

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Příprava a analýza radioaktivně značených
biologicky aktivních látek**

Hradec Králové

2008

Mgr. Miloš Petřík

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc., za cenné rady, připomínky a pomoc při vedení po celou dobu mého doktorandského studia.

Děkuji také Prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc. a Univ. Doz. Dr. Clemensi Decristoforovi, jejichž dlouholeté zkušenosti v oblasti radiofarmacie mi velmi pomohly pro pochopení a získání základních vědomostí a praktických dovedností v této oblasti.

Velký dík patří také kolektivu katedry biofyziky a fyzikální chemie a pracovníkům oddělení radiofarmak katedry farmakologie a toxikologie, kteří mi vytvořili výborné podmínky pro vypracování této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Miloš Petřík

OBSAH

1	Úvod	7
2	Cíl práce	10
3	Teoretická část	13
	3.1. Radionuklidy	14
	3.1.1. Radionuklidy vhodné pro terapii	14
	3.1.2. Radionuklidy vhodné pro diagnostiku	16
	3.1.3. Typy radioaktivních přeměn	18
	3.2. Bifunkční chelátory	20
	3.2.1. Požadované vlastnosti BFC	20
	3.2.2. Termodynamická stabilita	20
	3.2.3. Kinetická stabilita	21
	3.2.4. Struktura BFC	22
	3.2.4.1. Vazebné jednotky vícefunkčních chelátorů	22
	3.2.4.2. Prostorové uspořádání vazebných jednotek vícefunkčních chelátorů	25
	3.2.5. Příklady BFC	27
	3.2.5.1. Acyklické BFC	27
	3.2.5.2. Cyklické BFC	28
	3.2.6. Účinnost tvorby radioaktivního komplexu	30
	3.3. Biologicky aktivní molekuly	30
	3.3.1. Protilátky a fragmenty protilátek	31
	3.3.1.1. Polyklonální a monoklonální protilátky	32
	3.3.1.2. Protilátky a fragmenty protilátek v nukleární medicíně	34
	3.3.1.2.1. Anti CD66 (a,b,c,e)	35
	3.3.2. Peptidy	36
	3.3.2.1. Somatostatin	38
	3.3.2.2. Gastrin a Cholecystokinin (CCK)	40
	3.3.2.3. Bombesin	41
	3.3.2.4. Vazoaktivní intestinální peptid	41
	3.3.2.5. Neurotensin	42
	3.3.2.6. α - Melanocyty stimulující hormon	43
	3.3.2.7. Substance P	43

3.4. Metody radioaktivního značení biologicky aktivních látek	43
3.4.1. Chemická syntéza	44
3.4.2. Výměnná reakce	45
3.4.3. Biochemická syntéza	46
3.4.4. Radiojodace makromolekul	46
3.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	47
3.6. Papírová a tenkovrstvá chromatografie (PC, TLC)	50
3.6.1. Papírová chromatografie (PC)	50
3.6.2. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	51
3.6.2.1. Instantní tenkovrstvá chromatografie na silikagelem potažených skleněných mikrovláčkách (ITLC-SG)	52
3.7. Gelově permeační chromatografie	52
4 Experimentální část	55
4.1. Radioaktivní značení a analýza bifunkčních chelátorů	56
4.1.1. Radioaktivní značení a analýza cyklických BFC	56
4.1.1.1. Příprava komplexu ^{111}In s H4do3apABn	56
4.1.1.2. Příprava komplexu ^{111}In s H5do3apPrA	59
4.1.1.3. Příprava komplexu ^{111}In s Do3a-pyNox	62
4.1.1.4. Příprava komplexu ^{111}In s H4dota	65
4.1.1.5. Analytické metody používané pro analýzu značených cyklických BFC	68
4.1.2. Radioaktivní značení a analýza acyklických BFC	71
4.1.2.1. Příprava komplexu ^{111}In s Amino-B2M3-A	71
4.1.2.2. Příprava komplexu ^{111}In s Amino-B2M3-B	74
4.1.2.3. Příprava komplexu ^{111}In s Amino-B2M3-E	77
4.1.2.4. Analytické metody používané pro analýzu značených acyklických BFC	80
4.2. Radioaktivní značení a analýza receptorově specifických peptidů	83
4.2.1. DOTA-Tyr ³ -oktreotát (DOTA-Tyr ³ -tát)	83
4.2.1.1. Příprava ^{111}In -DOTA-Tyr ³ -tátu	83
4.2.1.2. Příprava ^{177}Lu -DOTA-Tyr ³ -tátu	86
4.2.1.3. Příprava ^{90}Y -DOTA-Tyr ³ -tátu	88
4.2.1.4. Příprava DOTA- ^{125}I -Tyr ³ -tátu (značení oxidativní jodací chloraminovou metodou)	90

4.2.2. Glukosa-Tyr ³ -oktreotát (Glu-Tyr ³ -tát)	93
4.2.2.1. Příprava Glu- ¹²⁵ I-Tyr ³ -tátu (značení oxidativní jodací chloraminovou metodou)	93
4.2.3. DOTA-Nal ³ -oktreotid (DOTA-NOC)	97
4.2.3.1. Příprava ¹¹¹ In-DOTA-NOC	97
4.2.3.2. Příprava ¹⁷⁷ Lu-DOTA-NOC	100
4.2.3.3. Příprava ⁹⁰ Y-DOTA-NOC	102
4.2.4. Analytické metody používané pro analýzu značených peptidů	105
4.3. Radioaktivní značení a analýza protilátek	107
4.3.1. Radioaktivní značení antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A) _{4,5} indiem-111	107
4.3.2. Radioaktivní značení antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A) _{4,5} ytrem-90	108
4.3.3. Radioaktivní značení antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH ₂ PO(OH)CH ₂ -DO3A) _{2,3} indiem-111	109
4.3.3.1. Metoda stanovení stability ¹¹¹ In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH ₂ PO(OH)CH ₂ -DO3A) _{2,3}	110
4.3.3.2. Metoda stanovení stability ¹¹¹ In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH ₂ PO(OH)CH ₂ -DO3A) _{2,3} za přítomnosti vysoké koncentrace konkurenčního chelátoru EDTA	114
4.3.3.3. Metoda stanovení stability ¹¹¹ In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH ₂ PO(OH)CH ₂ -DO3A) _{2,3} v potkaní plazmě	118
4.3.4. Radioaktivní značení antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH ₂ PO(OH)CH ₂ -DO3A) _{2,3} ytrem-90	122
4.3.4.1. Metoda stanovení stability ⁹⁰ Y-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH ₂ PO(OH)CH ₂ -DO3A) _{2,3}	123
4.3.4.2. Metoda stanovení stability ⁹⁰ Y-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH ₂ PO(OH)CH ₂ -DO3A) _{2,3} za přítomnosti vysoké koncentrace konkurenčního chelátoru EDTA	127
4.3.4.3. Metoda stanovení stability ⁹⁰ Y-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH ₂ PO(OH)CH ₂ -DO3A) _{2,3} v potkaní plazmě	131
4.3.5. Analytické metody používané pro analýzu značených protilátek	135
4.4. Biologické experimenty	136
4.5. Použité materiály a přístroje	142

4.5.1.	<i>Chemikálie a materiál</i>	142
4.5.2.	<i>Přístrojové vybavení</i>	142
5	Výsledky a diskuse	143
5.1.	<i>Bifunkční chelátory</i>	144
5.1.1.	<i>Cyklické chelátory</i>	144
5.1.2.	<i>Acyklické chelátory</i>	145
5.2.	<i>Receptorově specifické peptidy</i>	145
5.2.1.	<i>Receptorově specifické peptidy značené kovovými radionuklidy</i>	146
5.2.2.	<i>Receptorově specifické peptidy značené oxidativní jodací</i>	146
5.3.	<i>Protilátky</i>	147
5.4.	<i>Biodistribuční studie</i>	148
6	Závěr	150
7	Souhrn	152
8	Summary	154
9	Přílohy	157
9.1.	<i>Přehled publikovaných prací</i>	158
9.1.1.	<i>Články</i>	158
9.1.2.	<i>Abstrakty a postery</i>	158
9.2.	<i>Potvrzení o absolvování studijního pobytu v Rakousku</i>	160
9.3.	<i>Petřík M., Lázníčková A., Lázníček M., Zalutsky M.R., Anticancer Research 27, 3941-3946 (2007)</i>	161
9.4.	<i>Lázníčková A., Petřík M., Hermann P., Lukeš I., Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 273, 583-586 (2007)</i>	167
9.5.	<i>Trejtmar F., Lázníček M., Lázníčková A., Kopecký M., Petřík M., Behe M., Schmidt J., Mäcke H.R., Maina T., Nock B., Anticancer Research 27, 907-912 (2007)</i>	171
10	Seznam použitých zkratk	177
11	Seznam použité literatury	180

1 Úvod

Velké množství biologicky aktivních molekul je v posledních dvaceti letech intenzivně studováno z hlediska jejich potenciálního využití v nukleární medicíně jako radiofarmak. Radiofarmaka jsou látky obsahující radionuklid a na odděleních nukleární medicíny jsou rutinně využívány pro diagnostiku nebo terapii mnoha onemocnění. Většinou se jedná o malé organické a anorganické sloučeniny. Nemalou skupinu radiofarmak rovněž tvoří sloučeniny odvozené od biopolymerů nebo jejich jednodušších stavebních jednotek¹⁻¹³. O možném použití radiofarmaka rozhoduje nejenom jeho chemická struktura, ale i typ navázaného radionuklidu. Diagnostická radiofarmaka mají ve své struktuře zabudovány buď, gama zářiče pro scintigrafická zobrazení, nebo pozitronové zářiče pro pozitronovou emisní tomografii. Radiofarmaka tohoto typu se podávají ve velmi nízkých koncentracích (10^{-6} - 10^{-8} mol/l) a neočekává se od nich žádný farmakologický účinek. Podstatou aplikace těchto látek je detailní popis morfologické struktury orgánů a testování jejich fyziologických funkcí. Kromě toho aplikace diagnostického radiofarmaka představuje neinvazivní metodu, díky níž lze velmi snadno hodnotit průběh nemoci a monitorovat účinek léčby^{4,8,10,14-18}. Naproti tomu terapeutická radiofarmaka obsahují buď čisté beta zářiče, nebo smíšené zářiče s emisí beta i gama záření, perspektivní jsou ale i některé alfa zářiče. Cílem terapeutické aplikace radionuklidů je místní ozáření patologické tkáně z minimální vzdálenosti. Přičemž vlastní léčba zářením je založena na biologickém účinku záření, které vratně nebo nevratně poškozuje funkci případně život buněk. Snahou je vystavit tomuto účinku nádorové buňky a ochránit zdravou tkáň^{8,14-18}.

Podle biodistribuce můžeme radioaktivně značené biologicky aktivní látky rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny řadíme látky, jejichž biodistribuce je výhradně daná jejich chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Druhou skupinu tvoří látky, jejichž biodistribuce je předurčena schopností vázat se na specifické receptory, proto se látky z této skupiny nazývají receptorově specifická radiofarmaka¹⁰. Tyto látky jsou obvykle složeny ze čtyř částí. Na biologicky aktivní část je přes linker, který se používá jako modifikátor farmakokinetiky těchto látek, navázán bifunkční chelátor (BFC), který pevně poutá patřičný ion kovu. Jako biologicky aktivní složka slouží polypeptidy, protilátky, fragmenty protilátek, oligonukleotidy, oligopeptidy, apod. Tyto látky se mohou vázat na patřičné receptory na povrchu buněk nebo přímo na matici tkáně. Bifunkční chelátor musí pevně vázat radionuklid a obsahovat další funkční skupinu, přes kterou je vázán na zbytek celého konjugátu^{4,8}.

Velmi důležitou skupinou receptorově specifických radiofarmak jsou neuropeptidy, zejména strukturální obdoby somatostatinu. Somatostatinové receptory jsou lokalizované

na buněčné membráně tumorů endokrinního původu, ale i ostatních nádorů pod endokrinní kontrolou. Somatostatin působí jako inhibitor sekrece růstového hormonu a růstu některých nádorů. Byla syntetizována celá řada jeho strukturálních obdob (např. oktreatid), poněvadž somatostatin má velmi krátký biologický poločas. Výsledky detekce neuroendokrinních tumorů provedené na stovkách pacientů s využitím radioaktivně značených peptidů ukazují vysokou senzitivitu a specifitu radiofarmak tohoto typu. Zavedení ^{111}In -DTPA-Octreatidu do klinické praxe a jeho úspěšné využití v diagnostice nádorových onemocnění podnítilo snahu o nalezení nových receptorově specifických radiofarmak. Kromě derivátů somatostatinu jsou v centru zájmu současného výzkumu i jiné biologicky aktivní peptidy, například peptidy ze skupiny bombesinu, derivátů gastrinu, cholecystokininu, vazoaktivního intestinálního peptidu, apod^{5,6,12,18-29}.

Nezbytnou podmínkou pro případné klinické využití studovaných značených biologicky aktivních látek je tvorba dostatečně pevného komplexu s danými radionuklidy s vysokou radiochemickou čistotou⁸. Radioaktivně označené biomolekuly je třeba před vlastním použitím k biologickým experimentům účinně vyčistit a čistotu potvrdit vhodnou analytickou metodou. Pro analýzu čistoty radioaktivně označených struktur a dělení intaktní látky od metabolitů pro případ studia jejich farmakokinetiky se nabízí řada metodik, jako jsou například kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi, gelová permeační chromatografie nebo extrakce na tuhé fázi. Pro rychlé určení radiochemické čistoty označených struktur na odděleních nukleární medicíny se velmi často využívají jednoduché analytické metody, jako je tenkovrstvá nebo papírová chromatografie.

2 Cíl práce

V současné době jsou předmětem intenzivního studia nejenom nové biologicky aktivní peptidy, protilátky a jejich fragmenty, ale i nové bifunkční chelátory umožňující vazbu různých perspektivních radionuklidů. Snahou je připravit termodynamicky i kineticky stabilní radioaktivně značené biomolekuly, které vykazují potřebnou stabilitu vůči vlivu endogenních enzymů a podstatně vyšší afinitu k daným receptorům, případně látky modifikované dalšími funkčními skupinami, které zvyšují jejich afinitu k nádorové tkáni (glykosilované deriváty, apod.).

Cíle této disertační práce lze rozdělit do několika skupin. První část se týkala vývoje nových bifunkčních chelátorů ze skupiny derivátů tetraazacyklododekantetraoctové kyseliny (DOTA), konkrétně ligandů 10-[[[(4-aminofenyl)hydroxyfosforyl]methyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina (H4do3apABn), 10-[[[(2-karboxyethyl)hydroxyfosforyl]methyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina (H5do3apPrA) a 1-[(1-oxo-1 λ^5 -pyridin-2-yl)methyl]-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-trioctová kyselina (Do3a-pyNox), které byly studovány ve spolupráci s katedrou anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a dále studia chelatačních schopností stereoizomerů ligandu 2-(4-aminobenzyl)-3-methyl-DTPA (Amino-B2M3-A, B, E), připravených firmou Azacycles s.r.o. Cílem těchto experimentů bylo nalezení vhodných podmínek (pH, teplota a koncentrační poměry) pro radioaktivní značení a analýzu radiochemické čistoty těchto látek, potenciálně využitelných k modifikaci nejruznějších biologicky aktivních sloučenin, především monoklonálních protilátek.

V další části této disertační práce byly prováděny studie možnosti efektivního značení komerčně dostupných peptidů DOTA-Tyr³-oktreotátu (DOTA-Tyr³-tát), DOTA-Nal³-oktreotidu (DOTA-NOC) pomocí ¹¹¹In, ⁹⁰Y a ¹⁷⁷Lu, a dále studie značení glukosa-Tyr³-oktreotátu (Glu-Tyr³-tát), který byl připraven na pracovišti profesora Zalutského v USA, oxidativní jodací jodem-¹²⁵I. U radioaktivně značených peptidů byla nejprve prováděna HPLC analýza jejich radiochemické čistoty a po aplikaci potkanům byla u některých z nich prováděna analýza jejich metabolismu a vylučování. Cílem tedy bylo nalézt optimální podmínky jak pro přípravu, tak pro analýzu radioaktivně značených biologicky aktivních peptidů.

Další skupinou studovaných sloučenin pak byly různě modifikované monoklonální protilátky vyvinuté firmou Azacycles s.r.o. Jednalo se o protilátku modifikovanou jednak necyklickým chelátorem - antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)₄₋₅, u níž byly studovány podmínky radioaktivního značení, ale i o protilátku modifikovanou

fosfinovým derivátem DOTA - antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃, kde bylo úkolem stanovit podmínky radioaktivního značení indiem-111 a ytriem-90 a stanovit radiochemickou čistotu a stabilitu značeného produktu.

Neméně důležitou součástí této práce bylo nalezení podmínek pro tzv. rychlé metody analýzy jako je například tenkovrstvá chromatografie na rychle vzlínajících vrstvách (ITLC-SG), apod., které jsou použitelné pro rutinní stanovení kvality radioaktivně značených přípravků na pracovištích nukleární medicíny.

3 Teoretická část

3.1. Radionuklidy

Začátky nukleární medicíny jsou spjaty se zavedením ^{131}I do klinické praxe pro terapii štítné žlázy v roce 1946, avšak obrovský rozvoj tohoto oboru nastal teprve s objevem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a následným vyvinutím prvního komerčního $^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátoru v roce 1964. Pro zobrazování se $^{99\text{m}}\text{Tc}$ díky svým ideálním fyzikálním vlastnostem (poločas 6h., $E_\gamma = 140\text{keV}$), univerzálnímu chemismu a možnosti generátorové produkce stalo základním a nejpoužívanějším radionuklidem v nukleární medicíně¹⁴. Kromě $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se i přes relativně vyšší cenu, díky svým fyzikálně-chemickým a chelatačním vlastnostem, s výhodou používá také ^{111}In . Významné uplatnění nachází mimojiné v preklinických studiích a při testování a potvrzení afinity biologicky aktivních látek k receptorům. Většina dalších radionuklidů je vyráběna v cyklotronech nebo jaderných reaktorech, což je velmi nákladné a méně dostupné pro okamžité podání. V současnosti existuje v nukleární medicíně kolem 100 procedur využívajících různé radionuklidy jak pro diagnostiku (zobrazování), tak terapii.

Vlastnosti ideálního radionuklidu vhodného pro terapii se dost liší od těch, které jsou vyžadovány u radionuklidů vhodných pro zobrazování. Energie radionuklidu využitelného pro zobrazení musí být vyhovující pro snímací zařízení, bez závažné absorpce tkání. Naproti tomu energie terapeutického radionuklidu musí působit především na buňky v postižené tkáni. Žádný radionuklid nemá v terapii takové postavení jako $^{99\text{m}}\text{Tc}$ v diagnostice. Při léčbě rakoviny byla posuzována účinnost alfa i beta zářičů. Nicméně radiobiologická účinnost alfa a beta zářičů je rozdílná. Alfa zářiče jsou schopné doručit na cílové místo vysoké dávky, avšak jejich dosah je podstatně nižší než u beta zářičů¹⁴⁻¹⁸.

3.1.1. Radionuklidy vhodné pro terapii

Tabulka 3.1 ukazuje některé radionuklidy potenciálně využitelné v radioterapii. Zvláštnímu zájmu se těší radioizotopy patřící mezi lanthanoidy, jejichž koordinační chemie je velmi podobná ytriu. Příprava, vlastnosti a koordinační chemie chelátorů je velmi dobře prozkoumána. Naproti tomu výběr nejvhodnějšího izotopu pro radioterapii je často těžkým úkolem, který vyžaduje zvážení řady faktorů, mezi něž patří rychlost vychytávání a setrvání radiofarmaka ve tkáni zájmu (v tumoru), krevní clearance, fyzikální poločas a dosažitelná specifická aktivita radionuklidu, případně ekonomický způsob jeho produkce³⁰⁻

³³. Zásadním úkolem terapeutických radiofarmak je doručit dostatečnou (tumorcidní) dávku záření do nádorových buněk bez vyvolání nezvladatelných vedlejších účinků.

Fyzikální poločas terapeutického radionuklidu by měl odpovídat biologickému poločasu radiofarmaka. Jestliže je poločas radionuklidu příliš krátký, bude většina aktivity vyzářena dříve, než radiofarmakum dosáhne maximálního poměru nádor (cíl)/tkáň (pozadí). Dokázat dosažení dostatečné dávky působící v tumoru (>50Gy) je v tomto případě velmi problematické³⁰⁻³². Na druhou stranu příliš dlouhý poločas by vedl k nadbytečnému ozáření zdravé tkáně. Ideálně by měl mít radionuklid poločas dostatečně dlouhý tak, aby minimální dosažená dávka byla (>40Gy/h) a aby poločas radionuklidu byl přiměřeně dlouhý s ohledem k přípravě, kontrole a doručení příslušného radiofarmaka k pacientovi.

Tabulka 3.1 - Nejčastěji používané a perspektivní radionuklidy pro terapii^{8,13,14,18,28,34,35}

Radionuklid	Poločas přeměny	Max E _{β⁻} (MeV)	E _γ (keV) (%)	Dosah záření v tkáních (průměr) (mm)
⁶⁷ Cu	61,8h.	0,577 (20%)	91 (7%) 93(16%) 185(48%)	0,27
⁹⁰ Y	64,1h.	2,27 (100%)	-	2,8
¹³¹ I	193h.	0,606 (90%)	364 (81%)	0,28
¹⁴⁹ Pm	53h.	1,07 (96%)	286 (3%)	0,71
¹⁵³ Sm	46,5h.	0,694 (50%)	103 (29%)	0,5
¹⁶⁶ Dy	81,6h.	0,40 (92%)	82,5 (13%)	0,18
¹⁷⁷ Lu	161,5h.	0,50 (79%)	208 (11%) 113 (6,4%)	0,24
¹⁸⁶ Re	89,3h.	1,071 (71%)	137 (8,5%)	0,7
¹⁸⁸ Re	17h.	2,120 (71%)	155 (15%)	2,4
²¹¹ At	7,2h.	5,87 (α, 42%) 0,78 (EC, 58%)	-	0,055 0,07
²¹² Bi	1h.	2,25 (β ⁻ , 64%) 6,1 (α, 36%)	727 (7%)	0,09 0,06
²¹³ Bi	46min.	5,87 (α, 2,2%) 1,42 (β ⁻ , 97,8%)	440 (27,3%)	0,06 0,08
²²⁵ Ac	240h.	5,83 (α, 51%)	-	0,06

Dále je třeba, při výběru radionuklidu určeného ke značení biologicky aktivní molekuly pro radioterapii, brát zřetel na jeho dostupnost a kvalitu. Radionuklidová čistota musí být dostatečná a reprodukovatelná, poněvadž i stopové množství nečistot může významně ovlivnit značení a čistotu značeného radiofarmaka. Vzhledem k tomu, že množství cílových receptorů na tumoru je omezeno, je vyžadováno, aby zvolený radionuklid měl vysokou specifickou aktivitu. Specifická aktivita závisí zejména na způsobu přípravy radionuklidu. Kromě toho je nutné minimalizovat výskyt i stopového množství kovových nečistot, které konkurují kovovému radionuklidu při vazbě na BFC a jejichž přítomnost snižuje radiochemickou čistotu značené biomolekuly. V případě radioterapeutik, kde se pro radioaktivní značení používá velkých aktivit, může i malé procento nečistot způsobit pacientovi závažné vedlejší účinky⁸.

3.1.2. Radionuklidy vhodné pro diagnostiku

Radionuklidy běžně užívané v nukleární medicíně pro diagnostiku jsou zaznamenány v tabulce 3.2. Typické vlastnosti požadované pro radiofarmakum vhodné k diagnostickým účelům v nukleární medicíně jsou - schopnost nahromadění a zadržení v cílovém orgánu, rapidní clearance z tkání a krve, schopnost neukládat se v necílových tkáních, minimální výskyt vedlejších účinků, nízká cena, jednoduchá příprava (možnost tvorby kitu) a vysoká specifita.

Pro diagnostiku se využívají radionuklidy emitující gama záření, které se používají pro scintigrafická zobrazení nebo radionuklidy emitující pozitrony, pro pozitronovou emisní tomografii. V současné době existuje množství procedur v nukleárně medicínské diagnostice využívajících různé gama a pozitronové zářiče. Zobrazování založené na emisi gama záření bylo úspěšně aplikováno pro téměř každý orgán (mozek, ledviny, srdce, plíce, kosti, atd.) stejně jako pro diagnostiku zánětu, aterosklerózy, trombózy a rakoviny. Dostupnost ^{18}F a obzvláště ^{18}F -fluorodeoxy-D-glukózy (FDG) vedla k praktickému používání pozitronové emisní tomografie (PET). Nicméně krátký poločas většiny pozitronových zářičů, s výjimkou ^{18}F (poločas = 1,83h.), je činí velmi nepraktickými pro rutinní použití z důvodu nutné přítomnosti cyklotronu na odděleních nukleární medicíny. Z tohoto pohledu se zdá být velmi perspektivním radionuklidem ^{68}Ga s poločasem 68min. a možností získávat jej z $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru^{12,36-38}.

Radiofarmaka obsahující tyto radionuklidy se podávají ve velmi nízkých koncentracích a neočekává se od nich žádný farmakologický účinek. Podstatou aplikace těchto látek je detailní popis morfologické struktury orgánů a testování jejich

fyziologických funkcí. Kromě toho aplikace diagnostického radiofarmaka představuje neinvazivní diagnostickou metodu, díky níž lze velmi snadno hodnotit průběh nemoci a monitorovat účinek léčby¹⁰.

Tabulka 3.2 - Nejčastěji používané a perspektivní radionuklidy pro diagnostiku^{14,18,28,34,35}

Radionuklid	Poločas přeměny	Typ přeměny	E_{γ} (keV)	E_{β^+} (keV) (průměr)
¹¹ C	20min.	β^+ (99,8%)	-	386
¹³ N	10min.	β^+ (99,8%)	-	492
¹⁵ O	2min.	β^+ (99,9%)	-	735
¹⁸ F	1,8h.	β^+ (96,7%), EZ (3,3%)	-	250
⁵⁵ Co	17,5h.	β^+ (76%), EZ (24%)	477	649, 436
⁶² Cu	9,7min.	β^+ (98%), EZ (2%)	1173	1316
⁶⁴ Cu	12,7h.	β^+ (28,5%), EZ (71,4%)	1346	278
⁶⁷ Ga	78,3h.	EZ (100%)	91, 93, 185, 300, 394	-
⁶⁸ Ga	68min.	β^+ (89%), EZ (11%)	1077	836
⁸⁶ Y	14,7h.	β^+ (32%), EZ (68%)	1076	1437, 883, 768, 681, 535
^{99m} Tc	6h.	IP (100%)	140	-
¹¹¹ In	67,9h.	EZ (100%)	245, 172	-
¹²³ I	13,2h.	EZ (100%)	159	-
¹²⁴ I	100,3h.	β^+ (22,8%), EZ (76,9%)	602	2137,1535
²⁰¹ Tl	72,9h.	EZ (100%)	167	-

Budoucnost radiofarmak využívaných pro diagnostiku se nachází zejména ve vývoji nových chelatačních činidel a receptorově specifických biomolekul, schopných doručit

radionuklid na místo určení, spíše, než ve vývoji a objevování nových vhodných radionuklidů.

3.1.3. Typy radioaktivních přeměn

Radioaktivní přeměny atomových jader souvisejí s jejich vnitřní strukturou. Při určitém počtu nukleonů v jádře je toto jádro stabilní pouze tehdy, je-li vhodný poměr počtu protonů a neutronů. Jádra s jiným poměrem se samovolně přeměňují na jádra jiná a tento jev je spojen s emisí nabitých částic, případně s vyzářením fotonu. Při radioaktivní přeměně vychází z jader atomů záření, které reaguje s prostředím, výsledkem čehož je ionizace nebo excitace atomů okolního prostředí. Radionuklidy se mohou samovolně přeměňovat buď jedním, nebo kombinací více způsobů radioaktivních přeměn, které probíhají následujícím způsobem¹⁶.

Přeměna alfa (α)

Při této přeměně se uvolňuje alfa částice, což je jádro helia obsahující dva protony a dva neutrony. Tato přeměna je typická pro těžší atomová jádra s protonovým číslem větším než 82. Alfa částice intenzivně ionizují prostředí a jejich dosah v tkáních je velmi malý (10^{-8} m). Přeměna alfa může být také doprovázena emisí záření gama^{16,17,39}.

Přeměna beta (β^-)

K této přeměně dochází tehdy, má-li jádro vyšší poměr počtu neutronů k počtu protonů než odpovídá stabilnímu jádru. Při přeměně β^- se z jádra emituje elektron a dochází také k přeměně jednoho neutronu na proton. Dosah záření β^- je ve tkáních větší (několik mm) než u záření alfa. Jestliže vzniklé dceřiné jádro je v excitovaném stavu, může být β^- přeměna doprovázena emisí záření gama^{16,17,39}.

Přeměna beta (β^+)

Tato přeměna je charakteristická pro jádra, která mají poměr počtu neutronů k počtu protonů nižší, než odpovídá stabilnímu jádru. Při přeměně β^+ se z jádra emituje pozitron a dochází také k přeměně jednoho protonu na neutron. Dosah záření β^+ je v hmotě malý, při setkání pozitronu s elektronem dochází k tzv. anihilaci, kdy pozitron a elektron zanikají a místo nich vznikají dva fotony o energii 511 keV vyzářené do protilehlých směrů^{16,17,39}.

Elektronový záchyt (EZ)

Elektronový záchyt je alternativou k přeměně β^+ . Vyskytuje se také u jader, která mají poměr počtu neutronů k počtu protonů nižší, než odpovídá stabilnímu jádru. V tomto případě jádro zachytí jeden z elektronů nejčastěji z vrstvy K a přitom se jeden proton přemění na neutron. Uvolněné místo v elektronové vrstvě K nemůže zůstat neobsazeno a je tedy zaplněno přeskokem elektronu z vyšší energetické hladiny, přitom dochází k emisi paprsků charakteristického Roentgenova záření (RTG)^{16,17,39}.

Přeměna gama (γ)

Jestliže je předchozí radioaktivní přeměnou (alfa nebo beta) vytvořeno jádro v energeticky vzbuzeném stavu, zbavuje se jádro přebytku své energie emisí fotonu a přechází na základní stav. Foton se vyzáří při přechodu nukleonů v jádře z vyšších energetických hladin na nižší. Gama záření je velmi pronikavé a radionuklidy emitující toto záření nachází široké uplatnění v radiodiagnostice^{16,17,39}.

Izomerický přechod (IP)

Při této přeměně se energeticky bohatší izomer prvku mění vyzářením gama kvanta na izomer energeticky chudší. Izomerickým přechodem se přeměňuje nejpoužívanější radionuklid v nukleární medicíně ^{99m}Tc na svůj dlouhodobý izotop ^{99}Tc ^{16,17,39}.

Vnitřní konverze (VK)

Jde o jev, při kterém je emise gama záření částečně nebo úplně nahrazena emisí elektronu z obalu téhož atomu. Takto vyzářené elektrony se nazývají konverzní elektrony. Uvolněné místo v elektronové vrstvě nemůže zůstat neobsazeno a je zaplněno přeskokem elektronu z vyšší energetické hladiny, přičemž dochází k vyzáření paprsků charakteristického RTG záření. Alternativou k emisi RTG záření při EZ nebo VK je tzv. Augerův jev, při kterém je rozdíl energie mezi dvěma elektronovými orbity přenesen na elektron z vnější vrstvy, který je emitován z atomu. Tyto elektrony se nazývají Augerovy elektrony^{16,17,39}.

Radionuklidy určené pro použití v nukleární medicíně jsou připravovány uměle ve speciálních zařízeních, jako je cyklotron nebo jaderný reaktor. Při přípravě radionuklidů je využíváno vhodné uměle vyvolané jaderné reakce, kterou ze stabilních prvků terčového materiálu vznikají požadované radionuklidy, případně je využíváno i produktů štěpení těžších atomových jader. Vedle zmíněných zdrojů radionuklidů je velmi významným

zdrojem získá tzv. dceřiných izotopů z radionuklidových generátorů. V nich vzniká samovolnou radioaktivní přeměnou z mateřského prvku, připraveného v jaderném reaktoru nebo cyklotronu, prvek dceřiný, který je také radioaktivní a má vhodné vlastnosti pro použití v nukleární medicíně^{16,17}.

3.2. Bifunkční chelátory

Bifunkční chelátory (BFC) jsou látky, které ve své struktuře obsahují část, která je schopna chelátovat kovy (např. radionuklidy) a část pomocí níž se chelátor váže na biologicky aktivní molekulu (BM). Jednou z možností je reakce aktivovaných karboxylových skupin chelátoru s volnými aminoskupinami biomolekuly za vzniku pevné amidové vazby, další možností je například reakce isothiokyanátů, apod.

3.2.1. Požadované vlastnosti BFC

Aby mohl být BFC bezpečně a efektivně využíván, musí splňovat několik požadavků. Musí tvořit termodynamicky a kineticky stabilní komplexy s radionuklidem, komplexace musí probíhat za vhodných podmínek (pH, čas, teplota) s vysokým výtěžkem a vzniklé komplexy musí vykazovat vysokou specifickou aktivitu. Při nedostatečné stabilitě kovového chelátu se mohou uvolňovat kovové ionty, které se, například v případě trojmocných kovů, ukládají v kostní dřeni. V případě nutnosti rychlé krevní clearance a renální exkrece radioaktivně označeného i neoznačeného konjugátu je nezbytné, aby byl BFC vysoce polární látkou. BFC musí být schopen odolat radiolýze a musí tvořit kovové cheláty s minimálním množstvím izomerů. Vazba radiofarmaka na nádorové buňky nezávisí pouze na afinitě biologicky aktivní molekuly k receptorům, ale také na farmakokinetice, která závisí na chemických i fyzikálních vlastnostech biomolekuly i kovového chelátu. Tvorba izomerů může mít velmi výrazný vliv na biologické vlastnosti radiofarmaka⁸.

3.2.2. Termodynamická stabilita

BFC musí tvořit kovové komplexy s vysokou termodynamickou stabilitou z důvodu zachování integrity při kompetici s přirozenými chelátory, jako je např. transferin. Ztráta radiokovu z komplexu může vyústit v kumulaci radioaktivity mimo cílový orgán. Je známo, že ⁹⁰Y a izotopy lanthanoidů se ochotně usazují v kostech⁴⁰. Což je způsobeno

jejich podobností s železem, které je přenášeno transferinem do kostní dřeně. Vysoká termodynamická stabilita však není jediným požadavkem, neboť vyjadřuje pouze směr, nikoliv rychlost reakce. Je třeba zdůraznit, že stabilita radiofarmaka v krevním řečišti je převážně daná kinetickou stabilitou, nikoliv termodynamickou stabilitou kovového komplexu⁸.

Nejběžnějším způsobem zvýšení termodynamické a kinetické stability kovových komplexů je použití polyfunkčního chelátoru. Výběr vhodného chelátoru velmi závisí na velikosti a koordinační geometrii kovového iontu. Lanthanoidy a yttrium patří mezi velké ionty, které k vyplnění koordinační sféry a tvorbě stabilních komplexů s makrocyclickými chelátory jako je DOTA a její deriváty, potřebují osm až devět donorových atomů.

Platí, že BFC s vyšším počtem funkčních skupin mají vyšší termodynamickou i kinetickou stabilitu, zejména pokud jsou do jejich struktury začleněny další donorové atomy⁸.

3.2.3. Kinetická stabilita

Kinetická stabilita je pojem týkající se rychlosti disociace radionuklidu z radiofarmaka. Kinetika disociace hraje důležitou úlohu u *in vivo* stability kovového komplexu. Zatímco rychlá kinetika disociace je charakteristická pro kovové komplexy acyklických chelátorů, jsou komplexy obsahující cyklický chelátor daleko více kineticky inertní⁴¹⁻⁴⁸.

Pro radiofarmaka obsahující ve své struktuře kovové radionuklidy a makrocyclické chelátory typu DOTA, by tedy měla být kysele katalyzovaná disociace radionuklidu z komplexu v krevním řečišti minimální a neočekává se, že výměna radionuklidu za jiný kov by měla být významným mechanismem způsobujícím toxicitu kostní dřeně. McMurry a kol. studovali protilátky s různými deriváty DTPA značené yttriem a zjistili, že kysele katalyzovaná disociace není hlavní cestou *in vivo* uvolňování yttria z komplexu⁴⁹. Důležitost kysele katalyzované disociace radionuklidu, kterou lze nalézt v literatuře je pravděpodobně poněkud zjednodušována. Nejvhodnější metodou pro vyhodnocení *in vivo* stability radiofarmaka zůstávají stále biologické studie na různých zvířecích modelech.

Výběr BFC s vhodnou kinetickou charakteristikou je také závislý na farmakokinetice radiofarmaka. Například značené protilátky, které mají dlouhý biologický poločas a jsou většinou metabolizovány játry, musí být modifikovány takovým kovovým komplexem, který vykazuje extrémně vysokou termodynamickou a kinetickou stabilitou, aby byl schopen odolat konkurenci s kovovými ionty a přirozenými chelátory plazmy. U malých značených biomolekul je biologický poločas obvykle mnohem kratší, a proto požadavek

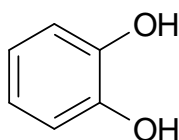
kinetické stability kovového komplexu není tak důležitý. Hlavním cílem ve výběru vhodného BFC je tedy minimalizovat *in vivo* disociaci radionuklidu z kovového komplexu radiofarmaka⁸.

3.2.4. Struktura BFC

3.2.4.1. Vazebné jednotky vicefunkčních chelátorů

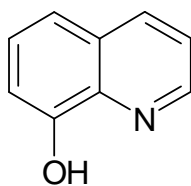
Struktura polyfunkčních chelátorů je tvořena vhodným uspořádáním jeho vazebných jednotek. V posledních několika letech bylo syntetizováno velké množství chelatačních činidel a byla studována jejich komplexace s různými kovovými ionty. Jedná se o deriváty katecholu, 8-hydroxychinolinu, aminofenolu, hydroxamáty, aminokarboxyláty, aminofosfonáty a hydroxypyridinony. Obecně lze říci, že chelátory obsahující ve své struktuře dva kyslíkové atomy (katecholy, hydroxamáty, hydroxypyridinony), aminokarboxyláty a aminofosfonáty jsou prostudovány více než ostatní skupiny chelatačních činidel⁸.

Katechol tvoří pevnou vazbu s trojmocnými kovy⁵⁰⁻⁵⁵, jako jsou In^{3+} , Fe^{3+} , Ln^{3+} , avšak hodnoty pK_a dvou fenolických skupin jsou příliš vysoké (9,2 a 13). Při neutrálním a nižším pH dochází ke kompetici mezi protonem a kovovým iontem což vede k tvorbě řady sloučenin.



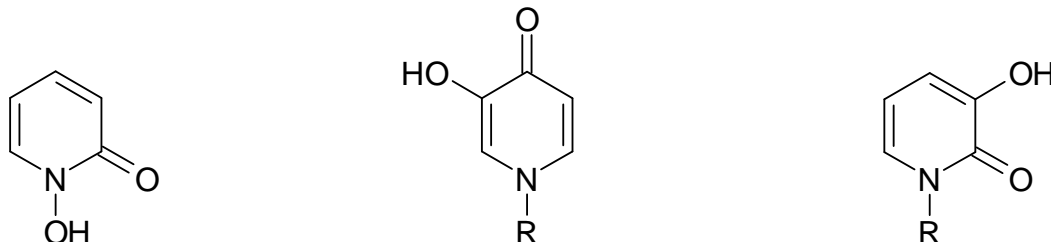
Obr. 3.1 - Katechol

8-hydroxychinolin disponuje vysokou afinitou k trojmocným kationtům, ale vazba není selektivní, velmi pevně váže také Cu^{2+} ionty⁵¹. Další nevýhodou hydroxychinolinu je jeho toxicita způsobená pravděpodobně jeho extrémní lipofilitou. Navíc hydroxylované aromatické sloučeniny jsou velmi náchylné k radiolýze. Proto vazebné jednotky chelátoru tvořené deriváty katecholu a 8-hydroxychinolinu nejsou pro radiofarmaka vhodné.



Obr. 3.2 - 8-hydroxychinolin

Hydroxypyridinony byly při přípravě léčiv používány jako náhrada za katecholy^{51,56,57}. Stejně jako hydroxamáty, jsou hydroxypyridinony monobazické sloučeniny, které tvoří stabilní komplexy s trojmocnými kovy - In^{3+} , Fe^{3+} , Ln^{3+} . Hydroxypyridinony se vyznačují relativně nízkými hodnotami pK_a a vysokou selektivitou k trojmocným kovům. Chelátory založené na hydroxypyridinonových vazebných jednotkách byly používány jako detoxikační látky kovů a jejich kovové komplexy byly studovány jako potenciální diagnostické látky v nukleární medicíně. Využitelnost hydroxypyridinonů jako vazebných jednotek pro vývoj nových BFC by mohla být omezena z důvodu jejich lipofility, způsobené přítomností aromatického kruhu v jejich struktuře⁸.



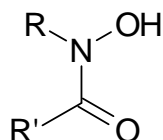
Obr. 3.3 - Hydroxypyridinony

Podobné omezení ze stejných důvodů mají i pyridinkarboxyláty a imidazolkarboxyláty. Avšak kombinace hydroxypyridinonů, pyridinkarboxylátů a imidazolkarboxylátů s hydrofilními vazebnými jednotkami by mohla vést k získání nových užitečných BFC.



Obr. 3.4 - Pyridinkarboxyláty, imidazolkarboxyláty

Hydroxamáty se hojně nacházejí v sideroforech bakterií a hub^{51,56-59}. Za fyziologických podmínek je u těchto sloučenin protonizován pouze jeden atom kyslíku (pK_a 9,35), proto jsou konstanty stability komplexů podstatně nižší než u katecholových vazebných jednotek. Ačkoliv bylo popsáno, že hydroxamátové vazebné jednotky tvoří vysoce stabilní komplexy s lanthanoidy⁶⁰, existuje jen velmi málo příkladů jejich využití jako BFC.



Obr. 3.5 - Hydroxamáty

Aminokarboxylové skupiny jsou velmi často součástí struktury vícefunkčních chelátorů, například DTPA a EDTA. Aminokarboxylové vazebné jednotky mají obecně vysokou afinitu k velkým kationtům, obzvláště k In^{3+} . EDTA ani DTPA však nejsou dostatečně velké sloučeniny na to, aby mohly kompletně obklopit kovové ionty lanthanoidů, a nechávají tak volná koordinací místa pro navázání molekul vody. EDTA má navíc vysokou afinitu k bivalentním kovovým iontům jako jsou Zn^{2+} , Ca^{2+} a Cu^{2+} . EDTA ani DTPA tedy nejsou specifické chelatační látky pro lanthanoidy^{51,56}. Vysoká selektivita polyaminokarboxylových chelátorů pro lanthanoidy může být dosažena použitím makrocyclické struktury s osmi nebo devíti donorovými atomy.



Obr. 3.6 - Aminokarboxyláty, diaminy

U aminofosfonátových skupin je známá jejich vysoká afinita k tzv. silným (tvrdým) kationtům jako např. Ca^{2+} . Kovové komplexy polyaminofosfonátů se často ukládají v kostech, proto jsou jejich komplexy s lanthanoidy studovány jako potenciální terapeutická radiofarmaka pro paliativní léčbu kostních metastáz. Nedávno byl dokonce komplex ^{153}Sm -EDTMP (Quadramet) schválen pro používání v nukleární medicíně^{61,62}. Aminofosfonáty obecně tvoří méně stabilní komplexy s kovovými ionty než

aminokarboxyláty. Ukládání polyaminofosfonátových komplexů v kostech a z toho vyplývající toxicita kostní dřeni nečiní tuto třídu chelátorů vhodnou pro radioaktivní značení biomolekul pomocí ^{90}Y nebo lanthanoidy⁸.



Obr. 3.7 - Aminofosfonáty

Aminothioly a amidothioly tvoří stabilní komplexy s jádery $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$ a $[\text{Re}=\text{O}]^{3+63,64}$. Diaminodithioly i diamidodithioly se používají jako bifunkční chelátory pro značení biomolekul techneciem ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Polyaminothioly tvoří také velmi silné komplexy s trojmocnými kovy, jako jsou Ga^{3+} , Fe^{3+} , In^{3+} a $\text{Ln}^{3+65-69}$.



Obr. 3.8 - Aminothioly, amidothioly

3.2.4.2. Prostorové uspořádání vazebných jednotek vícefunkčních chelátorů

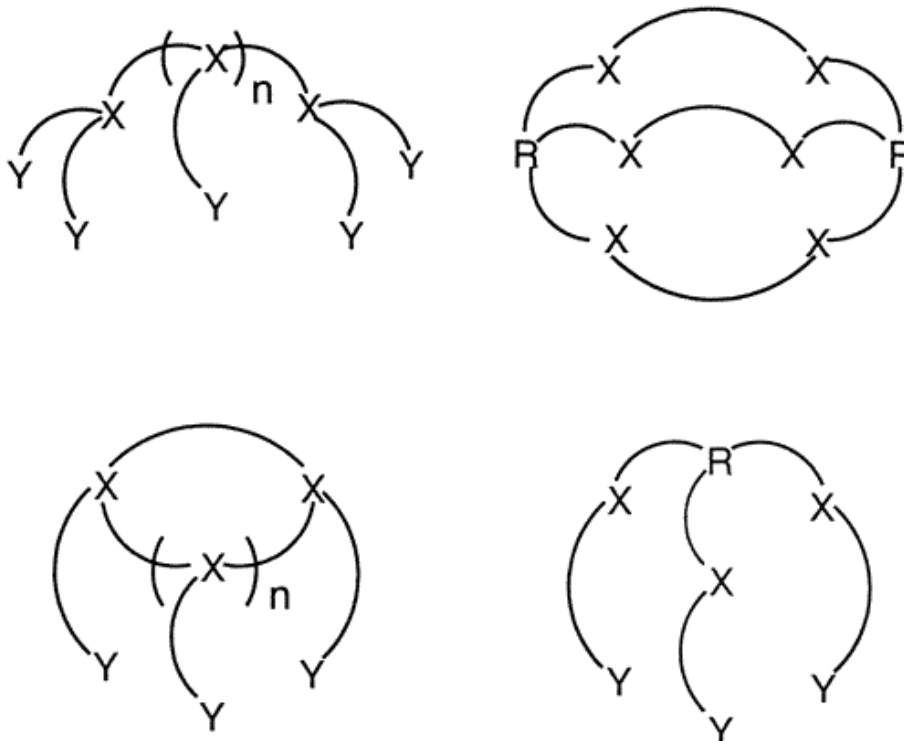
Vícefunkční chelátory s trojrozměrnými dutinami jsou vzhledem ke schopnosti zaujmout v nekomplexované formě předorganizovanou konformaci středem zájmu. Čím vyšší je stupeň předorganizace nekoordinovaného chelátoru, tím stabilnější kovové komplexy tvoří. Předorganizace prostorového uspořádání vazebných jednotek chelátoru také zvyšuje kinetickou stálost, která je důležitým faktorem při uvolňování radionuklidu z radiofarmaka.

Předorganizace snižuje volnost pohybu donorových atomů a prostorového uspořádání vazebných jednotek chelátoru v průběhu komplexace tak, že volný chelátor zaujímá podobnou konformaci jako v komplexní formě⁷⁰⁻⁷². Vzhledem k omezení volnosti pohybu je ztráta entropie při tvorbě komplexu podstatně nižší, což vede ke zvýšené termodynamické stabilitě kovového komplexu. Ačkoliv je předorganizace pojem zpravidla uplatňovaný u makrocyclických kovových komplexů, má jistou důležitost i u acyklických chelátorů. Například kovové komplexy CDTA (*trans*-cyklohexandiamintetraoctová

kyselina) jsou 2-3krát stabilnější než stejné komplexy EDTA, kvůli omezenému pohybu iminodioctových chelatačních ramen v CDTA⁷².

Je třeba zdůraznit, že předorganizace vícefunkčních chelátorů nevede pouze k vysoké termodynamické stabilitě, ale jak již bylo zmíněno, také ke zvýšení kinetické stability kovových komplexů. Tuto skutečnost lze doložit na následujícím příkladě. Poločas komplexu $Gd(DOTA)^-$ v 0,1 M HCl je 60,2h., zatímco komplex $Gd(DTPA)^{2-}$ je srovnatelně termodynamicky stabilní, v kyselém prostředí se velmi rychle rozkládá⁴⁶.

Vysoce předorganizovaná makrocyclická kostra chelátorů typu DOTA, nutí čtyři acetátová chelatační ramena přijmout konformaci, která „obaluje“ kovový iont N_4O_4 donorovou sadou⁷³. Přičemž pro koordinovaný acetát je daleko složitější být disociován z vazby s kovovým iontem. Předorganizace by tedy měla být důležitým faktorem při návrhu nových BFC vhodných pro značení biomolekul. Existuje několik způsobů, jak dosáhnout vysokého stupně předorganizace vícefunkčních chelátorů. Zahrnují využití makrocyclických struktur, uplatnění vodíkových vazeb k vytvoření trojrozměrné dutiny pro koordinaci kovu a výběr vhodných chelatačních ramen. Některé příklady prostorového uspořádání vazebných jednotek vícefunkčních chelátorů jsou znázorněny na obrázku 3.9.



Obr. 3.9 - Příklady prostorového uspořádání vazebných jednotek vícefunkčních chelátorů, X a Y představují donorové hetroatomy⁸

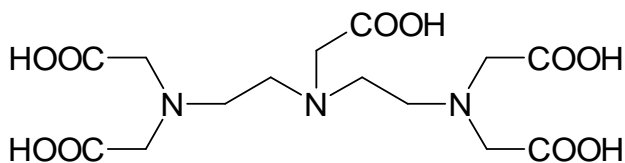
3.2.5. Příklady BFC

3.2.5.1. Acyklické BFC

O rozvoj analogů EDTA se v sedmdesátých letech zasloužili Sundberg a kol⁷⁴. Ve stejnou dobu Krejcarek s Tuckerem vyvinuli aktivovaný derivát DTPA, který mohl být navázán na proteiny⁷⁵. Od té doby se cyklický anhydrid DTPA stal velmi využívaným v nukleárně medicínském výzkumu⁷⁶. Tyto lineární BFC tvoří termodynamicky stabilní komplexy s množstvím kovových iontů (¹¹¹In, ⁹⁰Y, apod.). Hlavní výhodou použití analogů DTPA jako bifunkčních chelátorů je jejich velmi rychlá kinetika značení, což je důležitý faktor při značení protilátek a fragmentů protilátek, vzhledem k jejich citlivosti na zvýšenou teplotu. Avšak kovové komplexy acyklických chelátorů jsou velmi často kineticky labilní, což přispívá k uvolňování radionuklidu z komplexu a vede k významné toxicitě kostní dřevě⁷⁷⁻⁷⁹.

DTPA (*N*-diethylenetriaminpentaocetová kyselina)

Jedná se o silné chelatační činidlo, patřící do skupiny polyaminokarboxylových acyklických chelátorů. Často bývá používána k navázání ¹¹¹In, s nímž tvoří komplexy s osmi koordinačními vazbami. Na těchto vazbách se podílí všechny tři aminoskupiny a čtyři karboxylové skupiny, osmá pozice je obsazena amidovým kyslíkem^{80,81}. Ke konjugaci s biomolekulami (protilátky, proteiny, peptidy) je s úspěchem využíváno isobutylchloroformátu jako konjugačního činidla. ¹¹¹In-DTPA konjugáty vykazují excelentní stabilitu *in vivo*.

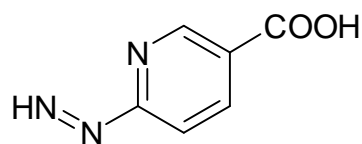


Obr. 3.10 - DTPA

DTPA je také velmi oblíbená pro široký výběr komerčně dostupných derivátů, pomocí nichž se podařilo naznačit velké množství biologicky aktivních molekul. Mezi nejpoužívanější analogy DTPA patří například aminobenzyl-DTPA, isothiokyanobenzyl-DTPA, bromacetamidobenzyl-DTPA, apod^{49,81-84}.

HYNIC (6-hydrazinonikotinová kyselina)

Abrams a kol. jako první použili arylhydraziny, mezi něž se řadí i HYNIC, jako bifunkční chelátory pro značení polyklonálních IgG pomocí $^{99m}\text{Tc}^{85,86}$. Od té doby byl HYNIC použit pro značení pomocí ^{99m}Tc u protilátek, chemotaktických peptidů, somatostatinových analogů, antisense oligonukleotidů a polypeptidů⁸⁷⁻¹⁰⁰. Výhodou použití HYNIC jako bifunkčního chelátoru je vysoká efektivita značení^{101,102}. Vzhledem k tomu, že HYNIC může v komplexu zaujmout pouze 1 nebo 2 koordinační místa, je k vytvoření stabilního komplexu nutné doplnit koordinační sféru Tc použitím koligandu. Použití koligandů jako jsou glukohexonát, etylendiamindioctová kyselina (EDDA), tricin, apod. umožňuje ovlivnění polaritě a farmakokinetických vlastností značených biomolekul. Nevýhodou použití koligandů je možnost tvorby derivátů komplexu v roztoku a nízká stabilita komplexů v roztoku při absenci nadbytku koligandu¹⁰³.



Obr. 3.11 - HYNIC

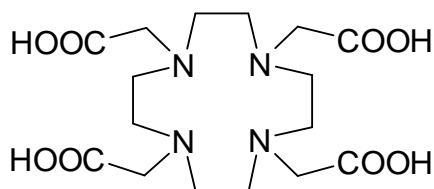
3.2.5.2. Cyklické BFC

Makrocyclické sloučeniny $(\text{XCH}_2\text{CH}_2)_n$ ($\text{X}=\text{O}, \text{NH}, \text{S}; n=4, 5, 6$) jsou známy již mnoho let. Velký zájem o tyto látky ale odstartoval až Pederson¹⁰⁴, který jako první popsal syntézu a unikátní komplexační vlastnosti mnoha makrocyclických látek. Od té doby bylo připraveno a zkoumáno velké množství makrocyclických chelátorů s různými donorovými atomy. Středem zájmu se staly tetraazamakrocycly a jejich N- nebo C-substituované deriváty. Makrocyclické BFC, jako DOTA, se těší zvláštnímu zájmu z několika důvodů. Prostorové uspořádání vazebných jednotek je velmi dobře zorganizováno, proto tvoří polyazamakrocycly vysoce termodynamicky a kineticky stabilní kovové komplexy¹⁰⁵⁻¹⁰⁹. Hodnoty pK_a karboxylových skupin se nachází v rozmezí 2-5. Nižší hodnoty pK_a vedou k nižší kompetici s protonem, vysoké stabilitě komplexu a minimálnímu uvolňování kovu z komplexu při kyselém pH. Funkční skupiny pro konjugaci biomolekuly se mohou vázat buď k jednomu ze čtyř dusíků nebo k jednomu z uhlíkových atomů makrocyclické struktury. Acetátové skupiny vázané k dusíkovým atomům mají nízkou molekulovou hmotnost a jsou velmi hydrofilní, proto je příspěvek BFC k celkové molekulové hmotnosti konjugátu BFC-biomolekula, zanedbatelný. Vysoká hydrofilita BFC je vítaná vlastnost,

která zvyšuje krevní clearance radiofarmak s nízkou molekulovou hmotností, což vede ke snížené kompetici mezi značeným a neznačeným konjugátem BFC-biomolekula při vazbě na cílové receptory. Jestliže je biomolekulou protilátka nebo fragment protilátky, vázaný BFC nemá tak dramatický vliv na fyzikální a biologické vlastnosti konjugátu BFC-biomolekula, jako je tomu u malých biomolekul⁸.

*DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododekan-*N,N',N'',N'''*-tetraoctová kyselina)*

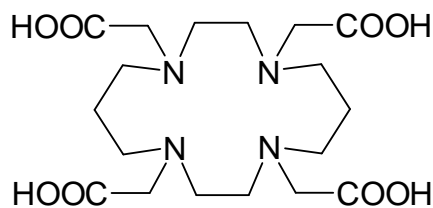
DOTA je tvořena dvanáctičlenným uzavřeným kruhem, patří tedy mezi makrocyclické BFC a představuje vhodnou alternativu pro DTPA. Vytváří velmi pevné komplexy s různými trojmocnými a dvojmocnými radionuklidy (^{66,67,68}Ga, ¹¹¹In, ^{86,90}Y, ¹⁷⁷Lu, ²⁷Mg, ⁴⁷Ca, ⁶⁴Cu). S úspěchem se využívají také její deriváty. Existují dvě skupiny těchto látek, DOTA analogy s postraními řetězci, přičemž biomolekula se váže přímo na tento řetězec a DOTA deriváty s aktivovanou jednou z karboxylových skupin pro usnadnění reakce s primární aminoskupinou biomolekuly. Mezi nejpoužívanější DOTA analogy patří například aminobenzyl-DOTA (PA-DOTA), isothiokyanobenzyl-DOTA (*p*-NCS-Bz-DOTA), DOTA-glutarová kyselina (DOTAGA)^{47,80-82}.



Obr. 3.12 - DOTA

*TETA (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-*N,N',N'',N'''*-tetraoctová kyselina)*

TETA je bifunkční chelatační činidlo tvořené čtrnáctičlenným makrocyclickým kruhem, obsahující čtyři karboxymethyl substituované dusíky. Díky velikosti kruhu se jedná o chelátor vhodný především pro tvorbu komplexů s izotopy mědi. Třebaže Cu²⁺-TETA komplexy jsou méně termodynamicky stabilní než Cu²⁺-EDTA nebo Cu²⁺-DTPA, jejich kinetická stabilita v lidském séru je daleko vyšší^{110,111}. S úspěchem se využívají také její deriváty, například bromacetamidobenzyl-TETA⁸⁰.



Obr. 3.13 - TETA

3.2.6. Účinnost tvorby radioaktivního komplexu

Účinnost radioaktivního značení vyjadřuje schopnost chelátoru tvořit komplex s radioaktivním kovem při nízkých koncentracích a za mírných podmínek. Účinnost radioaktivního značení chelátoru je značně závislá na podmínkách značení - koncentraci kovových nečistot v roztoku radioaktivního kovu, pH, teplotě, reakčním čase a koncentraci BFC. Je známo, že účinnost radioaktivního značení DOTA analogů je maximální, jen když je koncentrace BFC několikanásobně vyšší než koncentrace radioaktivního kovu^{112,113}. Značení při laboratorní teplotě je výhodnější a u značení některých biomolekul i nezbytné, oproti značení při vysokých teplotách - 100°C. Nicméně značení při nižších teplotách často vyžaduje prodloužení reakční doby a pro zajištění dostatečné radiochemické čistoty (RČ > 90%) je nutná vyšší koncentrace konjugátu bifunkčního chelátoru s biomolekulou (BFC-BM). Použití stejných podmínek značení při vyšší teplotě a delší reakční době obvykle vede ke zvýšení radiochemické čistoty, za předpokladu, že značená biomolekula je termostabilní. Výběr pufru závisí na hodnotě pH, která je pro komplexaci optimální. Nejčastěji se používají acetátové, citrátové, fosfátové, apod. pufrы o koncentraci 0,1 - 0,5 mol/l⁸.

3.3. Biologicky aktivní molekuly

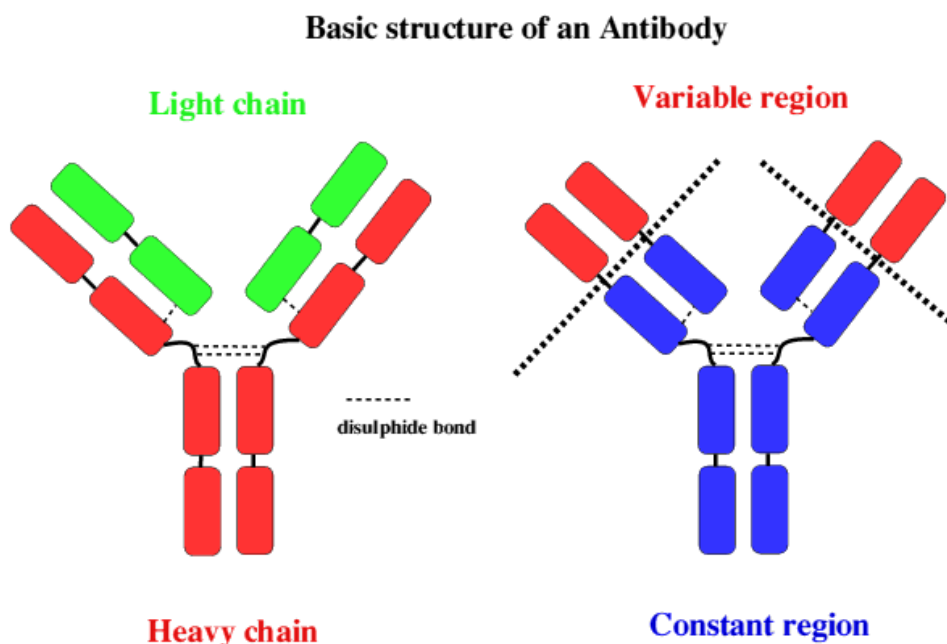
Biologicky aktivní molekuly radiofarmaka plní funkci „nosiče“, jehož pomocí je radionuklid dopraven do cílových orgánů, tkání a buněk. Tyto biomolekuly nejsou účinnou ani pomocnou látkou, ale protože významně ovlivňují distribuci radionuklidů, jsou tak integrální součástí účinné látky. Jako nosiče mohou sloužit jak makromolekulární látky typu protilátek a fragmentů protilátek, které mají vysokou afinitu a specifitu ke svým antigenům, tak malé biomolekuly typu peptidů a nepeptidových heterocyklů. Mezi tyto látky patří také přirozené biomolekuly jako například hormony a růstové faktory, které hrají zásadní roli v růstu buněk a buněčné proliferaci. V neposlední řadě mohou jako

nosiče sloužit také malé syntetické biomolekuly, které napodobují struktury přirozených makromolekul¹⁰.

Výběr vhodné biologicky aktivní molekuly je závislý na řadě faktorů - typu onemocnění, hustotě receptorů v postižené tkáni, afinitě biomolekuly k receptorům, internalizaci receptorů, velikosti a lipofilitě nosiče¹⁰.

3.3.1. Protilátky a fragmenty protilátek

Protilátky jsou bílkoviny, které jsou schopny jakožto součást imunitního systému specificky rozpoznat a zneškodnit jiné, často cizorodé objekty (mikroorganismy, viry, molekuly) v lidském těle. Protilátky produkované lidským organismem patří mezi glykoproteiny a jsou označovány jako imunoglobuliny. Během imunitní odpovědi jsou produkovány B-lymfocyty. Molekula imunoglobulinu se skládá ze dvou identických těžkých řetězců a ze dvou lehkých řetězců, které jsou navzájem pospojovány pomocí disulfidových můstků. Těžké řetězce se skládají ze čtyř či více strukturně podobných domén, zatímco lehké řetězce jsou tvořeny pouze dvěma doménami. Jednotlivé domény jsou tvořeny sekvencí aminokyselin. Některé z domén jsou variabilní a jejich struktury se individuálně liší, ostatní domény jsou konstantní a pro řetězce téhož typu jsou shodné. Variabilní domény lehkých a těžkých řetězců vytvářejí vazebné místo, do kterého pak jako klíč do zámku zapadá příslušný antigen, pro který je daná protilátka specifická. Působením enzymů (papain, pepsin) na citlivá místa molekuly imunoglobulinu lze získat fragmenty různé velikosti. Podle typu těžkého řetězce, který tvoří molekulu imunoglobulinu, dělíme imunoglobuliny do pěti tříd - IgG, IgM, IgE, IgD, IgA. Nejčastěji se vyskytujícím imunoglobulinem v lidském séru zdravých jedinců je IgG. IgG je u lidí jedinou imunoglobulinovou třídou, která prochází placentou a zajišťuje obranu novorozence v prvních měsících jeho života. Je třeba také zdůraznit, že IgG se u člověka největší mírou podílí na imunitní odpovědi¹¹⁴.



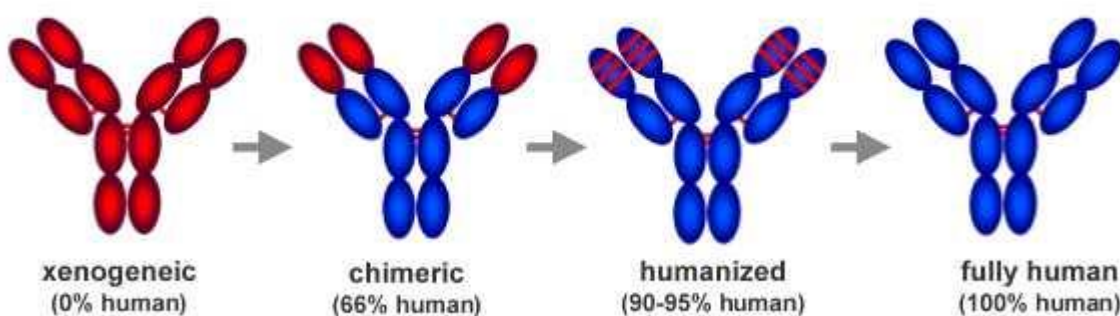
Obr. 3.14 - Základní struktura protilátek¹¹⁵

3.3.1.1. Polyklonální a monoklonální protilátky

Protilátková odpověď i proti nejjednodušším antigenům je většinou polyklonálního charakteru a výsledkem je směs velkého množství individuálně rozdílných molekul imunoglobulinů, které jsou produkovány velkým počtem různých klonů plazmocytů. Výsledkem záměrné imunizace experimentálních zvířat (králíků, koz, ovcí, myší, apod.) je pak polyklonální antisérum, které není tvořeno jednou čistou protilátkou, ale spíše směsí rozdílných protilátek specifických proti různým oblastem antigenu, takováto antiséra se mohou významně lišit, dokonce i když pocházejí ze stejného zvířete. Kromě toho postup přípravy polyklonálních protilátek zahrnující opakovanou imunizaci, kontrolu přítomnosti protilátek a následný odběr krve experimentálních zvířat začíná být kritizován ze strany ochránců zvířat, a proto je velmi přísně sledován a evidován. Často je tedy mnohem výhodnější použít homogenní protilátku o přesně definovaných vlastnostech - monoklonální protilátku¹¹⁴.

Monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu plazmocytů, jsou tedy specifické proti jediné antigenní determinantě a jsou jednoho izotypu. V organismu se vyskytují pouze v nepatrném množství, ale za patologických okolností mohou převládat, nejčastěji jako produkt nádoru plazmatických buněk, tzv. plazmocyтому (myelomu), při kterém se nádorově změněný plazmocyt vymkne regulaci, ale zachovává si schopnost produkovat protilátky jednoho izotypu a jedné náhodné, obvykle neznámé specifity.

Nejobvyklejším způsobem přípravy homogenních monoklonálních protilátek je fúze normálních B-lymfocytů s vhodnou myelomovou buněčnou linií, která dobře a neomezeně roste v tkáňové kultuře. Výsledkem fúze mezi specifickým B-lymfocytem a myelomem je hybridom, což je klon buněk schopný produkce monoklonálních protilátek. Zatímco mateřský normální B-lymfocyt (od imunizovaného dárce) je nositelem specifity produkované protilátky, myelomová buňka je nositelem vysokého až neomezeného proliferačního potenciálu. Hybridom tedy zdědí po myelomové buňce možnost nepřetržitého růstu a po aktivovaném B lymfocytu schopnost syntetizovat monoklonální protilátku namířenou proti jedné antigenní determinantě¹¹⁴.



Obr. 3.15 - Schéma vývoje terapeutických protilátek¹¹⁶

Zpočátku byly k dispozici jen myší monoklonální protilátky. Protože jde ale o lidskému organismu cizí bílkovinu, imunitní systém ji jako cizí rozpoznává a začne se proti ní bránit tvorbou vlastních (antimyších) protilátek. Při opakované aplikaci myší protilátky se tak snižuje její účinnost, roste riziko přecitlivosti apod. Z toho důvodu se objevily snahy o přípravu nejdříve chimerických (složených kromě myších i z humánních komponent, které tvoří až 70%), pak humanizovaných (kde humánní komponenty představují 90-95%) a nakonec plně humánních protilátek, které jsou zcela prosté rizika vyvolání imunitní reakce, protože jejich bílkovinná struktura je identická se strukturou protilátek produkovaných lidským organismem a neobsahují ani minimální příměs myších protilátek^{114,117}.

Hybridomové monoklonální protilátky jsou mimořádně důležitými nástroji biologického výzkumu a prakticky velmi užitečnými reagensy užívaných v klinické

praxi jako diagnostika i terapeutika a ve výzkumu jako nástroje analytické a biotechnologické s velkým komerčním významem.

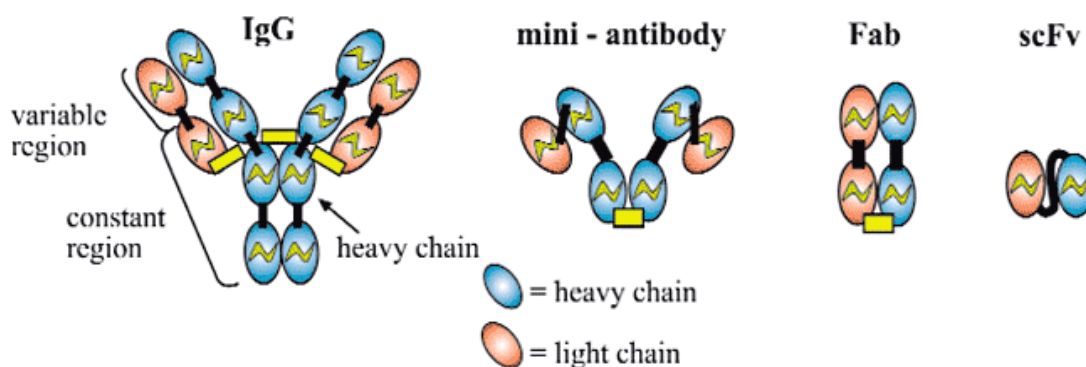
3.3.1.2. Protilátky a fragmenty protilátek v nukleární medicíně

Ještě v nedávné době byla v nukleární medicíně pozornost zaměřena především na monoklonální protilátky. Díky své různorodosti, specifitě a biologické aktivitě jsou monoklonální protilátky ideálním prostředkem pro rozmanitá použití u benigních i maligních onemocnění¹. Takovéto molekuly by poskytovaly účinný nástroj pro prakticky neomezenou paletu radiofarmak, která by mířila pouze do určitých tkání, nádorů nebo na vysoce specifické receptory. Za použití takovýchto látek by se nukleárně medicínské diagnostické metody staly vysoce konkurenčními pro ostatní využívané diagnostické způsoby a značení těchto látek alfa nebo beta zářiči, které se používají v nukleární medicíně pro radioterapii, by se stalo zásadním nástrojem pro onkologii. Takový významný průlom se bohužel neodehrál¹¹⁸.

Zkušenosti z posledních let pomohly objasnit výhody a nedostatky monoklonálních protilátek^{1,117,119-126}. Klinické studie s radioaktivně značenými protilátkami a fragmenty protilátek často ukazují omezené hromadění v cílovém místě, relativně pomalou krevní clearance (biodistribuci), která je daná jejich vysokou molekulovou hmotností, vysokou kumulací ve zdravých tkáních a jejich antigenní reakci vůči hostiteli. Nedostatečná účinnost radioaktivně značených protilátek je z části připisována omezené přístupnosti makromolekul k nádorovým buňkám v dostatečném množství a částečně také heterogenní distribucí nádorových antigenů na povrchu nádoru¹²⁷. Existuje také jistá pochybnost, zda mají protilátky a jejich fragmenty dostatečně vysokou afinitu a specifitu k receptorům. Obecně lze říci, že hromadění značených protilátek v tumoru je nedostatečné a poměr aktivity mezi cílovou a zdravou okolní tkání je nepříznivý¹²⁸. Pokud radioaktivně značená protilátka není doručována na cílové místo efektivně a uvolňována ze zdravých tkání dostatečně rychle, není vhodná pro diagnostiku ani radioterapii. Přesto si některé z těchto látek vydobily své místo v nukleární medicíně, jako například ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) a ¹³¹I-tositumomab (Bexxar)^{129,130}.

Jak již bylo zmíněno, protilátka by neměla mít pouze minimální imunitní odezvu dovolující opakované podání, ale i optimální schopnost vazby k antigenu, penetraci a rychlou clearance ze zdravých tkání pro efektivní a specifické zacílení nádoru. Jednou z cest k překonání těchto problémů byl vývoj nízkomolekulárních produktů, jako jsou

fragментy a subfragментy protilátek, které jsou schopny vazby na tumor při rychlém uvolnění za zdravých tkání^{117,131}.



Obr. 3.16 - Různé struktury protilátek a jejich fragmentů¹³²

Bivalentní i monovalentní fragmenty protilátek ukazují excelentní nádorovou penetraci a dobré terapeutické výsledky, ačkoliv doba zadržení v tumoru je nižší než u intaktních imunoglobulinů. Dokonce byly připraveny ještě menší jednořetězcové fragmenty s molekulovými hmotnostmi dovolující rapidní clearance z těla. Bylo zkoumáno množství různých molekul odvozených od imunoglobulinů s potenciálním využitím v radioterapii. Bohužel bylo zjištěno, že čím má fragment nižší molekulovou hmotnost, tím se snižuje doba zadržení v tumoru, což je důležitý parametr pro doručení terapeutické radiační dávky^{117, 133}. Ačkoliv imunoglobulinový fragment s ideální vazbou a zacílením tumoru nebyl zatím vytvořen, je věnována značná pozornost vývoji optimálnějších molekul^{1,2,5,10}. Od objevení peptidových receptorů a syntézy malých, biologicky aktivních peptidů se začal vývoj v radiofarmacii ubírat tímto směrem, tedy cestou receptorově specifických peptidů^{3-7,9,10,13,18}.

3.3.1.2.1. Anti CD66 (a,b,c,e)

Jedná se o nativní humánní monoklonální protilátku s molekulovou hmotností kolem 140 kDa, komerčně vyráběnou firmou Scintec Diagnostic (Švýcarsko). Anti CD66 (a,b,c,e) je s ohledem na její biokinetická data a klinické aplikace dobře definovaná protilátka s využitím při scintigrafii kostní dřeně a lokalizaci infekcí. Antigen CD66 se ve vysoké hustotě vyskytuje na normálních myelopoetických buňkách. Vysoká afinita protilátky pro její antigenní determinantu a hojný výskyt této antigenní determinanty v kostní dřeni vede ke kumulaci zhruba 50% protilátky v kostní dřeni již asi dvě hodiny po aplikaci.

V kombinaci s vhodným radionuklidem může tato protilátka představovat perspektivní nástroj využitelný v radioimunoterapii u pacientů s akutní myeloidní leukémií, myelodysplastickým syndromem, apod¹³⁴.

3.3.2. Peptidy

Peptidy jsou složeny z relativně jednoduchých stavebních jednotek, aminokyselin. Jsou tvořeny až 50 aminokyselinami a jejich molekulová hmotnost nepřesahuje 10 000 Da a zejména malé peptidy mohou být velmi snadno chemicky syntetizovány. Naproti tomu proteiny jsou velké molekuly, které zpravidla nemají dobře definovanou strukturu a často musí být získány z biologických zdrojů, například DNA-rekombinantními technikami. Peptidy patří mezi nezbytné prvky základních biologických procesů více než kterákoliv jiná skupina molekul. Působí jako neurotransmitery, neuromodulátory, hormony, růstové faktory, inhibitory růstu a cytokiny. Ačkoliv existují četné výjimky jako je inzulín, oxytocin a kalcitonin, většina peptidů není používána přímo jako léčiva, a často nejužitečnějším prostředkem pro terapii bývají deriváty, které působí jako agonisté nebo antagonisté přirozených peptidů. Vývoj peptidů a jejich analogů, které se mohou vázat na receptory ovlivňující biologické procesy je v posledních letech jednou z hlavních priorit biologických, chemických a lékařských věd⁵.

Pro radiofarmaceutický výzkum jsou velmi zajímavé jak specificky navržené peptidy imitující vazebné části proteinů a protilátek, tak přirozeně se vyskytující biologicky aktivní peptidy^{2,135}. Pro scintigrafickou detekci nebo zobrazení nádorů je nezbytné rychlé a masivní hromadění značených biomolekul v cílové tkáni. Vzhledem k tomu, že peptidy hrají také důležitou úlohu jak v růstu, tak i dalších buněčných funkcích nejenom normálních tkání, ale i tumorů, můžeme u mnoha typů rakoviny pozorovat vysoký počet receptorů na povrchu nádorů, což činí tyto receptory atraktivním cílem pro zobrazování tumorů^{12,135-138}. Na tato vysoce selektivní vazebná místa se může vázat i relativně krátká sekvence aminokyselin¹³⁵. Jedna z prvních klinicky významných aplikací byla popsána Krenningem a kol., který popsal výskyt tumorů endokrinního systému pomocí analogu somatostatinu značeného jodem¹³⁹. Derivát somatostatinu značený ¹¹¹In se poté začal rutinně používat v nukleární medicíně a umožnil tak účinné zacílení a zobrazení tkání s dostatečnou hustotou somatostatinových receptorů a tím usnadnil diagnostiku a studium neuroendokrinních tumorů⁵.

Studie s radioaktivně značenými peptidy ukazují oproti značeným proteinům a protilátkám několik výhod. Malé peptidy jsou distribuovány jednotněji, pronikají snadněji

tkáněmi, jsou vylučovány z cirkulace rychleji než protilátky nebo fragmenty protilátek, je u nich méně pravděpodobná imunitní odpověď a v neposlední řadě je u nich daleko rychlejší nádorový uptake. Navíc je lze poměrně snadno syntetizovat, jsou levnější (odpadají u nich drahé testy na přítomnost viru HIV a hepatitidy C) a jsou schopné odolat daleko drsnějším podmínkám při radioaktivním značení a modifikacích. Na druhou stranu i menší změny struktury mohou vést k významné ztrátě jejich vazebné afinity^{5,10}.

Velmi důležitou úlohu ovlivňující kinetiku a biodistribuci značené biologicky aktivní molekuly, hraje samozřejmě struktura peptidu. Hydrofilita zlepšuje renální clearance, zatímco více lipofilní peptidy vykazují značnou hepatobiliární exkreci. Na biodistribuci a kinetiku má také vliv radioaktivní značení, které může velmi významně ovlivňovat lipofilitu a výsledný náboj značené molekuly^{140,141}. Rychlý metabolismus nebo vylučování značeného peptidu snižuje možnost nahromadění radiofarmaka v cílovém místě, na druhou stranu, rychlá clearance zlepšuje poměr cíl/zdravá tkáň. Pro většinu receptorových systémů platí, že když agonista aktivuje receptor, dochází k internalizaci^{12,137}. Jakmile dojde k internalizaci, značený peptid projde intracelulárním katabolismem s následnou tvorbou značených metabolitů¹⁴². Biodistribuci a intracelulární zachycení značených metabolitů určují další tělesné dispozice. Peptidy značené jodem jsou katabolizovány na jodtyrosiny a jod, tyto látky vykazují rychlou clearance z receptorového místa i plazmy. Pro kovové radionuklidy jako jsou například ^{99m}Tc a ¹¹¹In se tyto mechanismy liší, protože transchelatace na intracelulární proteiny a proteiny plazmy prodlužuje dobu zadržení v receptorovém místě a plazmě, což vede k vychytávání značených látek hepatickým systémem⁵.

Pro scintigrafické zobrazení není ani tak důležitá skutečná velikost tumoru, jako receptorová hustota. Z toho důvodu i malé nádory, avšak s vysokou hustotou exprimovaných receptorů, mohou být snadno zobrazeny¹⁴³. Různé endogenní neuropeptidy regulují proliferaci nádorových buněk a interagují s odlišnými typy receptorů. Tyto receptory váží endogenní peptidy s vyšší afinitou než klasické (přenosové) receptory^{135,144}. Disociace je několikanásobně pomalejší než u neurotransmiterů, což činí diagnostické zobrazování pomocí značených analogů neuropeptidů proveditelné i přes nižší hustotu receptorů¹⁴⁴.

Značené biomolekuly určené k diagnostickým účelům, mohou být používány v daleko menších množstvích, než jsou dávky vykazující farmakologický účinek. Nicméně některé peptidy mohou mít významné hemodynamické efekty nebo mohou stimulovat růst nádorů již při velmi nízkých koncentracích - subnanogramová množství^{118,145}. Důležitým

požadavkem pro receptorovou scintigrafii je vysoká specifická aktivita značených látek, vzhledem k tomu že hustota receptorů je často poměrně nízká. Minimální množství podaného peptidu bude zeslabovat nepříznivé farmakologické účinky a snižovat obsazení receptorů, čímž bude optimalizováno specifické zacílení. Dosažení tohoto cíle bývá v některých případech komplikované, z toho důvodu se k přečištění značených peptidů v některých případech používá preparativní HPLC. Na druhou stranu někteří autoři uvádějí, že optimálního poměru cíl/pozadí, není dosaženo nejnižší možnou dávkou peptidu. Toto tvrzení lze vysvětlit upregulací receptorů a pozorováním, že nespecifická vazba je méně závislá na dávce¹⁴⁶. Podle Breemana a kol., se specifická vazba pentetrotidu zvyšuje s větším množstvím radiofarmaka, optimální hodnota je v mikrogramových množstvích¹⁴⁷.

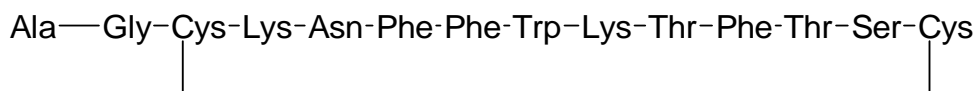
Jak již bylo zmíněno, mnoho peptidů je produkováno tkáněmi neuroendokrinního systému. Tyto vysoce účinné neuropeptidy zodpovědné za širokou paletu účinků a regulaci biologických procesů, mají díky rychlé exkreci a degradaci peptidázami, velmi krátký biologický poločas - řádově několik minut. Tato enzymatická destrukce může být potlačena různými molekulárními úpravami, jako například náhradou D-aminokyselin za L-aminokyseliny, začleněním aminoalkoholů a vložení neobvyklých aminokyselin nebo postranních řetězců^{135,148}. Jiným způsobem potlačení proteolytické degradace je amidace. Velká část přirozených peptidických hormonů jsou amidy, které v porovnání s volnými kyselinami vykazují zvýšenou biologickou aktivitu¹⁴⁹.

Nový rozvoj vizualizace tumorů prostřednictvím vazby peptidů na receptory nastal zhruba před 15 lety, kdy byly zavedeny do nukleární medicínské praxe pro *in vivo* zobrazování lidských nádorů radioaktivně značené somatostatinové analogy¹⁸. Od té doby bylo zkoumáno velké množství peptidů a receptorových systémů a mnoho z nich bylo navrženo pro potenciální využití v nukleární medicíně. Patří sem peptidy jako je bombesin, gastrin uvolňující peptid, vazoaktivní intestinální peptid, cholecystokinin, gastrin, neurotensin, α - melanocyty stimulující hormon, substance P, apod^{5,6,12}. Přesto byla doposud více či méně důkladně prozkoumána jen velmi malá část z velkého počtu potenciálně užitečných regulačních peptidů a budoucí práce pravděpodobně odhalí množství klinicky prospěšných peptidických radiofarmak.

3.3.2.1. Somatostatin

Přírodní somatostatin byl objeven v roce 1973, jedná se o cyklický peptid, složený ze 14 aminokyselin (obr. 3.17). Somatostatin patří do skupiny neuropeptidů a poprvé byl

izolován z hovězího hypotalamu¹⁵⁰. Jedná se o vysoce biologicky aktivní peptid, jehož funkce je především inhibiční s účinkem na celou řadu orgánů. Je odvozen od vysokomolekulárního prekursoru, který se následně štěpí na somatostatin-28 a somatostatin-14. Cyklická struktura a část řetězce (aminokyseliny 7-11) se zdají být podstatným faktorem pro vazbu na receptory.

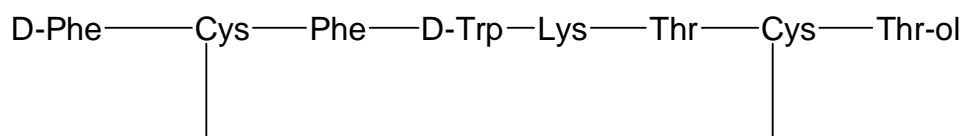


Obr. 3.17 - Somatostatin

Kromě hypotalamu je somatostatin uvolňován buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, střevními buňkami, hypofýzou a dalšími tkáněmi. Somatostatin plní regulační úlohu v mnoha tkáních. Předpokládá se, že v centrálním nervovém systému plní somatostatin funkci neurotransmiteru a neuromodulátoru¹⁵¹. Tlumí uvolňování růstového hormonu (GH), hormonu štítné žlázy (TSH), inhibuje uvolňování žaludečních a střevních hormonů jako jsou například cholecystokinin, gastrin, sekretin, vazoaktivní intestinální peptid, enteroglukagon, molitin. Inhibuje glandulární sekreci, kontraktilitu hladkého svalstva a funkci aktivovaných imunitních buněk. Somatostatin také prodlužuje žaludeční vyměšování, stahování žlučníku, střevní pohyblivost, inhibuje vyměšování endokrinních hormonů pankreatu tj. inzulínu a glukagonu a exokrinních hormonů pankreatu^{5,6,12}. Úloha somatostatinu na periférii není ovšem ještě zdaleka komplexně prozkoumána.

Účinek somatostatinu je zprostředkován vazbou na somatostatinové receptory. Somatostatinové receptory jsou integrální membránové glykoproteidy patřící do skupiny G-proteinů. *In vivo* a *in vitro* studie ukázaly, že somatostatinové receptory (SSTR) se hojně vyskytují na povrchu různých typů buněk. Velký význam má především výskyt somatostatinových receptorů na povrchu nádorových buněk. Jedná se o nádory hypofýzy, endokrinní pankreatické nádory, nádory žaludku, maligní nádory prsu, některé nádory mozku, nádory štítné žlázy, apod^{12,152,153}. Výzkum na úrovni molekulární biologie v nedávné době odhalil několik různých typů somatostatinových receptorů. V současnosti se rozlišuje 5 subtypů somatostatinových receptorů SSTR1-SSTR5^{12,154-159}, které se liší v interakci s formou somatostatinu (somatostatin - 28, somatostatin - 14) nebo s jeho deriváty¹⁶⁰, rozdílná je také jejich tkáňová distribuce¹⁶¹. Největší zastoupení na povrchu buněk mají somatostatinové receptory subtypu 2¹².

Přirozený ligand somatostatinových receptorů, endogenní somatostatin, má velmi krátký biologický poločas v řádu několika minut, čímž je znemožněna jeho dostatečná vazba na receptory a není tedy vhodný pro klinické využití v nukleární medicíně. Z tohoto důvodu byl vyvinut jeho analog, složený z 8 aminokyselin. Tento oktapeptid, oktreatid, má delší biologický poločas a je metabolicky stabilnější⁵. Zvýšení biologické stability bylo způsobeno začleněním (D) Phe¹, (D) Trp⁴ a Thr(ol)⁸ na citlivá místa peptidu (obr. 3.18). V roce 1994 získal FDA souhlas ke klinickému používání ¹¹¹In-DTPA-oktreatidu (OctreoScan), který se tak stal prototypem látek tohoto druhu v klinické praxi¹⁸.



Obr. 3.18 - Oktreatid

3.3.2.2. Gastrin a Cholecystokinin (CCK)

Gastrin a cholecystokinin jsou gastrointestinální peptidy, které se vyskytují v různých molekulárních formách¹². Biologicky aktivní peptidy strukturně podobné gastrinu a cholecystokininu mohou mít proměnlivou délku, avšak pětice koncových aminokyselin je vždy stejná. Tyto látky působí jako neurotransmitery v mozku, regulátory různých funkcí gastrointestinálního traktu, zejména na úrovni žaludku, pankreatu a žlučníku¹⁶²⁻¹⁶⁴. Navíc mohou účinkovat jako fyziologické růstové faktory ve většině částí gastrointestinálního traktu¹² a také jako růstové faktory některých typů rakoviny - tlustého střeva, žaludku, mozku^{12,165-167}. Účinek CCK a gastrinu je zprostředkován několika subtypy receptorů, nejlépe jsou popsány receptory CCK₁ a CCK₂^{163,168-170}. CCK₁ a CCK₂ receptory se liší afinitou ke gastrinu a mají také rozdílnou afinitu k nepeptidovým selektivním antagonistům CCK. Na CCK₁ receptor se váže pouze cholecystokinin, zatímco CCK₂ receptor je citlivý jak pro cholecystokinin tak pro gastrin. Nedávno byly popsány další subtypy CCK receptorů, což je výsledkem rozsáhlého a intenzivního výzkumu v této oblasti¹⁷¹⁻¹⁷³. CCK₁ i CCK₂ receptory byly identifikovány ve zdravých tkáních i nádorech. CCK₁ receptory se nacházejí mimo jiné ve žlučníku, mozku, žaludku a periferním nervovém systému^{12,163,164,174,175}, kromě několika výjimek - gastroenteropatické nádory, meningiomy, neuroblastomy, adenokarcinomy pankreatu^{176,177} se CCK₁ receptory vyskytují na nádorových buňkách poměrně zřídka¹⁷⁸. Naproti tomu CCK₂ receptory se převážně objevují v žaludeční sliznici, mozku, některých částech ledviny^{163,175,179,180} a

několika tumorech, jako například medulární thyroideální nádor, malobuněčný plicní nádor, stromatální ovariální nádor, gastroenteropatické neuroendokrinní nádory, gastrointestinální adenokarcinomy a další¹⁸¹⁻¹⁸⁵.

Radiofarmaka vyvinutá pro zobrazení nebo terapii těchto nádorů jsou buď minigastriny^{186,187} nebo nesulfátové CCK oktapeptidové deriváty navázané na DTPA nebo DOTA, značené nejčastěji ¹¹¹In nebo ⁹⁰Y.

3.3.2.3. Bombesin

Bombesin a gastrin uvolňující peptid (GRP) hrají kromě jejich fyziologických funkcí také důležitou úlohu v genezi rakoviny^{6,12,188-190}. Bombesin je peptid složený ze 14 aminokyselin, přítomný ve tkáních obojživelníků, zatímco GRP, složený z 27 aminokyselin, je jeho lidským protějškem. Oba peptidy ve své struktuře obsahují stejnou sekvenci aminokyselin, která je důležitá pro jejich účinek a která vysvětluje jejich podobnou biologickou aktivitu. GRP působí především v CNS a enterálním systému, kde reguluje několik fyziologických procesů, jako jsou termoregulace, cirkadiální rytmy, sytost, kontraktilita hladkého svalstva, imunitní funkce a uvolňování jiných peptidových hormonů^{12,189,190}. Nicméně ze všech účinků GRP se nejvíce studovaným stal ten, který souvisí s rakovinou. Bylo pozorováno, že rakovinné buňky stejně jako primární lidské tumory mohou syntetizovat jak bombesin, tak GRP¹⁹¹. Nedávno bylo také zjištěno, že bombesin a GRP hrají důležitou roli ve stimulaci proliferace malobuněčného plicního nádoru, rakoviny prsu a pankreatu^{6,12,192-196}. Navíc GRP podporuje růst rakovinných buněk u neuroblastomů nebo u rakoviny prostaty¹⁹⁷. Působení bombesinu a GRP je zprostředkováno vazbou na specifické membránové receptory G-proteinového typu. Rozlišovány jsou nejméně čtyři subtypy bombesin/GRP receptorů BB₁-BB₄¹⁹⁸⁻²⁰¹.

3.3.2.4. Vazoaktivní intestinální peptid

Vazoaktivní intestinální peptid (VIP) je neuropeptid složený z 28 aminokyselin, který byl izolován z tenkého střeva. Společně s peptidem aktivujícím hypofyzární adenylát cyklázu (PACAP) patří mezi důležité střevní neurotransmitery, současně plní také úlohu významných imunomodulátorů a neuromodulátorů v CNS^{5,6,12,202-206}. Jejich působení je zprostředkováno vazbou na specifické receptory. Díky molekulární biologii byla zjištěna existence několika subtypů VIP a PACAP receptorů^{207,208}. Popsány jsou zatím VPAC₁ a VPAC₂ receptory, oba typy mají vysokou afinitu jak pro VIP, tak pro PACAP. Identifikován byl také receptor pojmenovaný PAC₁, který je charakteristický sice vysokou

afinitou k PACAP, ale nízkou k VIP^{207,208} a bylo objeveno i několik dalších variant tohoto receptoru s odlišným farmakologickým chováním^{209,210}. Tyto receptory se nenachází jen v mozku, ale i ve většině epiteliálních tkání lidského těla. VPAC₁ se hojně vyskytuje například na hepatocytech, gastrointestinální mukóze, folikulech štítné žlázy, prostatě, močovém měchýři, močovodu, prsních kanálcích, plicních váčcích a pankreatu²¹¹⁻²¹³. V některých dalších tkáních jako jsou některé části mozku, hypofýza a dřev nadledvinek se převážně vyskytují PAC₁ receptory²¹⁴. Naopak hladké svalstvo v různých částech lidského těla je charakteristické pro výskyt VPAC₂ receptorů²¹⁴. Vysoká hustota VIP/PACAP receptorů je typická pro lymfatické uzliny, slezinu, brzlík a Peyerovy pláty. Přítomnost VIP/PACAP receptorů téměř ve všech tkáních ukazuje na mnohonásobné a komplexní biologické působení VIP/PACAP v lidském organismu¹².

Je také známo, že VIP podporuje růst normálních i rakovinných buněk. VIP/PACAP receptory byly lokalizovány na většině adenokarcinomů, nádorech prsu, nádorech prostaty, nádorech močového měchýře a karcinomech dělohy, tlustého střeva a jícnu. Navíc většina nádorů vaječníků, pankreatu, malobuněčných plicních nádorů a glioblastomů obsahuje VIP/PACAP receptory ve vysokém množství a stejně tak u neuroendokrinních tumorů je poměrně častý výskyt receptorů tohoto typu. Tyto údaje ukazují na vysoký potenciál radioaktivně značených derivátů odvozených od VIP a PACAP, vhodných pro *in vivo* scintigrafii a diagnostiku zmiňovaných tumorů^{6,12}.

3.3.2.5. Neurotensin

Neurotensin je tridekapeptid, který se vyskytuje jak v CNS, tak v periferních tkáních, zejména gastrointestinálním traktu²¹⁵⁻²¹⁷. V CNS neurotensin působí jako neurotransmiter a neuromodulátor a na periférii jako místní hormon. Navíc může stimulovat růst mnoha normálních buněk, například v tlustém střevě a pankreatu^{218,219}. Farmakologický účinek neurotensinu vyplývá z interakce peptidu s jeho receptory, které se nacházejí na povrchu buněk. Rozlišují se tři subtypy neurotensinových receptorů NTR₁-NTR₃. Nicméně farmakologie a způsob účinku neurotensinu nejsou v současnosti zcela jasné. Důležitá zjištění byla provedena Reubim a kol.²²⁰, kteří studovali několik pacientů s různými druhy poškození pankreatu - adenokarcinomy, rakovina endokrinního původu, chronická pankreatitida a zdravé pacienty za použití ¹²⁵I-Tyr³-neurotensinu. Získané výsledky otevírají možnost zobrazování adenokarcinomů pankreatu neuroendokrinního původu. Je známo, že neurotensinové receptory se vyskytují na různých nádorech, především na

neuroblastomech, malobuněčném plicním nádoru, tumorech tlustého střeva a již zmíněných nádorech pankreatu^{6,12,219}.

3.3.2.6. α - Melanocyty stimulující hormon

α - Melanocyty stimulující hormon (α -MSH) je peptid složený z 13 aminokyselin, odvozený od proopiomelanocortinu, který vykonává funkce v mozku, na periférii, ale primárně je odpovědný za regulaci kožní pigmentace^{221,222}. α -MSH hraje také významnou úlohu při regulaci proliferace a funkce melanomárních buněk²²¹. Bylo popsáno pět subtypů melanocortinových receptorů MC1-5-R, ale zřejmě jen MC1-R receptory jsou relevantní pro řízení melanomárních buněk²²³. Receptory pro α -MSH byly dokázány na povrchu lidských maligních melanomů²²⁴, proto byly tyto tumory navrženy jako potenciální cíle aplikace radioaktivně značených α -MSH peptidů. Pro radioaktivní značení a *in vivo* aplikaci byly připraveny analoga α -MSH konjugované k chelátorům jako je DTPA^{225,226} a DOTA⁶. Tyto sloučeniny vykazovaly dobrou biologickou aktivitu, přičemž se ukázalo, že použití DOTA dále zlepšuje specifitu biodistribuce, a proto by mohly být základem pro vytvoření úspěšného přípravku pro klinické použití^{6,12}.

3.3.2.7. Substance P

Substance P (SP) je undekapeptid patřící do skupiny tachykininů. Jedná se o neuropeptid účastnící se mnoha činnostmi v CNS a v periferním nervovém systému, včetně vnímání bolesti a vazodilatace^{6,12,227}. Receptory substance P, zejména NK₁ subtyp, se poměrně často vyskytují na gliálních tumorech, nádorech prsu, karcinomech štítné žlázy, pankreatických nádorech, malobuněčném plicním nádoru a glioblastomech^{228,229}. Vysoká incidence receptorů na glioblastomech dělá tyto receptory zajímavým cílem pro radioterapii tumorů tohoto typu, které mají velmi špatnou prognózu.

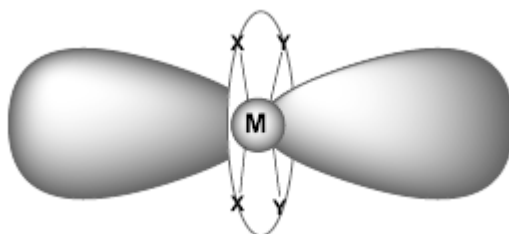
3.4. Metody radioaktivního značení biologicky aktivních sloučenin

K přípravě radioaktivně značených organických sloučenin pro klinické aplikace se využívají tři základní metody, a to klasická chemická syntéza, výměnná reakce a biochemická syntéza. Každá z uvedených metod má své výhody i nevýhody. Pro radioaktivní značení konkrétní sloučeniny je volba metody dána jednak chemickou strukturou značené látky a také povahou zvoleného radionuklidu.

3.4.1. Chemická syntéza

Příprava radioaktivně značených látek chemickou syntézou je založena na klasických metodách organické syntézy, modifikovaných tak, aby bylo možno pracovat v mikroměřítku (často nízké koncentrace výchozích látek), reakce by měla probíhat s vysokou výtěžností a měla by být časově nenáročná. Při tomto typu radioaktivního značení je radionuklid zabudován do molekuly pomocí koordinační nebo kovalentní vazby na vhodné místo ve struktuře organické látky.

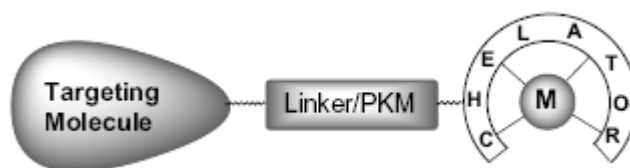
Pro radioaktivní značení receptorově specifických radiofarmak existuje několik vhodných přístupů²³⁰. Jedním z nich je postup založený na náhradě části receptorově specifického ligandu kovovým chelátem a jeho začlenění do struktury ligandu tak, aby došlo k minimálním změnám ve velikosti, konformaci a afinitě k receptorům (obr. 3.19)¹⁰. Nevýhodou tohoto přístupu je častý úbytek afinity k receptorům²³¹ a dále náročná syntéza takovéto molekuly. Výměna C-C nebo C-heteroatom vazeb za M-N, M-O nebo M-S vazby má významný vliv na velikost a konformaci molekuly, což jsou kritické faktory pro vazbu na receptory. Zavedení kovového jádra (chelátu) může také měnit lipofilitu receptorově specifického ligandu.



Obr. 3.19 - Způsob radioaktivního značení receptorově specifických radiofarmak¹⁰

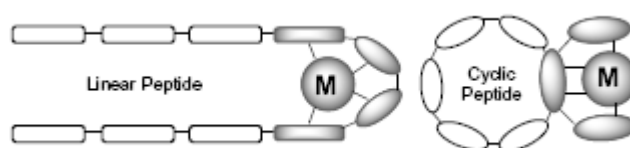
Další přístup je založen na spojení receptorově specifického ligandu s bifunkčním chelátorem přes linker, který plní funkci farmakokinetického modifikátoru (obr. 3.20)¹⁰. Bifunkční chelátor obsahuje ve své struktuře část, která je schopna chelátovat kovy (např. radionuklidy) a část pomocí níž se chelátor váže na biologicky aktivní molekulu, kterou mohou být protilátky, fragmenty protilátek, malé peptidy nebo i nepeptidové struktury. Výběr bifunkčního chelátoru je závislý na povaze a oxidačním stavu kovového iontu. Je třeba zdůraznit, že biologicky aktivní molekula je pouze jednou z částí radiofarmaka. Linker a kovový chelát jsou srovnatelně důležité složky. Výhodou tohoto přístupu je skutečnost, že kovový chelát je často dostatečně vzdálen od části, která se váže na receptor,

čímž se snižuje možnost interference při vazbě na receptory. Většina schválených i klinicky zkoumaných receptorově specifických radiofarmak využívá tento přístup.



Obr. 3.20 - Způsob radioaktivního značení receptorově specifických radiofarmak¹⁰

Třetí postup je založen na chelataci radionuklidu (^{99m}Tc nebo ^{188}Re) tripeptidovou sekvencí (jako např. Gly-Gly-Gly, Cys-Gly-Gly, Cys-Gly-Cys) obsahující N_4 , N_3S nebo N_2S_2 donorový soubor (obr. 3.21)¹⁰. Tripeptidová sekvence může být buď součástí lineárního řetězce polypeptidu, nebo částí struktury cyklického peptidu. Tento přístup se využívá především při značení analogů melanocyty stimulujícího hormonu pomocí ^{99m}Tc nebo ^{188}Re ^{10,232,233}.



Obr 3.21 - Způsob radioaktivního značení receptorově specifických radiofarmak¹⁰

3.4.2. Výměnná reakce

Při izotopové výměnné reakci je jeden či více atomů v molekule značené sloučeniny nahrazen svým radioaktivním izotopem. Předností této metody je to, že se jedná o jednostupňovou reakci, jejíž provedení je často velmi jednoduché a umožňuje tak přípravu radioaktivně značených sloučenin o vysoké měrné aktivitě a radiochemické čistotě. Tuto metodu lze s úspěchem použít v případě, kdy vyměňovaný atom je již přítomen v požadované molekule a jeho vazba je labilní. Výměnná reakce je tedy používána zejména pro značení látek obsahujících jod pomocí izotopů jodu (^{123}I , ^{125}I , ^{131}I), případně dalších látek obsahujících halogeny, v omezené míře i pro přípravu sloučenin značených ^{15}O , ^{13}N ^{16,234}.

3.4.3. Biochemická syntéza

Biochemická syntéza je metoda založená na schopnosti živých organismů produkovat z anorganických a jednoduchých organických sloučenin, pomocí biochemických procesů, složitější organické sloučeniny, využitelné v nukleární medicíně. Při této metodě je radionuklid obsažen v kultivačním mediu a živým mikroorganismem je zabudován do produkováných metabolitů. Požadovaný metabolit je poté chemicky separován. Biochemická syntéza se s výhodou využívá v případech, kdy danou sloučeninu nelze připravit jinými metodami, nebo je její příprava velmi složitá a náročná^{16,234}.

3.4.4. Radiojodace makromolekul

K zavedení radioaktivního jódu do struktury makromolekul lze použít izotopovou výměnou reakci, kdy je radioaktivní atom jódu ve formě jodidu vyměněn za neaktivní atom jódu, který je již přítomen ve struktuře značené molekuly. U makromolekul, které ve své struktuře neobsahují jód, se pro radioaktivní značení jódem využívá ve většině případů přímá jodace elektrofilní substitucí, v některých případech také adice jódu na dvojnou vazbu.

Při elektrofilní substituci dochází k záměně vodíkového iontu ve struktuře makromolekuly za ion I^+ . Vzhledem k tomu, že nejstabilnější chemická forma jódu ve vodných roztocích je jodid I^- , je nutné nejprve I^- vhodnými oxidačními činidly převést do stavu I^+ . Existuje velké množství oxidačních činidel a metod vhodných pro tento účel^{16,235}.

Jodmonochloridová metoda

Radioaktivní jodmonochlorid (ICl) byl historicky prvním činidlem užívaným pro značení proteinů, byl připraven izotopovou výměnnou reakcí s radioaktivním NaI. Značení touto metodou je rychlé a výskyt nežádoucích vedlejších reakcí je značně omezený.

Jodogenová metoda

Při této metodě se pro své oxidační schopnosti využívá jodogen (1,3,4,6-tetrachlor-3 α ,6 α -difenyglykouril), který se nejdříve rozpustí v metylenchloridu. Ten se pak odpaří s cílem vytvoření povlaku na vnitřní stěně reakční nádoby, do níž se následně přidají radioaktivní jodid a značená molekula. Protože jodogen je ve vodě těžce rozpustný, probíhá jodace v pevné fázi a nežádoucí vedlejší reakce jsou omezeny a stejně tak dochází k minimální degradaci makromolekul. Tato metoda je velmi vhodná pro radioaktivní značení makromolekul, jako jsou peptidy, monoklonální protilátky, apod.

Metoda s chloraminem T

Chloramin T (sodná sůl N-chlor-*p*-toluensulfonamidu) je slabé oxidační činidlo, které se při pokojové teplotě a neutrálním nebo bazickém pH velmi často používá pro jodaci peptidů a proteinů. K roztoku značené makromolekuly se přidá roztok radioaktivního jodidu a okamžitě poté roztok chloraminu T, reakce se ukončuje přidávkem redukčního činidla. Výtěžek jodace bývá velmi vysoký, nicméně chloramin T může způsobovat tvorbu makroagregátů, polymeraci, oxidaci methioninu, chloraci, apod. Tyto nevýhody se minimalizují použitím nejmenšího možného množství chloraminu T a včasným ukončením reakce.

Trijodidová metoda

Tato metoda je založená na adici radioaktivního jódu na značenou makromolekulu za přítomnosti směsi jodidu draselného a molekulárního jódu. Tato metoda se využívá například při značení bílkovin.

Enzymatická metoda

Jedná se o velmi šetrnou metodu vhodnou pro jodaci mnoha makromolekul. Do reakční směsi obsahující radioaktivní jodid a značenou makromolekulu se přidává velmi malé množství (nmol) peroxidu vodíku. Oxidace radioaktivního jodidu na I^+ je katalyzována přítomným enzymem (peroxidázou).

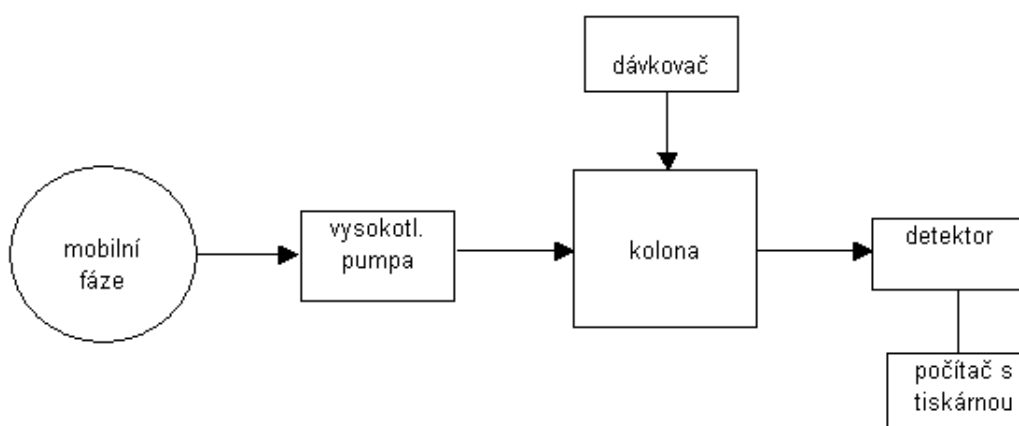
Konjugační metody

Existuje velké množství konjugačních technik, od předchozích metod se liší tím, že se jedná o metody nepřímého značení. Při těchto metodách se nejdříve radioaktivní jód naváže na vhodnou malou molekulu, která se poté váže na makromolekulu. Nejčastěji používanou funkční skupinou ke konjugaci makromolekuly s jodovanou molekulou je aminoskupina, zpravidla jde o ϵ -aminoskupinu lysinu. Příkladem tohoto přístupu je Bolton-Hunterovo činidlo.

3.5. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika označovaná jako HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „high

performance liquid chromatography“ (vysokoučinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). HPLC je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie, která se používá k separaci součástí směsi s využitím různých druhů chemických interakcí mezi analyzovanou látkou (analytem) a náplní chromatografické kolony. Vysoké účinnosti separačního procesu je dosahováno použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf (obr. 3.22).



Obr. 3.22 - Schéma kapalinového chromatografu²³⁶

Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části - zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor. Metoda HPLC existuje v tzv. normálním nebo reversním uspořádání. Při normálním uspořádání HPLC je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Naproti tomu při reversním uspořádání HPLC je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. Reversní HPLC bývá též označovaná jako RP-HPLC (reverse phase HPLC). Tato HPLC technika je již řadu let používána mnohem častěji než HPLC v normálním uspořádání.

Mobilní fází při RP-HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru. Při chromatografickém procesu vstupuje

mobilní fáze do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu (kvalitu separace).

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10 μ m) na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Vlastní stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (C8 - oktan, C18 - oktadekan), nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. -CN, -NH₂, apod.).

Kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním průměru okolo 4mm a délce typicky 5-25cm, která je naplněna stacionární fází. O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči (viz. stacionární fáze). Pro dosažení dostatečného a konstantního průtoku mobilní fáze je, vzhledem ke zmíněnému značnému odporu mikročástic stacionární fáze, nutno aplikovat přetlak desítek MPa. Tok mobilní fáze je tedy zajišťován vysokotlakým čerpadlem, které je velmi důležitou součástí HPLC aparatury.

Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dávkovače.

Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky - vysoká citlivost, reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost odezvy na změně mobilní fáze při použití gradientové eluce, univerzálnost. Pro HPLC je dostupná řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Mezi nejpoužívanější patří tyto typy detektorů - spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor, infračervený detektor, rozptylový detektor, konduktometrický detektor, amperometrický detektor, radiometrický detektor. Volba detektoru závisí na konkrétní aplikaci. Často používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) anebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce). Pokud analyt sám o sobě neabsorbuje záření v oblasti UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které mají potřebné vlastnosti - absorpce UV-VIS, fluorescence). Při použití radioaktivně značených látek je možno s výhodou uplatnit radiometrické detektory, které jsou založeny na měření jaderného záření.

Energie tohoto záření bývá několikanásobně vyšší než u záření vyplývajících ze struktury elektronového obalu, s čímž souvisí i vysoká citlivost tohoto způsobu detekce.

Radioaktivní detekce lze s výhodou využít pro analýzu radioaktivně značených biologicky aktivních látek a jejich metabolitů. HPLC s využitím radiometrické detekce umožňuje jednak stanovení metabolitů o neznámé struktuře a také umožňuje celkový pohled na zastoupení původní látky a metabolitů v biologických tekutinách (moči, plazmy, apod.) bez nutnosti předseparace z tohoto prostředí. Podstatně také usnadňuje i následnou identifikaci metabolitů (při známé hodnotě retenčního času je možné podrobit eluát z HPLC další hmotnostní a strukturní analýze). Přitom při stanovení a kvantifikaci těchto metabolitů nejsou na překážku ani případně přítomné endogenní látky s podobnou hodnotou retenčního času (t_R) jako má stanovovaný metabolit, protože přítomnost metabolitu a stanovení jeho množství je prováděno na základě měření radioaktivity.

Při HPLC analýze protéká chromatografickým systémem mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlaké čerpadlo na kolonu, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nastříkovan vzorek (řádově několik μl). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je poté zaznamenáván pomocí počítače. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena je výsledkem HPLC analýzy chromatogram, kde každé složce směsi odpovídá jeden pík²³⁶⁻²³⁹.

3.6. Papírová a tenkovrstvá chromatografie (PC, TLC)

3.6.1. Papírová chromatografie (PC)

Papírová chromatografie byla po určitou dobu v praxi nejpoužívanější metodou plošné chromatografie. Jedná se o velmi jednoduchou, rychlou a ekonomicky nenáročnou metodu, využitelnou pro separaci velkého množství látek charakteru malých anorganických sloučenin nebo i složitých biomolekul. Základním separačním mechanismem papírové chromatografie je rozdělovací rovnováha mezi vodou nebo jiným rozpouštědlem zakotveným v papíru a použitou mobilní fází. Důležitým faktorem ovlivňujícím dobu separace je typ použitého chromatografického papíru. Vyrábějí se různé speciálně upravované druhy chromatografických papírů - například hydrofobizované, apod.

Chromatografie na papíře se nejčastěji provádí ve vzestupném uspořádání, kdy je chromatografický papír zavěšen v chromatografické komoře a spodním okrajem je ponořen do mobilní fáze, která putuje směrem vzhůru. Na připravený proužek chromatografického papíru patřičné délky a šířky se vyznačí start, na nějž se nanáší vzorek. Start by měl být alespoň 1cm nad hladinou mobilní fáze a minimálně 1cm od okraje chromatografického papíru. Vzorek rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle se nanáší mikropipetou či injekční stříkačkou tak, aby skvrna vznikající na startu nebyla příliš rozměrná. Optimální nanášené množství analyzované látky se pohybuje v rozmezí 0,1 - 100 μ g, příliš velké množství analyzované látky ve vzorku způsobuje tvorbu rozvleklých skvrn. Před zahájením vlastního vyvíjení chromatogramu je třeba naplnit chromatografickou komoru mobilní fází a přibližně 15 - 20 minut ponechat na ustavení rovnováhy par mobilní fáze v chromatografické komoře. Volba složení mobilní fáze ovlivňuje pohyblivost chromatografovaných látek. Polární látky se chromatografují ve směsi polárních organických rozpouštědel s vodou a přidávkem kyseliny či báze a nepolární látky se chromatografují ve směsích nepolárních rozpouštědel. Pohyblivost látky na chromatogramu se vyjadřuje hodnotou R_f . R_f je retenční faktor, který určuje poměr vzdálenosti, kterou urazí skvrna analyzované látky ke vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla.

Detekce chromatografovaných látek se provádí po vyjmutí a vysušení chromatografického papíru buď přímo vizuálně, pokud jsou chromatografované látky barevné, nebo se využívá jejich fluorescence pod UV zářením, či se provádí postřik detekčním činidlem za vzniku barevných skvrn. Při analýze radioaktivně značených látek lze s výhodou uplatnit radiometrickou detekci. Podle polohy skvrny látky ve vzorku ve srovnání se standardem, případně i stejného chování při detekci určíme kvalitu látky, kvantitu pak odhadujeme z porovnání velikosti či intenzity zbarvení skvrn vzorku a standardu^{236,238-241}.

3.6.2. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie (TLC, thin layer chromatography) je případem plošné chromatografie, může být typu kapalina-kapalina nebo kapalina-tuhá látka. V obou případech je mobilní fází kapalina. Stacionární fází je v případě TLC chromatografie buď kapalina zakotvená v tenké vrstvě na podložním materiálu, nebo pevná látka (adsorbent) v podobě tenké vrstvy. Používanými mobilními fázemi jsou například - cyklohexan, isopropanol, aceton, voda, toluen, apod. Stacionárními fázemi mohou být - silikagel, oxid

hlinitý, celulóza, iontoměnič, apod. Tenká vrstva sorbetu je nanesena na vhodné podložce (kovová fólie, sklo).

Podobně jako u papírové chromatografie se na start nanáší velmi malé množství analyzované látky. Po zaschnutí nanesených vzorků se chromatogram vloží do chromatografické komory tak, aby startovní pozice kapek analytu zůstaly nad hladinou mobilní fáze, a nechá se vyvíjet tak dlouho, dokud čelo směsi rozpouštědel nedosáhne okraje desky. Potom se chromatogram vyjme, označí se čelo mobilní fáze, chromatogram se vysuší a vhodným způsobem detekuje.

K detekci se používají stejné postupy jako v papírové chromatografii, mnohdy se používají vrstvy upravené fluorescenční látkou, fluoreskující při osvětlení UV zářením. Stanovované látky velmi často tuto fluorescenci zhašejí, takže se pod UV lampou objevují na chromatogramu v podobě tmavých skvrn. Využívají se i další způsoby detekce, založené na postřiku chromatogramu vhodným činidlem, které se stanovovanou látkou vytváří barevnou sloučeninu. Podobně jako u PC lze při analýze radioaktivně značených látek s výhodou uplatnit radiometrickou detekci^{236,238,240-242}.

3.6.2.1. *Instantní tenkovrstvá chromatografie na silikagelem potažených skleněných mikrovláčkách (ITLC-SG)*

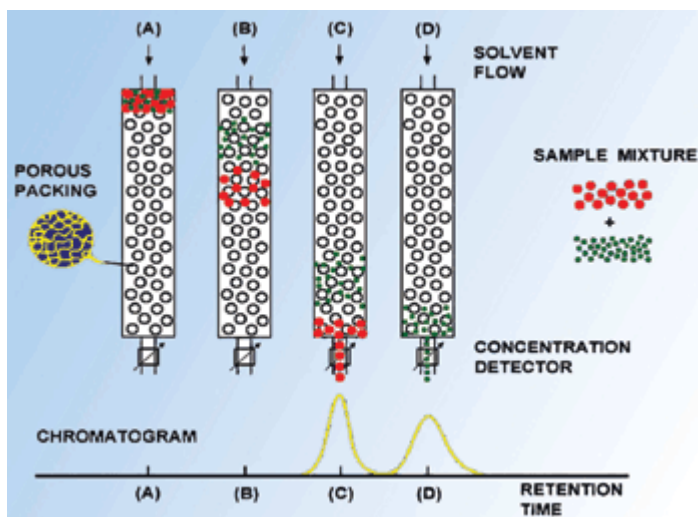
Instantní tenkovrstvá chromatografie na silikagelem potažených skleněných mikrovláčkách (ITLC-SG) představuje rychlou a vhodnou alternativu k tradiční TLC na silikagelem potažených skleněných deskách. Výhodou jsou (díky velké porositě vrstvy) především velmi krátké vyvíjecí časy, obvykle do 20 minut a příprava chromatografických stripů, které lze snadno nařezat. ITLC-SG se rutinně využívá v nukleární medicíně k rychlému určení radiochemické čistoty připravených radiofarmak a lze ji také využít k dělení lipidů a dalších nepolárních sloučenin²⁴³.

3.7. Gelově permeační chromatografie

Gelově permeační chromatografie (size exclusion chromatography, SEC) je jednoduchá metoda založena na principu „neionogenního molekulového síta“, při kterém jsou látky děleny převážně na základě velikosti a tvaru molekuly a při kterém separace téměř nezávisí na fyzikálně-chemických vlastnostech dělených látek. Stacionární fáze je tvořena inertním zesítěným nerozpustným polymerním gelem s definovanou velikostí pórů, který je nasycen

kapalinou. Stejná kapalina je použita jako mobilní fáze. Separací proces je tedy závislý převážně na charakteru pórů stacionární fáze, tj. jejich velikosti, tvaru, množství a relativním objemu, dále závisí na velikosti a distribuci částic stacionární fáze, na viskozitě mobilní fáze a na její průtokové rychlosti^{244,245}.

Po uvedení dělených látek do chromatografického systému sloučeniny s velkou molární hmotností nemohou difundovat do pórů gelu a jsou unášeny mobilní fází mezi částicemi gelu. Naproti tomu sloučeniny s menší molární hmotností jsou schopny difundovat do gelu a jsou rovnoměrně rozptýleny v kapalně fázi jak vně, tak i uvnitř gelu. Tato difúze dovnitř gelu (do stacionární fáze) způsobuje, že se při promývání kolony postup těchto látek zpomaluje a za většími molekulami se tedy zpožďují (obr. 3.23).



Obr. 3.23 - Průchod částic kolonou při gelové permeační chromatografii²⁴⁶

Eluční objem V_R , tj. objem eluátu, měřený od nanesení zóny separované molekuly až k její eluci v maximální koncentraci, je dán elučním vztahem²⁴⁵.

$$V_R = V_0 + K_D * V_S$$

kde V_S je objem rozpouštědla v pórech gelu, resp. objem stacionární fáze (objem nabobtnalého gelu), V_0 , je objem volné mobilní fáze v koloně (objem rozpouštědla mezi částicemi nabobtnalého gelu, nazývaný také jako eluční, zádržný nebo limitní objem) a K_D je distribuční koeficient pro danou molekulu, který může nabývat hodnot od 0 do 1.

Molekuly s molární hmotností větší než limitní mají $K_D = 0$ a eluují se s limitním elučním objemem. Malé molekuly s $K_D = 1$ prostupují všechny póry a jsou eluovány s maximálním V_R .

Gelová chromatografie se dříve dělila na gelovou filtraci s vodnou mobilní fází pro analýzu ve vodě rozpustných biopolymerů a na gelovou permeaci s organickou mobilní fází pro analýzu syntetických lipofilních polymerů. Dnes je tato oblast jednotně označována jako SEC. Podle polaritativy mobilní fáze lze použít hydrofilní nebo hydrofobní polymery jako fáze stacionární. Jako hydrofilní gely se používají polymery na bázi dextranu, agarózy anebo akrylamidu, hydrofobní gely jsou polymery na bázi polystyrenu, polyvinylacetátu, porézní anorganické materiály na bázi silikagelu nebo deaktivovaná porézní skla^{244,245}. Výběr mobilní fáze v gelové chromatografii se řídí převážně rozpustností analyzovaných makromolekul. Jako mobilní fáze pro separaci na polárních gelech se používají roztoky elektrolytů různé iontové síly, pro dělení na hydrofobních gelech se používají vhodná organická rozpouštědla, jako například tetrahydrofuran, dimethylformamid nebo nízkotoxický dichloropentafluoropropan vhodný pro rozpouštění polyfluorovaných polymerů²⁴⁴. Matrice gelu musí být inertní vůči chromatografovaným látkám i k mobilní fázi. K zamezení nespecifických interakcí mezi analyzovanými makromolekulami a povrchem stacionární fáze (polarita gelu, jeho adsorpční vlastnosti) může vodná mobilní fáze obsahovat 100 - 300mM NaCl. Vyšší koncentrace solí nejsou vhodné vzhledem k možnosti precipitace proteinů. Porézní skla lze deaktivovat silanizací, povrch silikagelu lze chemicky modifikovat na diolovou fázi²⁴⁴.

Gelová chromatografie se využívá při analýze makromolekulárních látek např. v biochemii nebo v biotechnologii. Vzhledem k tomu, že retenční objem, resp. čas, odpovídá velikosti molekuly, může být tato technika použita pro stanovení molární hmotnosti proteinů, pro určení distribuce molárních hmotností polymerů a pro dělení směsí (malé molekuly, oligomery, polymery).

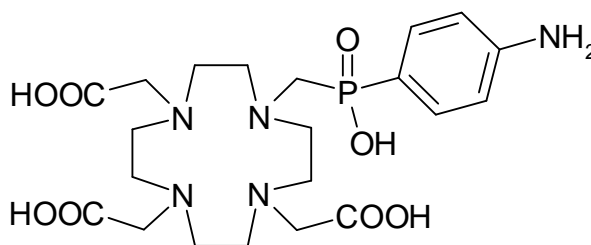
4 Experimentální část

4.1. Radioaktivní značení a analýza bifunkčních chelátorů

4.1.1. Radioaktivní značení a analýza cyklických BFC

V rámci spolupráce s katedrou anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy byly studovány chelatační vlastnosti cyklických bifunkčních chelátorů odvozených od DOTA s cílem nalezení chelátorů s rychlejší kinetikou vazby radiokovů při nižší teplotě, což hraje důležitou úlohu především pro radioaktivní značení takto modifikovaných protilátek.

4.1.1.1. Příprava komplexu ^{111}In s H4do3apABn



Obr. 4.1 - H4do3apABn

Kinetika tvorby komplexu při různém pH (A1)

Byly připraveny roztoky 0,5M acetátového pufru o pH = 3,4; 4,4; 5,4; 6,4; 7,4. K 90 μl každého pufru bylo přidáno 7 μl roztoku H4do3apABn ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány při teplotě 40°C. V čase 5, 15, 30, 60 a 120 minut byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na teplotě (B1)

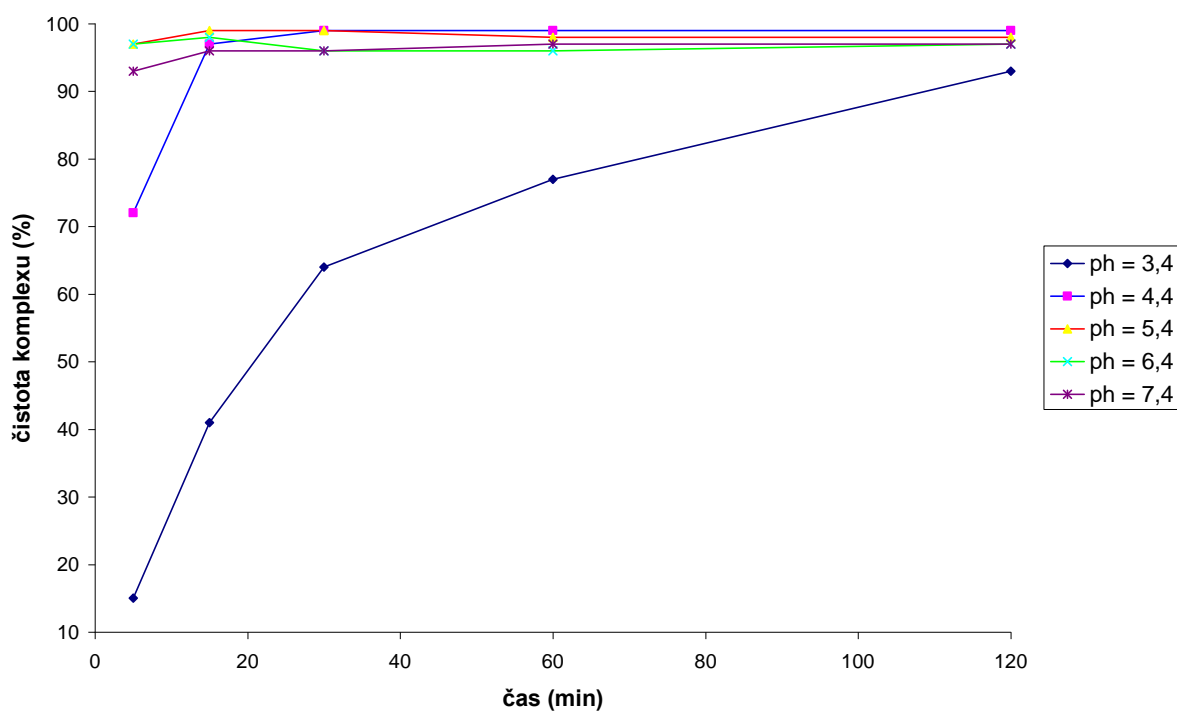
Byly připraveny tři vzorky, složené z 90 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4; k němuž bylo postupně přidáno 7 μl roztoku H4do3apABn ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány po dobu 30 minut, každý při jiné teplotě (40°C, 60°C, 90°C). Po 30 minutách byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (C1)

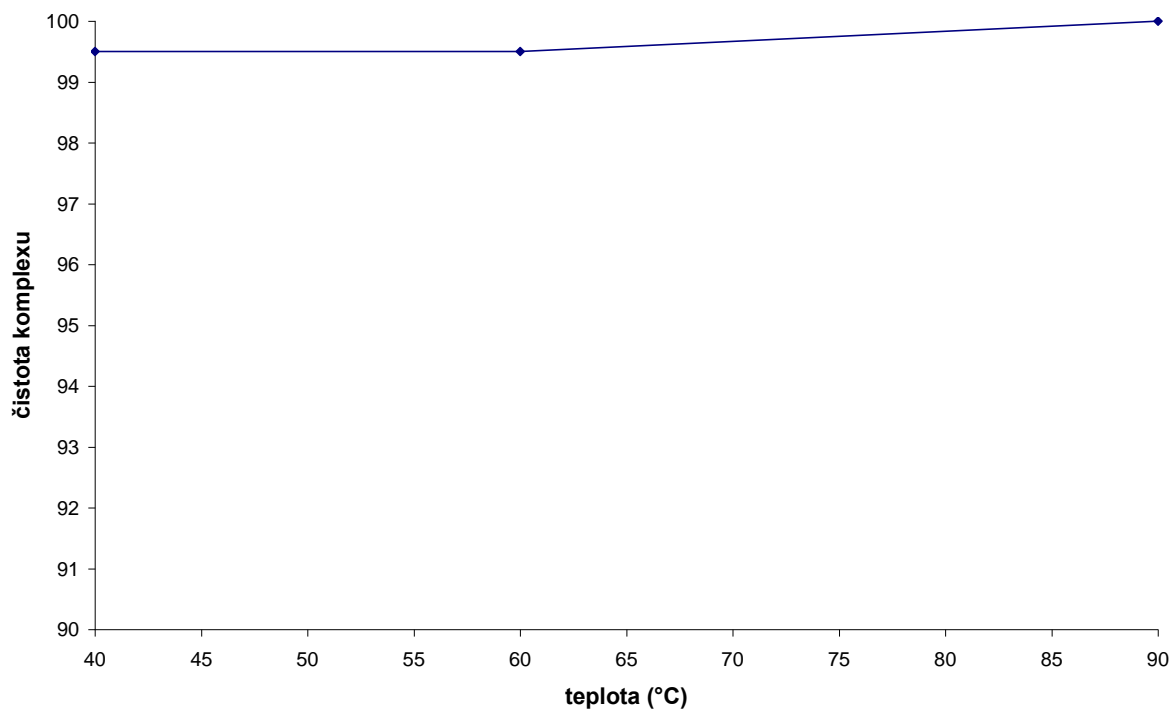
Bylo připraveno šest vzorků o různých koncentracích H4do3apABn. K 90 μ l 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4 bylo postupně přidáno 7 μ l roztoku H4do3apABn o příslušné koncentraci ($c' = 1\text{mg/ml}$, $1\text{mg}/10\text{ml}$, $1\text{mg}/100\text{ml}$, $1\text{mg}/1000\text{ml}$, $1\text{mg}/10000\text{ml}$, $1\text{mg}/100000\text{ml}$) a 2 μ l $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μ l). Každý vzorek byl zahříván 30 minut při teplotě 40°C. Potom byl každý vzorek analyzován za použití níže popsané ITLC-SG.

Ideální podmínky značení H4do3apABn

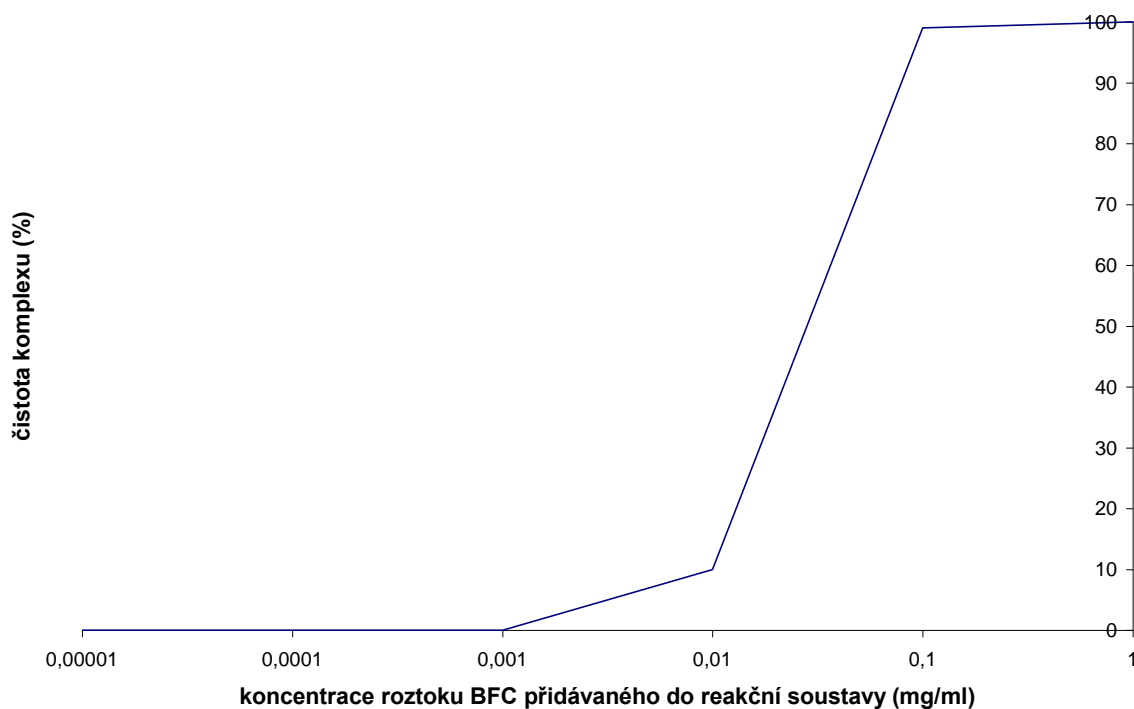
1,0mg H4do3apABn byl rozpuštěn v 1,0ml superčisté vody. 7 μ l tohoto roztoku bylo přidáno k 90 μ l 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4. Po promíchání byly přidány 2 μ l $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μ l) a směs byla zahřívána 30 minut při 40°C.

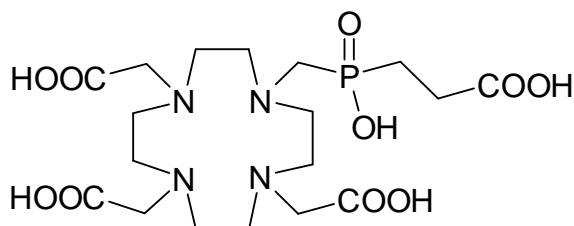
A1: Kinetika tvorby komplexu při různém pH ($t = 40^\circ\text{C}$, $c_{\text{BFC}} = 1,35 \times 10^{-4} \text{mol/l}$)

B1: Závislost tvorby komplexu na teplotě ($c_{BFC} = 1,35 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$, čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 5,4$)



C1: Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (jednotlivé koncentrace chelátoru v reakční soustavě (od $c_{BFC} = 1,35 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ do $c_{BFC} = 1,35 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$), čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 5,4$)



4.1.1.2. Příprava komplexu ^{111}In s H5do3apPrA

Obr. 4.2 - H5do3apPrA

Kinetika tvorby komplexu při různém pH (A2)

Byly připraveny roztoky 0,5M acetátového pufru o pH = 3,4; 4,4; 5,4; 6,4; 7,4. K 90 μl každého pufru bylo přidáno 7 μl roztoku H5do3apPrA ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány při teplotě 40°C. V čase 5, 15, 30, 60 a 120 minut byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na teplotě (B2)

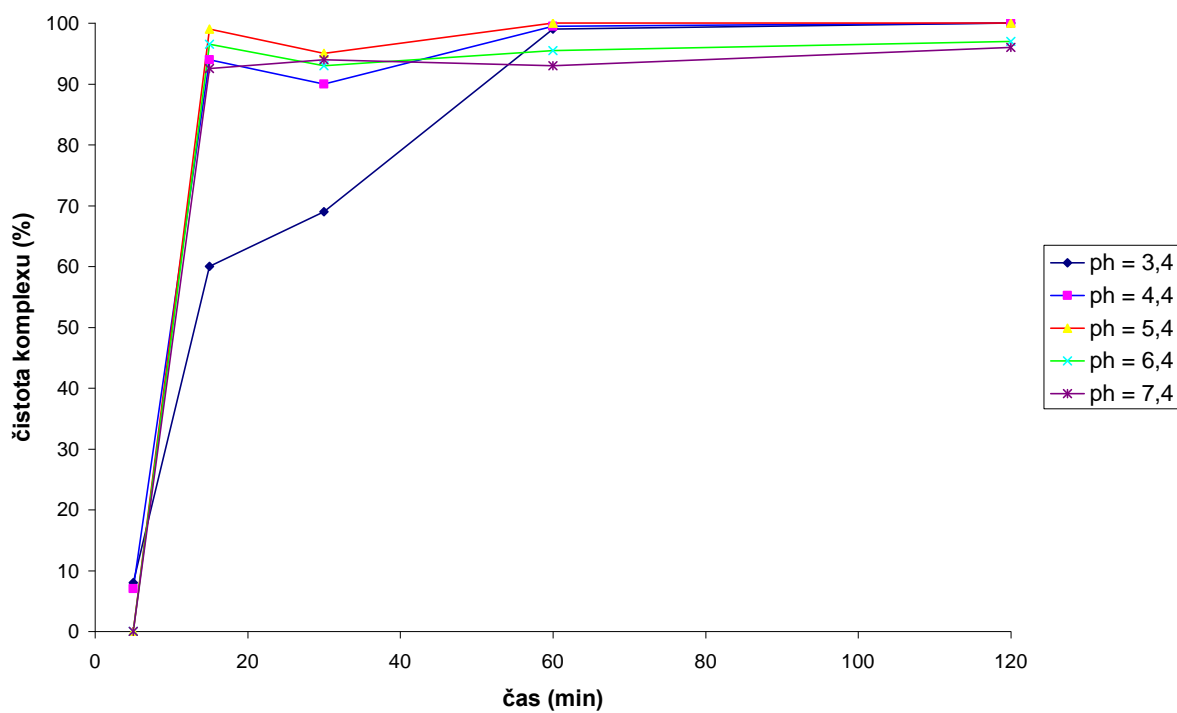
Byly připraveny tři vzorky, složené z 90 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4; k němuž bylo postupně přidáno 7 μl roztoku H5do3apPrA ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány po dobu 30 minut, každý při jiné teplotě (40°C, 60°C, 90°C). Po 30 minutách byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (C2)

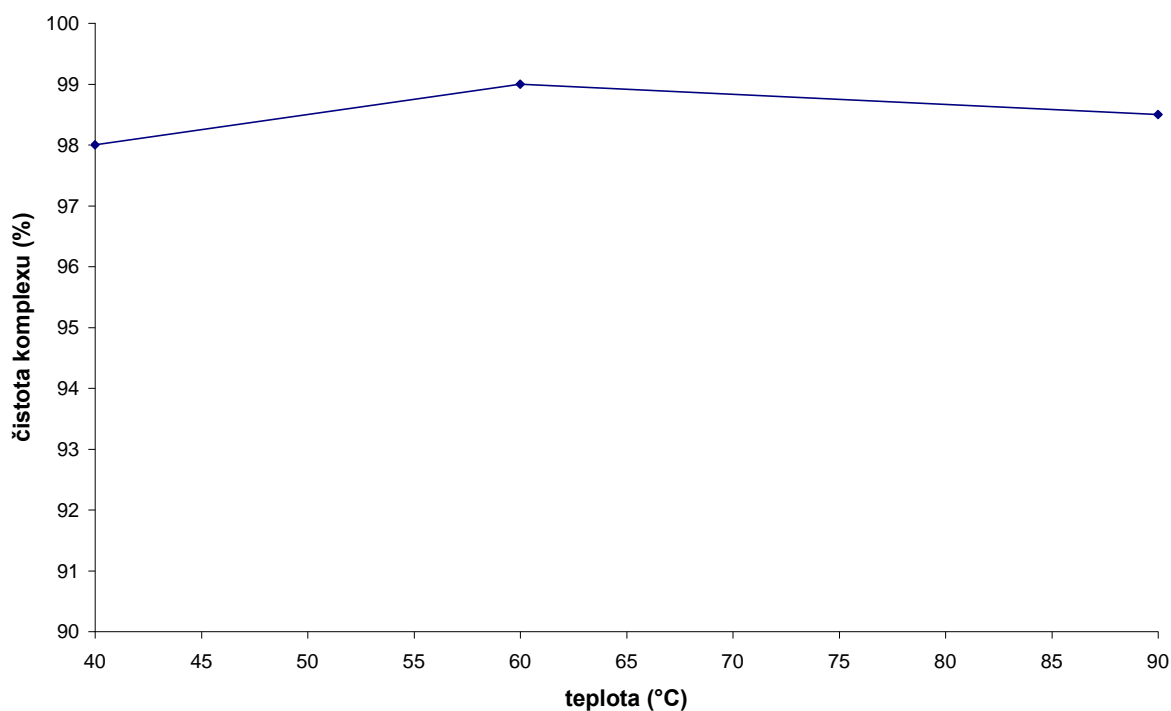
Bylo připraveno šest vzorků o různých koncentracích H5do3apPrA. K 90 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4 bylo postupně přidáno 7 μl roztoku H5do3apPrA o příslušné koncentraci (1mg/ml, 1mg/10ml, 1mg/100ml, 1mg/1000ml, 1mg/10000ml, 1mg/100000ml) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Každý vzorek byl zahříván 30 minut při teplotě 40°C. Potom byl každý vzorek analyzován za použití níže popsané ITLC-SG.

Ideální podmínky značení H5do3apPrA

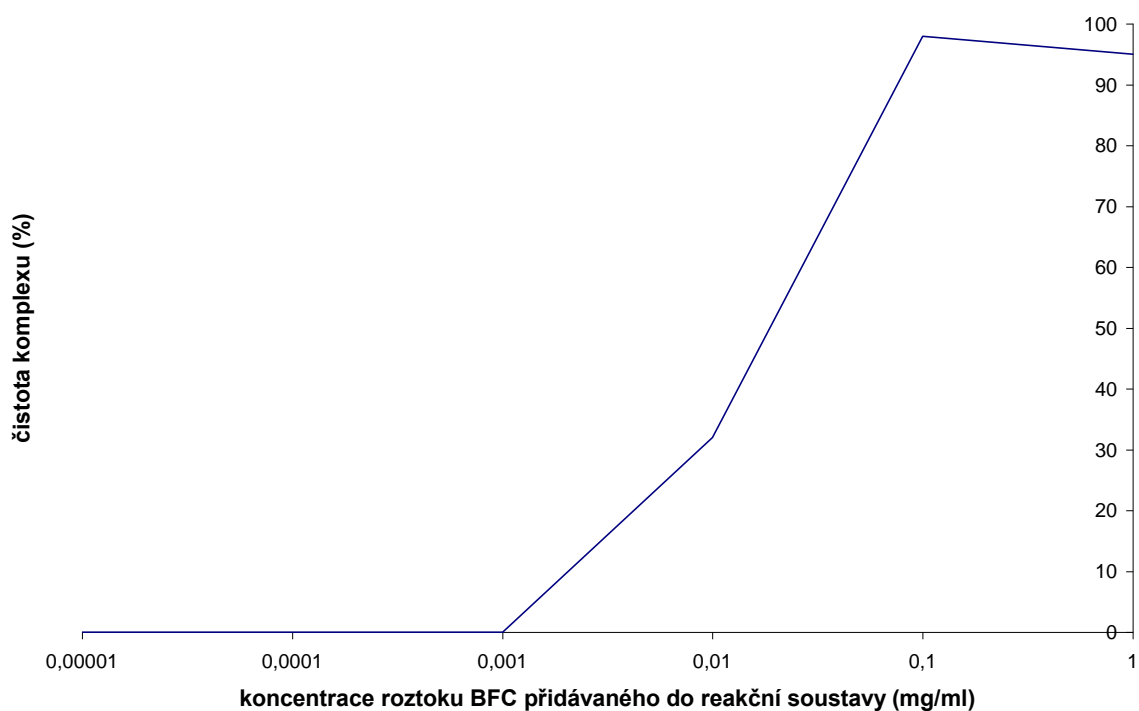
0,9mg H5do3apPrA bylo rozpuštěno v 0,9ml superčisté vody. 7 μ l tohoto roztoku bylo přidáno k 90 μ l 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4. Po promíchání byly přidány 2 μ l $^{111}\text{In-}\text{InCl}_3$ (2mCi/200 μ l) a směs byla zahřívána 30 minut při 40°C.

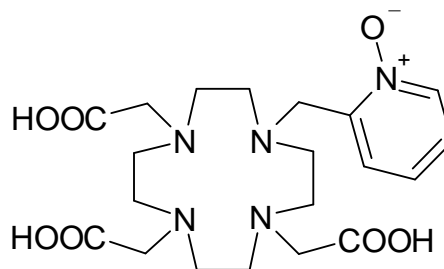
A2: Kinetika tvorby komplexu při různém pH ($t = 40^\circ\text{C}$, $c_{\text{BFC}} = 1,4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$)

B2: Závislost tvorby komplexu na teplotě ($c_{BFC} = 1,4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$, čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 5,4$)



C2: Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (jednotlivé koncentrace chelátoru v reakční soustavě (od $c_{BFC} = 1,4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ do $c_{BFC} = 1,4 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$), čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 5,4$)



4.1.1.3. Příprava komplexu ^{111}In s Do3a-pyNox

Obr. 4.3 - Do3a-pyNox

Kinetika tvorby komplexu při různém pH (A3)

Byly připraveny roztoky 0,5M acetátového pufru o pH = 3,4; 4,4; 5,4; 6,4; 7,4. K 90 μl každého pufru bylo přidáno 7 μl roztoku Do3a-pyNox ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorokly byly zahřívány při teplotě 90°C. V čase 5, 15, 30, 60 a 120 minut byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na teplotě (B3)

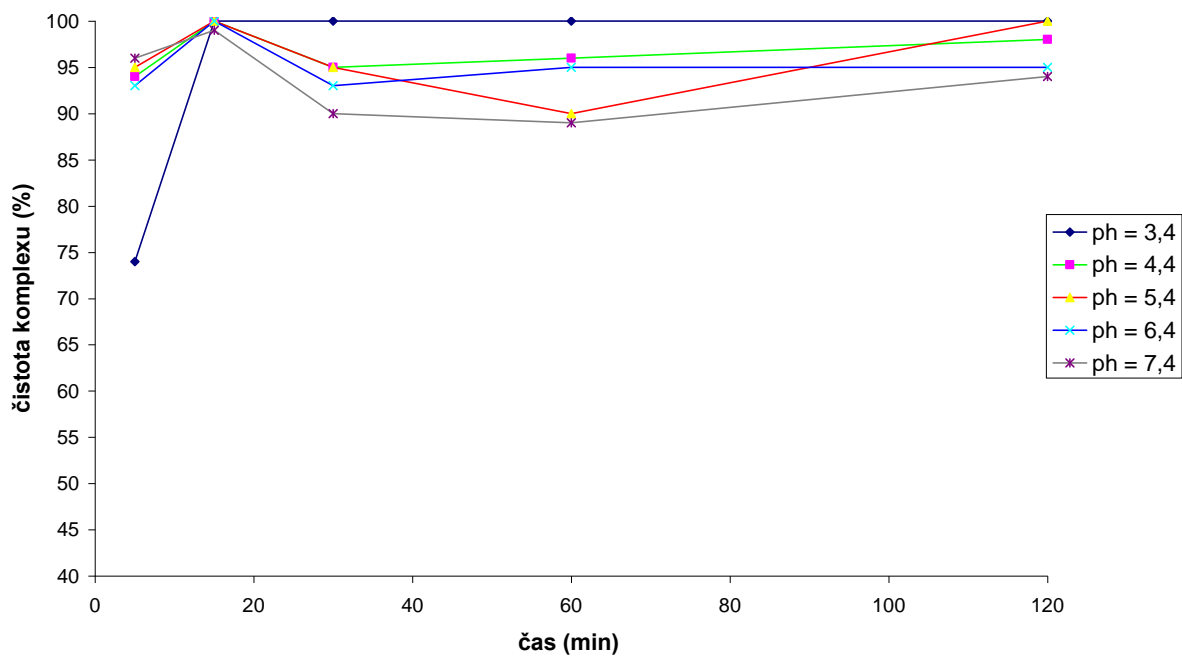
Byly připraveny tři vzorky, složené z 90 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4; k němuž bylo postupně přidáno 7 μl roztoku Do3a-pyNox ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorokly byly zahřívány po dobu 30 minut, každý při jiné teplotě (40°C, 60°C, 90°C). Po 30 minutách byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (C3)

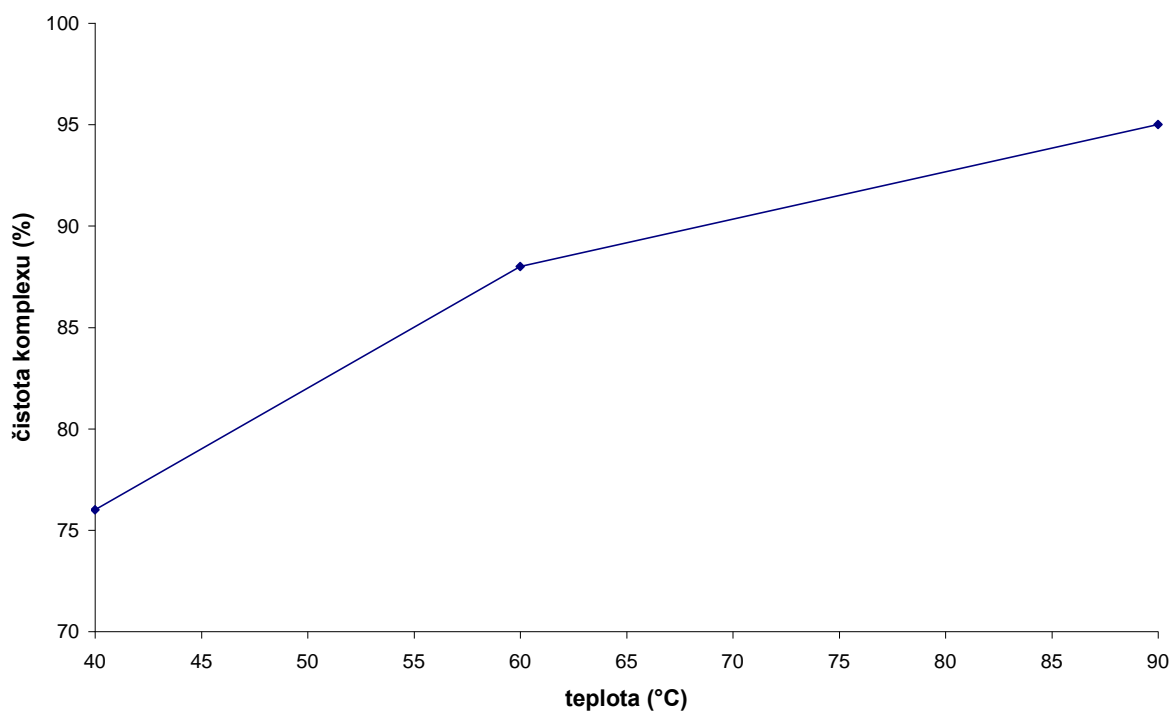
Bylo připraveno šest vzorků o různých koncentracích Do3a-pyNox. K 90 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4 bylo postupně přidáno 7 μl roztoku Do3a-pyNox o příslušné koncentraci (1mg/ml, 1mg/10ml, 1mg/100ml, 1mg/1000ml, 1mg/10000ml, 1mg/100000ml) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Každý vzorek byl zahříván 15 minut při teplotě 90°C. Potom byl každý vzorek analyzován za použití níže popsané ITLC-SG.

Ideální podmínky značení Do3a-pyNox

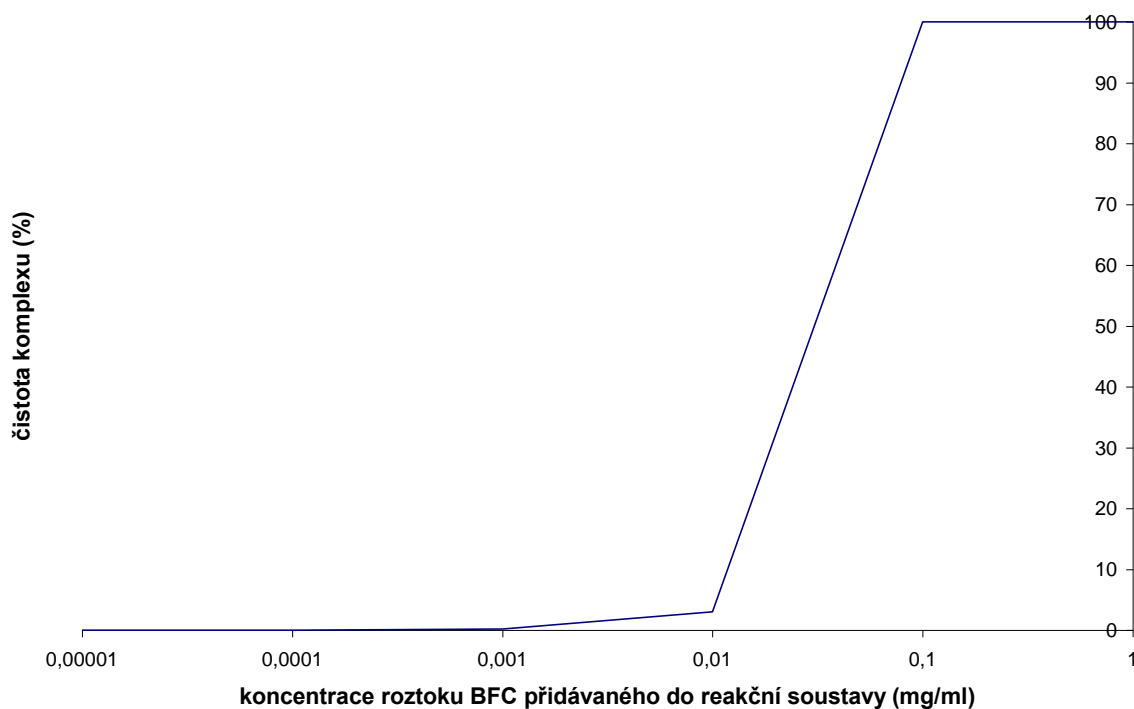
1,1mg Do3a-pyNox bylo rozpuštěno v 1,1ml superčisté vody. 7 μ l tohoto roztoku bylo přidáno k 90 μ l 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4. Po promíchání byly přidány 2 μ l $^{111}\text{In-}\text{InCl}_3$ (2mCi/200 μ l) a směs byla zahřívána 15 minut při 90°C.

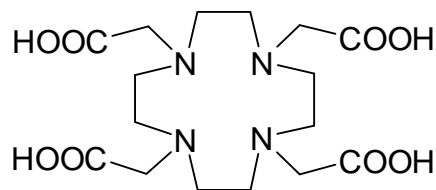
A3: Kinetika tvorby komplexu při různém pH ($t = 90^\circ\text{C}$, $c_{\text{BFC}} = 1,54 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$)

B3: Závislost tvorby komplexu na teplotě ($c_{BFC} = 1,54 \times 10^{-4} \text{ mo/l}$, čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 5,4$)



C3: Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (jednotlivé koncentrace chelátoru v reakční soustavě (od $c_{BFC} = 1,54 \times 10^{-4} \text{ mo/l}$ do $c_{BFC} = 1,54 \times 10^{-9} \text{ mo/l}$), čas reakce 15 minut, $\text{pH} = 5,4$)



4.1.1.4. Příprava komplexu ^{111}In s H4dota

Obr. 4.4 - H4dota

Kinetika tvorby komplexu při různém pH (A4)

Byly připraveny roztoky 0,5M acetátového pufru o pH = 3,4; 4,4; 5,4; 6,4; 7,4. K 90 μl každého pufru bylo přidáno 7 μl roztoku H4dota ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány při teplotě 90°C. V čase 5, 15, 30, 60 a 120 minut byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na teplotě (B4)

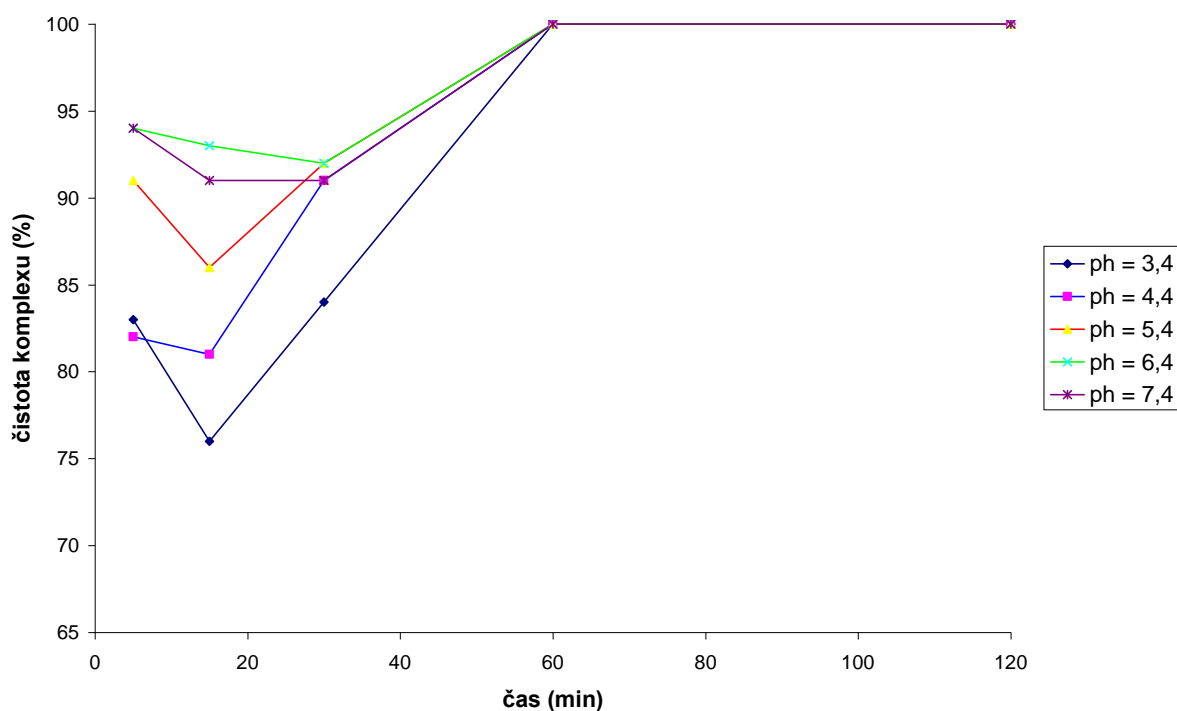
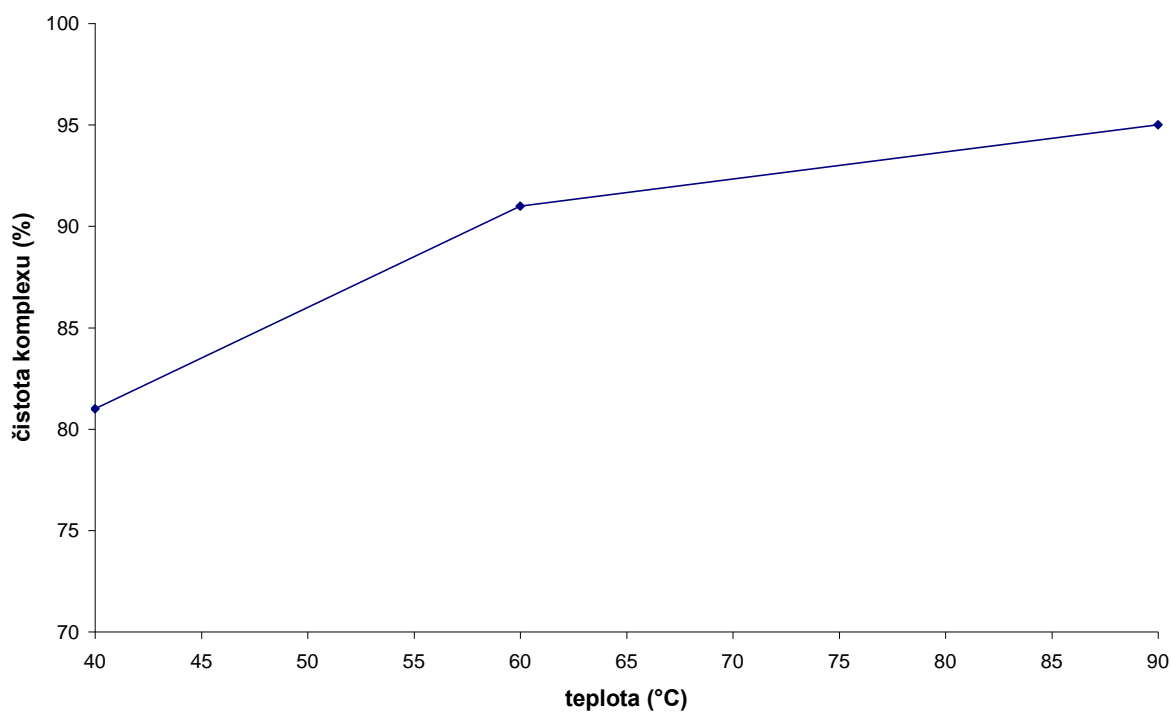
Byly připraveny tři vzorky, složené z 90 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4; k němuž bylo postupně přidáno 7 μl roztoku H4dota ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány po dobu 30 minut, každý při jiné teplotě (40°C, 60°C, 90°C). Po 30 minutách byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (C4)

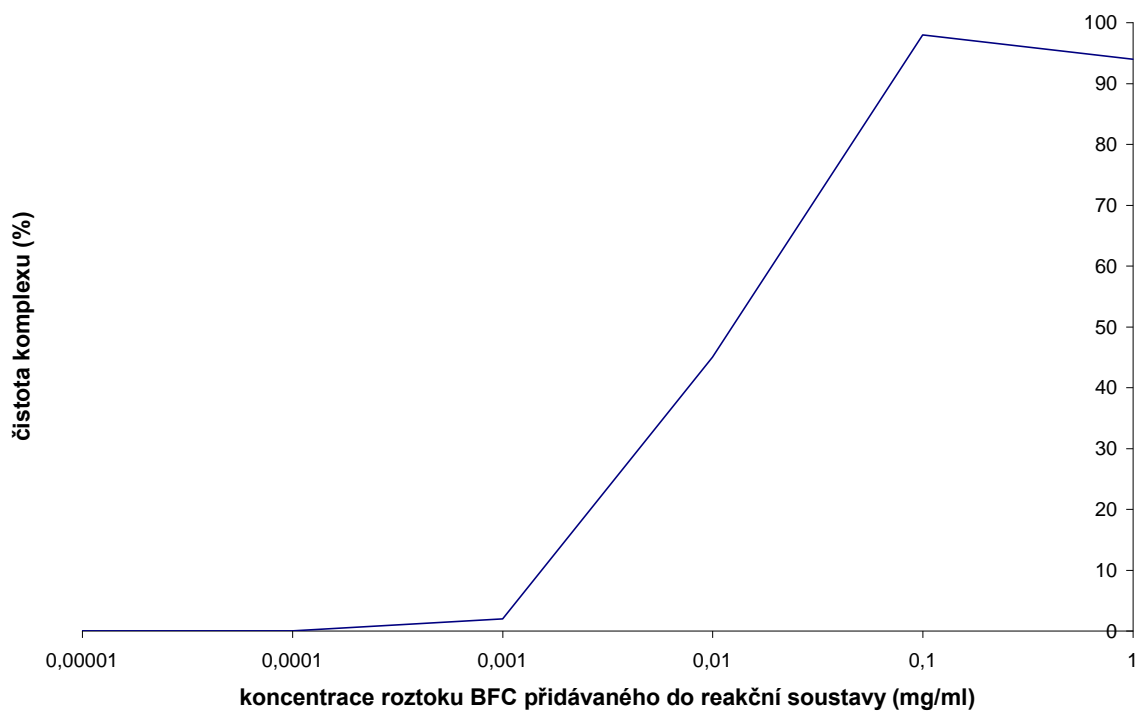
Bylo připraveno šest vzorků o různých koncentracích H4dota. K 90 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4 bylo postupně přidáno 7 μl roztoku H4dota o příslušné koncentraci (1mg/ml, 1mg/10ml, 1mg/100ml, 1mg/1000ml, 1mg/10000ml, 1mg/100000ml) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Každý vzorek byl zahříván 25 - 30 minut při teplotě 90°C. Potom byl každý vzorek analyzován za použití níže popsané ITLC-SG.

Ideální podmínky značení H4dota

1,1mg H4dota bylo rozpuštěno v 1,1ml superčisté vody. 7 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 90 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 5,4. Po promíchání byly přidány 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl) a směs byla zahřívána 25 - 30 minut při 90°C.

A4: Kinetika tvorby komplexu při různém pH ($t = 90^\circ\text{C}$, $c_{\text{BFC}} = 1,73 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$)B4: Závislost tvorby komplexu na teplotě ($c_{\text{BFC}} = 1,73 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$, čas reakce 30 minut, pH = 5,4)

C4: Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (jednotlivé koncentrace chelátoru v reakční soustavě (od $c_{BFC} = 1,73 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ do $c_{BFC} = 1,73 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$), čas reakce 25-30 minut, $\text{pH} = 5,4$)

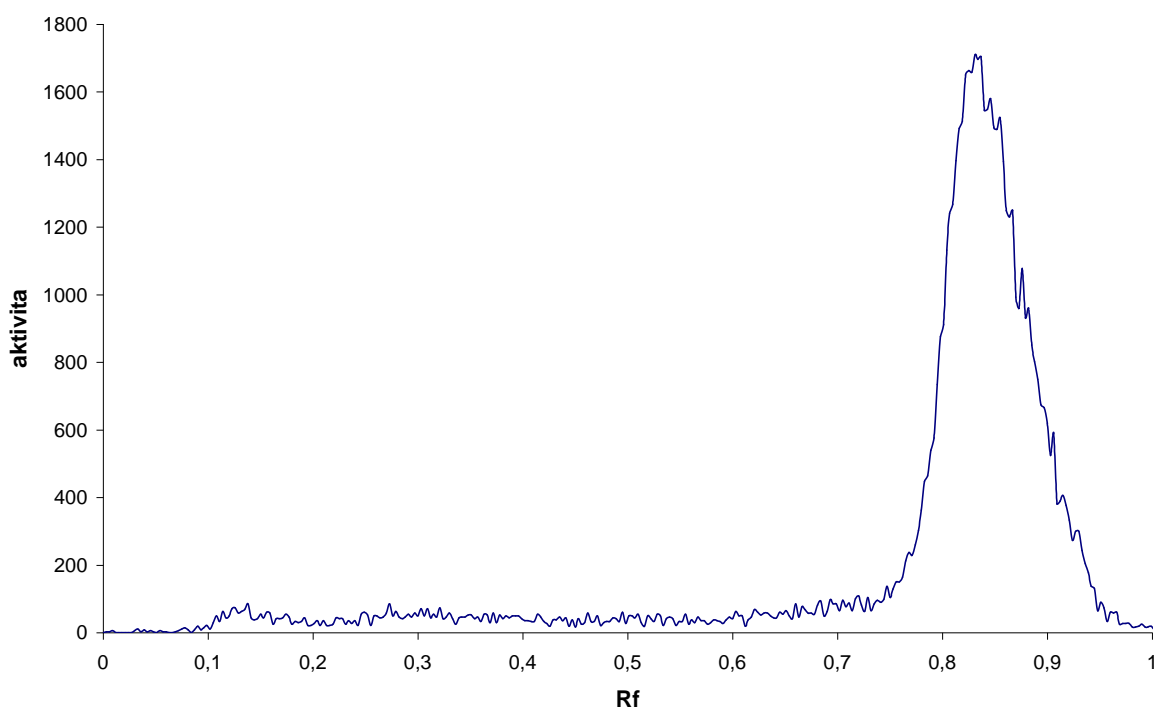


4.1.1.5. Analytické metody používané pro analýzu značených cyklických BFC

ITLC-SG analýza

Pro kontrolu radiochemické čistoty připravených značených komplexů byla využívána ITLC-SG analýza. Jako mobilní fáze byla použita směs - 10% octan amonný : metanol = 1:1. Na strip byl zpravidla nanášen 1 μ l vzorku. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu (D1). Hodnoty R_f jednotlivých přítomných chemických forem jsou následující: volné $^{111}\text{In}^{3+}$: $R_f = 0-0,2$; komplex $^{111}\text{In-BFC}$: $R_f = 0,8-1$

D1: Příklad radiochromatogramu značeného cyklického chelátoru získaného tenkovrstvou chromatografií (ITLC-SG); konkrétně $^{111}\text{In-H4do3apABn}$



Tabulka 4.1 - Souhrnné výsledky stability radioaktivně značených cyklických chelátorů zjištěné tenkovrstvou chromatografií

Komplex	Čistota komplexu (%) v čase		
	30min.	120min.	48h.
$^{111}\text{In-H4do3apABn}$	99,2	98,7	98,5
$^{111}\text{In-H5do3apPrA}$	95,6	100	99,1
$^{111}\text{In-Do3a-pyNox}$	95,4	98,3	98,7
$^{111}\text{In-H4dota}$	93,7	100	99,2

HPLC analýza

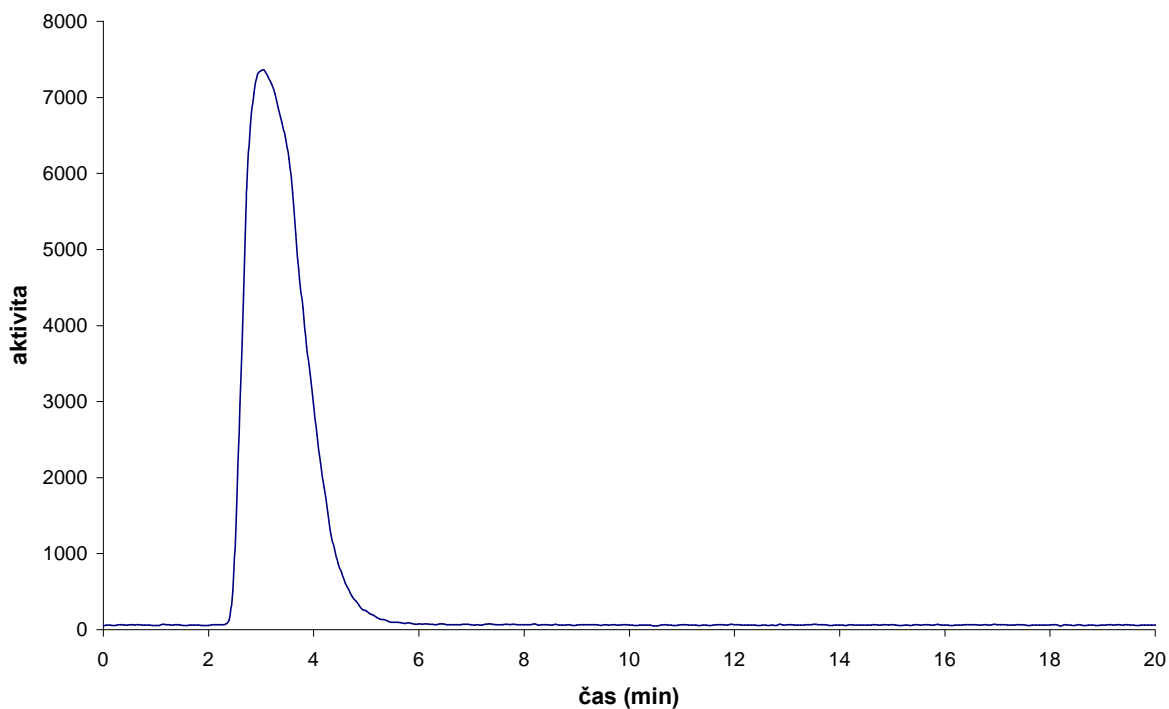
Příprava vzorků pro HPLC analýzu

15 μl BFC ($c' = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) bylo smícháno se 181 μl 0,5M acetátového pufru $\text{pH} = 5,4$ a 4 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Po promíchání byla reakční směs naředěna 800 μl superčisté vody a poté byla zahřívána 30 minut při 40°C u $^{111}\text{In-H4do3apABn}$ a $^{111}\text{In-H5do3apPrA}$, 15 minut při 90°C u $^{111}\text{In-Do3a-pyNox}$ a 25 - 30 minut při 90°C u $^{111}\text{In-H4dota}$.

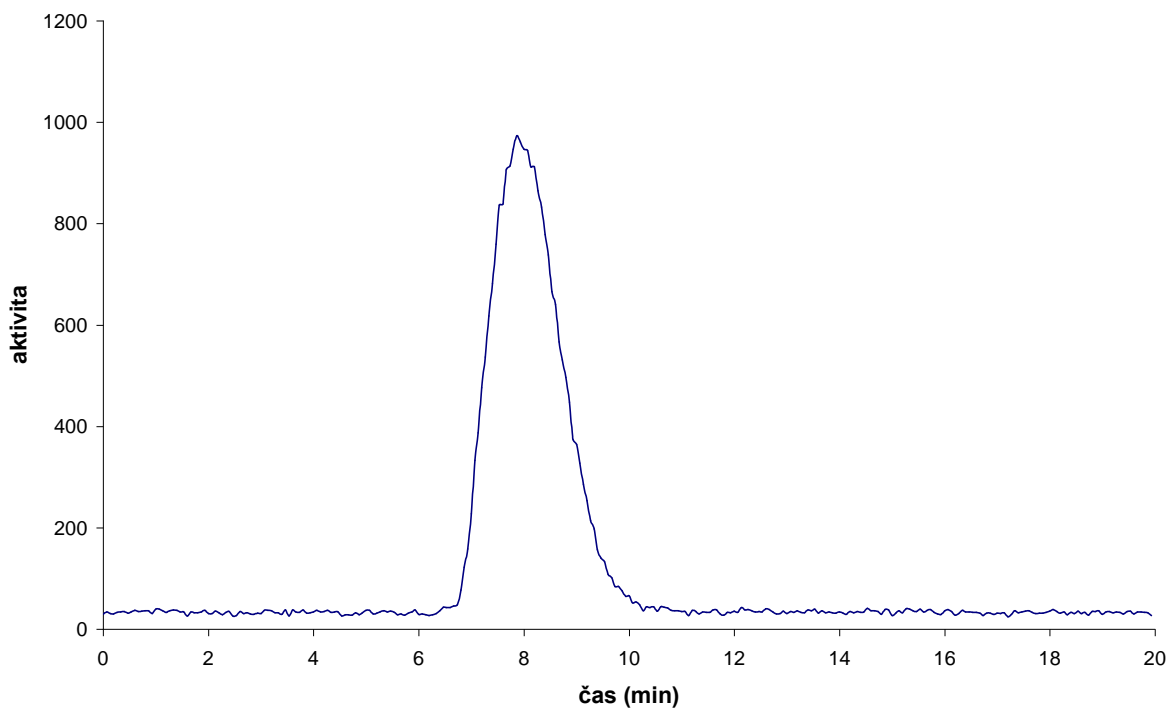
Podmínky analýz

HPLC analýzy byly prováděny na koloně LichroCart 125-4, Lichrospher 100, RP-18e, 5 μm ($^{111}\text{In-H4do3apABn}$, $^{111}\text{In-H5do3apPrA}$, $^{111}\text{In-Do3a-pyNox}$) nebo LichroCart 250-4, Lichrospher 100, RP-18e, 5 μm ($^{111}\text{In-H4dota}$). Jako mobilní fáze byl používán 0,2M acetátový pufr o $\text{pH} = 5,5$ nebo $\text{pH} = 5,6$. Nastříkováno bylo vždy 100 μl vzorku a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min ($^{111}\text{In-H4do3apABn}$, $^{111}\text{In-H5do3apPrA}$, $^{111}\text{In-Do3a-pyNox}$) nebo 0,25 ml/min ($^{111}\text{In-H4dota}$). HPLC analýzy komplexů připravených za optimálních podmínek ukazovaly, při porovnání s výsledky získanými tenkovrstvou chromatografií (tabulka 4.1), na vysokou radiochemickou čistotu a stabilitu připravených komplexů (E1a, E1b). Retenční časy značených komplexů byly 3,0 - 3,2 minut ($^{111}\text{In-H4do3apABn}$) 2,9 - 3,1 minut ($^{111}\text{In-H5do3apPrA}$) 3,5 - 3,7 minut ($^{111}\text{In-Do3a-pyNox}$) 7,9 - 8,1 minut ($^{111}\text{In-H4dota}$).

E1a: Příklad radiochromatogramu značeného cyklického chelátoru získaného HPLC analýzou; konkrétně $^{111}\text{In-H4do3apABn}$



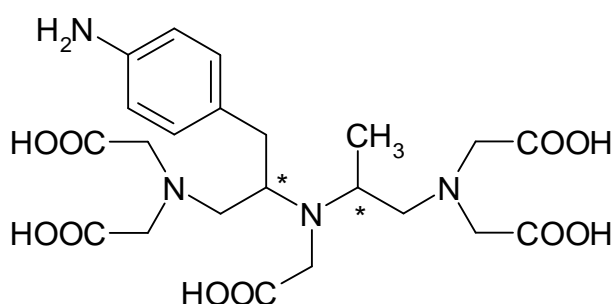
E1b: Příklad radiochromatogramu značeného cyklického chelátoru získaného HPLC analýzou; konkrétně $^{111}\text{In-H4dota}$



4.1.2. Radioaktivní značení a analýza acyklických BFC

V rámci spolupráce školícího pracoviště s firmou Azacycles s.r.o. byly zkoumány chelatační vlastnosti tří diastereoisomerů necyklického bifunkčního chelátoru odvozeného od DTPA, konkrétně 2-(4-aminobenzyl)-3-methyl-DTPA (Amino-B2M3-A, B a E). Vzhledem k tomu, že nám firma Azacycles s.r.o. neposkytla stereostruktury jednotlivých diastereoizomerů, je struktura chelátoru Amino-B2M3 s vyznačenými chirálními centry uvedena na následujících obrázcích (4.5-4.7) pouze obecně.

4.1.2.1. Příprava komplexu ^{111}In s Amino-B2M3-A



Obr. 4.5 - Amino-B2M3-A

Kinetika tvorby komplexu při různém pH (A5)

Byly připraveny roztoky 0,4M acetátového pufru o pH = 4; 5; 6; 7. K 90 μl každého pufru bylo přidáno 7 μl roztoku Amino-B2M3-A ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (5mCi/500 μl). Vzorky byly zahřívány při teplotě 40°C. V čase 5, 15, 30, 60 a 120 minut byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy rozstříhány na 10 částí a analyzovány na gamaautomatu.

Závislost tvorby komplexu na teplotě (B5)

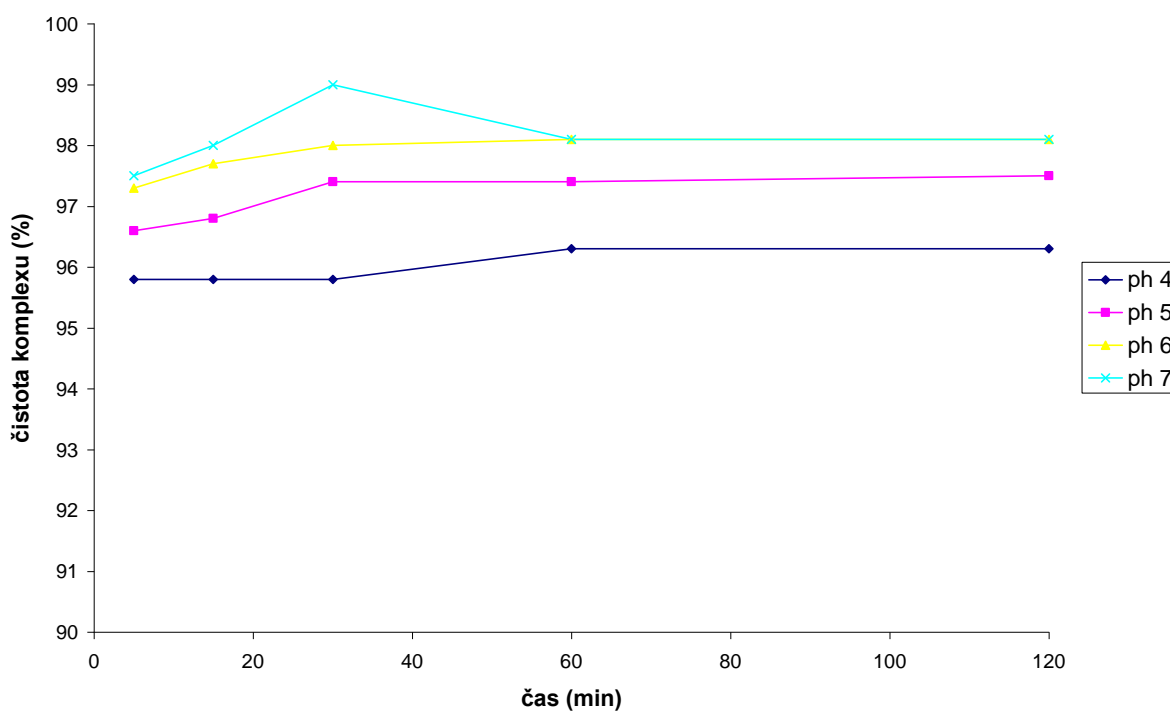
Byly připraveny tři vzorky, složené z 90 μl 0,4M acetátového pufru o pH = 5,5; k němuž bylo postupně přidáno 7 μl roztoku Amino-B2M3-A ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (5mCi/500 μl). Vzorky byly zahřívány po dobu 30 minut, každý při jiné teplotě (40°C, 60°C, 90°C). Po 30 minutách byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy rozstříhány na 10 částí a analyzovány na gamaautomatu.

Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (C5)

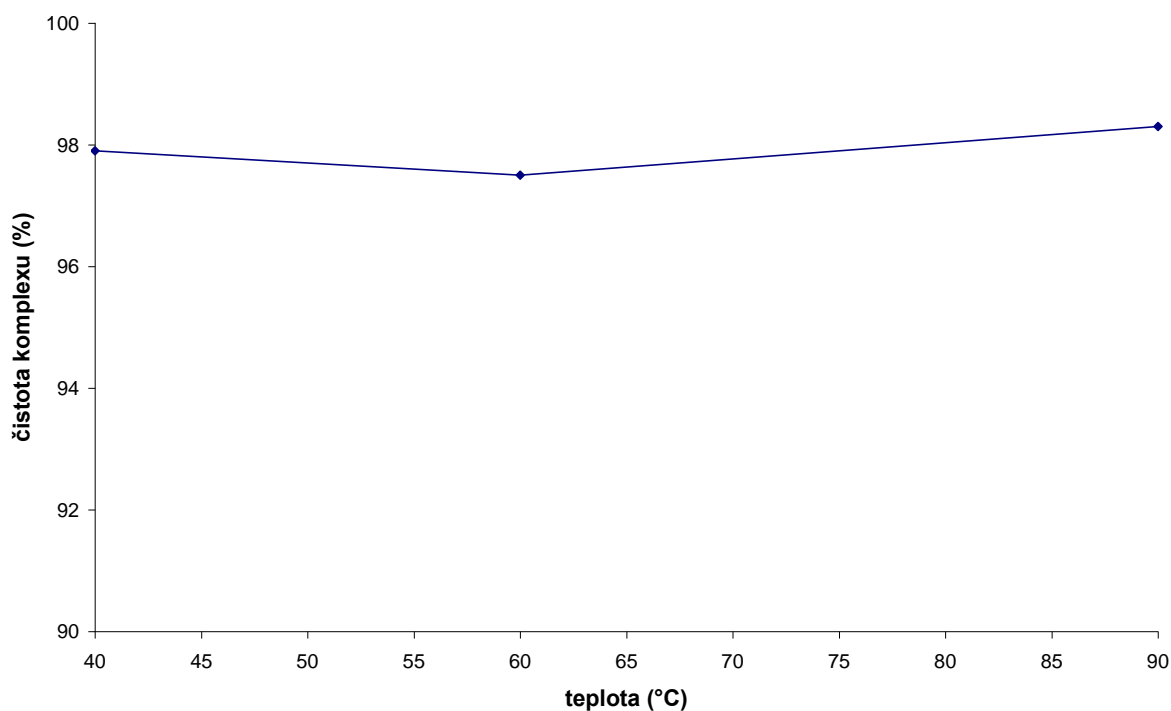
Bylo připraveno pět vzorků o různých koncentracích Amino-B2M3-A. K 90 μ l 0,4M acetátového pufru o pH = 6 bylo postupně přidáno 7 μ l roztoku Amino-B2M3-A o příslušné koncentraci (1mg/ml, 1mg/4ml, 1mg/40ml, 1mg/400ml, 1mg/4000ml) a 2 μ l $^{111}\text{In-InCl}_3$ (5mCi/500 μ l). Každý vzorek byl zahříván 30 minut při teplotě 40°C. Potom byl každý vzorek analyzován za použití níže popsané ITLC-SG.

Ideální podmínky značení Amino-B2M3-A

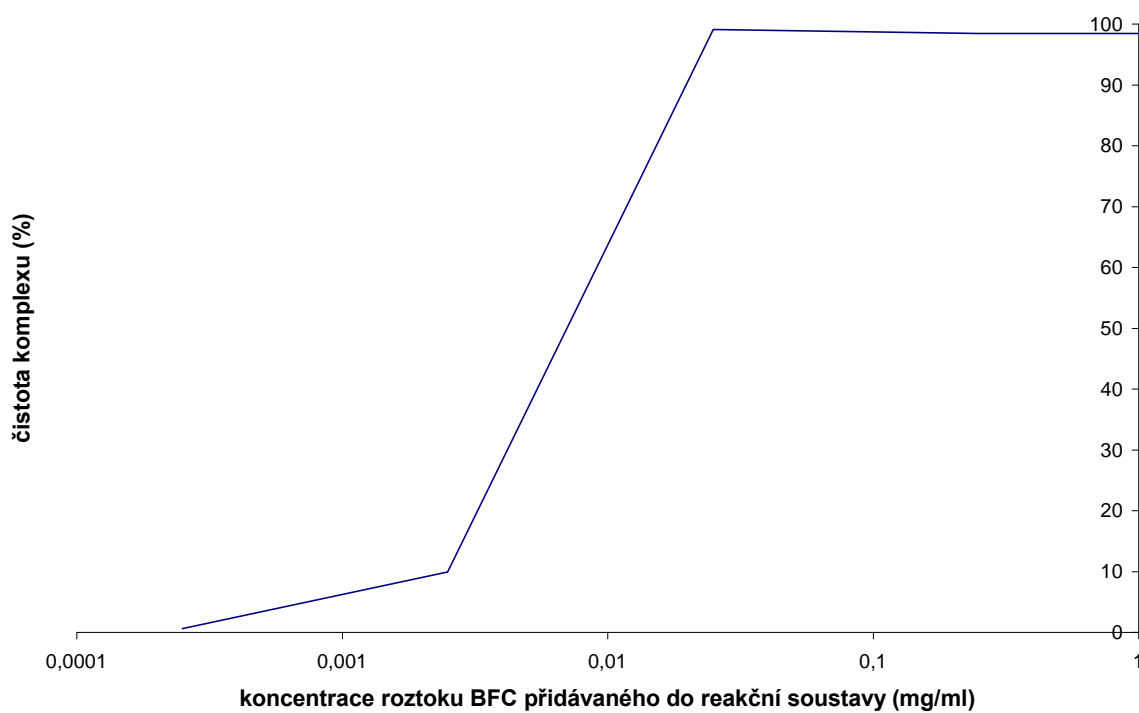
20,2mg Amino-B2M3-A bylo rozpuštěno ve 20,2ml superčisté vody. 7 μ l tohoto roztoku bylo přidáno k 90 μ l 0,4M acetátového pufru o pH = 6. Po promíchání byly přidány 2 μ l $^{111}\text{In-InCl}_3$ (5mCi/500 μ l) a směs byla zahřívána 30 minut při 40°C.

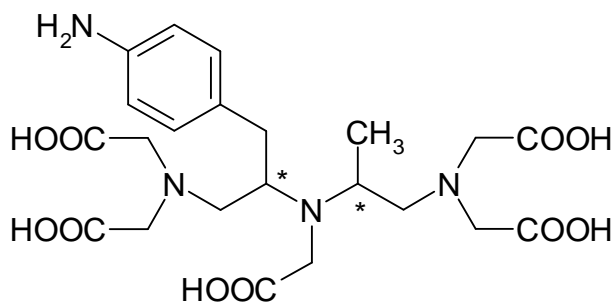
A5: Kinetika tvorby komplexu při různém pH ($t = 40^\circ\text{C}$, $c_{\text{BFC}} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$)

B5: Závislost tvorby komplexu na teplotě ($c_{BFC} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mo/l}$, čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 6$)



C5: Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (jednotlivé koncentrace chelátoru v reakční soustavě (od $c_{BFC} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mo/l}$ do $c_{BFC} = 3,4 \times 10^{-8} \text{ mo/l}$), čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 6$)



4.1.2.2. Příprava komplexu ^{111}In s Amino-B2M3-B

Obr. 4.6 - Amino-B2M3-B

Kinetika tvorby komplexu při různém pH (A6)

Byly připraveny roztoky 0,4M acetátového pufru o pH = 4; 5; 6; 7. K 90 μl každého pufru bylo přidáno 7 μl roztoku Amino-B2M3-B ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány při teplotě 40°C. V čase 5, 15, 30, 60 a 120 minut byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na teplotě (B6)

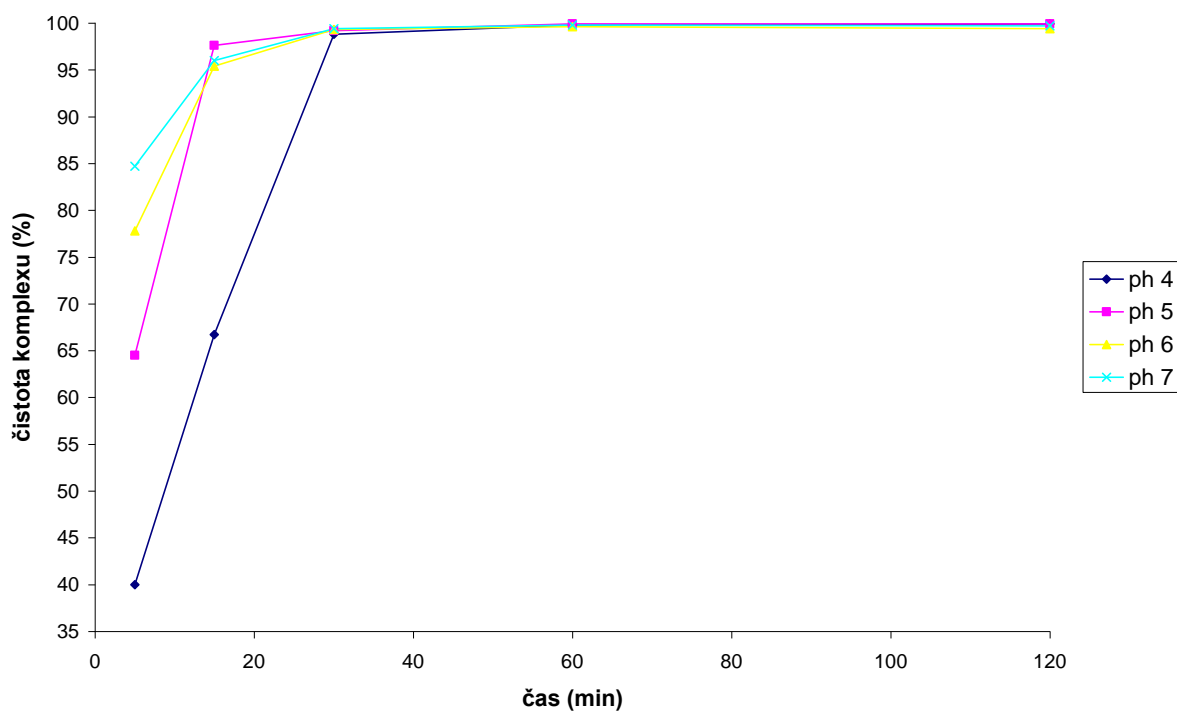
Byly připraveny tři vzorky, složené z 90 μl 0,4M acetátového pufru o pH = 6; k němuž bylo postupně přidáno 7 μl roztoku Amino-B2M3-B ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány po dobu 30 minut, každý při jiné teplotě (25°C, 40°C, 90°C). Po 30 minutách byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (C6)

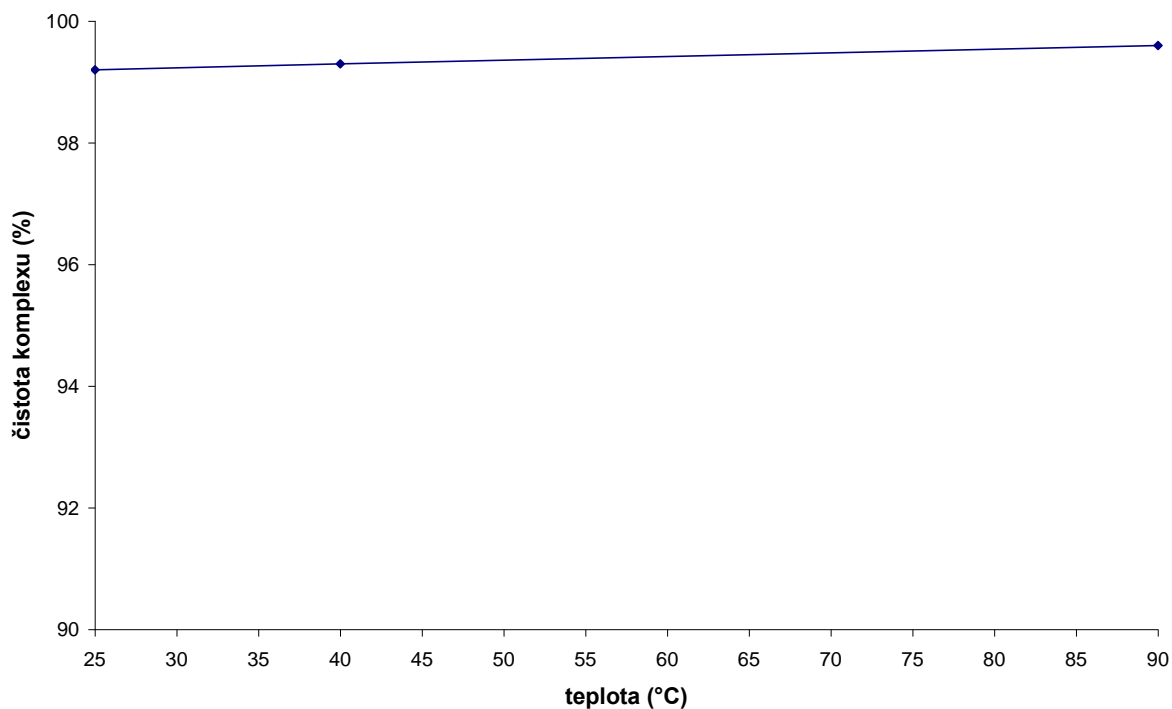
Bylo připraveno pět vzorků o různých koncentracích Amino-B2M3-B. K 90 μl 0,4M acetátového pufru o pH = 6 bylo postupně přidáno 7 μl roztoku Amino-B2M3-B o příslušné koncentraci (1mg/ml, 1mg/4ml, 1mg/40ml, 1mg/400ml, 1mg/4000ml) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Každý vzorek byl zahříván 30 minut při teplotě 40°C. Potom byl každý vzorek analyzován za použití níže popsané ITLC-SG.

Ideální podmínky značení Amino-B2M3-B

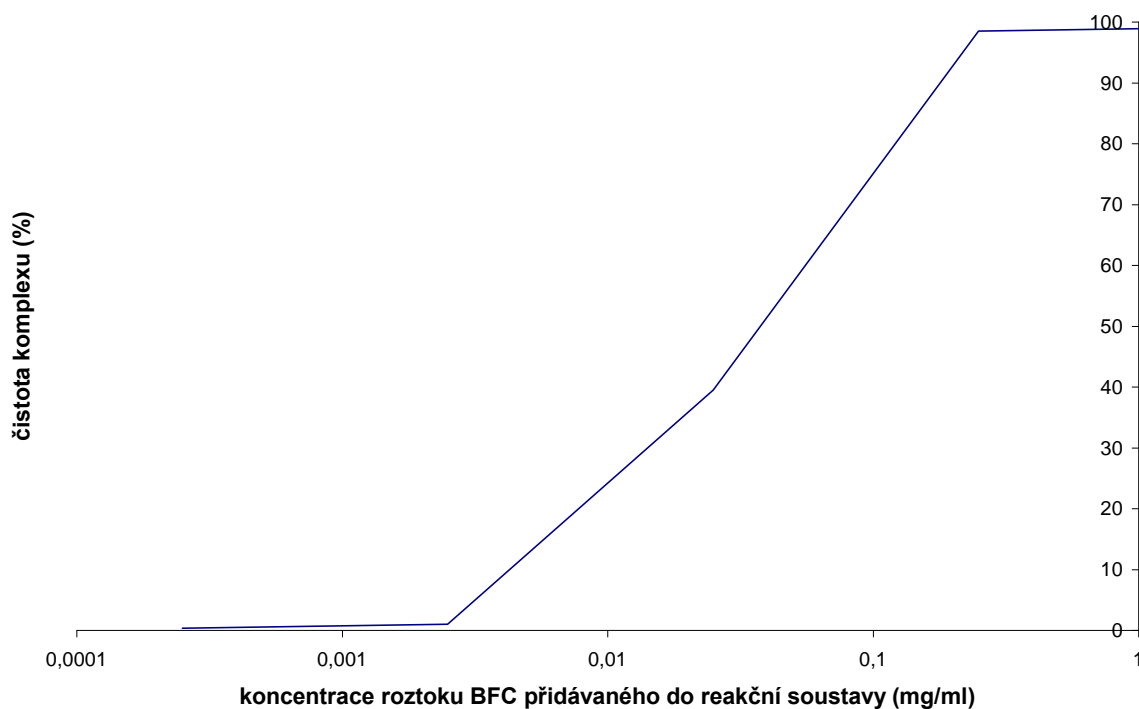
12,1mg Amino-B2M3-B bylo rozpuštěno ve 12,1ml superčisté vody. 7 μ l tohoto roztoku bylo přidáno k 90 μ l 0,4M acetátového pufru o pH = 6. Po promíchání byly přidány 2 μ l $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μ l) a směs byla zahřívána 30 minut při 40°C.

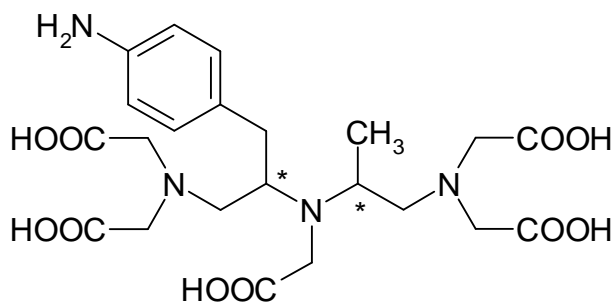
A6: Kinetika tvorby komplexu při různém pH ($t = 40^\circ\text{C}$, $c_{\text{BFC}} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$)

B6: Závislost tvorby komplexu na teplotě ($c_{BFC} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mo/l}$, čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 6$)



C6: Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (jednotlivé koncentrace chelátoru v reakční soustavě (od $c_{BFC} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mo/l}$ do $c_{BFC} = 3,4 \times 10^{-8} \text{ mo/l}$), čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 6$)



4.1.2.3. Příprava komplexu ^{111}In s Amino-B2M3-E

Obr. 4.7 - Amino-B2M3-E

Kinetika tvorby komplexu při různém pH (A7)

Byly připraveny roztoky 0,4M acetátového pufru o pH = 4; 5; 6; 7. K 90 μl každého pufru bylo přidáno 7 μl roztoku Amino-B2M3-E ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány při teplotě 40°C. V čase 5, 15, 30, 60 a 120 minut byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na teplotě (B7)

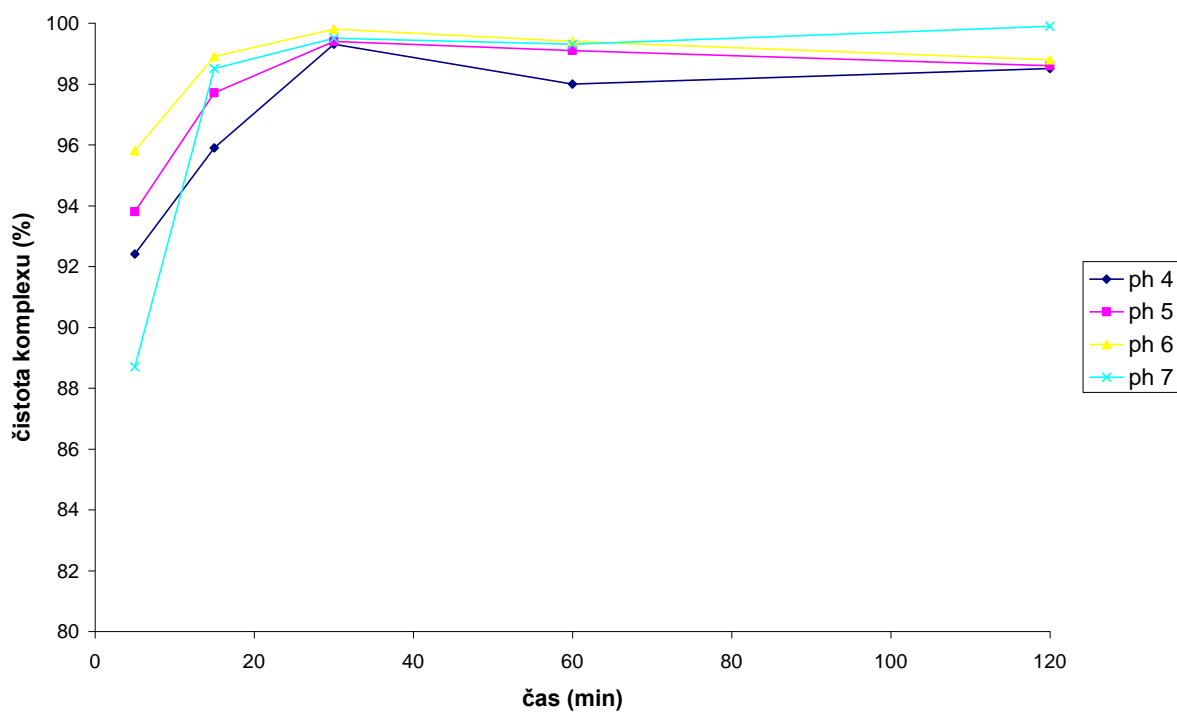
Byly připraveny tři vzorky, složené z 90 μl 0,4M acetátového pufru o pH = 6; k němuž bylo postupně přidáno 7 μl roztoku Amino-B2M3-E ($c' = 1\text{mg/ml}$) a 2 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Vzorky byly zahřívány po dobu 30 minut, každý při jiné teplotě (25°C, 40°C, 90°C). Po 30 minutách byl z každé směsi odebrán 1 μl , který byl nanesen na strip pro ITLC-SG analýzu. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu.

Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (C7)

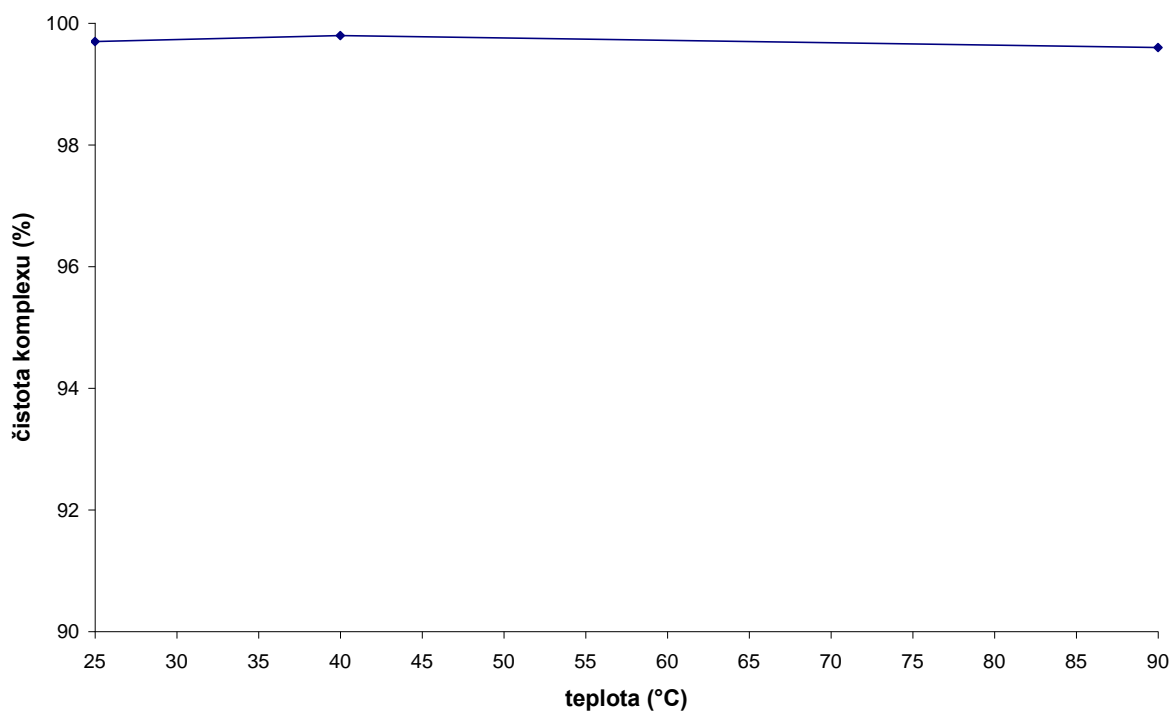
Bylo připraveno sedm vzorků o různých koncentracích Amino-B2M3-E. Ke 48 μl 0,4 M acetátového pufru o pH = 6 bylo postupně přidáno 1 μl roztoku Amino-B2M3-E o příslušné koncentraci (1mg/2ml, 1mg/4,5ml, 1mg/10ml, 1mg/20ml, 1mg/45ml, 1mg/100ml, 1mg/200ml) a 1 μl $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Každý vzorek byl zahříván 30 minut při teplotě 40°C. Potom byl každý vzorek analyzován za použití níže popsané ITLC-SG.

Ideální podmínky značení Amino-B2M3-E

2,1mg Amino-B2M3-E bylo rozpuštěno ve 2,1ml superčisté vody. 7 μ l tohoto roztoku bylo přidáno k 90 μ l 0,4 M acetátového pufru o pH = 6. Po promíchání byly přidány 2 μ l $^{111}\text{In-}\text{InCl}_3$ (2mCi/200 μ l) a směs byla zahřívána 30 minut při 40°C.

A7: Kinetika tvorby komplexu při různém pH ($t = 40^\circ\text{C}$, $c_{\text{BFC}} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$)

B7: Závislost tvorby komplexu na teplotě ($c_{BFC} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mo/l}$, čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 6$)



C7: Závislost tvorby komplexu na koncentraci chelátoru (jednotlivé koncentrace chelátoru v reakční soustavě (od $c_{BFC} = 1,36 \times 10^{-4} \text{ mo/l}$ do $c_{BFC} = 6,8 \times 10^{-7} \text{ mo/l}$), čas reakce 30 minut, $\text{pH} = 6$)

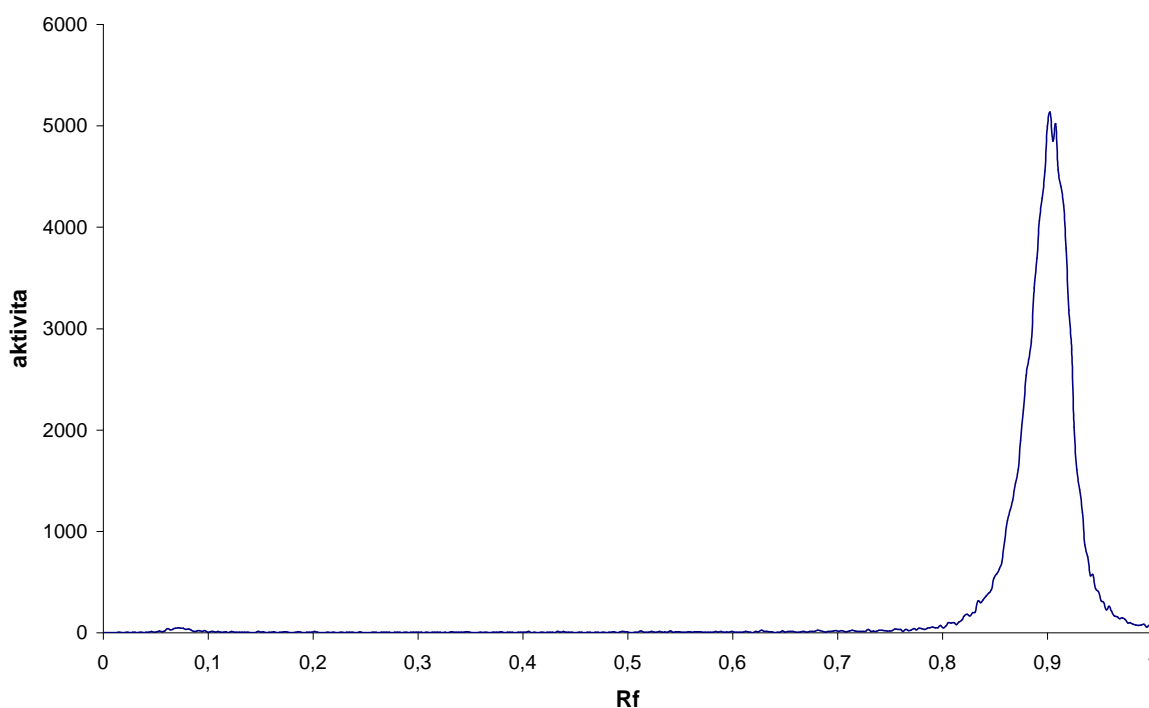


4.1.2.4. Analytické metody používané pro analýzu značených acyklických BFC

ITLC-SG analýza

Pro kontrolu radiochemické čistoty připraveného komplexu byla využívána ITLC-SG analýza. Jako mobilní fáze byla použita směs - 10% octan amonný : metanol = 1:1. Na strip byl zpravidla nanášen 1 μ l vzorku. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu (D2). Hodnoty R_f jednotlivých přítomných chemických forem jsou následující: volné $^{111}\text{In}^{3+}$: $R_f = 0-0,2$; komplex $^{111}\text{In-BFC}$: $R_f = 0,8-1$

D2: Příklad radiochromatogramu značeného acyklického chelátoru získaného tenkovrstvou chromatografií (ITLC-SG); konkrétně $^{111}\text{In-Amino-B2M3-B}$



Tabulka 4.2 - Souhrnné výsledky stability radioaktivně značených diastereoisomerů acyklického chelátoru Amino-B2M3 zjištěné tenkovrstvou chromatografií

Komplex	Čistota komplexu (%) v čase		
	30min.	120min.	48h.
$^{111}\text{In-Amino-B2M3-A}$	98	98,2	98,4
$^{111}\text{In-Amino-B2M3-B}$	99,3	99,5	98,7
$^{111}\text{In-Amino-B2M3-E}$	99,8	98,8	98,5

HPLC analýza

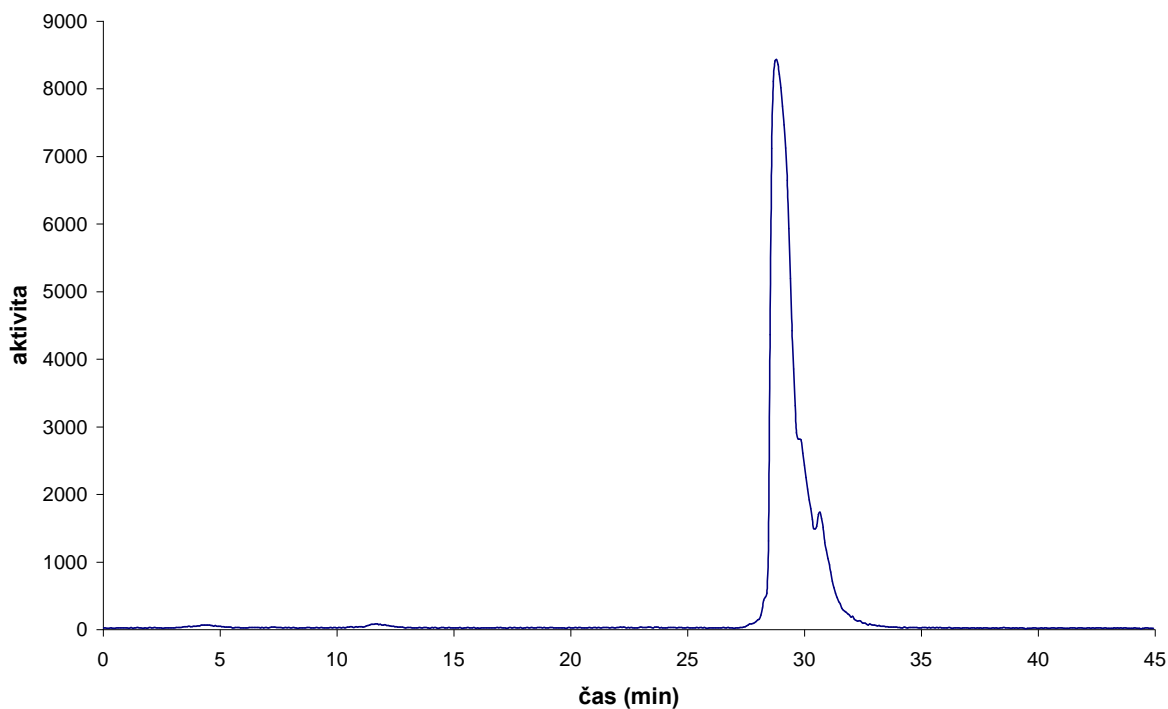
Příprava vzorků pro HPLC analýzu

35 μl Amino-B2M3-A ($c' = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) nebo 55 μl Amino-B2M3-B, E ($c' = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) bylo smícháno se 120 μl (Amino-B2M3-A) nebo 180 μl (Amino-B2M3-B, E) 0,4M acetátového pufru pH = 6 a 10 μl (Amino-B2M3-A) nebo 15 μl (Amino-B2M3-B, E) $^{111}\text{In-InCl}_3$ (2mCi/200 μl). Po promíchání byla reakční směs naředěna superčistou vodou na 1ml a poté byla zahřívána 30 minut při 40°C.

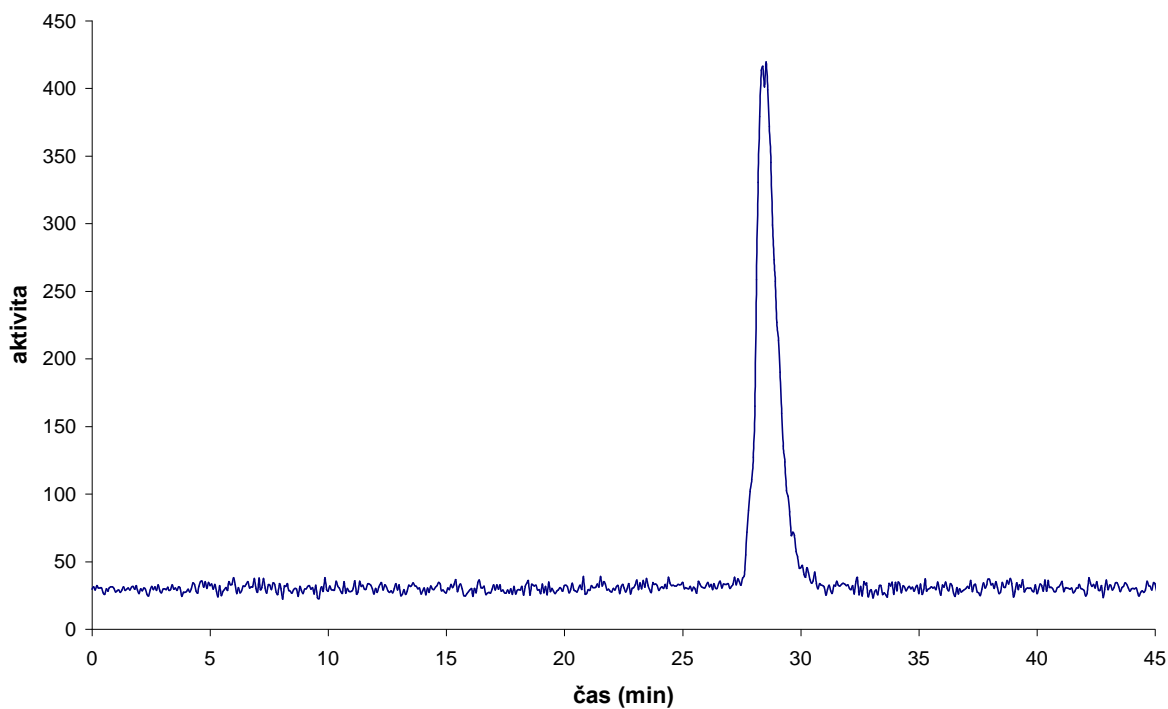
Podmínky analýz

HPLC analýzy byly prováděny na koloně LichroCart 125-4, Lichrospher 100, RP-18e, 5 μm . Jako mobilní fáze A byl používán 0,2M acetátový pufr o pH = 5,5 a jako mobilní fáze B byl používán metanol (MeOH). Časový průběh gradientu: 0-20 min 0% B, 20-25 min 0-50% B, 25-35 min 50% B, 35-40 min 50-0% B a 40-45 min 0% B. Nastříkáváno bylo vždy 100 μl vzorku a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. HPLC analýzy komplexů připravených za optimálních podmínek ukazovaly jejich vysokou radiochemickou čistotu a stabilitu (E2a, E2b), což bylo také potvrzeno výsledky získanými tenkovrstvou chromatografií (tabulka 4.2). Retenční časy značených komplexů byly 28,7 - 28,9 minut ($^{111}\text{In-Amino-B2M3-A}$) 28,4 - 28,6 minut ($^{111}\text{In-Amino-B2M3-B}$) 28,0 - 28,2 minut ($^{111}\text{In-Amino-B2M3-E}$).

E2a: Příklad radiochromatogramu značeného acyklického chelátoru získaného HPLC analýzou; konkrétně ^{111}In -Amino-B2M3-A



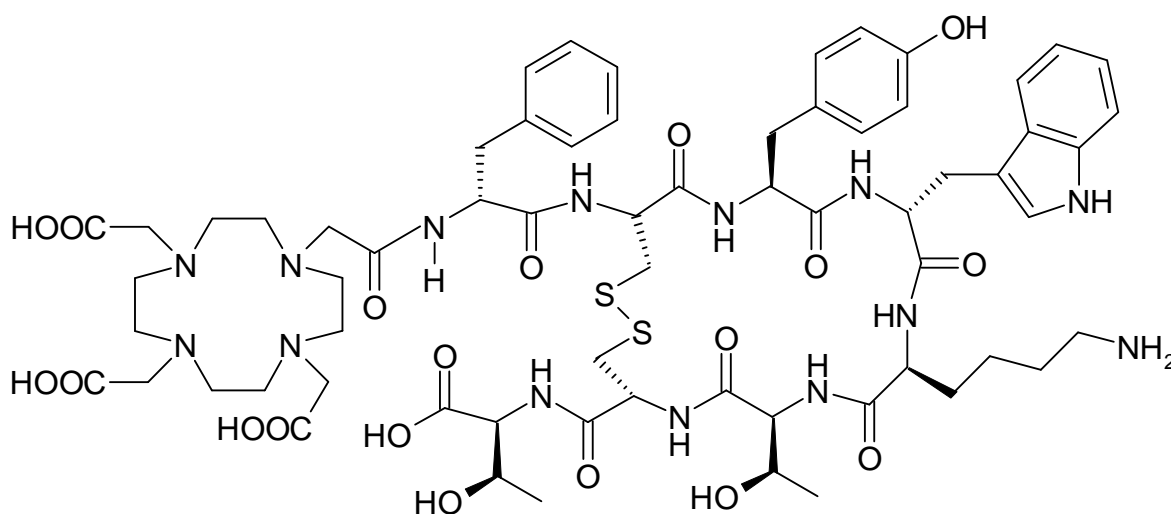
E2b: Příklad radiochromatogramu značeného acyklického chelátoru získaného HPLC analýzou; konkrétně ^{111}In -Amino-B2M3-B



4.2. Radioaktivní značení a analýza receptorově specifických peptidů

Součástí této práce bylo také studium podmínek značení, stability a případně studium metabolismu receptorově specifických peptidů ze skupiny derivátů somatostatinu, které byly získány v rámci spolupráce se zahraničními partnery nebo zakoupeny od výrobců.

4.2.1. DOTA-Tyr³-oktreotát (DOTA-Tyr³-tát)

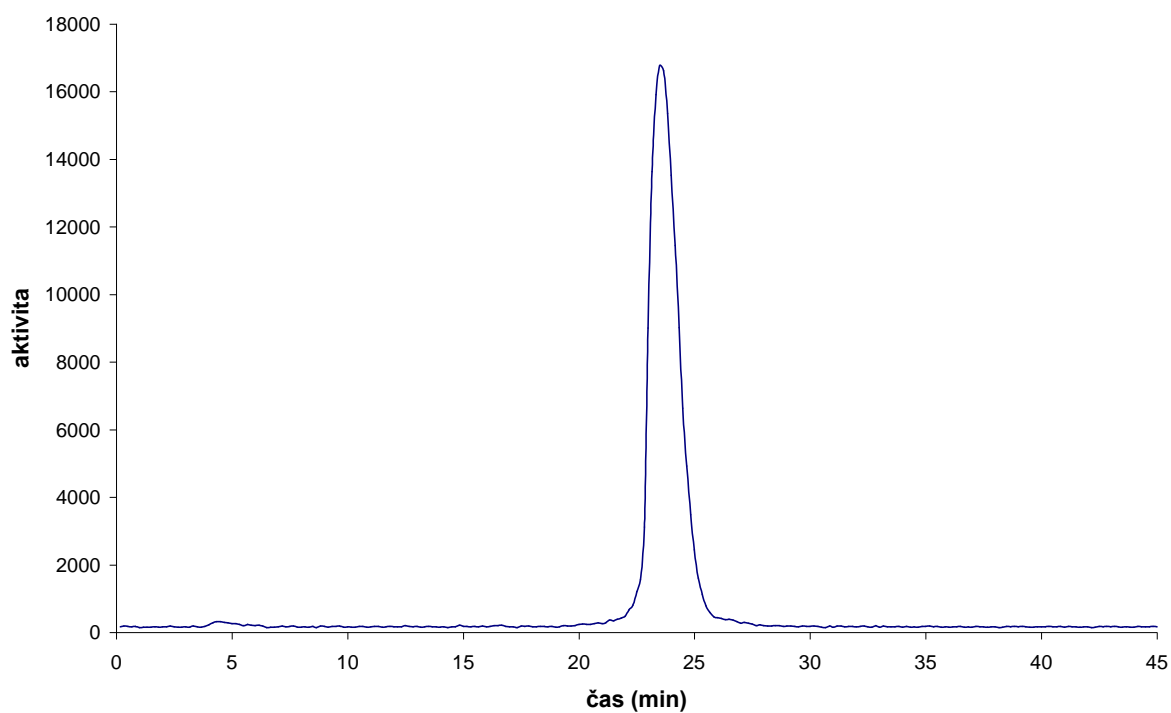
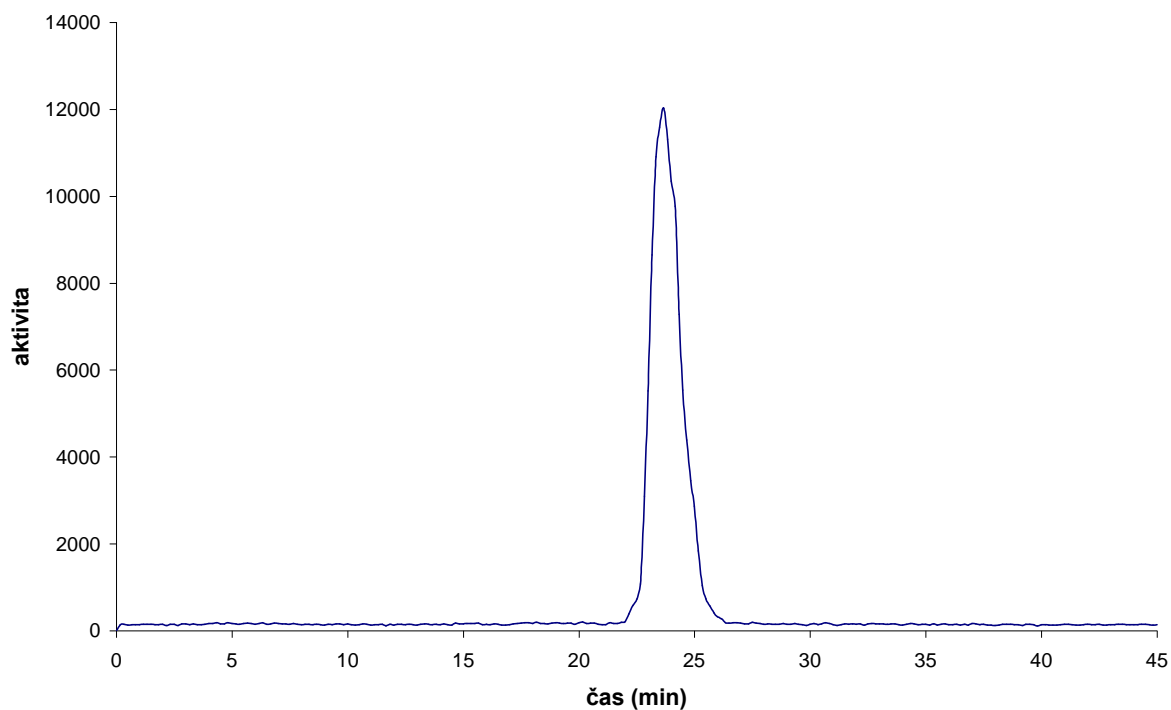


Obr. 4.8 - DOTA-Tyr³-oktreotát

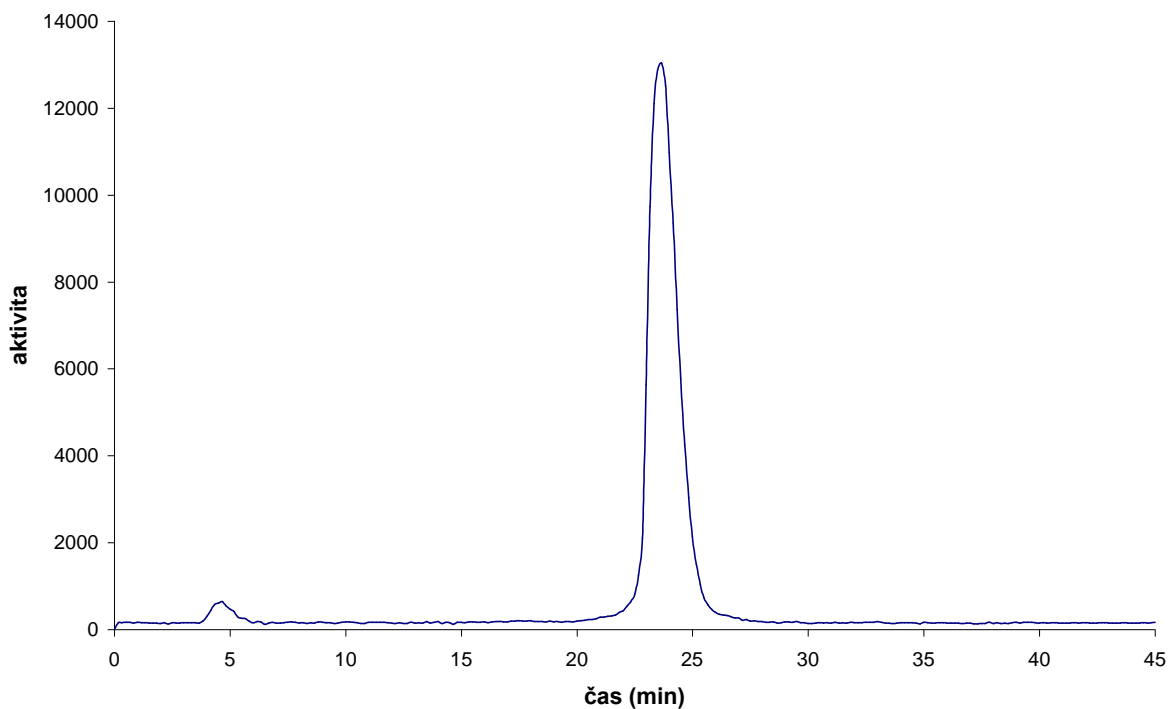
4.2.1.1. Příprava ¹¹¹In-DOTA-Tyr³-tátu

250µg DOTA-Tyr³-tátu bylo rozpuštěno ve 250µl superčisté vody. 10µl tohoto roztoku bylo přidáno k 200µl 0,4M acetátového pufru s 0,24M kyselinou gentisovou o pH = 5. Po promíchání bylo přidáno 50µl ¹¹¹In-InCl₃ v 0,04M HCl (2mCi/200µl) a směs byla zahřívána při 90-95°C po dobu 25 minut.

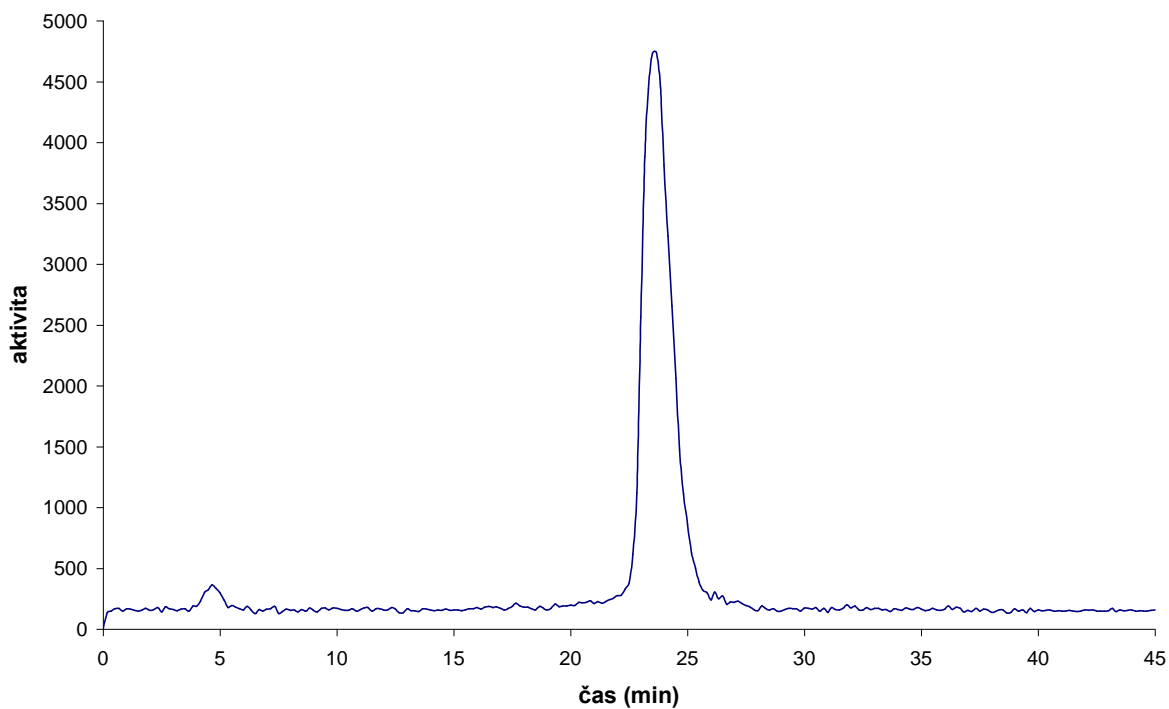
U takto připraveného ¹¹¹In-DOTA-Tyr³-tátu byla zjišťována radiochemická čistota, stabilita a po aplikaci potkanům přítomnost metabolitů v jejich moči.

Obr. 4.9 - Příklad radiochromatogramu ^{111}In -DOTA-Tyr³-oktreotátuObr. 4.10 - Příklad radiochromatogramu ^{111}In -DOTA-Tyr³-oktreotátu po 24 hodinách

Obr. 4.11 - Příklad radiochromatogramu potkaní moči po aplikaci $^{111}\text{In-DOTA-Tyr}^3$ -oktreotátu (interval 0-2h.)



Obr. 4.12 - Příklad radiochromatogramu potkaní moči po aplikaci $^{111}\text{In-DOTA-Tyr}^3$ -oktreotátu (interval 2-24h.)

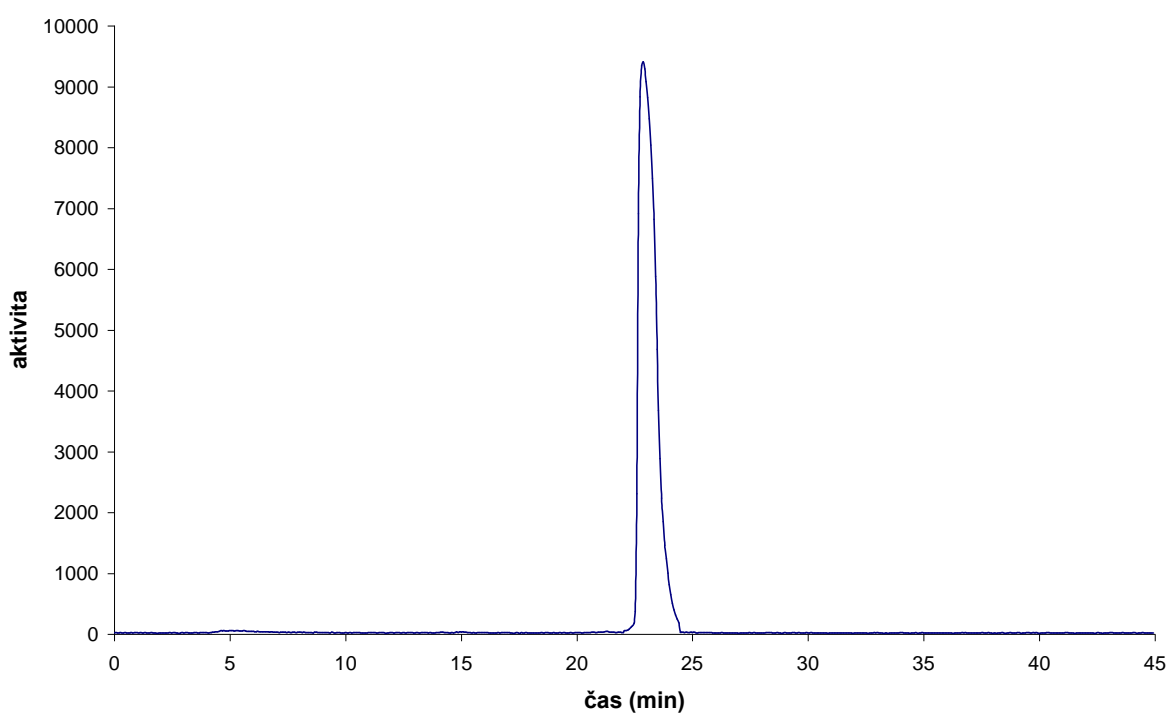


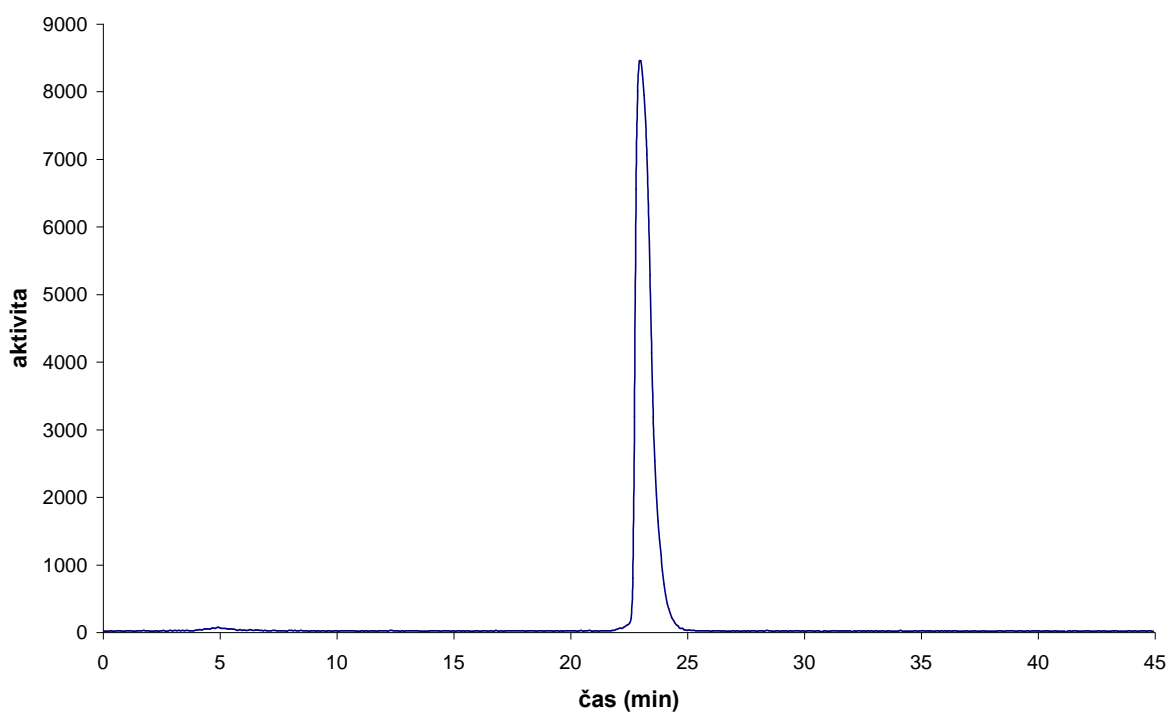
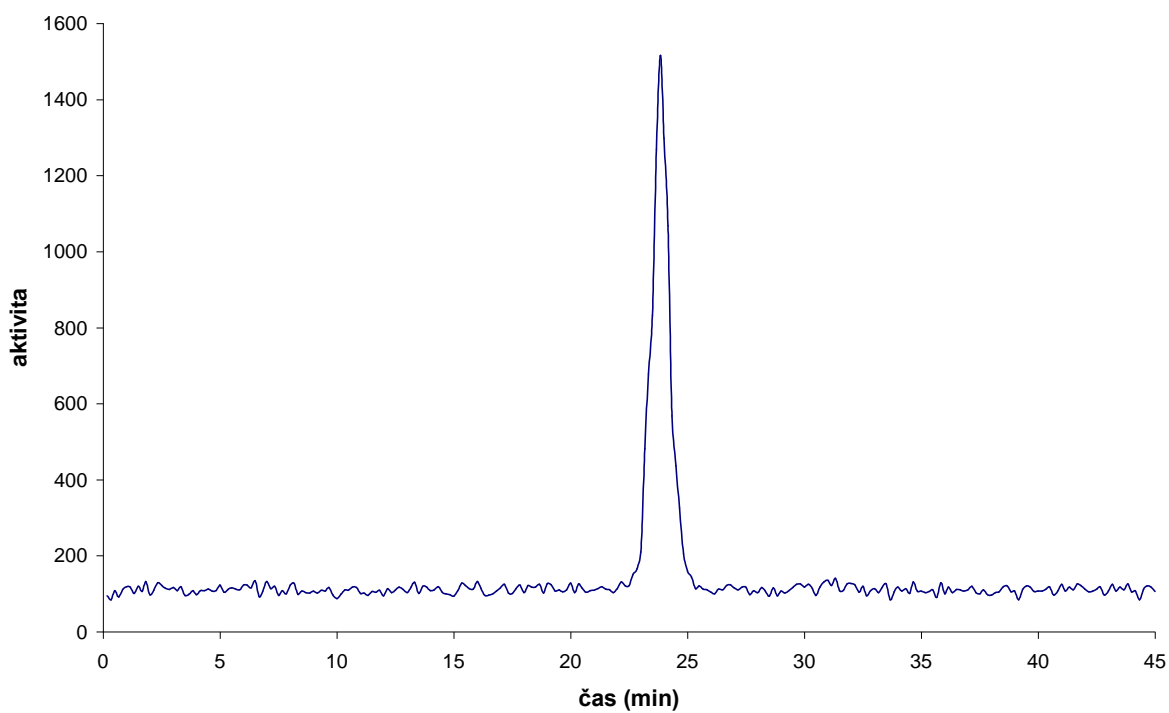
4.2.1.2. Příprava ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-tátu

250 μg DOTA-Tyr³-tátu bylo rozpuštěno ve 250 μl superčisté vody. 10 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 200 μl 0,4M acetátového pufru s 0,24M kyselinou gentisovou o pH = 5. Po promíchání bylo přidáno 0,8 μl ^{177}Lu -LuCl₃ v 0,05M HCl (10mCi/8 μl) a směs byla zahřívána při 90-95°C po dobu 25 minut.

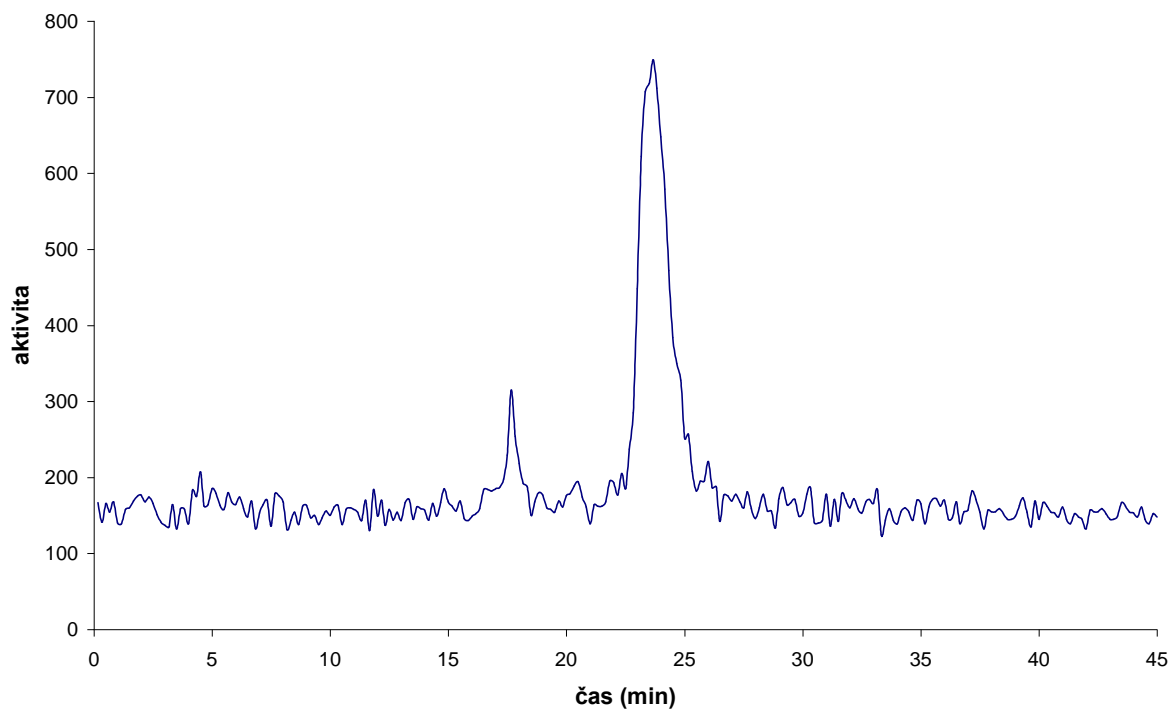
U takto připraveného ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-tátu byla zjišťována radiochemická čistota, stabilita a po aplikaci potkanům přítomnost metabolitů v jejich moči.

Obr. 4.13 - Příklad radiochromatogramu ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-oktreotátu



Obr. 4.14 - Příklad radiochromatogramu ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-oktreotátu po 24 hodináchObr. 4.15 - Příklad radiochromatogramu potkaní moči po aplikaci ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-oktreotátu (interval 0-2h.)

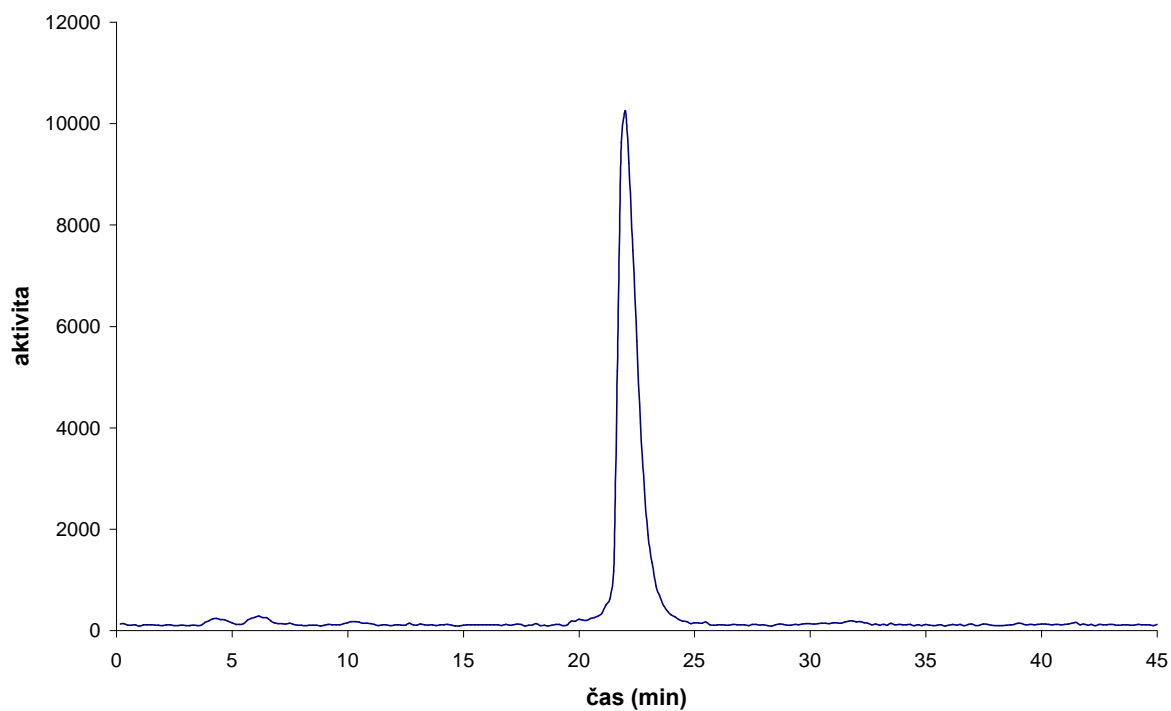
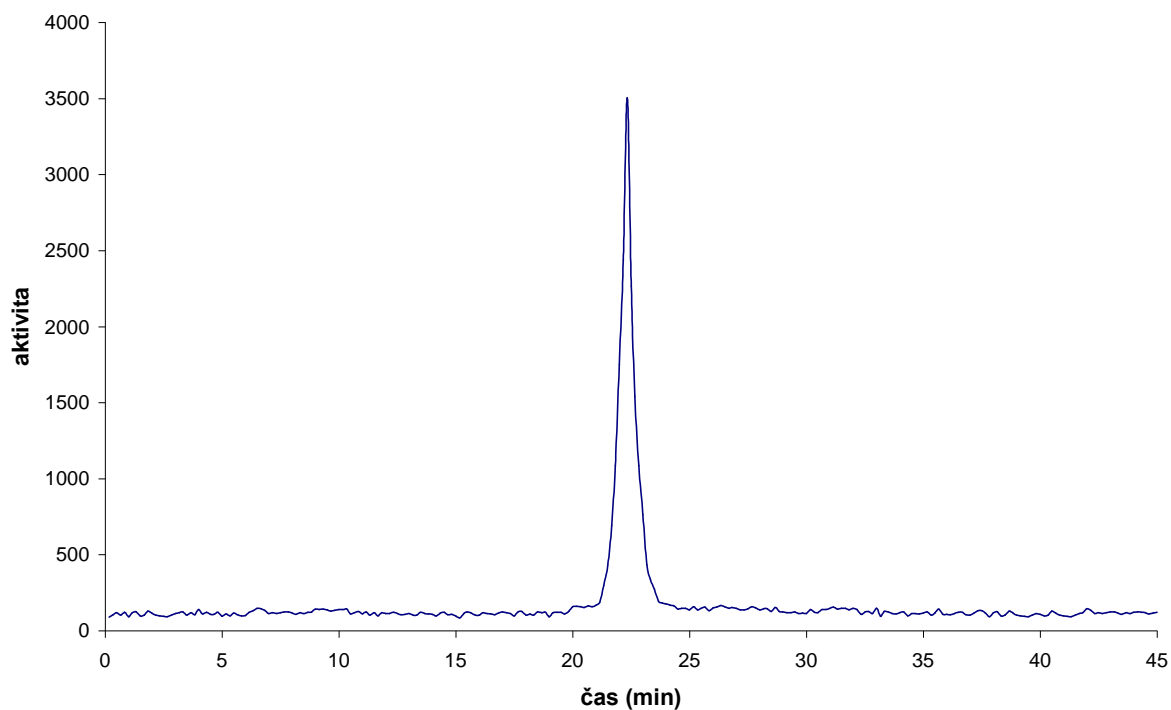
Obr. 4.16 - Příklad radiochromatogramu potkaní moči po aplikaci ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-oktreotátu (interval 2-24h.)



4.2.1.3. Příprava ^{90}Y -DOTA-Tyr³-tátu

250 μg DOTA-Tyr³-tátu bylo rozpuštěno ve 250 μl superčisté vody. 10 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 200 μl 0,4M acetátového pufru s 0,24M kyselinou gentisovou o pH = 5. Po promíchání bylo přidáno 2 μl ^{90}Y -YCl₃ v 0,05M HCl (10mCi/20 μl) a směs byla zahřívána při 90-95°C po dobu 25min.

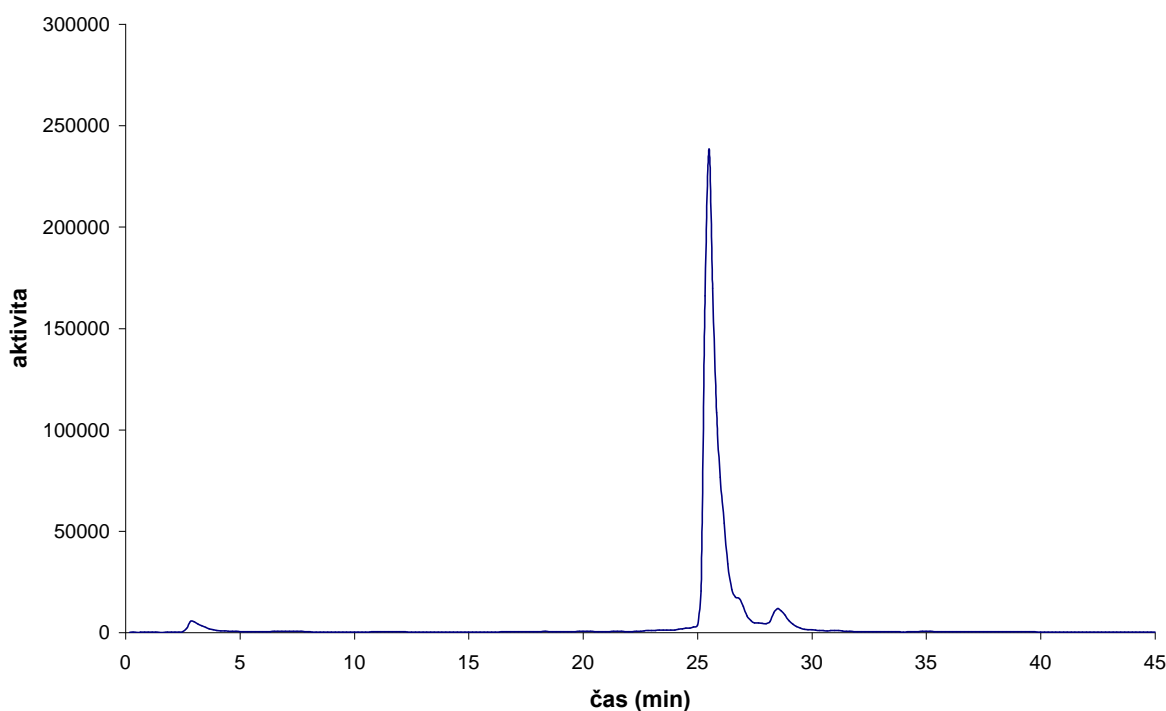
U takto připraveného ^{90}Y -DOTA-Tyr³-tátu byla zjišťována radiochemická čistota a stabilita.

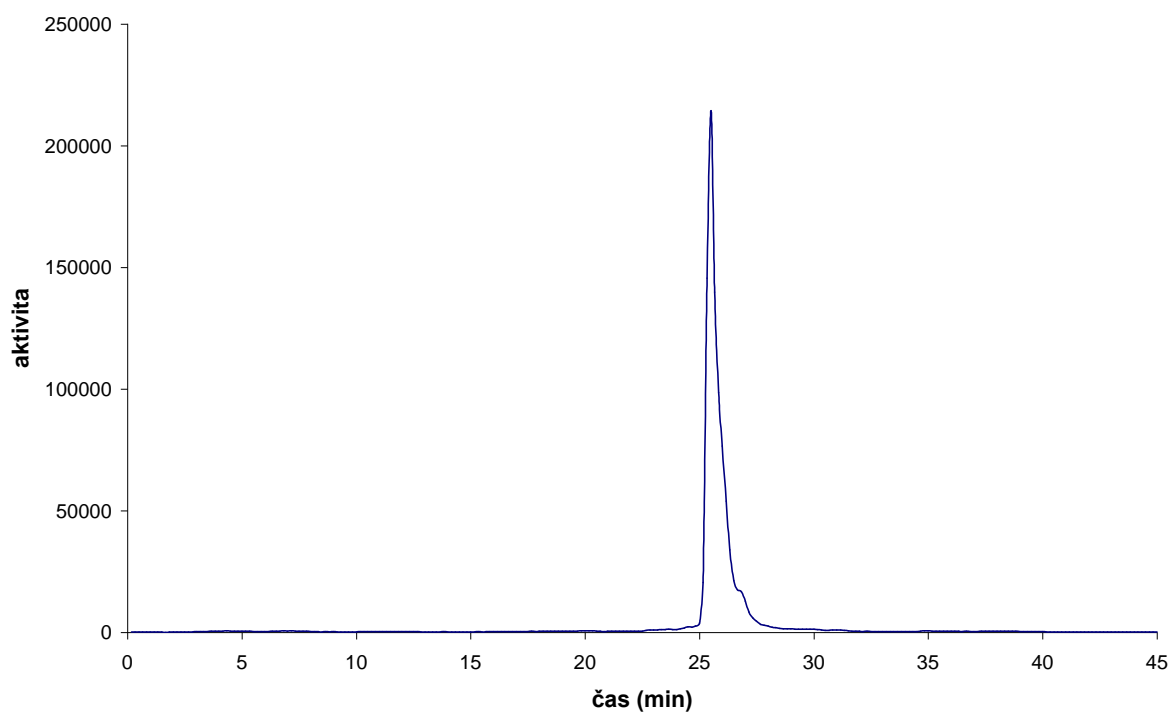
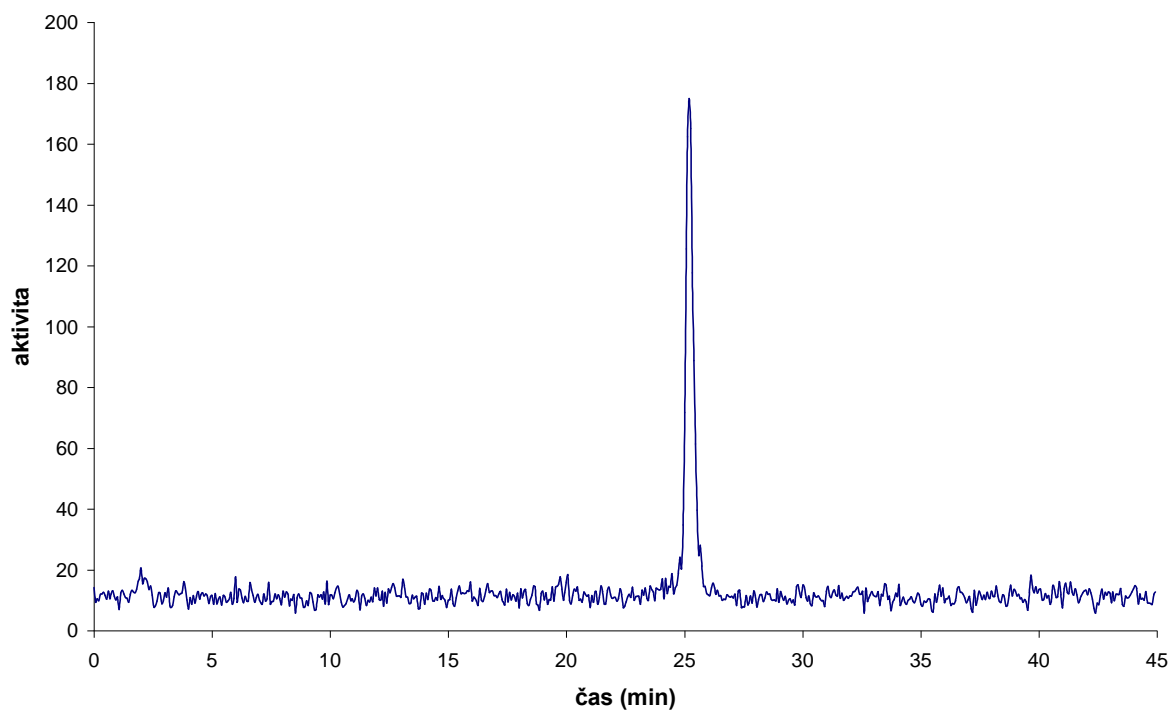
Obr. 4.17 - Příklad radiochromatogramu ^{90}Y -DOTA-Tyr³-oktreotátuObr. 4.18 - Příklad radiochromatogramu ^{90}Y -DOTA-Tyr³-oktreotátu po 24 hodinách

4.2.1.4. Příprava DOTA-¹²⁵I-Tyr³-tátu (značení oxidativní jodací chloraminovou metodou)

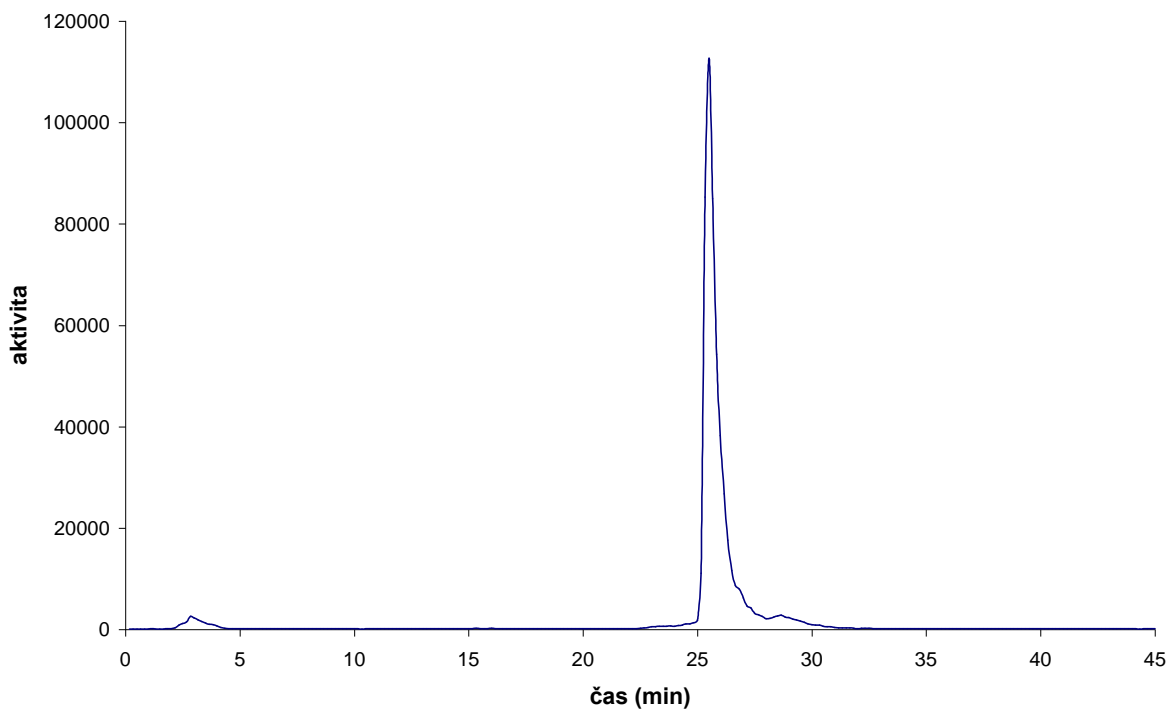
250µg DOTA-Tyr³-tátu bylo rozpuštěno ve 250µl superčisté vody. 5µl tohoto roztoku bylo přidáno k 50µl 0,05M fosfátového pufru o pH = 7,4. K této směsi byly připipetovány 4µl ¹²⁵I-NaI v 0,01M NaOH (5mCi/50µl). Po promíchání bylo přidáno 2,5µl roztoku chloraminu T (2mg chloraminu T byly rozpuštěny ve 2ml 0,05M fosfátového pufru o pH = 7,4). Po 60 sekundách byla reakce zastavena přidáním 40µl etanolu a okamžitým nanesením preparátu do HPLC systému. V průběhu HPLC analýzy byla radioaktivita monitorována online a současně byly sbírány frakce v 1 minutových intervalech. DOTA-¹²⁵I-Tyr³-tát byl tedy takto nejdříve přečištěn semipreparativní HPLC analýzou. Pro další experimenty byly spojeny a dále upraveny frakce hlavního píku. Následně pak byla zjišťována RČ, stabilita přípravku a dále po aplikaci potkanům přítomnost metabolitů v jejich moči.

Obr. 4.19 - Příklad radiochromatogramu po jodaci DOTA-Tyr³-oktreotátu

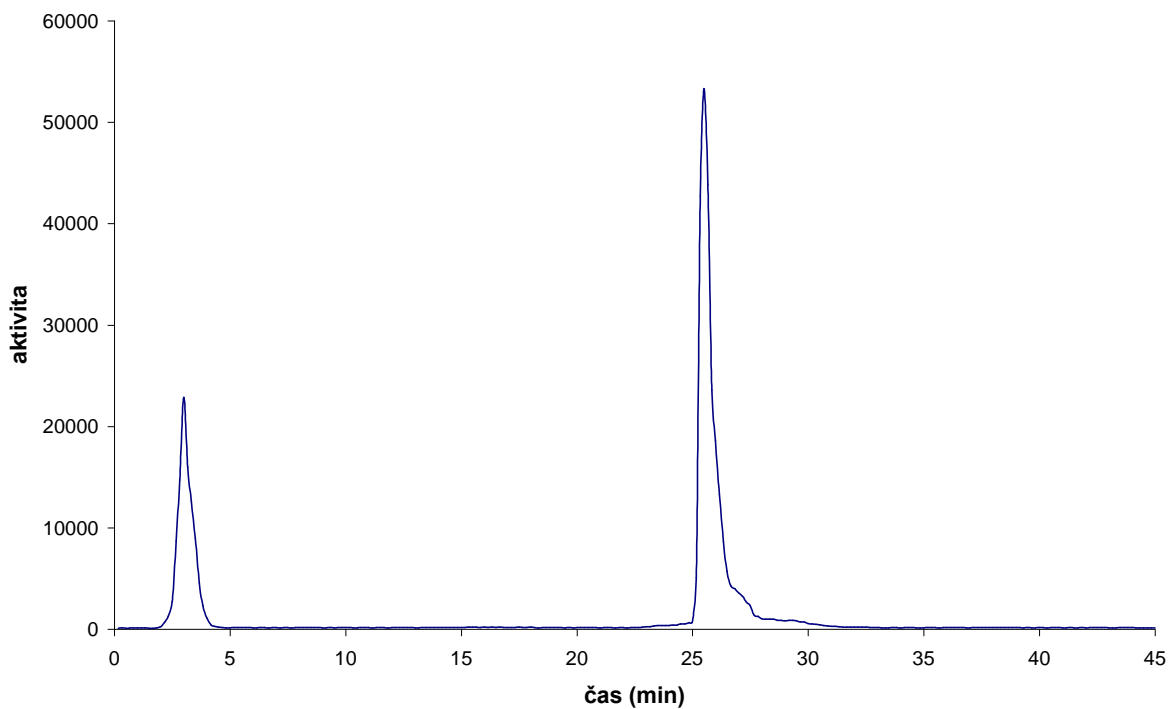


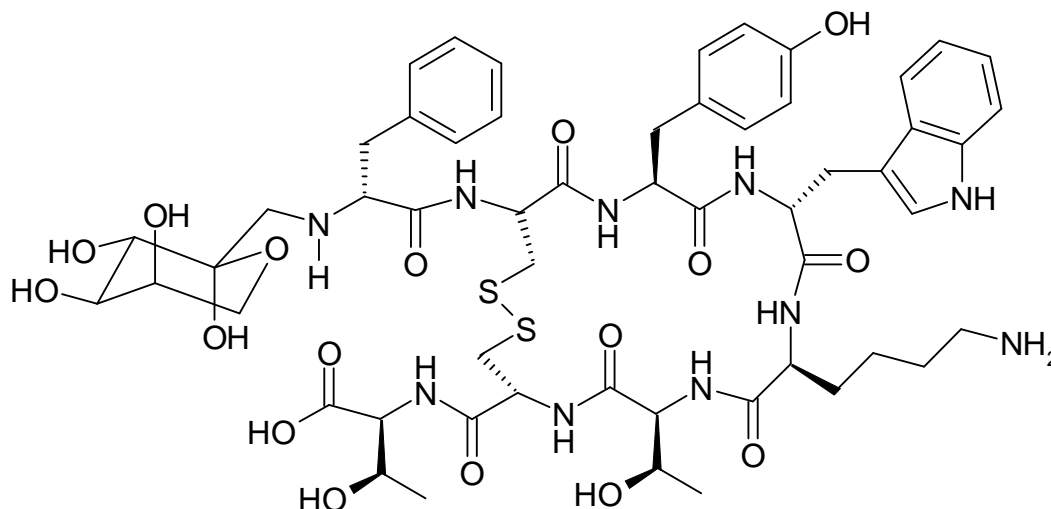
Obr. 4.20 - Příklad radiochromatogramu přečištěného DOTA-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátuObr. 4.21 - Příklad radiochromatogramu DOTA-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu po 24 hodinách

Obr. 4.22 - Příklad radiochromatogramu vytvořeného z naměřených aktivit sbíraných frakcí potkaní moči po aplikaci DOTA-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu (interval 0-2h.)

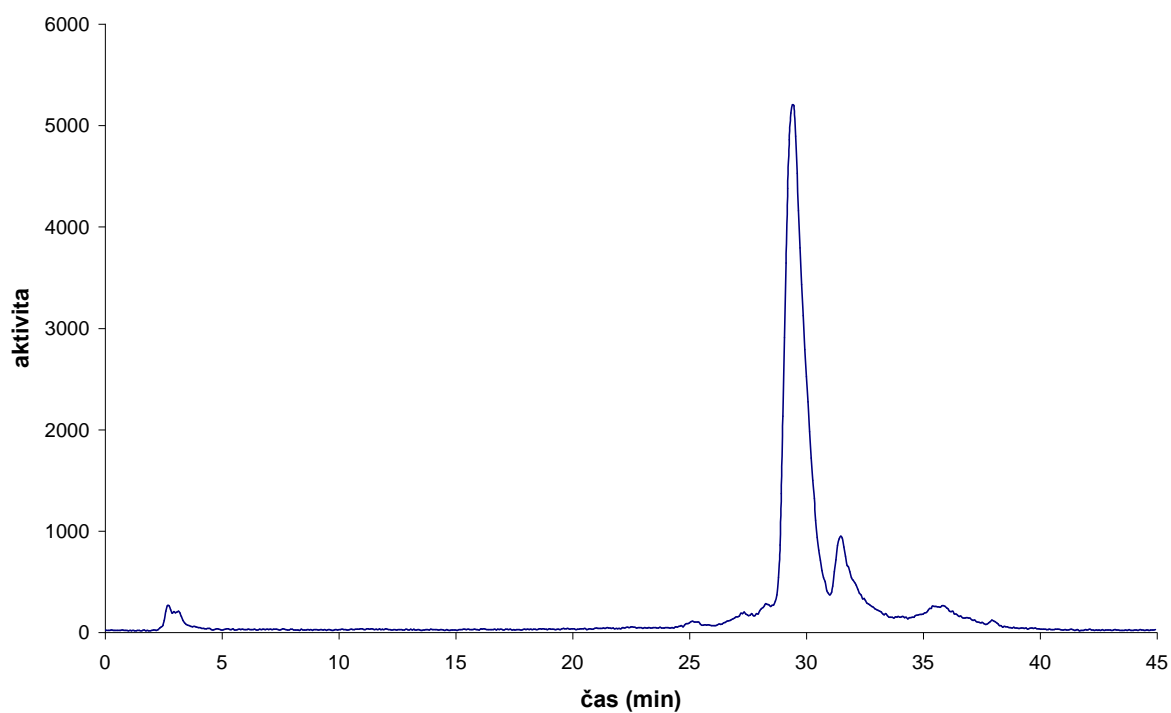
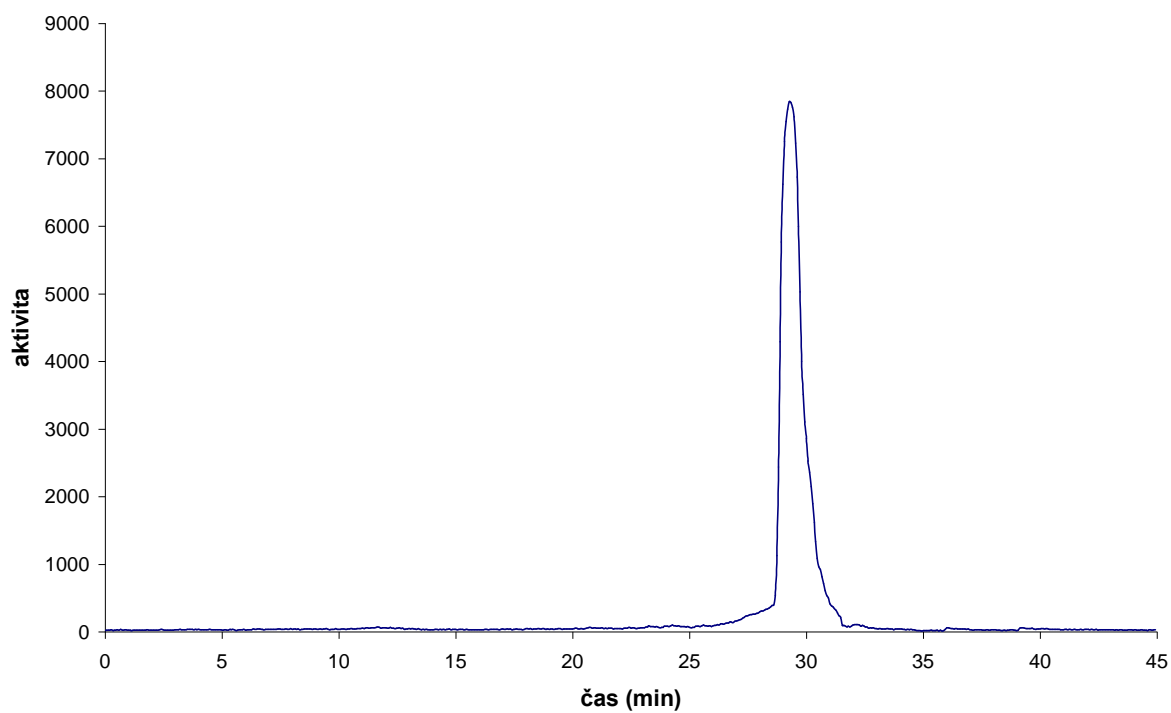


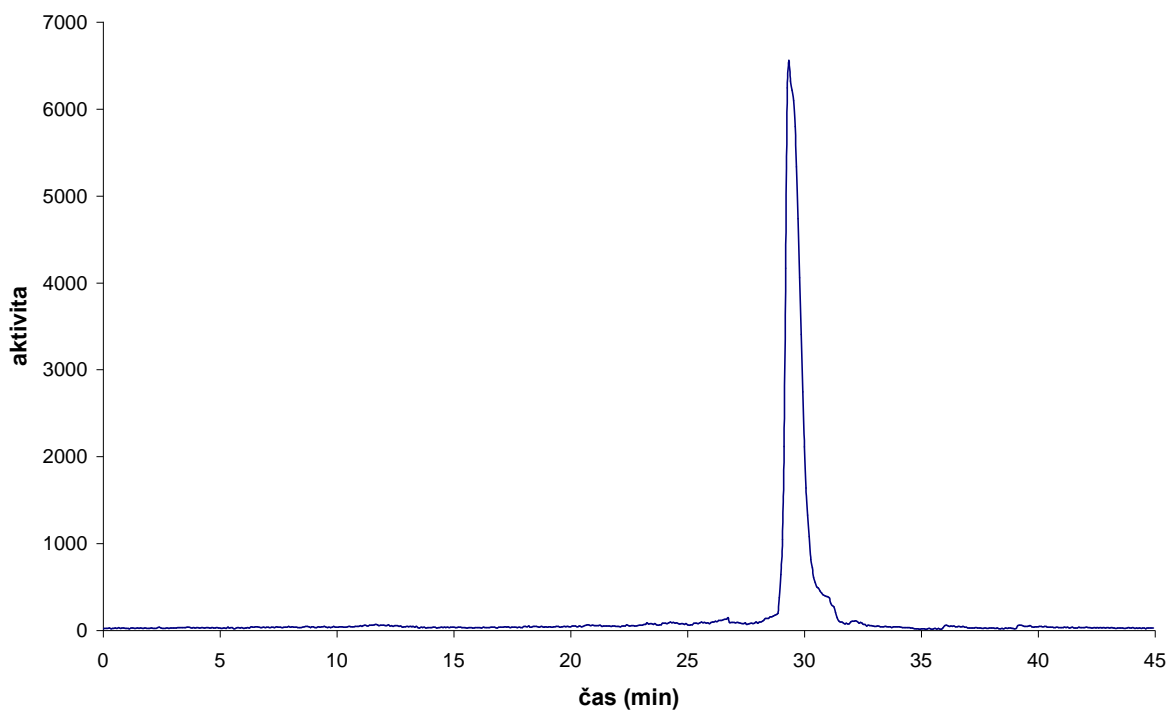
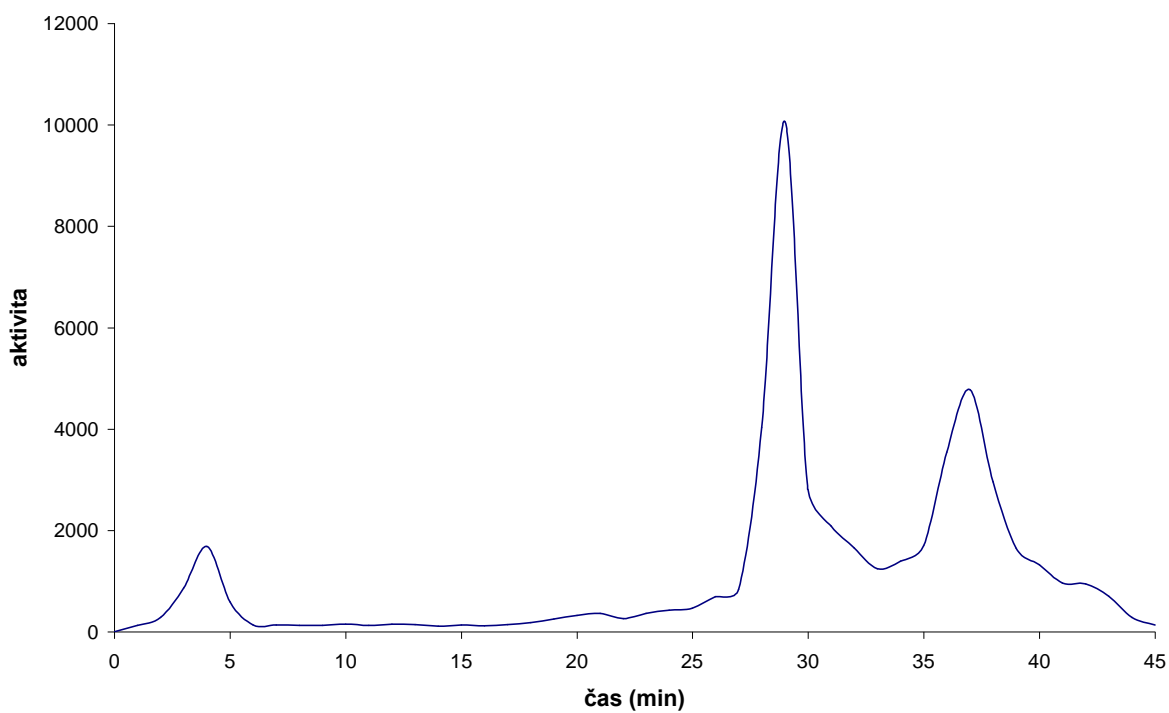
Obr. 4.23 - Příklad radiochromatogramu vytvořeného z naměřených aktivit sbíraných frakcí potkaní moči po aplikaci DOTA-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu (interval 2-24h.)



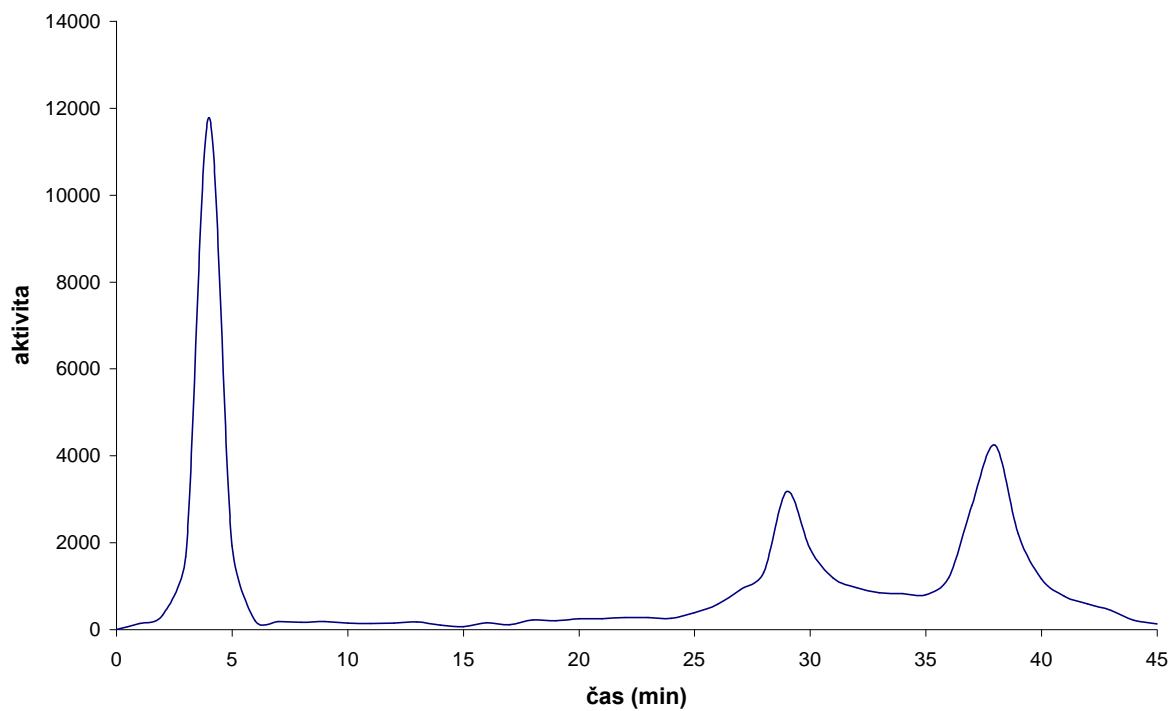
4.2.2. Glukosa-Tyr³-oktreotát (Glu-Tyr³-tát)Obr. 4.24 - Glukosa-Tyr³-oktreotát4.2.2.1. Příprava Glu-¹²⁵I-Tyr³-tátu (značení oxidativní jodací chloraminovou metodou)

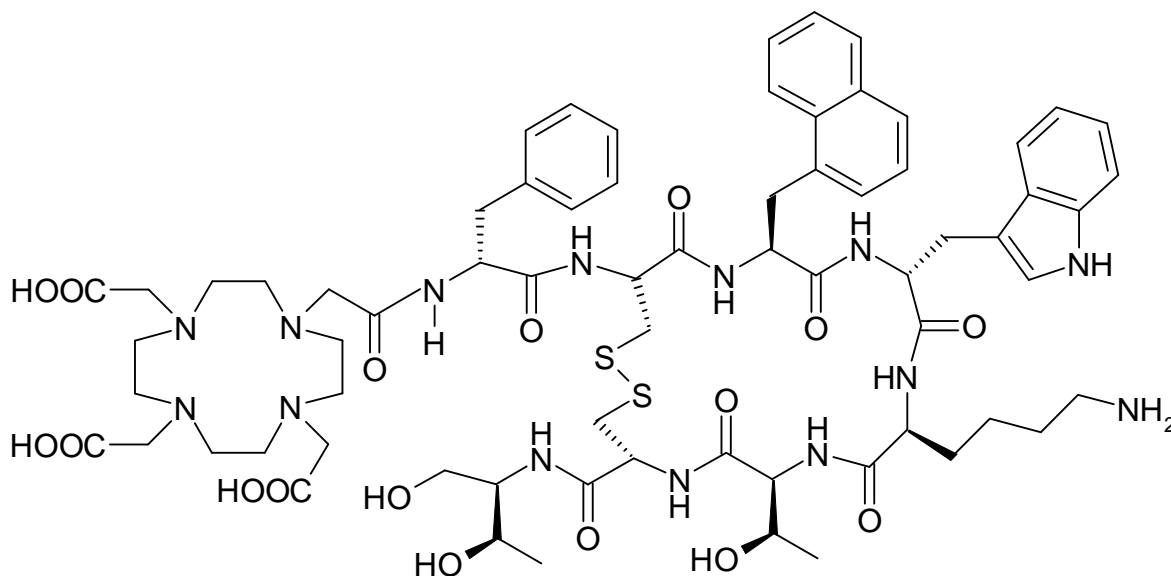
5 μg Glu-Tyr³-tátu bylo rozpuštěno v 5 μl 0,05M kyseliny octové. Tento roztok byl přidán k 50 μl 0,05M fosfátového pufru o pH = 7,4. K této směsi byly připipetovány 4 μl ¹²⁵I-NaI v 0,01M NaOH (5mCi/50 μl). Po promíchání bylo přidáno 2,5 μl roztoku chloraminu T (2mg chloraminu T byly rozpuštěny ve 2ml 0,05M fosfátového pufru o pH = 7,4). Po 60 sekundách byla reakce zastavena přidáním 40 μl etanolu a okamžitým nanesením preparátu do HPLC systému. V průběhu HPLC analýzy byla radioaktivita monitorována online a současně byly sbírány frakce v 1 minutových intervalech. Glu-¹²⁵I-Tyr³-tát byl tedy takto nejdříve přečištěn semipreparativní HPLC analýzou. Pro další experimenty byly spojeny a dále upraveny frakce hlavního píku. Následně pak byla zjišťována RČ, stabilita přípravku a dále po aplikaci potkanům přítomnost metabolitů v jejich moči.

Obr. 4.25 - Příklad radiochromatogramu po jodaci Glu-Tyr³-oktreotátuObr. 4.26 - Příklad radiochromatogramu přečištěného Glu-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu

Obr. 4.27 - Příklad radiochromatogramu Glu-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu po 24 hodináchObr. 4.28 - Příklad radiochromatogramu vytvořeného z naměřených aktivit sbíraných frakcí potkaní moči po aplikaci Glu-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu (interval 0-2h.)

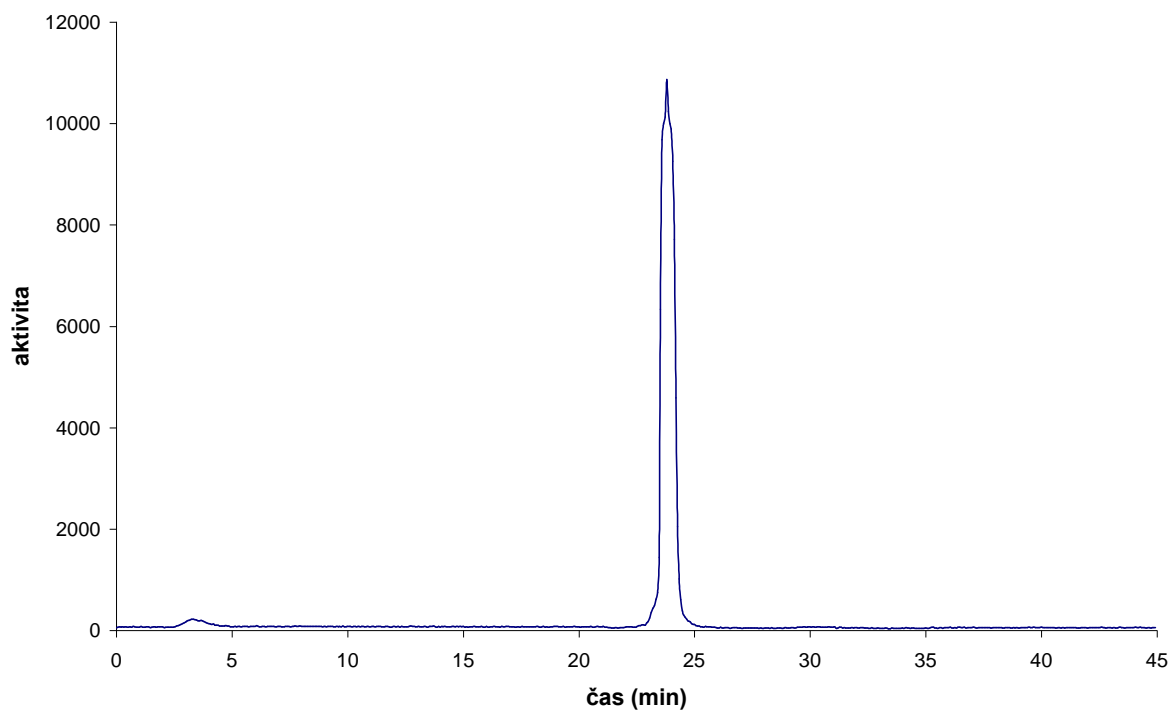
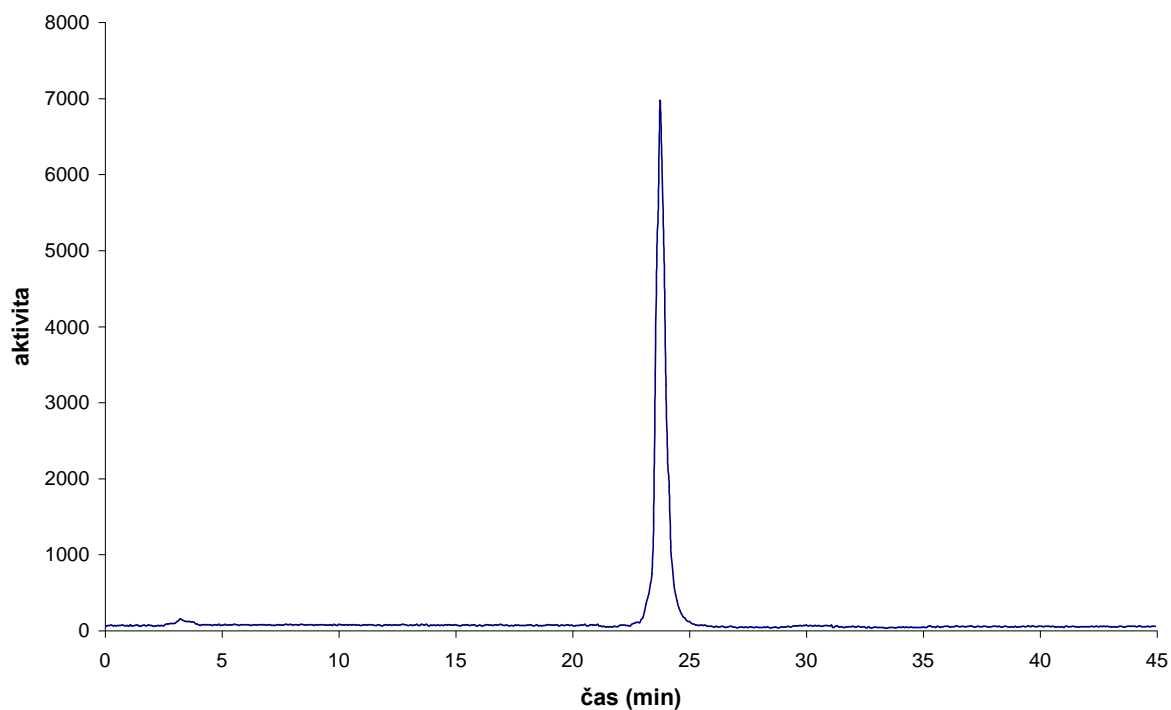
Obr. 4.29 - Příklad radiochromatogramu vytvořeného z naměřených aktivit sbíraných frakcí potkaní moči po aplikaci Glu-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu (interval 2-24h.)



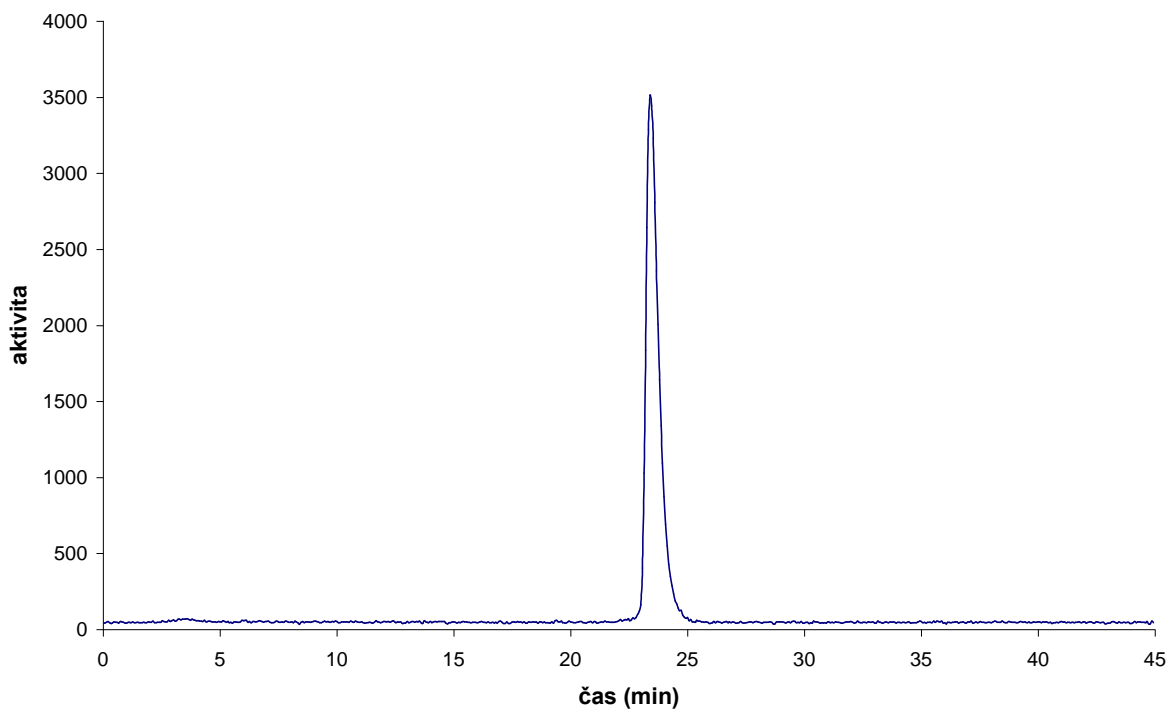
4.2.3. DOTA-Nal³-oktreotid (DOTA-NOC)Obr. 4.30 - DOTA-Nal³-oktreotid4.2.3.1. Příprava ¹¹¹In-DOTA-NOC

250 μg DOTA-NOC bylo rozpuštěno ve 250 μl superčisté vody. 10 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 200 μl 0,4M acetátového pufru s 0,24M kyselinou gentisovou o pH = 5. Po promíchání bylo přidáno 50 μl ¹¹¹In-InCl₃ v 0,04M HCl (2mCi/200 μl) a směs byla zahřívána při 90-95°C po dobu 25 minut.

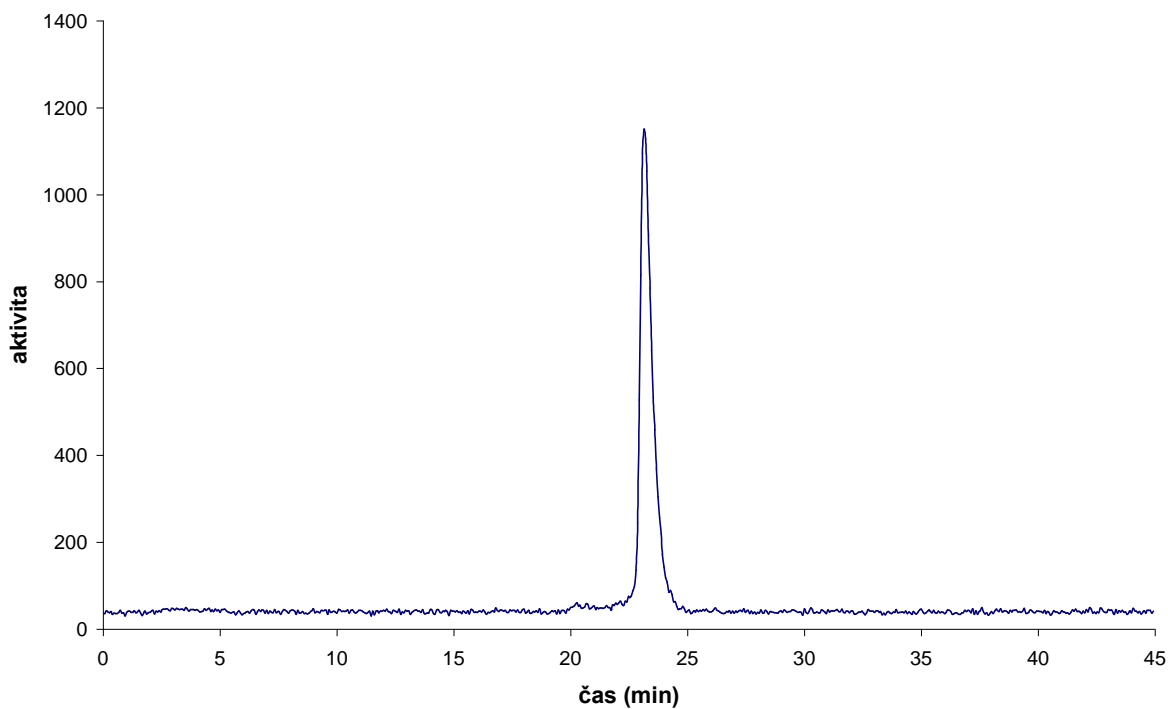
U takto připraveného ¹¹¹In-DOTA-NOC byla zjišťována radiochemická čistota, stabilita a po aplikaci potkanům přítomnost metabolitů v jejich moči.

Obr. 4.31 - Příklad radiochromatogramu ^{111}In -DOTA-NOCObr. 4.32 - Příklad radiochromatogramu ^{111}In -DOTA-NOC po 24 hodinách

Obr. 4.33 - Příklad radiochromatogramu potkaní moči po aplikaci ^{111}In -DOTA-NOC (interval 0-2h.)



Obr. 4.34 - Příklad radiochromatogramu potkaní moči po aplikaci ^{111}In -DOTA-NOC (interval 2-24h.)

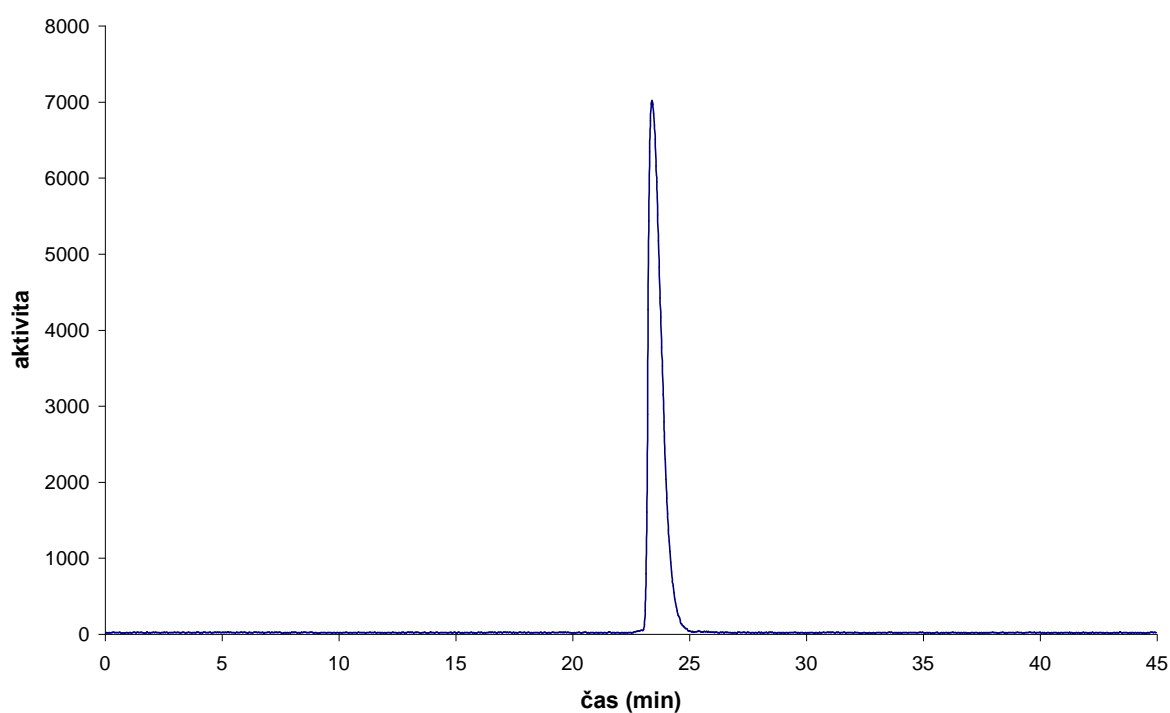


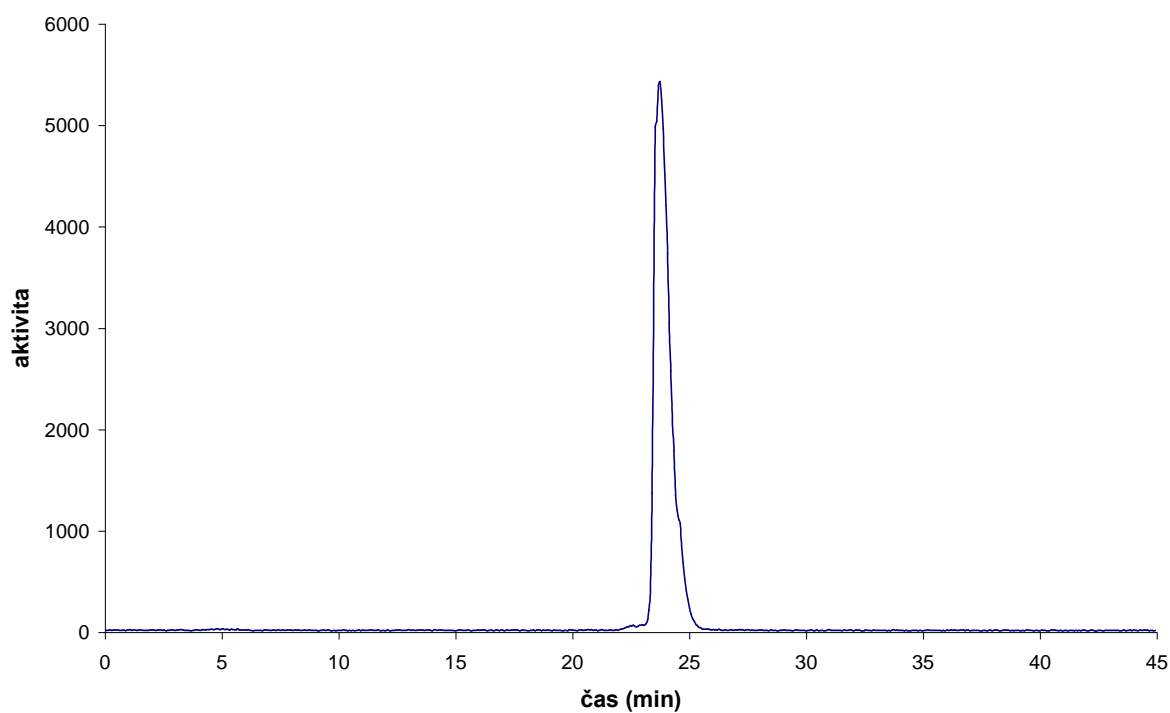
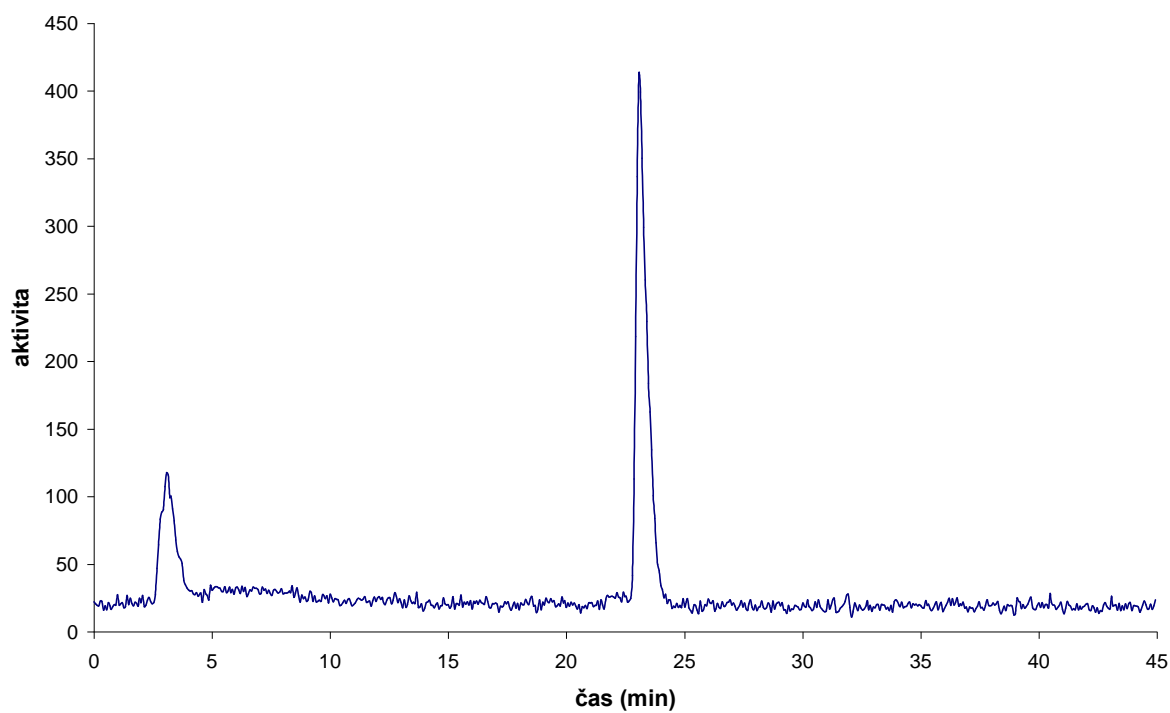
4.2.3.2. Příprava ^{177}Lu -DOTA-NOC

250 μg DOTA-NOC bylo rozpuštěno ve 250 μl superčisté vody. 10 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 200 μl 0,4M acetátového pufru s 0,24M kyselinou gentisovou o pH = 5. Po promíchání bylo přidáno 0,8 μl ^{177}Lu -LuCl₃ v 0,05M HCl (10mCi/8 μl) a směs byla zahřívána při 90-95°C po dobu 25 minut.

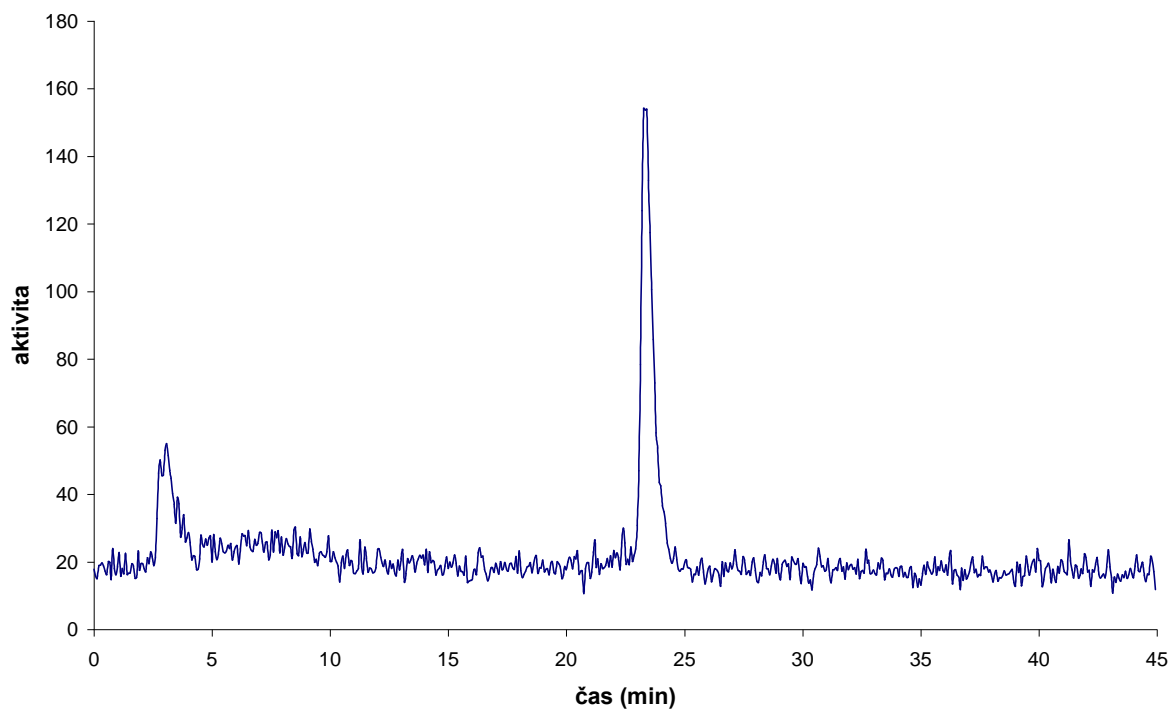
U takto připraveného ^{177}Lu -DOTA-NOC byla zjišťována radiochemická čistota, stabilita a po aplikaci potkanům přítomnost metabolitů v jejich moči.

Obr. 4.35 - Příklad radiochromatogramu ^{177}Lu -DOTA-NOC



Obr. 4.36 - Příklad radiochromatogramu ^{177}Lu -DOTA-NOC po 24 hodináchObr. 4.37 - Příklad radiochromatogramu potkaní moči po aplikaci ^{177}Lu -DOTA-NOC (interval 0-2h.)

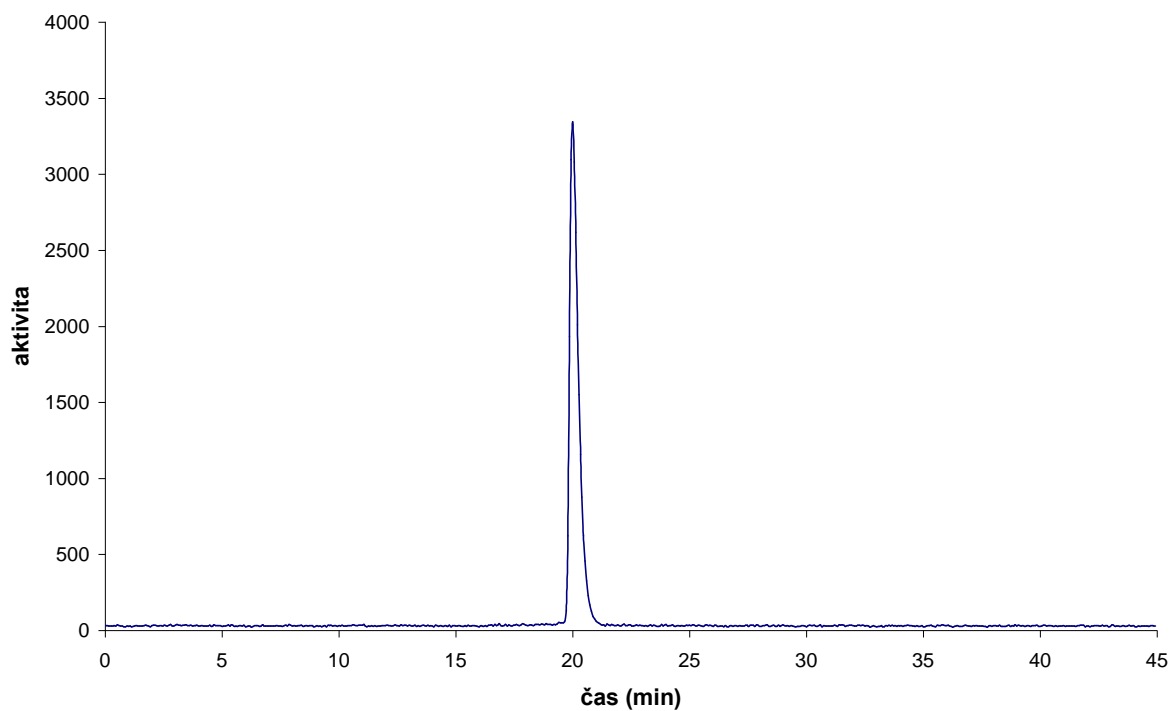
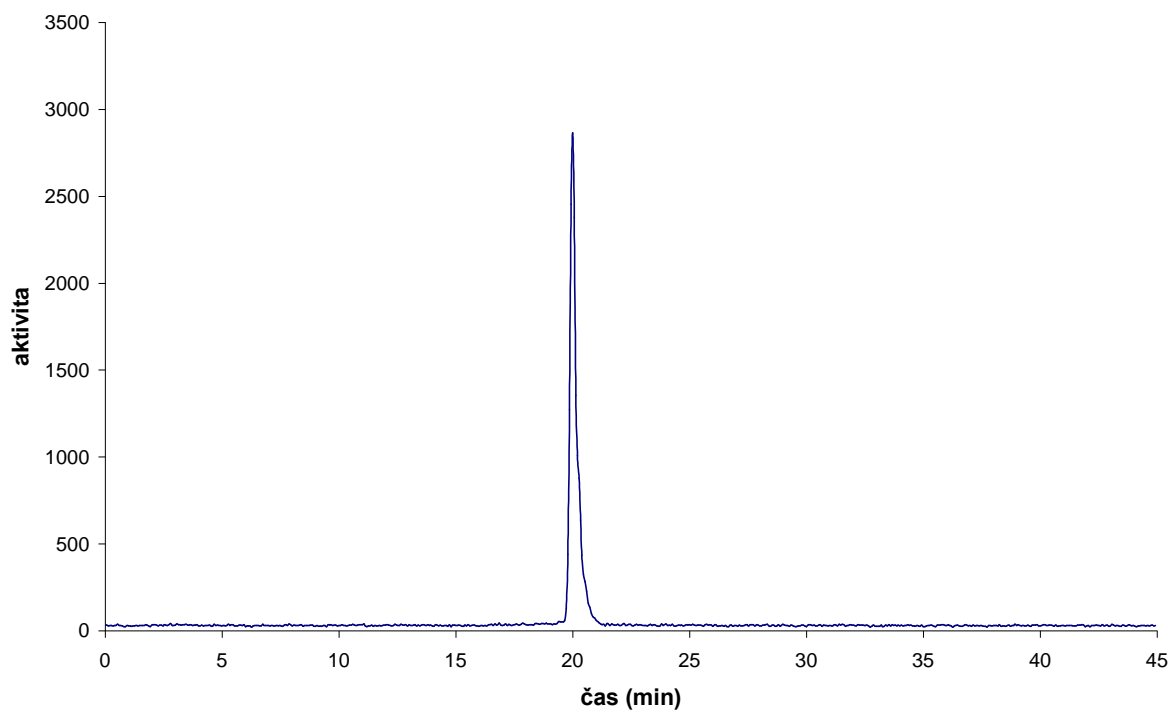
Obr. 4.38 - Příklad radiochromatogramu potkaní moči po aplikaci ^{177}Lu -DOTA-NOC (interval 2-24h.)



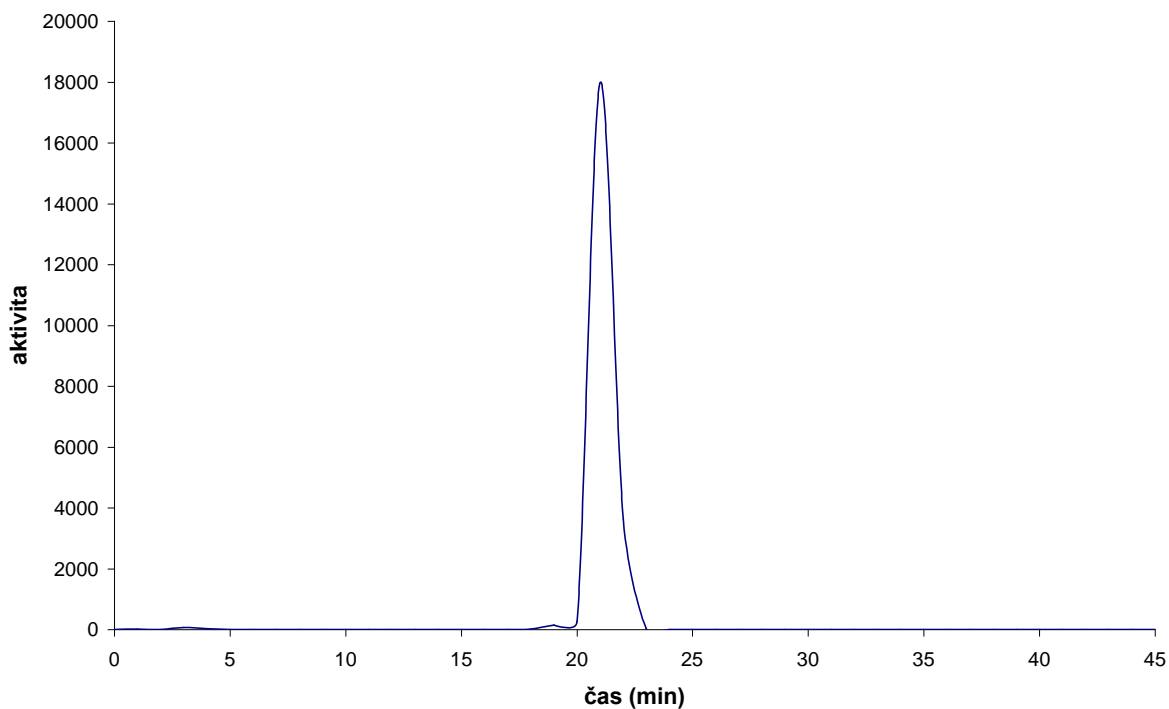
4.2.3.3. Příprava ^{90}Y -DOTA-NOC

250 μg DOTA-NOC bylo rozpuštěno ve 250 μl superčisté vody. 10 μl tohoto roztoku bylo přidáno k 200 μl 0,4M acetátového pufru s 0,24M kyselinou gentisovou o pH = 5. Po promíchání bylo přidáno 1 μl ^{90}Y -YCl₃ v 0,05M HCl (10mCi/20 μl) a směs byla zahřívána při 90-95°C po dobu 25 minut.

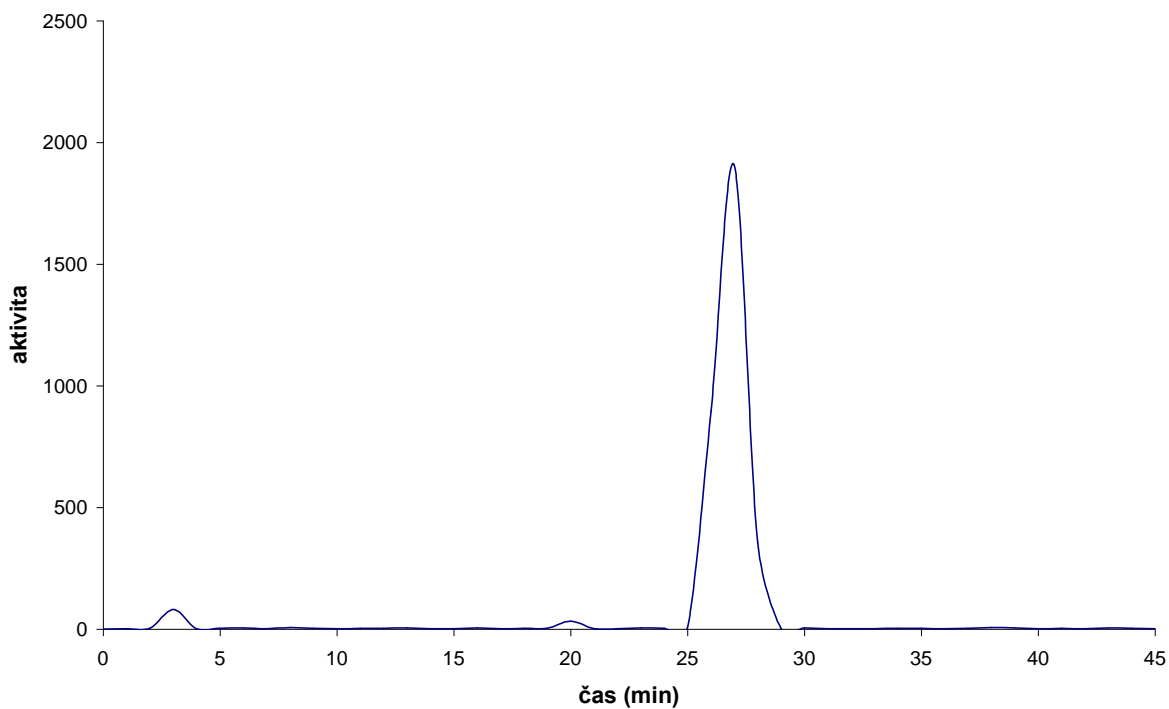
U takto připraveného ^{90}Y -DOTA-NOC byla zjišťována radiochemická čistota, stabilita a po aplikaci potkanům přítomnost metabolitů v jejich moči.

Obr. 4.39 - Příklad radiochromatogramu ^{90}Y -DOTA-NOCObr. 4.40 - Příklad radiochromatogramu ^{90}Y -DOTA-NOC po 24 hodinách

Obr. 4.41 - Příklad radiochromatogramu vytvořeného z naměřených aktivit sbíraných frakcí potkaní moči po aplikaci ^{90}Y -DOTA-NOC (interval 0-2h.)



Obr. 4.42 - Příklad radiochromatogramu vytvořeného z naměřených aktivit sbíraných frakcí potkaní moči po aplikaci ^{90}Y -DOTA-NOC (interval 2-24h.)



4.2.4. Analytické metody používané pro analýzu značených peptidů

ITLC-SG analýza

Pro kontrolu radiochemické čistoty peptidů značených kovovými radionuklidy byla využívána ITLC-SG analýza. Jako mobilní fáze byla použita směs - 10% octan amonný : metanol = 1:1. Na strip byl zpravidla nanášen 1 μ l vzorku. Po vyvinutí byly chromatogramy analyzovány na radiochromatografu. Hodnoty R_f jednotlivých přítomných chemických forem jsou následující: volné X^{3+} : $R_f = 0-0,2$; X-DOTA-Tyr³-tát nebo X-DOTA-NOC: $R_f = 0,8-1$ ($X = {}^{111}\text{In}, {}^{177}\text{Lu}, {}^{90}\text{Y}$)

HPLC analýza

HPLC analýzy peptidů značených kovovými radionuklidy byly prováděny na koloně LichroCart 125-4, Lichrospher 100, RP-18e, 5 μ m s využitím gradientové eluce. Jako mobilní fáze A byla používána 0,1 % trifluoroctová kyselina (TFA) a jako mobilní fáze B acetonitril (ACN). Časový průběh 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 a 40-45 min 100-0% B. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,5 ml/min a teplota na 25°C. Nastříkováno bylo 10-100 μ l vzorku (v závislosti na aktivitě), který byl připraven následujícím způsobem. 2 μ l značeného peptidu byly přidány do 98 μ l mobilní fáze A s 10 μ l 10⁻³M DTPA. Přídavek roztoku DTPA zajišťoval správnost stanovení RČ preparátu, protože volný kovový radionuklid se rychle navázal na DTPA, což zabraňuje sorpci tohoto radionuklidu na koloně při HPLC analýze.

Analýza potkaní moči byla prováděna za stejných podmínek. Na HPLC kolonu byly nastříkovány vzorky naředěné a zcentrifugované potkaní moči, které dále nebyly upraveny. Pro tuto analýzu byla použita nová kolona stejného typu, kromě online radioaktivní detekce byly v některých případech sbírány frakce v 1 minutových intervalech. Tyto frakce pak byly analyzovány na gamaautomatu.

HPLC analýzy jodovaných peptidů byly prováděny na koloně LichroCart 250-4, Lichrospher 100, RP-18e, 5 μ m s využitím gradientové eluce. Jako mobilní fáze A byl používán roztok 0,1M NaCl a jako mobilní fáze B 95 % etanol. Časový průběh 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. Průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml/min a teplota na 25°C. Nastříkováno bylo 10-100 μ l vzorku (v závislosti na aktivitě). Kromě online

radioaktivní detekce, byly sbírány frakce v 1 minutových intervalech. Frakce obsahující čistý Glu-¹²⁵I-Tyr³-tát byly smíchány a etanol byl pomocí proudu dusíku odpařen. Odparek byl po té naředěn fyziologickým roztokem a používán k dalším experimentům.

Analýza potkaní moči byla prováděna za stejných podmínek. Podobně jako u peptidů značených kovovými radionuklidy byly na HPLC kolonu nastříkány vzorky naředěné a zcentrifugované potkaní moči. Pro tuto analýzu byla použita nová kolona stejného typu a byly sbírány frakce v 1 minutových intervalech. Tyto frakce pak byly analyzovány na gamaautomatu.

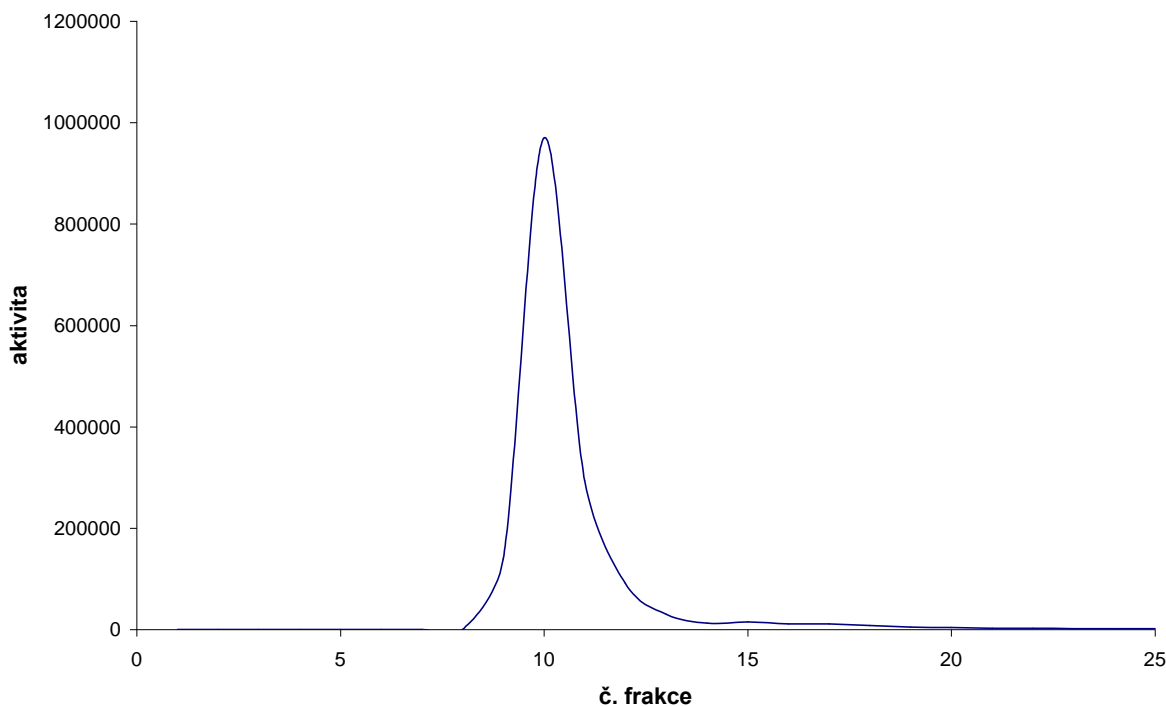
4.3. Radioaktivní značení a analýza protilátek

Radioaktivní značení protilátek bylo studováno v rámci projektu Tandem, jehož navrhovatelem je firma Azacycles s.r.o., která také dodala příslušné konjugáty protilátky s chelátory.

4.3.1. Radioaktivní značení antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)₄₋₅ indiem-111

K 200 μ l 0,4M acetátového pufru o pH = 6 bylo přidáno 100 μ l roztoku antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)₄₋₅ o koncentraci $c' = 3\text{mg/ml}$ a 50 μ l roztoku $^{111}\text{In-InCl}_3$ v 0,04M HCl. Směs byla inkubována po dobu 60 minut na 35°C. Pak bylo ke značené protilátce přidáno 10 μ l roztoku 10^{-3}M EDTA a po 5 minutové inkubaci byla směs nanesena na připravenou kolonu - Sephadex G-50 (28x1cm) v superčisté H₂O. Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,9% (m/v) NaCl. Prvních 6ml bylo odebíráno do odměrného válce a následně byly sbírány frakce po 23 kapkách (cca 1ml). Z každé frakce byl odebrán 1 μ l a z jejich změřené aktivity byl nakreslen eluční profil (obr. 4.43). Frakce obsahující vysokomolekulární formu (frakce č. 9-11) byly spojeny a řádně promíchány. Roztok přečištěné značené protilátky byl poté používán k dalším experimentům.

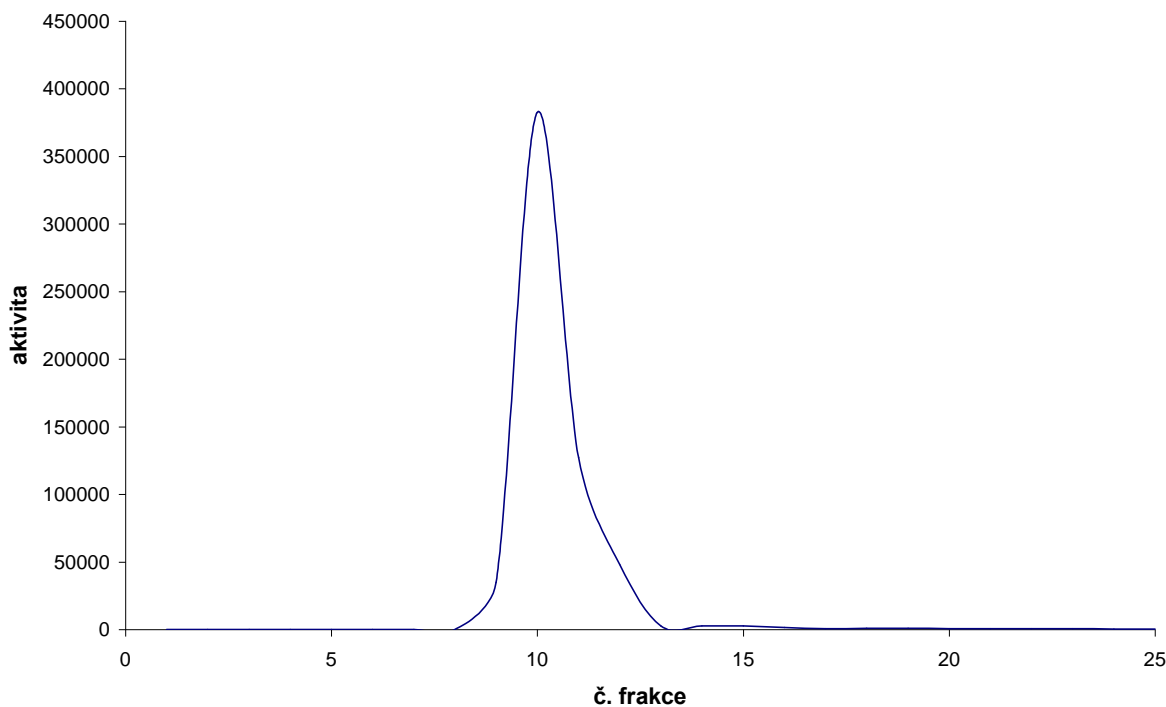
Obr. 4.43 - Čištění radioaktivně značené protilátky ^{111}In -antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)_{4.5} gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-50



4.3.2. Radioaktivní značení antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)_{4.5} ytriem-90

Ke 100 μl 0,4M acetátového pufru o pH = 6 bylo přidáno 100 μl roztoku antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)_{4.5} o koncentraci $c' = 3\text{mg/ml}$ a 4 μl roztoku $^{90}\text{Y-YCl}_3$ v 0,05M HCl. Směs byla inkubována po dobu 60 minut na 35°C. Pak bylo ke značené protilátce přidáno 10 μl roztoku 10^{-3}M EDTA a po 5 minutové inkubaci byla směs nanesena na připravenou kolonu - Sephadex G-50 (28x1cm) v superčisté H_2O . Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,9% (m/v) NaCl. Prvních 6ml bylo odebíráno do odměrného válce a následně byly sbírány frakce po 23 kapkách (cca 1ml). Z každé frakce byl odebrán 1 μl a z jejich změřené aktivity byl nakreslen eluční profil (obr. 4.44). Frakce obsahující vysokomolekulární formu (frakce č. 9-11) byly spojeny a řádně promíchány. Roztok přečištěné značené protilátky byl poté používán k dalším experimentům.

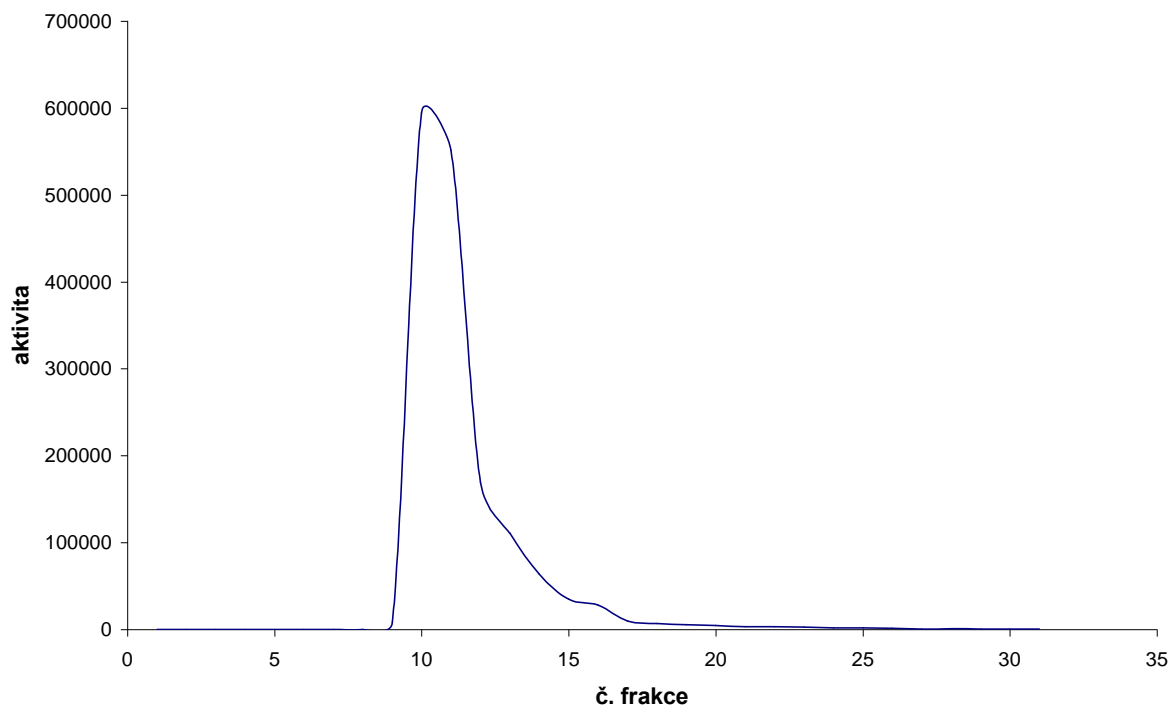
Obr. 4.44 - Čištění radioaktivně značené protilátky ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)₄₋₅ gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-50



4.3.3. Radioaktivní značení antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ indiem-111

Ke 125 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 6,5 bylo přidáno 100 μl roztoku antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ ($c' = 3\text{mg/ml}$) a 50 μl roztoku ^{111}In -InCl₃ v 0,04M HCl. Směs byla inkubována po dobu 45 minut na 35°C. Pak bylo ke značené protilátce přidáno 10 μl roztoku 10⁻³M EDTA a po 5 minutové inkubaci bylo 250 μl směsi nanášeno na připravenou kolonu - Sephadex G-50 (28x1cm) v superčisté H₂O. Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,9% (m/v) NaCl. Prvních 6ml bylo odebíráno do odměrného válce a následně byly sbírány frakce po 23 kapkách (cca 1ml). Z každé frakce byl odebrán 1 μl a z jejich změřené aktivity byl nakreslen eluční profil (obr. 4.45). Frakce obsahující vysokomolekulární formu (frakce č. 10-12) byly spojeny a řádně promíchány. Roztok přečištěné značené protilátky byl poté používán k dalším experimentům.

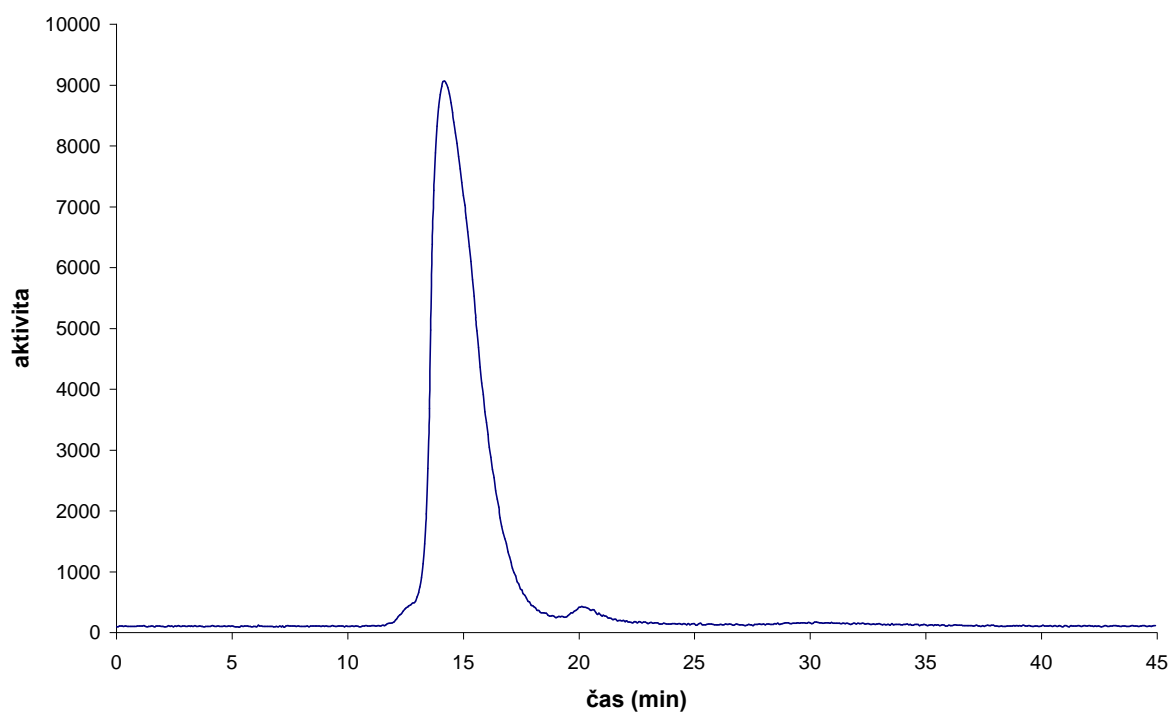
Obr. 4.45 - Čištění radioaktivně značené protilátky ^{111}In -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-50



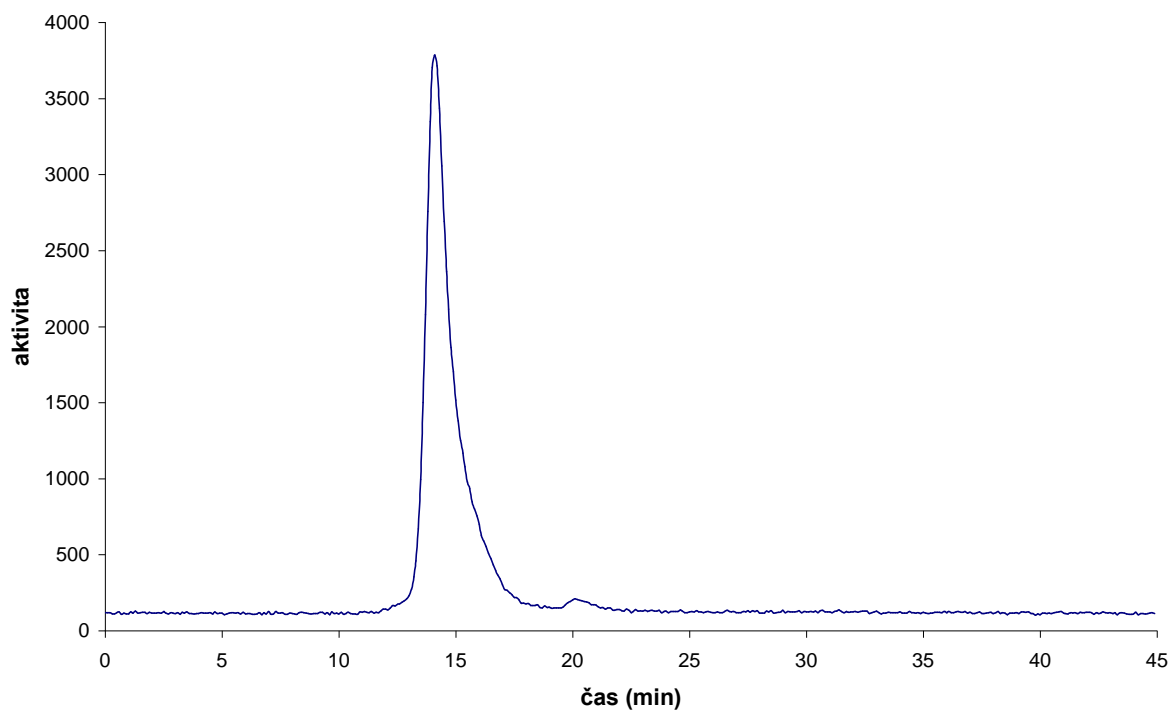
4.3.3.1. Metoda stanovení stability přípravku ^{111}In -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃

Přečištěná značená protilátka ^{111}In -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ byla inkubována při 35°C. HPLC analýza byla prováděna ihned po přečištění, za 1, 2, 4, 24 a 48 hodin. Ve stejných časech byla prováděna i ITLC-SG analýza. Příklady elučních profilů s online radioaktivní detekcí v příslušných časech jsou na obrázcích 4.46-4.51. Výsledky získané ITLC-SG analýzou jsou zaznamenány v tabulce 4.3.

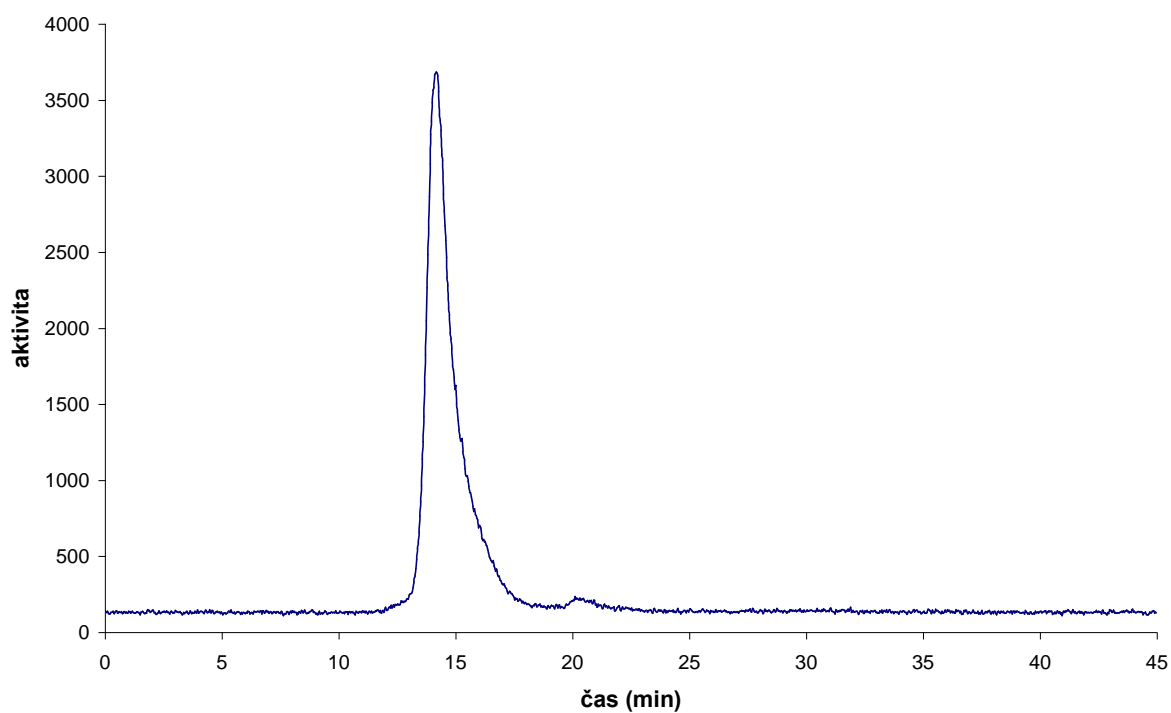
Obr. 4.46 - Příklad radiochromatogramu ihned po přečištění značené protilátky



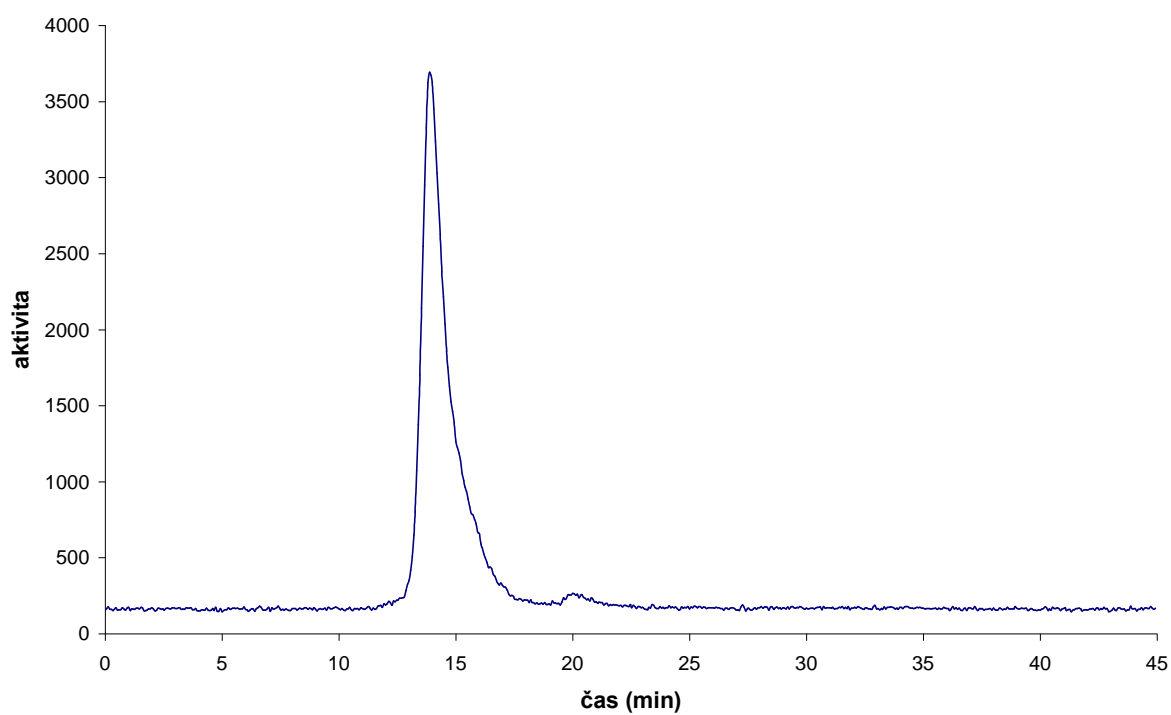
Obr. 4.47 - Příklad radiochromatogramu 1 hodinu po přečištění značené protilátky



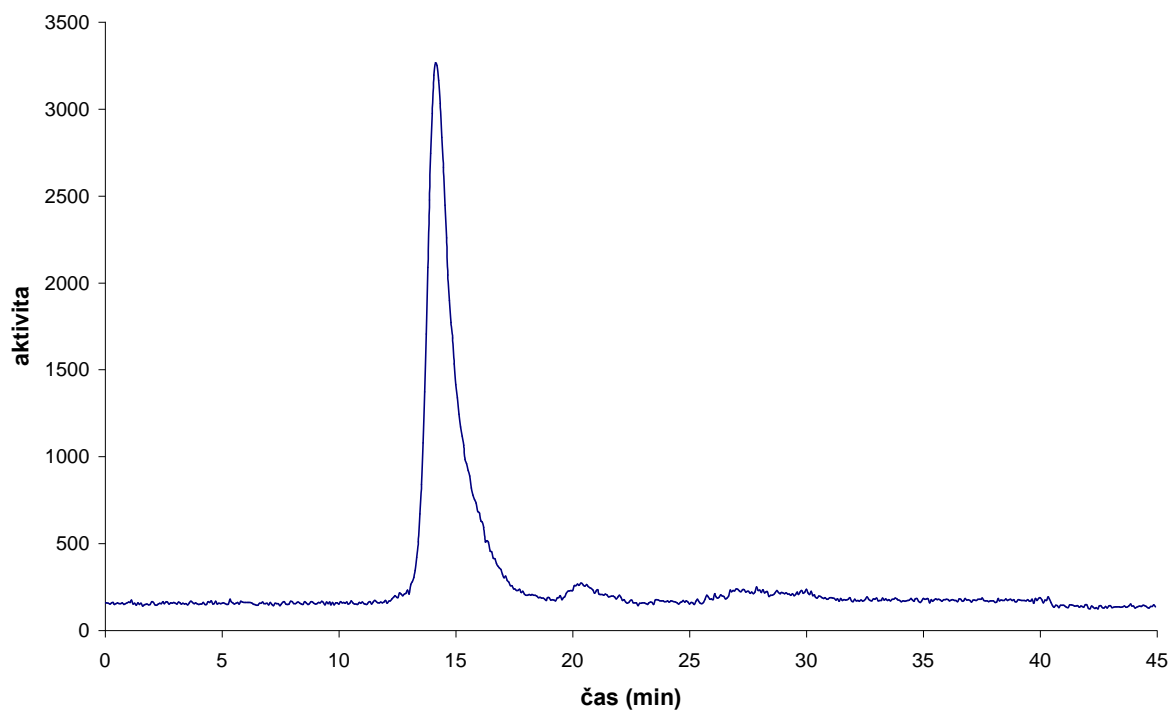
Obr. 4.48 - Příklad radiochromatogramu 2 hodiny po přečištění značené protilátky



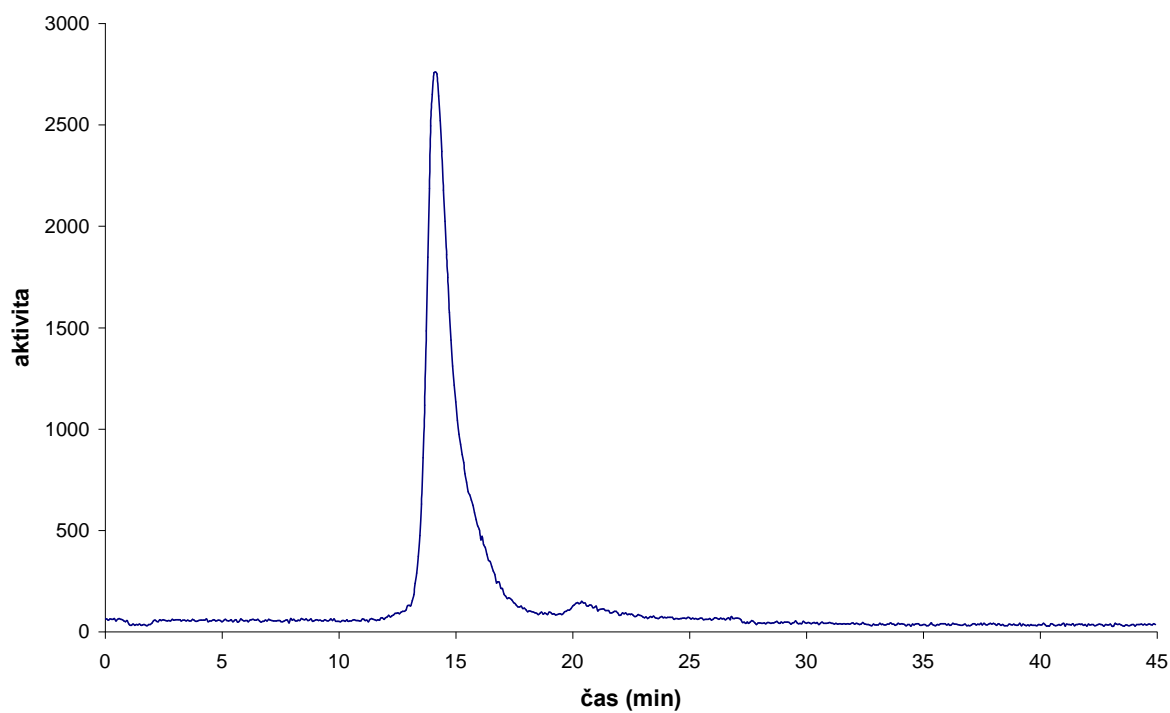
Obr. 4.49 - Příklad radiochromatogramu 4 hodiny po přečištění značené protilátky



Obr. 4.50 - Příklad radiochromatogramu 24 hodin po přečištění značené protilátky



Obr. 4.51 - Příklad radiochromatogramu 48 hodin po přečištění značené protilátky



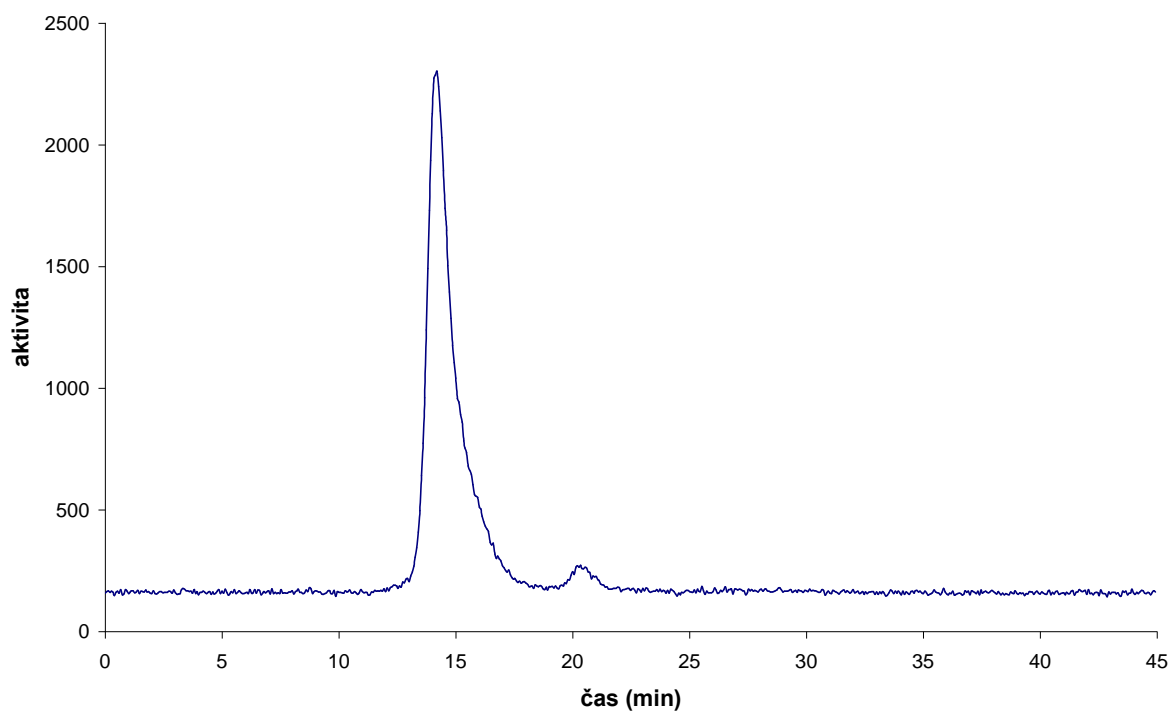
Tabulka 4.3 - Souhrnné výsledky stanovení stability $^{111}\text{In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH}_2\text{PO(OH)CH}_2\text{-DO3A)}_{2,3}$ zjištěné pomocí tenkovrstvé chromatografie ve dvou vyvíjecích soustavách

čas od přípravy (h.)	čistota komplexu (%)	čistota komplexu (%)
	(50mM EDTA v octanu sodném pH = 5,66)	(10% octan amonný : metanol (1:1))
0	95,1	96
1	96,5	97,3
2	96,7	97,3
4	96,1	96,6
24	96	95,9
48	96,6	96,2

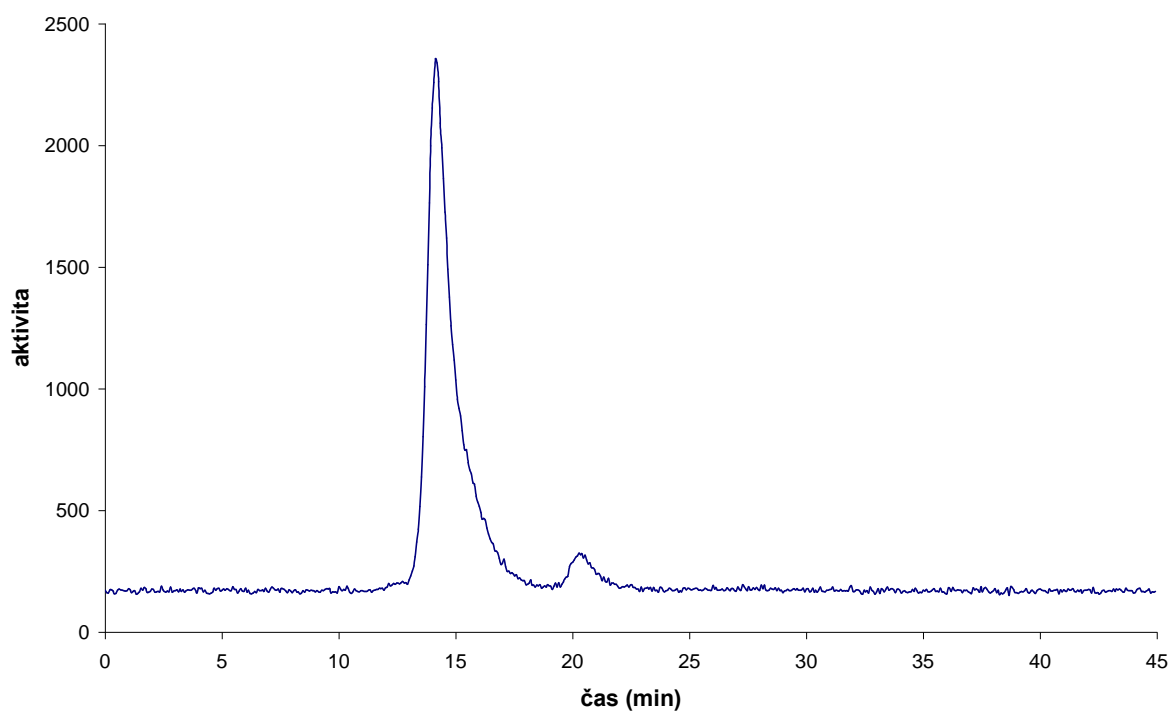
4.3.3.2. Metoda stanovení stability přípravku $^{111}\text{In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH}_2\text{PO(OH)CH}_2\text{-DO3A)}_{2,3}$ za přítomnosti vysoké koncentrace konkurenčního chelátoru EDTA

500 μl přečištěné $^{111}\text{In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH}_2\text{PO(OH)CH}_2\text{-DO3A)}_{2,3}$ bylo smícháno s 500 μl roztoku 4mM EDTA (koncentrace EDTA několikařádově převyšovala koncentraci chelátoru v protilátce) a směs byla inkubována při 35°C. HPLC analýza byla prováděna ihned po přečištění a po smíchání s EDTA, za 1, 2, 4, 24 a 48 hodin. Ve stejných časech byla prováděna i ITLC-SG analýza. Příklady elučních profilů s online radioaktivní detekcí v příslušných časech jsou na obrázcích 4.52-4.57. Výsledky získané ITLC-SG analýzou jsou zaznamenány v tabulce 4.4.

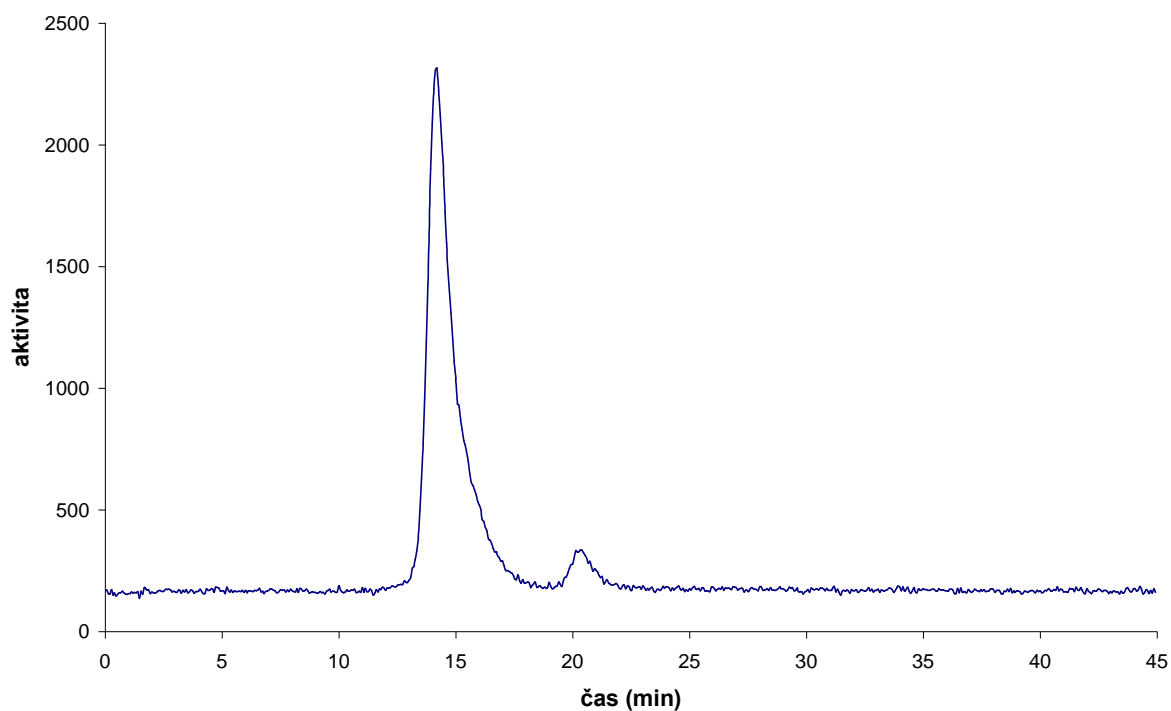
Obr. 4.52 - Příklad radiochromatogramu ihned po smísení s roztokem konkurenčního chelátoru



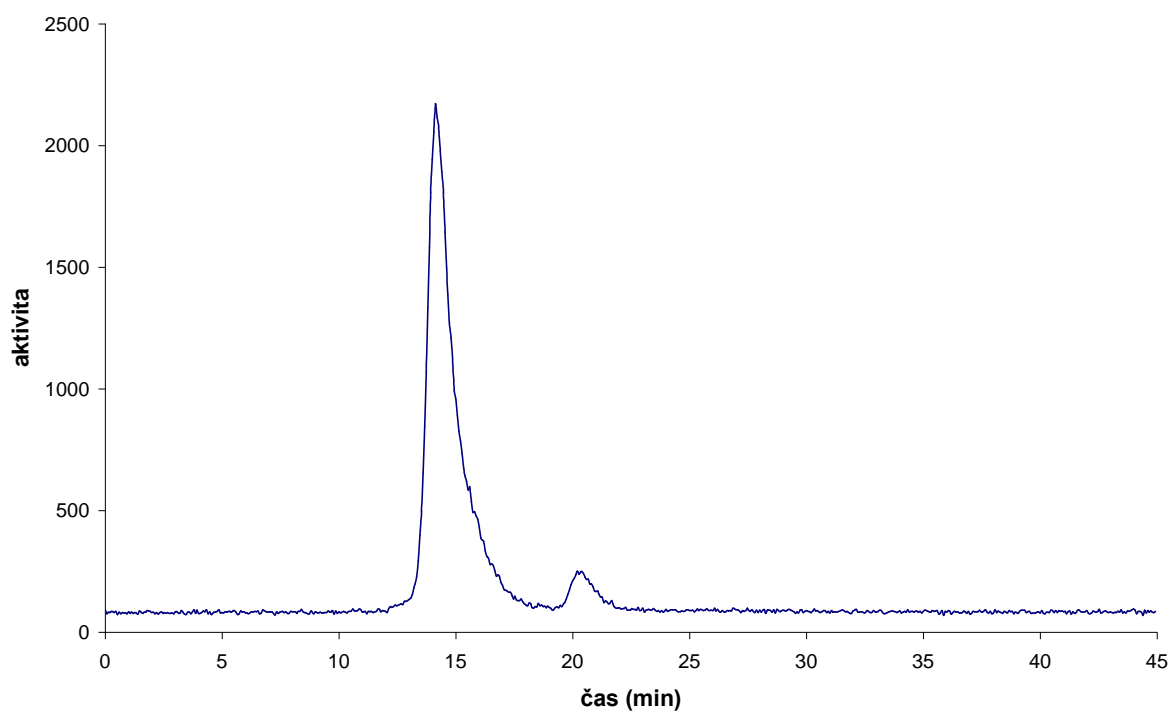
Obr. 4.53 - Příklad radiochromatogramu 1 hodinu po smísení s roztokem konkurenčního chelátoru



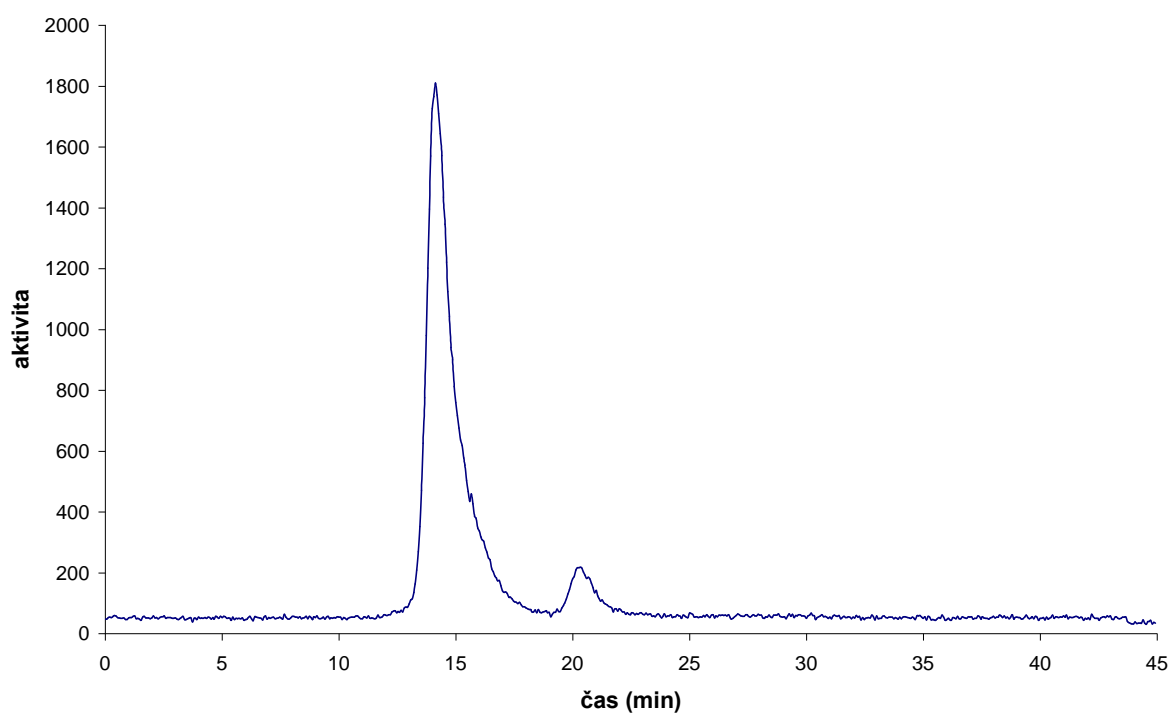
Obr. 4.54 - Příklad radiochromatogramu 2 hodiny po smísení s roztokem konkurenčního chelátoru



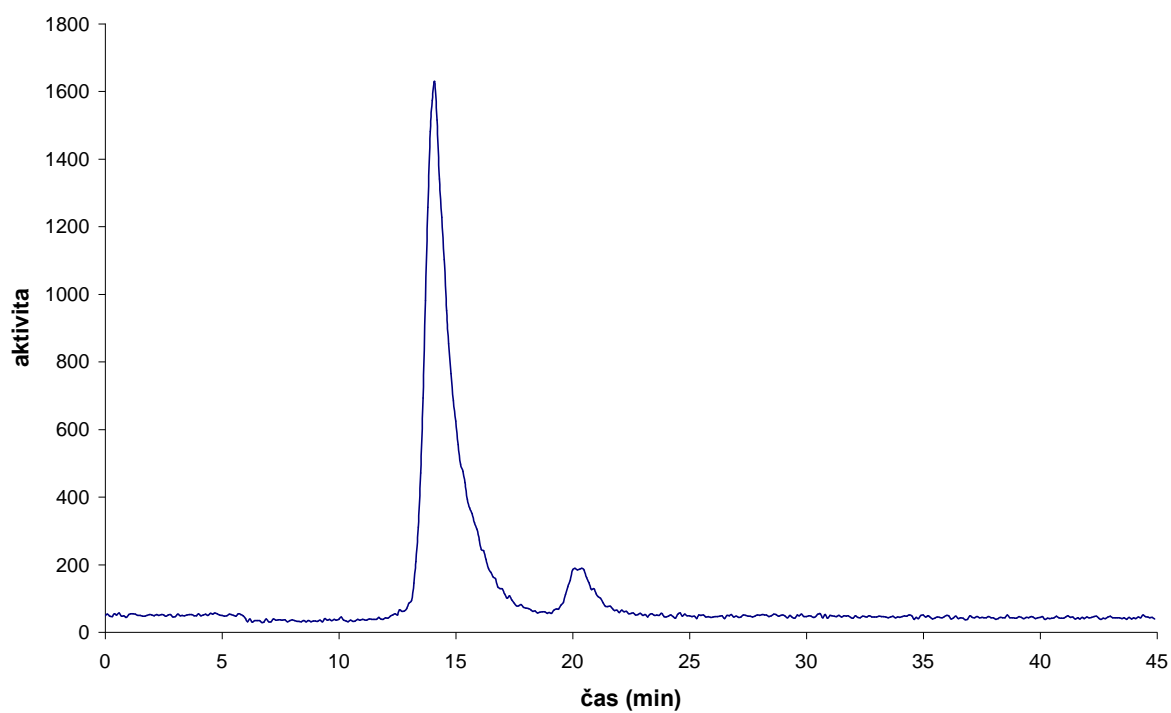
Obr. 4.55 - Příklad radiochromatogramu 4 hodiny po smísení s roztokem konkurenčního chelátoru



Obr. 4.56 - Příklad radiochromatogramu 24 hodin po smísení s roztokem konkurenčního chelátoru



Obr. 4.57 - Příklad radiochromatogramu 48 hodin po smísení s roztokem konkurenčního chelátoru



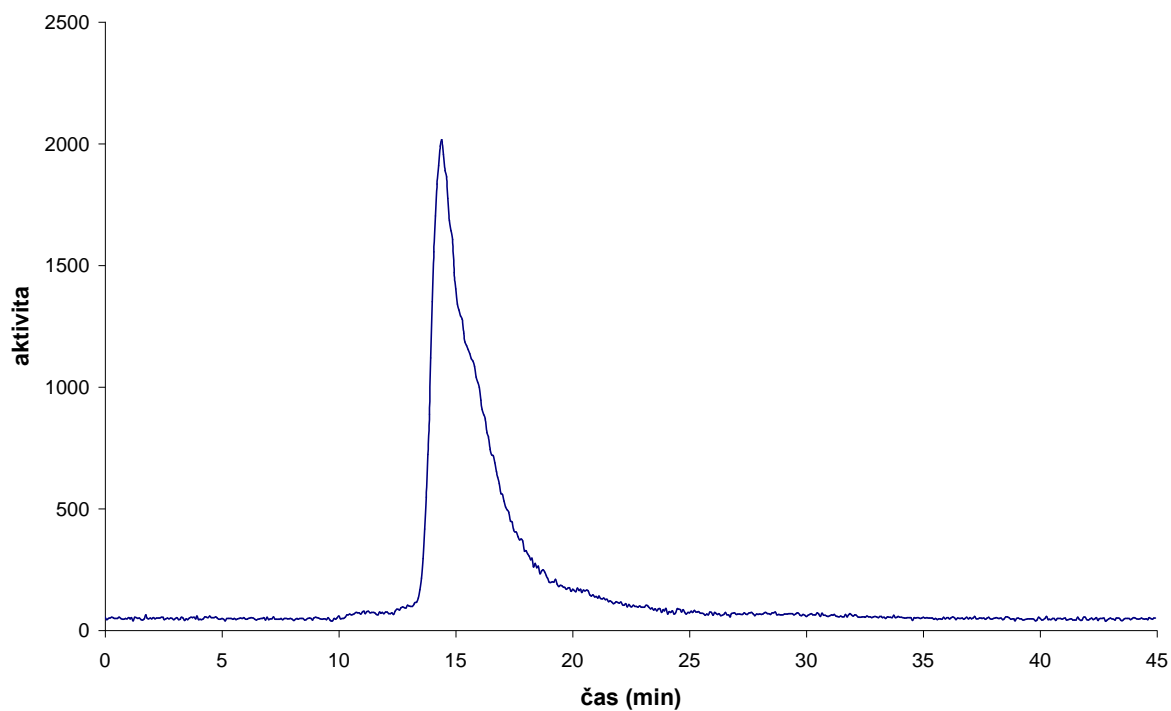
Tabulka 4.4 - Souhrnné výsledky stanovení stability $^{111}\text{In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH}_2\text{PO(OH)CH}_2\text{-DO3A)}_{2-3}$ v prostředí s vysokou koncentrací konkurenčního chelátoru EDTA zjištěné pomocí tenkovrstvé chromatografie ve dvou vyvíjecích soustavách

Čas od smíchání s roztokem EDTA (h.)	čistota komplexu (%) (50mM EDTA v octanu sodném pH = 5,66)	čistota komplexu (%) (10% octan amonný : metanol (1:1))
0	95,2	94,9
1	93,7	93,3
2	93,4	93
4	92,9	92,4
24	91,5	91,8
48	91,2	90,1

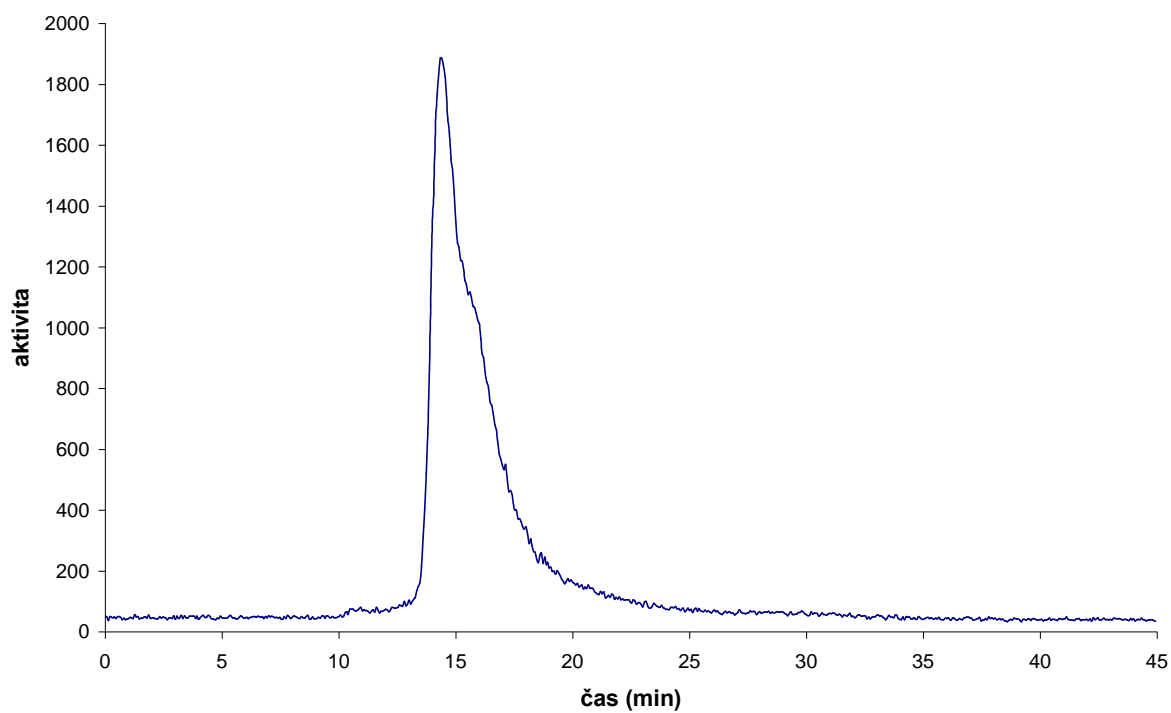
4.3.3.3. Metoda stanovení stability $^{111}\text{In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH}_2\text{PO(OH)CH}_2\text{-DO3A)}_{2-3}$ v potkaní plazmě

400 μl přečištěné $^{111}\text{In-antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH}_2\text{PO(OH)CH}_2\text{-DO3A)}_{2-3}$ bylo smícháno s 800 μl potkaní plazmy a směs byla inkubována při 35°C. HPLC analýza byla prováděna ihned po přečištění a smíchání s plazmou, za 1, 2, 4, 24 a 48 hodin. Ve stejných časech byla prováděna i ITLC-SG analýza. Příklady elučních profilů s online radioaktivní detekcí v příslušných časech jsou na obrázcích 4.58-4.63. Výsledky získané ITLC-SG analýzou jsou zaznamenány v tabulce 4.5.

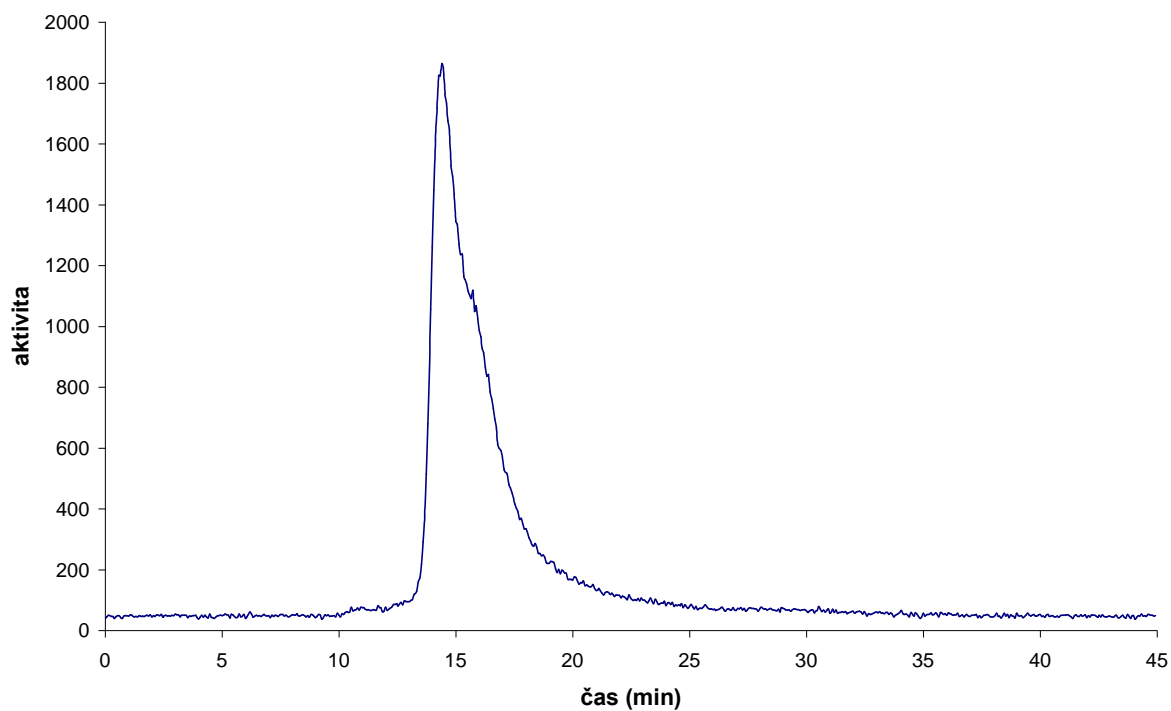
Obr. 4.58 - Příklad radiochromatogramu ihned po přidání protilátky k potkaní plazmě



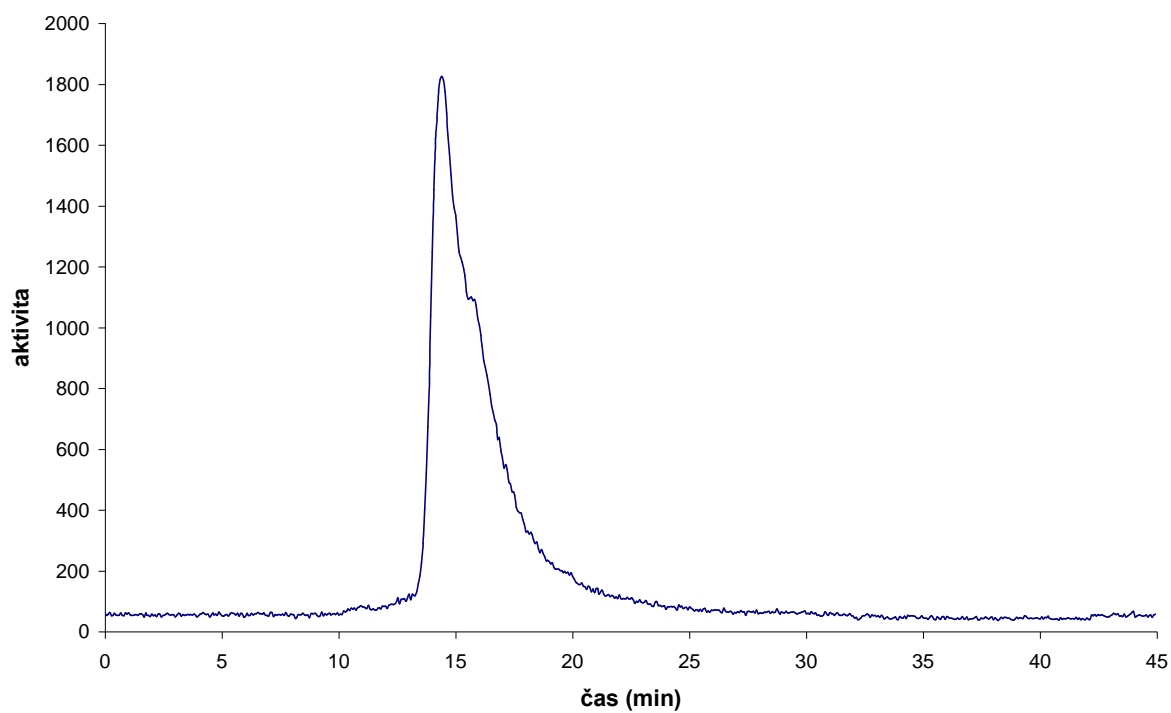
Obr. 4.59 - Příklad radiochromatogramu 1 hodinu po přidání protilátky k potkaní plazmě



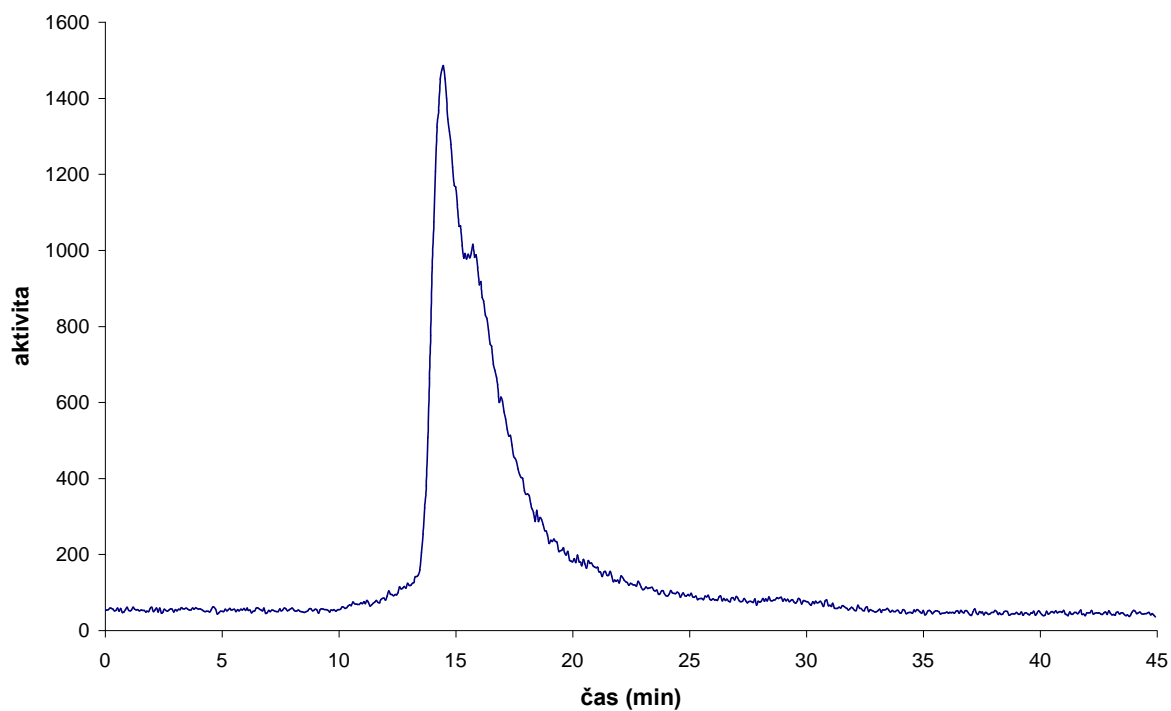
Obr. 4.60 - Příklad radiochromatogramu 2 hodiny po přidání protilátky k potkaní plazmě



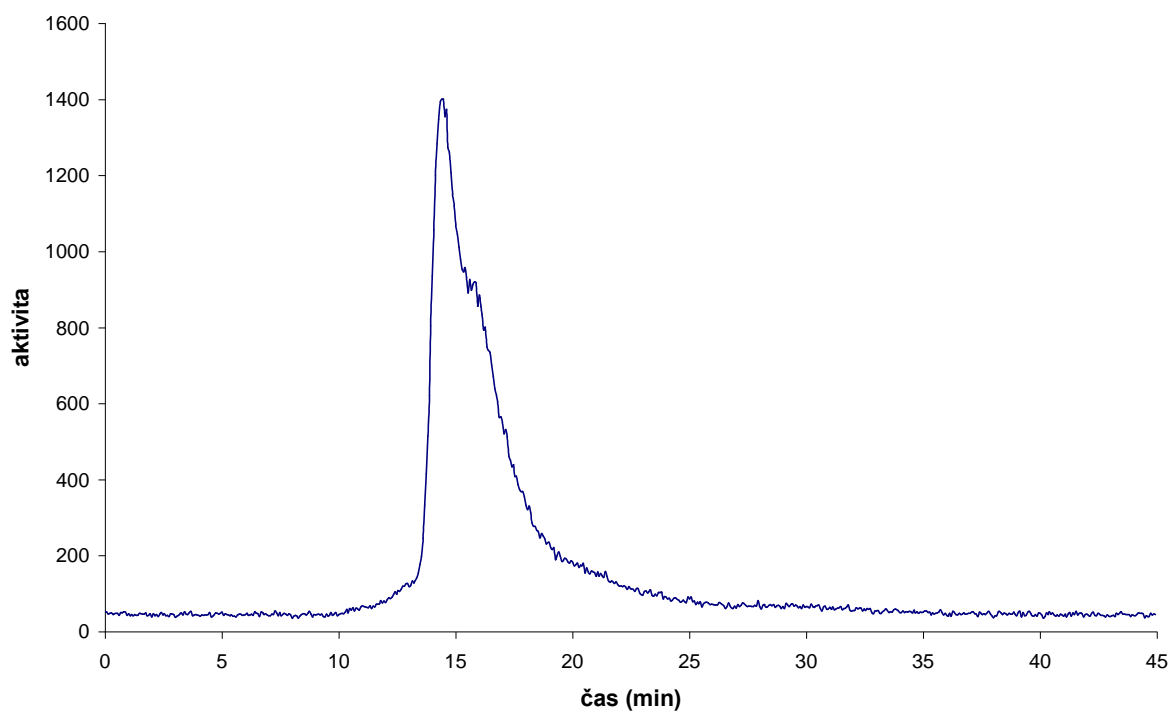
Obr. 4.61 - Příklad radiochromatogramu 4 hodiny po přidání protilátky k potkaní plazmě



Obr. 4.62 - Příklad radiochromatogramu 24 hodin po přidání protilátky k potkaní plazmě



Obr. 4.63 - Příklad radiochromatogramu 48 hodin po přidání protilátky k potkaní plazmě



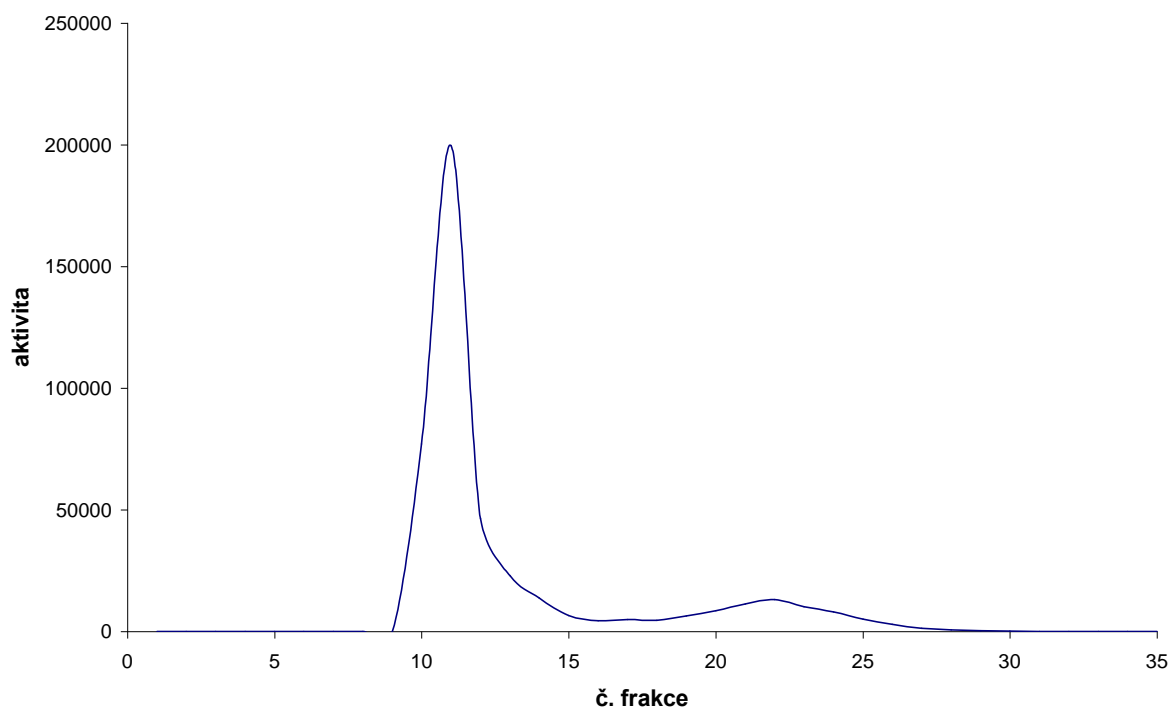
Tabulka 4.5 - Souhrnné výsledky stanovení stability ^{111}In -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ v prostředí potkaní plazmy zjištěné tenkovrstvou chromatografií ve dvou vyvíjecích soustavách

čas od smíchání protilátky s potkaní plazmou (h.)	Čistota komplexu (%) (50mM EDTA v octanu sodném pH = 5,66)	čistota komplexu (%) (10% octan amonný : metanol (1:1))
0	96,9	99,9
1	98,3	99,9
2	98,2	99,8
4	98,3	99,8
24	97,7	99,1
48	98,2	98,6

4.3.4. Radioaktivní značení antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ ytriem-90

Ke 125 μl 0,5M acetátového pufru o pH = 6,5 bylo přidáno 100 μl roztoku antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ (c' = 3mg/ml) a 1,2 - 1,5 μl (dle aktivity) roztoku ^{90}Y -YCl₃ v 0,05M HCl. Směs byla inkubována po dobu 45-60 minut na 35°C. Pak bylo ke značené protilátce přidáno 10 μl roztoku 10⁻³M EDTA a po 5 minutové inkubaci byla směs nanesena na připravenou kolonu - Sephadex G-50 (28x1cm) v superčisté H₂O. Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,9% (m/v) NaCl. Prvních 6ml bylo odebíráno do odměrného válce a následně byly sbírány frakce po 23 kapkách (cca 1ml). Z každé frakce byl odebrán 1 μl a z jejich změřené aktivity byl nakreslen eluční profil (obr. 4.64). Frakce obsahující vysokomolekulární formu (frakce č. 10-12) byly spojeny a řádně promíchány. Roztok přečištěné značené protilátky byl poté používán k dalším experimentům.

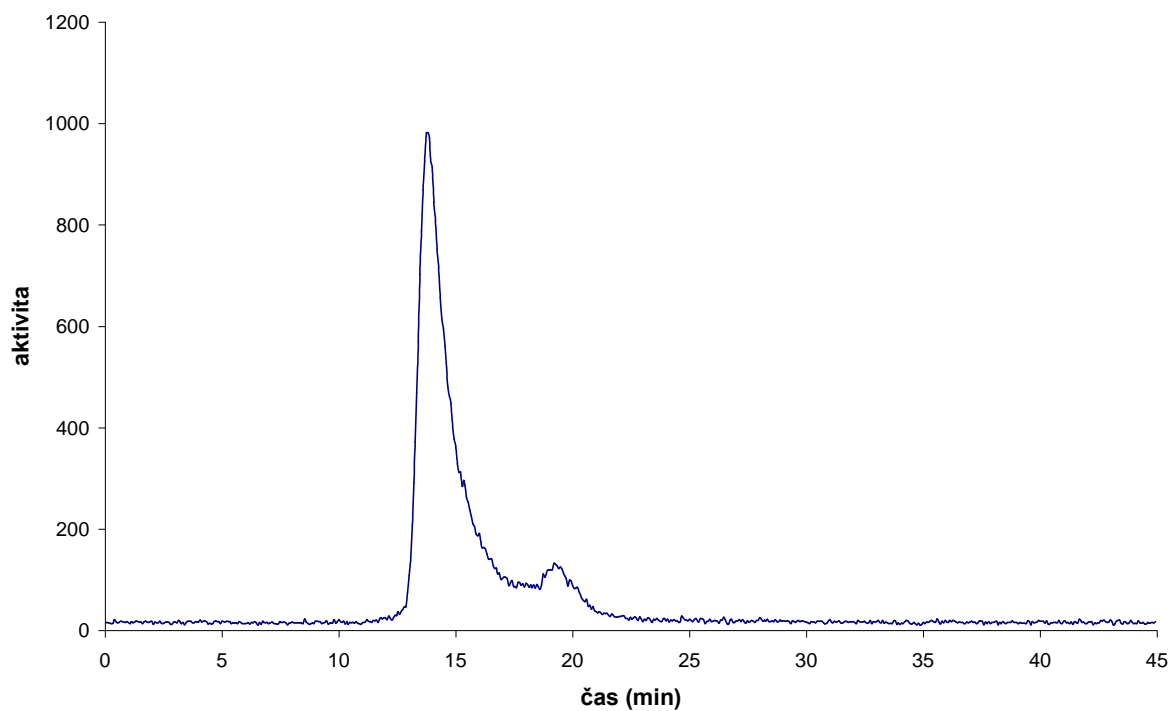
Obr. 4.64 Čištění radioaktivně značené protilátky ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-50



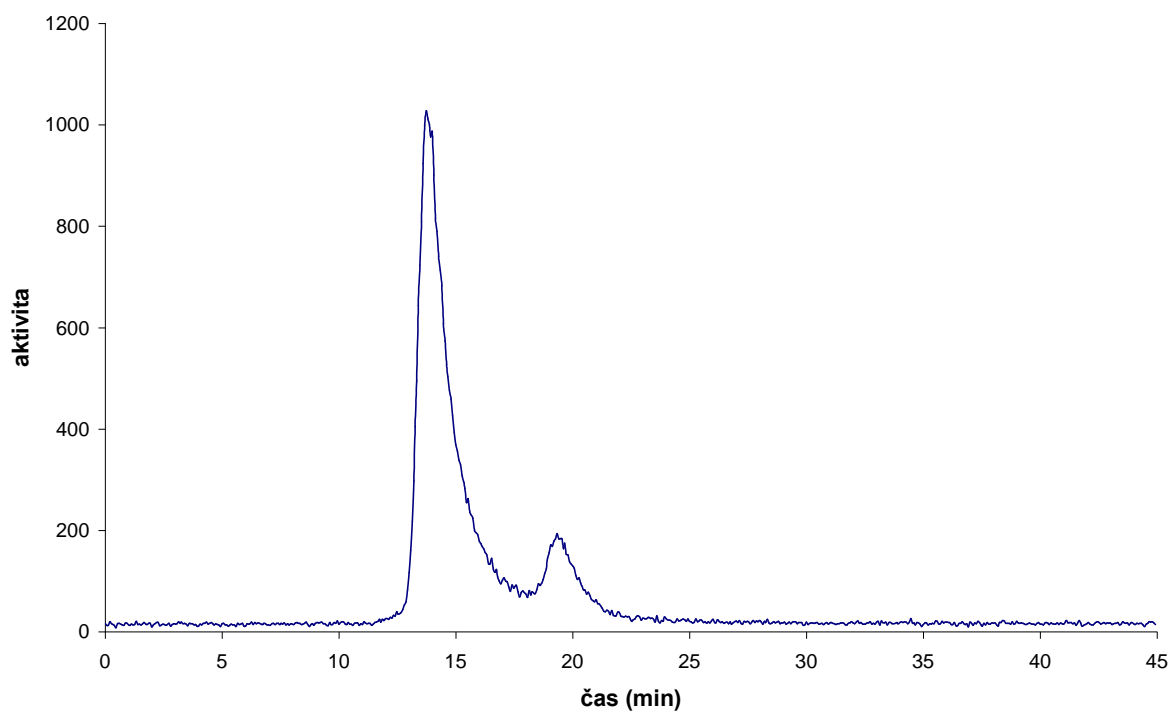
4.3.4.1. Metoda stanovení stability přípravku ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃

Přečištěná značená protilátka ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ byla inkubována při 35°C. HPLC analýza byla prováděna ihned po přečištění, za 1, 2, 4, 24 a 48 hodin. Ve stejných časech byla prováděna i ITLC-SG analýza. Příklady elučních profilů s online radioaktivní detekcí v příslušných časech jsou na obrázcích 4.65-4.70. Výsledky získané ITLC-SG analýzou jsou zaznamenány v tabulce 4.6.

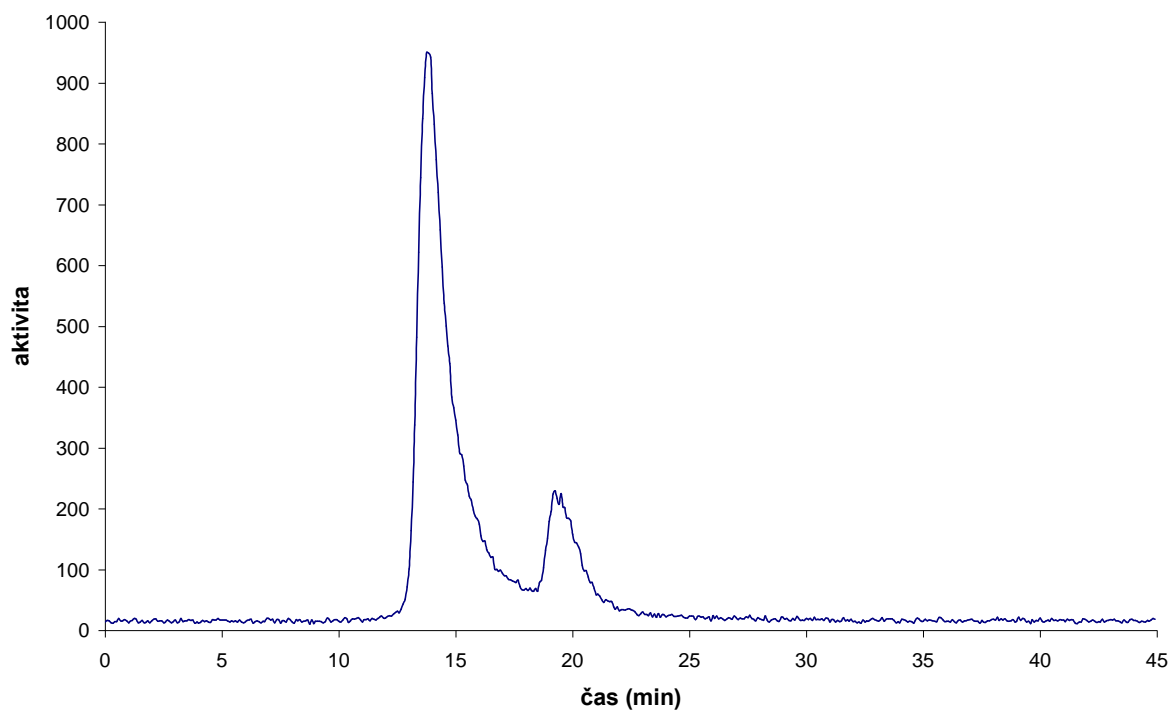
Obr. 4.65 - Příklad radiochromatogramu ihned po přečištění značené protilátky



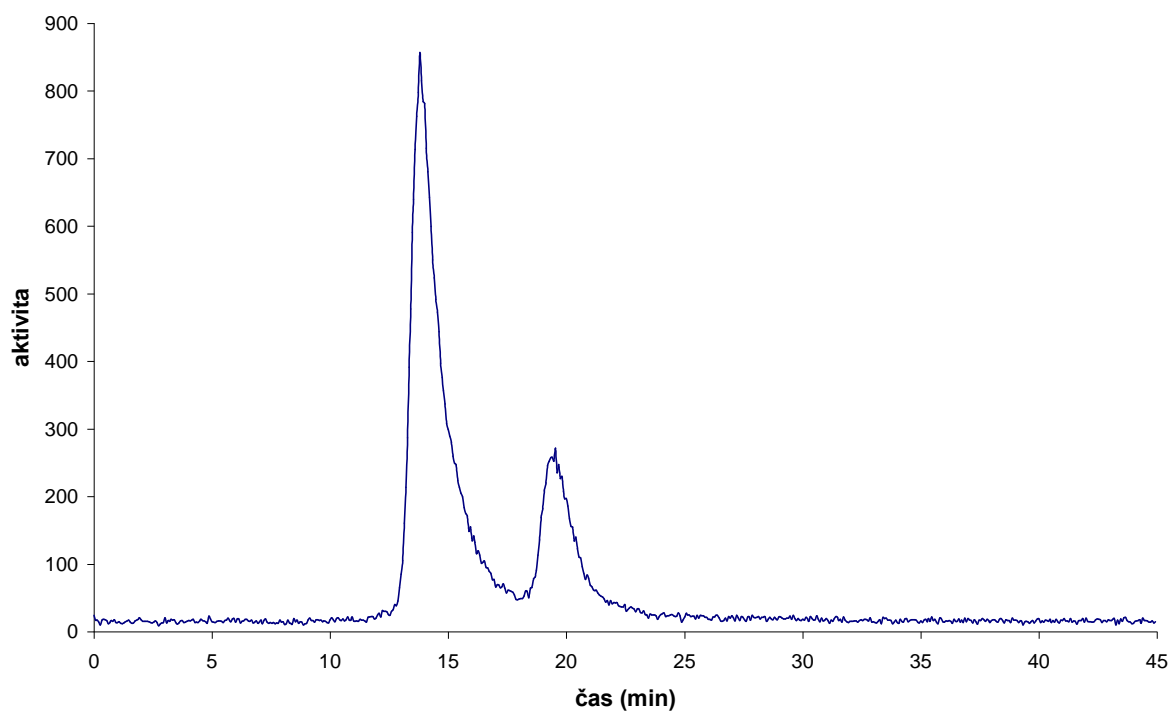
Obr. 4.66 - Příklad radiochromatogramu 1 hodinu po přečištění značené protilátky



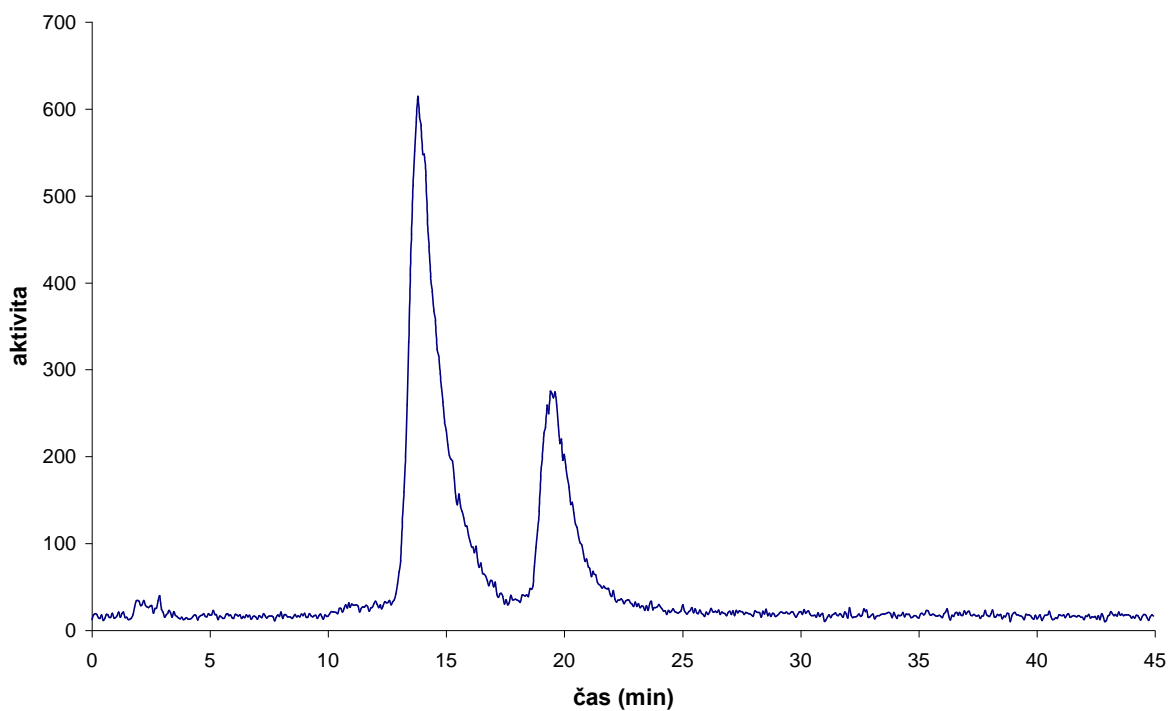
Obr. 4.67 - Příklad radiochromatogramu 2 hodiny po přečištění značené protilátky



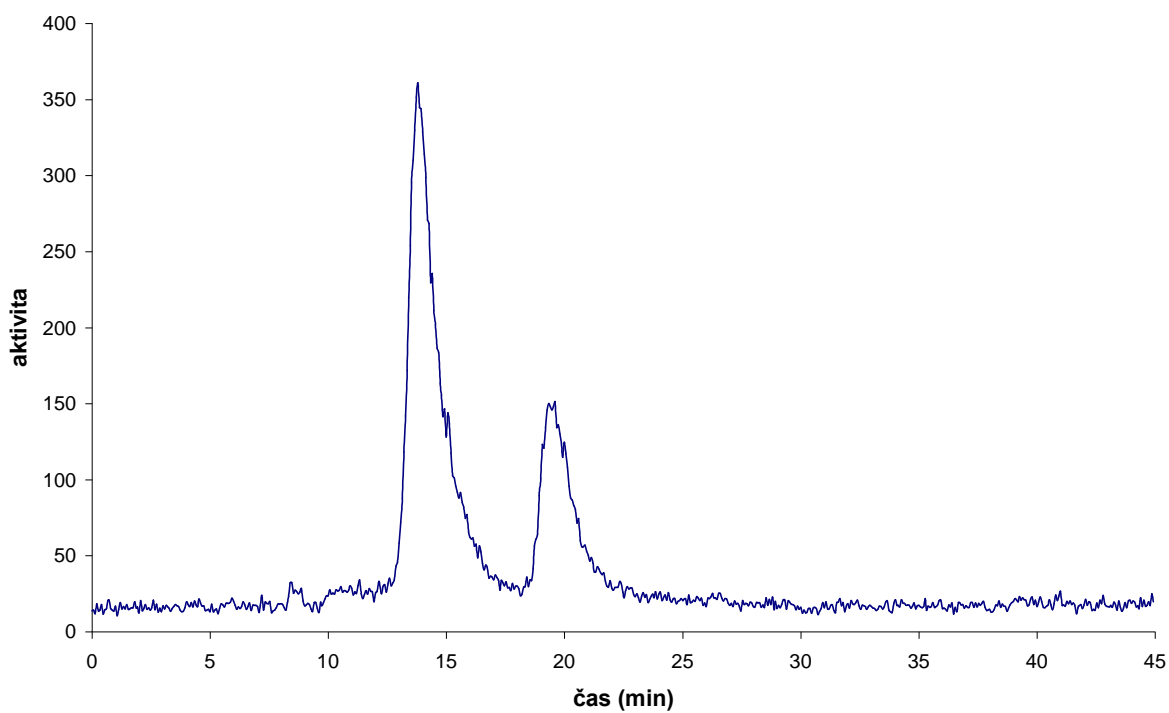
Obr. 4.68 - Příklad radiochromatogramu 4 hodiny po přečištění značené protilátky



Obr. 4.69 - Příklad radiochromatogramu 24 hodin po přečištění značené protilátky



Obr. 4.70 - Příklad radiochromatogramu 48 hodin po přečištění značené protilátky



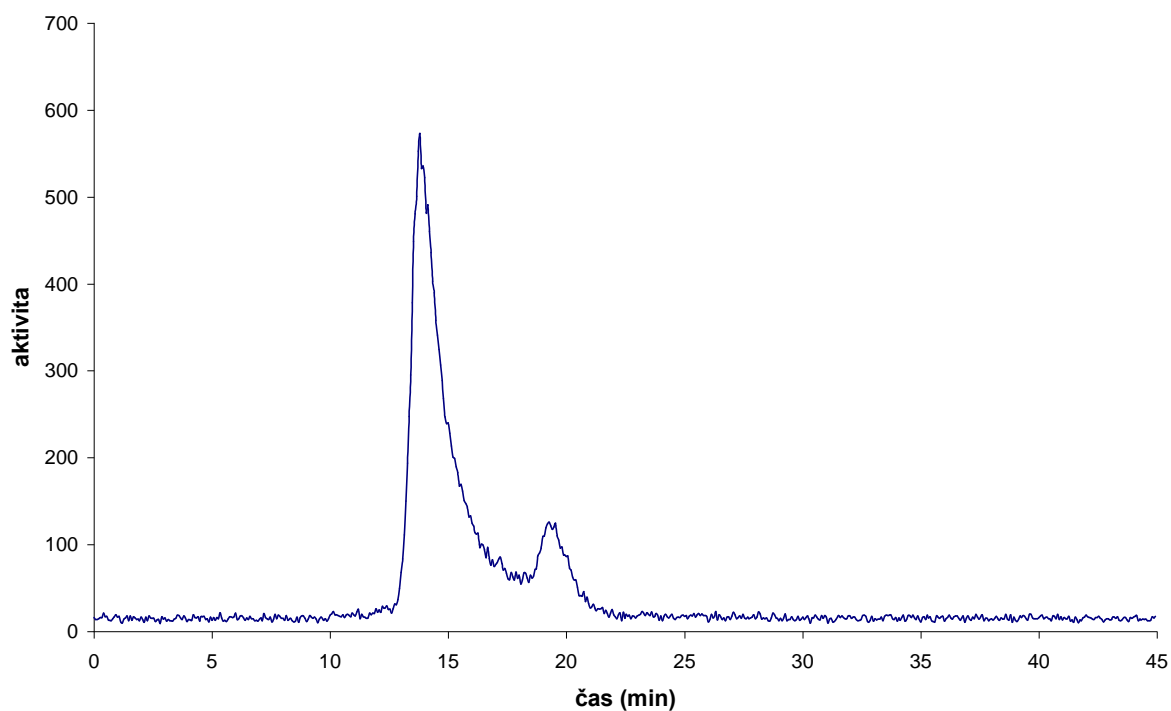
Tabulka 4.6 - Souhrnné výsledky stanovení stability přípravku ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ zjištěné tenkovrstvou chromatografií ve dvou vyvíjecích soustavách

čas od přípravy (h.)	Čistota komplexu (%)	čistota komplexu (%)
	(50mM EDTA v octanu sodném pH = 5,66)	(10% octan amonný : metanol (1:1))
0	94,7	98,1
1	88,9	94,1
2	83,4	93,6
4	76,1	83
24	70,6	75
48	69,6	78

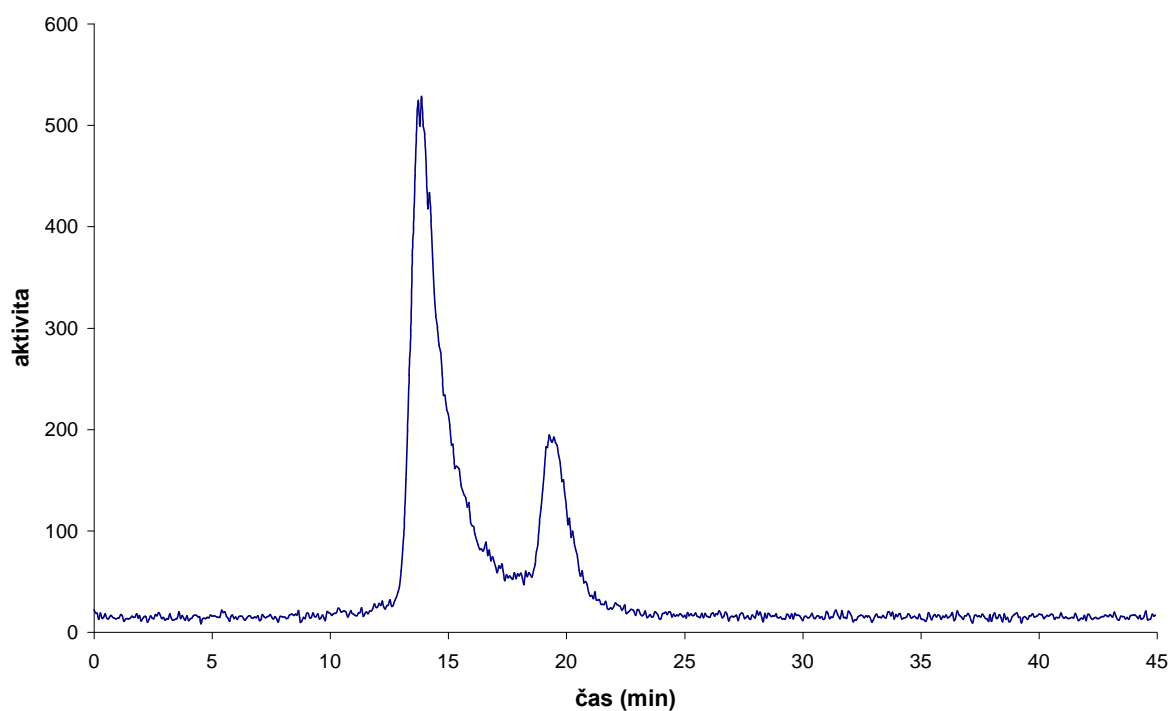
4.3.4.2. Metoda stanovení stability ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ za přítomnosti vysoké koncentrace konkurenčního chelátoru EDTA

800μl přečištěné ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ bylo smícháno s 800μl roztoku 4mM EDTA (koncentrace EDTA několikařádově převyšovala koncentraci chelátoru v protilátce) a směs byla inkubována při 35°C. HPLC analýza byla prováděna ihned po přečištění a po smíchání s EDTA, za 1, 2, 4, 24 a 48 hodin. Ve stejných časech byla prováděna i ITLC-SG analýza. Příklady elučních profilů s online radioaktivní detekcí v příslušných časech jsou na obrázcích 4.71-4.76. Výsledky získané ITLC-SG analýzou jsou zaznamenány v tabulce 4.7.

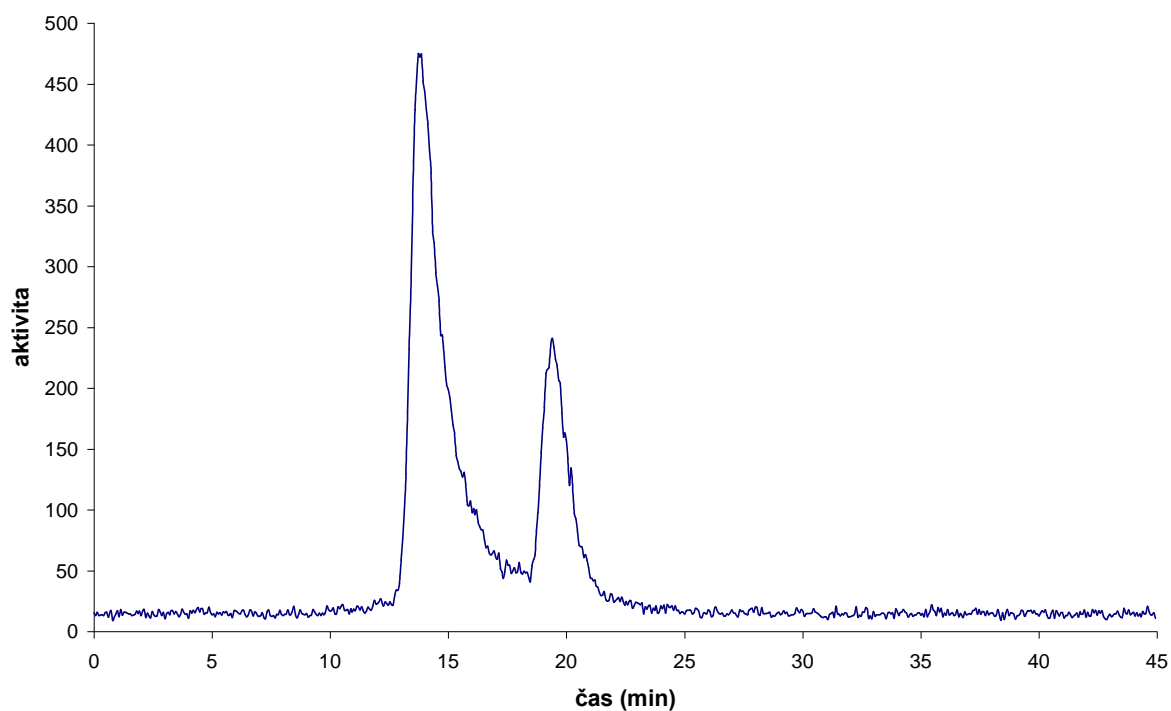
Obr. 4.71 - Příklad radiochromatogramu ihned po přidání roztoku konkurenčního chelátoru



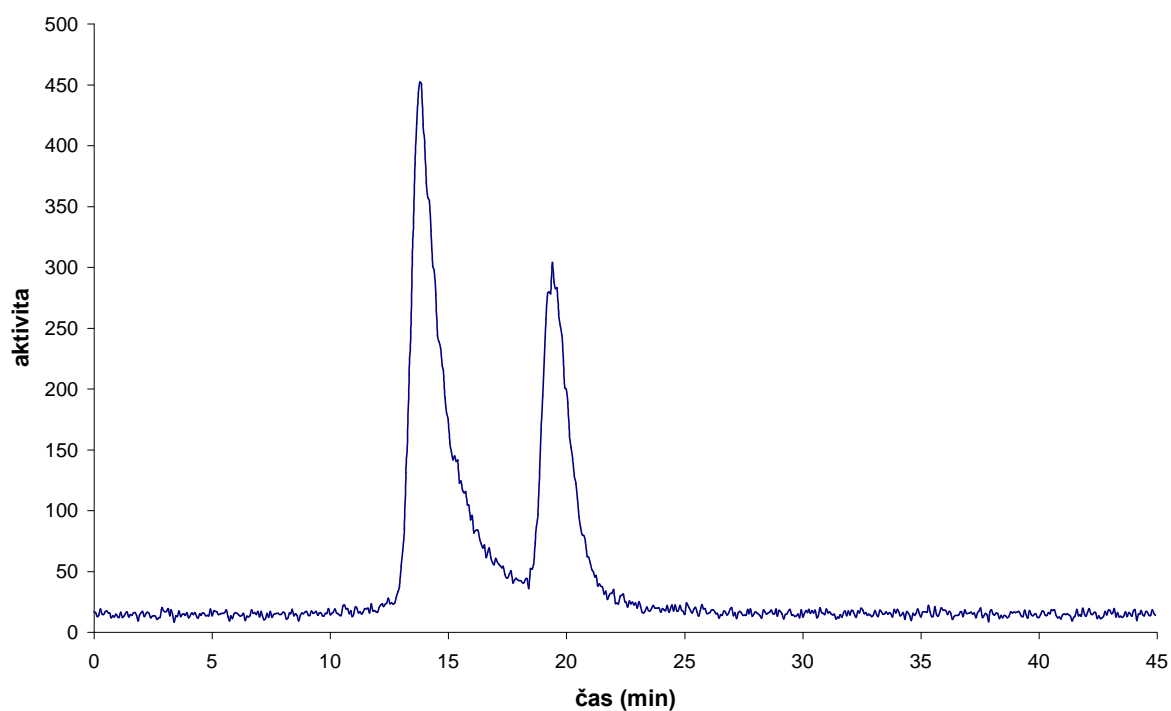
Obr. 4.72 - Příklad radiochromatogramu 1 hodinu po přidání roztoku konkurenčního chelátoru



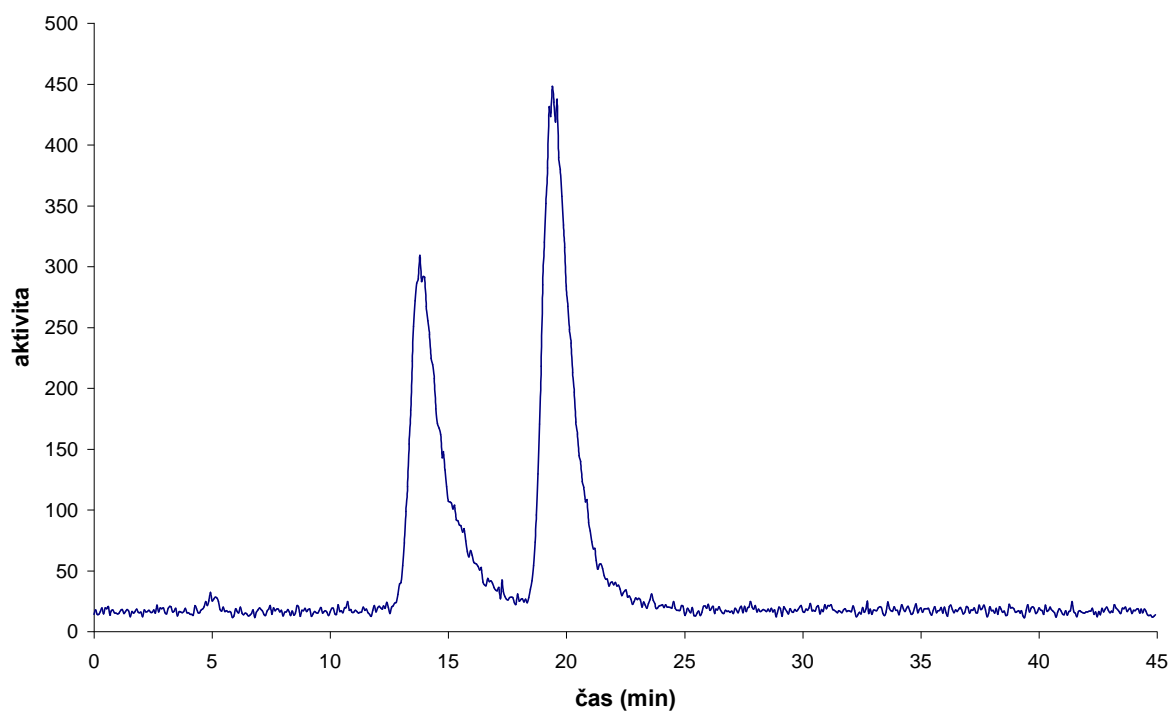
Obr. 4.73 - Příklad radiochromatogramu 2 hodiny po přidání roztoku konkurenčního chelátoru



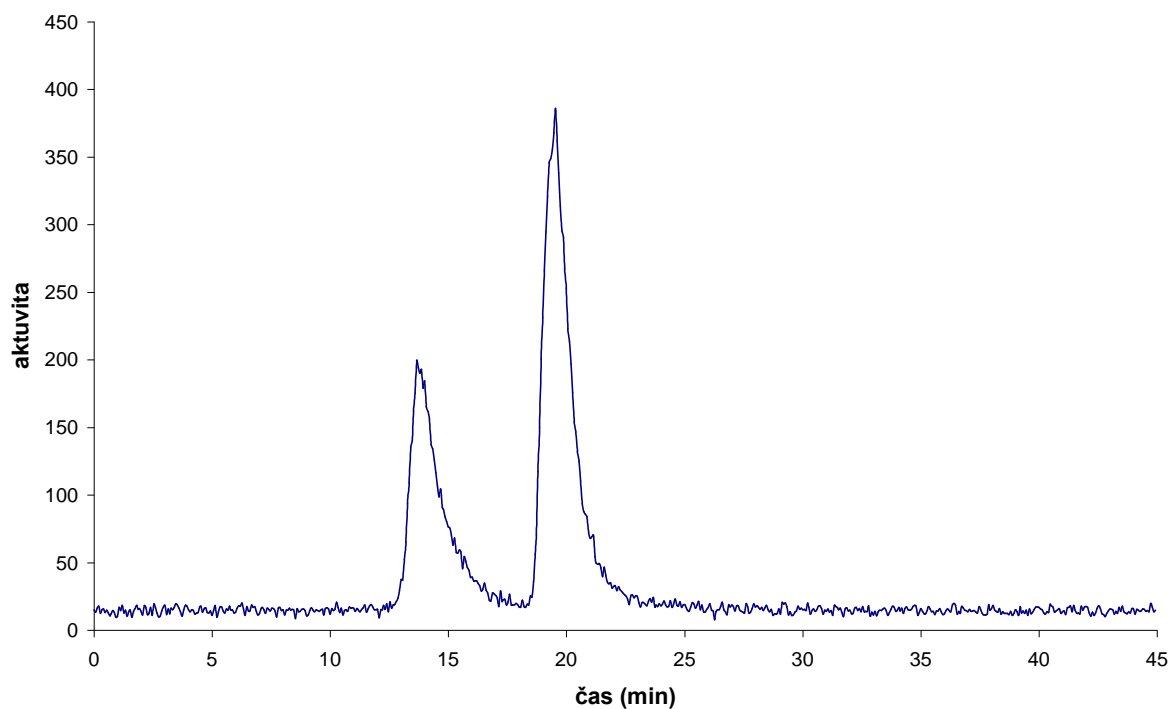
Obr. 4.74 - Příklad radiochromatogramu 4 hodiny po přidání roztoku konkurenčního chelátoru



Obr. 4.75 - Příklad radiochromatogramu 24 hodin po přidání roztoku konkurenčního chelátoru



Obr. 4.76 - Příklad radiochromatogramu 48 hodin po přidání roztoku konkurenčního chelátoru



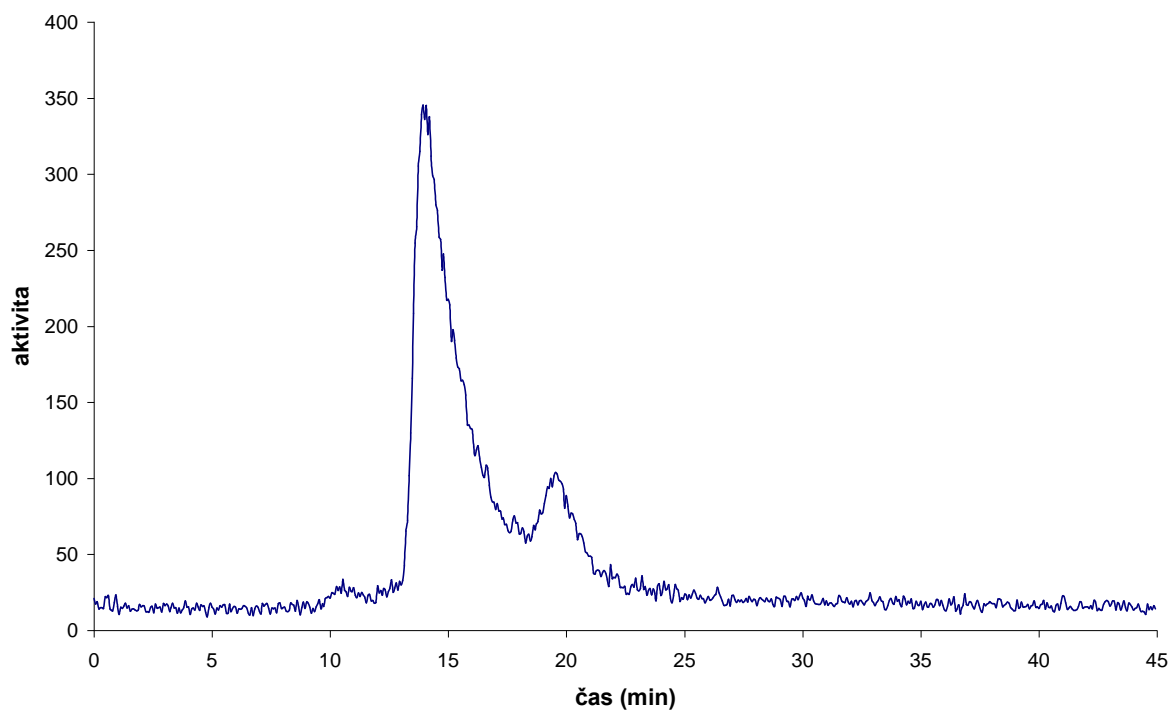
Tabulka 4.7 - Souhrnné výsledky stanovení stability ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ v prostředí s vysokou koncentrací konkurenčního chelátoru EDTA zjištěné tenkovrstvou chromatografií ve dvou vyvíjecích soustavách

Čas po smíchání s roztokem EDTA (h.)	Čistota komplexu (%) (50mM EDTA v octanu Sodném pH = 5,66)	čistota komplexu (%) (10% octan amonný : metanol (1:1))
0	90,9	94
1	85,9	86,1
2	81	81
4	75,3	82,5
24	54,8	52,3
48	43,5	43,3

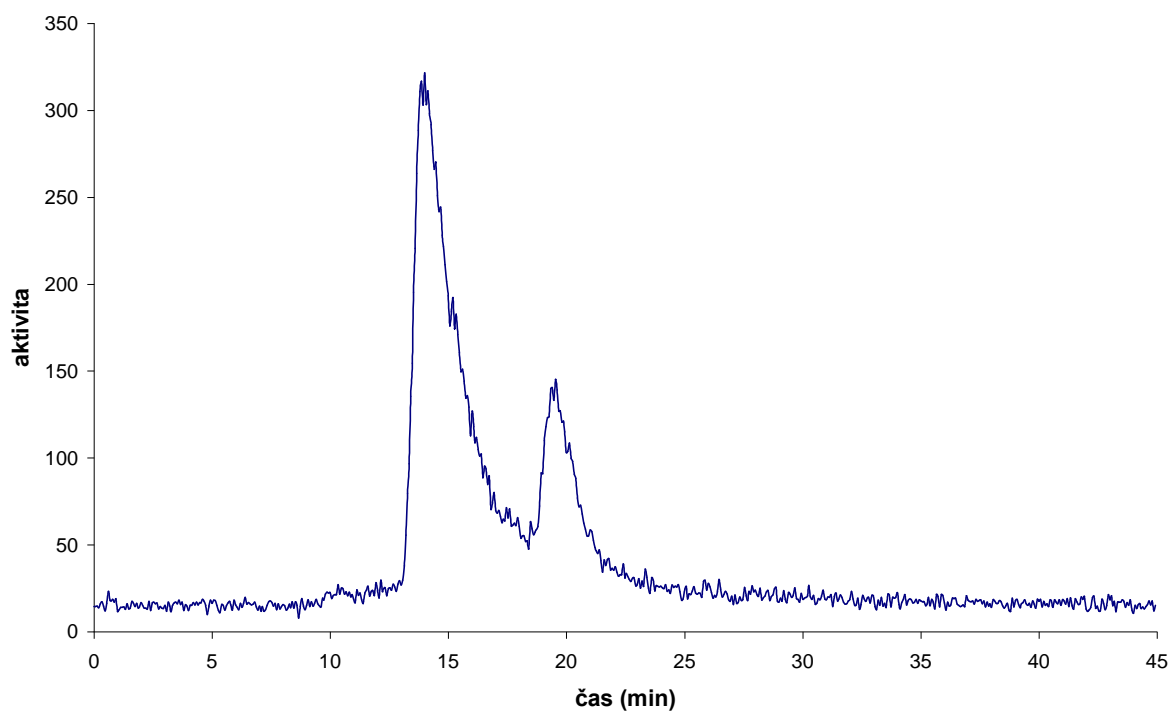
4.3.4.3. Metoda stanovení stability ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ v potkaní plazmě

500μl přečištěné ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ bylo smícháno s 1000μl potkaní plazmy a směs byla inkubována při 35°C. HPLC analýza byla prováděna ihned po přečištění a smíchání s plazmou, za 1, 2, 4, 24 a 48 hodin. Ve stejných časech byla prováděna i ITLC-SG analýza. Příklady elučních profilů s online radioaktivní detekcí v příslušných časech jsou na obrázcích 4.77-4.82. Výsledky získané ITLC-SG analýzou jsou zaznamenány v tabulce 4.8.

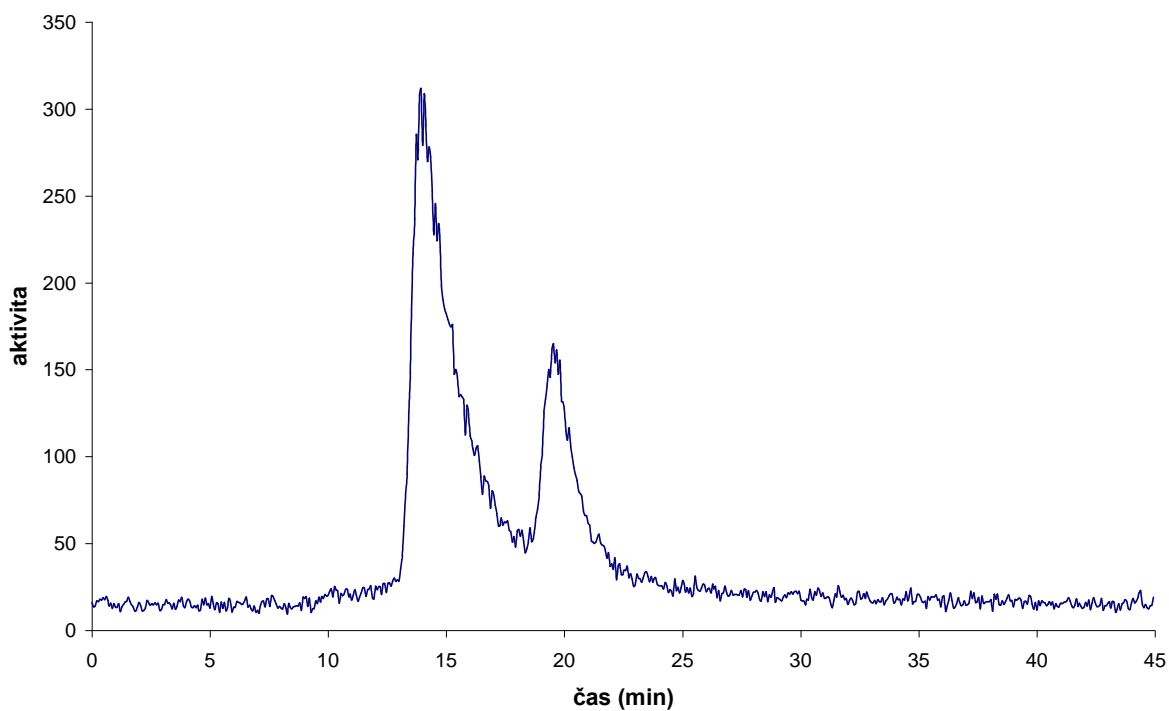
Obr. 4.77 - Příklad radiochromatogramu ihned po smíchání s potkaní plazmou



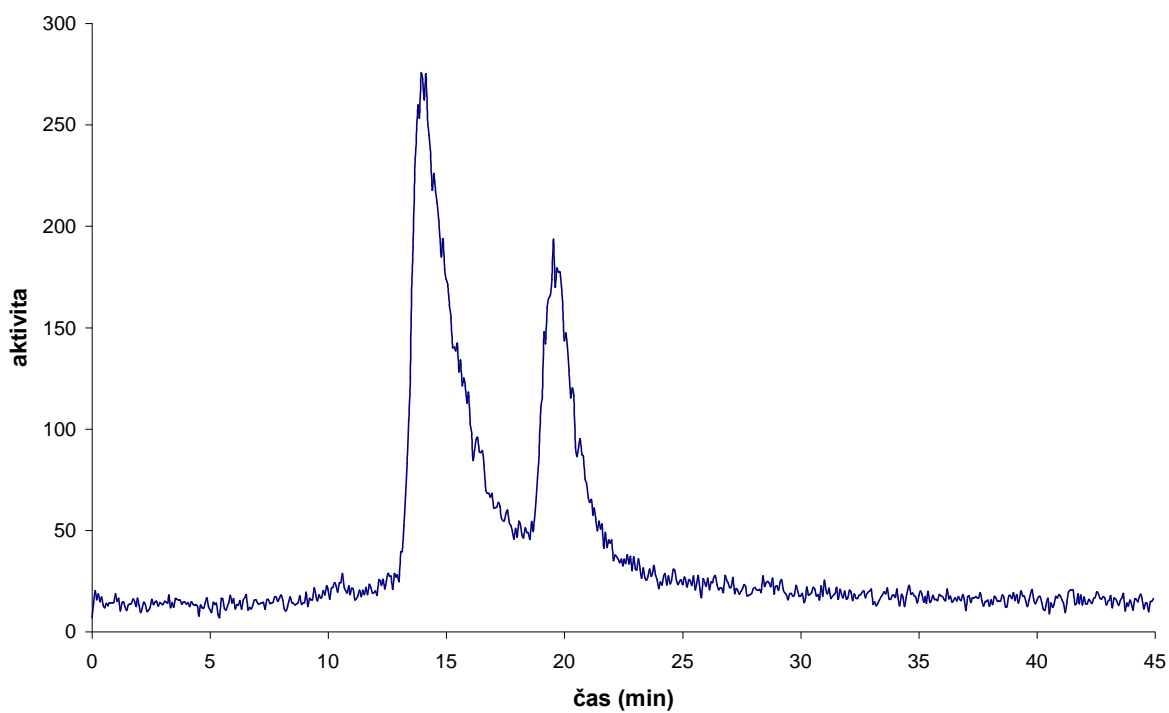
Obr. 4.78 - Příklad radiochromatogramu 1 hodinu po smíchání s potkaní plazmou



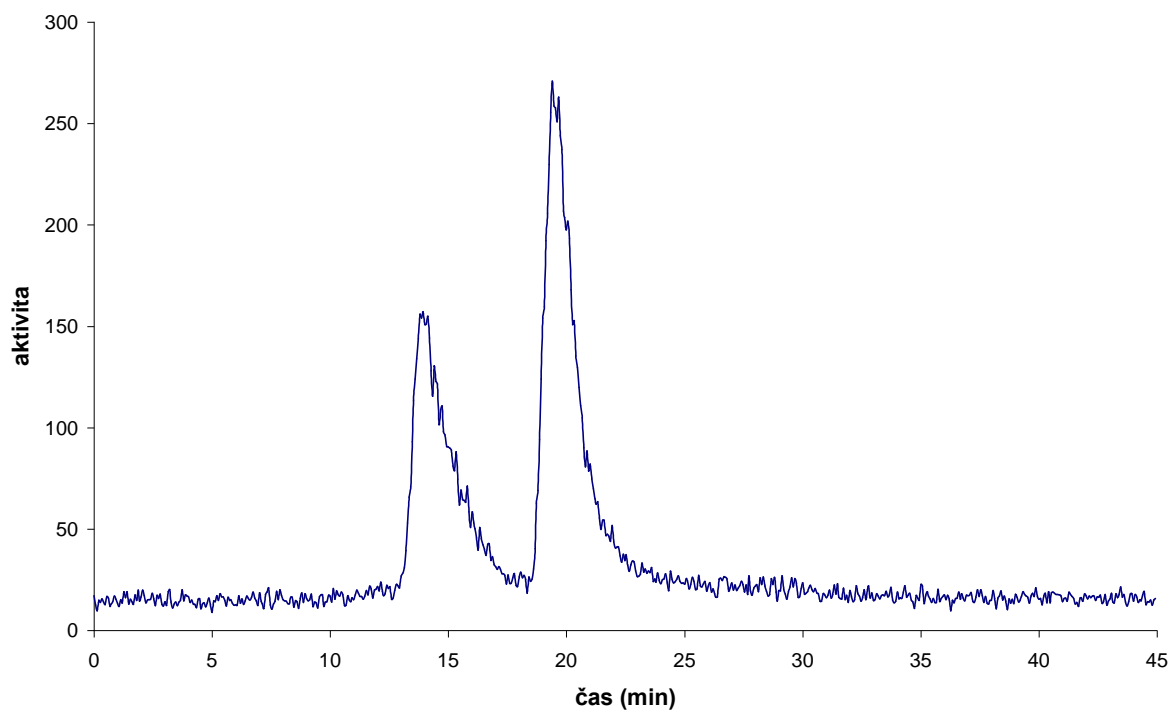
Obr. 4.79 - Příklad radiochromatogramu 2 hodiny po smíchání s potkaní plazmou



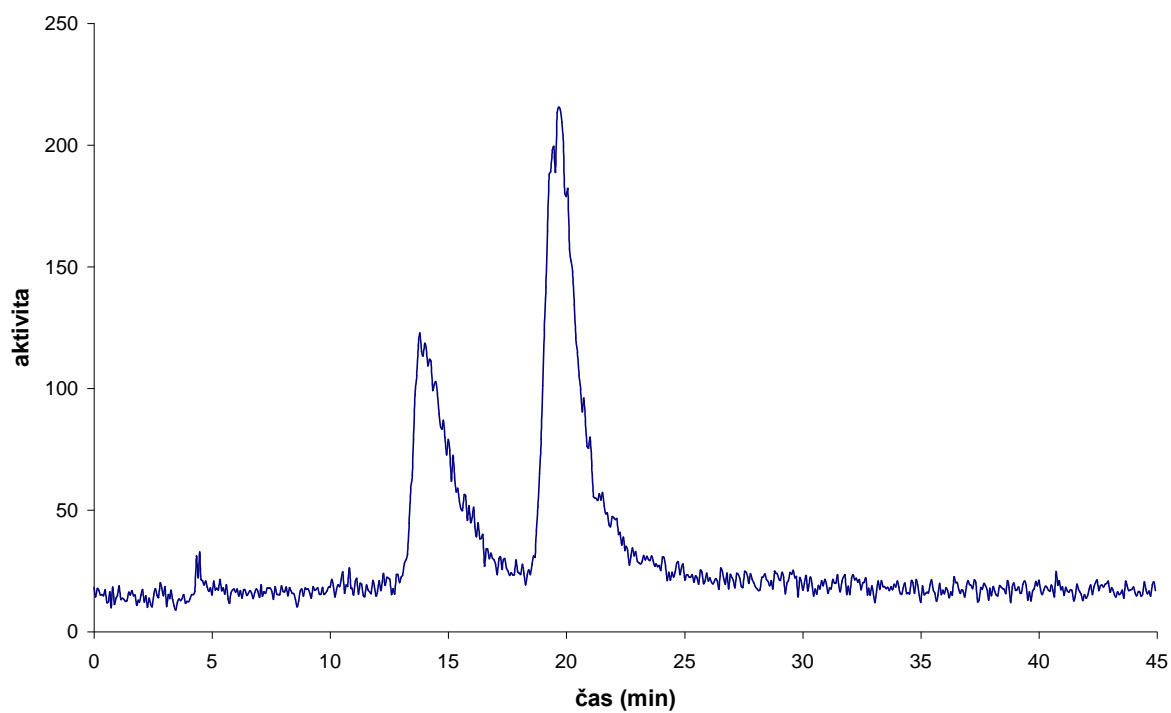
Obr. 4.80 - Příklad radiochromatogramu 4 hodiny po smíchání s potkaní plazmou



Obr. 4.81 - Příklad radiochromatogramu 24 hodin po smíchání s potkaní plazmou



Obr. 4.82 - Příklad radiochromatogramu 48 hodin po smíchání s potkaní plazmou



Tabulka 4.8 - Souhrnné výsledky stanovení stability ^{90}Y -antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ v prostředí potkaní plazmy zjištěné tenkovrstvou chromatografií ve dvou vyvíjecích soustavách

čas od smíchání protilátky s potkaní plazmou (h.)	Čistota komplexu (%) (50mM EDTA v octanu sodném pH = 5,66)	čistota komplexu (%) (10% octan amonný : metanol (1:1))
0	92	93,1
1	84,5	85,7
2	78,4	84,2
4	71,6	78,5
24	54,7	58,8
48	41,8	44,3

4.3.5. Analytické metody používané pro analýzu značených protilátek

HPLC analýza

HPLC analýzy byly prováděny na koloně Bio-Sil SEC 250, 300×7,8 mm. Jako mobilní fáze byl používán 0,1M fosfátový pufr s 2mM EDTA a 0,01M NaN₃ pH=7,07. Nastříkováno bylo 10-100μl vzorku (v závislosti na aktivitě a radionuklidu) a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Doba analýzy byla 45min a všechny analýzy byly prováděny při teplotě 30°C. Před nástřikem do HPLC systému byl vzorek vždy přefiltrován přes PVDF 0,2μm filtr.

ITLC-SG analýza

Pro kontrolu radiochemické čistoty byla využívána také ITLC-SG analýza. Každý vzorek byl analyzován ve dvou různých vyvíjecích soustavách. Jednou z nich byla směs 10% octan amonný : metanol (1:1) a druhá používaná mobilní fáze byla 50mM EDTA v octanu sodném pH = 5,66. Na strip byly zpravidla nanášeny 2μl vzorku. Po vyvinutí byly chromatogramy rozstříhány na 10 částí a měřeny na gamaautomatu.

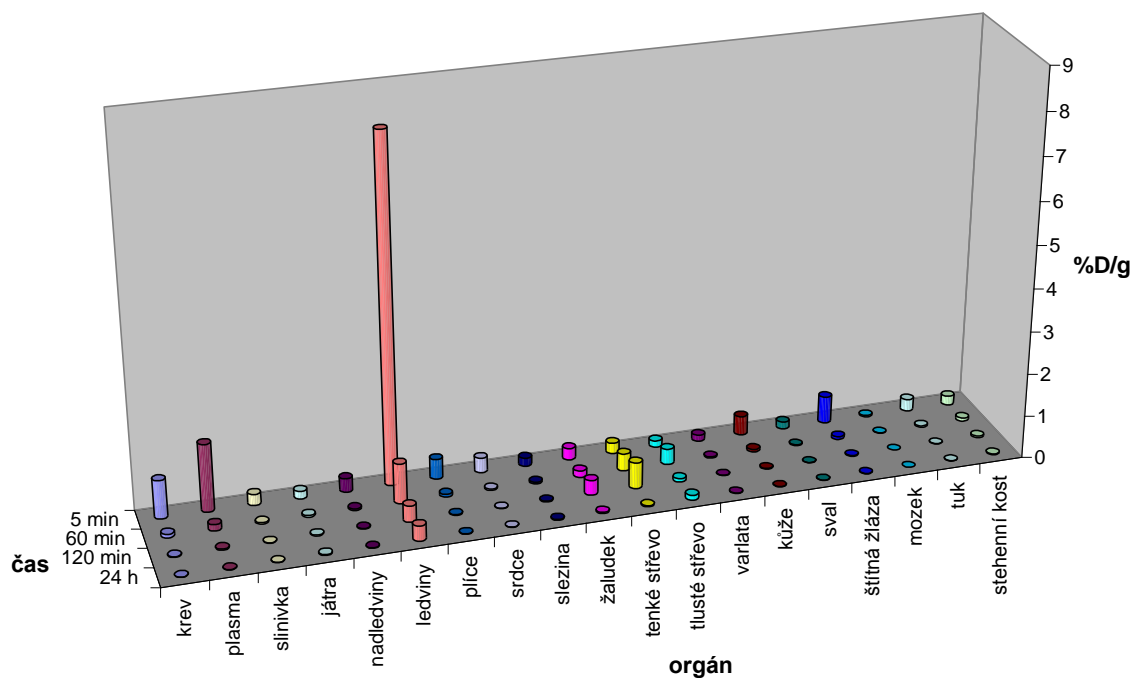
4.4. Biologické experimenty

Biodistribuční a eliminační studie byly prováděny pracovníky oddělení radiofarmak na potkaních samcích (kmen Wistar), jejichž hmotnost se pohybovala v rozmezí 190 - 240g. Při eliminačních experimentech měla zvířata neomezený přístup k potravě, narozdíl od distribučních studií, kdy byly potkaní samci drženi bez přístupu k potravě. Před aplikací radioaktivně značené látky byli potkani uvedeni do etherové anestézie a po té jim byla intravenózně podána značená látka (0,2ml; $c'_{\text{pept}} = 1\mu\text{g/ml}$, $c'_{\text{protin}} = 10\mu\text{g/ml}$). V průběhu experimentů byla zvířata jednotlivě umístěna do metabolických klecí, které umožňují oddělený sběr moči a stolice.

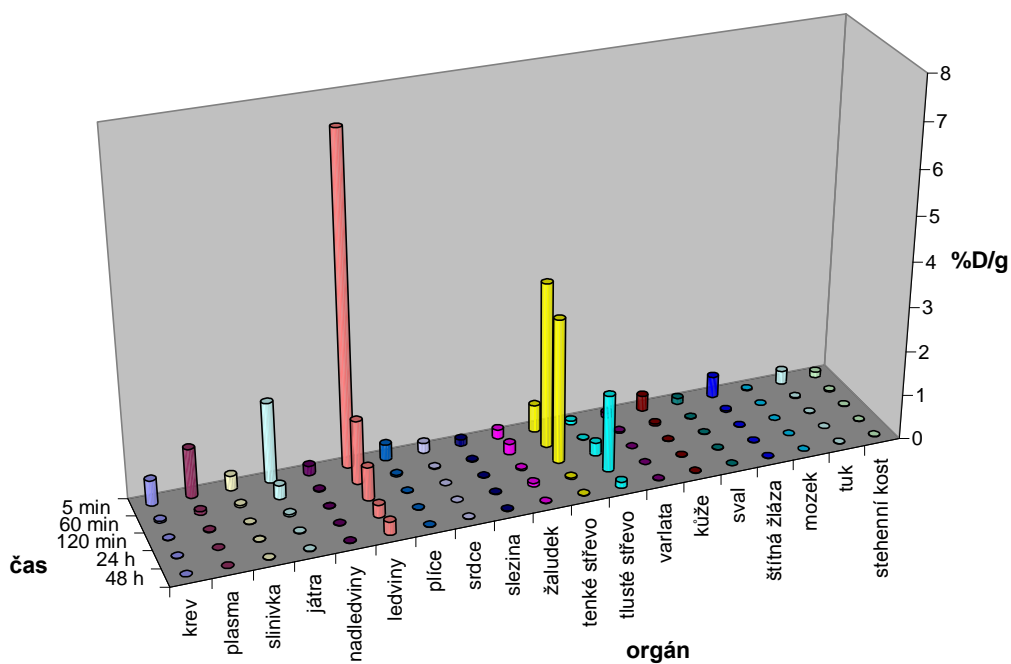
Pro biodistribuční studie byly ve zvolených časových intervalech odebírány vzorky krve a po usmrcení zvířete exsanguinací, byly odebrány a zváženy jednotlivé orgány. Po té byla jejich radioaktivita změřena na gamaautomatu. Ze získaných hodnot bylo vypočítáno procento radioaktivity z podané dávky v jednotlivých orgánech a tkáních (%D), a také procento radioaktivity z podané dávky vztažené na hmotnost orgánu (%D/g).

Pro účely eliminačních studií byli potkani po aplikaci radioaktivně značené látky umístěni do metabolických klecí a ve vybraných časových intervalech (2, 24, 48 hodin) byly sbírány vzorky moči a stolice. Ze získaných hodnot radioaktivity bylo pro každý časový interval vypočítáno procento vyloučené radioaktivity z podané dávky oběma exkrementními cestami. Vzorky moči byly v některých případech podrobeny HPLC analýze, moč sbírána v časovém intervalu 24-48 hodin nebyla vzhledem k nízkým hodnotám radioaktivity analyzována.

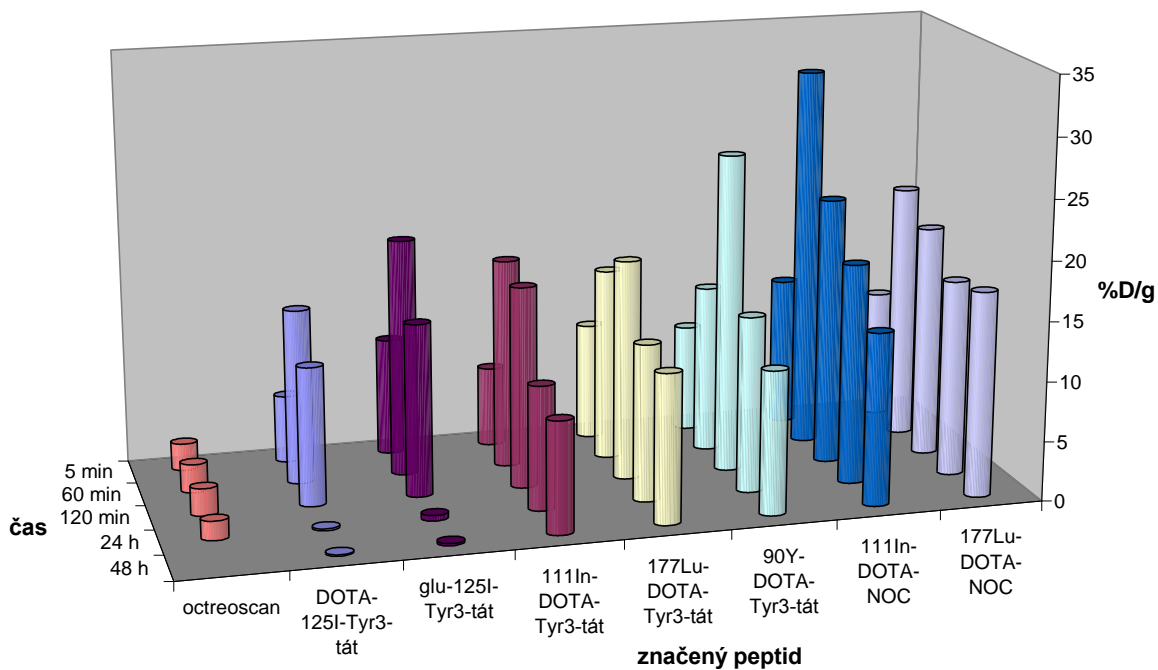
Obr. 4.83 - Příklad biodistribuce značených cyklických chelátorů, konkrétně $^{111}\text{In-H4do3apABn}$; hodnoty jsou vyjádřeny jako procento radioaktivity z podané dávky vztahované na gram orgánu (%D/g)



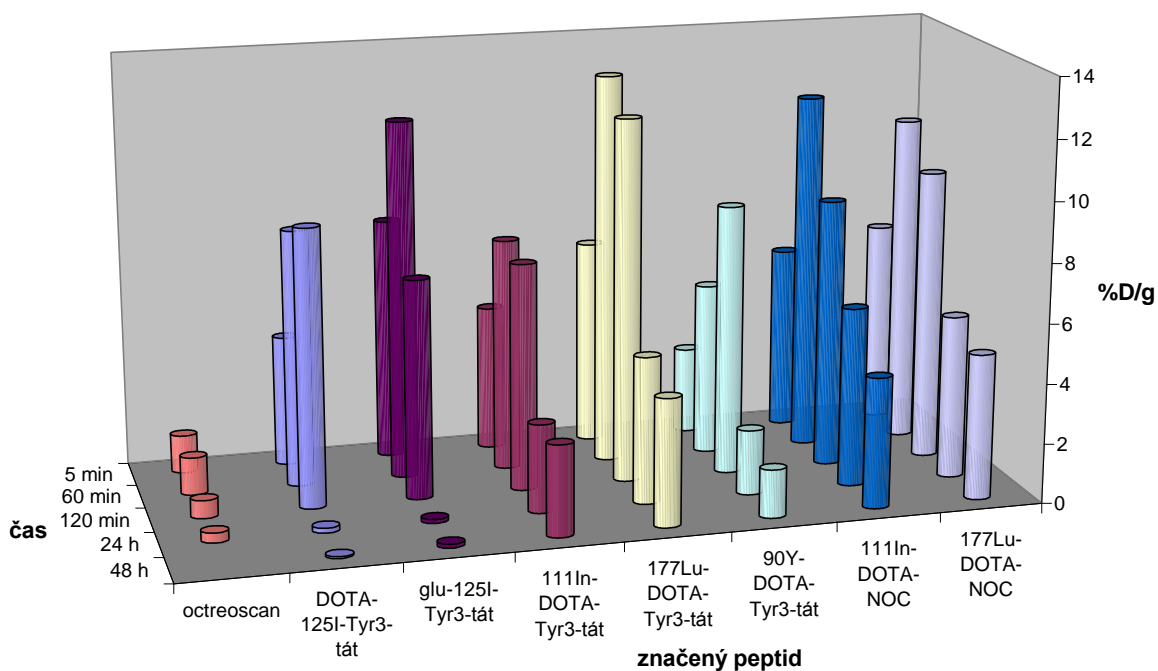
Obr. 4.84 - Příklad biodistribuce značených acyklických chelátorů, konkrétně $^{111}\text{In-Amino-B2M3-A}$; hodnoty jsou vyjádřeny jako procento radioaktivity z podané dávky vztahované na gram orgánu (%D/g)



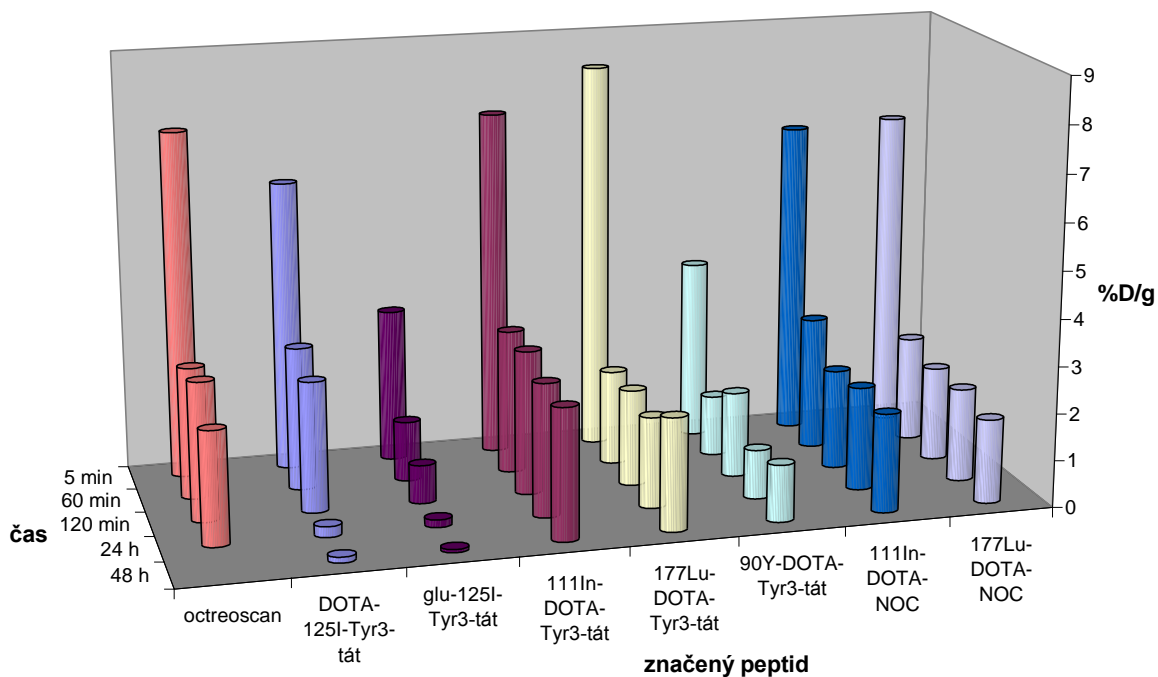
Obr. 4.85 - Srovnání biodistribuce vybraných značených peptidů do nadledvinek; hodnoty jsou vyjádřeny jako procento radioaktivity z podané dávky vztažené na gram orgánu (%D/g)



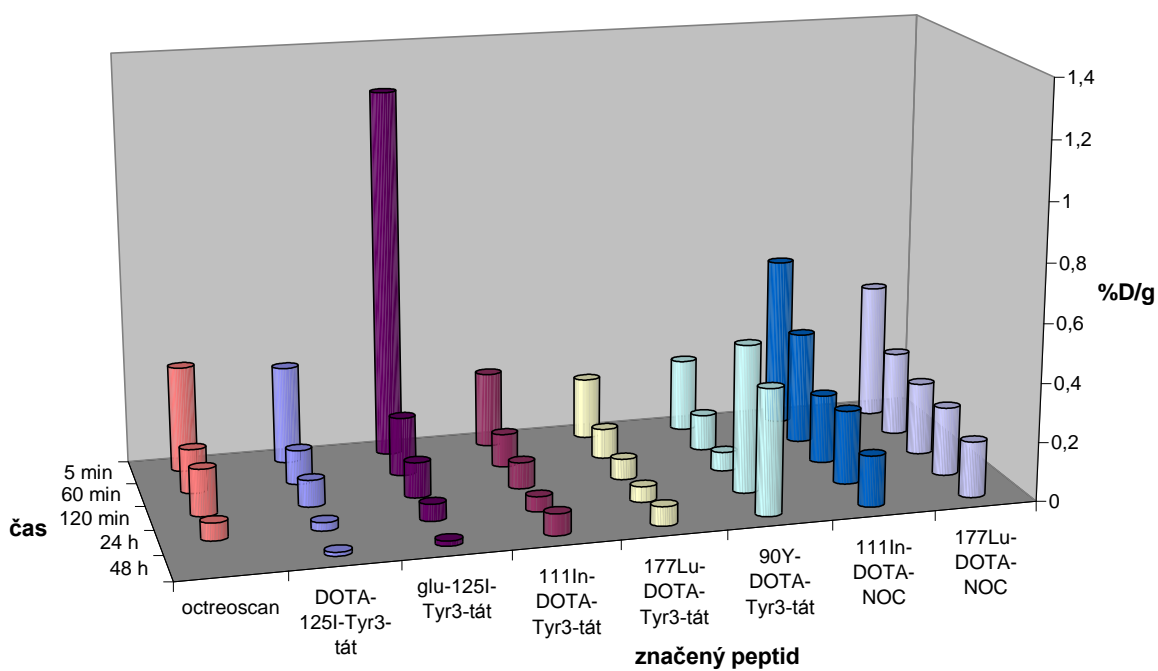
Obr. 4.86 - Srovnání biodistribuce vybraných značených peptidů do pankreatu; hodnoty jsou vyjádřeny jako procento radioaktivity z podané dávky vztažené na gram orgánu (%D/g)



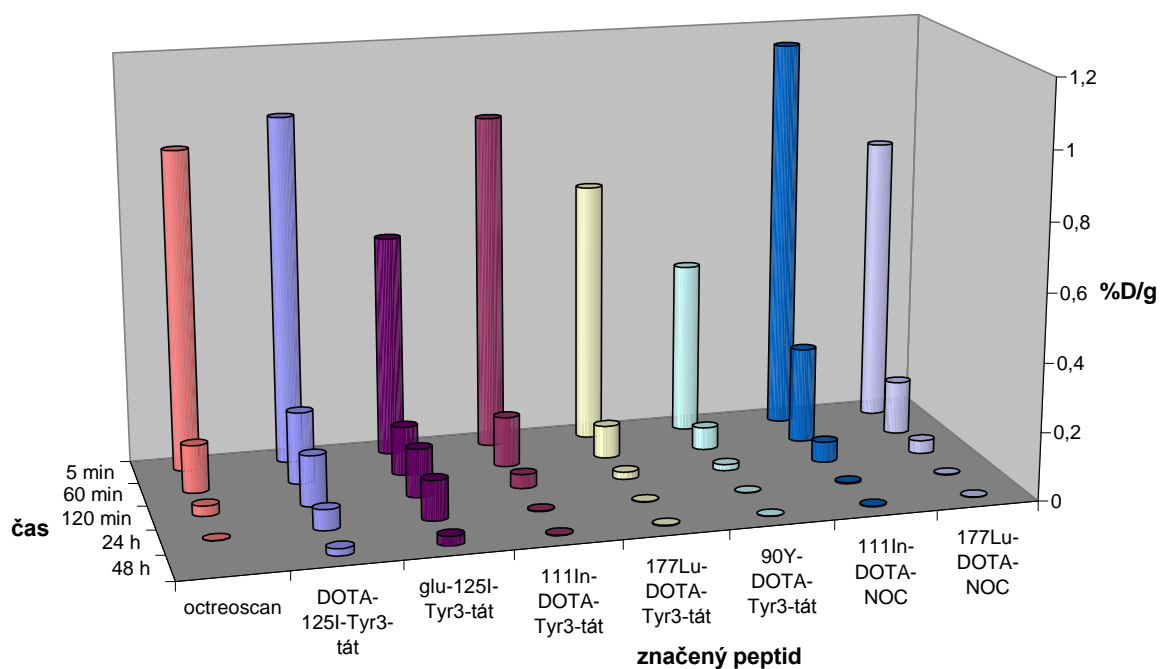
Obr. 4.87 - Srovnání biodistribuce vybraných značených peptidů do ledvin; hodnoty jsou vyjádřeny jako procento radioaktivity z podané dávky vztažené na gram orgánu (%D/g)



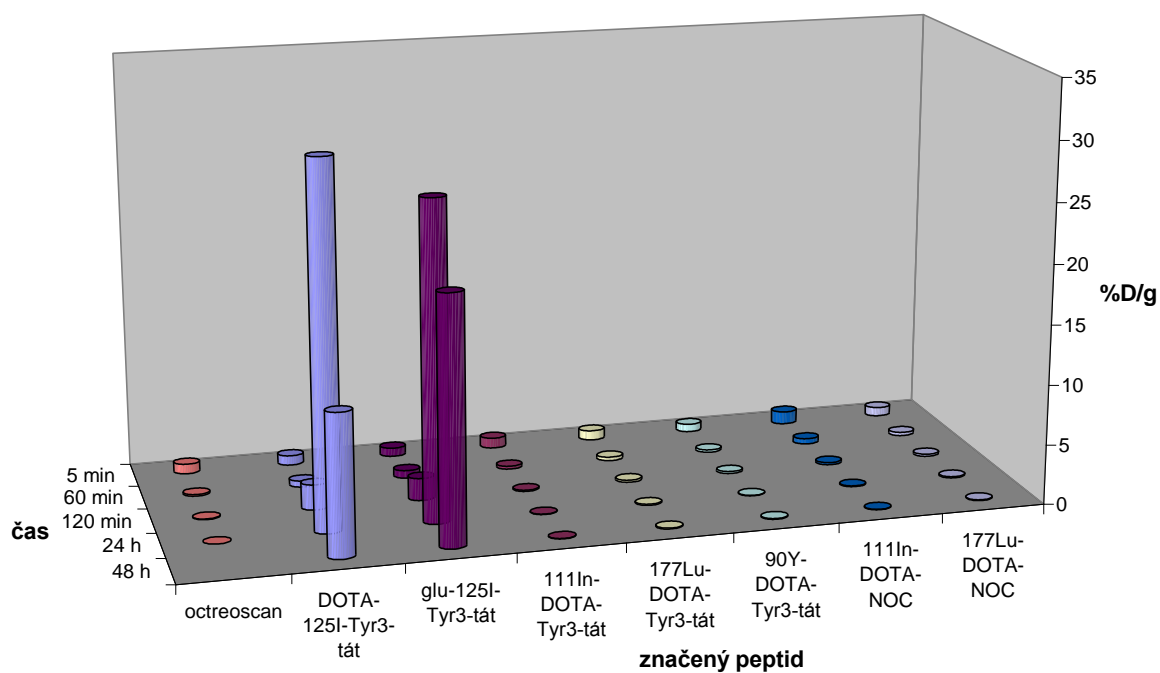
Obr. 4.88 - Srovnání biodistribuce vybraných značených peptidů do jater; hodnoty jsou vyjádřeny jako procento radioaktivity z podané dávky vztažené na gram orgánu (%D/g)



Obr. 4.89 - Srovnání biodistribuce vybraných značených peptidů v krvi; hodnoty jsou vyjádřeny jako procento radioaktivity z podané dávky vztažené na gram orgánu (%D/g)



Obr. 4.90 - Srovnání biodistribuce vybraných značených peptidů do štítné žlázy; hodnoty jsou vyjádřeny jako procento radioaktivity z podané dávky vztažené na gram orgánu (%D/g)



4.5. Použité materiály a přístroje

4.5.1. Chemikálie a materiál

H4do3apABn (PřF UK, Česká republika), H5do3apPrA (PřF UK, Česká republika), Do3apyNox (PřF UK, Česká republika), Amino-B2M3-A (Azacycles s.r.o., Česká republika), Amino-B2M3-B (Azacycles s.r.o., Česká republika), Amino-B2M3-E (Azacycles s.r.o., Česká republika), DOTA-Tyr³-oktreotát (piCHEM, Rakousko), DOTA-NOC (piCHEM, Rakousko), glu-Tyr³-oktreotát (Duke University Medical Center, USA), antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)₄₋₅ (Azacycles s.r.o., Česká republika), antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ (Azacycles s.r.o., Česká republika)

¹¹¹In-InCl₃ (GE Healthcare, Velká Británie), ¹⁷⁷Lu-LuCl₃ (PerkinElmer, USA), ⁹⁰Y-YCl₃ (PerkinElmer, USA), ¹²⁵I-NaI (MP Biomedicals, USA)

acetonitril (Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich), 2-propanol (Sigma-Aldrich), octan sodný (Merck), spehadex G-50 (Sigma-Aldrich), trifluoroctová kyselina (Merck), kyselina gentisová (Sigma-Aldrich), chloramin T (Sigma-Aldrich), etanol (Penta), kyselina chlorovodíková (Lachema), amoniak (Lachema), octan amonný (Penta), dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich), hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich), chlorid sodný (Lachema), 0,9% chlorid sodný (Braun), EDTA (MP Biomedicals), DOTA (Sigma-Aldrich), azid sodný (Fluka), kyselina octová (Lachema)

kolony: LichroCart 125-4, Lichrospher 100, RP-18e (5μm) (Merck); LichroCart 250-4, Lichrospher 100, RP-18e (5μm) (Merck); Bio-Sil SEC 250, 300×7,8 mm (Biorad)

předklony: LichroCart 4-4, Lichrospher 100, RP-18e (5μm) (Merck)

stripy pro instantní tenkovrstvou chromatografii na skleněných mikrovlákněch (GelmanSciences)

4.5.2. Přístrojové vybavení

Agilent HPLC system 1100 Series (Agilent Technologies, USA)

Pharmacia-LKB HPLC systém s programátorem gradientu Gradient Master GP 962 (UOCHAB, Česká republika)

univerzální scintilační sonda s radiometrem SSU-70-2 (Polon, Polsko)
automatic gammacounter 1480 Wizard™ 3" (Wallac, Finsko)
TLC-analyzer (Raytest, Německo)
dry bath incubator (Major Science, Taiwan)
centrifuge MPW-300 (Mechanika Precyzyjna, Polsko)
pH meter Orion 350 (Thermo Scientific, USA)
analytické váhy (Boeco, Německo)
vakuové čerpadlo Vacc-space-20 (Chromservis, Česká republika)
Thermo Savant SPD Speed Vac concentrator (GMI, USA)
magnetická míchačka (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)
třepačka BioVortex V1 (Biosan, Lotyšsko)
minicentrifuga Z 100 M (Hermle, Německo)

5 Výsledky a diskuse

5.1. Bifunkční chelátory

Hledání podmínek dostatečně rychlé tvorby komplexů vícemocných kovů s vícefunkčními polyaminokarboxylovými chelátory představuje hledání kompromisu reakčního pH, kdy tyto BFC chelátují nejlépe při pH dostatečně vysokém, tak aby karboxylové skupiny chelátoru byly disociovány a na druhé straně pH musí vyhovovat vlastnostem vícemocných kovů, pro které je z důvodu možné hydrolyzy, vhodné pH co nejnižší. Problém je možno vyřešit například vytvořením reakčního prostředí s vysokou koncentrací slabě komplexujícího iontu, který sice udrží příslušný vícemocný kov v roztoku ve slabém komplexu, ale nekompetuje při tvorbě termodynamicky mnohem silnějšího chelátu.

Jako slabé komplexany je možno použít například metylendifosfonát, který se často používá při radioaktivním značení protilátek techneciem-99m. Pro naše pokusy byl používán acetátový pufr o vysoké koncentraci (0,4-0,5 mol/l), který umožňuje vytváření komplexů trojmocných kovů se zkoumanými chelátory při vyšším pH (5-7).

Při radioaktivním značení bifunkčních chelátorů byly hledány jednak optimální podmínky přípravy značeného komplexu, ale i podmínky analytického stanovení radiochemické čistoty vzniklého produktu. Studie zahrnovaly proměření závislostí tvorby komplexu (radionuklid-BFC) na parametrech reakční soustavy, tj. na teplotě, koncentraci BFC, pH a čase.

5.1.1. Cyklické chelátory

Pro vazbu trojmocných kovových radionuklidů (lanthanoidů, india-111, yttria-90 a dalších) na biologicky aktivní sloučeniny se používají cyklické chelátory, které vytvářejí s těmito kovy termodynamicky stabilní komplexy. Své využití při značení receptorově specifických peptidů našla DOTA, její nevýhodou je však pomalá tvorba komplexů. Pro zlepšení kinetiky tvorby komplexů byly na Přírodovědecké fakultě UK syntetizovány různé deriváty tohoto komplexanu.

Ukázalo se, že tvorba komplexů cyklických BFC (H4do3apABn, H5do3apPrA, Do3a-pyNox) probíhá v porovnání s H4dota rychleji a optimální pH pro tvorbu komplexů se nachází v rozmezí pH = 4,4 - 7,4 (A1-A4). Pro rychlost a kvalitu značení Do3a-pyNox a H4dota hraje významnou úlohu reakční teplota. Při vyšší teplotě (90°C) probíhá tvorba dostatečně radiochemicky čistého komplexu ($R\check{C} > 95\%$) rychleji (B3, B4). Na rozdíl od tvorby značených H4do3apABn a H5do3apPrA komplexů, jejichž radiochemická čistota není teplotou příliš ovlivněna (B1, B2). Pro tvorbu dostatečně čistých preparátů je

nezbytná několikanásobně vyšší koncentrace BFC v porovnání s koncentrací radiokovu (C1-C4).

Ke stanovení radiochemické čistoty byla využívána ITLC-SG (D1) a k detailnějšímu popisu reakčních směsí byla použita RP-HPLC s izokratickou elucí (E1a, E1b). Bylo zjištěno, jak ukazuje tabulka 4.1, že při uchovávání v chladu jsou všechny připravené značené komplexy stabilní po dobu několika dní.

5.1.2. *Acyklické chelátory*

Tvorba radioaktivně značených komplexů acyklických BFC (amino-B2M3-A, B, E) s indiem-111 probíhá poměrně rychle v širokém rozmezí pH, kdy již v čase 30 minut bylo u všech studovaných látek více než 95% aktivity vázáno do komplexu (A5-A7). Z teplotních závislostí je zřejmé, že teplota příliš neovlivňuje radiochemickou čistotu preparátů (B5-B7). Ve všech případech se tvořil prakticky čistý komplex v krátkém čase i za teploty do 40°C, což je limitní teplota pro značení proteinových struktur (například protilátek). Ze studií závislosti koncentrace BFC na tvorbě komplexu se ukázalo, že pro tvorbu dostatečně čistého značeného preparátu je, podobně jako u cyklických BFC, nezbytná koncentrace BFC několikařádově přesahující koncentraci radiokovu (C5-C7). Důvodem je zřejmě jednak pomalá rychlost reakce při malých koncentracích a především stupeň čistoty reakčního prostředí dosažitelný za našich podmínek.

Pro rychlé stanovení radiochemické čistoty byla zvolena jako optimální metoda instantní tenkovrstvá chromatografie (ITLC-SG) (D2). Důkladnější popis složení reakčních soustav byl proveden za použití gradientové RP-HPLC (E2a, E2b). Eluční profily naznačují pravděpodobnou přítomnost různých forem (optické izomery, různé iontové formy) komplexu. Z výsledků stabilitních studií (tabulka 4.2) je zřejmé, že při uchovávání v lednici jsou komplexy stabilní po dobu několika dní.

5.2. *Receptorově specifické peptidy*

Součástí této práce bylo také studium podmínek značení, stability a metabolismu receptorově specifických peptidů ze skupiny derivátů somatostatinu modifikovaných chelátorem DOTA (DOTA-Tyr³-tát, DOTA-NOC) a glykosilovaného Tyr³-oktreotátu bez chelatační skupiny, který byl značen prostřednictvím tyrosinové skupiny.

5.2.1. Receptorově specifické peptidy značené kovovými radionuklidy

Všechny radioaktivně značené biologicky aktivní receptorově specifické peptidy byly připraveny s vysokou radiochemickou čistotou ($R\check{C} > 98\%$), pro jejíž stanovení byla u všech značených peptidů vyvinuta metodika s využitím HPLC analýzy. Pro rychlé stanovení radiochemické čistoty peptidů značených kovovými radionuklidy (^{111}In , ^{177}Lu , ^{90}Y) byla s výhodou využívána také ITLC-SG analýza. Po aplikaci radioaktivně značené látky potkanům byly ve vybraných časových intervalech sbírány vzorky moči. Analýzy moči byly prováděny s využitím příslušné HPLC metody s přímým nástřikem vzorku a ve většině případů s online radioaktivní detekcí. V některých případech nízkých aktivit v delších časových intervalech u peptidů značených ^{125}I , ^{90}Y byly sbírány frakce v 1 minutových intervalech. Tyto frakce pak byly proměřeny na gamaautomatu.

Analýzy moči prokázaly, že oba peptidy (DOTA-Tyr³-tát i DOTA-NOC) značené ^{111}In se vylučují v nezměněné podobě (obr. 4.11, 4.12, 4.33, 4.34). DOTA-Tyr³-oktreotát značený β zářiči ^{177}Lu , případně ^{90}Y se v krátkých časech po podání potkanům vylučoval také v nezměněné formě (obr. 4.15). Na radiochromatogramu moči sbírané v delším časovém intervalu 2-24 hodin (obr. 4.16), byl detekován drobný pik s menším retenčním časem (t_R), pravděpodobně se jedná o polárnější štěp. Naproti tomu po aplikaci ^{177}Lu -DOTA-NOC byla stanovena radioaktivita odpovídající polárnější látce v obou měřených časových intervalech (obr. 4.37, 4.38). Analýzy moči DOTA-NOC značeného ^{90}Y ukazují na pravděpodobnou přítomnost metabolitů, rozkladných produktů, případně i větších nebo lipofilnějších struktur (dimerů) (obr. 4.41, 4.42). Na radiochromatogramech jsou patrné eluční zóny s menším i vyšším t_R než odpovídá samotnému ^{90}Y -DOTA-NOC.

5.2.2. Receptorově specifické peptidy značené oxidativní jodací

Původně byl fenylalanin ve struktuře oktreotidu nahrazen tyrosinem z důvodu možnosti označení této struktury oxidativní jodací. Tento záměr se zdařil, a zároveň bylo zjištěno, že Tyr³-oktreotid má podstatně vyšší afinitu k některým subtypům somatostatinových receptorů, z toho důvodu se začal tento peptid intenzivně studovat. Radioaktivní značení oxidativní jodací je poměrně snadná a rychlá metoda, problémem je však zastavení reakce, které se provádí použitím redukčního činidla. Redukující látky totiž mohou narušit disulfidický můstek ve struktuře peptidu, což vede ke ztrátě afinity k příslušným receptorům.

Pro značení peptidů (DOTA-Tyr³-oktreotátu a glu-Tyr³-oktreotátu) jodem-125 byla využívána metoda s chloraminem T s využitím semipreparativní HPLC k oddělení

označeného peptidu z reakční soustavy. Jak ukazují radiochromatogramy (obr. 4.21, 4.27) jsou oba peptidy za *in vitro* podmínek stabilní po dobu nejméně 24 hodin od přípravy.

Moč analyzovaná po aplikaci DOTA-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu vykazovala v obou měřených časových intervalech přítomnost polárního analytu s velmi krátkým retenčním časem (obr. 4.22, 4.23), pravděpodobně se jedná o jodid uvolněný z tyrosinové skupiny. Naproti tomu u jodovaného glu-Tyr³-oktreotátu byly stanoveny nejenom vysoké hodnoty radioaktivity odpovídající tomuto analytu, ale i píky s vyšším t_R než náleží glu-¹²⁵I-Tyr³-oktreotátu (obr. 4.28, 4.29). Opět se pravděpodobně jedná o rozkladné produkty, lipofilnější metabolity, případně dimery, struktury těchto látek nebyly stanoveny.

5.3. Protilátky

V rámci spolupráce s firmou Azacycles s.r.o. jsme získali protilátku modifikovanou jak acyklickým, tak cyklickým chelátorem. V obou případech byly studovány podmínky značení a u protilátky modifikované cyklickým chelátorem byla navíc studována stabilita v různých prostředích.

Protilátka modifikovaná acyklickým chelátorem antiCD66 a,b,c,e-(NHCSNH-B2M3-DTPA izomer A)₄₋₅ byla označena indiem-111 i ytriem-90. Za popsanych podmínek radioaktivního značení se po přečištění gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-50, podařilo získat dostatečně čistou značenou protilátku (obr. 4.43, 4.44).

U protilátky modifikované cyklickým chelátorem antiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH₂PO(OH)CH₂-DO3A)₂₋₃ byly nejdříve studovány podmínky jejího radioaktivního značení indiem (¹¹¹In) a ytriem (⁹⁰Y). Bylo zjištěno, že protilátku lze označit oběma radionuklidy a po přečištění gelovou permeační chromatografií na Sephadexu G-50, je možné získat radioaktivně značený preparát s dostatečnou radiochemickou čistotou (obr. 4.45, 4.64). Byla vyvinuta metoda pro stanovení stability radioaktivně značené protilátky, dále byla sledována stabilita značené protilátky v přítomnosti vysoké koncentrace konkurenčního chelátoru (EDTA), a stabilita značené protilátky v potkaní plazmě s použitím gelové permeační chromatografie na koloně Bio-Sil SEC 250, 300×7,8 mm (Biorad) v HPLC systému Agilent 1100 Series.

Výsledky ukázaly, že samotná protilátka značená indiem uchovávaná při 35°C je velmi stabilní, poněvadž až do 48 hodin se uvolní řádově jen několik málo procent radionuklidu v nízkomolekulární formě (obr. 4.46-4.51). Ani přítomnost několikanásobně vyšší koncentrace konkurenčního chelátoru EDTA příliš neovlivňuje radiochemickou čistotu značené protilátky. Po 48 hodinách zůstává přes 90% aktivity vázáno na protilátce

(obr. 4.52-4.57). Profily radiochromatogramů při studiu stability značené protilátky v plazmě ukazují na přítomnost další vysokomolekulární formy, která se za daných podmínek nepodařila úplně oddělit, procentuální zastoupení radioaktivity v této formě postupně narůstá (obr. 4.58-4.63). Může se jednat například o postupnou transchelaci india na transferin.

Naproti tomu vazba yttria na tuto protilátku nebyla příliš pevná, což ukazují výsledky analýzy radiochemické čistoty samotného preparátu v krátkém čase po přečištění gelovou permeační chromatografií na sephadexu (obr. 4.65-4.70). Tento fakt potvrzují i výsledky stanovení stability značené protilátky v prostředí vysoké koncentrace konkurenčního chelátoru EDTA a v plazmě, které ukazují na rychlý nárůst koncentrace nízkomolekulární formy v čase (obr. 4.71-4.82).

Ve všech případech byla prováděna také ITLC-SG analýza, jejíž výsledky korespondují s výsledky získanými HPLC analýzou (tabulky 4.3-4.8).

5.4. Biodistribuční studie

Výsledky biodistribučních studií značených cyklických BFC byly velmi podobné pro všechny studované látky. Po intravenózní aplikaci značených BFC potkanům dochází k rychlé eliminaci radioaktivity z krve a většiny orgánů a tkání přes ledviny do moči (obr. 4.83). V žádném ze sledovaných orgánů a tkání nedocházelo ke specifickému vychytávání a kumulaci radioaktivity. Pouze malé množství z aplikované aktivity bylo detekováno v gastrointestinálním traktu. Všechny studované komplexy analogů DOTA měly biodistribuční profily srovnatelné s $^{111}\text{In-H4dota}$ komplexem. Speciální pozornost byla věnována vychytávání radioaktivity v kostech, protože derivatizace H4dota fosfinovými skupinami mohla teoreticky zvyšovat kumulaci značených komplexů v této oblasti. Tato skutečnost se nepotvrdila a žádná podstatná kumulace radioaktivity v kostech nebyla pozorována. Při celkovém zhodnocení získaných výsledků lze říci, že studované deriváty DOTA a jejich komplexy jsou vhodnou alternativou k běžně používané H4dota a jejím komplexům.

Biodistribuční studie značených acyklických BFC, intravenózně aplikovaných potkanům, ukazovaly rychlou eliminaci radioaktivity z krve a většiny orgánů a tkání podobně jako u cyklických BFC (obr. 4.84). V počátečních časových intervalech se aktivita přechodně hromadila v ledvinách a játrech, následně pak byla částečně vylučována močí a částečně hepatobiliární cestou do střev a poté eliminována z těla stolicí. V žádném ze sledovaných orgánů a tkání nedocházelo k dlouhodobé kumulaci radioaktivity. Všechny

studované látky měly srovnatelné biodistribuční profily s výjimkou toho, že u komplexu ^{111}In -Amino-B2M3-B byla významně snížena hepatobiliární eliminace.

Distribuční studie radioaktivně značených peptidů ukazovaly u všech studovaných látek rychlou krevní clearance. Po aplikaci potkanům docházelo k vychytávání a kumulaci aktivity především v ledvinách, receptorově bohatých orgánech (pankreatu a nadledvinkách) a u jodovaných látek byla v delších časových intervalech pozorována výrazná kumulace radioaktivity ve štítné žláze (obr. 4.85-4.90). Vychytávání a zadržování radioaktivity v nadledvinkách a pankreatu je způsobeno interakcí značených peptidů se specifickými somatostatinovými receptory, které zprostředkovávají internalizaci značených peptidů pomocí endocytózy. Také v ledvinách jsou značené peptidy po glomerulární filtraci částečně internalizovány pomocí endocytózy zprostředkované megalin/kubillinovým systémem^{247,248}. V obou případech jsou následně značené peptidy transportovány do lysozomů, kde jsou rozštěpeny pomocí proteolytických enzymů²². Štěpy jodovaných peptidů jsou externalizovány jak z receptorově bohatých orgánů, tak z ledvin a jsou eliminovány do moči. Nízkomolekulární jodované rozkladné produkty (jodid, jodovaný tyrosin, apod.) se hromadí ve štítné žláze a postupně jsou eliminovány také do moči. Naproti tomu degradační produkty peptidů značených kovovými radionuklidy (značených chelátor, případně chelátor s částí sekvence aminokyselin) nejsou schopny přechodu přes stěnu lysozomů ani buněčnou membránu (externalizace) a zůstávají tak v receptorově bohatých orgánech i ledvinách dlouhou dobu po aplikaci²⁴. Tato zjištění jsou plně v souladu s výsledky získanými HPLC analýzou močí značených peptidů.

Výsledky biodistribučních studií byly porovnávány s ^{111}In -DTPA-octreotidem (octreoscan), látkou rutinně používanou v klinické praxi. Při porovnání se značenými DOTA-Tyr³-tátem, glu-DOTA-Tyr³-tátem i DOTA-NOC byla u těchto látek pozorována výrazně vyšší kumulace radioaktivity v receptorově bohatých orgánech (nadledvinky, pankreas). Ostatní biodistribuční charakteristiky byly srovnatelné.

Podobně jako u značených bifunkčních chelátorů a peptidů, byly prováděny biodistribuční studie také u značené protilátky. Vzhledem k tomu, že se jednalo o humánní protilátku, která byla po označení aplikována potkanům, jde u těchto studií nikoliv o potvrzení distribuce do místa zájmu, ale sleduje se, zda nedochází k nežádoucí kumulaci případných degradačních produktů do některého orgánu, kde by působily vedlejší účinky.

6 ZÁVĚR

Při celkovém zhodnocení výsledků chelatačních vlastností studovaných derivátů DOTA a DTPA se ukázalo, že kinetika tvorby komplexů některých chelátorů s indiem-111 je rychlejší a umožňuje chelátování kovových radionuklidů při teplotě příznivější pro proteinové struktury. Potvrdilo se, že hledání nových struktur, analogů DOTA i DTPA se ubírá správným směrem.

Studium radioaktivního značení nových derivátů somatostatinu ukázalo možnost jejich označení kovovými radionuklidy i jodem-125 s vysokou radiochemickou čistotou. Porovnání jejich biodistribučních vlastností ukázalo podstatně vyšší afinitu k příslušným receptorům, než vykazuje standardní látka Octreoscan. Získání jodované struktury z této skupiny peptidů potvrdilo jejich předpokládané transportní mechanismy v biologickém systému.

Radioaktivní značení protilátky antiCD66 (a,b,c,e) modifikované cyklickým i acyklickým ligandem potvrdilo výsledky studia komplexačních vlastností některých studovaných chelátorů. Ukázalo se, že protilátku lze označit s vysokou radiochemickou čistotou indiem-111 i ytriem-90, avšak vazba yttria-90 nebyla příliš pevná. V tomto případě, kdy zamýšlené použití značené protilátky je v radioimunoterapii u pacientů s akutní myeloidní leukémií a myelodysplastickým syndromem, a místem účinku je tedy kostní dřeň, by labilita vazby yttria-90 nemusela příliš vadit.

Pro všechny značené látky byly vyvinuty analytické metody pro kontrolu jejich radiochemické čistoty. S výhodou byly používány především RP-HPLC s radioaktivní detekcí a instantní tenkovrstvá chromatografie (ITLC-SG), a v případě značených protilátek i gelově permeační chromatografie.

Závěrem lze říci, že vytyčené cíle byly splněny.

7 Souhrn

Předložená disertační práce se zabývá optimalizací podmínek přípravy a analýzy radioaktivně značených biologicky aktivních látek. Teoretická část je věnována popisu jednotlivých složek (radionuklidy, bifunkční chelátory a biologicky aktivních látky) většiny receptorově specifických radiofarmak. Dále jsou pak v této části disertační práce popsány základní metody radioaktivního značení biologicky aktivních látek a některé analytické metody běžně používané k přečištění a kontrole kvality značených látek.

Experimentální část disertační práce lze rozdělit na tři hlavní části. První z nich se týkala nalezení optimálních podmínek radioaktivního značení bifunkčních chelátorů ze skupiny derivátů DTPA a DOTA. Všechny studované látky byly radioaktivně označeny s vysokou radiochemickou čistotou. Pro kontrolu radiochemické čistoty byly vyvinuty metody s využitím tenkovrstvé chromatografie (ITLC-SG) a HPLC. Další část experimentální práce byla věnována přípravě radioaktivně značených receptorově specifických peptidů, analogů somatostatinu. Celkem byly studovány tři peptidy (DOTA-Tyr³-oktreotát, DOTA-NOC, glu-Tyr³-oktreotát), které byly označeny různými radionuklidy (¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y a u struktur obsahujících tyrosinovou skupinu i ¹²⁵I). Pro značené peptidy byly vyvinuty analytické metody (HPLC a ITLC-SG) vhodné pro stanovení jejich radiochemické čistoty a stability, dále byl prostřednictvím vyvinutých metod studován metabolismus značených peptidů analýzou potkaní moči získané v různých časových intervalech. Tyto výsledky byly porovnány se závěry biodistribučních a eliminačních studií. V poslední části experimentální práce byly studovány podmínky radioaktivního značení protilátky modifikované cyklickým i acyklickým chelátorem. Protilátka byla označena jak ¹¹¹In, tak ⁹⁰Y a byly vyvinuty analytické metody (SEC, HPLC, ITLC-SG) vhodné k přečištění a stanovení radiochemické čistoty značené protilátky. Radioaktivně značená protilátka modifikovaná cyklickým chelátorem byla podrobena studiu stability v různých prostředích (pufr, přítomnost vysoké koncentrace konkurenčního chelátoru a plazma).

Všechny značené látky byly aplikovány potkanům a byly u nich provedeny biodistribuční a eliminační studie, které provedli pracovníci katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK z oddělení radiofarmacie.

Dosažené výsledky jsou součástí projektů v rámci dlouhodobé spolupráce s katedrou anorganické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, firmou Azacycles s.r.o. a zahraničními pracovišti spolupracujícími v rámci programů řízených Mezinárodní agenturou pro atomovou energii (IAEA) ve Vídni a projektu COST B12 EU.

8 Summary

The presented dissertation thesis is dealing with an optimization of the conditions of preparation and analysis of the radiolabelled biologically active compounds. Theoretical part consists of a description of particular components of the most receptor specific radiopharmaceuticals such as radionuclides, bifunctional chelators and biologically active compounds. Further in this part of dissertation thesis the main methods of the biologically active compounds radiolabelling and chosen analytical methods usually used for purifying and quality control of the labelled compounds are described.

The experimental part of the dissertation thesis may be divided into three main parts. First part has been focused on searching for the optimal conditions for the radiolabelling of the bifunctional chelators belonging to the group of DTPA and DOTA analogues. All studied compounds have been radiolabelled with high radiochemical purity. The methods for quality control of their radiochemical purity using thin layer chromatography (ITLC-SG) and HPLC have been developed. The other part of the experimental work is dedicated to preparation of the radiolabelled receptor specific peptides, analogues of somatostatin. Three peptides have been studied (DOTA-Tyr³-octreotate, DOTA-NOC, glu-Tyr³-octreotate) which were radiolabelled with different radionuclides (¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ⁹⁰Y and peptides containing tyrosine group also with ¹²⁵I). The analytical methods (HPLC and ITLC-SG) suitable for a determination of the radiochemical purity and stability of the labelled peptides have been developed. The metabolism of labelled peptides has been studied through those developed methods by analysis of the rat's urine obtained in different time intervals. The results were compared with conclusions of the biodistribution and elimination studies. In the last part of the experimental work the conditions of the antibody radiolabelling modified by cyclic and acyclic chelator have been studied. The antibody has been managed to label with ¹¹¹In and also with ⁹⁰Y, the analytical methods (SEC, HPLC, ITLC-SG) suitable for purifying and determination of the radiochemical purity of labelled antibody have been developed. The stability of radiolabelled antibody modified by cyclic chelator has been studied in different media (buffer, a presence of the competitive chelator in high concentration and plasma).

All labelled compounds were applied to the rats and the biodistribution and elimination studies were completed by the employees of Department of Pharmacology and Toxicology of Faculty of Pharmacy of the Charles University from Radiopharmacy section.

Obtained results take a part in the projects within the long-term cooperation with Department of Inorganic Chemistry of Faculty of Natural Sciences of the Charles University, Azacycles s.r.o. company and foreign workplaces cooperating within the programs operated by International Atomic Energy Agency (IAEA) in Vienna and within project COST B12 EU.

9 Přílohy

9.1. Přehled publikovaných prací

9.1.1. Články

1. Lázníčková A., Petřík M., Hermann P., Lukeš I.: Labelling of a bifunctional monophosphinic acid DOTA analogue with In-111: radiochemical aspects and preclinical results. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **273**, 583-586 (2007)
2. Trejtnar F., Lázníček M., Lázníčková A., Kopecký M., Petřík M., Behe M., Schmidt J., Mäcke H.R., Maina T., Nock B.: Bioistribution and elimination characteristics of two ¹¹¹In-labelled CCK-2/gastrin receptor specific peptides in rats. *Anticanc. Res.* **27**, 907-912 (2007)
3. Petřík M., Lázníčková A., Lázníček M., Zalutsky M.R.: Radiolabelling of glucose-Tyr³-octreotate with ¹²⁵I and analysis of its metabolism in rats: comparison with radiolabelled DOTA-Tyr³-octreotate. *Anticanc. Res.* **27**, 3941-3946 (2007)
4. Lázníček M., Lázníčková A., Trejtnar F., Melicharová L., Cihlo J., Petřík M.: Preclinical comparison of DOTA-Tyr³-octreotate labelled with different radionuclides. *Comparative Evaluation of Therapeutic Radiopharmaceuticals, Technical reports series 458*, 73-86 (2007)
5. Försterová M., Petřík M., Lázníčková A., Lázníček M., Hermann P., Lukeš I., Melichar F.: Complexation and biodistribution study of ¹¹¹In and ⁹⁰Y complexes of bifunctional phosphinic acid analogues of H₄dota. (odesláno *Appl. Rad. Isot.* 2008)
6. Trejtnar F., Lázníčková A., Petřík M., Melicharová L., Vaňková M., Lázníček M.: In vitro comparison of renal handling and uptake of two somatostatin receptor-specific peptides labeled with indium-111. (odesláno *Ann. Nucl. Med.* 2008)
7. Cihlo J., Melicharová L., Petřík M., Lázníčková A., Lázníček M.: Comparison of ¹¹¹In-DOTA-NOC and ¹¹¹In-DOTA-TATE distribution in the target and dose-limiting tissues: Conflicting results *in vitro* and *in vivo*. (odesláno *Anticanc. Res.* 2008)

9.1.2. Abstrakty a postery

1. Lázníčková A., Petřík M., Melicharová L., Lázníček M., Zalutsky M.R.: Preclinical pharmacokinetic comparison of glucose-125I- Tyr³-octreotate with DOTA-125I-Tyr³-octreotate. *Eur. J. Nucl. Med.* **33**, 307 (2006)
2. Cihlo J., Lázníček M., Petřík M.: Comparison of the kidney uptake of two somatostatin analogues labelled with In-111. *Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology, Seoul, Korea* (2006)

3. Decristoforo C., Petrik M., Von Guggenberg E., Carlsen J., Huisman M., Wester H. J., Virgolini I., Haubner R.: ⁶⁸Ga-Labelled RGD-peptides for imaging $\alpha v\beta 3$ integrin expression. *International Symposium on Radiopharmaceutical Science, Aachen, Germany* (2007)
4. Petřík M., Lázníčková A., Polášek M., Hermann P., Lukeš I. and Lázníček M.: Labelling of a bifunctional pyridinoxide derivative of dota with In-111 and Y-90: radiochemical aspects and preclinical results. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **34**, 334 (2007)
5. Lázníčková A., Petřík M., Melicharová L., Lázníček M., Zalutsky M.R.: Preclinical study glucose-Tyr³-octreotate: comparison with ¹¹¹In-DOTA-Tyr³-octreotate. *International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals, Vienna, Austria* (2005)
6. Petřík M., Lázníčková A., Lázníček M.: Značení receptorově specifického peptidu DOTA-Tyr³-oktreotátu indiem-111 a jodem-125 a analýza jeho metabolitů v moči. *Konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice, Česká republika* (2006)
7. Lázníčková A., Lázníček M., Syrovátka M., Petřík M., Maecke H. R.: DOTA-Tyr³-Octreotate labelled with radiometals or radiohalogen: labelling procedure and analysis of pharmacokinetics in rats. *Nucl. Med. Rev.* **8**, 22-23 (2005)
8. Försterová M., Zimová J., Petřík M., Lázníček M., Lázníčková A., Hermann P., Melichar F.: Complexation and biodistribution study of ¹¹¹In complexes of bifunctional phosphinic acid analogues of H₄dota. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **34**, 337 (2007)
9. Lázníčková A., Petřík M., Hermann P., Lukeš I.: Labelling of a bifunctional monophosphinic acid DOTA analogue with In-111: radiochemical aspects and preclinical results. *International Nuclear Chemistry Congress, Kusadasi, Turecko* (2005)
10. Melicharová L., Lázníček M., Lázníčková A., Petřík M.: Afinita receptorově specifických peptidů ¹¹¹In-DOTA-NOC a ¹¹¹In-DOTA-TATE k somatostatinovým receptorům in vivo a in vitro. *Farmakologické dny, Olomouc, Česká republika* (2007)
11. Lázníčková A., Lázníček M., Petřík M.: Analysis of metabolism of some radiolabelled somatostatin receptor specific peptides in rats. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **34**, 335 (2007)

9.2. Potvrzení o absolvování studijního pobytu v Rakousku



Tiroler Landeskrankenstalten Ges.m.b.H.
Landeskrankenhaus - Universitätskliniken - Innsbruck
Universitätsklinik für Nuklearmedizin
Anichstrasse 35, A-6020 Innsbruck
Vorständin: O. Univ.-Prof. Dr. Irene Virgolini
Tel.: +43-512-504/22651, Fax: +43-512-504/22659
email: Nuklearmedizin@uibk.ac.at



Innsbruck 21.12.06

Confirmation for

Milos Petrik
Charles University in Prag,
Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove,
Czech Republic

Hereby we confirm that Mr MILOS PETRIK has stayed in our department from October 9th – January 2nd 2006/2007 and has studied the radiolabelling of peptides for Nuclear Medicine applications including the use of ⁶⁸Ga-generators, labelling with ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu and ^{99m}Tc as well as analysis of radiolabelled peptides using HPLC, TLC and Solid Phase extraction under the supervision of Doz.Dr.Clemens Decristoforo, radiopharmacist at our department. He was involved in peptide synthesis, purification and analysis for use as radiopharmaceutical precursors as well as in vitro and in-vivo biological evaluation of radiolabelled peptides (protein binding, log P, internalisation and binding studies on receptor positive cells, biodistribution studies in tumour models).

Additionally he has gained experience in the preparation, radiation protection and quality control of clinically applied radiopharmaceuticals (PET, SPECT and therapy), aseptic preparation techniques and clinical use of radiopharmaceuticals.

Univ. Prof. Dr. Irene VIRGOLINI
(Head of department)

Univ. Doz. Dr. Clemens Decristoforo
(Radiopharmacist)

Univ. Doz. Dr. Clemens Decristoforo
Universitätsklinik für Nuklearmedizin
Anichstrasse 35, 6020 Innsbruck

9.3. Petřík M., Lázníčková A., Lázníček M., Zalutsky M.R., *Anticancer Research* 27, 3941-3946 (2007)

ANTICANCER RESEARCH 27: 3941-3946 (2007)

Radiolabelling of Glucose-Tyr³-octreotate with ¹²⁵I and Analysis of Its Metabolism in Rats: Comparison with Radiolabelled DOTA-Tyr³-octreotate

MILOŠ PETRIK¹, ALICE LAZNICKOVA¹, MILAN LAZNICEK² and MICHAEL R. ZALUTSKY³

Departments of ¹Biophysics and Physical Chemistry and ²Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; ³Department of Radiology, Duke University Medical Center, Box 3808, Durham, North Carolina, 27710 U.S.A.

Abstract. Background: Somatostatin analogues labelled with radiometals or radiohalogens are useful for the imaging and treatment of somatostatin receptor-containing tumours. In this study, the procedures for the radioiodination of glucose-Tyr³-octreotate (gluc-Tyr³-tate) and radiolabelling of DOTA-Tyr³-octreotate (DOTA-Tyr³-tate) with ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu and ¹²⁵I were compared and their metabolism in rats was analyzed. The usefulness of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis and instant thin-layer chromatography on silica gel (ITLC-SG) for both radiochemical purity determination and analysis of metabolism in urine was investigated. Materials and Methods: For labelling with radiometals, the formation of a complex with the 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) functionality of the peptide was employed. Radioiodination was performed by the chloramine-T method. The radiochemical purity of radiolabelled peptides and the analyses of rat urine were determined by HPLC and/or ITLC-SG methods. Male Wistar rats were used in the elimination studies. Results: DOTA-Tyr³-tate was simply radiolabelled with radiometals with high yield and high radiochemical purity. Stopping of the reaction was a critical step for radioiodination, therefore labelling of gluc-Tyr³-tate and DOTA-Tyr³-tate with ¹²⁵I was not so simple and the reaction product had to be purified by preparative HPLC analysis. Whereas ¹¹¹In-DOTA-Tyr³-tate and ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tyr³-tate were eliminated in rat urine in a practically unchanged form, a significant proportion of metabolites was observed with radioiodinated peptides,

particularly at longer time intervals. Conclusion: Labelling of DOTA-Tyr³-tate with radiometals is simple and the radiochemical purity of prepared compounds is very high, while iodination of the peptides demands purification of the product by preparative HPLC. The analysis of rat urine showed that excretion of radioiodinated peptides included a significant proportion of metabolites.

Radiolabelled biomolecules are used in nuclear medicine for both the diagnosis and treatment of many diseases (1, 2). Radiopharmaceuticals with affinity towards specific receptors are mostly derived from biopolymers or their simpler building elements, such as polypeptides, antibodies and oligonucleotides. A large number of peptides have been found which can be used not only for diagnosis, but also for therapy in many pathological cases (1-3). Neuropeptides, especially analogues of somatostatin, are a very important group of such compounds. Receptors of somatostatin are localized on the cell membrane of tumours of endocrine origin, but also are present on other tumours under endocrine control (4-6). Somatostatin, an endogenous tetradecapeptide, acts both as a secretion inhibitor of growth hormone and as an inhibitor of growth of several tumours. Radiolabelled somatostatin is unsuitable for clinical application because of its very short biological half-life, which is why multiple synthetic somatostatin derivatives with a similar bioactive amino acid sequence have been developed (7, 8). DOTA-Tyr³-octreotate (DOTA-Tyr³-tate) is a somatostatin analogue with a very high affinity towards the somatostatin receptor subtype2 (sstr₂), which is abundant in the majority of endocrine tumours (9). The macrocyclic chelator 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) is able to bind different radiometals (radioindium, radioyttrium, radioactive lanthanides and others), while including tyrosine in the peptide structure allows labelling with radioiodine (10-12). Recent studies have shown that conjugation of glucose to the Tyr³-octreotate core increased internalization activity insstr₂

Correspondence to: Assoc. Prof. Ing. Alice Laznickova, CSc., Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Heyrovského 1203, CZ-500 05, Hradec Kralove, Czech Republic. Tel: +420495067478, Fax: +420495067160, e-mail: laznicko@faf.cuni.cz

Key Words: Somatostatin peptide analogues, radiolabelling, radiochemical purity, metabolism.

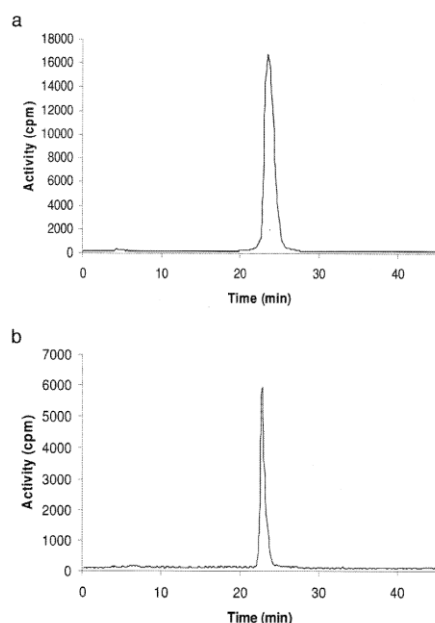


Figure 1. Examples of HPLC analysis of radiochemical purity. a: ^{111}In -DOTA-Tyr³-octreotate. b: ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-octreotate.

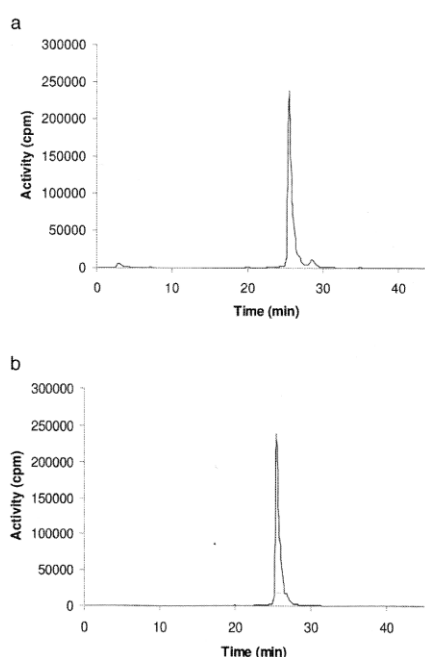


Figure 2. Examples of HPLC analysis of radiochemical purity. Glucose- ^{125}I -Tyr³-octreotate before (a) and after (b) purification of the reaction product by preparative HPLC. DOTA- ^{125}I -Tyr³-octreotate had a similar profile.

expressing cell lines (13). The aims of this study were to compare the procedures for the radioiodination of glucose-Tyr³-octreotate (gluc-Tyr³-tate) and radiolabelling of DOTA-Tyr³-tate with ^{111}In (used for diagnosis), ^{177}Lu (used for cancer treatment) and ^{125}I (used for diagnostics and therapy) and to evaluate the methods of analysis of the labelled agents and their metabolites in urine.

Materials and Methods

Materials and reagents. The gluc-Tyr³-tate was synthesized at Duke University Medical Center as described previously (13). The DOTA-Tyr³-tate was prepared by piCHEM Research and Development, Graz, Austria. All other chemicals used were purchased from commercial sources. For high performance liquid chromatography (HPLC) analysis a Pharmacia-LKB system with Gradient Master GP 962 (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague, Czech Republic) equipped with a LichroCART 125-4 or 250-4 HPLC Cartridge Lichrospher RP C18e, 5 μm (Merck, Darmstadt, Germany) and with a radioactivity monitoring analyzer was used. An automatic gamma counter (1480 WizardTM 3rd, Wallac, Finland) was used for counting the fractions on HPLC analysis of the rat urine. Instant thin-layer chromatography on silica gel (ITLC-SG) was performed on commercial silica gel impregnated glass fiber sheets (Gelman Sciences, Michigan, USA). Detection of the ITLC-SG strips was carried out by a TLC-analyzer (Raytest, Straubenhardt, Germany).

Table 1. Radioactivity elimination by urine after radiolabelled gluc-Tyr³-tate and DOTA-Tyr³-tate administration to rats (% of administered dose).

Agent	0-2 h	2-24 h
^{111}In -DOTA-Tyr ³ -tate	60.5 \pm 12.2	7.0 \pm 1.2
^{177}Lu -DOTA-Tyr ³ -tate	45.8 \pm 10.2	7.7 \pm 2.0
DOTA- ^{125}I -Tyr ³ -tate	39.0 \pm 20.7	19.6 \pm 2.8
gluc- ^{125}I -Tyr ³ -tate	21.9 \pm 11.5	36.6 \pm 5.1

Preparation of ^{111}In -DOTA-Tyr³-tate. Two hundred μl of 0.4 M acetate buffer (pH=5) with 0.24 M gentisic acid, 10 μg DOTA-Tyr³-tate in 10 μl of H₂O and 0.5 mCi $^{111}\text{InCl}_3$ in 0.04 M HCl were successively added to a vial. The solution was well mixed and then incubated at 90-95 $^\circ\text{C}$ for 25 min.

Preparation of ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-tate. Two hundred μl of 0.4 M acetate buffer (pH=5) with 0.24 M gentisic acid, 10 μg DOTA-Tyr³-tate in 10 μl of H₂O and 1 mCi $^{177}\text{LuCl}_3$ in 0.05 M HCl were successively added to a vial. The solution was well mixed and then incubated at 90-95 $^\circ\text{C}$ for 25 min.

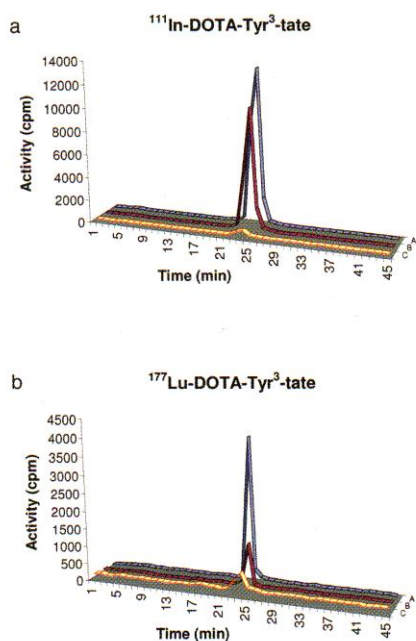


Figure 3. Examples of HPLC analysis. a: diluted standard of ^{111}In -DOTA-Tyr³-tate (A), rat urine 2 hours (B) and 24 hours (C) after injection. b: diluted standard of ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-tate (A), rat urine 2 hours (B) and 24 hours (C) after injection.

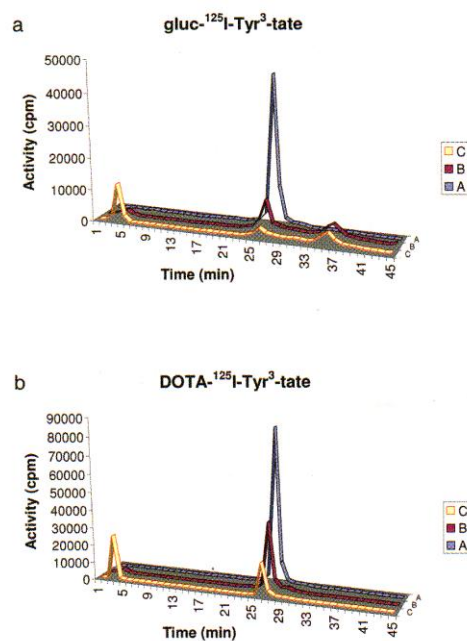


Figure 4. Examples of HPLC analysis. a: diluted standard of gluc- ^{125}I -Tyr³-tate (A), rat urine 2 hours (B) and 24 hours (C) after injection. b: diluted standard of DOTA- ^{125}I -Tyr³-tate (A), rat urine 2 hours (B) and 24 hours (C) after injection.

Preparation of gluc- ^{125}I -Tyr³-tate and DOTA- ^{125}I -Tyr³-tate. Fifty μl of 0.05 M phosphate buffer (pH=7.4), 5 μg gluc-Tyr³-tate or DOTA-Tyr³-tate in 5 μl of 0.05M acetic acid and 0.4 mCi Na ^{125}I were mixed and then 2.5 μg of chloramine T in 2.5 μl of the same 0.05 M phosphate buffer (pH=7.4) was added. After 60 sec reaction at room temperature, the mixture was diluted by the addition of 40 μl of ethanol and after that, the solution was injected onto the HPLC system.

HPLC analysis. The radiochemical purity of the peptides labelled with radiometals was determined by reverse phase HPLC analysis using a LichroCART 125-4 HPLC Cartridge Lichrospher RP C18e, 5 μm and gradient elution with 0.1% trifluoroacetic acid as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. The gradient sequence was 0-5 min 0% B, 5-25 min 0-30% B, 25-30 min 30% B, 30-35 min 30-100% B, 35-40 min 100% B and 40-45 min 100-0% B. The flow rate was 0.5 ml/min.

For the radioiodinated peptides, reverse phase HPLC analysis was conducted on a LichroCART 250-4 HPLC Cartridge Lichrospher RP C18e, 5 μm . Gradient elution with 0.1 M NaCl as mobile phase A and 95% ethanol as mobile phase B was employed for purification of the product. The gradient was 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 and 40-45 min 100-0% B at a flow rate of 1 ml/min. In addition to detecting radioactivity on line, fractions were taken at

1 minute intervals to analyze radioactivity at the peaks. The mobile phase of the fractions containing gluc-Tyr³- ^{125}I -tate or DOTA-Tyr³- ^{125}I -tate was evaporated at 37 °C under a gentle stream of nitrogen and the residue was diluted with saline.

The analysis of rat urine after the injection of the labelled peptides was performed under the same conditions, except that a new column of the same size was used and fractions were taken at 1 minute intervals. These fractions were analyzed on the automatic gamma counter.

ITLC-SG analysis. ITLC-SG analysis was used for the rapid evaluation of the purity of peptides labelled by ^{111}In and ^{177}Lu . ITLC-SG chromatography was performed on silica gel impregnated glass fiber sheets with 10% ammonium acetate and methanol 1:1 as the eluent. In this system, the labelled peptide moves with the solvent front and unbound radiometal remains at the start of the chromatogram. A 1 μl aliquot of labelled peptide was evaluated on each ITLC-SG strip. After elution, the ITLC-SG strips were counted by the TLC-analyzer.

Biological experiments. Male Wistar rats weighing 200-250 g (each experimental group consisted of four animals) were used in the elimination studies and 0.2 ml of radiopharmaceutical (0.8-1 μg of the peptide per kg of body weight) was injected into the tail vein. Each rat was placed in a separate glass metabolic cage. The urine

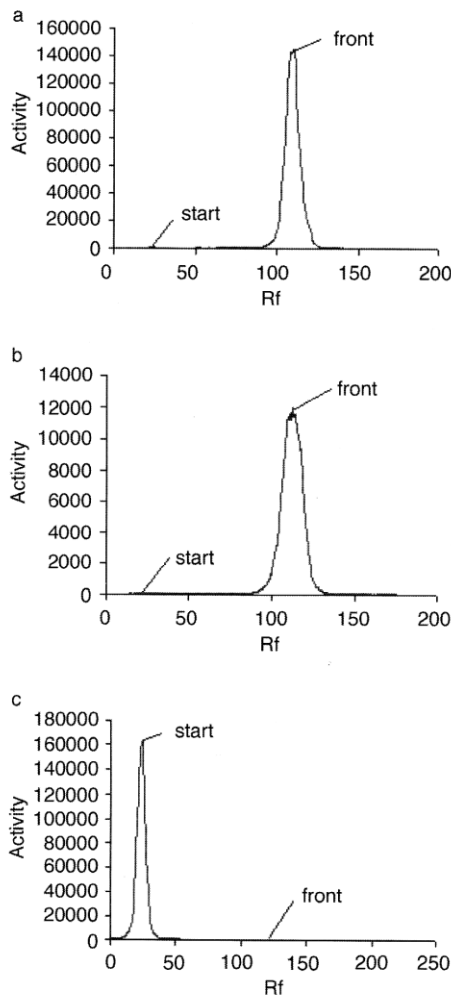


Figure 5. Examples of ITLC-SG analysis. a: ^{111}In -DOTA-Tyr³-tate, b: ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-tate, and c: free radiometal (^{111}In , ^{177}Lu).

was collected 2 h and 24 h after the injection. Handling (immobilization) was used for emptying the urinary bladders of the animals at the above mentioned intervals. All urine eliminated in time intervals 0-2 h and 2-24 h was used for subsequent analysis.

All animal experiments were approved by the Ethics Commission of the Faculty of Pharmacy, Charles University.

Plasma protein binding. The binding of radiolabelled peptides to rat plasma was determined by equilibrium dialysis at 37°C (14). Plasma was obtained by centrifugation of heparinized rat blood. 0.5 ml of plasma was dialysed against the same volume of saline

Table II. Free fraction of the peptides in rat plasma determined by equilibrium dialysis at 37°C.

Agent	Free fraction in rat plasma (%)
^{111}In -DOTA-Tyr ³ -tate	77.3±1.0
^{177}Lu -DOTA-Tyr ³ -tate	82.5±1.5
DOTA- ^{125}I -Tyr ³ -tate	58.6±7.1
gluc- ^{125}I -Tyr ³ -tate	44.4±1.5

buffered with 0.01 mol/l phosphate (pH=7.4) with the peptide at the initial concentration of 1 ng/ml for 16 hours.

Statistical analysis. Statistical analysis was carried out with Student's unpaired *t*-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Radiochemical purity of labelled peptides. DOTA-Tyr³-tate was labelled easily with ^{111}In and ^{177}Lu with high radiochemical purity (more than 98%, Figures 1a and b). Labelling of gluc-Tyr³-tate and DOTA-Tyr³-tate by oxidative iodination (^{125}I) was simple, but a problematic aspect was the termination of the reaction, because the reducing agents used routinely to accomplish this may also break down the disulfide bridge of the peptide. For that reason, the reaction product after radioiodination was purified by preparative HPLC before its use (Figure 2a and b). The HPLC purification method was able to separate various forms of the radioiodinated peptide.

Elimination of radioactivity via the urine after intravenous administration to rats. The excretion of radioactivity in the urine during the time intervals 0-2 h and 2-24 h after administration of the labelled peptides is presented in Table I. Urinary excretion was the main elimination pathway for these radiopharmaceuticals and renal excretion of radioactivity was relatively rapid.

The proportion of radioactivity excreted by the urine in the time interval 0-2 h after gluc- ^{125}I -Tyr³-tate administration was significantly lower than those for the other radiometal-labelled peptides. No significant differences in cumulative radioactivity elimination between the agents under study in the time interval 0-24 h were found, however.

HPLC analysis of rat urine. HPLC analysis of the rat urine 2 hours and 24 hours after ^{111}In -DOTA-Tyr³-tate and ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-tate injection indicated that elimination of the parent peptides was the predominant process. In contrast, a significant proportion of the radioactivity present in the rat urine 2 hours and 24 hours after gluc- ^{125}I -Tyr³-tate and DOTA- ^{125}I -Tyr³-tate injection was determined to be in the form of metabolites.

Substantial differences in the proportion of metabolites found in the urine between peptides labelled with ^{125}I and those labelled with radiometals are shown in Figures 3 and 4. Whereas only traces of metabolites after application of radiometal-labelled compounds were detected in the urine, after DOTA- ^{125}I -Tyr 3 -tate administration, up to 50% of the eliminated radioactivity was in the form of degradation products. In the case of gluc- ^{125}I -Tyr 3 -tate, most of the eliminated radioactivity (65-75%) in urine was found as breakdown products.

ITLC-SG analysis. ITLC-SG analysis showed very high purity of DOTA-Tyr 3 -tate labelled with radiometals. The radiochemical purity determined by this method was greater than 98%, identical to the results measured by HPLC (Figure 5).

Plasma protein binding. The reversible binding of the four radiolabelled peptides to rat plasma proteins was evaluated by equilibrium dialysis. The free peptide fractions are compared in Table II. The free fractions for the two radiometal labelled peptide conjugates were similar and significantly higher ($p < 0.05$) than those for either of the radioiodinated peptides. Furthermore, the free fraction for the radioiodinated peptide containing the more polar DOTA prosthetic group was significantly higher than that observed for the glycosylated peptide conjugate.

Discussion

HPLC is probably the most accurate and sensitive method for an analysis of the purity of radiolabelled octreotate analogues. This method is, however, frequently not available for routine analysis of radiolabelled receptor specific peptides in departments of nuclear medicine, particularly in countries such as the Czech Republic. For this reason, ITLC-SG analysis is usually used as a quicker and simpler alternative to HPLC. In the present study ITLC-SG with HPLC of the four labelled peptides was compared. ITLC-SG analysis showed very high purity of the DOTA-Tyr 3 -tate labelled with radiometals. The radiochemical purity was higher than 98%, identical to the results obtained by HPLC analysis. On the other hand, ITLC-SG analysis of the radioiodinated peptides would not be a very useful alternative to HPLC because of its inability to separate labelled peptide from chemically similar byproducts.

In evaluating the renal excretion of the 4 labelled peptides, it was found that the iodinated peptides were eliminated into the urine more slowly than the peptides labelled with radiometals and the gluc- ^{125}I -Tyr 3 -tate was the slowest. This finding was in agreement with the higher lipophilicity of iodinated compounds, gluc- ^{125}I -Tyr 3 -tate being the most lipophilic. Another consequence of higher

lipophilicity is higher plasma protein binding of the compound, and our results were again consistent with this. Because of their molecular size, the four peptides under study are thought to be eliminated from the blood predominantly by glomerular filtration in the kidney. Considering that the renal elimination rate is a product of the glomerular filtration rate and the free drug fraction in the plasma, higher plasma binding (lower free fraction) results in slower renal elimination rate of the agent.

The difference in the proportion of activity present as metabolites in urine between iodinated peptides and DOTA-Tyr 3 -tate labelled with radiometals probably reflected the different handling of the peptides in the somatostatin receptor-rich organs and in the kidney. In the tissues with a high density of somatostatin receptors, labelled peptides are internalized by somatostatin receptor-mediated endocytosis. Also in the kidney, after glomerular filtration, the peptides would have been partly internalized by megalin/cubillin-mediated endocytosis in renal tubules (15, 16). In both types of tissues, the agents would have been subsequently transferred into the lysosomes, wherein they would have been degraded by proteolytic enzymes (17). The degradation products of iodinated DOTA-Tyr 3 -tate (free iodide and/or iodinated tyrosine and/or other iodinated fragments) were externalized from somatostatin receptor-rich tissues and from the kidney and finally eliminated into urine, whereas the breakdown products of DOTA-Tyr 3 -tate labelled with radiometals are known to persist in receptor-rich tissues for a long time (18).

Conclusion

Labelling of DOTA-Tyr 3 -tate with radiometals is simple and the radiochemical purity of the labelled products is very high, while iodination of gluc-Tyr 3 -octreotate and DOTA-Tyr 3 -tate with ^{125}I is more complicated. Radiochemical purity determination by ITLC-SG was comparable to HPLC analysis for radiometal-labelling, but ITLC-SG analysis of radioiodinated peptides is not useful because of the limited ability to separate the desired labelled peptide from other labelled species. ^{111}In -DOTA-Tyr 3 -tate and ^{177}Lu -DOTA-Tyr 3 -tate were eliminated by rat urine mainly in an unchanged form, but with iodinated gluc-Tyr 3 -tate and DOTA-Tyr 3 -tate, a significant proportion of metabolites (iodide and/or iodinated fragments of the peptide) was observed.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mrs. J. Hoderova and Mrs. E. Teichmanova for their excellent technical assistance. The investigation was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No. 305/07/0535.

References

- 1 Heppeler A, Froidevaux S, Eberle AN and Maecke HR: Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr Med Chem* 7: 971-994, 2000.
- 2 Riccabona G and Decristoforo C: Peptide targeted imaging of cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 18: 675-687, 2003.
- 3 Thakur ML: Radiolabelled peptides: now and the future. *Nucl Med Comm* 16: 724-732, 1995.
- 4 Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH *et al*: Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe1] and [¹²³I-Tyr³]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med* 20: 716-731, 1993.
- 5 Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Pauwels S, Kvols LK and Reubi JC: Somatostatin receptor scintigraphy. *In: Nuclear Medicine Annual*. Freeman LM (ed.). New York, Raven Press, pp. 1-50, 1995.
- 6 Reubi JC and Maurer R: Autoradiographic mapping of somatostatin receptors in the rat central nervous system and pituitary. *Neuroscience* 15: 1183-1193, 1985.
- 7 Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ and Pless J: SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 31: 1133-1140, 1982.
- 8 Lamberts SWJ, Krenning EP and Reubi JC: The role of somatostatin and its analogues in the diagnosis and treatment of tumours. *Endocr Rev* 12: 450-482, 1991.
- 9 Reubi JC, Waser B, Schaefer J and Laissue JA: Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med* 28: 836-846, 2001.
- 10 Rolleman EJ, Forrer F, Bernard B, Bijster M, Vermeij M, Valkema R, Krenning EP and De Jong M: Amifostine protects rat kidneys during peptide receptor radionuclide therapy with [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³]octreotate. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 34: 763-771, 2007.
- 11 Esser JP, Krenning EP, Teunissen JJM, Kooij PPM, Van Gametem ALH, Akker WH and Kwekkeboom DJ: Comparison of [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³]octreotate and [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³]octreotide: which peptide is preferable for PRRT? *Eur J Nucl Med Mol Imag* 33: 1346-1351, 2006.
- 12 Koukouraki S, Strauss LG, Georgoulas V, Eisenhut M, Heberkorn U and Dimitrakopoulou-Strauss A: Comparison of the pharmacokinetics of ⁶⁸Ga-DOTATOC and [¹⁸F]FDG in patients with metastatic neuroendocrine tumours schedule for ⁹⁰Y-DOTATOC therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 33: 1115-1121, 2006.
- 13 Vaidyanathan G, Friedman HS, Affleck DJ, Schottelius M, Wester HJ and Zalutsky MR: Specific and high-level targeting of radiolabelled octreotide analogues to human medulloblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* 9: 1868-1876, 2003.
- 14 Laznicke M and Senius KEO: Protein binding of tolfenamic acid in the plasma from patients with renal and hepatic disease. *Eur J Clin Pharmacol* 30: 591-596, 1986.
- 15 Melis M, Krenning EP, Bernard BF, Barone R, Visser TJ and De Jong M: Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Molec Imag* 10: 1136-1143, 2005.
- 16 De Jong M, Barone R, Krenning EP, Bernard B, Melis M, Visser TJ, Gekle M, Willnow TE, Walrand S, Jamar F and Pauwels S: Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of [¹¹¹In-DTPA-Octreotide]. *J Nucl Med* 10: 1696-1700, 2005.
- 17 Kwekkeboom DJ, Krenning EP and De Jong M: Peptide receptor imaging and therapy. *J Nucl Med* 41: 1704-1713, 2000.
- 18 Breeman WAP, De Jong M, Kwekkeboom DJ, Valkema R, Bakker WH, Kooij PPM, Visser TJ and Krenning EP: Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med* 28: 1421-1429, 2001.

Received July 5, 2007

Revised October 2, 2007

Accepted October 8, 2007

9.4. Lázníčková A., Petřík M., Hermann P., Lukeš I., *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 273, 583-586 (2007)

Labeling of a bifunctional monophosphinic acid DOTA analogue with ^{111}In : Radiochemical aspects and preclinical results

A. Laznickova,^{1*} M. Petřík,¹ P. Hermann,² I. Lukeš²

¹ Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Kralove, Czech Republic

² Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

(Received June 27, 2006)

The complex formation of the bifunctional monophosphinic acid DOTA analogue DO3AP^{ABn} (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-4,7,10-triacetic-1-{methyl}[(4-aminophenyl)methyl] phosphinic acid) with ^{111}In at a tracer level was analyzed. Formation of a complex between ^{111}In and DO3AP^{ABn} was very rapid even at room temperature and high radiolabeling yields were achieved. As introducing the methylphosphinic acid arm to the DOTA structure generated a chiral centre, more than one peak (probably corresponding to various diastereoisomers) of ^{111}In -DO3AP^{ABn} were separated on HPLC. Four peaks were separated by HPLC; they probably correspond to four diastereoisomers of ^{111}In -DO3AP^{ABn} originating from combination of chirality of complexes of DOTA-like ligands with chirality of coordinated phosphorus atom. Studies in rats showed rapid elimination of radioactivity from the blood and other organs and tissues. The results indicate that DO3AP^{ABn} represents a promising ligand for radiolabeling of target-specific biomolecules with radiometals.

Introduction

Macrocyclic bifunctional chelates (BFC) are used to tag monoclonal antibodies and receptor-specific peptides with radiometals for in vivo diagnosis and therapy of cancers and their metastases. For this purpose, DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) has been widely employed as the chelating agent for the labeling of target-specific biomolecules due to the excellent kinetic stability of complexes of DOTA derivatives with radiometals. However, a relatively slow formation of radiometal-DOTA complexes at a temperature acceptable for monoclonal antibody radiolabeling represents a serious problem.

The bifunctional monophosphinic acid DOTA analogue DO3AP^{ABn} represents a new bifunctional ligand in which the replacement of an acetic acid arm with a methylphosphinic acid moiety could accelerate complex formation between BFC and a radiometal.¹ Functionalization of the methylphosphinic acid arm with the *p*-aminophenyl moiety enables further conjugation of the chelator with biomolecules. In this report, we present the characterization of the ^{111}In complex with DO3AP^{ABn} at a tracer level and describe the preclinical biodistribution characteristics and elimination pathways of the complex in rats.

Experimental

Radiolabeling

For radiolabeling of DO3AP^{ABn} with ^{111}In , to 1 ml of 10^{-3}M ligand solution in 0.4M acetate buffer pH 5.5 about $3.7 \cdot 10^7$ Bq (1 mCi) of ^{111}In corresponding to 100 μl of $^{111}\text{InCl}_3$ solution in 0.04M HCl was added and subsequently pH was adjusted to pH 5.5 by adding 10 μl

0.4M NH_4OH . After 30-minute incubation, an isocratic RP-HPLC analysis was carried out on an Agilent 1100 Series liquid chromatograph equipped with a radioactivity detector and a LiChroCART C18 column 125 \times 4 mm, 5 μm (Merck) with the mobile phase 0.2M acetate buffer pH 5.5. Radiochemical purity was confirmed by thin-layer chromatography on ITLC-SG (silica-gel on glass fibers) in a 10% ammonium acetate water solution – methanol (1:1). The fractions from HPLC were collected and radioactivity in the individual peaks was concentrated at 80 $^\circ\text{C}$ for 3 hours on a SPD SpeedVac (ThermoSavant) for further HPLC analysis. Subsequent HPLC analyses were done under the same conditions as above.

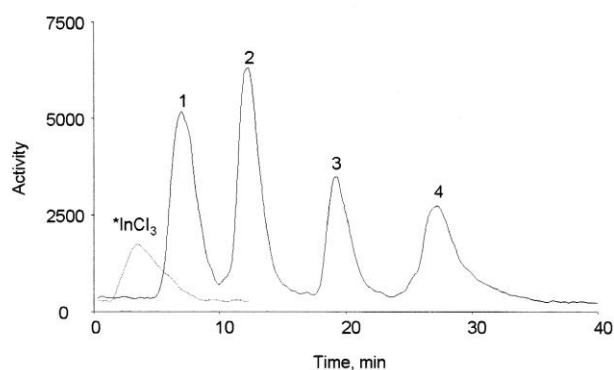
Biodistribution studies in rats

For biological experiments, male Wistar rats weighing 240–280 g were used. The radio-labeled agent was dissolved in a saline solution and administered to animals intravenously at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of BW in a volume of 0.2 ml. At selected time intervals after dosing, a blood sample was withdrawn from the carotid artery under ether anaesthesia and the distribution of radioactivity in different organs, tissues, and systems was analyzed. Animal experiments were approved by the Ethics Committee of Charles University, Faculty of Pharmacy.

Results

HPLC studies revealed that the reaction kinetics for the encapsulation of the radionuclide to the cavity of DO3AP^{ABn} was rapid even at a room temperature and high radiolabeling yields were achieved. In the preparations of ^{111}In -DO3AP^{ABn}, no free ^{111}In was determined by instant thin-layer chromatography.

* E-mail: laznicko@faf.cuni.cz

A. LAZNICKOVA et al.: LABELING OF A BIFUNCTIONAL MONOPHOSPHINIC ACID DOTA ANALOGUE WITH ^{111}In Fig. 1. HPLC chromatogram of $^{111}\text{In-DO3APABn}$ in trace levelTable 1. Biodistribution of $^{111}\text{In-DO3APABn}$ in rats*

Organ	5 min	60 min	120 min	24 h
Blood	0.902 ± 0.079	0.083 ± 0.045	0.016 ± 0.001	0.003 ± 0.000
Plasma	1.594 ± 0.142	0.150 ± 0.082	0.029 ± 0.002	0.005 ± 0.001
Pancreas	0.262 ± 0.032	0.036 ± 0.021	0.009 ± 0.002	0.006 ± 0.001
Liver	0.176 ± 0.011	0.042 ± 0.013	0.024 ± 0.002	0.021 ± 0.002
Adrenals	0.321 ± 0.042	0.036 ± 0.017	0.014 ± 0.005	0.011 ± 0.004
Kidney	8.110 ± 2.249	0.939 ± 0.469	0.381 ± 0.067	0.354 ± 0.090
Lung	0.469 ± 0.021	0.062 ± 0.025	0.017 ± 0.003	0.006 ± 0.001
Heart	0.344 ± 0.043	0.033 ± 0.018	0.008 ± 0.001	0.004 ± 0.000
Spleen	0.191 ± 0.016	0.036 ± 0.008	0.017 ± 0.001	0.019 ± 0.003
Stomach	0.273 ± 0.075	0.154 ± 0.087	0.350 ± 0.542	0.028 ± 0.039
Intestine	0.249 ± 0.063	0.404 ± 0.411	0.613 ± 0.217	0.026 ± 0.015
Colon	0.154 ± 0.034	0.366 ± 0.701	0.084 ± 0.106	0.114 ± 0.051
Testes	0.144 ± 0.021	0.030 ± 0.016	0.008 ± 0.001	0.007 ± 0.005
Skin	0.448 ± 0.015	0.057 ± 0.031	0.015 ± 0.003	0.007 ± 0.000
Muscle	0.168 ± 0.008	0.019 ± 0.011	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.000
Thyroid	0.631 ± 0.050	0.065 ± 0.036	0.018 ± 0.004	0.010 ± 0.002
Brain	0.033 ± 0.007	0.011 ± 0.013	0.002 ± 0.000	0.001 ± 0.000
Fat	0.279 ± 0.044	0.031 ± 0.018	0.007 ± 0.003	0.005 ± 0.002
Femur	0.215 ± 0.024	0.077 ± 0.031	0.042 ± 0.004	0.020 ± 0.003

* Data are presented in %D/g ± SD (n=5).

HPLC analysis of $^{111}\text{In-DO3APABn}$ showed four peaks; the last two well separated peaks were collected (Fig. 1). The corresponding fractions were concentrated at 80 °C and subjected to a subsequent HPLC analysis under the same conditions (the results are not presented here). The analysis showed that the peak 3 from the previous chromatography was separated into two peaks with the retention times corresponding to peaks 2 and 3 in the chromatogram of the original preparation. The peak 4 separated into two other peaks with the retention times of peaks 1 and 4 in the HPLC analysis of the original preparation.

A summary of the distribution results obtained after intravenous administration of the radiolabeled complex to rats is presented in Table 1. Results indicate a rapid

decrease in radioactivity concentration in blood and most organs. The highest radioactivity concentration was found in the kidney due to the elimination of the complex through the kidney to urine. No significant radioactivity accumulation in the bowels was determined indicating negligible elimination of radioactivity by the hepatobiliary system. No specific uptake of radioactivity in other organs and tissues was found.

Discussion

DO3APABn is an analogue of DOTA in which one pendant arm contains a methylphosphinic acid moiety bound to one of the nitrogen atoms. It has been shown that such substitution with the phosphorus acid moiety

A. LAZNICKOVA et al.: LABELING OF A BIFUNCTIONAL MONOPHOSPHINIC ACID DOTA ANALOGUE WITH ^{111}In

leads to a significantly faster exchange rate of the coordinated water molecule in their gadolinium(III) complexes in comparison with an analogous complex of DOTA.^{1,2} For this reason the gadolinium(III) complex of DO3AP^{ABn} is a promising synthon for the synthesis of new contrast agents for Magnetic Resonance Imaging.³

DOTA is also widely used in nuclear medicine to tag radiometals to receptor-specific peptides and monoclonal antibodies for cancer imaging and treatment.⁴ A slow rate of complex formation between DOTA and a radiometal is the main obstacle for the use of the ligand for radiolabeling of monoclonal antibodies as it is impossible to carry out the chelating reaction at a higher temperature (over 45 °C). A possible route to solve the problem is to design a chelator that is able to encapsulate radiometal ions more rapidly than H₄DOTA and, in addition, the resulting complex is sufficiently thermodynamically stable to ensure safe human application; DO3AP^{ABn} being a potential candidate in this field.

For radiolabeling of DO3AP^{ABn}, carrier-free ^{111}In was used. This radionuclide has a half-life of 67 hours and decays by electron capture with associated gamma-

ray emissions at 173 and 247 keV. ^{111}In is readily available commercially and has been widely used to label target-specific biomolecules for imaging studies. The complex formation between ^{111}In and DO3AP^{ABn} was studied at a tracer level as only a limited amount of radiolabeled bioactive molecules (receptor-specific peptides or monoclonal antibodies) can be injected to patients due to their possible undesired pharmacological and/or toxic side effects. Surprisingly, the HPLC chromatograms of the preparation showed four peaks on the radioactivity records at longer retention times. To check such behavior at higher overall concentrations, the same experiments were carried out with inactive indium labeled with ^{111}In . They showed that the peak separation became less pronounced and mutual peak intensity was changed with higher concentration of the complex. This observation can be tentatively explained by creating a new chiral centre on phosphorus atom of the phosphinate group after coordination of the moiety to the metal ion. The combination of the phosphorus-based chirality with the chirality common in the complexes of DOTA with trivalent metal ions (given by conformation of the chelate rings and the direction of the pendant arm rotation⁵) leads to four diastereoisomers (Fig. 2).

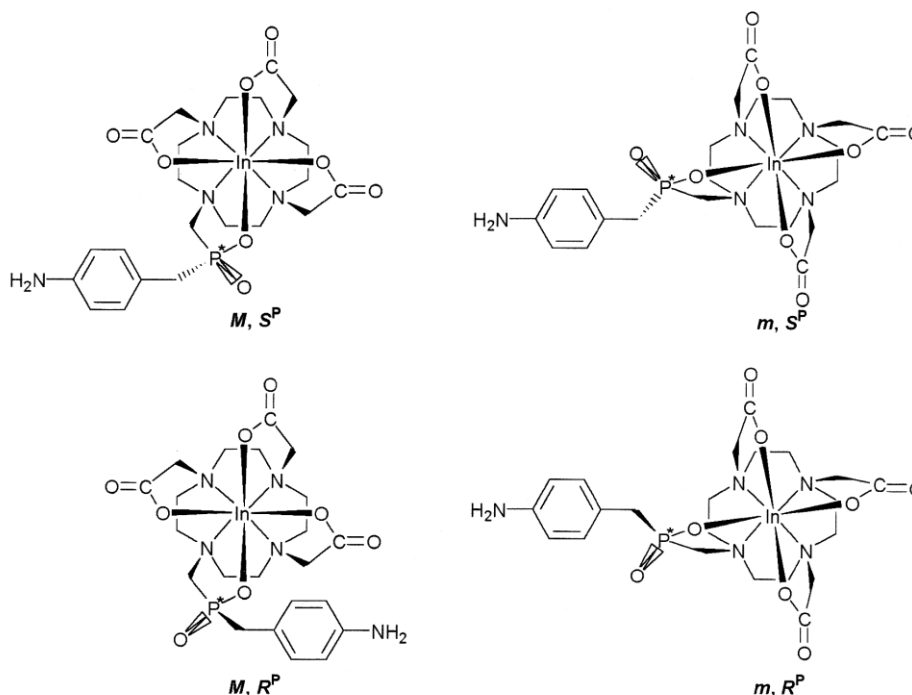


Fig. 2. Proposed structures of diastereoisomers of ^{111}In -DO3AP^{ABn} (labeling *m* and *M* mean chirality based on DOTA skeleton (5) and *R^P* and *S^P* mean configuration on phosphorus atom)

A. LAZNICKOVA et al.: LABELING OF A BIFUNCTIONAL MONOPHOSPHINIC ACID DOTA ANALOGUE WITH ^{111}In

Such diastereoisomers of $^{111}\text{In-DO3AP}^{\text{ABn}}$ may be separated by isocratic reverse-phase HPLC chromatography under radiochemical conditions at a tracer level. To get more inside into the phenomenon, we collected fractions corresponding to the peak 3 and 4 of the original preparation. The solvent was concentrated at high temperature what should lead to, at least partial, isomerization. Indeed, the subsequent HPLC analysis showed that another peaks are present in the chromatograms. Such behavior supports the hypothesis that mixture of diastereoisomers of the complex was present in the original preparation. At macroscopic level, mixture of such isomers was observed for lanthanide(III) complexes of the ligand by multinuclear NMR.¹

Direct evidence for such conclusion would, however, require further studies and an employment of different experimental approaches; but most of them are hardly useful at a tracer level used in the present work.

Biodistribution studies in rats showed rapid elimination of radioactivity from the blood and other organs and tissues after intravenous administration of $^{111}\text{In-DO3AP}^{\text{ABn}}$. The results were similar to that after $^{111}\text{In-DOTA}$ dosing. In rats no specific accumulation of radioactivity in individual organs and tissues after $^{111}\text{In-DO3AP}^{\text{ABn}}$ was determined. An introduction of a phosphorus acid group to the chelator could enhance its affinity to the bones which can result in a risk of radiotoxic side-effects (namely bone-marrow radiotoxicity). There has been known for a long time that phosphonates, mainly bis(phosphonates), have a high affinity to bone matrix (hydroxyapatite).⁶ The levels of radioactivity in the bone after $^{111}\text{In-DO3AP}^{\text{ABn}}$ were, however, satisfactorily low. The main elimination pathway of the chelate was urine excretion, mostly by the mechanism of glomerular filtration. The results indicate that $\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$ represents a promising bifunctional complex for radiolabeling of target-specific biomolecules with radiometals.

Biodistribution studies in rats showed a rapid time decrease in radioactivity from blood and most other organs of animals. The elimination pathway was radioactivity excretion by the kidney to urine. No specific accumulation of radioactivity in organs and tissues of animals is preferable for a possible use of the complex for radiolabeling of receptor-specific peptides and monoclonal antibodies. In case the chelator-radiometal complex is cleaved from the biomolecule in the body, a rapid elimination of break-down products to urine is preferable to minimize the radiation dose to non-target organs and tissues.

In conclusion, the results presented here showed that the $^{111}\text{In-DO3AP}^{\text{ABn}}$ complexes behaves similarly to complexes of other DOTA-like ligands and the ligand is suitable for a conjugation to targeting bioactive molecules.

*

The study was supported by the grants of the Grant Agency of Charles University (No. 405/2004 and 423/2004) and the Grant Agency of the Czech Republic (No. 203/03/0168).

References

1. J. RUDOVSKY, J. KOTEK, P. HERMANN, I. LUKES, V. MAINERO, S. AIME, *Org. Biomol. Chem.*, 3 (2005) 112.
2. J. RUDOVSKY, P. CIGLER, J. KOTEK, P. HERMANN, P. VOJTISEK, I. LUKES, J. A. PETERS, L. V. ELST, R. N. MULLER, *Chem. Eur. J.*, 11 (2005) 2372.
3. J. RUDOVSKY, P. HERMANN, M. BOTTA, S. AIME, I. LUKES, *Chem. Commun.*, (2005) 2390.
4. *Handbook of Radiopharmaceuticals. Radiochemistry and Applications*, M. J. WELCH, C. S. REDVANLY (Eds), Wiley, Chichester, UK, 2003.
5. S. AIME, M. BOTTA, M. FASANO, M. P. M. MARQUES, C. F. G. C. GERALDES, D. PUBANZ, A. E. MERBACH, *Inorg. Chem.*, 36 (1997) 2059.
6. H. FLEISCH, *Bisphosphonates in Bone Disease*, 4th ed., Academic Press, London, 2000.

- 9.5. Trejtnar F., Lázníček M., Lázníčková A., Kopecký M., Petřík M., Behe M., Schmidt J., Mäcke H.R., Maina T., Nock B., *Anticancer Research* 27, 907-912 (2007)

ANTICANCER RESEARCH 27: 907-912 (2007)

Biodistribution and Elimination Characteristics of Two ^{111}In -labeled CCK-2/gastrin Receptor-specific Peptides in Rats

FRANTISEK TREJTNAR¹, MILAN LAZNICEK¹, ALICE LAZNICKOVA¹,
MARTIN KOPECKY¹, MILOS PETRIK¹, MARTIN BÉHÉ², JÖRG SCHMIDT³,
HELMUT MAECKE³, THEODOSIA MAINA⁴ and BERTHOLD NOCK⁴

¹Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic;

²Department of Nuclear Medicine, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany;

³Division of Radiological Chemistry, University Hospital Basel, Switzerland;

⁴Institute of Radioisotopes-Radiodiagnostic Products, National Centre for Scientific Research "Demokritos", Athens, Greece

Abstract. *Background:* Due to their high CCK-2/gastrin receptor selectivity, high affinity, and rapid background clearance, radiolabeled minigastrins (MG) are emerging as promising new tools in the diagnosis and therapy of CCK-2/gastrin receptor-positive tumors. In this study, the pharmacokinetic profile, particularly the excretion mode, of two ^{111}In -labeled minigastrins was compared in rats. The first tracer, ^{111}In -MG-0 is based on (D)Glu¹-MG, while the second, ^{111}In -MG-11, is its des-(Glu)₅-derivative, expected to be less retained in renal tissue. *Materials and Methods:* The fate of ^{111}In -MG-0 and ^{111}In -MG-11 in the body of rats was investigated during biodistribution and bioelimination experiments, while the respective elimination parameters were determined in perfused rat liver and kidney models. *Results:* During biodistribution both compounds were rapidly cleared from the blood and most non-target organs whereas activity levels in the bowel and stomach declined slowly. The overall contribution of hepatobiliary excretion of ^{111}In -MG-0 and ^{111}In -MG-11 was relatively small. In the perfused rat liver their elimination into the bile was negligible. In contrast, renal excretion was the major excretion pathway for both analogs, mainly via glomerular filtration. However, kidney levels were substantially higher and retention was more prolonged in the case of ^{111}In -MG-0 as compared to ^{111}In -MG-11. *Conclusion:* The presence of the (Glu)₅-chain in ^{111}In -MG-0 appears to be implicated in the prolonged radioactivity retention in the kidney of rats.

Correspondence to: Prof. F. Trejtnar, Ph.D., Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Heyrovskeho 1203, CZ-500 05 Hradec Kralove, Czech Republic. Fax: +420 495067170, e-mail: trejtr@faf.cuni.cz

Key Words: Gastrin analogs, radiopharmaceuticals, pharmacokinetics, renal handling, radiodiagnosis in oncology.

The somatostatin analog ^{111}In -DTPA-octreotide (Octreoscan[®]) is used nowadays in the diagnosis of somatostatin receptor-positive neuroendocrine tumors (1-3). In addition to somatostatin receptors, other peptide receptors also seem to be clinically relevant targets in the diagnosis and therapy of malignant tumors. The cholecystokinin (CCK) receptor is recently regarded as another potentially useful target for nuclear oncology applications (2, 4). Cholecystokinin receptors comprise two distinct subtypes: the CCK-1 and the CCK-2/gastrin receptor subtype (4, 5), characterized by their different binding affinity toward known agonists and antagonists (6, 7). The CCK-1 receptors have been identified in normal tissues, such as in the smooth muscle of the gallbladder and of the sphincter of Oddi, the pancreatic acini and the brain (4, 8, 9). With some exceptions, CCK-1 receptors are rarely expressed in human tumors (10). CCK-2/gastrin receptors have been found on gastric parietal cells, gastrointestinal smooth muscle cells, in the brain, and in selected areas of the kidney (4, 6, 7). CCK-2/gastrin receptors have also been shown to be expressed in medullary thyroid cancers (MTC), small cell lung cancers (SCLC), stromal ovarian cancers, astrocytomas (11-13) and in several other types of human tumors (14, 15).

Radiopharmaceuticals developed for the targeting of CCK-2/gastrin receptor-positive tumors with ^{111}In and therapeutic radionuclides, such as ^{90}Y , are either minigastrin (16, 17), or non-sulfated CCK octapeptide (CCK-8) derivatives linked to diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) or 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) (18). $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled [(D)Glu¹]MG analogs modified with acyclic tetraamines were proposed for the CCK-2/gastrin receptor-targeted diagnosis of human MTC (19). Pilot clinical studies demonstrated that the majority of primary and metastatic MTC lesions can be visualized by CCK-2/gastrin receptor scintigraphy (16, 17, 19-21). In addition, CCK-2/gastrin receptor-targeted

radiotherapy of MTC using radiolabeled minigastrin was reasonably successful in a small number of patients (16, 17, 20). However, the high radiation dose to the kidney due to the prolonged renal retention remains a major concern and minigastrin analogs with reduced renal retention need to become available. Although premedication with polyglutamate chains of at least 5 glutamic acid residues was showed to effectively reduce the undesirable renal accumulation of radiolabeled minigastrins in mice (22), the effectiveness of this strategy in human has not yet been proven. In a study on the effects of charge and (Glu)_x chain length in a library of ¹¹¹In-DTPA-(D)Glu¹-minigastrins on renal retention, biokinetics and CCK-2/gastrin receptor-targeting capacity, ¹¹¹In-MG-11, altogether lacking the (Glu)₅-chain of minigastrin, emerged as the agent of choice for further clinical validation (23).

In the present work, the pharmacokinetic profile of ¹¹¹In-DTPA-(D)Glu¹-minigastrin (¹¹¹In-MG-0) was compared with that of the newly proposed truncated analog ¹¹¹In-MG-11 in healthy rats. Special attention has been paid to the renal handling of these two analogs, which are predominantly excreted *via* the kidneys. The study includes biodistribution and bioelimination experiments in rats as well as experiments experimentally perfused rat liver and kidney models.

Materials and Methods

Radiolabeling and radiochemical analysis. Minigastrin 0 (MG-0, DTPA-D-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) and minigastrin 11 (MG-11, DTPA-D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) were prepared as reported elsewhere (23). Polyfructosan (INUTEST) (Laevosan, Linz, Austria) was used as a marker of glomerular filtration rate and the sodium salt of bromosulfophthalein as a marker of the liver function. All other chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich Co. (Steinheim, Germany).

To 10 µl of peptide solution (1 µg/µl in 0.5M acetate buffer pH 5.4), 20 µl of 0.5 M acetate buffer (pH 5) was added together with the same volume of ~40 MBq ¹¹¹InCl₃ in 0.04 M HCl (Amersham, UK). After 30 min incubation at room temperature, HPLC analysis on a Pharmacia LKB system efficient with a LichChroCart RP C18, 125 mm x 4 mm (5 µm) column (Merck, Darmstadt, Germany) was carried out using the following mobile phases: 0.01 phosphate buffer pH 6.5 (phase A) and acetonitrile (phase B). Elution gradient during analysis was as follows: 0-5 min 0% B; 5-35 min 0-30% B; 35-55min 30% B at a flow rate of 1 ml/min. Radiochemical purity of the peptides was always higher than 98%.

Distribution and elimination studies *in vivo*. Male Wistar rats weighing 200-220 g were used for the experiments. The tracers were administered into the tail vein in a volume of 0.2 ml (approx. 1 µg/kg of body weight; activity 0.5-1 MBq/kg). At the selected time interval (5 min, 1 h, 2 h, 24 h or 48 h) post injection (pi), a blood sample was collected in a glass tube containing dry heparin. After exsanguination, selected organs were removed to determine the distribution of ¹¹¹In activity with time. For bioelimination studies, radiopharmaceuticals were administered as described above and

each animal was placed in a separate glass metabolic cage. Urine and faeces were collected at 2 h (urine only), 24 h and 48 h pi. Rats were compelled to empty their urinary bladders by handling (immobilization).

The Ethical Committee of the Faculty of Pharmacy of Charles University, approved the protocols of animal experiments. These protocols were pursued in accordance with the directive of the Ministry of Education of the Czech Republic.

Rat kidney perfusion. Male Wistar rats weighing 280-320 g were used for perfusion experiments, as described elsewhere (24). In brief, the kidney was perfused with 100 ml Krebs-Henseleit solution containing 6% bovine serum albumin, 5-6% washed rat erythrocytes and a mixture of amino acids and metabolic substrates. The perfusion was performed under a recirculation regimen at a constant arterial pressure. The agents under study were added into the perfusion system as a bolus (0.2 µg). Polyfructosan was used to determine the glomerular filtration rate. Concentrations of polyfructosan in the perfusate and the urine were measured colorimetrically (25). The elimination profiles in the perfused rat kidney were characterized on the basis of total renal clearance (urinary activity x volume of urine/activity in perfusate) and filtration clearance (= elimination rate due to glomerular filtration) calculated as follows: glomerular filtration rate x free fraction of the agent in the perfusate. Radioactivity in the kidney and ratio of kidney to perfusate radioactivity at the end of the perfusion were also calculated.

Rat liver perfusion. The recirculation perfusion study was performed as described elsewhere (26). Under pentobarbital anesthesia, the bile duct and the portal vein of the rat were cannulated. The blood was washed out from the liver with Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4 with glucose) *via* the inferior vena cava and the perfusion medium (oxygenated Krebs-Henseleit buffer, pH 7.4, supplemented with 10 mM glucose, 4% BSA and 10% washed bovine erythrocytes) was infused into the portal vein. The flow of the perfusate medium was kept at 25 ml/min and the radiotracer was added to a reservoir. The experiment was performed for 90 min after drug administration and samples from the inflow and outflow perfusate and bile were collected throughout the experiment. Hepatobiliary clearance was calculated as the activity of the agent eliminated into the bile per min/the activity in 1 ml perfusate. In all experiments, ¹¹¹In activity in collected samples was measured in a 1480 Wizard 3 gamma-spectrometer (Wallac, Finland) and related to appropriate standards.

Results

Distribution and elimination studies in rats. Cumulative data of ¹¹¹In-MG-0 and ¹¹¹In-MG-11 biodistribution in the rat are summarized in Table I and II, respectively, and are expressed as % injected dose/organ (% ID/organ) and as % injected dose/g (% ID/g) for the 5 min, 1, 2, 24 and 48 h pi time intervals. Both tracers were rapidly cleared from blood *via* the kidneys and the urinary system. However, ¹¹¹In-MG-11, lacking the Glu₅-sequence, was more rapidly excreted into the urine with only a small part of the radioactivity retained in renal tissue (<2.0% at 1 h pi). In contrast, non-

Trejtnar *et al.*: ^{111}In -minigastrin Profile in RatsTable I. Distribution of ^{111}In -MG-0 in rats (mean \pm SD, n=4).

	5 min	1 h	2 h	24 h	48 h
% injected dose in whole organ (% ID/organ)					
Liver	1.845 \pm 0.882	0.287 \pm 0.171	0.105 \pm 0.021	0.074 \pm 0.004	0.070 \pm 0.008
Stomach	1.310 \pm 0.575	0.964 \pm 0.329	0.606 \pm 0.215	0.380 \pm 0.034	0.209 \pm 0.024
Intestine	2.191 \pm 0.884	4.080 \pm 6.884	1.604 \pm 1.702	0.412 \pm 0.272	0.085 \pm 0.029
Colon	1.102 \pm 0.462	0.207 \pm 0.096	0.051 \pm 0.017	3.513 \pm 1.229	0.762 \pm 0.292
Kidney	32.414 \pm 11.105	47.039 \pm 26.550	31.453 \pm 3.418	33.542 \pm 2.678	29.581 \pm 5.048
Lung	0.818 \pm 0.341	0.106 \pm 0.071	0.016 \pm 0.008	0.006 \pm 0.003	0.005 \pm 0.001
Heart	0.363 \pm 0.172	0.031 \pm 0.013	0.005 \pm 0.002	0.002 \pm 0.000	0.002 \pm 0.001
% injected dose per g (% ID/g)					
Blood	1.341 \pm 0.638	0.114 \pm 0.064	0.010 \pm 0.004	0.001 \pm 0.000	0.001 \pm 0.000
Stomach	0.705 \pm 0.312	0.468 \pm 0.068	0.300 \pm 0.121	0.219 \pm 0.033	0.126 \pm 0.021
Liver	0.284 \pm 0.136	0.045 \pm 0.024	0.018 \pm 0.004	0.012 \pm 0.002	0.011 \pm 0.001
Pancreas	0.415 \pm 0.185	0.058 \pm 0.027	0.012 \pm 0.003	0.009 \pm 0.002	0.006 \pm 0.003
Adrenals	0.451 \pm 0.183	0.242 \pm 0.242	0.016 \pm 0.004	0.010 \pm 0.009	0.007 \pm 0.007
Kidney	19.224 \pm 7.681	26.428 \pm 14.632	18.507 \pm 2.316	20.358 \pm 1.040	17.336 \pm 2.086
Thyroid	0.873 \pm 0.403	0.080 \pm 0.032	0.009 \pm 0.008	0.003 \pm 0.004	0.003 \pm 0.005
Muscle	0.264 \pm 0.130	0.028 \pm 0.018	0.004 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	0.001 \pm 0.000

Table II. Distribution of ^{111}In -MG-11 in rats (mean \pm SD, n=4).

	5 min	1 h	2 h	24 h	48 h
% injected dose in whole organ (% ID/organ)					
Liver	1.447 \pm 0.142	0.186 \pm 0.032	0.101 \pm 0.016	0.069 \pm 0.008	0.057 \pm 0.007
Stomach	1.519 \pm 1.569	0.261 \pm 0.069	0.196 \pm 0.056	0.116 \pm 0.018	0.291 \pm 0.461
Intestine	2.777 \pm 1.969	0.487 \pm 0.092	0.569 \pm 0.172	0.150 \pm 0.054	0.040 \pm 0.023
Colon	0.967 \pm 0.137	0.119 \pm 0.003	0.049 \pm 0.019	3.189 \pm 2.406	0.678 \pm 0.497
Kidney	12.281 \pm 8.745	1.932 \pm 0.254	1.660 \pm 0.110	1.472 \pm 0.087	1.386 \pm 0.097
Lung	0.698 \pm 0.055	0.085 \pm 0.039	0.024 \pm 0.014	0.005 \pm 0.001	0.004 \pm 0.001
Heart	0.245 \pm 0.142	0.028 \pm 0.008	0.005 \pm 0.001	0.002 \pm 0.000	0.001 \pm 0.000
% injected dose per g (% ID/g)					
Blood	0.993 \pm 0.043	0.076 \pm 0.015	0.010 \pm 0.003	0.001 \pm 0.000	0.000 \pm 0.000
Stomach	0.575 \pm 0.446	0.124 \pm 0.032	0.083 \pm 0.027	0.065 \pm 0.014	0.125 \pm 0.174
Liver	0.218 \pm 0.011	0.028 \pm 0.003	0.015 \pm 0.002	0.010 \pm 0.002	0.009 \pm 0.001
Pancreas	0.323 \pm 0.021	0.038 \pm 0.005	0.011 \pm 0.001	0.007 \pm 0.001	0.006 \pm 0.000
Adrenals	0.307 \pm 0.034	0.037 \pm 0.006	0.013 \pm 0.003	0.003 \pm 0.003	0.005 \pm 0.004
Kidney	7.043 \pm 4.910	1.105 \pm 0.187	0.893 \pm 0.106	0.838 \pm 0.089	0.823 \pm 0.082
Thyroid	0.707 \pm 0.015	0.050 \pm 0.029	0.012 \pm 0.004	0.007 \pm 0.002	0.003 \pm 0.002
Muscle	0.192 \pm 0.015	0.018 \pm 0.006	0.003 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	0.002 \pm 0.000

truncated ^{111}In -MG-0 showed high uptake and prolonged retention in the rat kidney with \sim 30% ID still detected in renal tissue at 48 h pi.

Fast uptake of both minigastrins in the stomach (known to naturally express CCK-2/gastrin receptors) was evident as soon as 5 min pi. However, ^{111}In -MG-11 was quickly lost from the stomach while the decrease of stomach radioactivity was slower in the case of ^{111}In -MG-0. In CCK-1 receptor-positive organs (e.g. pancreas) and in CCK-2/gastrin receptor-negative organs (e.g. adrenals, heart)

radioactivity values paralleled blood clearance. The radioactivity detected in the small and large intestine after injection of both analogs was attributed to minor excretion *via* the gastrointestinal tract. The uptake in all other organs and tissues studied (spleen, testes, brain, femur, skin, abdominal fat) remained below 0.5% ID at all time intervals. From the radioactivity concentration values (% ID/g values in Table I and II) high and prolonged uptake was evident in the kidneys and stomach for both compounds. Thyroid uptake, an important factor of the

ANTICANCER RESEARCH 27: 907-912 (2007)

Table III. Cumulative excretion (% injected dose) of ^{111}In -MG-0 and ^{111}In -MG-11 after i.v. administration in rats (mean \pm SD, n=4).

Compound	2 h		24 h		48 h	
	Urine	Faeces	Urine	Faeces	Urine	Faeces
^{111}In -MG-0	53.88 \pm 4.81	–	57.09 \pm 5.52	3.42 \pm 1.69	59.05 \pm 4.68	4.76 \pm 1.02
^{111}In -MG-11	78.22 \pm 7.99	–	80.54 \pm 6.96	4.86 \pm 3.09	80.96 \pm 6.81	6.48 \pm 3.72

Table IV. Excretion and retention data of ^{111}In -MG-0 and ^{111}In -MG-11 in perfused rat kidney (values are means \pm SD, n=4).

Compound	Renal clearance (ml/min/g)	Free fraction in perfusate	Filtration clearance (ml/min/g)	Radioactivity of the kidney at the end of the perfusion (% dose)	Kidney-to-perfusate ratio at the end of the perfusion
^{111}In -MG-0	0.418 \pm 0.034	0.523 \pm 0.022	0.358 \pm 0.049	13.4 \pm 0.9	20.6 \pm 2.0
^{111}In -MG-11	0.599 \pm 0.033	0.829 \pm 0.089	0.612 \pm 0.082	2.0 \pm 0.4	3.2 \pm 0.4

feasibility to image primary MTC in the thyroid, although initially substantial, declined very rapidly thereafter. Cumulative excretion data in rat urine and faeces during the 48 h span is presented in Table III. Urine excretion was the main elimination pathway for both ^{111}In -labeled minigastrins and most of the radioactivity was eliminated during the first 2 h. It is worth noticing that the percentage of radioactivity found in the urine was markedly higher for ^{111}In -MG-11 as compared with ^{111}In -MG-0.

Rat kidney perfusion. The renal clearance parameters and the accumulation characteristics of ^{111}In -MG-0 and ^{111}In -MG-11 in the perfused rat kidney along with their free fractions in the perfusate are presented in Table IV. No significant differences in the renal clearance values were found during 60 min of perfusion. From the corresponding renal elimination characteristics, it is apparent that ^{111}In -MG-0 was more slowly filtered in the glomeruli than ^{111}In -MG-11, despite its significantly higher accumulation in renal tissue.

Rat liver perfusion. Rat liver perfusion experiments revealed that the excretion rate by the liver into the bile was very low for ^{111}In -MG-11 and negligible for ^{111}In -MG-0 (Table V). Liver-to-perfusate ratios at the end of perfusion experiments were relatively low for both agents and indicated that they were little accumulated in liver cells.

Discussion

Radiolabeled CCK- or gastrin-peptide analogs have been proposed as potential diagnostic or therapeutic drugs against CCK-2/gastrin receptor-expressing tumors, such as

Table V. Excretion parameters of ^{111}In -MG-0 and ^{111}In -MG-11 in perfused rat liver (values are means \pm SD, n=4).

Compound	Bile clearance of the peptide (ml/min)	Liver-to-perfusate ratio at the end of the perfusion
^{111}In -MG-0	0.0002 \pm 0.0001	0.253 \pm 0.109
^{111}In -MG-11	0.0034 \pm 0.0008	0.200 \pm 0.016

MTC or SCLC (16-23). Previous studies have revealed the impact of a (Glu)₅-sequence in radiolabeled minigastrins on the prolonged radioactivity retention in the kidneys of experimental animals and patients (22, 23). As a result, the anionic pentaglutamate sequence of minigastrins leads to unfavourably high radiation doses to the kidney. This disadvantage seems to be compensated for, by the higher CCK-2/gastrin receptor targeting capacity of minigastrins both *in vitro* and *in vivo* versus the respective CCK analogs. In the present study, we compared the distribution and elimination profile in rats of two such ^{111}In -labeled peptide analogs derived either from minigastrin, ^{111}In -MG-0, or from *des*-(Glu)₅-minigastrin, ^{111}In -MG-11. The latter was recently selected from an ^{111}In -labeled DTPA-(D)Glu¹-MG library as the agent of choice for CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor scintigraphy because it combines high affinity binding to the receptor with low uptake and retention in the kidneys of experimental animals (23).

Our results from the distribution and elimination studies in rats conducted in the present work confirmed the findings from previous reports. Thus, we were able to observe higher uptake and longer retention of ^{111}In -MG-0 in the CCK-2/gastrin receptor-rich stomach in comparison with ^{111}In -

MG-11. Although both tracers were excreted from blood and non-target tissues via the kidneys and the urinary system, they differed significantly in the amount of radioactivity accumulated in the kidney. Renal radioactivity levels of <2% ID at 1 h pi declined to 1.4% ID at 48 h pi for the *des*-(Glu)₅ analog, ¹¹¹In-MG-11. Conversely, in the case of ¹¹¹In-MG-0, nearly 30% ID levels were still detected in renal tissue at 48 h pi. These findings were corroborated by results from experiments in perfused rat kidney. Thus, renal retention of ¹¹¹In-MG-0 at 60 min perfusion was several times higher in comparison with ¹¹¹In-MG-11.

It is generally accepted that tubular reabsorption is responsible for the renal uptake of peptides (27-28). The mechanism of renal accumulation is usually explained as a process including several transport and metabolic steps. The accumulated radiolabeled compounds are primarily filtered in the glomeruli and subsequently partly reabsorbed into the cells of proximal tubules. Thereafter, the agents are transferred into lysosomes by means of pinocytosis wherein they are degraded by proteolytic enzymes. Most often, breakdown products, namely radiolabeled chelate-conjugated amino acids, cannot leave the lysosomes and remain trapped in the proximal tubular cells.

In the rat kidney perfusion model, we found differences in the total renal clearance rates as well as in the glomerular filtration clearance rates between non-truncated and truncated minigastrins. This difference was attributed to the different degree of radiotracer binding to plasma proteins found in the applied perfusate. The filtration clearance of both tracers was not significantly different from their total renal clearance. This means that the radiotracer amount filtered in the glomeruli is practically the same as the amount excreted. The decisive renal excretion process for both peptides seems to be glomerular filtration. It should be noted that the filtration clearance of ¹¹¹In-MG-0 was lower than the total renal clearance, consistent with a partial secretion of this agent in the renal tubular system. However, the difference between these clearance values was not significant. Moreover, tubular secretion has so far been shown only for smaller peptides, such as ^{99m}Tc-labeled tetrapeptides (24).

Acknowledgements

The authors thank Mrs. I. Filipova, Mrs. J. Hoderova and Mrs. Teichmanova for their excellent technical assistance. The investigation was supported by the Grant Agency of Charles University, grant no. 109/2005 and 146/2004 and by COST Action B12: "Radiotracers for *In Vivo* Assessment of Biological Function", WG-3: "Radiolabeled Biologically Active Peptides".

References

- Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Valkema R, Pauwels S, Kvols LK and De Jong M: Peptide receptor radionuclide therapy. *Ann NY Acad Sci* 1014: 234-245, 2004.
- Reubi JC, Maecke HR and Krenning EP: Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J Nucl Med* 46(Suppl 1): 67S-75S, 2005.
- Warner RR and O'dorisio TM: Radiolabeled peptides in diagnosis and tumor imaging: clinical overview. *Semin Nucl Med* 32: 79-83, 2002.
- Wank SA: Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol* 269: G628-G646, 1995.
- Shulkes A and Baldwin GS: Biology of gut cholecystokinin and gastrin receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 209-216, 1997.
- Schrenck T, de Weerth A, Bechtel S, Weil J, Wolf G, Schulz M and Greten H: Evidence for CCK(B) receptors in the guinea-pig kidney: localization and characterization by [¹²⁵I]gastrin binding studies and by RT-PCR. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358: 287-292, 1998.
- Weerth A, Jonas L, Schade R, Schoneberg T, Wolf G, Pace A, Kirchhoff F, Schulz M, Heinig T, Greten H and von Schrenck T: Gastrin/cholecystokinin type B receptors in the kidney: molecular, pharmacological, functional characterization, and localization. *Eur J Clin Invest* 28: 592-601, 1998.
- Cox KL, von Schrenck T, Moran TH, Gardner JD and Jensen RT: Characterization of cholecystokinin receptors on the sphincter of Oddi. *Am J Physiol* 259: G873-G881, 1990.
- Schrenck T, Moran TH, Heinz-Erian P, Gardner JD and Jensen RT: Cholecystokinin receptors on gall bladder muscle and pancreatic acinar cells: a comparative study. *Am J Physiol* 255: G512-G521, 1988.
- Reubi JC: CCK receptors in human neuroendocrine tumors: clinical implications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 234: 101-104, 2001.
- Reubi JC and Waser B: Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 67: 644-647, 1996.
- Reubi JC, Schaefer JC and Waser B: Cholecystokinin (CCK)-1 and CCK-2/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 57: 1377-1386, 1997.
- Schaefer JC and Reubi JC: High gastrin and cholecystokinin (CCK) gene expression in human neuronal, renal, and myogenic stem cell tumors: comparison with CCK-1 and CCK-2 receptor contents. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 233-239, 1999.
- Upp JR, Singh P, Townsend CM and Thompson JC: Clinical significance of gastrin receptors in human colon cancers. *Cancer Res* 49: 488-492, 1989.
- Weinberg DS, Ruggeri B, Barber MT, Biswas S, Miknyocki S and Waldman SA: Cholecystokinin A and B receptors are differentially expressed in normal pancreas and pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Invest* 100: 597-603, 1997.
- Behr TM, Jenner N, Radetzky S, Behe M, Gratz S, Yucekent S, Raue F and Becker W: Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors *in vivo*: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med* 25: 424-430, 1998.
- Béhé M, Becker W, Gotthardt M, Angerstein C and Behr TM: Improved kinetic stability of DTPA-dGlu as compared with conventional monofunctional DTPA in chelating indium and yttrium: preclinical and initial clinical evaluation of radiometal labelled minigastrin derivatives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30: 1140-1146, 2003.

ANTICANCER RESEARCH 27: 907-912 (2007)

- 18 Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laederach U, Erion J, Srinivasan A, Schmidt MA and Bugaj JE: Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Nucl Med* 25: 481-490, 1998.
- 19 Nock BA, Maina T, Béhé M, Nikolopoulou A, Gotthardt M, Schmitt JS, Behr TM and Maecke HR: CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with ^{99m}Tc-labeled minigastrin analogs. *J Nucl Med* 46: 1727-1736, 2005.
- 20 Behr TM, Jenner N, Béhé M, Angerstein C, Gratz S, Raue F and Becker W: Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. *J Nucl Med* 40: 1029-1044, 1999.
- 21 Behr TM and Béhé MP: Cholecystokinin-B/gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor-expressing malignancies. *Semin Nucl Med* 32: 97-109, 2002.
- 22 Béhé M, Kluge G, Becker W, Gotthardt M and Behr TM: Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys. *J Nucl Med* 46: 1012-1015, 2005.
- 23 Bernard BF, Béhé MP, Breeman WAP, Nock B, Maecke HR, Schmitt J, Behr TM, Maina T, Waser B, Reubi JC, Krenning EP and de Jong M: Preclinical evaluation of minigastrin analogs for CCK-B receptor targeting. *Cancer Biother Radiopharm* 18: 281, 2003.
- 24 Trejtnar F, Laznicek M, Laznickova A and Mather SJ: Pharmacokinetics and renal handling of ^{99m}Tc-labelled peptides. *J Nucl Med* 41: 177-182, 2000.
- 25 Heyrovsky A: A new method for the determination of inulin in plasma and urine. *Clin Chim Acta* 1: 470-474, 1956.
- 26 Laznickova A, Laznicek M, Trejtnar F, Melicharova L, Suzuki KH, Akizawa H, Arano Y and Yokoyama A: Distribution and elimination characteristics of ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide and ¹¹¹In-DTPA-L-Phe¹-octreotide in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 27: 37-43, 2002.
- 27 Behr TM, Goldenberg DM and Becker W: Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur J Nucl Med* 25: 201-212, 1998.
- 28 Duncan JR, Behr TM and DeNardo S: Intracellular fate of radiometals. *J Nucl Med* 38: 829, 1997.

Received November 23, 2006

Revised January 23, 2007

Accepted February 2, 2007

10 Seznam použitých zkratek

α -MSH	α - melanocyty stimulující hormon
ACN	acetonitril
BFC	bifunkční chelatační činidlo, bifunkční chelátor
BM	biologicky aktivní molekula, biomolekula
CCK	cholecystokinin
CDTA	cyklohexandiamintetraoctová kyselina
CNS	centrální nervový systém
Cys	cystein
DOTA, H4dota	tetraazacyklododekantetraoctová kyselina
DOTAGA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1-glutarová kyselina-4,7,10 triocto- vá kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
EDDA	ethylendiamindioctová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EDTMP	ethylendiamintetramethylenfosfonát
EZ	elektronový záchyt
FDA	americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FDG	^{18}F -fluorodeoxy-D-glukóza
GH	růstový hormon
Gly	glycin
GRP	gastrin uvolňující peptid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HYNIC	hydrazinonikotinová kyselina
ICI	jodmonochlorid
IgG	imunoglobulin G
ITLC-SG	instantní tenkovrstvá chromatografie na skleněných mikrovláčkách
IP	izomerický přechod
MeOH	metanol
<i>p</i> -NCS-Bz-DOTA	(2-(4-isothiokyanatobenzyl)tetraazacyklododekantetraoctová kyselina
PACAP	peptid aktivující hypofýzární adenylát cyklázu
PA-DOTA	R-[2-(4-aminofenyl)-ethyl]tetraazacyklododekantetraoctová kyselina

PC	papírová chromatografie
PET	pozitronová emisní chromatografie
PVDF	polyvinylidenfluorid
RČ	radiochemická čistota
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
RTG	Roentgenovo záření
SEC	gelově permeační chromatografie, gelová chromatografie
SP	substance P
SSTR	somatostatinové receptory
TETA	tetraazacyklotetradekantetraoctová kyselina
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TSH	hormon štítné žlázy
UV-VIS	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti
VIP	vazoaktivní intestinální peptid
VK	vnitřní konverze

11 Seznam použité literatury

1. Serafini A. N.: From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units: an overview. *J. Nucl. Med.* 34, 533-536 (1993)
2. Fischman A. J., Babich J. W., Strauss H. W.: A ticket to ride: Peptide radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* 34, 2253-2263 (1993)
3. Thakur M. L.: Radiolabelled peptides: now and the future. *Nucl. Med. Commun.* 16, 724-732 (1995)
4. Liu S., Edwards D. S., Barrett J. A.: Tc 99m labelling of highly potent small peptides. *Bioconjug. Chem.* 8, 621-636 (1997)
5. Blok D., Feitsma R. I. J., Vermeij P., Pauwels E. J. K.: Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Eur. J. Nucl. Med.* 26, 1511-1519 (1999)
6. Heppeler A., Froidevaux S., Eberle A. N., Maecke H. R.: Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr. Med. Chem.* 7, 971-994 (2000)
7. Signore A., Annovazzi A., Chianelli M., Corsetti F., Van de Wiele C., Watherhouse R. N.: Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. *Eur. J. Nucl. Med.* 28, 1555-1565 (2001)
8. Liu S., Edwards D. S.: Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug. Chem.* 12, 7-34 (2001)
9. Weiner R. E., Thakur M. L.: Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. *Appl. Rad. Isot.* 57, 749-763 (2002)
10. Liu S., Edwards D. S.: Fundamentals of receptor-based diagnostic metalloradiopharmaceuticals. *Top. Curr. Chem.* 222, 259-278 (2002)
11. Riccabona G., Decristoforo C.: Peptide targeted imaging of cancer. *Canc. Biother. & Radiopharm.* 18, 675-687 (2003)
12. Reubi J. C.: Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endoc. Rev.* 24, 389-427 (2003)
13. Sosabowski J., Melendez-Alafort L., Mather S.: Radiolabelling of peptides for diagnosis and therapy of non-oncological diseases. *Q. J. Nucl. Med.* 47, 223-237 (2003)
14. www.launc.tased.edu.au/online/sciences/PhysSci/radres/Radfiles/s7mcg.pdf (staženo 2007)
15. www.uic.com.au/nip26.htm (staženo 2007)
16. Lázníček M., Komárek P.: Základy radiofarmacie. *Karolinum*, Praha (1997)
17. Chalabala M., a kol.: Technologie léků. *Galén*, Praha (2001)

18. Maecke H. R.: Radiolabeled peptides in nuclear oncology: influence of peptide structure and labeling strategy on pharmacology. In: Bogdanov Jr. A. A., Licha K., eds. *Molecular imaging*. Springer, Berlin (2005)
19. Reubi J. C.: Neuropeptide receptors in health and disease: The molecular basis for in vivo imaging. *J. Nucl. Med.* 36, 1825-1835 (1995)
20. De Jong M., Bakker W. H., Krenning E. P., Breeman W. A. P., Pluijm M. E., Bernard F. B., Visser T. J., Jermann E., Behe M., Powell P., Maecke H. R.: Yttrium-90 and indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of [DOTA⁰, D-Phe¹, Tyr³]octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. *Eur. J. Nucl. Med.* 24, 368-371 (1997)
21. Kwekkeboom D. J., Kooij P. P., Bakker W. H., Maecke H. R., Krenning E. P.: Comparison of ¹¹¹In-DOTA-Tyr³-Octreotide in the same patients: Biodistribution, kinetics, organ and tumor uptake. *J. Nucl. Med.* 40, 762-767 (1999)
22. Kwekkeboom D. J., Krenning E. P., De Jong M.: Peptide receptor imaging and therapy. *J. Nucl. Med.* 41, 1704-1713 (2000)
23. Bohuslavizki K. H.: Somatostatin receptor imaging: Current status and future perspectives. *J. Nucl. Med.* 42, 1057-1058 (2001)
24. Breeman W. A., De Jong M., Kwekkeboom D. J., Valkema R., Bakker W. H., Kooij P. P. M., Visser T. J., Krenning E. P.: Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur. J. Nucl. Med.* 28, 1421-1429 (2001)
25. Capello A., Krenning E. P., Breeman W. A. P., Bernard B. F., De Jong M.: Peptide receptor radionuclide therapy in vitro using [¹¹¹In-DTPA⁰]octreotide. *J. Nucl. Med.* 44, 98-104 (2003)
26. Ginj M., Chen J., Walter M. A., Eltschinger V., Reubi J. C., Maecke H. R.: Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy. *Clin. Can. Res.* 11, 1136-1145 (2005)
27. Reubi J. C., Maecke H. R., Krenning E. P.: Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J. Nucl. Med.* 46, 67S-75S (2005)
28. Cremonesi M., Ferrari M., Bodei L., Tosi G., Paganelli G.: Dosimetry in peptide radionuclide receptor therapy: a review. *J. Nucl. Med.* 47, 1467-1475 (2006)
29. Forrer F., Valkema R., Kwekkeboom D. J., De Jong M., Krenning E. P.: Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrin. Metab.* 21, 111-29 (2007)

30. Wolf W., Shani J.: Criteria for the selection of the most desirable radionuclide for radiolabeling of monoclonal antibodies. *Nucl. Med. Biol.* 13, 319-324 (1986)
31. Fawwaz R. A., Wang T. S. T., Srivastava C., Hardy M. A.: The use of radionuclides for tumor therapy. *Nucl. Med. Biol.* 13, 429-436 (1986)
32. Schubiger P. A., Alberto R., Smith A.: Vehicles, chelators, and radionuclides: choosing the "building blocks" of an effective therapeutic radioimmunoconjugate. *Bioconjug. Chem.* 7, 165-179 (1996)
33. Marques F., Paulo A., Campello M. P., Lacerda S., Vitor R. F., Gano L., Delgado R., Santos I.: Radiopharmaceuticals for targeted radiotherapy. *Rad. Prot. Dos.* 116, 601-604 (2005)
34. <http://atom.kaeri.re.kr/>
35. Žabka M., Müller R. H., Hildebrand G. E.: Moderní lékové formy ve farmaceutické technologii. *SAP*, Bratislava (2001)
36. Meyer G. J., Maecke H. R., Schuhmacher J., Knapp W. H., Hofmann M.: ⁶⁸Ga-labeled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 31, 1097-1104 (2004)
37. Maecke H. R., Hofmann M., Haberkorn U.: ⁶⁸Ga-labeled peptides in tumor imaging. *J. Nucl. Med.* 46, 172S-178S (2005)
38. Breeman W. A. P., De Jong M., De Blois E., Bernard B. F., Konijnenberg M., Krenning E. P.: Radiolabelling DOTA-peptides with ⁶⁸Ga. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 32, 478-485 (2005)
39. Květina J., a kol.: Radiofarmaka. *Avicenum*, Praha (1987)
40. Ando A., Ando I., Hiraki T., Hisada K.: Relation between the location of elements in the periodic table and various organ-uptake rates. *Nucl. Med. Biol.* 16, 57-80 (1989)
41. Laufer R. B.: Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and Design. *Chem. Rev.* 87, 901-927 (1987)
42. Moi M. K., Meares C. F.: The peptide way to macrocyclic bifunctional chelating agents: synthesis of 2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N' ',N' "-tetraacetic acid and study of its yttrium(III) complex. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6266-6267 (1988)
43. Cox J. L., Craig A. S., Helps I. M., Jankowski K. J., Parker D., Eaton M. A. W., Millican A. T., Millar K., Beeley N. R. A., Boyce B. A.: Synthesis of C- and N-functionalized derivatives of 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid (NOTA), 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-1,4,7,10-tetrayltetra-acetic acid (DOTA), and

- diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA): bifunctional complexing agents for the derivatization of antibodies. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2567-2576 (1990)
44. Broan C. J., Cox J. P. L., Craig A. C., Katakya R., Parker D., Harrison A., Randall A. M., Ferguson G.: Structure and solution stability of indium and gallium complexes of 1,4,7-triazacyclononanetriacetate and yttrium complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecanetraacetate and related ligands: kinetically stable complexes for use in imaging and radioimmunotherapy. X-Ray molecular structure of the indium and gallium complexes of 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 87-99 (1991)
45. Parker D., Pulukkody K. P., Norman T. J., Harrison A., Royle L., Walker C.: Stable anionic, neutral and cationic complexes of gadolinium with functionalized aminophosphinic acid macrocyclic ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1441-1443 (1992)
46. Pulukkody K. P., Norman T. J., Parker D., Royle L., Broan C. J.: Synthesis of charged and uncharged complexes of gadolinium and yttrium with cyclic polyazaphosphinic acid ligands for in vivo applications. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 605-620 (1993)
47. Takenouchi K., Watanabe K., Kato Y., Koike T., Kimura E.: Novel bifunctional macrocyclic chelating agents appended with a pendant-type carboxymethylamino ligand and nitrobenzyl group and stability of the $^{88}\text{Y}^{\text{III}}$ complexes. *J. Org. Chem.* 58, 1955-1958 (1993)
48. Caravan P., Ellison J. J., McMurry T. J., Lauffer R. B.: Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* 99, 2293-2352 (1999)
49. McMurray T. J., Pippin C. G., Wu C., Deal K. A., Brechbiel M. W., Mirzadeh S., Gansow O. A.: Physical parameters and biological stability of yttrium(III) diethylenetriaminepentaacetic acid derivative conjugates. *J. Med. Chem.* 41, 3546-3549 (1998)
50. Garrett T. M., McMurry T. J., Hosseini M. W., Reyes Z. E., Hahn F. E., Raymond K. N.: Synthesis and characterization of macrocyclic iron (III) sequestering agents. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 2965-2977 (1991)
51. Hider R. C., Hall A. D.: Clinically useful chelators of tripositive elements. *Prog. Med. Chem.* 28, 41-173 (1991)

52. Scarrow R. C., Ecker D. J., Ng C., Liu S., Raymond K. N.: Iron (III) coordination chemistry of linear dihydroxyserine compounds derived from enterobactin. *Inorg. Chem.* **30**, 900-906 (1991)
53. Stack T. D. P., Karpishin T. B., Raymond K. N.: Structure and spectroscopic characterization of chiral ferric tris-catecholamides: unravelling the design of enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1512-1514 (1992)
54. Karpishin T. B., Stack T. D. P., Raymond K. N.: Octahedral vs trigonal prismatic geometry in a series of catechol macrobicyclic ligand-metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 182-192 (1993)
55. Karpishin T. B., Stack T. D. P., Raymond K. N.: Stereoselectivity in chiral Fe^{III} and Ga^{III} tris (catecholate) complexes effected by nonbonded, weakly polar interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6115-6125 (1993)
56. Hider R. C., Hall A. D.: Iron chelating agents in medicine. The application of bidentate hydroxypyridin-4-ones. *Perspect. Bioinorg. Chem.* **1**, 209-253 (1991)
57. Orvig C.: The aqueous coordination chemistry of aluminium. In: Robinson G., ed. *Coordination Chemistry of Aluminium*. VCH Publishers, New York (1993)
58. Drechsel H., Jung G.: Peptide siderophores. *J. Pept. Sci.* **4**, 147-181 (1998)
59. Haas H.: Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl. Microbiol. Biotech.* **62**, 316-330 (2003)
60. Gopalan A. S., Huber V. J., Zincircioglu O., Smith P. H.: Novel tetrahydroxamate chelators for actinide complexation: synthesis and binding studies. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1266-1268 (1992)
61. Ketring A. R.: ¹⁵³Sm-EDTMP and ¹⁸⁶Re-HEDP as bone therapeutic radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.* **14**, 223-232 (1987)
62. Holmes R. A.: [¹⁵³Sm]EDTMP: a potential therapy for bone cancer pain. *Semin. Nucl. Med.* **22**, 41-45 (1992)
63. Lever S. Z., Baidoo K. E., Mahmood A.: Structure proof of syn/anti isomerism in N-alkylated diaminedithiol (DADT) complexes of technetium. *Inorg. Chim. Acta* **176**, 183-184 (1990)
64. Marchi A., Marvelli L., Rossi R., Magon L., Bertolasi V., Ferretti V., Gilli P.: Nitrido- and oxo-technetium (V) chelate complexes with N₂S₂ ligands: Synthesis and crystal structures. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1485-1490 (1992)

65. Anderson C. J., John C. S., Li Y. J., Hancock R. D., McCarthy T. J., Martell A. E., Welch M. J.: *N,N'*-Ethylene-di-L-cysteine (EC) complexes of Ga (III) and In (III): molecular modelling, thermodynamic stability and in vivo studies. *Nucl. Med. Biol.* 22, 165-173 (1994)
66. Ma R., Welch M. J., Reibenspies J., Martell A. E.: Stability of metal ion complexes of 1,4,7-tris(2-mercaptoethyl)-1,4,7-triazacyclononane (TACN-TM) and molecular structure of $\text{In}(\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{S}_3)$. *Inorg. Chim. Acta* 236, 75-82 (1995)
67. Sun Y., Motekaitis R. J., Martell A. E., Welch M. J.: *N,N'*-Bis(2-mercaptoethyl)ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid; and effective ligand for indium(III). *Tetrahedron* 54, 4203-4210 (1995)
68. Li Y. J., Martell A. E., Hancock R. D., Reibenspies J., McCarthy T. J., Anderson C. J., Welch M. J.: *N,N'*-Ethylene-di-L-cysteine (EC) and its metal complexes: synthesis, characterization, crystal structures, and equilibrium constants. *Inorg. Chem.* 35, 404-414 (1996)
69. Sun Y., Anderson C. J., Pajeau T. S., Reichert D. E., Hancock R. D., Motekaitis R. J., Martell A. E., Welch M. J.: Indium (III) and gallium (III) complexes of bis(aminoethanethiol) ligands with different denticities: stabilities, molecular modelling, and in vivo behaviour. *J. Med. Chem.* 39, 458-470 (1996)
70. Hancock R. D., Martell A. E.: The chelate, cryptate, and macrocyclic effects. *Comments Inorg. Chem.* 6, 237-284 (1988)
71. Hancock R. D., Martell A. E.: Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution. *Chem. Rev.* 89, 1875-1914 (1989)
72. Hancock R. D., Martell A. E., Motekaitis R. J.: Factors affecting stabilities of chelate, macrocyclic and macrobicyclic complexes in solution. *Coord. Chem. Rev.* 133, 39-65 (1994)
73. Lecomte C., Dahaoui-Gindrey V., Chollet H., Gros C., Mishra A. K., Barbette F., Pullumbi P., Guillard R.: Prediction of the coordination scheme of lanthanide *N*-tetrasubstituted tetraazamacrocycles: an X-ray crystallography and molecular modelling study. *Inorg. Chem.* 36, 3827-3838 (1997)
74. Sundberg M. W., Meares C. F., Goodwin D. A., Diamanti C. I.: Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA. *Nature* 250, 587-589 (1974)
75. Krejcarek G. E., Tucker K. L.: Covalent attachment of chelating groups of macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 581-588 (1977)

76. Paik C. H., Murphy P. R., Eckelman W. C., Vokert W. A., Reba R. C.: Optimization of the DTPA mixed-anhydride reaction with antibodies at low concentration. *J. Nucl. Med.* 24, 932-936 (1983)
77. Brechbiel M. W., Gansow O. A.: Backbone-substituted DTPA ligands for ^{90}Y radioimmunotherapy. *Bioconjug. Chem.* 2, 187-194 (1991)
78. Pippin C. G., Parker T. A., McMurry T. J., Brechbiel M. W.: Spectrophotometric method for the determination of a bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates. *Bioconjug. Chem.* 3, 342-345 (1992)
79. Wu C., Brechbiel M. W., Gansow O. A., Kobayashi H., Carrasquillo J., Pastan I.: Stability of the four 2-(p-nitrobenzyl)-trans-CyDTPA ^{88}Y complexes. *Radiochim. Acta* 79, 123-136 (1997)
80. Hermanson G. T.: Bioconjugate techniques. *Academic Press*, San Diego (1996)
81. Woods M., Kovacs Z., Sherry A. D.: Targeted complexes of lanthanide(III) ions as therapeutic and diagnostic pharmaceuticals. *J. Supramol. Chem.* 2, 1-15 (2002)
82. Meares C. F., Moi M. K., Diril H., Kukis D. L., McCall M. J., Deshpande S. J., DeNardo S. J., Snook D., Epenetos A. A.: Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy. *Br. J. Canc.* 62, 21-26 (1990)
83. Deal K. A., Welch M. J.: Effect of stereochemistry on the clearance mechanism of ^{111}In (III)-labeled D- or L-benzyl-diethylenetriaminepentaacetic acid. *J. Med. Chem.* 40, 3986-3989 (1997)
84. Sabbah E. N., Kadouche J., Ellison D., Finucane C., Decaudin D., Mather S. J.: In vitro and in vivo comparison of DTPA- and DOTA-conjugated antiferitin monoclonal antibody for imaging and therapy of pancreatic cancer. *Nucl. Med. Biol.* 34, 293-304 (2007)
85. Abrams M. J., Juweid M., Ten Kate C. I., Schwartz D. A., Hauser M. M., Gaul F. E., Fuccello A. J., Rubin R. H., Strauss H. W., Fischman A. J.: Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J. Nucl. Med.* 31, 2022-2028 (1990)
86. Schwartz D. A., Abrams M. J., Hauser M. M., Gaul F. E., Larsen S. K., Rauh D., Zubieta J.: Preparation of hydrazinomodified proteins and their use for the synthesis of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -protein conjugates. *Bioconjug. Chem.* 2, 333-336 (1991)
87. Babich J. W., Fischman A. J.: Effect of co-ligand on the biodistribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled hydrazino nicotinic acid derivatized chemotactic peptides. *Nucl. Med. Biol.* 22, 25-30 (1995)

88. Ultee M. E., Bridger G. J., Abrams M. J., Longley C. B., Burton C. A., Larsen S. K., Henson G. W., Padmanabhan S., Gaul F. E., Schwartz D. A.: Tumor imaging with technetium-99m labeled hydrazinonicotinamide-Fab' conjugates. *J. Nucl. Med.* **38**, 133-138 (1997)
89. Decristoforo C., Mather S. J.: 99mTc-labeled peptide-HYNIC conjugates: effects of lipophilicity and stability on biodistribution. *Nucl. Med. Biol.* **26**, 389-396 (1999)
90. Decristoforo C., Mather S. J.: Technetium-99m somatostatin analogues: effect of labeling methods and peptide sequence. *Eur. J. Nucl. Med.* **26**, 869-876 (1999)
91. Guo W. J., Hinkle G. H., Lee R. J.: 99mTc-HYNICfolate: a novel receptor-based targeted radiopharmaceutical for tumor imaging. *J. Nucl. Med.* **40**, 1563-1569 (1999)
92. Hartus T. D., Sworin M., Williams N., Rajopadhye M., Damphousse P. R., Glowacka D., Poirier M. J., Yu K.: Synthesis of Stable Hydrazones of a Hydrazinonicotinyl-Modified Peptide for the Preparation of 99mTc-Labeled Radiopharmaceuticals. *Bioconjug. Chem.* **10**, 808-814 (1999)
93. Babich J. W., Coco W. G., Barrow S., Fischman A. J., Femia F. J., Zubieta J.: 99mTc-labeled chemotactic peptides: influence of coligand on distribution of molecular species and infection imaging properties. Synthesis and structural characterization of model complexes with the $\{\text{Re}(\eta^2\text{-HNNC5H4N})(\eta^1\text{-NNC5H4N})\}$ core. *Inorg. Chim. Acta* **309**, 123-136 (2000)
94. Decristoforo C., Melendez-Alafort L., Sosabowski J. K., Mather S. J.: 99mTc-HYNIC-[Tyr3]-octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: preclinical evaluation and comparison with 111In-Octreotide. *J. Nucl. Med.* **41**, 1114-1119 (2000)
95. Decristoforo C., Mather S. J., Cholewinski W., Donnemiller E., Riccabona G., Moncayo R.: 99mTc-EDDA/HYNICTOC: a new 99mTc-labeled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumors: first clinical results and inpatient comparison with 111In-labeled octreotide derivatives. *Eur. J. Nucl. Med.* **27**, 1318-1325 (2000)
96. Zhang Y. M., Liu N., Zhu Z. H., Rusckowski M., Hnatowich D. J.: Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 and DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled antisense DNA. *Eur. J. Nucl. Med.* **27**, 1700-1707 (2000)
97. Ono M., Arano Y., Mukai T., Uehara T., Fujioka Y., Ogawa K., Namba S., Nakayama M., Saga T., Konishi J., Horiuchi K., Yokoyama A., Saji, H.: Plasma

- protein binding of ^{99m}Tc -labeled hydrazino nicotinamide derivatized polypeptides and peptides. *Nucl. Med. Biol.* 28, 155-164 (2001)
98. Ono M., Arano Y., Mukai T., Fujioka Y., Ogawa K., Uehara T., Saga T., Konishi J., Saji H.: ^{99m}Tc -HYNICderivatized ternary ligand complexes for ^{99m}Tc -labeled peptides with low in vivo protein binding. *Nucl. Med. Biol.* 28, 215-224 (2001)
99. Purohit A., Liu S., Ellars Ch. E., Casebier D., Haber S. B., Edwards D. S.: Pyridine-Containing 6-Hydrazinonicotinamide Derivatives as Potential Bifunctional Chelators for ^{99m}Tc -Labeling of Small Biomolecules. *Bioconjug. Chem.* 15, 728-737 (2004)
100. Von Guggenberg E., Mikolajczak R., Janota B., Riccabona G., Decristoforo C.: Radiopharmaceutical Development of a Freeze-Dried Kit Formulation for the Preparation of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-D-Phe1, Tyr3]-Octreotide, a Somatostatin Analog for Tumor Diagnosis. *J. Pharm. Sci.* 93, 2497-2506 (2004)
101. Liu S., Edwards S. D., Harris A. R., Singh P. R.: ^{99m}Tc -labeling kinetics of four thiol-containing chelators and 2-hydrazinopyridine: factors influencing their radiolabeling efficiency. *Appl. Radiat. Isot.* 48, 1103-1111 (1997)
102. Edwards D. S., Liu, S.: ^{99m}Tc -labeling of hydrazinonicotinamide modified highly potent small molecules: Problems and solutions. *Trans. Metal Chem.* 22, 425-426 (1997)
103. Kim Y. S., He Z., Hsieh W. Y., Liu S.: A Novel Ternary Ligand System Useful for Preparation of Cationic ^{99m}Tc -Diazenido Complexes and ^{99m}Tc -Labeling of Small Biomolecules. *Bioconjug. Chem.* 17, 473-484 (2006)
104. Pederson C. J.: Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 2495-2496; *J. Am. Chem. Soc.* 89, 7017-7036 (1967)
105. Bhula R., Osvath P., Weatherburn D. C.: Complexes of tridentate and pentadentate macrocyclic ligands. *Coord. Chem. Rev.* 91, 89-213 (1988)
106. Bernhardt P. V., Lawrance G. A.: Complexes of polyazamacrocycles bearing pendent coordinating groups. *Coord. Chem. Rev.* 104, 297-343 (1990)
107. Pietraszkiewicz M.: Synthetic methods in supermolecular chemistry. *J. Coord. Chem.* 27, 151-199 (1992)
108. Guerriero P., Tamburini S., Vugato P. A.: From mononuclear to polynuclear macrocyclic or macrocyclic complexes. *Coord. Chem. Rev.* 139, 17-243 (1995)
109. Kaden T. A.: Dinuclear metal complexes of bis-macrocycles. *Coord. Chem. Rev.* 190-192, 371-389 (1999)

110. Meares C. F., McCall M. J., et al.: Copper chelates as probes of biological systems: stable copper complexes with a macrocyclic bifunctional chelating agent. *Anal. Biochem.* 148, 249 (1985)
111. Cole W. C., De Nardo S. J., Meares C. F., et al.: Serum stability of Cu-67 chelates: comparison with In-111 and Co-57, *Nucl. Med. Biol.* 13, 363 (1986)
112. Stimmel J. B., Stockstill M. E., Kull Jr. F. C.: Yttrium-90 chelation properties of tetraazatetraacetic acid macrocycles, diethylenetriaminepentaacetic acid analogues, and a novel terpyridine acyclic chelator. *Bioconjug. Chem.* 6, 219-225 (1995)
113. Stimmel J. B., Kull Jr. F. C.: Samarium-153 and lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and cyclic ligands. *Nucl. Med. Biol.* 25, 117-125 (1998)
114. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*. Triton, Praha (2005)
115. http://www-immuno.path.cam.ac.uk/~immuno/part1/lec06/lec6_97.html (staženo 2008)
116. http://www.4-antibody.com/research/antibodies_in_medicine.php (staženo 2008)
117. Goldenberg D. M.: Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J. Nucl. Med.* 43, 393-413 (2002)
118. Fischman A. J., Babich J. W.: Radiolabeled peptides: a new class of imaging agents. In: Freeman L. M., ed. *Nuclear medicine annual 1997*. Lippincott-Raven, Philadelphia (1997)
119. Delaloye A. B., Delaloye B.: Radiolabelled monoclonal antibodies in tumour imaging and therapy: out of fashion? *Eur. J. Nucl. Med.* 22, 571-580 (1995)
120. Behr T. M., Goldenberg D. M.: Improved prospects for cancer therapy with radiolabeled antibody fragments and peptides? *J. Nucl. Med.* 37, 834-836 (1996)
121. Wilder R. B., DeNardo G. L., DeNardo S. J.: Radioimmunotherapy: recent results and future directions. *J. Clin. Oncol.* 14, 1383-1400 (1996)
122. Meredith R. F., LoBuglio A. F., Spencer E. B.: Recent progress in radioimmunotherapy for cancer. *Oncology* 11, 979-987 (1997)
123. Govinden S. V., Goldenberg D. M., Hansen H. J., Griffiths G. L.: Advances in the use of monoclonal antibodies in cancer radiotherapy. *Pharm. Sci. Tech. Today* 3, 90-98 (2000)
124. Knox S. J., Meredith R. F.: Clinical radioimmunotherapy. *Semin. Radiat. Oncol.* 10, 73-93 (2000)
125. Illidge T. M., Brock S.: Radioimmunotherapy of cancer: using monoclonal antibodies to target radiotherapy. *Curr. Pharm. Des.* 6, 1399-1418 (2000)

126. Goldenberg D. M.: Radioimmunotherapy. In: Freeman L. M., ed. *Nuclear Medicine Annual*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)
127. Britton K. E.: Towards the goal of cancer-specific imaging and therapy. *Nucl. Med. Commun.* 18, 992-1007 (1997)
128. De Bie S. H., Ferreira T. C., Pauwels E. K., Cleton F. J.: Immunoscintigraphy for cancer detection: “a thousand ills require a thousand cures”. *J. Can. Res. Clin. Oncol.* 118, 1-15 (1992)
129. Sharkey R. M., Goldenberg D. M.: Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *Canc. Radioimmun.* 46, 115S-127S (2005)
130. Goldenberg D. M.: Radiolabelled monoclonal antibodies in the treatment of metastatic cancer. *Curr. Oncol.* 14, 39-42 (2007)
131. Sharkey R. M., Karacay H., Cardillo T. M., Chang Ch. H., McBride W. J., Rossi E. A., Horak I. D., Goldenberg D. M.: Improving the delivery of radionuclides for imaging and therapy of cancer using pretargeting methods. *Clin. Canc. Res.* 11, 7109S-7121S (2005)
132. <http://www.philotec.it/pag/antibodys.htm> (staženo 2008)
133. Goldenberg D. M.: Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer. *Canc. Immunol. Immunother.* 52, 281-296 (2003)
134. Bunjes D., Buchmann I., Duncker Ch., Seitz U., Kotzerke J., Wiesneth M., Dohr D., Stefanic M., Buck A., Harsdorf S. V., Glatting G., Grimminger W., Karakas T., Munzert G., Dohner H., Bergmann L., Reske S. N.: Rhenium 188-labeled anti-CD66 (a, b, c, e) monoclonal antibody to intensify the conditioning regimen prior to stem cell transplantation for patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome: results of a phase I-II study. *Blood* 98, 565-572 (2001)
135. McAfee J. G., Neumann R. D.: Radiolabeled peptides and other ligands for receptors overexpressed in tumor cells for imaging neoplasm. *Nucl. Med. Biol.* 23, 673-676 (1996)
136. Reubi J. C.: Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Q. J. Nucl. Med.* 41, 63-70 (1997)
137. Reubi J. C., Waser B., Schaer J. C., et al.: Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues in vitro and in vivo. *Eur. J. Nucl. Med.* 25, 481-490 (1998)
138. Spradau T. W., Edwards W. B., Anderson C. J., Welch M. J., Katzenellenbogen J. A.: Synthesis and biological evaluation of Tc-99m-

- cyclopentadienyltricarbonyltechnetium-labeled octreotide. *Nucl. Med. Biol.* 26, 1-7 (1999)
139. Krenning E. P., Bakker W. H., Breeman W. A., et al.: Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin. *Lancet* I, 240-244 (1989)
140. Lister-James J., Moyer B. R., Dean R. T.: Small peptides radiolabeled with ^{99m}Tc. *Q. J. Nucl. Med.* 40, 221-233 (1996)
141. Lister-James J., Moyer B. R., Dean R. T.: Pharmacokinetic considerations in the development of peptide-based imaging agents. *Q. J. Nucl. Med.* 41, 111-118 (1997)
142. Staud F., Nishikawa M., Morimoto K., Takakura Y., Hashida M.: Disposition of radioactivity after injection of liver-targeted proteins labelled with ¹¹¹In or ¹²⁵I. Effect of labeling on distribution and excretion of radioactivity in rats. *J. Pharm. Sci.* 88, 577-585 (1999)
143. Kennedy J. W., Dluhy R. G.: The biology and clinical relevance of somatostatin receptor scintigraphy in adrenal tumor management. *Yale J. Biol. Med.* 70, 565-575 (1997)
144. Moody T. W., Perry D. C.: Peptide receptors. In: Williams M., Glennon R. A., Timmermans P. B. M. W. M., eds. *Receptor pharmacology and function*. Dekker, New York (1989)
145. Mather S. J., Chianelli M.: Radiolabelled cytokines. *Q. J. Nucl. Med.* 40, 290-300 (1996)
146. Breeman W. A. P., Vanhagen M. P., Visserwisselaar H. A., et al.: In vitro and in vivo studies of substance P receptor expression in rats with the new analog [indium 111 DTPA Arg (1)]substance P. *J. Nucl. Med.* 37, 108-117 (1996)
147. Breeman W. A. P., Kwekkeboom D. J., Kooij P. P., et al.: Effect of dose and specific activity on tissue biodistribution of indium-111-pentetreotide in rats. *J. Nucl. Med.* 36, 623-627 (1995)
148. Powell M. F., Grey H., Gaeta F., Sette A., Colon S.: Peptide stability in drug development: a comparison of peptide reactivity in different biological media. *J. Pharm. Sci.* 81, 731-735 (1992)
149. Cuttitta F.: Peptide amidation: signature of bioactivity. *Anat. Rec.* 236, 87-93 (1993)
150. Brazeau P., Vale W., Burgus R., et al.: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179, 77-79 (1973)

151. Epelbaum J.: Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog. Neurobiol.* 27, 63-100 (1986)
152. Krenning E. P., Kwekkeboom D. J., Bakker W. H., et al.: Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]- and [¹²³I-Tyr³]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med.* 20, 716-731 (1993)
153. Reubi J. C., Laissue J., Waser B., Horisberger U., Schaer J. C.: Expression of somatostatin receptors in normal, inflamed, and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Ann. NY Acad. Sci.* 733, 122-137 (1994)
154. Bruno J. F., Xu Y., Song J., Berelowitz M.: Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11151-11155 (1992)
155. Yamada Y., Post S. R., Wang K., Tager H. S., Bell G. I., Seino S.: Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 251-255 (1992)
156. Yamada Y., Reisine T., Law S. F., et al.: Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Mol. Endocrinol.* 6, 2136-2142 (1992)
157. Yamada Y., Kagimoto S., Kubota A., et al.: Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSTR4) and a fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 844-852 (1993)
158. Hoyer D., Bell G. I., Berelowitz M., Epelbaum J., Feniuk W., Humphrey P. P. A., O'Carroll A., Patel Y. C., Schonbrunn A., Taylor J. E., Reisine T.: Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharm. Sci.* 16, 86-88 (1995)
159. Patel Y.: Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrin.* 20, 157-198 (1999)
160. Patel Y. C., Srikant C. B.: Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hSSTR 1-5). *Endocrinology* 135, 2814-2817 (1994)
161. Bell G. I., Reisine T.: Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends. Neurosci.* 16, 34-38 (1993)
162. Walsh J. H.: Gastrin. In: Walsh J. H., Dockray G. J., eds. *Gut peptides: biochemistry and physiology*. Raven Press, New York (1994)
163. Wank S. A.: Cholecystokinin receptors. *Am. J. Physiol.* 269, 628-646 (1995)

164. Trejtnar F., Laznicek M., Laznickova A., Kopecky M., Petrik M., Behe M., Schmidt J., Maecke H., Maina T., Nock B.: Biodistribution and elimination characteristics of two ¹¹¹In-labeled CCK-2/gastrin receptor-specific peptides in rats. *Anticanc. Res.* 27, 907-912 (2007)
165. Rehfeld J. F., van Solinge W. W.: The tumor biology of gastrin and cholecystokinin. *Adv. Cancer. Res.* 63, 295-347 (1994)
166. Camby I., Salmon I., Oiry C., Galleyrand J. C., Nagy N., Danguy A., Brotchi J., Pasteels J. L., Martinez J., Kiss R.: The influence of gastrin and/or cholecystokinin antagonists on the proliferation of three human astrocytic tumor cell lines. *Neuropeptides* 30, 433-437 (1996)
167. Dockray G. J.: Gastrin, growth, and colon neoplasia. *Gut* 47, 747-748 (2000)
168. Wank S. A., Pisegna J. R., de Weerth A.: Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 8691-8695 (1992)
169. Kopin A. S., Lee Y., McBride E. W., Miller L. J., Lu M., Lin H. Y., Kolakowski L. F., Beinborn M.: Expression, cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 3605-3609 (1992)
170. Shulkes A., Baldwin G. S.: Biology of gut cholecystokinin and gastrin receptors. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 24, 209-216 (1997)
171. Singh P., Owlia A., Espejo R., Dai B.: Novel gastrin receptors mediate mitogenic effects of gastrin and processing intermediates of gastrin on Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 270, 8429-8438 (1995)
172. Baldwin G. S., Shulkes A.: Gastrin, gastrin receptors and colorectal carcinoma. *Gut* 42, 581-584 (1998)
173. Rozengurt E., Walsh J. H.: Gastrin, CCK, signaling, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 49-76 (2001)
174. Moriarty P., Dimaline R., Thompson D. G., Dockray G. J.: Characterization of cholecystokinin-A and cholecystokinin-B receptors expressed by vagal afferent neurons. *Neuroscience* 79, 905-913 (1997)
175. Reubi J. C., Waser B., Läderach U., Stettler C., Friess H., Halter F., Schmassmann A.: Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B/gastrin receptors in the human stomach and gallbladder. *Gastroenterology* 112, 1197-1205 (1997)

176. Maillieux P., Vanderhaeghen J. J.: Cholecystokinin receptors of A type in the human dorsal medulla oblongata and meningiomas, and of B type in small cell lung carcinomas. *Neurosci. Lett.* 117, 243-247 (1990)
177. Reubi J. C., Waser B.: Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for *in vivo* multireceptor tumour targeting. *Eur. J. Nucl. Med.* 30, 781-793 (2003)
178. Reubi J. C.: CCK receptors in human neuroendocrine tumors: clinical implications. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 234, 101-104 (2001)
179. Mantyh C. R., Pappas T. N., Vigna S. R.: Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B/gastrin receptors in the canine upper gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 107, 1019-1030 (1994)
180. Saillan-Barreau C., Dufresne M., Clerc P., Sanchez D., Corominola H., Moriscot C., Guy-Crotte O., Escrieut C., Vaysse N., Gomis R., Tarasova N., Fourmy D.: Evidence for a functional role of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in the human fetal and adult pancreas. *Diabetes* 48, 2015-2021 (1999)
181. Upp J. R., Singh P., Townsend C. M., Thompson J. C.: Clinical significance of gastrin receptors in human colon cancers. *Canc. Res.* 49, 488-492 (1989)
182. Sethi T., Herget T., Wu S. V., Walsh J. H., Rozengurt E.: CCK-A and CCK-B receptors are expressed in small cell lung cancer lines and mediate Ca²⁺ mobilization and clonal growth. *Cancer. Res.* 53, 5208-5213 (1993)
183. Matsumori Y., Katakami N., Ito M., Taniguchi T., Iwata N., Takaishi T., Chihara K., Matsui T.: Cholecystokinin-B/gastrin receptor. A novel molecular probe for human small cell lung cancer. *Cancer. Res.* 55, 276-279 (1995)
184. Weinberg D. S., Ruggeri B., Barber M. T., Biswas S., Miknyocki S., Waldman S. A.: Cholecystokinin A and B receptors are differentially expressed in normal pancreas and pancreatic adenocarcinoma. *J. Clin. Invest.* 100, 597-603 (1997)
185. Jensen R. T.: Involvement of cholecystokinin/gastrin-related peptides and their receptors in clinical gastrointestinal disorders. *Pharmacol. Toxicol.* 91, 333-350 (2002)
186. Behr T. M., Jenner N., Radetzky S., Behe M., Gratz S., Yucekent S., Raue F., Becker W.: Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors *in vivo*: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur. J. Nucl. Med.* 25, 424-430 (1998)

187. Béhé M., Becker W., Gotthardt M., Angerstein C., Behr T. M.: Improved kinetic stability of DTPA-dGlu as compared with conventional monofunctional DTPA in chelating indium and yttrium: preclinical and initial clinical evaluation of radiometal labelled minigastrin derivatives. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 30, 1140-1146 (2003)
188. Cuttitta F., Carney D. N., Mulshine J., Moody T. W., Fedorko J., Fischler A., Minna J. D.: Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 316, 823–825 (1985)
189. Bunnett G.: Gastrin-releasing peptide. In: Walsh J. H., Dockray G. J., eds. *Gut peptides: biochemistry and physiology*. Raven Press, Ltd, New York (1994)
190. Walsh J. H.: Gastrointestinal hormones. In: Johnson L. R., ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, Ltd, New York (1994)
191. Moody T. W., Pert C. B., Gazdar A. F., Carney D. N.: High levels of intracellular bombesin characterize human small cell lung carcinoma. *Science* 214, 1246-1248 (1981)
192. Carney D. N., Cuttitta F., Moody T. W., Minna J. D.: Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Canc. Res.* 47, 821-825 (1987)
193. Alexander R. W., Upp J. R., Poston G. J., Gupta V., Townsend C. M., Thompson J. C.: Effects of bombesin on growth of human small cell lung carcinoma *in vivo*. *Canc. Res.* 48, 1439-1441 (1988)
194. Nelson J., Donnelly M., Walkter B., Gray J., Shaw C., Murphy R. F.: Bombesin stimulates proliferation of human breast cancer cells in culture. *Br. J. Canc.* 63, 933-936 (1991)
195. Moody T. W., Cuttitta F.: Growth factor and peptide receptors in small cell lung cancer. *Life Sci.* 52, 1161-1173 (1993)
196. Wang Q. J., Knezetic J. A., Schally A. V., Pour P. M., Adrian T. E.: Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. *Int. J. Canc.* 68, 528-534 (1996)
197. Kim S., Hu W., Kelly D. R., Hellmich M. R., Evers B. M., Chung D. H.: Gastrin-releasing peptide is a growth factor for human neuroblastomas. *Ann. Surg.* 235, 621-630 (2002)
198. Spindel E. R., Giladi E., Brehm P., Goodman R. H., Segerson T. P.: Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor. *Mol. Endocrin.* 4, 1956-1963 (1990)

199. Wada E., Way J., Shapira H., Kusano K., Lebacqz-Verheyden A. M., Coy D., Jensen R., Battey J.: cDNA cloning, characterization and brain region-specific expression of a neuromedin-B preferring bombesin receptor. *Neuron*. 6, 421-430 (1991)
200. Fathi Z., Corjay M. H., Shapira H., Wada E., Benya R., Jensen R., Viallet J., Sausville E. A., Battey J. F.: BRS-3: novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 268, 5979-5984 (1993)
201. Nagalla S. R., Barry B. J., Creswick K. C., Eden P., Taylor J. T., Spinel E. R.: Cloning of a receptor for amphibian [Phe13]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6205-6209 (1995)
202. O'Dorisio M. S.: Neuropeptide modulation of the immune response in gut associated lymphoid tissue. *Int. J. Neurosci.* 38, 189–198 (1988)
203. Ottaway C. A., Lay T. E., Greenberg G. R.: High affinity specific binding of vasoactive intestinal peptide to human circulating T cells, B cells and large granular lymphocytes. *J. Neuroimmun.* 29, 149–155 (1990)
204. Magistretti P. J., Journot L., Bockaert J., Martin J. L.: Brain PACAP/VIP receptors: regional distribution, functional properties and physiological relevance. In: Quirion R., Björklund A., Hökfelt T., eds. *Handbook of chemical neuroanatomy. Elsevier Science BV*, Amsterdam (2000)
205. Pozo D., Delgado M., Martinez M., Guerrero J. M., Leceta J., Gomariz R. P., Calvo J. R.: Immunobiology of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immun. Today* 21, 7–11 (2000)
206. Goetzl E. J., Voice J. K., Shen S., Dorsam G., Kong Y., West K. M., Morrison C. F., Harmar A. J.: Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC (2) receptor for vasoactive intestinal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13854–13859 (2001)
207. Harmar A. J., Arimura A., Gozes I., Journot L., Laburthe M., Pisegna J. R., Rawlings S. R., Robberecht P., Said S. I., Sreedharan S. P., Wank S. A., Waschek J. A.: International union of pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol. Rev.* 50, 265–270 (1998)
208. Vaudry D., Gonzalez B. J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol. Rev.* 52, 269–324 (2000)

209. Dautzenberg F. M., Mevenkamp G., Wille S., Hauger R. L.: N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants. *J. Neuroendocrin.* 11, 941–949 (1999)
210. Daniel P. B., Kieffer T. J., Leech C. A., Habener J. F.: Novel alternatively spliced exon in the extracellular ligand-binding domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) selectively increases ligand affinity and alters signal transduction coupling during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 276, 12938-12944 (2001)
211. Reubi J. C.: *In vitro* evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues: clinical implications. *Ann. NY Acad. Sci.* 921, 1-25 (2000)
212. Busto R., Prieto J. C., Bodega G., Zapatero J., Carrero I.: Immunohistochemical localization and distribution of VIP/PACAP receptors in human lung. *Peptides* 21, 265-269 (2000)
213. Reubi J. C., Waser B., Schaer J. C., Laissue J. A.: Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur. J. Nucl. Med.* 28, 836-846 (2001)
214. Reubi J. C., Läderach U., Waser B., Gebbers J. O., Robberecht P., Laissue J. A.: Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Canc. Res.* 60, 3105-3112 (2000)
215. Carraway R., Leeman S. E.: The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem.* 248, 6854–6861 (1973)
216. Kitabgi P., Carraway R., Leeman S. E.: Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J. Biol. Chem.* 251, 7053–7058 (1976)
217. Vincent J. P., Mazella J., Kitabgi P.: Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends. Pharm. Sci.* 20, 302–309 (1999)
218. Evers B. M., Izukura M., Chung D. H., Parekh D., Yoshinaga K., Greeley G. H., Uchida T., Townsend C. M., Thompson J. C.: Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. *Gastroenter.* 103, 86-91 (1992)
219. Ishizuka J., Townsend Jr. C. M., Thompson J. C.: Neurotensin regulates growth of human pancreatic cancer. *Ann. Surg.* 217, 439-446 (1993)
220. Reubi J. C., Waser B., Friess H., Büchler M., Laissue J.: Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut* 42, 546-550 (1998)

221. Eberle A. N.: The Melanotropins: Chemistry, physiology and mechanism of action. In: Eberle A. N., ed *The Melanotropins: Chemistry, physiology and mechanism of action*. Karger, Basel (1988)
222. Sawyer T. K., Staples D. J., Castrucci A. M., Hadley M. E., Al-Obeidi F. A., Cody W. L., Hruby V. J.: α -Melanocyte stimulating hormone message and inhibitory sequences: comparative structure-activity studies on melanocytes. *Peptides* **11**, 351–357 (1990)
223. Siegrist W., Eberle A. N.: Melanocortins and their implication in melanoma. *Trends Endocrin. Metab.* **6**, 115-120 (1995)
224. Siegrist W., Solca F., Stutz S., Giuffre L., Carrel S., Girard J., Eberle A. N.: Characterization of receptors for α -melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer* **49**, 6352–6358 (1989)
225. Bard D. R., Wraight E. P., Knight C. G.: BisMSH-DTPA: a potential imaging agent for malignant melanoma. *Ann. NY Acad. Sci.* **680**, 451-453 (1993)
226. Bagutti C., Stolz B., Albert R., Bruns C., Pless J., Eberle A. N.: [^{111}In]-DTPA-labeled analogues of alpha-melanocyte-stimulating hormone for melanoma targeting: receptor binding in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer.* **58**, 749-755 (1994)
227. Hökfelt T., Pernow B., Wahren J.: Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J. Intern. Med.* **249**, 27-40 (2001)
228. Hennig I. M., Laissue J. A., Horisberger U., Reubi J. C.: Substance P receptors in human primary neoplasms: tumoural and vascular localisation. *Int. J. Canc.* **61**, 786-792 (1995)
229. Friess H., Zhu Z., Liard V., Shi X., Shrikhande S. V., Wang L., Lieb K., Korc M., Palma C., Zimmermann A., Reubi J. C., Büchler M. W.: Neurokinin-1 receptor (NK-1R) expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab. Inv.* **83**, 731-742 (2003)
230. Liu S., Edwards D. S.: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. **99**, 2235-2268 (1999)
231. Hom R. K., Katzenellenbogen J. A.: Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: recent developments and encouraging results. **24**, 485-498 (1997)
232. Chen J., Cheng Z., Hoffman T. J., Jurisson S. S., Quinn T. P.: Melanoma targeting properties of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled cyclic alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogs. *Canc. Res.* **60**, 5649-5658 (2000)

233. Giblin M. F., Jurisson S. S., Quinn T. P.: Conjugation of a peptide-rhenium complex to alpha melanotropin analogs. *Bioconjug. Chem.* **8**, 347-353 (1997)
234. <http://old.lf3.cuni.cz/nuklearnimediceina/scriptai.htm> (staženo 2008)
235. Coenen H. H., Mertens J., Maziere B.: Radioionidation reactions for pharmaceuticals. *Springer*, Dordrecht (2006)
236. http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc (staženo 2008)
237. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J.: Fundamentals of analytical chemistry. *Saunders college publishing*, Orlando (1996)
238. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: Základní analytická chemie. *Karolinum*, Praha (2003)
239. Český lékopis 2002, *Grada publishing*, Praha (2002)
240. Opletal L., Drašar P.: Fotochemické metody. *Karolinum*, Praha (1994)
241. <http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/chrom/chrom.pdf> (staženo 2007)
242. Český lékopis 2005, *Grada publishing*, Praha (2005)
243. <http://www.krackeler.com/products/1375-Supplies/23123-Gelman-ITLC-Media.htm> (staženo 2008)
244. http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/GE_gelfiltration.pdf (staženo 2007)
245. Zýka J., a kol.: Analytická příručka. *SNTL/ALFA*, Praha (1979)
246. http://www.viscotek.com/theory_gpc_sec.php4 (staženo 2008)
247. Melis M., Krenning E. P., Bernard B. F., Barone R., Visser T. J., De Jong M.: Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* **10**, 1136-1143 (2005)
248. De Jong M., Barone R., Krenning E. P., Bernard B., Melis M., Visser T. J., Gekle M., Willnow T. E., Walrand S., Jamar F., Pauwels S.: Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of ^{111}In -DTPA-Octreotide. *J Nucl Med* **10**, 1696-1700 (2005)