost internalizace komplexu ligand-receptor do buňky. Je to důležité pro zadržení radioligandů v cílových buňkách, jinak radioaktivita nesetrvá v nádorové tkáni dostatečně dlouhou dobu a nemůže být využita k diagnostickým nebo terapeutickým účelům.

Schopnost internalizace jednotlivých receptorů, ale také schopnost různých analogů somatostatinu tento proces vyvolat, je různá. Např. po navázání ligandu na sst2 nebo sst3 je internalizace mnohem lepší (2, 6).

Je proto důležité při vývoji nových sloučenin zkoumat i tyto vlastnosti. Míru internalizace vyvolanou různými somatostatinovými analogy lze určit pomocí imunocytochemických metod (12).

3.3.2 Radioaktivně značené peptidy v diagnostice

Vysoká úroveň exprese peptidových receptorů na různých nádorových buňkách ve srovnání s normálními tkáněmi dává molekulární základ pro klinické využití radioaktivně značených peptidů v nukleární medicíně.

Scintigrafické zobrazování nádorů je velmi citlivou a specifickou technikou, která využívá značení peptidů pomocí radionuklidů γ zářičů, jako jsou např. ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, vhodný je také ^{111}In (EZ - γ). Toto γ záření prochází relativně snadno tkáněmi a může být následně zobrazeno pomocí γ -kamery.

Značených analogů somatostatinu lze využít k vizualizaci primárních nádorů a metastáz vyznačujících se vysokou hustotou somatostatinových receptorů, zejména se jedná o neuroendokrinní tumory, ale také meningiomy nebo meduloblastomy. Úspěšně byly také zobrazovány nádory s nižším nebo nehomogenním zastoupením somatostatinových receptorů jako nádor prsu, lymfomy nebo karcinom renálních buněk (2, 11).

Jako první radioaktivně značený analog somatostatinu byl v 80. letech k diagnostickým účelům použit stabilní jodovaný octapeptid ^{125}I - nebo ^{123}I -[Tyr³]octreotid. ^{123}I značený peptid však měl řadu nevýhod, jako cena, krátký poločas, vysoká akumulace radioaktivity v játrech, žlučníku a gastrointestinálním traktu, a také rychlejší uvolňování radiojodovaných peptidů z buněk, což způsobovalo nižší citlivost vyšetřovací metody.

Připojením chelatačního činidla (DTPA, DOTA) k molekule somatostatinového analogu se jednak zlepšil biodistribuční profil a hlavní cestou exkrece se staly ledviny namísto vylučování gastrointestinálním traktem, také se prodloužilo setrvání molekuly v buňce. Nejvíce využívaným analogem pro scintigrafické zobrazování se tak stal octreotid spojený s DTPA, chelátorem, který umožňuje pevně vázat radioizotop ^{111}In . Jde o [^{111}In -DTPA⁰]octreotid s komerčním označením OctreoScan, který je v současné době standardem pro odhalení nádorů pomocí scintigrafie (2, 4).

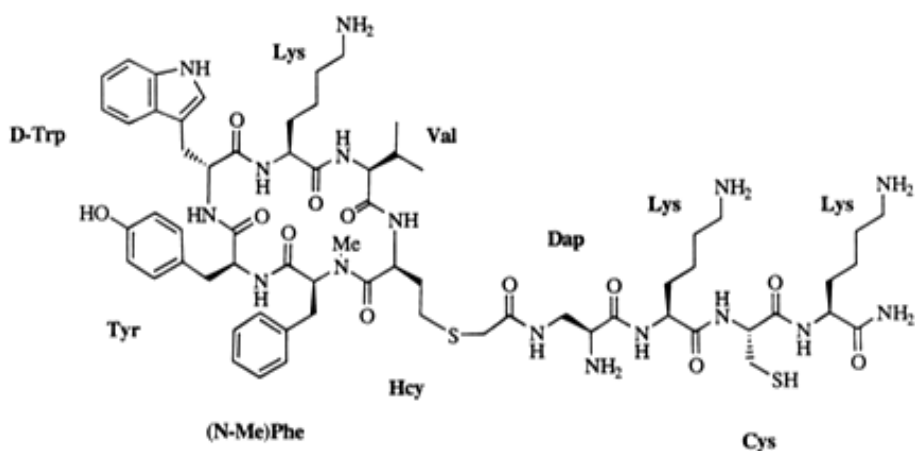
I přes dobré výsledky OctreoScanu byly pro scintigrafické zobrazení studovány i další somatostatinové analogy lišící se afinitou k somatostatinovým receptorům, což se pak odráží v odlišných scintigrafických výsledcích u vybraných tumorů. Jsou to např. (10):



Pro scintigrafické zobrazování může být využit také radionuklid $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Jeho výhodou oproti indiu je nižší cena, lepší dostupnost a výhodnější nukleární vlastnosti.

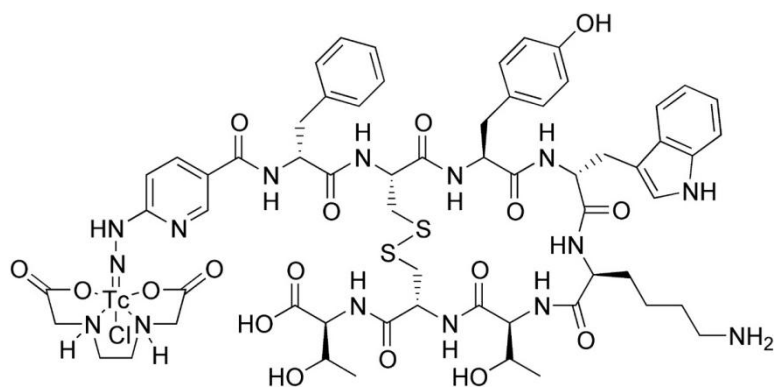
Příkladem prvního techneciem značeného radiopeptidu je depreotid ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -P829) registrovaný pod názvem NeoSpect, který se vyznačuje vysokou afinitou k somatostatinovým receptorům. Technecium je tu vázáno pomocí chelatační jednotky, kterou tvoří tripeptid (β -DAP)-Lys-Cys. Jeho nevýhodou je nižší citlivost při

zobrazování zejména jaterních metastáz a méně výhodné farmakokinetické vlastnosti.



cyclo (N-Me)Phe-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Hcy(CH₂CO-β-Dap-Lys-Cys-Lys-NH₂)

Pro značení somatostatinových analogů může být využito bifunkčních chelátů, jako např. propylenamin oxim, tetraamin nebo 6-hydrazinopyridin-3-karboxylová kyselina (HYNIC). Posledně zmiňovaná kyselina váže technecium ještě s pomocí koligandu, tím může být např. tricín nebo ethylendiamin-N,N'-dioctová kyselina (EDDA). Výhodné je, že obměnou koligandu může být dosaženo různých farmakokinetických vlastností. Příkladem takové sloučeniny je [^{99m}Tc/EDDA/HYNIC]-octreotát, která se vyznačuje vysokou citlivostí při zobrazování receptorově pozitivních tumorů (13, 14).



Jiným příkladem je ^{99m}Tc demotát 1, což je analog Tyr³-octreotátu, který má na N konci peptidového řetězce otevřený tetraamin (tetraazaundekan) umožňující značení techneciem (^{99m}Tc-[N₄, Tyr³]-octreotát). ^{99m}Tc demotát 1 prokazuje rychlé a

specifické vychytávání nádorovou tkání a během prvních studií byl také pacienty velmi dobře snášen (15).

3.3.3 Radioaktivně značené peptidy v terapii

Další vývoj receptorově specifických peptidů směřoval ke značení peptidů radionuklidy vyzařující alfa nebo beta částice s využitím pro terapii. Je založena na stejném principu jako zobrazování nádorových tkání využívající vysoké afinity somatostatinových analogů k receptorům a vychytávání radionuklidů nádorovými buňkami. Peptid tak přenese radioaktivní izotop přímo do rakovinných buněk. Izotopy emitující α částice krátkého dosahu lze použít v případech, kdy je třeba zasáhnout malé skupiny buněk nebo zničit metastazující rakovinné buňky (např. leukémie). Izotopy s pronikavějším zářením β pak mohou být použity pro větší rakovinná ložiska.

Z počátku byly zkoumány peptidy značené ^{111}In , protože kromě γ paprsků potřebných pro scintigrafii emituje také Augerovy elektrony. Avšak pro nízkou penetraci tkáněmi tohoto záření není ^{111}In zcela optimálním radionuklidem. Pro terapeutické využití se ukázaly být výhodnější β zářiče, které emitují částice s krátkým dosahem a dostatečnou energií ke zničení buněk, aniž by pronikaly dál do okolní tkáně. Vysokoenergetické β zářiče navázané na somatostatinové analogy tak mohou teoreticky doručit letální dávku radiace k sst pozitivním nádorům s minimálním poškozením zdravé tkáně.

Připojením chelátu k peptidu byly ovlivněny nejen biodistribuční vlastnosti a afinitní profil sloučenin, ale bylo také umožněno značení různými radioaktivními kovy. Zatímco DTPA tvoří stabilní komplex pouze s In, cyklický DOTA je schopný pevně vázat kromě In i velké množství především trojmocných kovů: ^{111}In , ^{90}Y , $^{67,68}\text{Ga}$, ^{153}Sm , ^{177}Lu , $^{212,213}\text{Bi}$ nebo ^{212}Pb (7). Byly nasyntetizovány a do klinického zkoušení zavedeny sloučeniny značené ^{90}Y - $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]\text{octreotid}$ (^{90}Y -DOTATOC). Dalšími možnými DOTA analogy jsou $[\text{DOTA}]\text{lanreotid}$, novějším pak $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]\text{octreotát}$, u kterého bylo dosaženo vysoké afinity k somatostatinovému receptoru sst2 a také delší setrvání radioaktivity v nádorové tkáni (4, 16).

Nejčastěji používanými radionuklidy ke značení peptidů pro terapeutické využití jsou izotopy yttria a lutecia.

Yttrium-90 (^{90}Y) je čistý vysokoenergetický β^- zářič (2.27 MeV), jehož β částice mají ve tkáni díky vyšší energii delší dosah (12,0 mm). Důsledkem toho je vyšší radiační dávka v místě účinku, což je výhodné zejména u větších nádorů nebo nádorů s heterogenním rozložením receptorů. Kratší poločas rozpadu (2,7 d) vyžaduje častější podávání značeného terapeutika.

Lutecium-177 (^{177}Lu) emituje γ záření využitelné pro scintigrafii a zároveň je β^- zářičem se středně vysokou energií (0.5 MeV). Částice s nižší energií a kratším dosahem (2,1 mm) jsou lépe absorbovány menšími nádory. Díky delšímu poločasu (6,7 d) je jednodušší dávkování (17).

Studie porovnávací terapeutický efekt těchto dvou izotopů poukázaly na základě jejich rozdílných vlastností na vhodnost kombinace ^{90}Y - a ^{177}Lu - značených analogů. Použitím ^{177}Lu -DOTATOC a ^{90}Y -DOTATATE bylo dosaženo vyššího protinádorového účinku (17).

Mezi další sloučeniny s pozměněnou strukturou patří DOTA-[1-NaI³]-octreotid (DOTANOC) s vysokou afinitou k somatostatinovým receptorům sst₂, sst₃, a sst₅. Jako slibné sloučeniny byly také popsány analogy octreotidu spojené s cukernou jednotkou (2).

Limitujícím faktorem radioterapie je ionizující záření působící na zdravou tkáň, která má také receptory pro somatostatin. Je proto nutné tuto radiaci kontrolovat ke snížení vedlejších účinků.

Kritickým orgánem, který může být rovněž poškozen, jsou ledviny nejen proto, že mají somatostatinové receptory, ale hlavně proto, že vylučují a eliminují z těla velké množství peptidových nosičů, které se nenavázaly na nádorové buňky. Malé radioaktivní peptidy jsou přes glomerulární kapiláry v ledvinách filtrovány a následně reabsorbovány a zadrženy v buňkách proximálního tubulu. Tato kumulace radioaktivity v ledvinách může být redukována intravenózní infuzí obsahující pozitivně nabitě bazické aminokyseliny lysin a arginin před, během a po podání radiofarmaka (6).

Léčba radioaktivně značenými somatostatinovými analogy je slibná zejména pro pacienty s neoperovatelnými nebo metastazovanými nádory neuroendokrinního původu.

3.4 Teorie jodace

3.4.1 Radionuklidy jódu (18)

Zatímco bylo rozpoznáno kolem třiceti uměle připravených radioizotopů jódu, pouze jeden stabilní izotop jod-127 se vyskytuje v přírodě.

Díky výhodným rozpadovým charakteristikám jsou některé radioizotopy využívány v biochemickém a farmaceutickém výzkumu, v nukleární medicíně a k radioimunoanalytickým stanovením. Zejména pak radioizotopy ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I dosáhly velkého významu při značení malých i velkých molekul.

Pro jodaci byla vyvinuta celá řada jednoduchých a velmi efektivních metod. Výhodou jodace je jenom malá strukturální změna, která podstatně nezmění biologické chování značené molekuly oproti původní molekule.

^{125}I ($t_{1/2} = 60$ d, γ záření 35 keV) je v praxi využíván zejména k in vitro pokusům, zvláště pak pro předběžné studie při vývoji nových potenciálních radiofarmak a také v radioimunoanalýze.

^{123}I ($t_{1/2} = 13,2$ h, γ záření 159 keV) je vhodný pro použití k diagnostickým účelům v nukleární medicíně (zobrazování scintigrafií a SPECT - single photon emission computed tomography). Má vhodné nukleární vlastnosti, nevýhodou je pak vysoká cena, jelikož je to izotop produkovaný v cyklotronu.

^{131}I [$t_{1/2} = 8$ d, γ záření 364 keV (83%) a β^- záření 606 keV (90%)] je pro své β^- záření využíván k terapeutickým účelům a zároveň γ záření lze využít pro scintigrafii. Je to v nukleární medicíně nejčastěji využívaný izotop jódu.

Izotopy ^{120}I , ^{122}I , ^{124}I jsou β^+ zářiči a hodí se pro zobrazovací metodu PET (pozitronová emisní tomografie).

3.4.2 Metody značení radioaktivním jódem

K radioaktivnímu značení molekul mohou být využity klasické metody jodace z organické chemie. Musí však být brán ohled na poločas radionuklidu a reakce musí být přizpůsobeny k použití velmi malých koncentrací.

Při výběru určité metody by mělo být zohledněno:

- inkorporace jódu do určité části molekuly by měla vést k pouze minimálním změnám biologické aktivity
- znalost farmakologických a toxikologických vlastností jodované sloučeniny
- in vivo stabilita
- značení by mělo být dosaženo během několika hodin a nejlépe v jednom kroku
- při značení by mělo být dosaženo vysokých výtěžků
- znalost specifické radioaktivity pro úspěšnou diagnózu in vivo

Reakce značení radioaktivním jódem mohou být podle mechanismu rozděleny na nukleofilní a elektrofilní substituce.

3.4.2.1 Nukleofilní substituce

Radiojodace nukleofilní substitucí je častější pro alifatické sloučeniny.

Činidlem v těchto reakcích je jodidový anion I^- , který nese elektronový pár. Několik různých mechanismů je možných v závislosti na substrátu (zda jde o alifatickou nebo aromatickou sloučeninu), na charakteru odstupující skupiny a na reakčních podmínkách (rozpouštědlo, teplota).

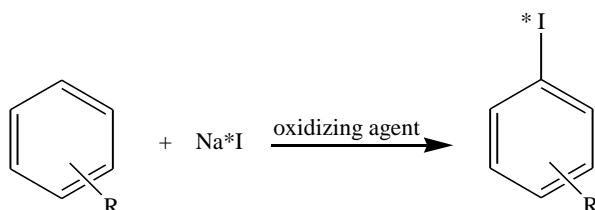
Příkladem může být izotopová výměna, kdy stabilní atom jódu, který je součástí molekuly, je zaměněn radioaktivním izotopem. Při těchto reakcích však není dosaženo vysoké specifické aktivity, protože ve výsledných sloučeninách stále převažuje stabilní jód. Vyšší specifické aktivity je dosaženo při reakcích, kdy jsou radioaktivním jódem nahrazeny atomy chlóru nebo fluóru, protože tyto sloučeniny mohou být efektivně vyměněny.

3.4.2.2 Elektrofilní substituce

Elektrofilní substituce je typickou reakcí aromatických sloučenin.

Elektrofilní radiojodace je proces, při kterém formálně kladně nabitý ion „ I^{++} “ atakuje systém s vysokou elektronovou hustotou, jako je aromatický kruh nebo násobná vazba. Ztrátou pozitivně nabitě odstupující skupiny vzniká kovalentní vazba

C-I, která se vyznačuje vysokou stabilitou. Sám jód však nemůže v oxidačním stupni +I díky vysoké energii existovat, je proto tvořen in situ z jodidu působením oxidačních činidel.



3.4.2.2.1 Oxidační činidla

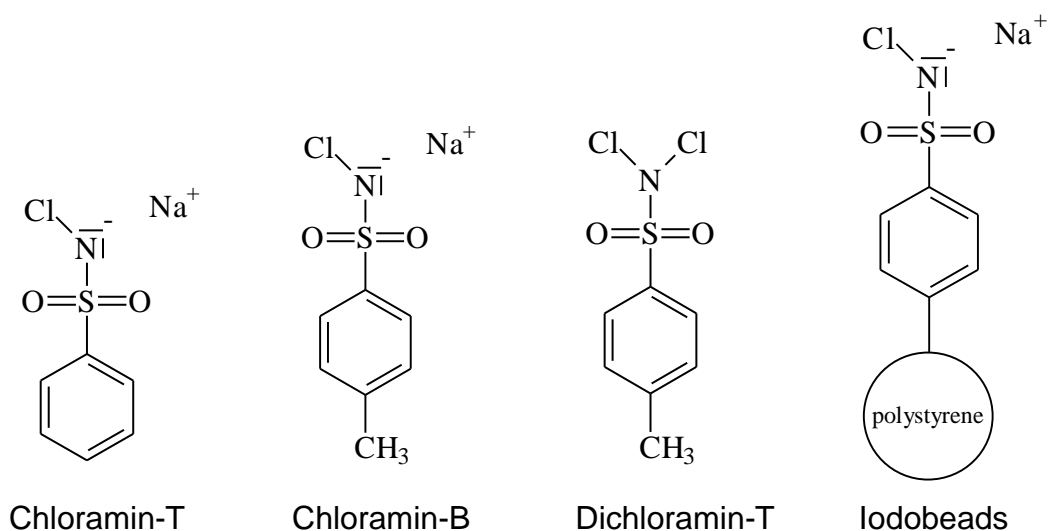
Jód monohalogenid (ICl, IF)

Pro vytvoření jód monohalogenidu je roztok radiojodidu sodného upraven působením ICl, kdy dochází k izotopové výměně jódu, nebo je oxidován elementárním halogenem (F_2 , Cl_2). Vyšší elektronová hustota chlóru a fluóru vede k silné polarizaci kovalentní vazby Cl-I nebo F-I. Na atomu jódu tak vzniká částečný pozitivní náboj, který umožňuje elektrofilní atak.

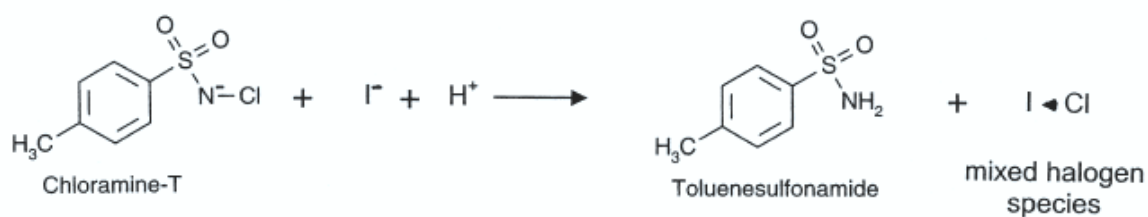
Nevýhodou jsou vysoké oxidační schopnosti a dosažení nižší specifické aktivity.

N-chloramidy

Jinou cestou, jak dosáhnout elektrofilní jodace, je použití sodných solí N-chlorotoluensulfonamidů: chloramin-T (CAT, N-chloro-p-toluensulfonová kyselina), chloramin-B (CAB, N-chloro-benzensulfonová kyselina), dichloramin-T (DCT, N,N-dichloro-p-toluensulfonová kyselina).



Tyto sloučeniny ve vodném roztoku uvolňují kyselinu chlornou (HOCl), která oxiduje jodid.

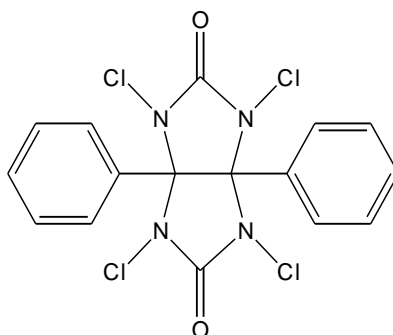


Nevýhodou jsou relativně silné oxidační podmínky a možnost vzniku vedlejších produktů chloračních reakcí. Je proto doporučováno pracovat při nízkých teplotách a s co nejnižší možnou koncentrací činidla (19). Další možností snížit tyto nevýhody je použití IodobeadsTM, což je chloramin-T imobilizovaný na polystyrenových kuličkách (20). Uvolňování oxidačního činidla je přidáním tohoto polymeru do reakční směsi zpomalené a jeho koncentrace je udržována velmi nízká. Také kontakt značené sloučeniny a oxidačního činidla je kratší. Při použití Iodobeads je další výhodou snadné oddělení oxidačního činidla filtrací, což umožňuje vyhnout se použití redukčního činidla.

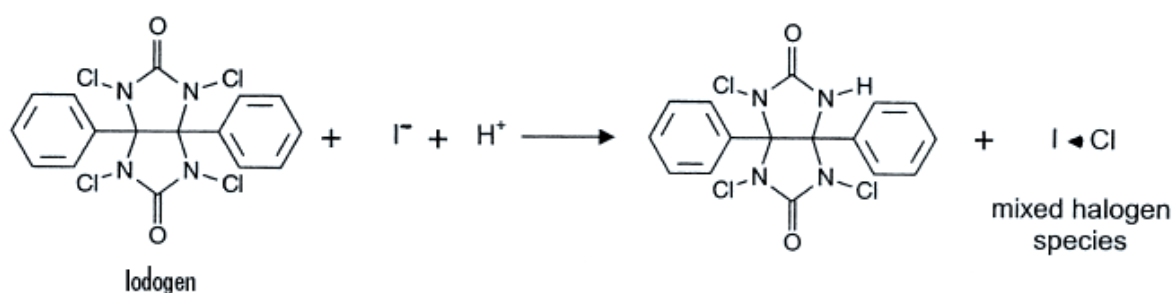
Protože monochlorosulfonamidy jsou jako iontové sloučeniny nerozpustné ve většině organických rozpouštědel, je jejich použití omezené na vodné prostředí. V organických rozpouštědlech umožňuje pracovat dichloramin-T. Oxidační schopnost a výsledky značení se při použití DCT jen minimálně liší od CAT (21).

IodogenTM

IodogenTM je obchodní název pro 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -difenyglycouril (22):



Iodogen byl vyvinut pro mírnou radiojodaci proteinů, peptidů a buněčných membrán. V těchto případech jsou získané výtěžky srovnatelné s použitím CAT.



Protože je Iodogen prakticky nerozpustný ve vodě, byla vyvinuta metoda dvou fází, kde Iodogen tvoří tenkou vrstvu na stěně reakční nádoby. Roztok Iodogenu v těkavém organickém rozpouštědle, jako je chloroform, je přenesen do reakční nádoby a rozpouštědlo je odpařeno proudem inertního plynu. Poté je přidán vodný roztok značené sloučeniny a radiojodid. Reakce probíhá několik minut a je jednoduše ukončena odstraněním vodné reakční směsi ze zkumavky.

Tento postup našel široké použití k radiojodaci aktivovaných aromatických sloučenin, jako jsou aniliny a fenoly. Díky mírným podmínkám jsou minimalizovány vedlejší oxidativní reakce senzitivních molekul a polyjodace.

N-halosuccinimidy

Jinou skupinu N-halogenidových oxidačních činidel tvoří N-halosuccinimidy:

NCTSF (N-chloro-tetrafluorosuccinimide),

NCS (N-chlorosuccinimid),

NBS (N-bromosuccinimid).

Použití NCTSF a NCS dává výtěžky téměř srovnatelné s těmi, které byly získány s chloraminem-T.

System NCS / Na⁺I⁻ v trifluormethansulfonové kyselině umožňuje přímou elektrofilní radiojodaci neaktivovaných a silně deaktivovaných aromatických sloučenin. Za vhodných podmínek je dokonce možná přímá radiojodace silně deaktivovaného nitrobenzenu s výtěžky 70%. Jediným nezbytným předpokladem je stabilita aromatických sloučenin v trifluormethansulfonové kyselině (23).

Perkyseliny

Výhodou perkyselin jako oxidačních činidel je, že se netvoří chlorované vedlejší produkty a také že tvorba vedlejších produktů vyplývající ze silné oxidace je velmi redukována. Perkyseliny se hodí zejména pro radiojodace senzitivních sloučenin.

Perkyselina se tvoří in situ z peroxidu vodíku a organické kyseliny (mravenčí, octové kyseliny), proto je koncentrace oxidačního činidla udržována nízká. Naopak přímé použití již připravené perkyseliny často vede k oxidativnímu poškození aromatické sloučeniny.

Výtěžky získané touto metodou jsou obecně nižší v porovnání s použitím N-halo-oxidačních činidel (24).

3.4.2.2.2 Přímá elektrofilní jodace

Všechna výše popsaná reakční činidla oxidují radiojodid in situ na reaktivní, elektrofilní kation vhodný pro substituci vodíku v elektronově bohatých aromatických sloučeninách. Tato metoda přímé jodace je však omezena pouze na takové aromatické sloučeniny, které jsou funkčními skupinami aktivovány.

Obecně přímá elektrofilní radiojodace dává vysoké výtěžky a je snadno proveditelná. Nevýhodou této metody je tvorba směsi isomerních produktů, které

mohou být obtížně oddělitelné. Substituce je orientována podle pravidel založených na I- a M- efektech do poloh ortho a para. Za určitých okolností v závislosti na dalších substituentech může dojít k regioselektivním reakcím (např. α -methyltyrosin, jodobenzamid).

3.4.2.2.3 Nepřímá elektrofilní jodace

Tyto reakce využívají organokovové sloučeniny jako prekurzory pro regioselektivní jodaci aktivovaných i deaktivovaných aromatických sloučenin za velmi mírných podmínek a s vysokými výtěžky.

Na základě elektro pozitivního charakteru použitého kovu, a z toho vyplývající polarizace vazby uhlík-kov, má tato vazba nižší energii než vazba uhlík-vodík. A tak vazba uhlík-kov je mnohem více aktivovaná pro elektrofilní atak a k substituci dochází právě na ní.

Ve skutečnosti literatura ukazuje, že není ideální organokovový prekurzor pro jodo-demetalaci, pokud jsou požadována kritéria jako jednoduchá syntéza, stabilita, reaktivita, toxicita a čistota. Nejvhodnějšími organokovovými sloučeninami jsou trialkylstannyl, trialkylsilyl nebo deriváty borité kyseliny.

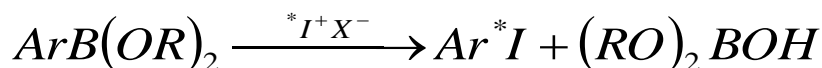
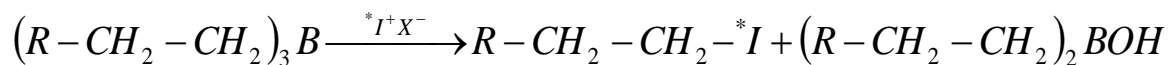
Syntéza organokovových prekurzorů může být někdy zdlouhavá a složitá a často se skládá z několika reakčních kroků, i přesto se stala tato metoda nadřazenou všem radiojodačním reakcím a našla široké uplatnění pro regioselektivní radiojodaci mnoha farmaceutických sloučenin.

Organokovové sloučeniny bóru

Sloučeniny bóru mají v použití organokovových sloučenin výjimečné postavení. I když vazba uhlík-bór není příliš polární a má vysokou vazebnou energii, prázdný 2p-orbital sloučenin bóru otevírá cestu pro elektrofilní atak. Výhodou organoborových sloučenin je jejich snadné zacházení, jsou to krystalické sloučeniny stabilní na vzduchu a odolné vůči vlhku (19, 25, 26).

Organoboráty vznikají hydroborací nenasycených vazeb podle Markovnikova pravidla. Rychlost jodační reakce se pak zvyšuje s počtem alkylových substituentů navázaných k atomu boru. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo použitím Chloraminu-T jako oxidačního činidla.

Tato metoda je vhodná nejen pro značení aromatických sloučenin, ale také vinylových a alkylových sloučenin.



Organokovové sloučeniny kovů ze IV. skupiny (Si, Ge, Sn)

Pro syntézu organokovových sloučenin vedle křemíku a germania našel široké uplatnění zejména cín. Byly zkoumány různé reakční podmínky a nejvyšších výtěžků bylo dosaženo použitím prekurzorů trimethyl derivátů cínu v octové kyselině nebo methanolu, nepolární rozpouštědla jako tetrachlormethan jsou pro tyto účely méně vhodné.

Pro in situ oxidaci radiojodidu jsou vhodné Chloramin-T, Dichloramin-T nebo také perkyseliny.

3.4.2.3 Značení makromolekul radioaktivním jódem

Metody radioaktivního značení proteinů by měly být mírné, rychlé a probíhat s vysokými výtěžky. Navíc jodované proteiny by měly mít vysokou specifickou aktivitu a měly by být inertní k dehalogenaci. Přímé značení makromolekul je možné, pokud je protein dostatečně stabilní vůči potřebným oxidačním podmínkám v reakční směsi. Protože tomu tak většinou není, byly navrženy alternativní nepřímé metody (27, 28).

3.4.2.3.1 Přímá jodace proteinů

Pro přímé značení jodací se využívají elektrofilní metody, které byly popsány dříve. Jedná se o reakce, kdy působením oxidačního činidla vzniká in situ z jodidového anionu kladně nabitý ion I^+ , který je elektrofilní substitucí zaveden do značené sloučeniny.

Oxidační činidlo by mělo být voleno tak, aby bylo kompatibilní s vodným prostředím, nedenaturovalo protein a umožňovalo snadné čištění radioaktivně

značených proteinů. Separace značených proteinů může být usnadněna také upevněním peptidů před jodací na nějaký pevný podklad (29).

Elektrofilní reakce může probíhat na aminokyselinách tyrosinu, fenylalaninu, histidinu, tryptofanu a také cysteinu. Různými reakčními podmínkami (např. změna pH) je možné ovlivnit, do jaké míry bude určitá aminokyselina reagovat s radioaktivním jódem (18, 30). Např. za běžných reakčních podmínek (pH = 7,4, chloramin-T) je vysoké procento radioaktivního jódu přítomno na fenolické části tyrosinu.

Jako oxidační činidla se pro značení peptidů používají:

Jód monochlorid (ICI)

Radiojód monochlorid, jako historicky první činidlo pro značení proteinů, byl připraven s nízkou specifickou aktivitou izotopovou výměnou s NaI.

Toto značení je rychlé a nežádoucí sekundární reakce jsou omezené. Navíc ICI je zvláště stabilní ve vodném prostředí. Tato metoda původně navržená McFarlanem, se stala předmětem různých modifikací (31).

Chloramin-T

N-chlortoluensulfonamid sodný je při pokojové teplotě v neutrálním nebo bazickém prostředí mírné oxidační činidlo, stalo se velmi používaným pro vysokou specifickou radioaktivitu značení peptidů a proteinů. Při přímé reakci jsou značené proteiny v přímém kontaktu s chloraminem-T, což může vést k chloraci, polymerizaci, tvorbě makroagregátů nebo oxidaci thiolových skupin methioninu. Tyto nevýhody mohou být minimalizovány použitím co nejnižšího možného množství chloraminu-T nebo použitím Iodobeads (viz. výše) (32, 33).

Iodogen^R

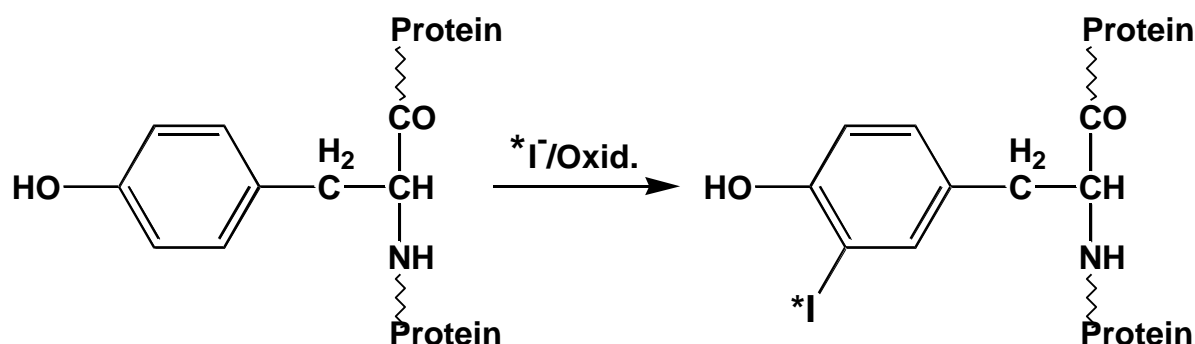
1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -difenylylglycouryl je další sloučenina chloru s mírnými oxidačními vlastnostmi, která nepotřebuje redukční činidla a umožňuje vysoké výtěžky značení. Protože je iodogen nerozpustný ve vodě, jeho kontakt s molekulou, která má být značena, je omezen a sekundární reakce, stejně jako degradace proteinu, jsou také minimalizovány (34). Navíc iodogen je snadno oddělitelný od značeného proteinu. Ukázal se být velmi atraktivním pro značení makromolekul, jako jsou peptidy a monoklonální protilátky (28).

Oxidativní enzymy

Velmi mírnou metodou jodace proteinů a peptidů je enzymatická reakce. V přítomnosti velmi malého množství peroxidu vodíku (přidaný do roztoku s proteinem nebo vytvořený in situ) enzym peroxidáza (lactoperoxidáza nebo myeloperoxidáza) katalyzuje oxidaci radiojodu na „aktivní jód“. Kinetika radiojodace je závislá na pH, obecně se používá pH 5-6 (35, 36, 37).

Jelikož protein není vystaven silnému oxidačnímu prostředí, imunologické a biologické vlastnosti molekul jsou zachovány. Během jodace je však jodován také enzym, což zvyšuje ztrátu jódu a způsobuje čištění značených proteinů od značené peroxidázy značně složitě. Tento problém je odstraněn použitím peroxidázy kovalentně vázané na nerozpustnou matrix, jako je agarosa, která může být z reakční směsi snadno odstraněna (37).

Při těchto reakcích je jodace směřována zejména na aminokyselinu tyrosin a v menší míře pak histidin a tryptofan.



Jodace tyrosinu do 1. stupně.

3.4.2.3.2 Nepřímá jodace proteinů

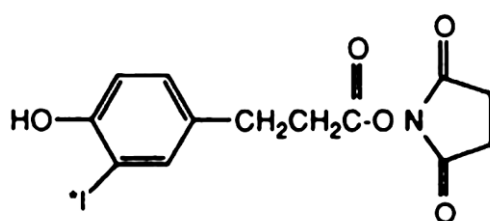
Přímé značení proteinů je omezeno na přítomnost aminokyselin, které tuto jodaci umožňují, jedná se zejména o tyrosin. Také pokud je molekula proteinu citlivá k použitým oxidačním podmínkám, může dojít k poškození a ztrátě biologické aktivity. Nebezpečná je ztráta afinity značených antigenů k protilátkám, což může způsobit snížení citlivosti kvantitativních rozborů radioimunoanalytických vyšetření.

Pro tyto situace byly vyvinuty metody nepřímého značení, kdy peptid samotný není přímo vystaven reakčním podmínkám jodace (38, 39).

Podstatou nepřímého značení je konjugace peptidu s molekulou, která byla značena radioaktivním jódem dříve bez přítomnosti peptidu. Tato molekula může reagovat s funkčními skupinami aminokyselin za tvorby kovalentní vazby.

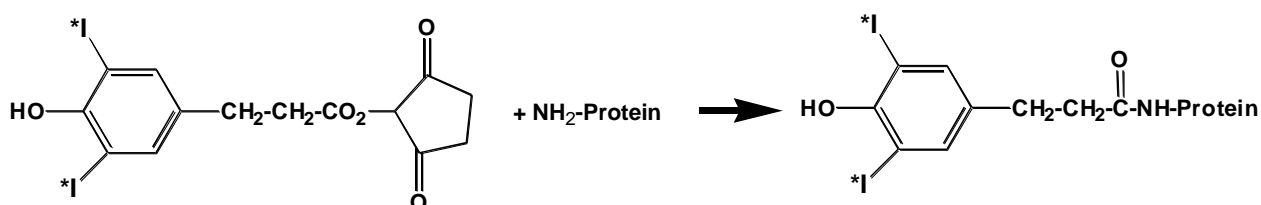
Nejběžnější funkční skupinou využívanou pro připojení radiojodovaných molekul k proteinu je aminoskupina (lysinu).

Spojením proteinových aminů s aktivním esterem vzniká stabilní amidová vazba. Prvním a stále běžně používaným esterem je Bolton-Hunterovo činidlo. Je to jódem značený N-succinimidyl 3-(4-hydroxyfenyl) propionát (38, 40).

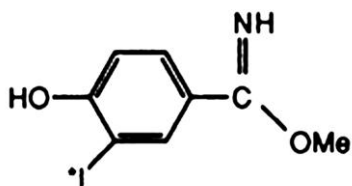


Bolton-Hunterovo činidlo

Princip značení je jednoduchý a zahrnuje dva kroky. Nejprve je reakcí s radioaktivním jódem a chloraminem-T připraveno Bolton-Hunterovo činidlo, které je následně spojeno s volnou aminovou skupinou proteinu. Dochází hlavně k reakci s aminoskupinou lysinu, ale také aminoskupina na N-konci peptidového řetězce může být jodována, vznikají deriváty mono- nebo di-jodované p-hydroxyfenylpropionové kyseliny.

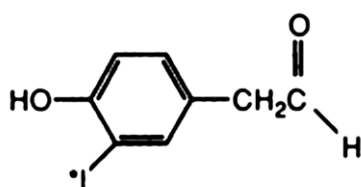


Dalším možným esterem, který reaguje s aminy proteinů za vzniku amidové vazby, je Woodovo činidlo, mono- nebo di-jodo derivát methyl-p-4-hydroxybenzimidátu.



Woodovo činidlo

Aminová skupina proteinů může také reagovat s aldehydy. Takto vznikají iminy (Schiffova base), které mohou být následně redukovány za tvorby sekundárních aminů. Byly vyvinuty sloučeniny skládající se z fenolického kruhu pro radiojodaci a aldehydicke skupiny pro konjugaci, např. (4-hydroxyfenyl)acetaldehyd, který umožňuje značení proteinů i při jejich velmi nízké koncentraci.

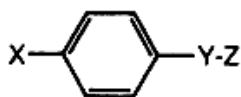


(4-hydroxyfenyl)acetaldehyd

Nevýhodou těchto látek je náchylnost k in vivo enzymatické dehalogenaci, což může vést ke snížení koncentrace jodovaného proteinu v místě účinku. Příčinou může být hydroxylová skupina v poloze para.

Důležitá se ukázala být substituce jódu právě v poloze para, protože v jiném případě může aromatický kruh in vivo podléhat enzymatické hydroxylaci, což může opět vést ke zvýšenému riziku dehalogenace (41).

Pro dosažení stabilnějšího značení jsou výhodné sloučeniny obecného vzorce:



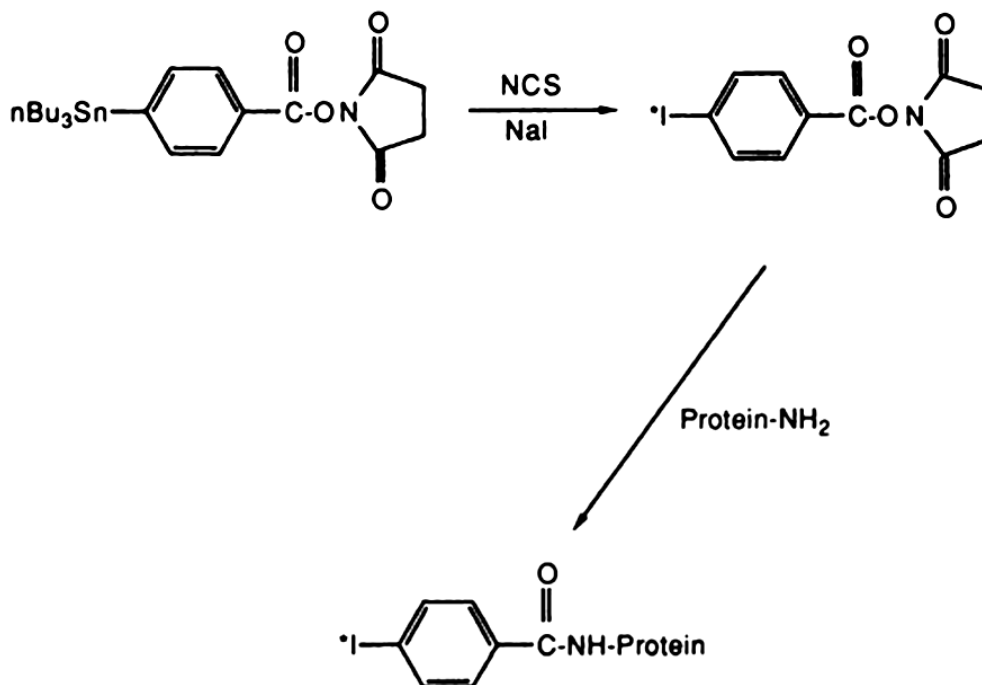
X = jód nebo skupina, která může být jódem nahrazena

Y = spojovací řetězec

Z = funkční skupina umožňující vazbu na protein

Příkladem takových sloučenin může být succinimidyl para-iodobenzoát, který se vyznačuje stabilitou, dává vysoké výtěžky radiojodace i konjugace na protein.

Může být připraven metodou využívající organokovové prekurzory. Takovým prekurzorem může pro snadnou přípravu, relativní stabilitu a obecnou reaktivitu s halogeny být succinimidyl para-tri-n-butylstannylbenzoát (41).



Vedle těchto zmíněných konjugačních sloučenin je ještě mnoho dalších, které lze využít ke specifickému značení konkrétních peptidů.

3.5 Separační metoda Sep-Pak

Sep-Pak metoda představuje extrakci na pevné fázi – SPE (Solid phase extraction). Jde o velmi účinnou metodu, které je možno využít jako předseparační techniky pro další analytické hodnocení vzorku. Je také velmi vhodná pro přečišťování výsledného produktu po radioaktivním značení peptidů, čehož se využívá na odděleních nukleární medicíny.

Náplní kolonky Sep-Pak je silikagel, který je modifikovaný hydrofóbním uhlíkovým řetězcem C-18. Umožňuje tak zadržení organických sloučenin z polárního roztoku, které tu jsou poutány nepolárními van der Waalsovými silami.

Po nanesení vzorku je kolonka s naneseným vzorkem nejprve promývána polárním rozpouštědlem (vodou), čímž se ze směsi oddělí nízkomolekulární složky (nenavázaný radionuklid, případně další činidla použitá při značení). Větší molekuly s nižší polaritou, mezi kterými je hlavně značený peptid, zůstanou zachyceny na nepolárním nosiči a jsou odstraněny v dalším kroku promýváním méně polárním rozpouštědlem (metanol, etanol).

4 Experimentální část

4.1 Materiály a přístroje

4.1.1 Přístroje

- Vybavení pro HPLC
 - pumpa – HPLC Pump 2248, (Pharmacia Biotech)
 - kolona
 - Lichnocart Lichnospher C-18, 125 x 4 mm, 5 μ m (Merch)
 - Lichnocart Lichnosphere C-18, 250 x 4 mm, 5 μ m (Merch)
 - programátor gradientu – GRADIENT MASTER GP 961, (UOCHAB Praha)
 - radiometr – Universal laboratory ratemeter – typ URL – 2, (Polon)
 - Výstupy z radiometru byly zpracovány pomocí programu Clarity, případně pomocí registračního programu vytvořeného v Basicu (Ing. Špaček, Packard)
- Laboratorní digitální pHmetr, (Orion)
- Centrifuga – HEBA 12, (Hettich)
- Váhy Kern
- Míchačka – Microshaker ML – 1, (Premed, ČR)
- Koncentrátor SpeedVac

4.1.2 Chemikálie

- Sørensenův fosfátový pufr pH 7,4
 - připraven z 1/15 M roztoku dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a 1/15 M roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného v poměru 8:2
- Radionuklid jódu ^{125}I
 - chemická forma KI
 - aktivita 3,7 GBq/ml
 - výrobce – Amersham, (Velká Británie)
- Chloramin T, (Sigma)
- DOTA-Tyr³-oktreotát, (π -chem, Rakousko)
- Metanol, (Fluka)
- Etanol, (Merck)
- Kolonky pro SPE Sep-Pak Vac 1cc (50 mg), C18 Cartridges, (Waters)

4.2 Metodika

4.2.1 Označení DOTA-Tyr³-octreotátu izotopem jódu

Ke značení peptidu byla použita metoda elektrofilní substituce s chloraminem-T jako oxidačním činidlem.

4.2.1.1 Vlastní značení

Do Ependorfovy zkumavky z polyethylenu o objemu 1,5 ml bylo pipetou odměřeno 40 μ l (předem připraveného) 0,05 M fosfátového pufru o pH 7,4. K roztoku pufru bylo přidáno 5 μ l (= 5 μ g) roztoku DOTA-Tyr³-octreotátu ve vodě. Dále bylo přidáno 5,5 μ l radioaktivního jodidu ve fosfátovém pufru a roztok byl promíchán. Reakce byla zahájena přidávkem 2 μ l (= 2 μ g) chloraminu T. Směs byla míchána 45 sekund a poté k ní bylo přidáno 40 μ l metanolu a reakce byla ihned ukončena nástřikem na HPLC kolonu.

4.2.1.2 Separace značeného peptidu pomocí HPLC

Separace byla prováděna za podmínek gradientové eluce na koloně Lichnocart Lichnospher C-18 (250 x 4 mm), případně (125 x 4 mm) o hrubosti zrnění 5 μ m. Průtoková rychlost kolonou byla 1 ml/min (pro menší kolonu 0,5 ml/min). Jako detektor byl použit radiometr.

Mobilní fáze: A: 0,1 M NaCl

B: etanol

Profil gradientu:

0 – 10 min	0 % B
10 – 20 min	0 – 60 % B
20 – 30 min	60 % B
30 – 35 min	60 – 100 % B
35 – 40 min	100 % B
40 – 45 min	100 – 0 % B

Během analýzy byly odebírány frakce po 1 minutě. Frakce s DOTA-Tyr³-octreotátem byla použita pro další HPLC analýzu pro potvrzení radiochemické čistoty jodovaného peptidu. Ta byla provedena na koloně Lichnocart Lichnospher C-18 (250 x 4 mm) o hrubosti zrnění 5 μm s mobilními fázemi A: 0,1 M NaCl, B: metanol stejným gradientem.

4.2.1.3 Stabilita DOTA-I¹²⁵-Tyr³-octreotátu

Zjištění stability v různých časech od přípravy bylo provedeno HPLC analýzou vzorku DOTA-Tyr³-octreotátu. Použita byla stejná kolona i mobilní fáze jako při stanovení radiochemické čistoty.

4.2.1.4 Separace značeného peptidu pomocí SPE

Po radioaktivním značení byla také vyzkoušena separace značeného peptidu na SPE kolonce Sep-Pak.

Aktivace kolony:

Kolonka byla upevněna do stojanu a promyta pomalým průtokem 15 ml 80% etanolu. Poté byla dále promývána 10 ml destilované vody po malých objemech tak, aby se etanol úplně vymyl.

Čištění značeného peptidu:

Pak byl nanesen vzorek reakční směsi (acetátový pufr s peptidem a příslušným radionuklidem). Po vsáknutí vzorku byla kolonka pomalu promyta 15 ml destilované vody (byly jímány frakce po 5 ml). V tomto prostředí se z kolonky vymyjí veškeré polární látky, včetně volného radionuklidu. Část nenavázaného radionuklidu, který je přítomen v hydrolyzované formě, se zachytí na kolonce.

Vymytí peptidu z kolonky:

Po promytí kolonky s naneseným vzorkem vodnou fází byl z kolony vymyt značený peptid 80% etanolem. Byly jímány frakce po 1 ml a po jejich změření byly spojeny etanolické frakce s největší aktivitou a dále zkoncentrovány na SpeedVacu.

4.2.1.5 Farmakokinetická studie

Radioaktivně označený peptid byl dále použit pro biodistribuční a metabolické studie na katedře farmakologie.

V rámci této studie byla provedena analýza moči pomocí HPLC. Použity byly oba typy kolon (125 x 4 mm, 250 x 4 mm) s mobilními fázemi A: 0,1 M NaCl, B: metanol.

4.3 Výsledky

Označení DOTA-Tyr³-octreotátu a stabilita značeného peptidu

Výsledky HPLC separace DOTA-Tyr³-octreotátu po oxidativní jodaci jsou uvedeny v grafu č.1. Z grafu je vidět, že v krátkém čase, řádově několika málo minut, kdy se z kolony vymyjí nízkomolekulární polárnější látky, se eluoval nenavázaný jodid. Hlavní pík ve 24. minutě pak patří značenému DOTA-Tyr³-octreotátu a za ním další píky představují pravděpodobně diiodovaný derivát, případně další větší útvary. Při vyšší koncentraci oxidačního činidla, případně při příliš dlouhé reakční době, může docházet kromě jodace i ke chloraci a tvorbě vyšších aglomerátů. Graf č. 2 pak potvrzuje čistotu odebraného DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu. Na chromatogramu je v elučním čase volného jodidu vidět pouze maličký pík odpovídající obvykle zlomku procenta z aktivity nanesené na chromatogram. Elučnímu času DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu odpovídá pak jediný pík značeného peptidu.

Přečištěný peptid byl dále zkoncentrován na SpeedVacu na vývěvě a dále ponechán při pokojové teplotě pro zjištění stability.

HPLC analýza v krátkém čase po přípravě (4 hod) neprokázala zvýšenou přítomnost nízkomolekulární aktivity. Viditelný nárůst aktivity této formy byl zjištěn až 24 hod od přípravy, viz graf č 3.

Separace značeného peptidu pomocí SPE

Výsledky separace na SPE kolonce Sep-Pak jsou uvedeny v následujícím grafu č. 4. Z grafu je patrné, že ve vzorku bylo jen nepatrné množství volného radionuklidu, což se projevilo jen velmi nízkou aktivitou v promývacích frakcích vodné fáze (1,2 %). Značený peptid pak byl z kolony vymyt méně polárním etanolem. Určité množství aktivity zůstalo nasorbované na kolonce Sep-Pak (4,2 %), viz. následující tabulka.

Eluční činidlo	Aktivita eluátu (cpm)
5 ml H ₂ O	16 500
5 ml H ₂ O	1 811
5 ml H ₂ O	264
1 ml C ₂ H ₅ OH	1 095 032
1 ml C ₂ H ₅ OH	362 855
1 ml C ₂ H ₅ OH	8 424
1 ml C ₂ H ₅ OH	1 255

Následná HPLC analýza zkoncentrovaného značeného peptidu po separaci na Sep-Paku ukázala, že vzorek byl dostatečně očištěn od nízkomolekulárních reaktantů, ale profil chromatogramu v oblasti elučního času peptidu ukazuje, že SPE neoddelí jednotlivé formy peptidu –viz graf č. 5.

HPLC analýza moči

Vzorky moči experimentálních zvířat (potkaní samci kmene Wistar) byly jímány v různých časech po *i.v.* aplikaci značeného peptidu (D 1 μ g/1kg) a po přefiltrování byly podrobeny HPLC analýze.

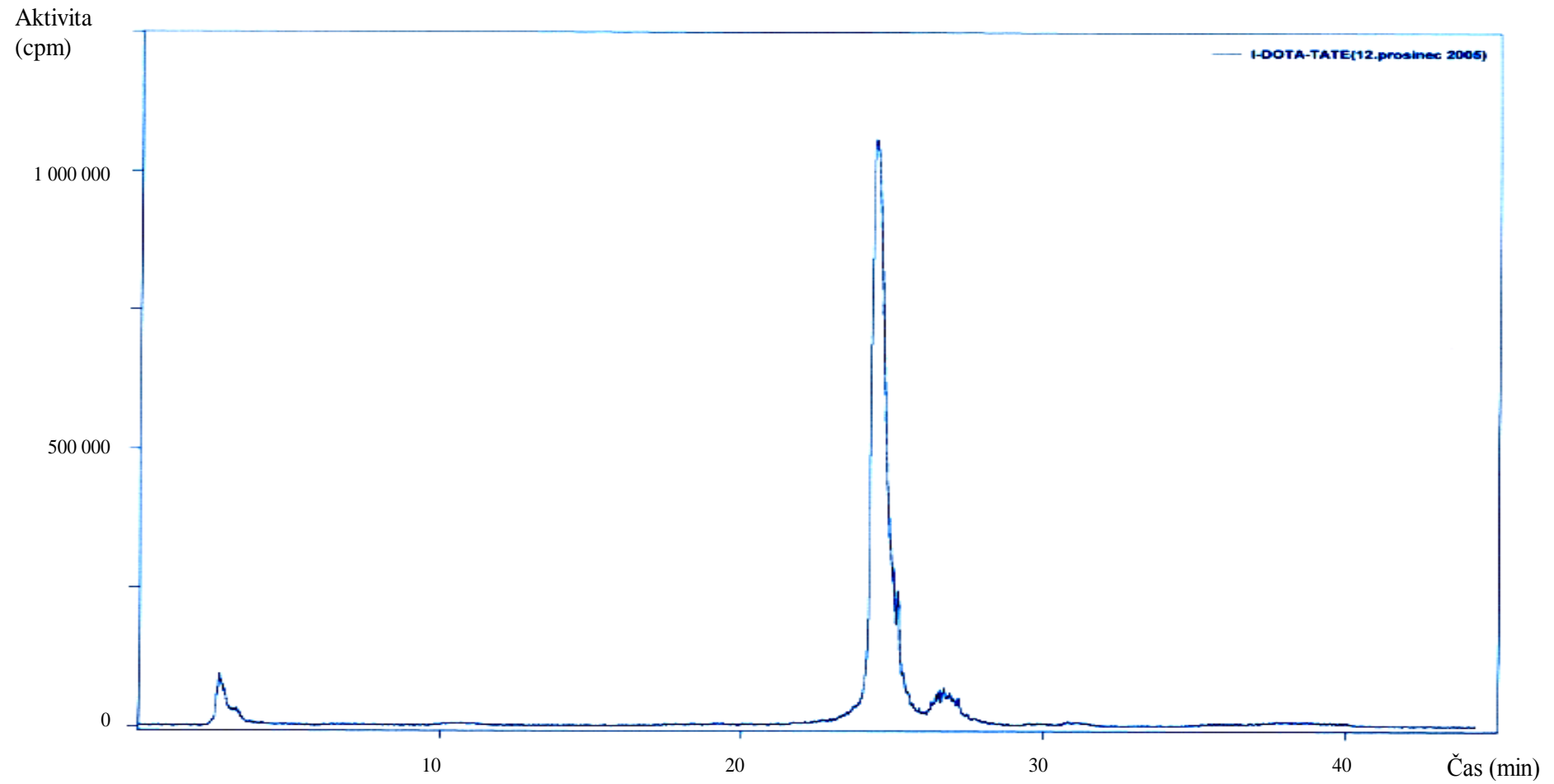
V krátkých časech po aplikaci peptidu (2 a 4 hod) nebyly v moči nalezeny jiné formy, než původní látka, viz graf č. 6 a graf č. 7. V dlouhých intervalech po 20 a ještě více pak po 48 hodinách již byly v moči přítomny nízkomolekulární látky (jodid a různé peptidové štěpy), které se oproti DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu eluovaly v kratších časech. Průběh analýz znázorňují graf č. 8 a graf č. 9.

Jiné příklady značení peptidu DOTA-Tyr³-octreotátu jódem jsou v grafech č. 10 – 13.

Biodistribuce radioaktivity v receptorově bohatých orgánech

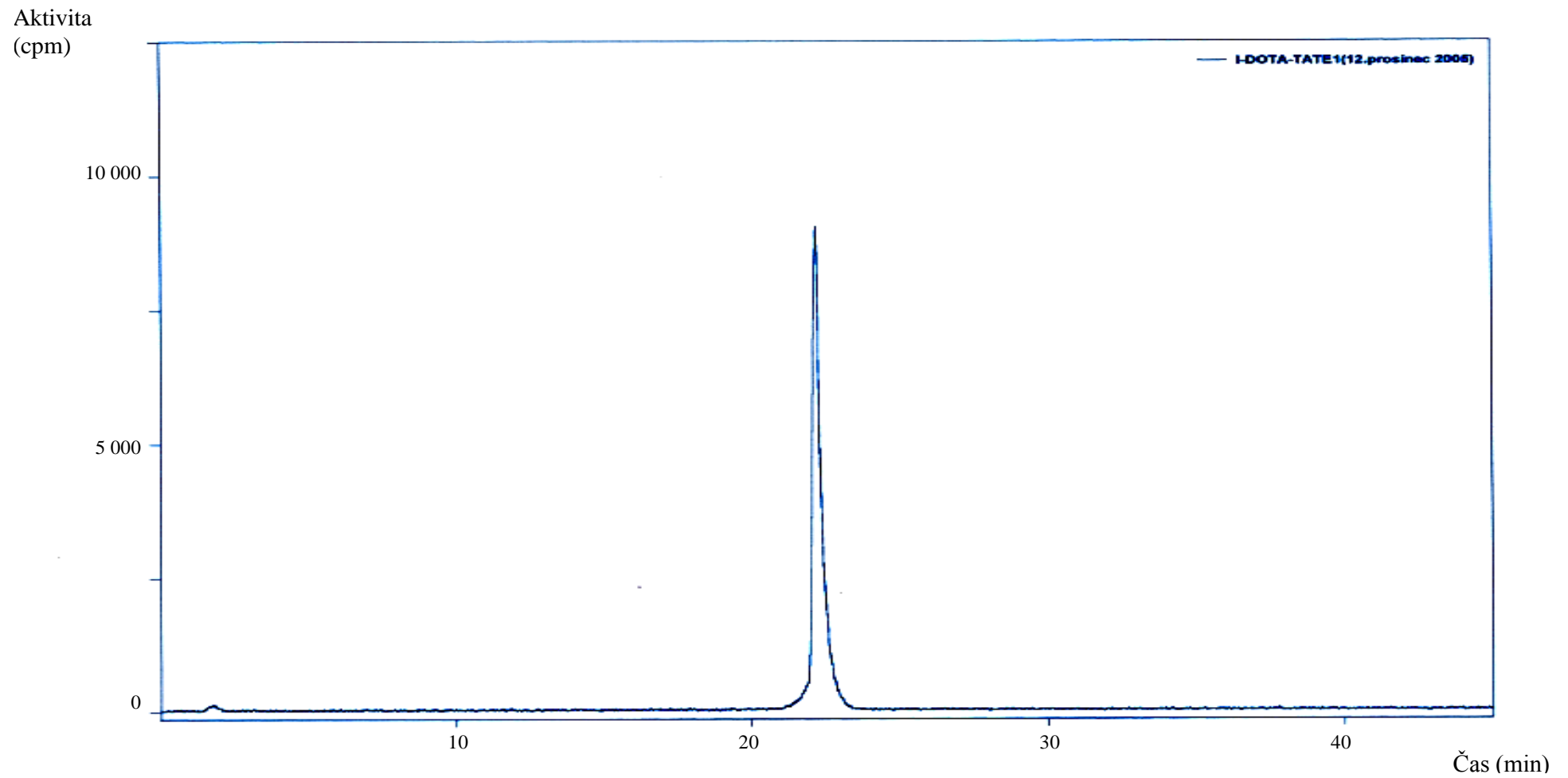
Přečištěné radioaktivně značené peptidy byly dále použity v izotopových laboratořích katedry farmakologie a toxikologie k biodistribučním studiím. Výsledky srovnání distribuce DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu v porovnání s distribucí DOTA-Tyr³-octreotátu značeného kovovými radionuklidy do receptorově-bohatých orgánů jsou uvedeny na obrázcích 14 a 15. Hodnoty aktivity v orgánech jsou vyjádřeny jako % z dávky na kg tělesné hmotnosti (%D/kg BW).

Záznam HPLC analýzy DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu



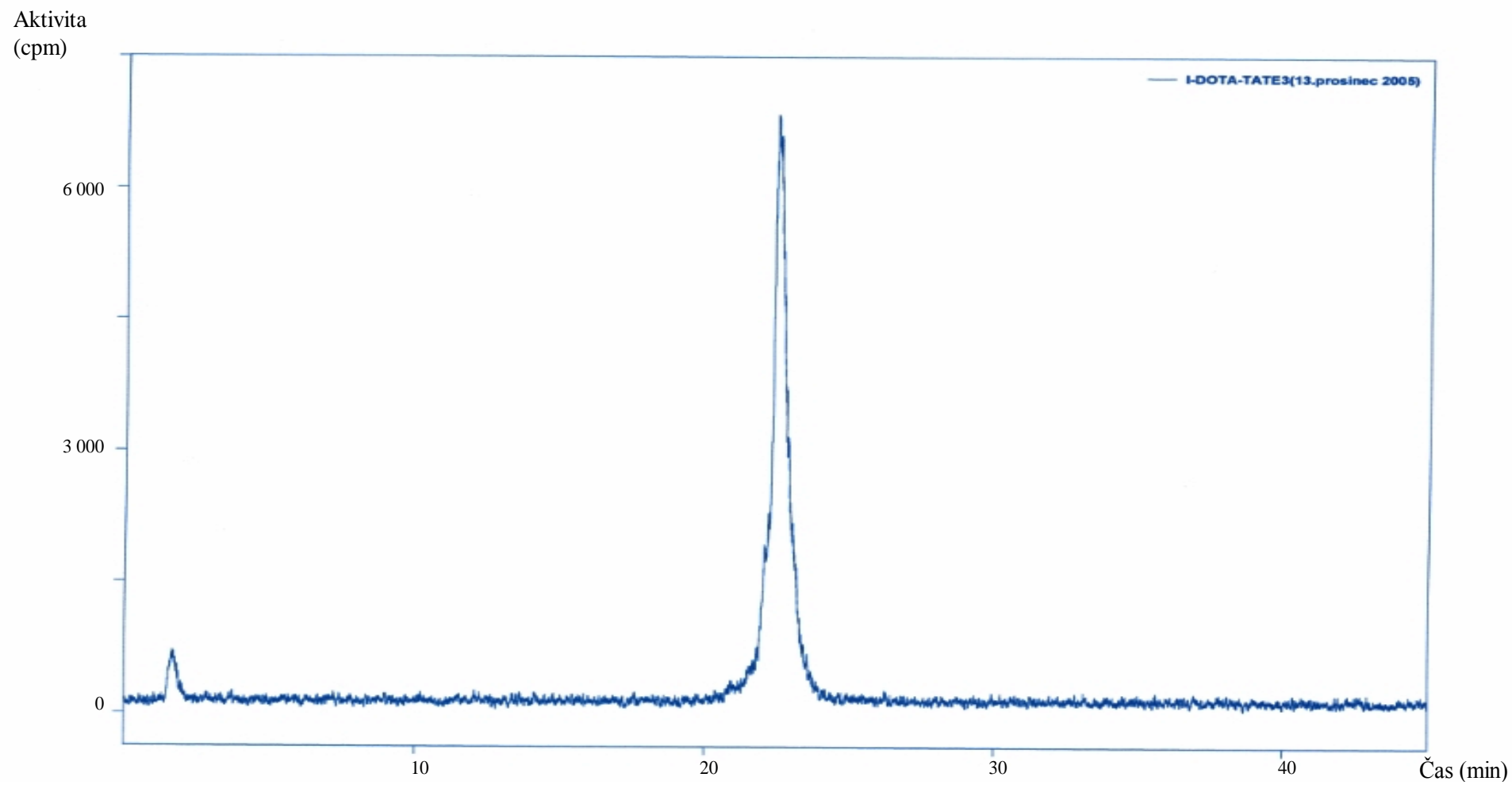
Graf č. 1

Záznam HPLC analýzy – ověření radioaktivní čistoty DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu



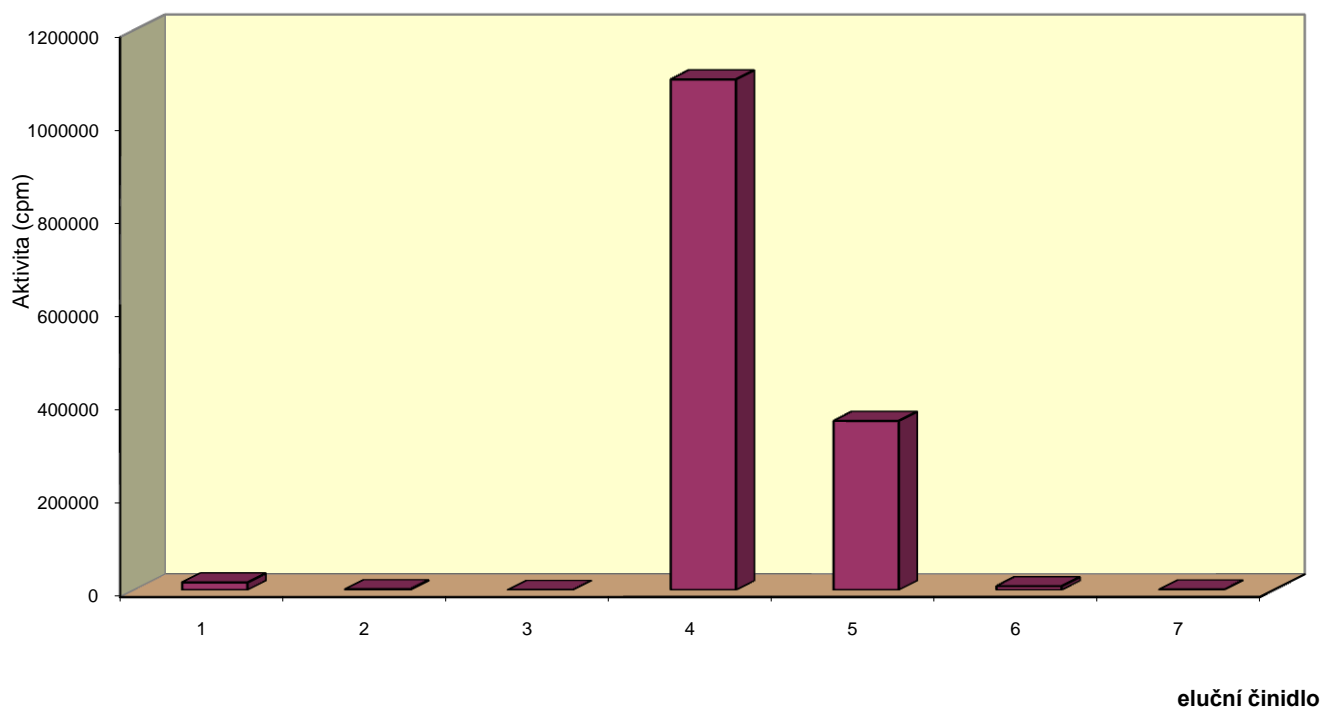
Graf č. 2

Záznam HPLC analýzy DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu po 24 hod.



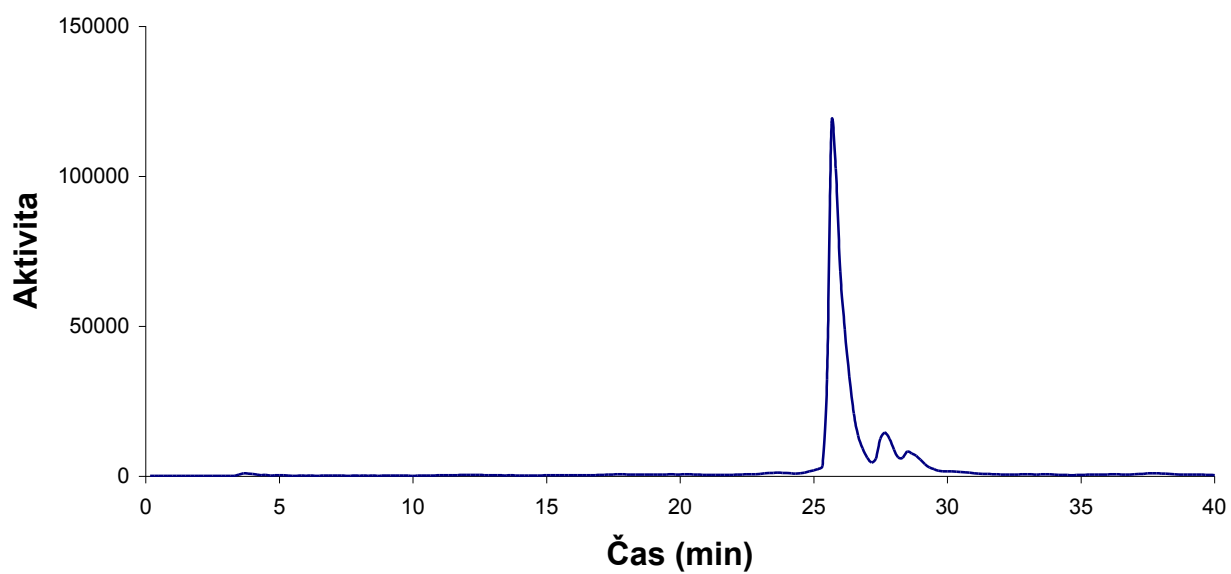
Graf č. 3

Separace DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu na SEP-PAKU



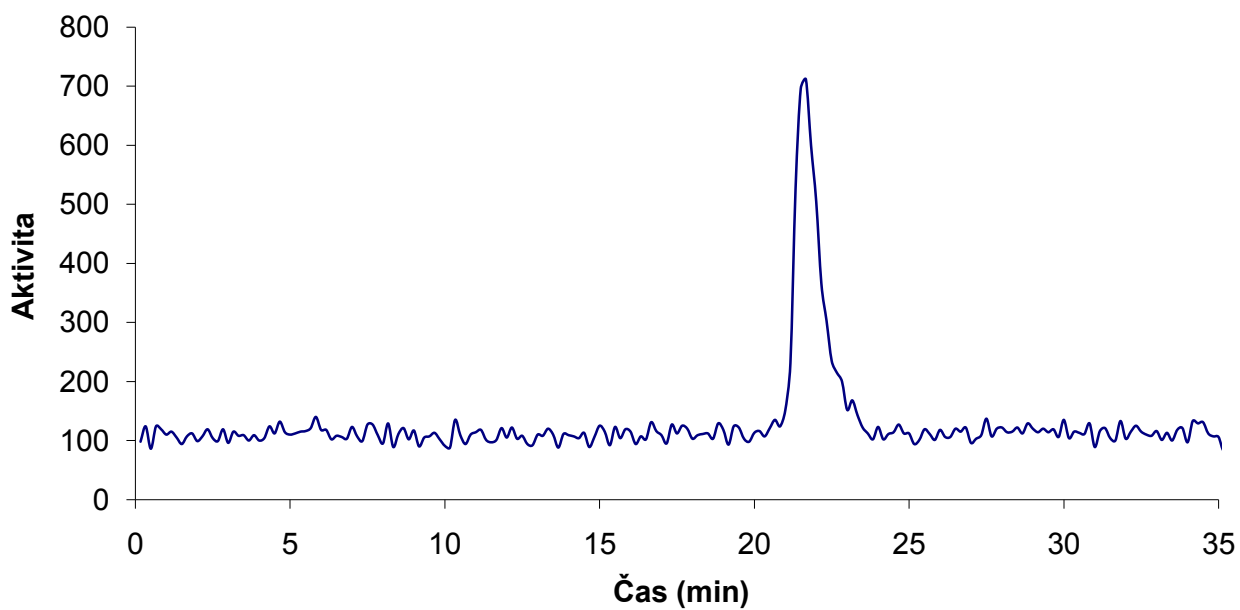
Graf č. 4

HPLC analýza DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu po separaci na Sep-Paku



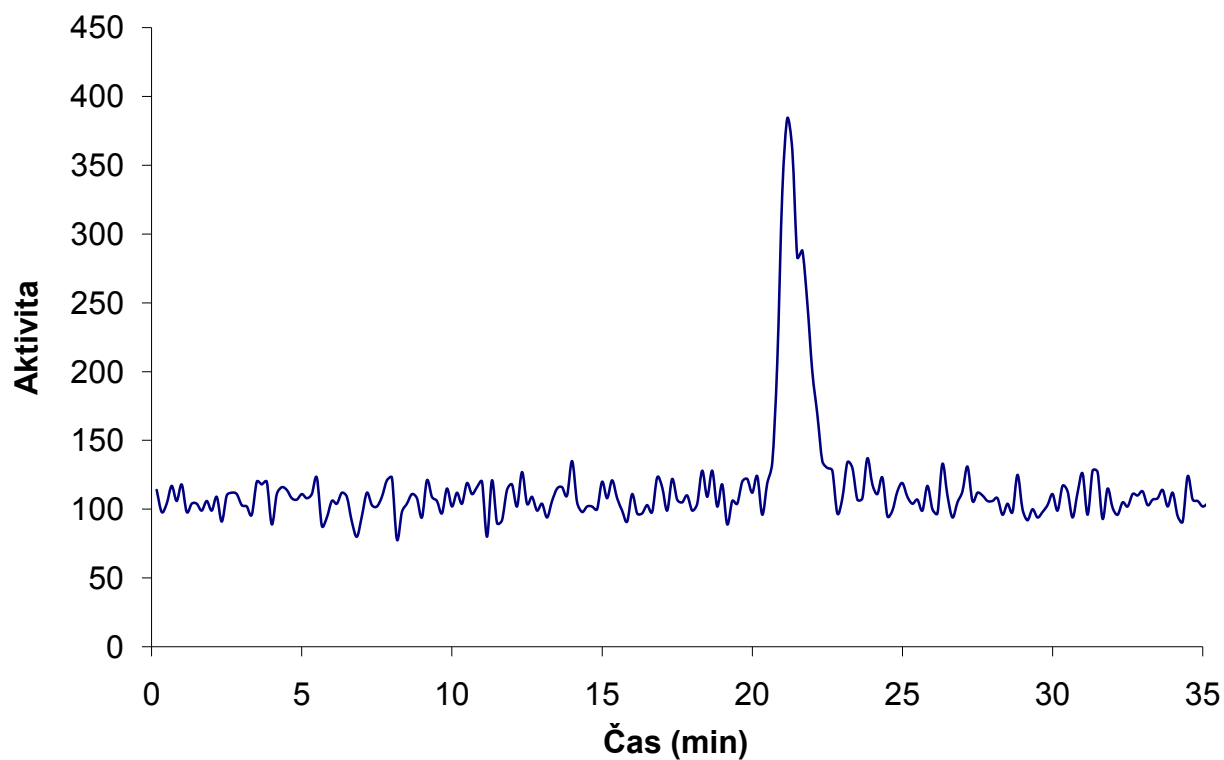
Graf č. 5

Záznam HPLC analýzy DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu v moči – 2 hod



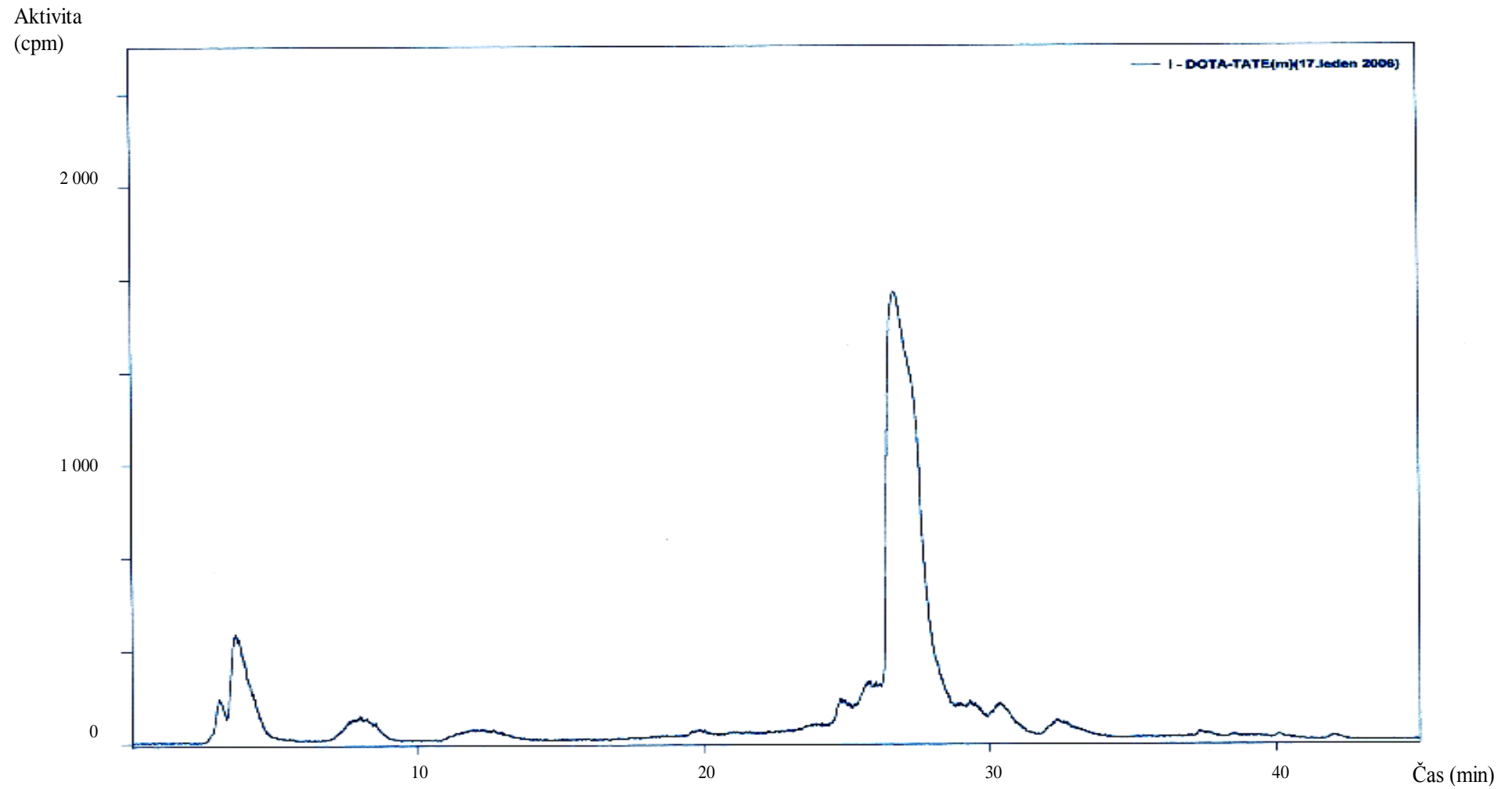
Graf č. 6

Záznam HPLC analýzy DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu v moči – 4 hod



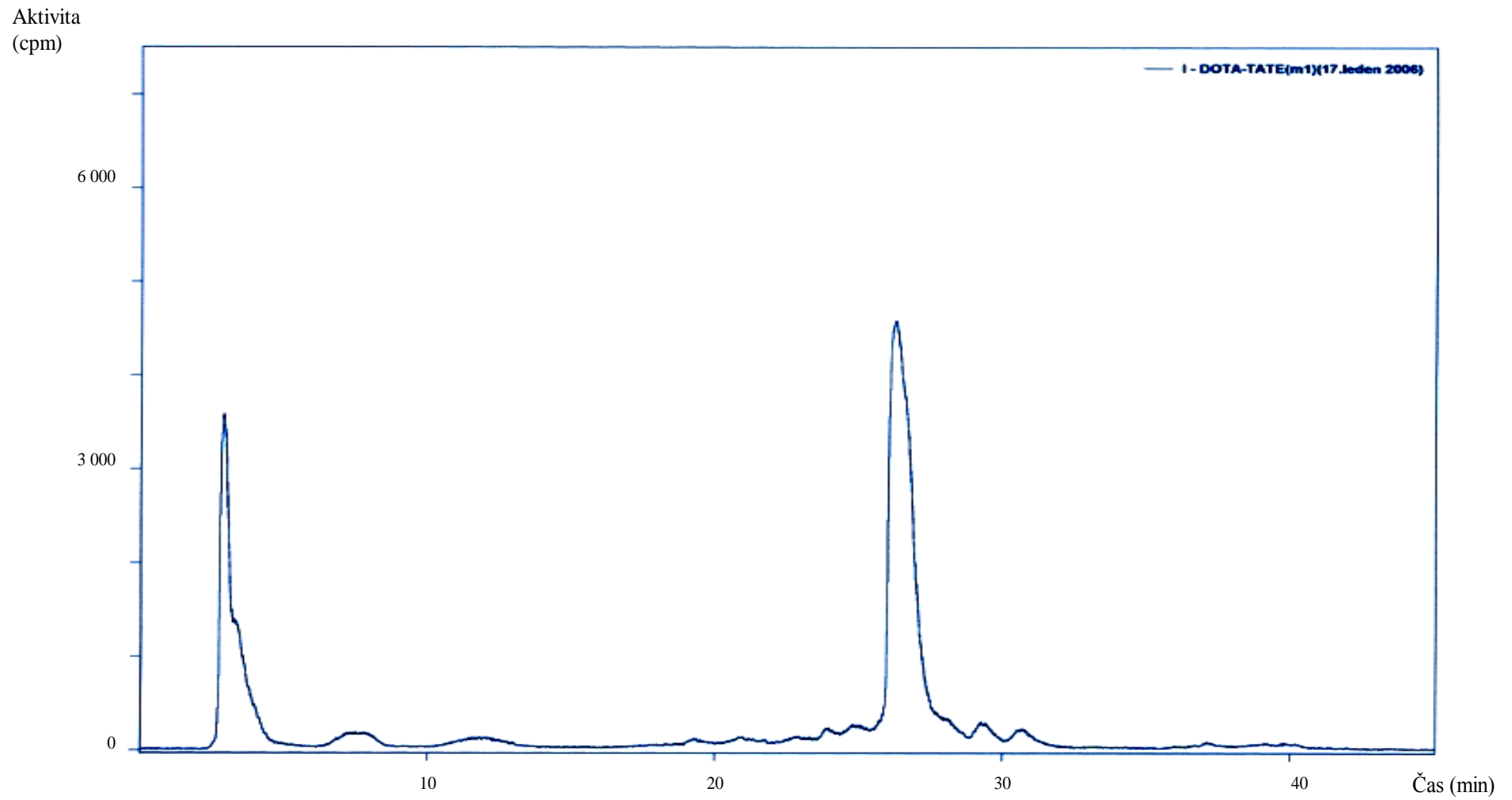
Graf č. 7

Záznam HPLC analýzy DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu v moči – 20 hod



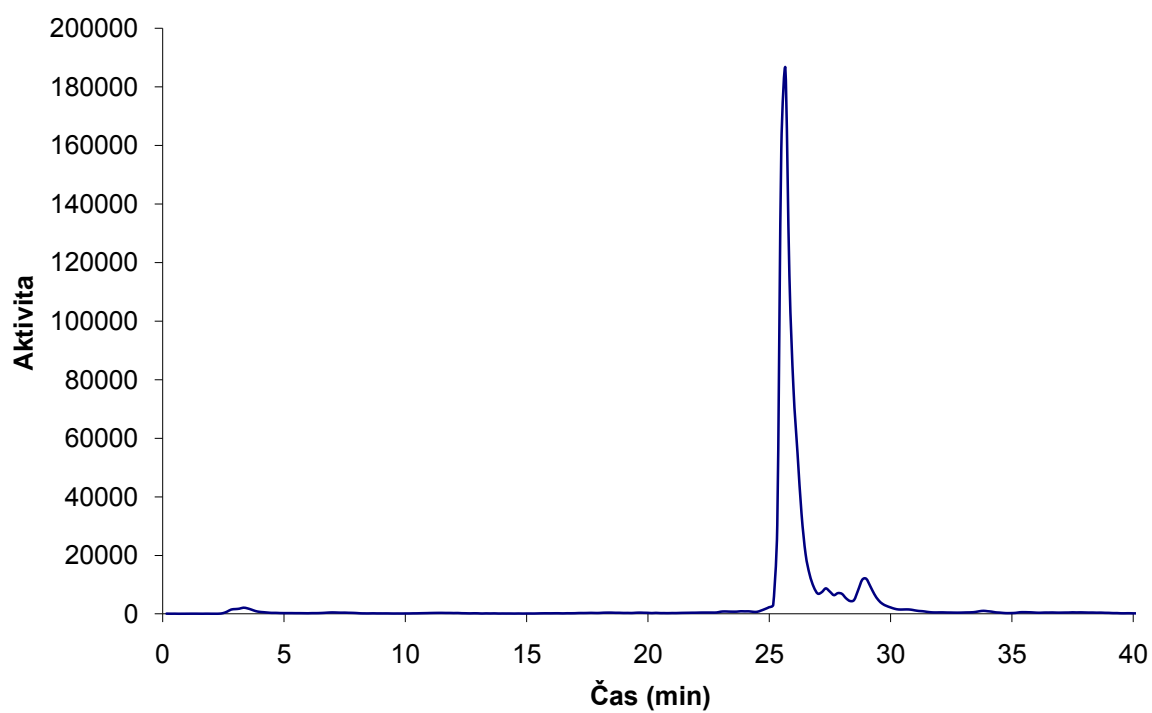
Graf č. 8

Záznam HPLC analýzy DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu v moči – 48 hod

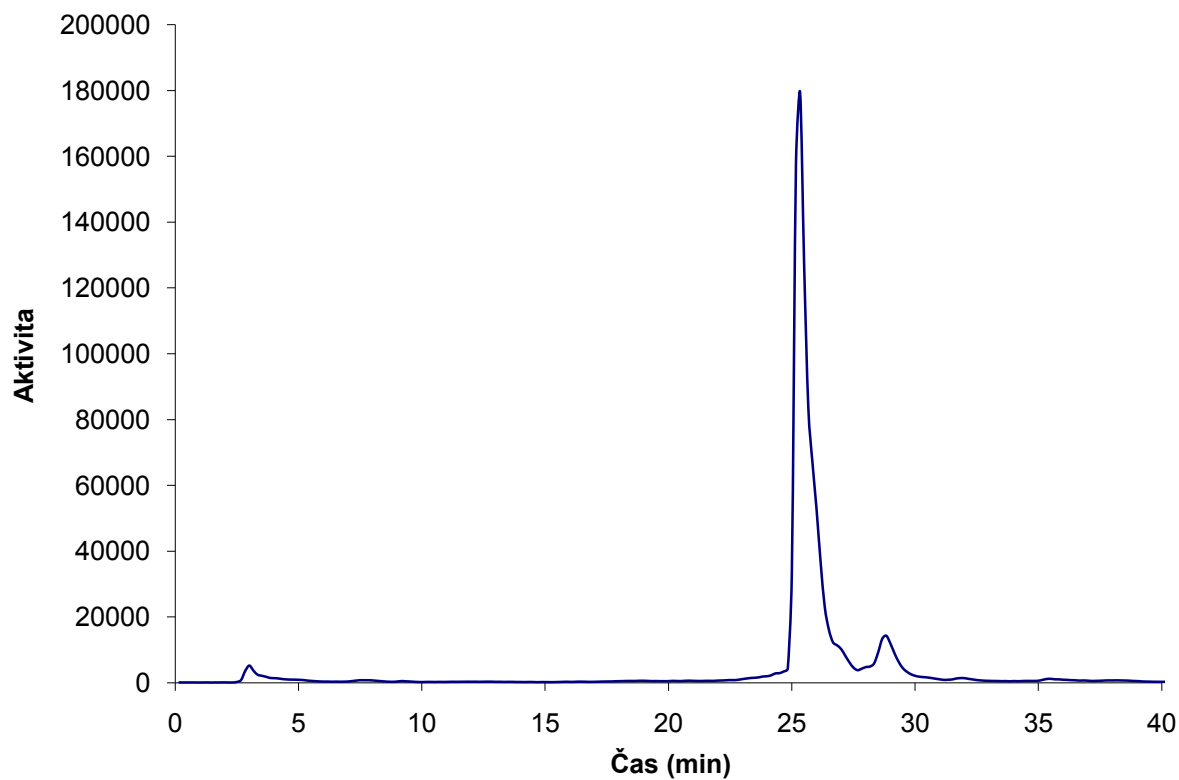


Graf č. 9

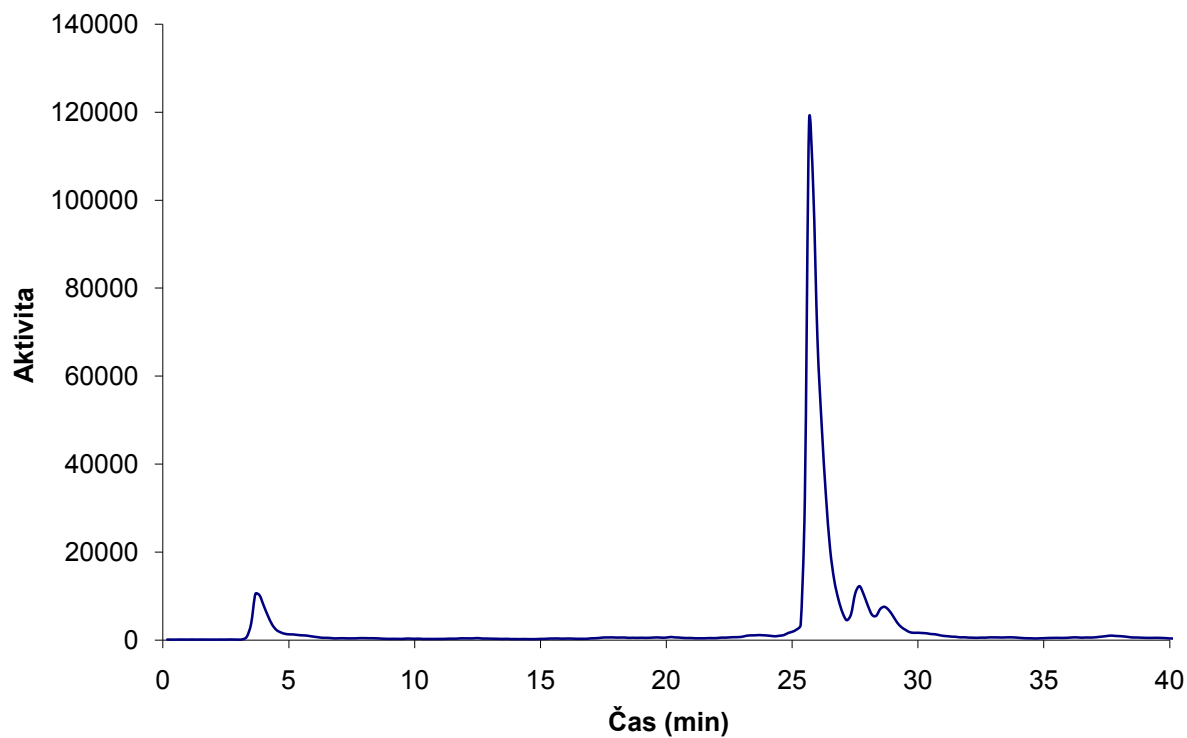
Záznam HPLC analýzy DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu



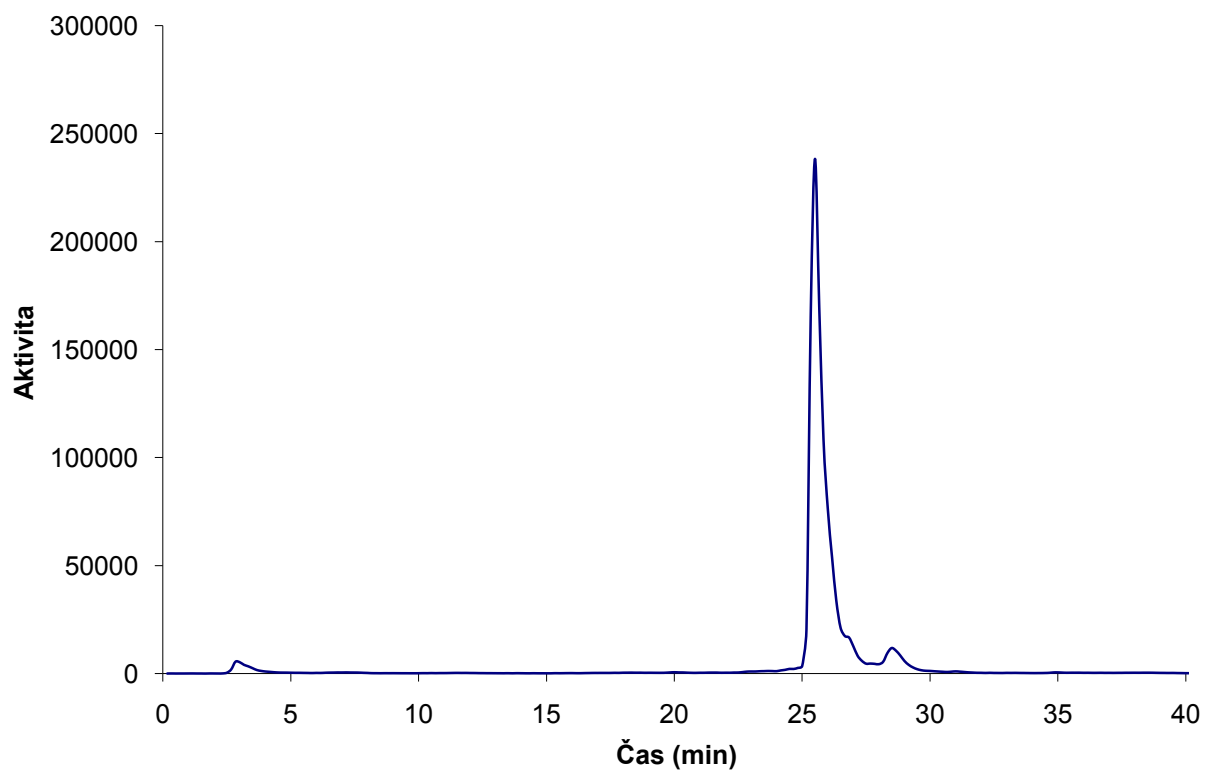
Graf č. 10



Graf č. 11

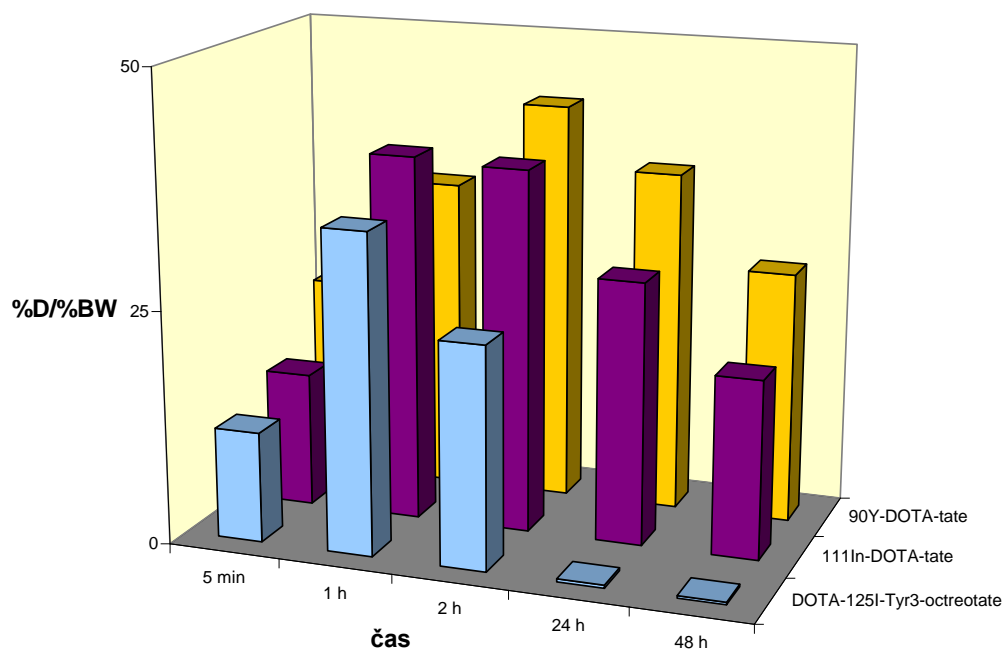


Graf č. 12



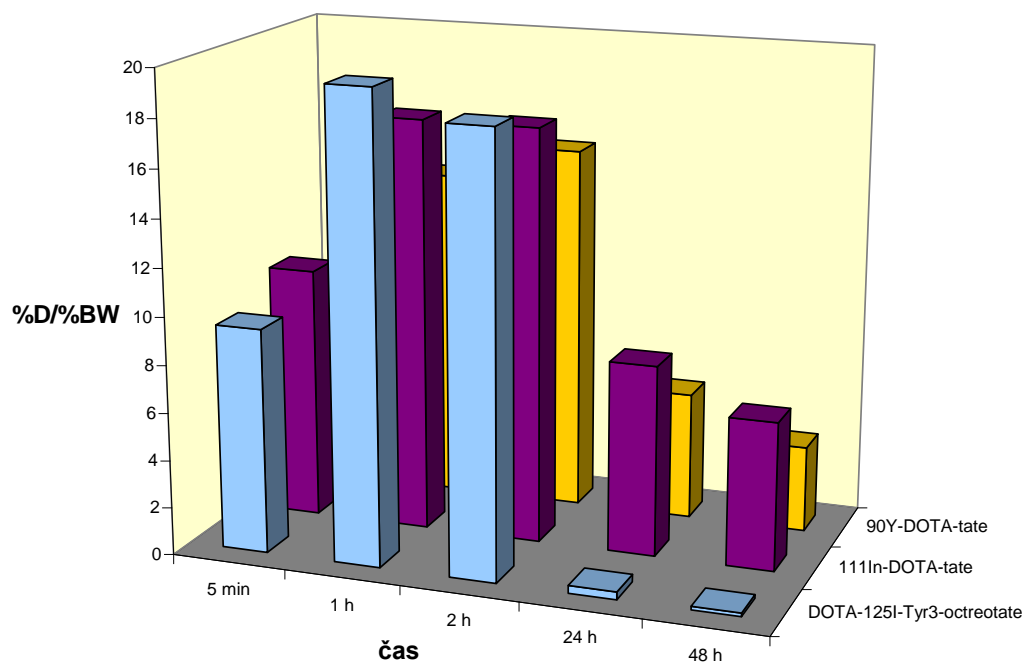
Graf č. 13

Distribuce značených peptidů do nadledvin



Graf č. 14

Distribuce značených peptidů do pankreatu



Graf č. 15

5 DISKUSE

V experimentální části byla pro radioaktivní značení peptidu DOTA-Tyr³-octreotátu použita metoda oxidativní jodace a jako oxidační činidlo byl použit chloramin T. Tato metoda byla vybrána zejména pro její jednoduchost, efektivnost a nízkou cenu.

Nebezpečím této reakce je vznik nežádoucích vedlejších produktů. Je proto snaha, aby reakce probíhala po co nejkratší možnou dobu, která by byla dostatečná pro efektivní značení a zároveň by omezila jodaci peptidu do druhého stupně. Vznik diiodovaných derivátů je nežádoucí z důvodu odlišných vlastností oproti mono-jodidům, např. jiná afinita k somatostatinovým receptorům nebo zvýšená lipofilita, a tedy odlišné farmakokinetické vlastnosti.

Dalším problémem této metody je zastavení oxidační reakce. K tomu mohou být použita redukční činidla, u nichž však hrozí nebezpečí poškození molekuly peptidu rozštěpením disulfidických můstků a následně ztráta biologické aktivity. K zastavení reakce může být použit také albumin, který je po přidání do reakční směsi díky svému přebytku hlavním substrátem jodace. V tomto případě je však složitá následná separace vzniklých produktů. Jinou možností, která byla použita v tomto případě, je zastavení reakce nástřikem na HPLC kolonu, kdy dochází k rychlé separaci jednotlivých složek reakční směsi.

Jinou metodou kromě HPLC vhodnou pro separaci reakčních produktů je extrakce na pevné fázi - SPE (Solid phase extraction). Jedná se o velmi výhodnou předseparační techniku a pro svou jednoduchost a nízkou cenu je také často využívána na odděleních nukleární medicíny pro přečišťování značených peptidů po jejich značení kovovými radionuklidy. Avšak v případě jódem značených peptidů není schopna oddělit jednotlivé jodované a případně polymerní formy značeného peptidu.

V současné době nejsou izotopy jódu nejčastěji využívaným prvkem pro diagnostiku a terapii receptorově pozitivních nádorů. Jódem značené peptidy jsou v porovnání s peptidy, které jsou značeny např. indiem, techneciem, ytriem nebo luteciem, méně stabilní, což může vést k negativnímu ovlivnění diagnostických a terapeutických výsledků. Radioaktivně značené peptidy pomocí izotopů jódu však byly využity při vysvětlení mechanismu zádrže radioaktivity v ledvinných buňkách při nádorové terapii. Jódem jsou peptidy značeny nikoliv v chelátové části, ale přímo v aminokyselinové sekvenci, kterou je buněčný aparát schopen po rozštěpení v lysozómech transportovat ven z buňky. Naproti tomu, jsou-li peptidy značeny pomocí chelatonu DOTA, zůstává tento chelaton s radionuklidem po rozštěpení enzymy uvnitř buňky (buňky nemají transportní mechanismus pro tuto umělou

strukturu) a jsou příčinou následného poškození eliminačních orgánů (ledvin). Tato hypotéza byla potvrzena porovnáním výsledků biodistribuce, kdy po podání receptorově specifických peptidů značených kovovými radionuklidy byla v orgánech s vysokou hustotou somatostatinových receptorů (nadledviny a pankreas) a dále v ledvinách nalezena vysoká koncentrace aktivity v dlouhých časech po aplikaci, zatímco hladiny jodovaných peptidů výrazně klesaly v mnohem kratších časech po aplikaci (43).

6 Závěr

- Byla prostudována literatura týkající se radioaktivně značených receptorově specifických peptidů se zaměřením na derivát somatostatinu octreotid a jeho analogy.
- Dále byla prostudována literatura z oblasti radioaktivního značení biologicky aktivních sloučenin izotopy jódu.
- V experimentální části byla odzkoušena metoda značení somatostatinového analogu DOTA-Tyr³-octreotátu oxidativní jodací s použitím chloraminu T a dva způsoby separace výsledného produktu.
- Nalezená metoda HPLC pro semipreparaci DOTA-¹²⁵I-Tyr³-octreotátu z reakční směsi byla dále použita k analýze moči experimentálních zvířat po *i.v.* aplikaci značeného peptidu.

7 Seznam literatury

- 1) Milan Lázníček, Pavel Komárek. Základy radiofarmacie *Praha 1998*, 36.
- 2) Jean Claude Reubi. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews* 2003;24(4):389-427.
- 3) Heppeler A, Froidevaux S, Eberle AN, Mäcke HR. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr Med Chem* 2000;7(9):971-994.
- 4) Leo J Hofland, Steven WJ Lamberts. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocrine Reviews* 2003;24(1):28-47.
- 5) Dagmar Lincová, Hassan Farghali et al. Základní a aplikovaná farmakologie. *Galén, Praha 2005, 1. vydání, 361, 363.*
- 6) Wout AP Breeman, Marion de Jong, Dik J Kwekkeboom, Roelf Valkema, Willem H Bakker, Peter PM Kooij, Theo J Visser, Eric P Krenning. Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1421-1429.
- 7) Behr TM, Gotthardt M, Barth A, Béhé M. Imaging tumors with peptide-based radioligands. *Q J Nucl Med* 2001;45:189-200.
- 8) Abstracts of an international conference on peptide radiopharmaceuticals in diagnosis and therapy. *Nuclear Medicine Communications* 2000;21,561-596.
- 9) Bodei L, Paganelli G, Mariani G. Receptor radionuclide therapy of tumors: a road from basic research to clinical applications. *J Nucl Med* 2006;47(3):375-377.

- 10) Virgolini I, Traub T, Novotny C, Leimer M, Füger B, Li SR, Patri P, Pangerl T, Angelberger P, Raderer M, Andreae F, Kurtaran A, Dudczak R. New trends in peptide receptor radioligands. *Q J Nucl Med* 2001;45:153-9.
- 11) Reubi JC, Schär JC, Waser B, Wenger S, Heppeler A, Schmitt JS, Mäcke HR. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 2000;27:273-282.
- 12) Cescato R, Schulz S, Waser B, Eltschinger V, Rivier JE, Wester HJ, Culler M, Ginj M, Liu Q, Schonbrunn A, Reubi JC. Internalization of sst₂, sst₃, sst₅ receptors: Effects of somatostatin agonists and antagonists. *J Nucl Med* 2006;47(3):502-511.
- 13) Storch D, Béhé M, Walter MA, Chen J, Powell P, Mikolajczak R, Mäcke RH. Evaluation of [^{99m}Tc/EDDA/HYNIC⁰]Octreotide Derivatives Compared with [¹¹¹In-DOTA⁰,Tyr³, Thr⁸]Octreotide and [¹¹¹In-DTPA⁰]Octreotide: Does Tumor or Pancreas Uptake Correlate with the Rate of Internalization? *J Nucl Med* 2005 Sep,46(9):1561-9.
- 14) Lister-James J, Moyer BR, Dean T. Small peptides radiolabeled with ^{99m}Tc. *QJ Nucl Med* 1996;40:221-33.
- 15) Kopecký M, Trejtnar F, Lázníček M, Lázníčková A, Semecký V, Maina T, Nock B. ^{99m}Tc demotate 1: biodistribution and elimination characteristics in rats. *Nucl Med Commun* 2005;26:549-55.
- 16) Esser JP, Krenning EP, Teunissen JJ, Kooij PP, van Gameren AL, Bakker WH, Kwekkeboom DJ. Comparison of [(177)Lu-DOTA (0), Tyr (3)]octreotate and [(177)Lu-DOTA (0), Tyr (3)]octreotide: which peptide is preferable for PRRT? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006 Nov, 33(11):1346-51.
- 17) Marion de Jong, Wout AP Breeman, Roelf Valkema, Bert F Bernard, Eric P Krenning. Combination radionuclide therapy using ¹⁷⁷Lu- and ⁹⁰Y-labeled somatostatin analogs. *J Nucl Med* 2005 Jan, 46(1):13S-17S.

- 18) Yamada A, Traboulsi A, Dittert LW, Hussain AA. Chloramin-T in radiolabeling techniques. III. Radioiodination of biomolecules containing thioether groups. *Anal Biochem* 2000;277(2),232-235.
- 19) Coenen HH, Moerlein SM, Stöckling G. No-carrier-added radiohalogenation methods with heavy halogens. *Radiochim Acta* 1983;34:47-68. (citováno viz. odkaz 42)
- 20) Markwell MAK. A new solid state reagent to iodinate proteins I. Conditions for the efficient labelling of antiserum. *Anal Biochem* 1982;-427.
- 21) Coenen HH, Petzold G, Stöckling G. Recent studies of radiobromination and iodination (nca) with chloramine-T in aqueous and organic solvents. *J Lab Comp Radiopharm* 1982;19:1580-1581.
- 22) Fraker PI, Speck Jr JC. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3 α -6 α -diphenylglycouril. *Biochem Biophys Res Com* 1978;80:849-856. (citováno viz. odkaz 42)
- 23) Mennicke E, Holschbach M, coenen HH. Electrophilic radioiodination of deactivated arenes with N-chlorosuccinimide. *J Lab Comp Radiopharm* 2000;43:721-737. (citováno viz. odkaz 42)
- 24) Moerlein SM, Beyer W, Stöckling G. No-carrier-added radiobromination and radioiodination of aromatic rings using in situ generated peracetic acid. *J Chem Soc Perkin Trans I* 1988;3:779-786.
- 25) Kabalka GW, Goodman MM. Synthesis of radiopharmaceuticals via organoboranes. In: Emram AM, ed. New trends in radiopharmaceutical synthesis, quality assurance and regulatory control. New York: *Plenum Press*, 1991:S289-S301.
- 26) Kabalka GW, Varma RS. The synthesis of radiolabelled compounds via organometallic intermediates. *Tetrahedron* 1989;45:6601-6621.

- 27) Wilbur DS. Radiohalogenation of proteins: An overview of radionuclides, labelling methods and reagents for conjugate labelling. *Bioconjug Chem* 1992;3:435-470.
- 28) Behr TM, Gotthardt M, Becker W, Behe M. Radioiodination of monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. A review of standardized, reliable and safe procedures for clinical grade levels kBq to GBq in the Göttingen/Marburg experience. *Nuklearmedizin* 2002;41,71-79.
- 29) Haubner R, Wester HJ, Reuning U, Senekowitsch-Schmidtke R, Diefenbach B, Kessler H, Stöcklin G, Schwaiger M. Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med* 1999;40:1061-1071. (citováno viz. odkaz 42)
- 30) Knight LC, Welch MJ. Sites of direct and indirect halogenation of albumin. *Biochim Biophys Acta* 1978;543:185-195. (citováno viz. odkaz 42)
- 31) Mc Farlane AS. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 1958;182:533-53. (citováno viz. odkaz 42)
- 32) Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 1963;89:114-123.
- 33) Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 2002;194:495-496. (citováno viz. odkaz 42)
- 34) Salcinski PRP, McLean C, Sykes JEC, Clement-Jones VV, Lowry PJ. Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using a solid-phase oxidizing agent 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycouril (iodogen). *Anal Biochem* 1981;117:136-146.

- 35) Dunford HB. Peroxidase-catalyzed halide ion oxidation. *Redox Rep* 2002;5:169-171. (citováno viz. odkaz 42)
- 36) Thorell JI, Johansson BG. Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochim Biophys Acta* 1971;251:363-369.
- 37) Marchalonis JJ. An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem J* 1969;113:299-305.
- 38) Bolton AE, Hunter WM. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem J* 1973;133:529-539.
- 39) Brinkley M. A brief survey of methods for preparing conjugates with dyes, haptens and cross-linking reagents. *Bioconjug Chem* 1992;3:2-13. (citováno viz. odkaz 42)
- 40) Langone JJ. Radioiodination by use of the Bolton-Hunter and related reagents. *Methods Enzymol* 1981;73:113-127.
- 41) Wilbur DS, et al. Development of a stable radioiodinating reagent to label monoclonal antibodies for radiotherapy of cancer. *J Nucl Med* 1989;30(2),216-226.
- 42) Coenen HH, Mertens J, Mazière B. Compendium on radioiodination reactions and radioiodinated Radiopharmaceuticals. *Springer, Dordrecht, Holandsko, 2006.*
- 43) Alice Lázníčková: The effect of receptor-specific binding on distribution and elimination of radiolabelled somatostatin analogues. *COST B12 Meeting, Pisa, Italy, 7th November 2003.*