

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie



**Rádioaktivne značené RGD peptidy pre
zobrazovanie nádorov**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Andrea Danišková
Vedúci práce:	PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.
Študijný program:	B 1407 Chémia
Študijný odbor:	Bioorganická chémia a chemická biológia
Forma štúdia:	Prezenčná
Rok:	2020

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Andrea Danišková
Názov práce	Rádioaktívne značené RGD peptidy pre zobrazovanie nádorov
Typ práce	Bakalárska
Katedra	Katedra organickej chémie Ústav molekulárnej a translačnej medicíny
Vedúci práce	PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Táto bakalárska práca sa zaoberá chemickou syntézou a biologickou štúdiou konjugátu cyklického RGD peptidu s chelatačným činidlom deferoxamínom. Hlavnou časťou práce je posúdenie potenciálu pripraveného konjugátu značeného rádioaktívnym izotopom gália-68 pre diagnostiku multiformného glioblastómu. Rádioaktívne značený peptid, ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK), bol podrobený preklinickému testovaniu, ktoré zahrňovalo zobrazovanie glioblastómu metódou pozitronovej emisnej tomografie. Získané dáta boli porovnané s inými klinicky používanými rádioaktívne značenými RGD peptidmi. Multiformný glioblastóm predstavuje jeden z najmalígnejších typov nádorov centrálného nervového systému, a preto je včasná a presná diagnóza kľúčovým faktorom jeho účinnej terapie.

Kľúčové slová	multiformný glioblastóm, gálium-68, pozitronová emisná tomografia, výpočtová tomografia, rádiofarmakum, ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK), syntéza na pevnej fáze
Počet strán	72
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author	Andrea Danišková
Title	Radiolabeled RGD peptides for tumor imaging
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Organic chemistry The Institute of Molecular and Translational Medicine
Supervisor	PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

The bachelor thesis reports on the synthesis of RGD peptide conjugated with chelating agent deferoxamine. The main aim of the project is a preclinical testing of RGD peptide radiolabeled with gallium-68 including imaging of glioblastoma multiforme by means of positron emission tomography. The obtained results were compared with other clinically used radiolabeled RGD peptides. Glioblastoma multiforme is one of the most malignant types of brain tumor, therefore early and accurate diagnosis is crucial for effective treatment.

Keywords	glioblastoma multiforme, gallium-68, positron emission tomography, computed tomography, radiopharmaceutical, ⁶⁸ Ga-DFO-c(RGDyK), solid-phase synthesis
Number of pages	72
Language	Slovak

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu „*Rádioaktívne značené RGD peptidy pre zobrazovanie nádorov*“ vypracovala samostatne pod vedením PharmDr. Miloša Petříka, Ph.D., s použitím odbornej literatúry a ďalších zdrojov, ktoré sú uvedené v zozname použitej literatúry.

V Olomouci dňa

.....

Andrea Danišková

Pod'akovanie

Predovšetkým by som chcela poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce PharmDr. Milošovi Petříkovi, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a ochotu pri vypracovaní záverečnej práce. Taktiež patrí obrovské poďakovanie Mgr. Soni Krajčovičovej, Ph.D., za pomoc s chemickou časťou práce, za pripomienky, neoceniteľné rady a nekonečnú ochotu. V neposlednom rade patrí najväčšie ďakujem mojej rodine, ktorá ma neprestala podporovať po celú dobu štúdia a bez ktorých by táto práca inak nevznikla.

Obsah

Zoznam skratiek	9
Úvod	12
Teoretická časť	13
1 Nádorové ochorenia	13
1.1 Multiformný glioblastóm	14
1.2 Diagnostika a liečba glioblastómu	15
2 Zobrazovacie metódy	17
2.1 Magnetická rezonancia a výpočtová tomografia	17
2.2 Metódy nukleárnej medicíny	18
3 Rádiofarmaká	19
3.1 Rádioaktívne žiarenie	19
3.2 Gálium	20
3.3 ⁶⁷ Ga/ ⁶⁸ Ga rádiofarmaká	22
3.4 Rádiofarmaká využívané v onkológii	23
4 RGD peptidy	24
4.1 Integríny	25
4.1.1 $\alpha_v\beta_3$ integríny	26
4.2 Cyklické RGD peptidy	27
4.3 Syntetická príprava peptidov	28
4.4 Metódy rádioaktívneho značenia peptidov	29
4.5 Konjugácia peptidov s chelátormi	30
4.5.1 DOTA	30
4.5.2 NOTA	31
4.5.3 Desferal	31
4.6 Využitie RGD peptidov v medicíne	33
Experimentálna časť	37

5	Príprava konjugátu DFO-c(RGDyK).....	37
5.1	Acylácia 2-chlorotrytylového resínu pomocou Fmoc-Gly-OH aminokyseliny	38
5.2	Odchránenie Fmoc chrániacej skupiny	39
5.3	Acylácia s Fmoc-Arg(Pbf)-OH aminokyselinou	39
5.4	Acylácia s Fmoc-Lys(Dde)-OH aminokyselinou	39
5.5	Acylácia s Fmoc-D-Tyr(^t Bu)-OH aminokyselinou	40
5.6	Acylácia s Fmoc-Asp(^t Bu)-OH aminokyselinou	40
5.7	Štiepenie z resínu so zachovaním chrániacich skupín a následná cyklizácia	41
5.8	Odchránenie Dde chrániacej skupiny	42
5.9	Acylácia s deferoxamínom-NCS a odchránenie zvyšných chrániacich skupín	43
6	Príprava a testovanie rádioaktívne značeného DFO-c(RGDyK).....	44
6.1	Rádioaktívne značenie	44
6.2	Kontrola kvality značenia	44
6.3	Testy stability.....	45
6.4	Rozdeľovací koeficient.....	46
6.5	Väzba na plazmatické proteíny	46
6.6	<i>In vivo</i> experimenty.....	47
6.6.1	Testovanie <i>in vivo</i> stability v moči.....	47
6.6.2	PET/CT zobrazovanie.....	47
6.6.3	<i>Ex vivo</i> biodistribučné štúdie.....	48
7	Výsledky	48
7.1	Syntéza konjugátu DFO–RGDyK.....	48
7.1.1	Syntéza cyklického peptidu	48
7.1.2	Acylácia s deferoxamínom.....	51
7.2	Rádioaktívne značenie	52
7.3	Testy stability.....	53
7.4	Rozdeľovací koeficient.....	54

7.5	Väzba na plazmatické proteíny	54
7.6	Testovanie <i>in vivo</i> stability v moči	54
7.7	PET/CT zobrazovanie zdravých myší	55
7.8	PET/CT zobrazovanie nádorových myší	56
7.9	<i>Ex vivo</i> biodistribúcia u zdravých myší.....	57
7.10	<i>Ex vivo</i> biodistribúcia u nádorových myší.....	57
8	Diskusia	59
9	Záver	65
10	Spektrálna charakteristika.....	66
	Zoznam obrázkov	68
	Referencie.....	69

Zoznam skratiek

ACN	acetonitril
Arg	arginín
Asp	asparágová kyselina
Bq	Becquerel (MBq – megabecquerel, GBq – gigabecquerel)
CPM	počet impulzov za minútu, <i>angl.</i> counts per minute
CT	výpočtová tomografia, <i>angl.</i> computed tomography
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DFO	deferoxamín
DFO-NCS	deferoxamín izotiokyanát
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropylkarbodiimid
DIPEA	<i>N,N'</i> -diizopropyletylamín
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>angl.</i> deoxyribonucleic acid
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DOTAGA	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1-(glutárová kyselina)-4,7,10-trioctová kyselina
DTPA	kyselina dietyléntriámín-pentaoctová
EDTA	kyselina etyléndiamín-tetraoctová
ESI	elektrosprejová ionizácia, <i>angl.</i> electrospray ionization
FDG	fluórodeoxyglukóza
FLT	fluórotymidín
Fmoc	fluóroenylmetoxykarbonyl protektívna skupina
GBD	Global Burden of Disease
GBM	multiformný glioblastóm, <i>angl.</i> glioblastoma multiforme
Gly	glycín
Gy	Gray
HFiP	hexafluóroizopropanol
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia, <i>angl.</i> high-performance liquid chromatography

HRMS	hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením, <i>angl.</i> high-resonance mass spectrometry
IR	infračervené žiarenie, <i>angl.</i> infrared radiation
LC/MS	kvapalinová chromatografia-hmotnostný spektrometer, <i>angl.</i> liquid-chromatography-mass spectrometry
Leu	leucín
LT	laboratórna teplota
Lys	lysín
MGMT	metylguanín DNA-metyltransferáza
MR	magnetická rezonancia, <i>angl.</i> magnetic resonance
MRS	magnetická rezonančná spektroskopia, <i>angl.</i> magnetic resonance spectroscopy
NMR	nukleárna magnetická rezonancia, <i>angl.</i> nuclear magnetic resonance
NODAGA	1-(1,3-karboxypropyl)-4,7-karboxymetyl-1,4,7-triazacyklononan
NODASA	1,4,7-triazacyklononán- <i>N</i> -jantárová kyselina- <i>N',N''</i> -dioctová kyselina
NOTA	1,4,7-triazacyklononán-1,4,7-trioctová kyselina
p.i.	po podaní, <i>angl.</i> post injection
PBS	fosfátový pufor
PET	pozitronová emisná tomografia, <i>angl.</i> positron emission tomography
PSMA	prostatický špecifický membránový antigén, <i>angl.</i> prostate-specific membrane antigen
PyBOB	benzotriazol-1-yl-oxytrispyrolidin fosfonium hexafluórofosfát
resín	polystýrenová živica
r.o.	retroorbitálne, <i>angl.</i> retro orbital
RGD	sekvencia arginín-glycín-asparágová kyselina
RCHČ	rádiochemická čistota
RTG	röntgenové žiarenie
SD	smerodajná odchýlka
SST	somatostatín
SSTR	receptory somatostatínu
SPECT	jednofotónová emisná výpočtová tomografia, <i>angl.</i> single-photon emission computed tomography
tBu	terc-butyl
TFA	kyselina trifluóroctová, <i>angl.</i> trifluoroacetic acid
TMZ	Temozolomide
Tyr	tyrozín

UHPLC	ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia, <i>angl.</i> ultra-high performance liquid chromatography
UV	ultrafialové žiarenie, <i>angl.</i> ultraviolet
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia, <i>angl.</i> World Health Organization

Úvod

Glioblastóm, známy tiež ako multiformný glioblastóm (GBM) alebo astrocytóm štvrtého stupňa, je jedným z najzávažnejších a najagresívnejších typov nádorov centrálného nervového systému. Napriek technologickému pokroku v chirurgii, chemoterapii, radiačnej terapii, ale aj rádiochemickej terapii v posledných rokoch zostáva glioblastóm do značnej miery odolný voči liečbe.

Glioblastóm, podobne ako všetky nádory, je výsledkom neprimeraného delenia buniek. V tomto prípade sa gliové bunky, ktoré normálne obklopujú a chránia nervové bunky mozgu, množia bez obmedzenia. Nádor sa šíri zákerne celým mozgom bez jasného ohraničenia, čo výrazne sťažuje chirurgický zákrok. Priemerne sa pacienti dožívajú 10–12 mesiacov od diagnostiky, pričom doba prežitia sa môže líšiť medzi jednotlivcami. Približne 10 % pacientov sa doživa dvoch, prípadne viac rokov. Práve preto je včasná a presná diagnóza kľúčovým aspektom pri zlepšení kvality a dĺžky života každého jedného pacienta.

Zobrazovacie techniky zohrávajú dôležitú rolu pri diagnostike glioblastómu a následnom monitorovaní terapeutической odpovede. Hoci je zobrazovanie pomocou magnetickej rezonancie (MR) prvou voľbou, po ktorej sa siahajú, pozitronová emisná tomografia (PET) sa výrazne dostáva do popredia pri diagnostike gliómov. Pri zobrazovaní sa uplatňujú najmä hybridné systémy PET/CT a PET/MR, ktoré predstavujú kombináciu dvoch zobrazovacích techník, čím umožňujú získať ucelenejšie dáta v rámci jedného vyšetrenia.

Počas klinického PET vyšetrenia zohrávajú dôležitú úlohu tzv. rádiofarmaká. PET skenovanie si vyžaduje aplikáciu malého množstva nosiča, ktorým môže byť napr. glukóza, peptid, apod., ktorý je značený vhodným rádionuklidom. Najbežnejším rádioaktívnym izotopom používaným pre PET aplikácie je fluór-18, pričom väčšina štúdií sa zameriava na vlastnosti a použitie ¹⁸F-fluórodeoxyglukózy, najpoužívanejšieho PET rádiofarmaka. Na získanie informácií o špecifických dráhach bunkových a molekulárných nádorov je v súčasnosti k dispozícii množstvo nových zlúčenín s perspektívou pre PET zobrazovanie. Medzi zaujímavé potenciálne rádiofarmaká použiteľné ku zobrazovaniu gliómov patria napr. rádioaktívne značené RGD peptidy.

Teoretická časť

1 Nádorové ochorenia

Nádorové ochorenia zahŕňajú širokú skupinu chorôb, ktoré môžu ovplyvniť ktorúkoľvek časť tela. Najväčším problémom je nekontrolovateľný rast a šírenie buniek, pričom napádajú okolité tkanivá a metastázujú. Jedná sa o druhú najčastejšiu príčinu úmrtí na celom svete, hneď po kardiovaskulárnych ochoreniach.¹

Podľa štúdie Global Burden of Disease (GBD) z roku 2015, ktorá bola vykonaná ako súčasť komplexného regionálneho a globálneho výskumného programu, ktorý hodnotí úmrtnosť a zdravotné postihnutie spôsobené závažnými ochoreniami, zraneniami a rizikovými faktormi, a ktorého sa zúčastňuje viac ako 500 výskumných pracovníkov zastupujúcich vyše 300 inštitúcií a 50 krajín, sa úmrtnosť v dôsledku nádorových ochorení medzi rokmi 2005 a 2015 znížila, aj napriek zvyšujúcej sa globálnej incidencii rakoviny v tomto období.¹ Je tomu tak vďaka výraznému zdokonaleniu diagnostiky rakoviny, pričom mnohé štúdiá sa naďalej zameriavajú na objavenie nových terapií, ktoré by dokázali znížiť vedľajšie účinky už zaužívaných prístupov ku liečbe, a tým znížiť úmrtnosť o niekoľko percent.

Ďalšou z možností zníženia úmrtnosti je včasná diagnostika tohto ochorenia. Pokiaľ sa rakovina podchyť v skorom štádiu, je omnoho pravdepodobnejšie, že bude odpovedať na liečbu. Avšak pokiaľ dôjde k zisteniu rakoviny v niektorých z neskorších, či posledných štádií, liečba už nemusí byť účinná. Screening u zdravých aj vysokorizikových populácií ponúka príležitosť na včasné odhalenie rakoviny so zvýšenou možnosťou liečby. V súčasnosti existuje možnosť screeningu u niektorých typov nádorových ochorení, avšak každý test má obmedzenia a mnohé ďalšie potrebujú dodatočné vylepšenia.²

Mechanizmus vzniku rakoviny, teda premeny normálnych buniek na nádorové, zahŕňa viacstupňový proces, ktorý všeobecne prechádza z prekanceróznej lézie na malígnu tumor. Tieto zmeny sú výsledkom interakcie genetických faktorov a externých činiteľov, ktoré možno rozdeliť na fyzikálne, chemické a biologické. Mnohým typom nádorových ochorení sa dá zabrániť, avšak jedným zo základných faktorov vývoja rakoviny je aj starnutie. Výskyt rakoviny dramaticky stúpa s vekom, pričom u takýchto

pacientov je rakovina sprevádzaná inými ochoreniami. Taktiež je u nich bunková oprava menej účinná než u mladého človeka a tým sa znižujú šance na prežitie.

Najbežnejším typom je rakovina pľúc, ktorá predstavuje približne 22 % prípadov. U žien sa najčastejšie stretávame s rakovinou prsníka a u mužov s rakovinou prostaty. Medzi ďalšie, často sa vyskytujúce nádorové ochorenia, možno zaradiť karcinóm kože, kolorektálny karcinóm, či rakovinu niektorého z ostatných orgánov gastrointestinálneho traktu.³ Medzi jedny z najnebezpečnejších druhov rakoviny možno zaradiť rôzne typy nádorov mozgu, ktoré sú vo väčšine prípadov sprevádzané až fatálnymi následkami.

Ako už bolo spomenuté, správna diagnóza je nevyhnutná pre primeranú a účinnú liečbu. Každý typ rakoviny vyžaduje špecifický liečebný režim, ktorý zahŕňa jednu alebo viac modalít, ako je chirurgický zákrok, rádioterapia a chemoterapia. Stanovenie cieľov liečby a paliatívnej starostlivosti je dôležitým prvým krokom. Hlavným cieľom je vyliečiť rakovinu alebo podstatne predĺžiť dĺžku života. Taktiež je dôležité zlepšiť kvalitu života pacienta, čo možno dosiahnuť podpornou alebo paliatívnou starostlivosťou a psychologickou podporou.³

V tejto práci som sa zamerala na preklinický výskum jedného z typov rakoviny mozgu, konkrétne som používala model U87-MG buniek, čo sú bunky ľudského glioblastómu. Bunky som detekovala pomocou zobrazovacích metód nukleárnej medicíny s využitím rádioaktívne značeného RGD peptidu. Nádory mozgu a centrálného nervového systému sú 10. najčastejšou príčinou úmrtí u mužov a žien.⁴ Primárne mozgové nádory vznikajú z mnohých typov tkanív ako sú spomínané gliové bunky, astrocyty, či iné bunky, zatiaľ čo metastatické typy sú spôsobené šírením rakovinových buniek z tela priamo do mozgu.

1.1 Multiformný glioblastóm

Multiformný glioblastóm je považovaný za najagresívnejší glióm, súbor nádorov vychádzajúcich z glie alebo ich prekursorov v centrálnom nervovom systéme. Glie, tiež gliové bunky, či neuroglie, predstavujú podporné bunky neurónov. Klinicky sa gliómy delia na štyri stupne, pričom najagresívnejší štvrtý stupeň, multiformný glioblastóm, je zároveň najbežnejším typom u ľudí.⁵ Polovica dospelých pacientov zomrie v priebehu 10 až 12 mesiacov po diagnóze a len 10 % pacientov sa dožíva až 24 mesiacov po stanovení diagnózy. Tento druh rakoviny postihuje hlavne pacientov vo veku 55 až 84 rokov, pričom príčiny väčšiny glioblastómov doposiaľ nie sú známe.⁶ Napriek niekoľkým klinickým štúdiám zameraným na antiangiogénne ciele terapie, teda terapie brániace vzniku nových ciev, ktoré by mohli zásobovať tumor krvou, zostáva lekárska starostlivosť o glioblastóm v poslednom desaťročí bez výrazného zlepšenia. Včasná diagnostika

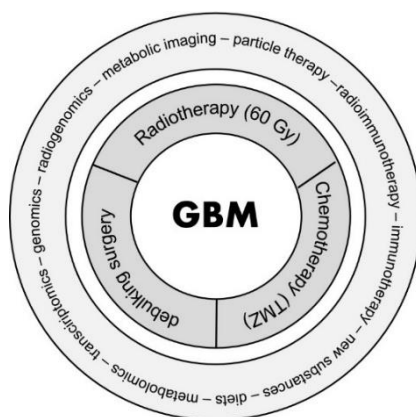
zabezpečujúca možnosť úplnej resekcie tumoru zvyšuje pravdepodobnosť úplného vyliečenia. Prognóza závisí od mnohých faktorov, avšak u mnohých pacientov je nepriaznivá a liečba má len paliatívny charakter. Preto mnohé súčasné štúdie kladú dôraz najmä na včasné odhalenie rakoviny a zlepšenie života pacientov. Významnú úlohu v diagnostike zohrávajú najmä sofistikované zobrazovacie techniky, ktoré môžu veľmi presne určiť polohu a rozsah nádorov.⁷

1.2 Diagnostika a liečba glioblastómu

Jedným z hlavných problémov liečby glioblastómu je nedostatok účinných diagnostických stratégií. V súčasnosti sa diagnostické metódy spoliehajú najmä na neurologické testy a anatomické zobrazovanie, ktoré sa často vykonávajú až v pokročilom štádiu ochorenia. Práve kvôli absencii účinných farmakologických a chirurgických liečebných postupov je identifikácia skorých štádií kľúčová pre zlepšenie miery prežitia a pre vývoj nových terapeutických metód.⁸

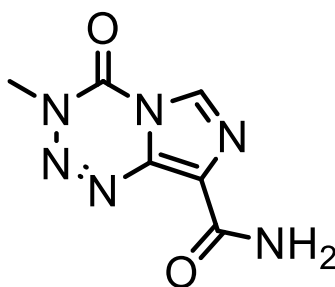
Štandardnou liečbou glioblastómu (obr. 1) je chirurgický zákrok. Tento prístup zahŕňa zváženie maximálnej chirurgickej resekcie nádorového tkaniva aj napriek tomu, že nie je možné odstrániť celý nádor. Samotný glioblastóm vykazuje vysokú agresivitu, ktorá sa vyznačuje infiltráciou okolitého tkaniva a rozsiahlou vaskularizáciou nádoru. Práve preto je táto metóda spojená s užívaním liekov a/alebo radiačnou terapiou.⁹ Krátko po vyvinutí ožarovacej terapie bolo preukázané, že kombináciou chemoterapie a rádioterapie je možné predĺžiť život pacientov.¹⁰ Dnes je bežná kombinovaná liečba, vrátane samotnej rádioterapie alebo chemoterapie pred operáciou, a takisto po nej. Chemoterapiu možno použiť aj v prípade oddialenia rádioterapie u mladších pacientov.⁹

Chemoterapia nachádza uplatnenie pri znižovaní nádoru, a taktiež ako nasledujúci krok po chirurgickom zákroku na zničenie zvyšných rakovinových buniek. Podáva sa systematicky, teda do celého tela v podobe tabletky, injekcie alebo infúzie.



Obrázok 1- Štandardná liečba glioblastómu¹¹

V súčasnosti patrí medzi najužívanejší liek multiformného glioblastómu Temozolomide (TMZ) (obr. 2). Radí sa medzi alkylačné činidlá, pričom jeho úlohou je spomaliť alebo zastaviť rast nádorových buniek. Avšak zdedená a získaná rezistencia znemožňuje úspešnú liečbu. Priamy opravný proteín metylguanín DNA-metyltransferáza (MGMT) odstraňuje cytotoxickú O6-metylguanín (O6-MeG) léziu dodávanú TMZ, čím jej expresia nádormi poskytuje rezistenciu. Tzv. „DNA mismatch repair“, skorý postreplikačný kontrolný a opravný mechanizmus, sa stáva nevyhnutným pre spracovanie O6-MeG aduktov. Jeho nedostatok vedie ku tolerancii lézií, rezistencii TMZ a ďalším mutáciám DNA.¹²



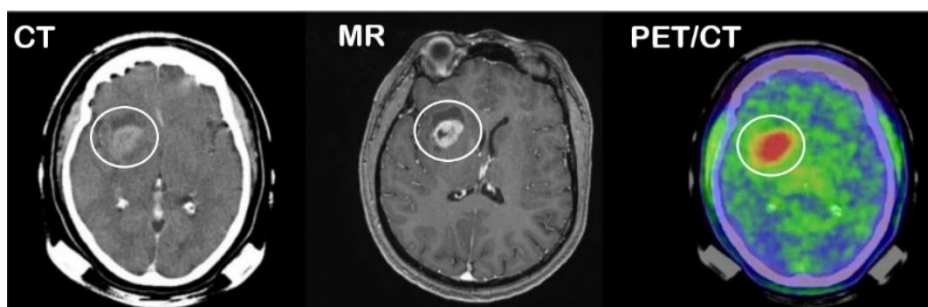
Obrázok 2- Chemická štruktúra Temozolomide (TMZ)

Radiačná terapia môže pomôcť kontrolovať rast nádoru a takisto sa môže použiť namiesto chirurgického zákroku alebo popri ňom. Tradičná radiačná terapia je alternatívou operácie a podobne ako chemoterapia môže odstrániť pozostalé rakovinové bunky. Bežným štandardným postupom je opakované ožarovanie 1,8 Gy (Gray – jednotka absorbovanej dávky) denne po dobu 6 týždňov. Vzhľadom na horšiu prognózu u starších pacientov prebehli viaceré štúdie, ktorých cieľom bolo zhodnotiť kratšie cykly rádioterapie. Kratší priebeh, nazývaný tiež hypofrakcia, znamená podanie vyššej dennej dávky, čo vedie ku kratšiemu trvaniu celkovej liečby. Prvá náhodná štúdia však nepreukázala žiadny rozdiel v prežití medzi 6 týždňovým a 3 týždňovým ožarovaním.¹³

Pretože tieto postupy neposkytujú dlhodobé riešenia, pozornosť výrazne začínajú priťahovať nové alternatívne spôsoby liečby, vrátane prírodných zlúčenín a fytochemikálií, teda látok nachádzajúcich sa v rastlinách. Vďaka svojmu prírodnému pôvodu vykazujú minimálnu bunkovú toxicitu voči normálnym bunkám, a tým sa stávajú jednými z najatraktívnejších prístupov pri liečbe nádorov.¹⁴

2 Zobrazovacie metódy

Kľúčovú rolu v diagnostike glioblastómu zohráva neuroimaging a následná biopsia, teda histologické potvrdenie alebo vyvrátenie diagnózy. Vykonáva sa v prípadoch, kedy človek trpí relevantnými symptómami ako sú záchvaty, neurologické deficity, či zmeny osobnosti.¹⁵ Diagnostické nástroje zahŕňajú primárne výpočtovú tomografiu (CT) a magnetickú rezonanciu (MR) (obr. 3). Intraoperačná MR môže byť tiež užitočná a to počas chirurgického zákroku pri usmerňovaní biopsií tkanív a odstraňovaní nádoru. Medzi ďalšie využívané metódy patrí magnetická rezonančná spektroskopia (MRS), ktorá sa používa na skúmanie chemického profilu nádoru. Pozitronová emisná tomografia (PET) zas často pomáha pri zisťovaní recidívy nádoru a spoločne s jednofotónovou emisnou výpočtovou tomografiou (SPECT) umožňuje zobraziť priestorové rozloženie rádioaktívne značenej látky po aplikácii do organizmu. Hovoríme o metódach nukleárnej medicíny, ktoré v posledných rokoch zaznamenali veľký rozvoj, a to najmä v kombinácii formou hybridných zobrazovacích systémov SPECT/CT, PET/CT (obr. 3) a PET/MR. Nedávny pokrok nukleárnej medicíny bol posúvaný vpred aj vďaka biotechnologickému pokroku, ktorý predstavuje rádioimunoterapiu a rádiopeptidovú terapiu, metódy predstavujúce sľubný krok vpred pre terapiu glioblastómu.⁷



Obrázok 3- CT, MR, PET/CT sken multiformného glioblastómu (prevzaté a upravené)¹⁶

2.1 Magnetická rezonancia a výpočtová tomografia

Magnetická rezonancia je primárne používanou zobrazovacou metódou pre diagnostiku glioblastómu, avšak pre pacientov s kardiostimulátorom, inzulínovou pumpou, či niektorým typom ortopedických alebo neurochirurgických implantátov predstavuje toto vyšetrenie vysoké riziko. U takýchto pacientov sa uprednostňuje výpočtová tomografia, ktorá umožní rozoznať nádory od veľkosti 5 mm. Z hľadiska bezpečnosti je MR bezpečnejšou metódou, pretože na rozdiel od CT, ktoré využíva röntgenové žiarenie

(RTG), MR využíva elektromagnetické vlnenie. To nezaťažuje pacienta v takej miere ako RTG lúče.

Na snímkach z MR je glioblastóm často zobrazený ako slabo ohraničená heterogénna lézia, obklopená edémom. Práve preto je obťažné správne identifikovať mozgové lézie. Iné diagnózy zvyčajne zahŕňajú astrocytóm nižšieho stupňa, metastázy a násobné lézie sklerózy multiplex. Novšie techniky MR ako sú difúzia, perfúzia, a spektroskopia umožňujú lepšie charakterizovať jednotlivé mozgové lézie.¹⁵

Pokročilá difúzna technika je založená na vlastnostiach pohybu vody v príslušnom prostredí. Je značne používaná na pozorovanie vnútornej štruktúry nádorového tkaniva, čím uľahčuje rozlíšenie medzi gliómami nízkeho a vysokého stupňa. Cieľom rôznych perfúzných techník je meranie vaskulárnej nepriechodnosti nádoru a podstatnej časti nádorovej neovaskulatúry. Jedným z najslubnejších prístupov zobrazovania pomocou perfúzie je MR so zvýšenou kontrastnou dynamikou. Odhaľuje mikrovaskulárne zmeny v nádorových tkanivách, ktoré súvisia so stupňom nádoru a klinickým výsledkom.¹¹

2.2 Metódy nukleárnej medicíny

Pozitronová emisná tomografia a jednofotónová emisná výpočtová tomografia sa radia medzi zobrazovacie metódy nukleárnej medicíny. Obe zobrazovacie techniky sú okrem iného veľmi často používané na hodnotenie nádorov. Ich postavenie v diagnostike glioblastómu sa v posledných rokoch výrazne zlepšilo, za čo možno vďačiť viacerým rádioaktívne značeným látkam.¹⁵ V klinickej praxi sa používajú prevažne dve triedy rádiofarmák, a to rádiofarmaká metabolizmu glukózy a rádiofarmaká transportu aminokyselín. Obe triedy poskytujú informácie o klasifikácii a prognóze, avšak aminokyseliny vykazujú nižšiu absorpciu v normálnom mozgovom tkanive, čím sa stávajú vhodnejšími kandidátmi.¹⁷

SPECT poskytuje trojrozmerné tomografické snímky distribúcie rádioaktívnych molekúl, ktoré boli aplikované do tela pacienta. 3D obrazy sú generované počítačom z veľkého počtu projekčných obrazov tela zaznamenaných z rôznych uhlov. SPECT zobrazovacie systémy majú gama kamerové detektory, ktoré dokážu rozpoznať gama lúče z indikátorov nachádzajúcich sa v ľudskom organizme. Kamery sú namontované na rotačnom portáli, ktorý umožňuje pohyb detektorov v tesnej blízkosti pacienta.

PET rovnako ako SPECT využíva rádiofarmaká na vytváranie trojrozmerných obrazov. Hlavný rozdiel medzi skenmi SPECT a PET je typ používaných rádioaktívne značených látok. Zatiaľ čo SPECT meria gama lúče, rozpad rádiofarmák používaných pri PET produkuje malé častice nazývané pozitrony. Tie reagujú s elektrónmi v tele,

pričom po spojení dvoch opačných častíc dochádza ku vzájomnému zničeniu, čiže anihilácii. Tým sa vyprodukuje malé množstvo energie vo forme dvoch fotónov, ktoré strieľajú v opačných smeroch. Detektory v PET skeneri tieto fotóny merajú a tým vytvárajú snímky distribúcie rádioaktivity v tele pacienta.

Obe metódy poskytujú snímky, ktoré sú primárne používané pri diagnostike a sledovaní postupu liečby. Zatiaľ čo doménou SPECT je diagnostika srdcových chorôb ako sú upchané koronárne tepny, poruchy kostí, ochorenia žlčníka alebo vnútorné krvácanie, PET sa primárne využíva na detekciu rakoviny. Jedná sa o modernejšiu metódu v porovnaní so SPECT a taktiež vykazuje vyššiu citlivosť. PET poskytuje dodatočný pohľad nad rámec MR, do biológie gliómov, ktoré môžu byť použité pre neinvazívnu klasifikáciu, vymedzenie rozsahu nádoru, pre plánovanie chirurgického zákroku a rádioterapie, či monitorovanie po liečbe.¹⁸

3 Rádiofarmaká

Rádiofarmaká sa používajú v nukleárnej medicíne pri zobrazovaní i pri liečbe mnohých chorôb. Nukleárna medicína využíva rádiofarmaká ako zdroj ionizujúceho žiarenia, ktoré je umiestnené vnútri tela pacienta. Skladá sa z rádionuklidu a značenej zlúčeniny, ktorá je špecifická pre konkrétne vyšetrenie.

Pri diagnostickom postupe sa do tela zavádza malé množstvo rádioaktívnych látok buď injekčne, inhalačne alebo perorálne. Množstvo použitého rádiofarmaka je zvolené tak, aby poskytlo pacientovi najnižšiu radiačnú expozíciu a zároveň zabezpečilo presné lekárske vyhodnotenie. Rádionuklid musí emitovať gama lúče s dostatočnou energiou a polčas rozpadu musí byť dostatočne krátky na to, aby sa rozpadol tesne po dokončení zobrazovania. Medzi bežné rádionuklidy používané v nukleárnej medicíne patrí fluór-18, gálium-67, kryptón-81m, rubídium-82, dusík-13, uhlík-11, indium-111, technécium-99m, jód-123, xenón-133, tálium-201, gálium-68, zirkónium-89, ytrium-90, luténium-177, či jód-131, pričom približne v 80 % zobrazovaní sa využíva práve technécium-99m.¹⁹

3.1 Rádioaktívne žiarenie

Rádioaktívne žiarenie je forma energie, ktorá putuje zo zdroja v podobe vlny alebo nabitej častice. Na spodnom konci spektra nájdeme rádiové vlny a mikrovlny, ktoré sú pre organizmus neškodné. Slnéčné svetlo sa nachádza v rozmedzí od ultrafialového

žiarenia (UV) po infračervené žiarenie (IR). Za UV sa nachádzajú typy žiarenia, ktoré vyžarujú také množstvo energie, že dochádza ku ionizácii.^{20,21}

Hlavnými typmi ionizujúceho žiarenia emitovaného počas rádioaktívneho rozkladu sú alfa častice, beta častice a gama lúče. Každý typ je spôsobený buď spontánnym alebo indukovaným rozpadom. Jadrá niektorých atómov sú nestabilné, čím podliehajú rádioaktívnemu rozpadu a stávajú sa stabilnými.

Gama lúče predstavujú žiarenie s najkratšou vlnovou dĺžkou a najväčšou energiou zo všetkých známych vln v elektromagnetickom spektre a sú emitované počas rádioaktívneho rozkladu a nukleárnych výbuchov. Na rozdiel od alfa a beta častíc, ktoré majú energiu aj hmotnosť, gama lúče disponujú len čistou energiou. Energia gama lúčov leží v rozmedzí 10 keV až 5 MeV, pričom pre *in vivo* aplikácie sú najlepšie lúče s nízkou energiou, teda 100–511 keV, pretože môžu bez problémov prenikať tkanivami. Spomínaný ^{99m}Tc, najčastejšie používaný rádionuklid pri zobrazovaní, emituje počas rozkladu gama lúče o energii 140 keV. Gálium-68, používaný v tejto bakalárskej práci, je pozitronový žiarič produkujúci anihilačné gama žiarenie o hodnote 511 keV.^{20,21,22}

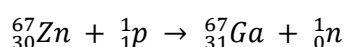
3.2 Gálium

Gálium sa nachádza v 13. skupine a 4. perióde. Je neuveriteľne mäkkým kovom, ktorý možno krájať nožom. Na jednej strane má extrémne nízku teplotu topenia (29,8 °C) a na druhej extrémne vysoký bod varu (2 204 °C). Toto rozpätie teplôt, v ktorých je gálium kvapalné, je najväčšie zo všetkých známych kovov.²³

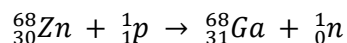
Radí sa medzi tvrdé Lewisove kyseliny, pričom tvorí komplexy koordinujúce štyri, päť alebo šesť ligandov, z čoho posledný spomenutý počet je najčastejšie sa vyskytujúcim a najstabilnejším.²⁴

Je známych 31 izotopov a 11 metastabilných izomérov vrátane dvoch prírodných sa vyskytujúcich stabilných izotopov gálium-69 (60,11 %) a gálium-71 (39,89 %). Z toho dva izotopy, gálium-67 a gálium-68, sú bežne používané v nukleárnej medicíne pre SPECT a PET zobrazovanie.²⁴

Gálium-67 má polčas rozpadu 3,26 dní a rozkladá sa pomocou elektrónového záchytu. Produkuje sa buď v cyklotróne alebo v urýchľovači protónovým ožiariním terčového zinku-67.²⁵



Gálium-68 je pozitronový žiarič s polčasom rozpadu 67,8 minút. Existujú dve metódy prípravy, buď priamou produkciou pomocou zinku-68 alebo rozkladom germánia-68.

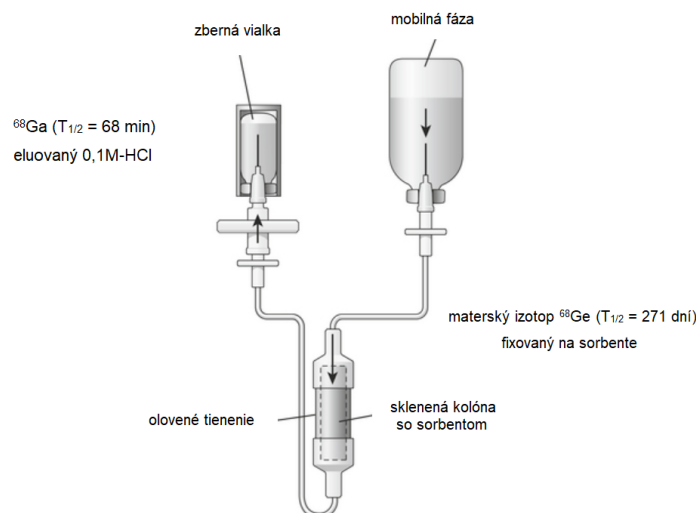


Avšak najviac používaná forma ${}^{68}\text{Ga}$ vzniká práve pomocou ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$ generátora.²⁵ Tento prístup však produkuje skôr menšie množstvo ${}^{68}\text{Ga}$ (väčšinou stovky MBq), ktoré umožňuje len obmedzené možnosti skenovania za deň. Kanadská spoločnosť ARTMS Products²⁶ vyvíja alternatívnu techniku, pri ktorej nízkoenergetický cyklotrón používa na produkciu gália-68 práve spomínaný zinok-68. Spoločnosť v súčasnosti preukázala rekordnú produkciu ${}^{68}\text{Ga}$ – 370 GBq – čo odpovedá 100 až 200 násobne vyššej aktivite, než je aktivita získaná z ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$ generátorov.²⁶

Prvé ${}^{68}\text{Ge}/{}^{68}\text{Ga}$ rádionuklidové generátory boli popísané v roku 1964. Aj keď sa nedá hovoriť o generátoroch ako ich poznáme v dnešnej dobe, na svoj čas perfektne spĺňali podmienky pre poskytovanie vhodných eluátov určených pre rádioaktívne značenie alebo priame zobrazovanie. Za tie roky sa výrazne zlepšila konštrukcia a spĺňa očakávania v každom smere, či už chemickom, rádiofarmaceutickom alebo medicínskom.²⁷

Prvé generátory poskytovali gálium-68 v podobe komplexu s kyselinou etyléndiamíntetraoctovou (EDTA), pričom boli eluáty priamo z generátorov využívané pri zobrazovaní, a to najmä mozgu. Nový typ generátorov, komerčne dostupný v prvých rokoch 21. storočia, je založený na eluácii gália-68 pomocou kyseliny chlorovodíkovej. Vytvára tak gálité ióny namiesto inertných komplexov.²⁷

Základom generátorov je rovnováha medzi pôvodným, čiže materským, a jeho dcérsnym rádionuklidom. Germánium-68 sa rozpadá s polčasom 271 dní pomocou elektrónového záchytu na gálium-68. Významne rozdielny polčas rozpadu germánia a gália umožňuje tejto dvojici rádionuklidov využitie ako generátorový systém. Najbežnejšie generátory (obr. 4) používajú matrice s oxidom titaničitým (TiO_2) alebo oxidom cíničitým (SnO_2), z ktorých je Ga^{3+} eluovaný pomocou HCl , zatiaľ čo Ge^{4+} zostáva absorbovaný. Fungujú teda na princípe iónovej chromatografie.^{24,28}



Obrázok 4- Schéma generátora (prevzaté a upravené)²⁹

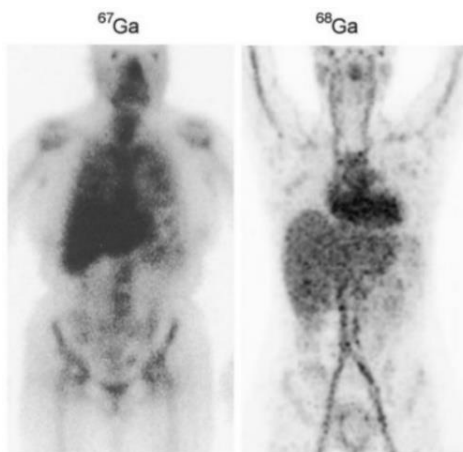
3.3 ⁶⁷Ga/⁶⁸Ga rádiofarmaká

Gálium-67 a gálium-68 patria medzi rádionuklidy, ktoré sa bežne používajú v nukleárnej medicíne už niekoľko rokov. Gálium-67 našlo uplatnenie vo forme rádiofarmaka ako je napr. ⁶⁷Ga-citrát/transferín. Prvýkrát bol použitý takmer pred 40 rokmi na zobrazovanie nádorov, a to najmä pri diagnostike určitých typov neoplazmy, ako sú Hodgkinovo ochorenie, nehodgkinské malígne lymfómy, rakovina pľúc, malígný melanóm alebo leukémia. Mechanizmus pôsobenia sa sústreďuje na jeho afinitu k receptorom transferínu na nádorových bunkách. V súčasnosti sa využíva len zriedkavo, a hoci je citlivý na detekciu lymfómu, nahradil ho ¹⁸F-FDG PET/CT, ktorý je výrazne citlivejší a špecifickejší. Bežne sa ⁶⁷Ga používa v diagnostike a terapeutickom zobrazovaní infekcií kostí.

Gálium-68 sa preukázal ako vhodný rádionuklid na označovanie malých zlúčenín, biologických makromolekúl, či nanočastíc a mikročastíc najmä v oblasti PET zobrazovaní. Využíva sa najmä v onkológii, avšak má potenciál aj pri zobrazovaní perfúzie myokardu, pľúcnej perfúzie a ventilácii, či pri rôznych zápaloch a infekciách v organizme. Medzi ďalšie aplikácie možno zahrnúť hodnotenie vaskulárnej permeability pri pľúcnych chorobách a transplantátoch.^{30,31,32}

V súčasnosti sa gálium-68 používa najčastejšie pri diagnostike rakoviny prostaty vo forme ⁶⁸Ga-PSMA-11. ⁶⁸Ga-PSMA-11 spolu s ¹⁷⁷Lu-DOTA-PSMA-617 tvoria teranostický pár, ktorý je vhodný na diagnostiku a liečbu rakoviny prostaty. Výhodou je, že diagnostické ⁶⁸Ga-PSMA-11 a terapeutické ¹⁷⁷Lu-DOTA-PSMA-617 vykazujú veľmi podobné biologické správanie.²⁴

Najdlhšie známy a najlepšie hodnotený teranostický pár značený ^{68}Ga a ^{177}Lu našiel uplatnenie pri diagnostike neuroendokrinných nádorov (NET) v kombinácii s rôznymi analógmi somatostatínu. Dôležitosť SSTR pre zobrazovanie NET bola spozorovaná počas štúdie³³, ktorej cieľom bolo vykonať scintigrafiu na viac ako tisíc pacientoch za použitia buď [^{123}I -Tyr³]- alebo [^{111}In -DTPA-D-Phe¹]-oktreotidu (^{111}In -oktreoscan), u ktorých má väčšina NET vysokú hustotu SSTR. Tá ich robí viditeľnými za použitia rádioaktívne značených somatostatínov alebo ich analógov. Avšak používanie ^{123}I ako rádionuklida predstavuje niekoľko nevýhod ako napríklad časovo náročné a zložité postupy značenia v porovnaní s ^{111}In . Vzhľadom k lepšiemu priestorovému rozlíšeniu u PET zobrazovania a schopnosti vykonávať kvantitatívne analýzy, bol jeden z výskumov zameraný na ^{68}Ga -DOTA-TOC PET. Štúdiou sa zistilo³³, že ^{68}Ga -DOTA-TOC PET vykazuje lepšie výsledky oproti ^{111}In -oktreoscan SPECT, pričom detekcia ďalších lézií vzrástla o 30 %. Práve tieto povzbudivé výsledky vydláždili cestu tohto rádiofarmaka a taktiež podčiarkli nutnosť zamerať sa na gálium-68 ako nádejný rádionuklid v nukleárnej medicíne. Vďaka veľkému úspechu ^{68}Ga -DOTA-TOC PET sa následný výskum zamerail aj na ďalšie oktreotidové analógy ako napr. ^{68}Ga -DOTA-NOC a ^{68}Ga -DOTA-TATE pri zobrazovaní NET. Hlavným rozdielom týchto analógov sú ich väzbové afinity ku piatim podtypom SSTR (SSTR 1–5).^{24,33}



Obrázok 5- Rozdiel medzi normálnou fyziologickou biodistribúciou ^{67}Ga -citrátu pomocou celotelovej scintigrafie a ^{68}Ga -citrátu pomocou PET /CT³⁴

3.4 Rádiofarmaká využívané v onkológii

Prebehlo mnoho štúdií zaoberajúcich sa PET indikátormi využiteľnými pre diagnostiku nádorových ochorení, medzi ktoré možno zaradiť ^{18}F -fluórodeoxyglukóza (^{18}F -FDG), ktorá skúma metabolizmus glukózy, nukleozidový analóg ^{18}F -fluórotymidín (^{18}F -FLT), či rádioaktívne značené aminokyseliny ako ^{18}F -fluórodihydroxyfenylalanín (^{18}F -FDOPA),

^{18}F -fluóroetyltirozín (^{18}F -FET), ^{11}C -metionín (^{11}C -MET). Najčastejšie sa používajú rádiofarmaká, ktoré sú značené rádionuklidom fluóru ^{18}F , ale presadzujú sa aj ďalšie rádionuklidy ako ^{11}C , ^{89}Zr , či ^{68}Ga . Tieto rôzne rádioaktívne značené látky dokážu poskytnúť spoľahlivé údaje v nejasných situáciách, zistiť skorú recidívu nádoru, skoršie zhodnotiť reakcie na liečbu, najmä v prípade nových postupov, alebo rozlíšiť medzi pseudoprogresiou a opätovným zhoršením.³⁵

Pokiaľ ide o rádioaktívne značené peptidy, je dôležité zdôrazniť zvyšujúce sa používanie analógov somatostatínu (SST) zameraných na receptory somatostatínu (SSTR) pri zápalových ochoreniach, a to najmä pri autoimunitných ochoreniach štítnej žľazy, či reumatoídnej artritíde. SSTR sú nadmerne exprimované v neuroendokrinných nádoroch, čo umožňuje ich vizualizáciu pomocou SST analógov značených ^{68}Ga a najčastejšie spájaných pomocou chelátora DOTA.^{36,37}

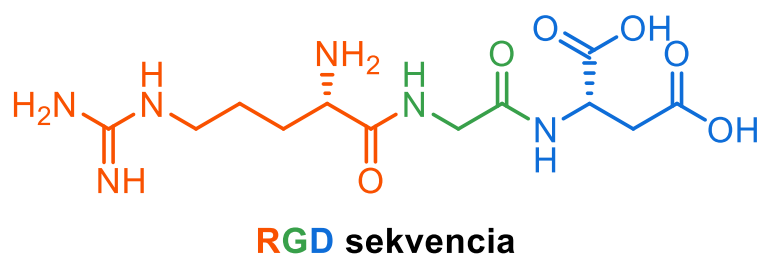
Pozornosť si tiež vyžiadal prostatický špecifický membránový antigén (PSMA), ktorý sa nadmerne vyskytuje pri rakovinách prostaty, najmä pri agresívnejších typoch. Aj keď je ^{68}Ga -PSMA stále viac využívaným rádiofarmakom pri hodnotení rakoviny prostaty, takmer polovica skenov vykonaných v skorom štádiu biochemickej recidívy býva negatívna.^{38,39}

4 RGD peptidy

V roku 1984, Pierschbacher a Ruoslahti objavili RGD sekvenciu, pozostávajúcu z troch aminokyselín (arginín-glycín-asparágová kyselina, obr. 6), ktorá sa stala predmetom mnohých štúdií. Proteíny obsahujúce RGD sekvenciu, ktorá slúži ako miesto pripojenia, a integríny, ktoré predstavujú receptory, tvoria hlavný systém rozpoznávania bunkovej adhézie. Hoci má mnoho integrínov schopnosť rozoznať ligandy obsahujúce RGD sekvenciu, predpokladá sa, že práve zvyšky tejto sekvencie poskytujú špecifickosť a vysokú afinitu. Predpokladá sa, že práve tieto miesta sekvencie interagujú priamo s α - podjednotkou, zatiaľ čo samotný reťazec sa viaže na β - podjednotku samotného integrínu.^{40,41,42} Jedna z možných nevýhod RGD peptidov spočíva v ich obmedzenom použití z dôvodu krátkeho polčasu ich cirkulácie. Jednou z možností ako tomuto predchádzať je prídanie *D*- aminokyseliny, vďaka čomu sa nielen že zvyšuje väzbová afinita ku integrínom, ale tiež ich biologická dostupnosť.⁴³

Mnoho štúdií sa zameralo na porovnanie vlastností lineárnych a cyklických RGD peptidov, tak isto ako monoménych a multiménych. Bolo zistené, že substitúciou *D*- enantiomeru do sekvencie sa zvyšuje afinita ku integrínom, a taktiež afinita rastie v prípade cyklických peptidov oproti ich lineárnym analógom.⁴⁴ Zlepšujú sa ich väzbové

vlastnosti, štruktúra je pevnejšia a stabilita *in vivo* je vyššia, čím sa predchádza enzymatickému štiepeniu.⁴⁵ Je nevyhnutné, aby sa ligandy viazali efektívne, čo zaručuje obmedzený počet konformácií. Všeobecne platí, že pokiaľ sa cyklizáciou obmedzí počet konformácií na tie, ktoré sú potrebné pre optimálne naviazanie receptorov, stanú sa omnoho užitočnejšími než lineárne peptidy, ktoré disponujú väčším počtom izomérov, z ktorých mnoho nie je použiteľných. Avšak je dôležité poznamenať, že cyklizácia nemusí nevyhnutne viesť ku zlepšeniu všetkých, a v niektorých prípadoch dokonca žiadnych z týchto vlastností. Lineárne peptidy môžu obsahovať sekvencie, ktoré môžu podporovať pevné štruktúry bez potrebného zacyklenia.⁴⁶ Napriek tomu, že monoméne a diméne peptidy vykazujú nižšiu afinitu ku integrínom, než ich multiméne analógy, ich farmakokinetické vlastnosti *in vivo* sú väčšinou omnoho lepšie.⁴⁷



Obrázok 6- Štruktúra RGD aminokyselín

4.1 Integríny

Integríny zohrávajú dôležitú rolu medzi interakciami buniek a buniek s extracelulárnou hmotou.⁴⁸ Sú to obojsmerné signálne molekuly, pričom na jednej strane prenášajú informácie z extracelulárneho prostredia, aby modulovali bunkovú reakciu, a na druhej strane je ich aktívny stav modulovaný zvnútra, teda z cytoplazmy. Ich zloženie pozostáva z dvoch nekovalentne viazaných podjednotiek, 18α - a 8β -, tvoriacich 24 odlišných dimérov s rozdielnou funkčnou a tkanivovou osobitosťou. Taktiež sú charakterizované veľkou extracelulárnou doménou, krátkou transmembránovou doménou a malým intracelulárnym nekatalytickým cytoplazmatickým chvostom. Jedná sa o rodinu α , β heterodimérnych receptorov, ktoré sprostredkujú dynamické väzby medzi extracelulárnymi adhéznymi molekulami a intracelulárnym aktívnym cytoskeletom. Vyskytujú sa u všetkých mnohobunkových živočíchov, pričom ich rozmanitosť sa líši medzi jednotlivými druhmi.^{49,50,51}

Mnoho integrínov býva často exprimovaných na bunkových povrchoch v neaktívnom stave. Počas tohto stavu nie sú schopné viazať ligandy alebo fungovať

ako signálne molekuly. Tento stav je veľmi dôležitým najmä pre ich biologické funkcie, pričom sa berú do úvahy hlavne integríny na cirkulujúcich krvných bunkách.^{49,51}

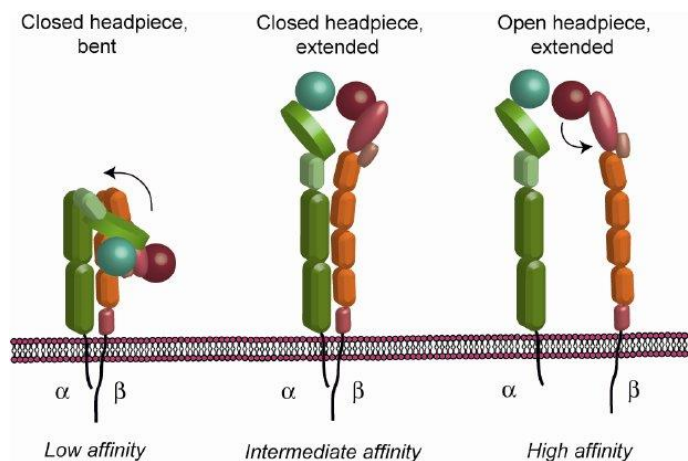
Spomedzi doteraz známych 24 ľudských dimérov má osem podčeladi schopnosť rozpoznať tripeptidovú aminokyselinovú sekvenciu RGD. Jedná sa o $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ a $\alpha_{11b}\beta_3$. Práve tieto sú najdôležitejšími a najpomocnejšími pri rakovine a jej metastázach.⁵²

4.1.1 $\alpha_v\beta_3$ integríny

Integrín $\alpha_v\beta_3$ (známy aj ako vitronektínový receptor) zohráva dôležitú úlohu v niekoľkých odlišných procesoch akými sú resorpcia kostí spôsobená osteoklastami, angiogenéza, patologická neovaskulatúra a nádorové metastázy.⁵³ Skladá sa z dvoch podjednotiek (125 kDa α - a 105 kDa β -) a na rozdiel od iných integrínov, ktoré sú vysoko selektívne, dokáže viazať širokú škálu molekúl extracelulárneho pôvodu s opakujúcim sa RGD motívom, vrátane fibronektínu, fibrinogénu, vitronektínu a proteolyzovaných foriem kolagénu a laminínu.⁵⁴

Pokiaľ ide o angiogenézu (proces novotvorby krvných kapilár), zohráva v nej najpodstatnejšiu rolu zo všetkých integrínov. Avšak čo je dôležitejšie, inhibícia aktivity týchto integrínov pomocou monoklonálnych protilátok alebo cyklických RGD antagonistov indukuje apoptózu endotelových buniek a inhibuje angiogenézu. Kľúčové úlohy integrínu v nádorovej angiogenéze viedli ku sľubnej stratégii blokovania jeho signalizácie antagonistami, čo by malo teoreticky za následok inhibíciu angiogenézy alebo zvýšenie účinnosti iných nádorových terapeutík. Navyše vďaka vysokej expresii v nových nádorových cievach a v niektorých nádorových bunkách je $\alpha_v\beta_3$ integrín vhodným cieľom rádioaktívne značených látok vyvinutých pre PET zobrazovanie $\alpha_v\beta_3$ integrínov a cytotoxických liečiv zameraných na terapiu rakoviny.⁴⁷

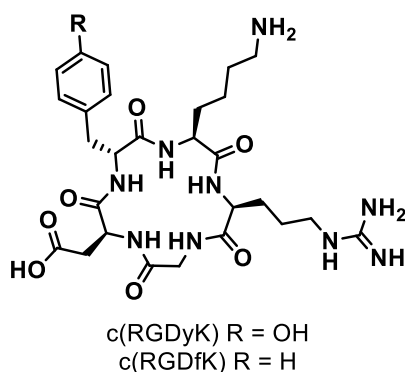
Medzi antagonistov, ktorý sa špecificky viažu na $\alpha_v\beta_3$ integríny patria už spomínané monoklonálne protilátky, disintegríny (47–84 aminokyselín dlhé, nízkomolekulové RGD peptidy obsahujúce vo svojej sekvencii najmä cysteín), ale aj nepeptidické molekuly, tzv. peptidomimetiká.^{54,55} Jedná sa o malé proteínové reťazce, ktoré vznikajú buď synteticky alebo skríningom z peptidomimetickej knižnice. Ich pozmenená štruktúra má za úlohu upravovať molekulárne vlastnosti ako je stabilita alebo biologická aktivita.^{54,56}



Obrázok 7- Schematické znázornenie preskupení počas aktivácie integrínu. V neaktívnej forme zostávajú podjednotky blízko seba a guľová hlavica smeruje k plazmatickej membráne. Vyrovnanie heterodiméru generuje rozšírenú konformáciu, kde sa hybridná doména β - podjednotky vykyvuje, čo vedie ku vysokoafinitnej konformácii. Separácia integrínových podjednotiek je posledným krokom v procese aktivácie integrínu.⁵⁷

4.2 Cyklické RGD peptidy

Prvé štúdiá RGD peptidov viedli ku objavu selektívneho antagonistu $\alpha_v\beta_3$ integrínov, c(RGDfV). Pentapeptid, ktorý pozostáva zo sekvencie arginín-glycín-asparágová kyselina-D-fenylalanín-valín, pričom jeho hodnoty IC_{50} sa pohybujú v jednotkách nanomólov. Dodatočné výsledky ukázali, že pokiaľ je na štvrtom mieste aminokyselina s hydrofóbnou povahou, afinita peptidu výrazne stúpa, pričom aminokyselina na piatom mieste nijako neovplyvňuje afinitu ku integrínom. Tieto štúdie poskytli peptid, ktorý môže byť modifikovaný pre použitie ako rádiofarmakum pre PET alebo SPECT.⁵⁸ Ďalšími modifikáciami možno dosiahnuť peptid, ktorý umožňuje elektrofilnú rádiodhalogenáciu (napr. ^{123}I , ^{131}I), a to po substitúcii D-fenylalanínu alebo valínu tyrozínom, čím vzniká c(RGDyV) alebo c(RGDfY). Na druhej strane zámena piatej aminokyseliny lyzínom, teda vznik c(RGDyK) a c(RGDfK) (obr. 8), poskytuje ďalšie alternatívy pre rádioaktívne značenie prostetickými skupinami (napr. ^{18}F , ^{123}I) alebo konjugáciu s chelátormi pre izotopy prechodných a post-prechodných kovov (napr. ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{64}Cu , ^{68}Ga).^{59,60} V tejto práci som sa zamerala na vlastnosti c(RGDyK) monoméru, ktorý som za pomoci bifunkčného chelátora deferoxamínu (DFO) značila ^{68}Ga .



Obrázok 8- Chemická štruktúra $c(\text{RGDyK})$, $c(\text{RGDfK})$

V porovnaní s $c(\text{RGDyK})$ je $c(\text{RGDfK})$ *in vitro* stabilnejším peptidom. *In vitro* experimenty za použitia rôznych reakčných podmienok a počas stabilitných štúdií, ktoré zahrňovali zvýšenú reakčnú teplotu, rôzne hodnoty pH alebo inkubáciu v ľudskom sére, ukázali vyššiu stabilitu $c(\text{RGDfK})$.⁶¹ Dôvodom je voľná hydroxy skupina na benzénovom jadre tyrozínu u $c(\text{RGDyK})$, ktorá ľahko podlieha oxidácii. Na druhej strane je však tyrozín hydrofilnejší než fenylalanín, čo má za následok rýchlejšie vylučovanie renálnou cestou a preto sa môže javiť ako vhodnejší pre rádioaktívne značenie.⁵⁸

4.3 Syntetická príprava peptidov

V laboratórnych podmienkach sa peptidy pripravujú najmä pomocou syntézy na pevnej fáze. S týmto pojmom sa stretávame od roku 1963, kedy biochemik Bruce Merrifield svojimi štúdiami a nápadmi vynašiel novú metódu, ktorá výrazne prispela vo vývoji mnohých biologicky aktívnych látok, a za ktorú mu bola udelená Nobelova cena. Bezpochyby sa považuje za významný medzník v oblasti chémie, ktorý mal výrazný vplyv na kombinatoriálnu chémiu. Hoci je koncepcia syntézy na pevnej fáze, podobne ako u mnohých iných dômyselných nápadov, jednoduchá a priama, Bruce Merrifield bol prvý, kto si uvedomil jej plný potenciál a vyvinul tak túto praktickú metódu.⁶²

Postup syntézy peptidov na pevnej fáze vo všeobecnosti spočíva v naviazaní prvej *N*-chránenej aminokyseliny na nerozpustný polymérny nosič pomocou esterovej alebo amidickej väzby (schéma 1, naviazanie cez esterovú väzbu). Chrániaca skupina aminoskupiny (najčastejšie Fmoc) naviazanej aminokyseliny na resín sa štiepi v zásaditom prostredí, čím dochádza k ortogonálnemu ochráneniu a táto aminoskupina sa následne acyluje ďalšou aminokyselinou. Najčastejšou metódou pre aktiváciu karboxylovej skupiny aminokyseliny je použitie karbodiimidu (napr. DIC), často za prítomnosti hydroxybenzotriazolu (HOBt). Tento dvojkrokový cyklus sa opakuje až pokým sa nedosiahne finálneho peptidu. Na konci syntézy dochádza ku štiepeniu

peptidu z resínu za použitia kyslých podmienok a taktiež ku odstráneniu chrániacich skupín postranných reťazcov, ktoré sú labilné práve v kyslom prostredí.⁶²

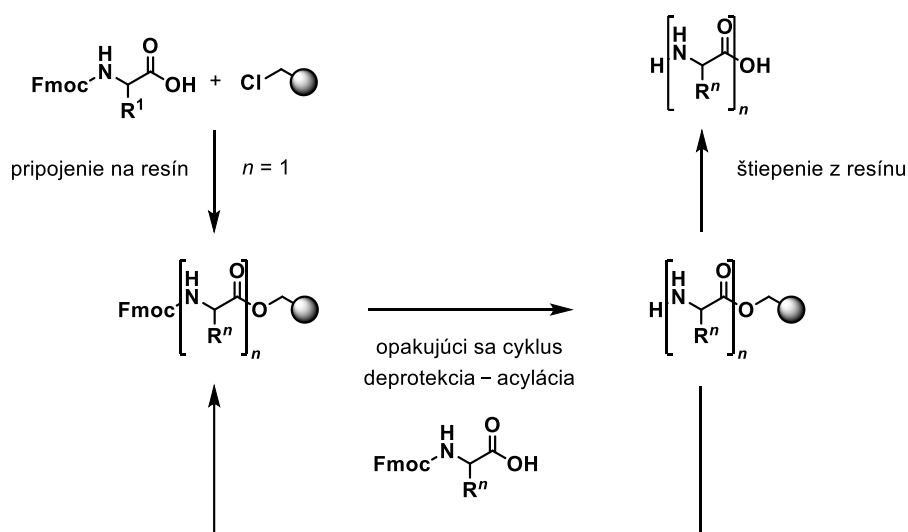


Schéma 1- Postup syntézy peptidov na pevnej fáze podľa Merrifielda (prevzaté a upravené)⁶²

Ako už bolo naznačené, hlavnou myšlienkou syntézy na pevnej fáze je viazanie reaktantov kovalentnou väzbou na nerozpustné nosiče, resíny. Najčastejšie sa využíva polystýrenová živica (resín) zosieťovaná divinylbenzénom (1–2% DVB), zatiaľ čo ostatné reaktanty zostávajú v roztoku. Pri syntéze sa pracuje s vysokými koncentraciami reakčných činidiel, aby sa dosiahlo čo najvyššej konverzie. Resín sa dôkladne premyje vhodnými rozpúšťadlami po každom kroku, čím sa jednoducho odstránia nadbytočné činidlá a rozpustné vedľajšie produkty. Analýza intermediátov sa vykonáva štiepením z resínu a následným použitím bežných analytických techník ako vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC), hmotnostná spektrometria (MS), či NMR spektrometria.⁶³

Produktami syntézy sú sekvenčne špecifické peptidy, ktoré je možné po štiepaní z nosiča získať v relatívne čistej forme. Okrem peptidov je možné syntetizovať oligonukleotidy, oligosacharidy, nukleové kyseliny a príbuzné molekuly.⁶³ Vďaka tomuto pokroku je možné syntetizovať väčšie a komplexnejšie molekuly, čo spôsobilo revolúciu vo výskume v biológii, mikrobiológii, medicínskej chémii a vývoji nových liečiv.

4.4 Metódy rádioaktívneho značenia peptidov

Rádioaktívne značenie peptidov sa zvyčajne vykonáva jednou z dvoch ciest, buď priamym značením alebo nepriamym pomocou bifunkčného chelatačného činidla. V prípade priameho značenia je atóm rádionuklidu naviazaný priamo na jeden alebo viac

atómov peptidovej štruktúry. Tyrozínové zvyšky môžu byť rádioaktívne označené jódom, disulfidové väzby zas možno redukovať, čím vznikajú voľné tioly, ktoré sú schopné viazať technécium. Nepriame značenie využíva činidlá, ktoré slúžia ako malé molekuly s jedným miestom pre rádioaktívne značenie a druhým pre pripojenie k peptidu. Tieto činidlá môžu byť značené pred alebo po kondenzácii s peptidom. Značenie pred naviazaním môže byť výhodnejšie pre peptid, a to najmä v prípade, keď si značenie vyžaduje extrémne podmienky. V praxi sa však dáva prednosť značeniu po kondenzácii, čím sa znižuje počet reakčných krokov zahrňujúcich použitie rádioaktivity, najmä pokiaľ sa jedná o rádionuklidy s krátkym polčasom rozpadu. Avšak hoci je priame označovanie jednoduchšie, nepriame ponúka väčšiu kontrolu štruktúry rádiofarmaka a lepšiu *in vivo* stabilitu.⁶⁴

4.5 Konjugácia peptidov s chelátormi

Novo syntetizované peptidy je potrebné pred použitím na zobrazovanie metódami nukleárnej medicíny označiť rádioaktívnym izotopom. Tento krok však pri použití metódy nepriameho značenia nie je možný bez konjugácie reťazca s vhodným chelátorom, ktorý je zodpovedný za naviazanie jednotlivých rádionuklidov. Používané rádionuklidy, medzi ktoré patrí aj ⁶⁸Ga, sa najčastejšie viažu pomocou rôznych chelátorov, ktoré sú buď cyklické alebo acyklické. Medzi najpoužívanejšie cyklické chelátory používané v rádiochémii patria DOTA, NOTA a ich deriváty DOTAGA, NODAGA alebo NODASA. Spomedzi lineárnych je to potom deferoxamín, či kyselina dietyléntriamínopentaoctová (DTPA).⁶⁵

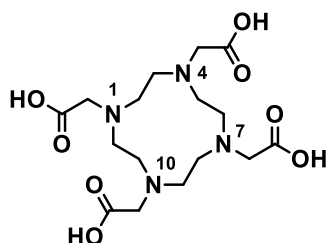
4.5.1 DOTA

1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina, skrátene DOTA (obr. 9), je makrocyclická molekula, v ktorej sú štyri atómy dusíka v polohách 1,4,7 a 10 substituované karboxymetylovou skupinou. Jedná sa o organickú molekulu, ktorá patrí do skupiny cyklenových ligandov a plní úlohu chelátora. Je schopná vytvárať stabilné komplexy s dvojmocnými a trojmocnými kationmi kovov/rádionuklidov.⁶⁶

Vzhľadom k tomu, že ku koordinácii s Ga³⁺ sú potrebné štyri atómy dusíka pochádzajúce z kruhu a dva atómy kyslíka z karboxylových skupín, DOTA môže byť použitá ako bifunkčné chelatačné činidlo bez ďalších potrebných modifikácií.⁶⁵

Aj keď konjugáty s DOTA patria medzi najčastejšie používanú triedu rádioaktívne značených látok pre PET, nie je najvhodnejším chelátorom pre tvorbu komplexov s gáliom. Vykazuje relatívne nízku konštantu stability ($\log K_{\text{GaL}} = 21,3$), čo je spôsobené veľkosťou kovu, ktorý je príliš malý, aby perfektne zapadol do dutiny cyklu. Pre niektoré

makrocikly sú aktivačné energie potrebné pre chelataciu výrazne vyššie než u lineárnych chelátorov. Na prekonanie týchto kinetických bariér pri rádioaktívnom značení DOTA konjugátov gáliom, je potrebné reakčné roztoky zahriať na teplotu 95 °C, čo však môže byť problémom pre niektoré termolabilné zlúčeniny.^{65,67}

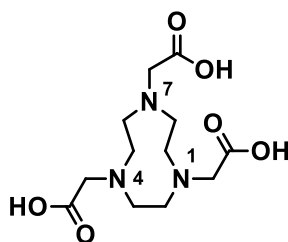


Obrázok 9- Štruktúrny vzorec chelatačného činidla DOTA

4.5.2 NOTA

NOTA, alebo 1,4,7-triazacyklononán-1,4,7-trioctová kyselina (obr. 10), obsahuje tri chelatačné karboxylátové skupiny a tri dusíky, čím tvorí maximálny počet donorových atómov.

V porovnaní s DOTA chelátorom má NOTA menší kruh, a Ga^{3+} teda omnoho lepšie zapadá do dutiny, čím sa zároveň zvyšuje stabilita ($\log K_{\text{GaL}} = 31,0$). Komplexácia Ga^{3+} na rozdiel od DOTA prebieha za laboratórnej teploty (LT) behom 5–10 minút s rádiochemickou čistotou (RCHČ) > 95%, takže nie je potrebné roztoky zahrievať.^{65,67}



Obrázok 10- Štruktúrny vzorec chelatačného činidla NOTA

4.5.3 Desferal

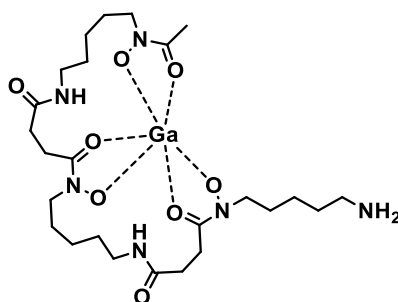
Desferal predstavuje komerčný názov pre liečivý prípravok obsahujúci deferoxamín (DFO) mezlát. Jedná sa o veľmi známe a najpoužívanejšie chelatačné činidlo železitých iónov (Fe^{3+}). Využíva sa pri liečbe hemosiderózy, teda hromadení pigmentu hemosiderínu v tkanivách.⁶⁸

Deferoxamín sa dá považovať za bifunkčný chelátor, činidlo so silnou chelatačnou skupinou (*N*-(hydroxy)-amidická skupina) na jednom konci, ktorá slúži ako väzbové miesto pre rádionuklid, a funkčnou reaktívnou skupinou (aminoskupina) na

konci druhom, kde sa viaže buď priamo biologicky aktívna látka alebo linker, ktorý slúži ako kovalentná väzba medzi reaktívnou skupinou a biologicky aktívnou látkou (napr. monoklonálna protilátka).⁶⁹ Konštanta stability ($\log K_{\text{GaL}} = 28,6$) komplexu s Ga^{3+} je vyššia než u ostatných lineárnych chelátorov, ktorým je aj DTPA ($\log K_{\text{GaL}} = 24,3$).⁶⁷

Patrí medzi siderofory, produkty metabolizmu niektorých baktérií, ktoré viažu a transportujú železo v mikroorganizmoch. Desferal je produkovaný baktériami *Streptomyces pilosus* a počiatky jeho klinického používania sa datujú do šesťdesiatych rokov 20. storočia.⁷⁰ Vo svojej štruktúre obsahuje dve amidické a tri *N*-(hydroxy)-amidické skupiny, pričom na tvorbe komplexu ako so železom, tak s gáliom, sa podieľajú práve druhé zmieňované skupiny. Voľná aminoskupina je zodpovedná za vysokú rozpustnosť vo vode. Hoci desferal možno získať aj synteticky, využitie prírodného produktu predstavuje ekonomicky výhodnejšiu variantu.

Desferal natívne viaže Fe^{3+} , a tiež sa vo veľkej miere využíva ako chelátor pre izotopy gália (obr. 11) a zirkónia, rovnako môže byť označený ^{111}In . Ukázalo sa tiež, že DFO možno využiť k redukcii Cu^{2+} . Za optimálnych podmienok dokáže jeden mol DFO redukovať 3 moly Cu^{2+} .⁷¹



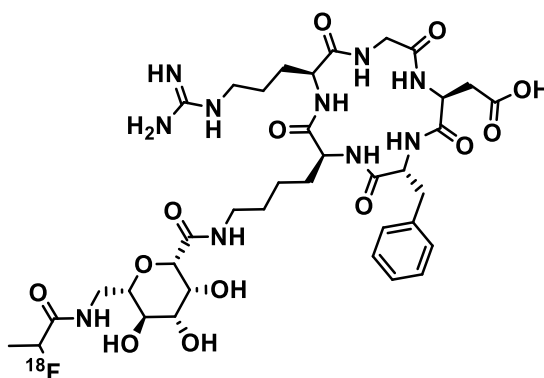
Obrázok 11- Komplex deferoxamín-gálium

DFO je najpoužívanejším chelátorom pre rádioaktívne značenie zirkónia-89. Zr^{4+} je vysoko nabitý, tvrdý metalový ión s relatívne malým iónovým polomerom, náchylný ku tvorbe nerozpustných polynukleárných hydroxidov vo vodných roztokoch, čím znemožňuje efektívne značenie. Po mnoho rokov sa využíval ako chelátor pre ^{89}Zr DTPA za tvorby termodynamicky stabilného komplexu. Avšak štúdie preukázali, že značenie DTPA je vysoko neefektívne (výťažok $< 1\%$) a *in vivo* stabilita je veľmi nízka. Naopak, využitie DFO pre značenie zirkóniom-89 poukazuje na kvantitatívne výťažky ($> 99\%$) a predpokladá sa, že viaže ^{89}Zr za využitia troch *N*-(hydroxy)-amidických skupín. Práve z dôvodu použitia DFO ako jediného vhodného kandidáta pre značenie ^{89}Zr , by bolo prospešné navrhnuť nové chelátory, ktoré by disponovali zlepšenou rozpustnosťou, *in vivo* stabilitou a vhodnými chelatačnými vlastnosťami.⁷²

4.6 Využitie RGD peptidov v medicíne

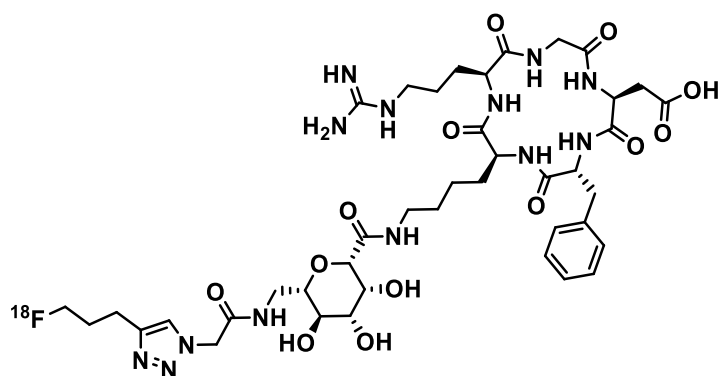
Prvé rádioaktívne značené RGD peptidy určené pre zobrazovanie $\alpha_v\beta_3$ integrínov sa objavili pred vyše 20 rokmi. Bolo skúmané nespočetné množstvo rôznych zlúčenín značených širokou škálou izotopov používaných v nukleárnej medicíne, avšak len malý počet z nich vstúpil do klinických štúdií.

Najintenzívnejšie študovaným peptidom je ^{18}F -galakto-RGD (obr. 12). Jedná sa o glykozylovaný peptid, ktorý vykazuje selektívnu akumuláciu rádionuklidov v mieste nádoru s rýchlou elimináciou, najmä renálnou cestou, čo vedie k dobrým pomerom tumor/pozadie a nízkej radiačnej záťaži pre pacienta. Využíva sa najmä pre expresiu $\alpha_v\beta_3$ integrínov v melanóme, sarkóme a nádoroch napádajúcich najmä hlavu a krk. Nevýhodou tejto zlúčeniny je časovo náročná rádiosyntéza, a preto bola hlavným cieľom optimalizácia rádioaktívneho značenia, ktorá zahrňovala tvorbu oximov, tzv. *click* chémiu, či zámenu izotopu. Jedným z prístupov k vývoju nového PET rádiofarmaka bolo zavedenie gália-68 ako alternatívy fluóru-18 pre PET zobrazovanie. Všetky spomenuté optimalizácie viedli ku kratšiemu času prípravy, pričom najkratší čas predstavovalo značenie pomocou ^{68}Ga .^{73,74}



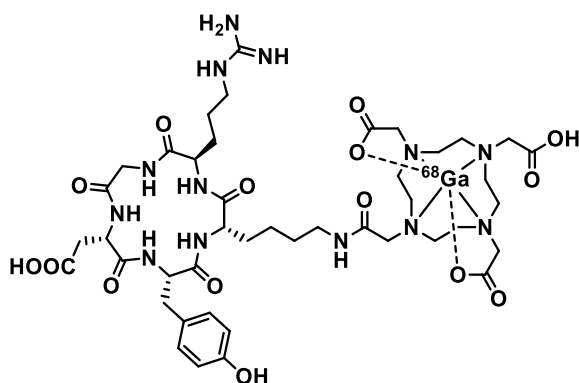
Obrázok 12- Chemická štruktúra ^{18}F -galakto-RGD

^{18}F -RGD-K5 (obr. 13), zložený z cyklického triazolového peptidu obsahujúci RGD sekvenciu, predstavuje úzko príbuzný derivát ^{18}F -galakto-RGD. V oboch prípadoch je použitý rovnaký pentapeptid c(RGDfK) a aminosacharid. Rozdiel predstavuje konjugácia kyseliny 2-azidooctovej v mieste amino skupiny RGD-K5, čo umožňuje značenie pomocou *click* chémie za použitia 5- ^{18}F -fluóro-1-pentýnu. Rovnako ako v prípade ^{18}F -galakto-RGD, *click* chémia vedie ku redukcii celkového času syntézy, čím sa zvyšuje dostupnosť ^{18}F -RGD-K5.⁷⁴



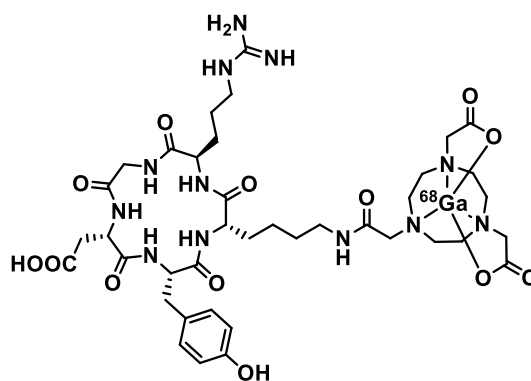
Obrázok 13- Chemická štruktúra ^{18}F -RGD-K5

^{68}Ga -DOTA-RGD (obr. 14) predstavuje ďalšie využitie RGD sekvencie. Vykazuje vysokú afinitu ku $\alpha_v\beta_3$ integrínom u *in vitro* experimentov a selektívnu akumuláciu v nádore vo zvieracom modeli. Avšak u tohto peptidu bola zistená vyššia väzba na plazmatické proteíny aj v porovnaní s analógom značeným ^{111}In . Vysoká väzba na plazmatické proteíny vedie ku zvýšenej koncentrácii aktivity v krvi a ku horším zobrazovacím vlastnostiam v porovnaní s ^{18}F -galakto-RGD.⁷⁴

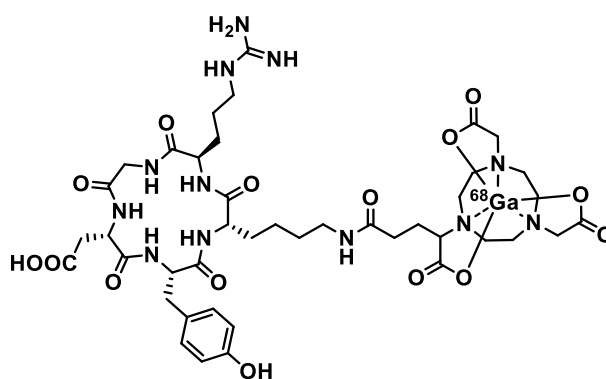


Obrázok 14- Chemická štruktúra ^{68}Ga -DOTA-RGD

Výhodnejším sa javí použitie iného chelátora, ktorým je buď NOTA alebo NODAGA. U oboch peptidov, ^{68}Ga -NOTA-RGD (obr. 15) a ^{68}Ga -NODAGA-RGD (obr. 16), bola preukázaná významne znížená väzba na plazmatické proteíny v porovnaní s ^{68}Ga -DOTA-RGD, výsledkom čoho boli rovnaké zobrazovacie vlastnosti u modelu nádorovej myši, ako tomu bolo u ^{18}F -galakto-RGD. Navyše vďaka vysokej konštante stability môže byť značenie NODAGA derivátu uskutočnené pri izbovej teplote s nízkym množstvom peptidu, a zároveň je dosiahnutá vysoká RCHČ.⁷⁴



Obrázok 15- Chemická štruktúra ^{68}Ga -NOTA-RGD



Obrázok 16- Chemická štruktúra ^{68}Ga -NODAGA-RGD

RGD sekvencia má široké využitie aj v prípade, kedy nie je rádioaktívne značená. Jedným z využití je tkanivové inžinierstvo, disciplína, pri ktorej sa biologické substituenty používajú na úpravu, udržiavanie alebo zlepšenie funkcie biologických tkanív. Dôležitým faktorom je, aby implantované substráty nielen že poskytovali štruktúrnu podporu pre poškodené tkanivá, ale aby tiež interagovali do týchto tkanív a podporovali regeneráciu v okolitom prostredí. RGD sekvencia účinne podporuje pripojenie mnohých typov buniek k množstvu rôznych materiálov. Výskumom⁷⁵ sa preukázalo, že imobilizované RGD alginátové štruktúry (prírodné polymérne nosiče) boli prospešné pre tkanivové inžinierstvo v kardiovaskulárnej oblasti. Imobilizovaný RGD peptid podporoval príľnavosť buniek k matrici, zabránil apoptóze buniek, zvýšil životnosť a regeneráciu buniek, a zrýchlil regeneráciu srdcového tkaniva.^{75,76}

Ligandy integrínov založené na RGD motíve pôsobia ako body ukotvenia pre aktínový cytoskelet, čo umožňuje jeho väzbu a následnú tvorbu štruktúrnych komponentov bunky. Extracelulárne adhezívne proteíny, najmä RGD, podporujú adhéziu a migráciu buniek, ktoré hrajú obzvlášť dôležitú úlohu v správaní osteoblastov. Zlepšená osseointegrácia, priame spojenie medzi kosťou a povrchom implantátu, pozorovaná na povrchoch potiahnutých RGD sekvenciou stimulovala nedávno úsilie

o pripojenie RGD na oxidom potiahnuté kovy a ich zliatiny, ako titán či Ti-6Al-4V, zliatina titánu, hliníka a vanádia. Výsledky štúdie⁷⁶ ukázali, že imobilizácia RGD peptidov na titanových povrchoch zlepšila hojenie implantovaných kostí, a to podporovaním včasného prichytenia osteoblastických buniek a následnou diferenciáciou uľahčujúcou väzbu proteínov.⁷⁶

Ďalším možným využitím RGD motívu je použitie sekvencie pri oprave rohovky. Integrita rohovky je veľmi kritická pre oči. Pokles endotelových buniek rohovky spôsobený chorobou alebo vekom môže ľahko poškodiť zrak. RGD sprostredkovaná povrchová modifikácia uľahčila prichytenie buniek, proliferáciu, zarovnanie a expresiu kolagénov a proteoglykánov. Tím výskumníkov⁷⁷ zaoberajúcich sa týmto využitím preukázal, že štruktúra hodvábanej ľudskej rohovky spojená s RGD by mohla byť biofunkcionalizovaná integráciou tkaniva rohovky s extracelulárnou maticou bohatou na proteoglykány. Tento biomimetický prístup na replikáciu štruktúrnej hierarchie a architektúry tkaniva rohovky sa môže stať užitočným pri samotnom navrhovaní rohovky. Ďalej možno tento prístup využiť pri oprave iných tkanivových systémov.^{76,77}

Experimentálna časť

5 Príprava konjugátu DFO-c(RGDyK)

Rozpúšťadlá a chemikálie boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (USA, www.sigmaaldrich.com), Acros Organics (Belgicko, www.acros.cz), Roth (Nemecko, www.carlroth.com) alebo Fluorochem (Veľká Británia, www.fluorochem.co.uk). 2-chlórotřitýlový resín (100–200 mesh, 1% DVB, 0,85 mmol g⁻¹) a Fmoc-amino kyseliny boli zakúpené od firmy AAPPTec (USA, www.aapptec.com). Pri syntéze boli používané plastové striekačky opatrené polypropylénovou fritou za použitia manuálne ovládaného syntetizátora (USA, www.torviq.com). Všetky reakcie prebiehali za laboratórnej teploty (21 °C), pokiaľ nebolo uvedené inak. Pri premývaní bol resín miešaný s čerstvým rozpúšťadlom po dobu jednej minúty pred zmenou rozpúšťadla. Intermediáty viazané na resín boli pre dlhšie skladovanie a/ alebo pre kvantitatívnu analýzu vysušené pod prúdom dusíku.

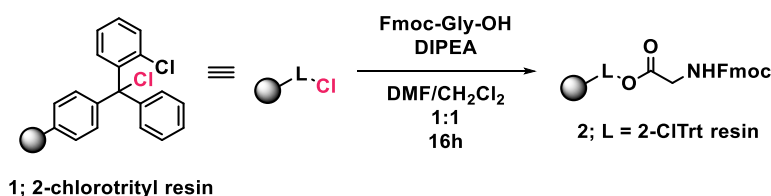
LC/MS analýza bola vykonaná na UHPLC-MS systéme zloženého z UHPLC chromatografu Acquity s detektorom s diódovým poľom a hmotnostným spektrometrom s jednoduchým kvadrupólom (Waters Corporation, USA). Používaná bola X-select C18 kolóna pri 30 °C a prietoku 600 µl min⁻¹. Ako mobilná fáza bol použitý (A) 0,01 mol dm⁻³ acetát amónny vo vode a (B) CH₃CN, lineárne naprogramovaný od 10 % do 80 % B počas 2,5 minúty, zachovaný po dobu 1,5 minúty. Následne bola kolóna navrátená do rovnováhy 10% roztokom B počas 1 minúty. ESI zdroj operoval pod prúdom 5 µA, odparovacou teplotou 350 °C a kapilárnou teplotou 200 °C. Purifikácia prebiehala na C18 kolóne s obrátenou fázou (19× 100 mm, 5 µm častice) a gradient bol tvorený z 0,01 mol dm⁻³ acetátu amónneho vo vode a acetonitrilu pri prietoku 15 ml min⁻¹.

HRMS analýza bola vykonaná na Orbitrap Elite high-resolution hmotnostnom spektrometri (Thermo Fischer Scientific, USA), operujúcom v pozitívnom full scan móde (120 000 FWHM) v rozmedzí 200–900 m z⁻¹. Získané dáta boli vnútorne kalibrované s diizooktyl ftalátom v metanole (m z⁻¹ 391,2843). Vzorky boli nariedené na finálnu koncentráciu 20 µmol dm⁻³ s 0,1% kyselinou mravčou vo vode a metanole (1:1). Vzorky boli nastrieknuté priamym nástrekom do hmotnostného spektrometra.

Pre meranie NMR spektier bol použitý JEOL ECX500 spektrometer s magnetickým poľom 11,75 T (pri operačnej frekvencii 500,16 MHz pre ^1H a 125,77 MHz pre ^{13}C) pri laboratórnej teplote (27 °C). Chemické posuny (δ) a interakčné konštanty (J) sú uvádzané v parts per million (ppm) a Hertzoch (Hz). ^1H a ^{13}C chemické posuny (δ v ppm) boli kalibrované na reziduálny signál DMSO- d_6 [2.50 (^1H) a 39.51 (^{13}C) ppm]. Skratky v NMR spektrách: br s – *broad* singlet (široký singlet); d – dublet; dd – dublet dubletov; m – multiplet; s – singlet; t – triplet.

Pre UHPLC-MS analýzu vzorky bola k resínu (5–10 mg) pridaná zmes TFA v CH_2Cl_2 (1:1, v/v), štiepiaca zmes bola odparená pod prúdom dusíku a odštiepená látka bola rozpustená v 1 ml CH_3CN . Pre výpočet loadingu bola použitá metóda vonkajšieho štandardu. K 2×10 mg resínu bol pridaný 1 ml TFA/ CH_2Cl_2 (1:1, v/v). Po štiepení a odparení bol odparok rozpustený v 1 ml acetonitrilu. Ako štandard bol použitý roztok Fmoc- β -Ala o koncentrácii $1,6 \text{ mol dm}^{-3}$. Po zmeraní štandardu bola prevedená integrácia píku pri vlnovej dĺžke 300 nm. Plochy píkov oboch zmeraných vzoriek boli priemerované a výsledná hodnota bola dosadená do vzorca pre výpočet loadingu.

5.1 Acylácia 2-chlorotritylového resínu pomocou Fmoc-Gly-OH aminokyseliny

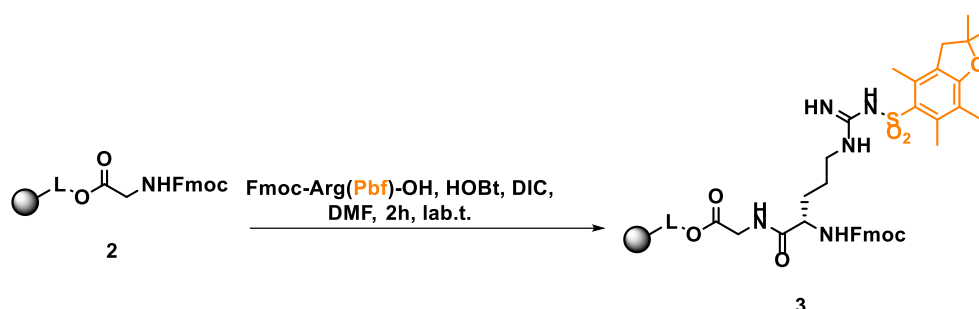


Do polypropylénovej striekačky opatrenej fritou bol navážený komerčne dostupný 2-chlorotritylový resín (300 mg, loading $0,85 \text{ mmol g}^{-1}$). Resín **1** bol premytý CH_2Cl_2 (5×5 ml). Fmoc-Gly-OH (0,9 mmol, 267 mg) a DIPEA (0,9 mmol, 116 mg) boli rozpustené v DMF/ CH_2Cl_2 (1:1, v/v; 3 ml) a pridané k 2-chlorotritylovému resínu. Reakčná zmes bola trepaná po dobu 16 hodín. Následne bol resín premytý CH_2Cl_2 (2×5 mL), DMF (5×5 mL) a CH_2Cl_2 (5×5 mL) a bola k nemu pridaná zmes $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{DIPEA}$ (17:2:1, v/v, 10,5 ml) a reakčná zmes bola miešaná po dobu 2 hodín. Resín bol potom opäť premytý CH_2Cl_2 (2×5 mL) a malé množstvo bolo odobrané na UHPLC-MS analýzu, ktorá potvrdila prítomnosť produktu **2** (ESI- : 296).

5.2 Odchránenie Fmoc chrániacej skupiny

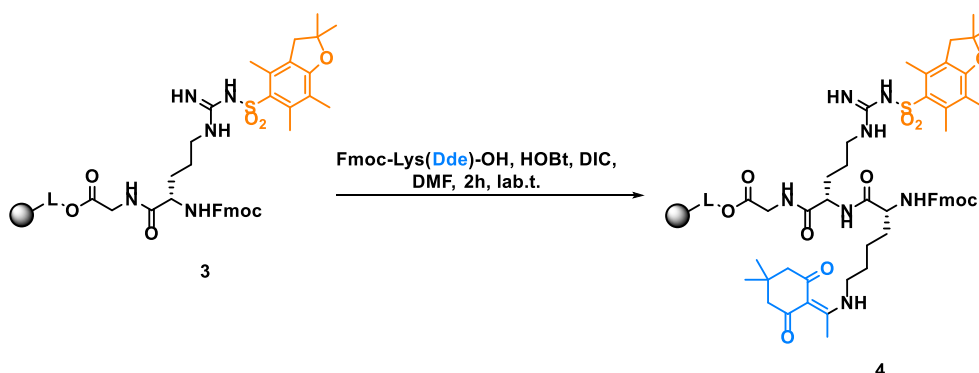
Príslušný resín bol premytý CH_2Cl_2 (5×5 ml). Roztok DBU/ CH_2Cl_2 (1:1, 3 ml) bol pridaný k resínu a reakčná zmes bola miešaná po dobu 10 minút. Následne bol resín premytý CH_2Cl_2 (2×5 ml), DMF (5×5 ml) a CH_2Cl_2 (5×5 ml) a použitý do ďalšieho kroku bez analýzy.

5.3 Acylácia s Fmoc-Arg(Pbf)-OH aminokyselinou



Resín **2** (300 mg) bol premytý CH_2Cl_2 (5×5 ml) a následne bola prevedená deprotekcija Fmoc chrániacej skupiny (kap. 5.2). Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0,9 mmol, 584 mg) a HOBt (0,9 mmol, 122 mg) boli rozpustené v DMF (3 ml) a k zmesi bol pridaný DIC (139 μl). Reakčná zmes bola pridaná k resínu a trepaná po dobu 2 hodín pri laboratórnej teplote. Následne bol resín premytý CH_2Cl_2 (2×5 ml), DMF (5×5 ml) a CH_2Cl_2 (5×5 ml). UHPLC-MS analýza potvrdila prítomnosť produktu **3** (ESI+ : 454).

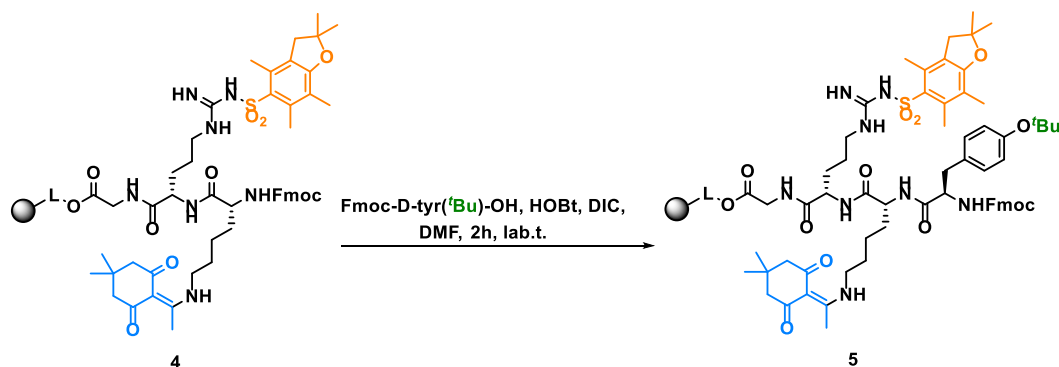
5.4 Acylácia s Fmoc-Lys(Dde)-OH aminokyselinou



Resín **3** (300 mg) bol premytý CH_2Cl_2 (5×5 ml) a následne bola prevedená deprotekcija Fmoc chrániacej skupiny (kap. 5.2). Fmoc-Lys(Dde)-OH (0,9 mmol, 479 mg) a HOBt (0,9 mmol, 122 mg) boli rozpustené v DMF (3 ml) a k zmesi bol pridaný DIC (139 μl).

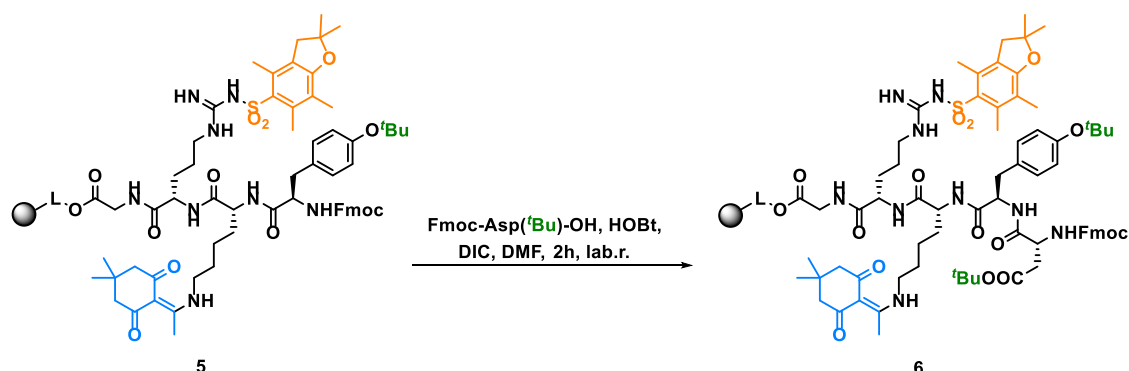
Reakčná zmes bola pridaná k resínu a trepaná po dobu 2 hodín pri laboratórnej teplote. Následne bol resín premytý CH₂Cl₂ (2× 5 ml), DMF (5× 5 ml) a CH₂Cl₂ (5× 5 ml). UHPLC-MS analýza potvrdila prítomnosť produktu **4** (ESI+ : 746).

5.5 Acylácia s Fmoc-D-Tyr(^tBu)-OH aminokyselinou



Resín **4** (300 mg) bol premytý CH₂Cl₂ (5× 5 ml) a následne bola prevedená deprotektia Fmoc chrániacej skupiny (kap. 5.2). Fmoc-D-Tyr(^tBu)-OH (0,9 mmol, 413 mg) a HOBt (0,9 mmol, 122 mg) boli rozpustené v DMF (3 ml) a k zmesi bol pridaný DIC (139 μl). Reakčná zmes bola pridaná k resínu a trepaná po dobu 2 hodín pri laboratórnej teplote. Následne bol resín premytý CH₂Cl₂ (2× 5 ml), DMF (5× 5 ml) a CH₂Cl₂ (5× 5 ml). UHPLC-MS analýza potvrdila prítomnosť produktu **5** (ESI+ : 910).

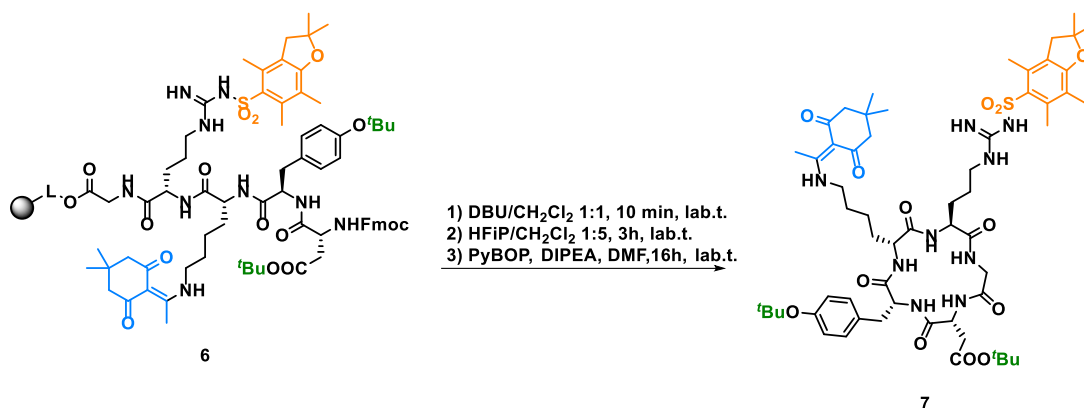
5.6 Acylácia s Fmoc-Asp(^tBu)-OH aminokyselinou



Resín **5** (300 mg) bol premytý CH₂Cl₂ (5× 5 ml) a následne bola prevedená deprotektia Fmoc chrániacej skupiny (kap. 5.2). Fmoc-Asp(^tBu)-OH (0,9 mmol, 370 mg) a HOBt (0,9 mmol, 122 mg) boli rozpustené v DMF (3 ml) a k zmesi bol pridaný DIC (139 μl). Reakčná zmes bola pridaná k resínu a trepaná po dobu 2 hodín pri laboratórnej teplote.

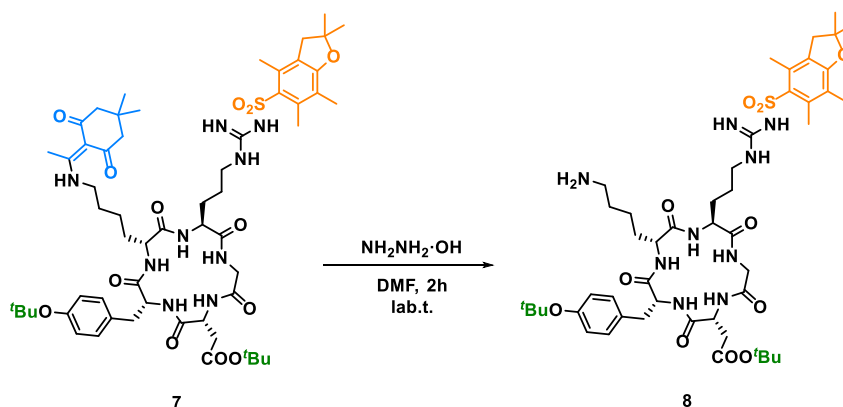
Následne bol resín premytý CH₂Cl₂ (2× 5 ml), DMF (5× 5 ml) a CH₂Cl₂ (5× 5 ml). UHPLC-MS analýza potvrdila prítomnosť produktu **6** (ESI+ : 1026).

5.7 Štiepenie z resínu so zachovaním chrániacich skupín a následná cyklizácia



Resín **6** (100 mg) bol premytý CH₂Cl₂ (5× 3 ml) a následne bola prevedená deprotekcia Fmoc chrániacej skupiny (kap. 5.2). Bola pripravená zmes 1,1,1,3,3,3-hexafluóro-2-propanolu (HFIP) a CH₂Cl₂ (1:5, v/v, 3 ml), ktorá bola následne pridaná ku ochránenému resínu **6**. Reakčná zmes bola trepaná po dobu 3 hodín pri laboratórnej teplote. Po uplynutí času bol obsah striekačky prevedený do banky a striekačka bola dodatočne ručne premytá zmesou HFIP/CH₂Cl₂ (1:5, v/v, 2× 3 ml). Organické frakcie boli spojené a odparené dosucha na rotačnej vákuovej odparke. Surový produkt bol rozpustený v DMF (1 ml) a bol k nemu pridaný PyBOP (0,1 mmol, 52 mg) a DIPEA (0,4 mmol, 70 μl). Zmes bola miešaná po dobu 21 hodín pri laboratórnej teplote. Následná UHPLC-MS analýza potvrdila prítomnosť cyklického surového produktu **7** (ESI- : 1147), ktorý bol použitý do ďalšieho kroku bez ďalšieho čistenia.

5.8 Odchránenie Dde chrániacej skupiny



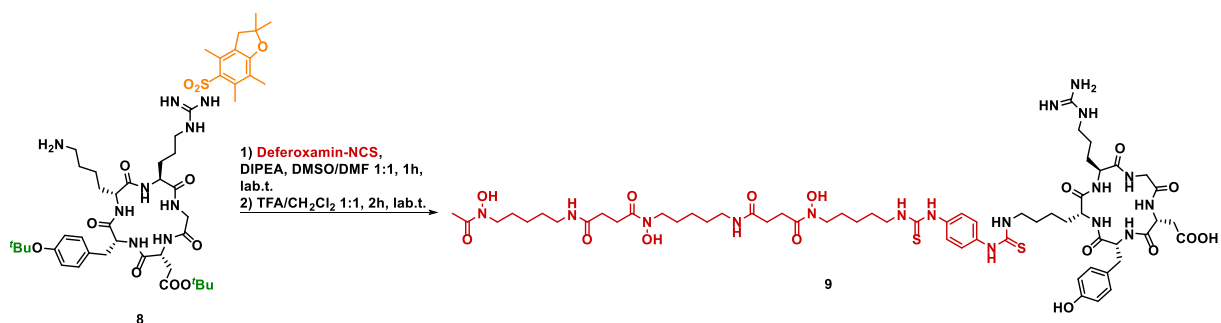
Do reakčnej zmesi s cyklickým produktom **7** bol pridaný $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{OH}$ (20 μl) a zmes bola miešaná po dobu 3 hodín pri laboratórnej teplote. Následná UHPLC-MS analýza potvrdila prítomnosť produktu **8** (ESI⁻ : 983). Banka so surovým produktom **8** bola následne zmrazená v tekutom dusíku a zvyškové rozpúšťadlá boli zlyofilizované (odparené pod vysokým vákuom). Surový produkt bol prečistený na semipreparatívnom HPLC a získaný ako biela pevná látka (45 mg, 76% výťažok).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.36 – 8.30 (m, 2H), 8.07 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.05 – 7.01 (m, 2H), 6.83 – 6.78 (m, 2H), 6.42 (br s, 1H), 4.61 – 4.56 (m, 1H), 4.41 – 4.37 (m, 1H), 4.12 – 4.09 (m, 1H), 4.06 – 3.98 (m, 2H), 3.27 – 3.24 (m, 3H), 3.22 – 3.19 (dd, $J = 15.2, 3.9$ Hz, 2H), 3.00 – 2.95 (m, 3H), 2.93 (s, 2H), 2.91 – 2.85 (m, 1H), 2.72 – 2.68 (m, 1H), 2.64 – 2.62 (m, 2H), 2.58 – 2.52 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.28 (dd, $J = 15.5, 6.3$ Hz, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.90 – 1.87 (m, 2H), 1.77 (s, 2H), 1.71 – 1.68 (m, 2H), 1.37 (s, 3H), 1.32 (s, 9H), 1.23 (s, 9H) ppm. (spektrum **1**)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 173.2, 171.8, 171.0, 170.4, 169.8, 169.3, 169.1, 157.4, 156.0, 153.3, 137.2, 134.1, 132.1, 131.3, 129.5, 124.2, 123.3, 116.2, 86.2, 79.8, 77.5, 54.3, 54.1, 51.9, 48.8, 47.3, 47.3, 45.8, 45.8, 43.2, 42.4, 36.7, 36.4, 30.9, 28.5, 28.2, 27.6, 27.7, 25.9, 25.8, 25.7, 25.6, 25.6, 22.2, 18.9, 17.5, 12.2 ppm. (spektrum **2**)

HRMS (ESI⁺) m/z vypočítané pre $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{N}_{11}\text{O}_9\text{S}_1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 984.5220, nájdené 984.5223.

5.9 Acylácia s deferoxamínom-NCS a ochránenie zvyšných chrániacich skupín



Cyklický produkt **8** (0,015 mmol, 15 mg) bol rozpustený v DMF (500 μ l) a bola k nemu pridaná zmes deferoxamínu izotiokyanátu (0,016 mmol, 12 mg) a DIPEA (0,046 mmol, 8 μ l) v DMSO (500 μ l). Reakčná zmes bola miešaná po dobu 30 minút pri laboratórnej teplote a následná UHPLC-MS analýza potvrdila prítomnosť produktu **9** s chrániacimi skupinami (ESI⁻ : 868 (*molekulový ión 1736*)). Banka so surovým ochráneným produktom **9** bola potom zmrazená v tekutom dusíku a zvyškové rozpúšťadlá boli odparené pod vákuom. Následne bola k surovému produktu pridaná zmes CH₂Cl₂/TFA (1:1, v/v, 2 ml) a reakčná zmes bola miešaná po dobu 2 hodín pri laboratórnej teplote. Zvyškové rozpúšťadlá boli odparené pod prúdom dusíku a surový finálny produkt **9** bez chrániacich skupín bol prečistený na semipreparatívnom HPLC a získaný ako svetlo krémová pevná látka (6mg, 30% výťažok).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.64 – 9.62 (m, 3H), 9.38 (br s, 1H), 9.10 (br s, 1H), 8.30 – 8.28 (m, 1H), 8.22 – 8.07 (m, 3H), 7.94 – 7.91 (m, 2H), 7.79 – 7.73 (m, 2H), 7.67 – 7.62 (m, 2H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.34 – 7.28 (m, 2H), 7.07 – 7.04 (m, 1H), 6.96 – 6.92 (m, 2H), 6.63 – 6.57 (m, 2H), 4.56 – 4.51 (m, 1H), 4.48 – 4.46 (m, 1H), 4.35 – 4.28 (m, 2H), 4.16 (dd, *J* = 16.3, 8.9 Hz, 1H), 3.52 – 3.40 (m, 11H), 3.11 – 3.07 (m, 2H), 3.11 – 2.98 (m, 4H), 2.65 – 2.54 (m, 8H), 2.29 – 2.25 (m, 4H), 1.96 (s, 3H), 1.73 – 1.68 (m, 1H), 1.66 – 1.57 (m, 4H), 1.56 – 1.42 (m, 13H), 1.40 – 1.35 (m, 4H), 1.29 – 1.17 (m, 9H) ppm. (spektrum **3**)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 172.0, 171.2, 170.6, 169.8, 156.6, 155.5, 154.7, 154.4, 129.8, 128.8, 127.6, 123.0, 114.8, 54.9, 53.3, 51.1, 48.7, 47.0, 44.7, 44.3, 43.8, 43.3, 42.6, 38.3, 31.5, 29.8, 28.7, 28.2, 27.5, 27.1, 26.5, 26.0, 23.4, 23.0, 21.0, 20.3 ppm. (spektrum **4**)

Pozn.: z dôvodu nízkeho pomeru signál-šum nebolo možné pozorovať všetky ^{13}C signály.

HRMS (ESI+) m/z vypočítané pre $\text{C}_{60}\text{H}_{94}\text{N}_{16}\text{O}_{17}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1372.6500, nájdené 1372.6500.

6 Príprava a testovanie rádioaktívne značeného DFO-c(RGDyK)

6.1 Rádioaktívne značenie

Pre rádioaktívne značenie bolo potrebné nájsť optimálne podmienky, a to množstvo peptidu (μl) a reakčný čas (min). Do mikroskúmaviek sa postupne napipetovalo 0,1 μl ; 1 μl ; 10 μl ; 20 μl a 50 μl peptidu (koncentrácia 1 mg ml^{-1}) a k nemu sa pridalo 30 μl acetátového pufru. Eluát ^{68}Ga v podobe gáliových iónov (GaCl_3) bol získaný pomocou $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátora (Eckert & Ziegler, Nemecko), kde ako elučné činidlo bol použitý roztok kyseliny chlorovodíkovej o koncentrácii 0,1 mol dm^{-3} . Odobrala sa stredná frakcia eluátu o objeme 1,5 ml, z ktorej sa postupne pipetovalo 300 μl do jednotlivých skúmaviek s peptidom a pufrom. Rádioaktívne značenie prebiehalo za zvýšenej teploty (85 $^{\circ}\text{C}$), ktorej sa dosiahlo pomocou termobloku (MD-02N, Major Science, USA), po dobu 1, 5, 10, 20 a 30 minút. Po inkubácii sa ku zmesi pridalo 100 μl acetátového pufru pre úpravu pH na hodnotu 6–7 a následne bola prevedená kontrola kvality značenia stanovením rádiochemickej čistoty pomocou HPLC. Pre meranie rádioaktivity bol použitý monitor radiácie (Mini 900 Ratemeter, Thermo Scientific, USA). Zo získaných dát boli vyhodnotené optimálne podmienky pre rádioaktívne značenie konjugátu DFO-c(RGDyK).

6.2 Kontrola kvality značenia

Kontrola kvality rádioaktívne značených zmesí sa prevádzala pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific, USA) s detektorom rádioaktivity (Gabi Star, Raytest, Nemecko) a kolónou Watrex Nucleosil 120 C18 5 μm 250 \times 4 mm (Česká republika). Prietoková rýchlosť bola nastavená na 1 ml min^{-1} a gradientová elúcia podľa tabuľky 1. Získané dáta boli vyhodnotené v programe Chromeleon 7.1 (Dionex, USA).

Tabuľka 1- Gradientová elúcia HPLC. Zloženie mobilných fáz: A – 99,9% H₂O + 0,1% kyselina trifluóroctová, B – 99,9% acetonitril + 0,1% kyselina trifluóroctová

Čas (min)	Zloženie mobilnej fáze
0	100% A + 0% B
3	100% A + 0% B
3,1	100% A + 0% B
6	50% A + 50% B
6,1	50% A + 50% B
10	50% A + 50% B
10,1	20% A + 80% B
13	20% A + 80% B
13,1	100% A + 0% B
15	100% A + 0% B

6.3 Testy stability

Pre testovanie stability komplexu ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK) v prostredí s konkurenčným kationom bol použitý roztok FeCl₃ o koncentrácii 0,1 mol dm⁻³. Z pripraveného roztoku značeného peptidu bolo odobraných 100 µl, ku ktorým sa pridalo 100 µl roztoku chloridu železitého a zmes sa nechala inkubovať pri teplote 37 °C po dobu 30, 60 a 120 minút. V jednotlivých časových intervaloch boli odobrané vzorky na analýzu pomocou HPLC.

Pre testovanie stability komplexu ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK) v prostredí s konkurenčným chelátorom bol použitý roztok DTPA o koncentrácii 6 mmol dm⁻³. Z pripraveného roztoku značeného peptidu bolo odobraných 100 µl, ku ktorým sa pridalo 100 µl roztoku DTPA a zmes sa nechala inkubovať pri teplote 37 °C po dobu 30, 60 a 120 minút. V jednotlivých časových intervaloch boli odobrané vzorky na analýzu pomocou HPLC.

Pre testovanie stability komplexu ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK) v prostredí s fyziologickým pH bol použitý roztok acetátového pufru o koncentrácii 1,1 mol dm⁻³. K pripravenému roztoku značenému peptidu bolo pridaných 100 µl pufru pre úpravu pH na hodnotu 6–7 (kontrola pomocou pH papierikov) a zmes sa nechala inkubovať pri teplote 37 °C po dobu 30, 60 a 120 minút. V jednotlivých časových intervaloch boli odobrané vzorky na analýzu pomocou HPLC.

Pre testovanie stability komplexu ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK) v ľudskom sére bolo odobraných 100 µl roztoku značeného peptidu, ktorý sa zmiešal s 300 µl ľudského séra (FNOL,

Transfúzne oddelenie) a zmes sa nechala inkubovať v mikrobiologickom inkubátore (B 6030, Thermo Scientific, USA) pri teplote 37°C po dobu 30, 60 a 120 minút. V jednotlivých časových intervaloch boli odobrané vzorky o objeme 100 µl, ku ktorým sa pridalo 150 µl acetonitrilu. Vzniknutá zrazenina bola zcentrifugovaná (Smart 15 Microcentrifuge, Hanil Science, Južná Kórea; 15 000 rpm, 3 min) a supernatant bol zanalyzovaný pomocou HPLC.

6.4 Rozdeľovací koeficient

Z pripraveného roztoku značeného peptidu bolo odobraných 350 µl, ku ktorým sa pridalo 650 µl roztoku PBS. Z nariedeného preparátu sa odobralo 50 µl, ktoré sa zmiešali s 450 µl PBS a 500 µl oktanolu. Takto bolo pripravených celkovo šesť skúmaviek, ktoré sa nechali pretrepávať na trepačke po dobu 20 minút pri 300 rpm. Následne boli vzorky vložené do centrifúgy (15 000 rpm, 1 min). Z každej skúmavky bolo odobraných 50 µl z vodnej fázy a 50 µl z oktanolovej fázy. V jednotlivých vzorkách bola meraná rádioaktivita pomocou automatického gama počítacza. Zo získaných dát bol vypočítaný rozdeľovací koeficient ($\log P$), ktorý predstavuje dekadický logaritmus podielu rádioaktivity v oktanolovej (%) a vodnej (%) fáze.

$$\log P = \log \frac{CPM (\%)_{oktanol}}{CPM (\%)_{voda}}$$

6.5 Väzba na plazmatické proteíny

Pre testovanie väzby ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) na plazmatické proteíny boli pripravené dva roztoky, A (základný) a B (kontrolný). Roztok A obsahoval 10 µl roztoku značeného peptidu a 190 µl ľudského séra, roztok B obsahoval 10 µl roztoku značeného peptidu a 190 µl PBS. Roztoky sa nechali inkubovať pri teplote 37 °C po dobu 30, 60 a 120 minút. V jednotlivých časových intervaloch bolo z oboch roztokov odobraných 25 µl vzorky, ktoré boli nanesené na vopred pripravené gélové kolóny (illustra MicroSpin S-400 HR, GE Healthcare Life Science, USA; centrifugácia 2000 g, 1 min) a zcentrifugované (2000 g, 2 min). Pomocou automatického gama počítacza bola zmeraná rádioaktivita na gélových kolónach a v eluátoch a zo získaných dát bola stanovená väzba značeného peptidu na plazmatické proteíny.

6.6 *In vivo* experimenty

Všetky *in vivo* experimenty boli prevedené v súlade so zákonom 246/1992 Sb., so súhlasom Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy (MSMT-18724/2016-2 a MSMT-41830/2018-7) a so súhlasom Odbornej komisie na ochranu zvierat proti týraniu Lekárskej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Pre *in vivo* experimenty boli použité laboratórne myši, samice kmeňu Balb/c a Balb/c nude nu/nu (Anlab, Praha, Česká republika).

Pre testy na nádorových myšiach boli zdravým myšiam subkutánne aplikované 5×10^6 U-87 MG bunky na pravý bok a rast nádoru bol priebežne sledovaný po dobu približne štyroch týždňov. Myši s veľkosťou nádoru 100–300 mm³ boli testované analogicky ako zdravé myši.

Pred každou aplikáciou rádioaktívne značeného preparátu ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK) laboratórnym myšiam bola overená hodnota pH, ktorá sa pohybovala v rozmedzí 6–7, a bola vykonaná kontrolná analýza značenia pomocou HPLC.

6.6.1 Testovanie *in vivo* stability v moči

Pre zistenie, či podávaná látka v organizme metabolizuje alebo je vylučovaná v nezmenenej podobe bolo potrebné vykonať testy *in vivo* stability. Laboratórnym myšiam bola retroorbitálne (r. o.) podaná látka ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK). Po uplynutí 30 a 90 minút boli odobrané vzorky moču, ktoré boli zanalyzované pomocou HPLC.

6.6.2 PET/CT zobrazovanie

Testovaná látka bola myšiam podávaná r. o., pričom aktivita jednej dávky sa pohybovala v rozmedzí 5–7 MBq. Počas celého vyšetrenia boli laboratórne myši udržiavané pod celkovou anestéziou za použitia inhalačného anestetika izofluránu, podávaného systémom pre inhalačnú anestéziu pre malé zvieratá (Summit Anesthesia Support, USA). Zobrazovanie prebehlo pomocou zobrazovacieho systému PET/SPECT/CT pre malé laboratórne zvieratá (Albira, Bruker Biospin Corporation, USA), pri ktorom bolo vykonané statické zobrazovanie. Statické skenovanie predstavovalo kombinované vyšetrenie pomocou PET a CT 30 a 90 minút po podaní rádioaktívne značeného preparátu. Po vyšetrení boli dáta vyhodnotené pomocou softwaru Albira Reconstructor (Bruker Biospin Corporation, USA) a snímky boli upravované počítačovými programami PMOD (PMOD Technologies Ltd., Švajčiarsko) a VolView (Kitware Inc., USA).

6.6.3 *Ex vivo* biodistribučné štúdie

Študovaná látka ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) bola nariadená 600 μl fyziologického roztoku a pripravený roztok bol r. o. aplikovaný šiestim laboratórnym myšiam. Po 30 a 90 minútach po podaní boli usmrtené tri myši. U každej myši prebehlo pitvanie a boli odobrané nasledujúce orgány: krv, slezina, pankreas, žalúdok (prázdny), črevo, obličky, pečeň, srdce, pľúca, sval, kosť a nádor, v prípade nádorových myší. Orgány boli zvážené a bola zmeraná rádioaktivita v jednotlivých orgánoch pomocou automatického gama počítača (Wizard², PerkinElmer, USA). Dáta boli následne vyhodnotené ako percento podanej dávky na gram orgánu (% ID/g).

7 Výsledky

7.1 Syntéza konjugátu DFO–RGDyK

7.1.1 Syntéza cyklického peptidu

Pre syntézu cyklického peptidu sa ukázala aj v našom prípade ako najvhodnejšia metóda syntézy na pevnej fáze, ktorá umožňovala rýchlu a efektívnu prípravu peptidovej sekvencie bez nutnosti chromatografického čistenia každého reakčného kroku. Navyše použitie mierneho nadbytku reakčných činidiel zabezpečovalo úplnú konverziu na príslušné produkty.

Komerčne dostupný 2-chlorotritylový resín bol v prvom kroku podrobený acylačnej reakcii s prvou aminokyselinou v našej sekvencii (glycínom) v prítomnosti diizopropyletylamínu (DIPEA) ako bázy (schéma 2). Následné ochránenie Fmoc protektívnej skupiny bolo prevedené za použitia zmesi silnej nenukleofilnej báze (v našom prípade DBU) a dichlórmétanu v pomere 1:1. Tento prístup bol nedávno vyvinutý v skupine docenta Sourala a v našom prípade bol zvolený namiesto štandardného použitia 20% piperidínu v DMF, z dôvodu lepších surových čistôt a aj kratšieho reakčného času (10 minút oproti 20 minútam). Acylácia (všeobecne pridanie acylového zbytku za vzniku novej väzby) s ďalšou aminokyselinou – arginínom – prebiehala za použitia DIC/HOBt acylačnej techniky čisto a bez vedľajších produktov (schéma 2).

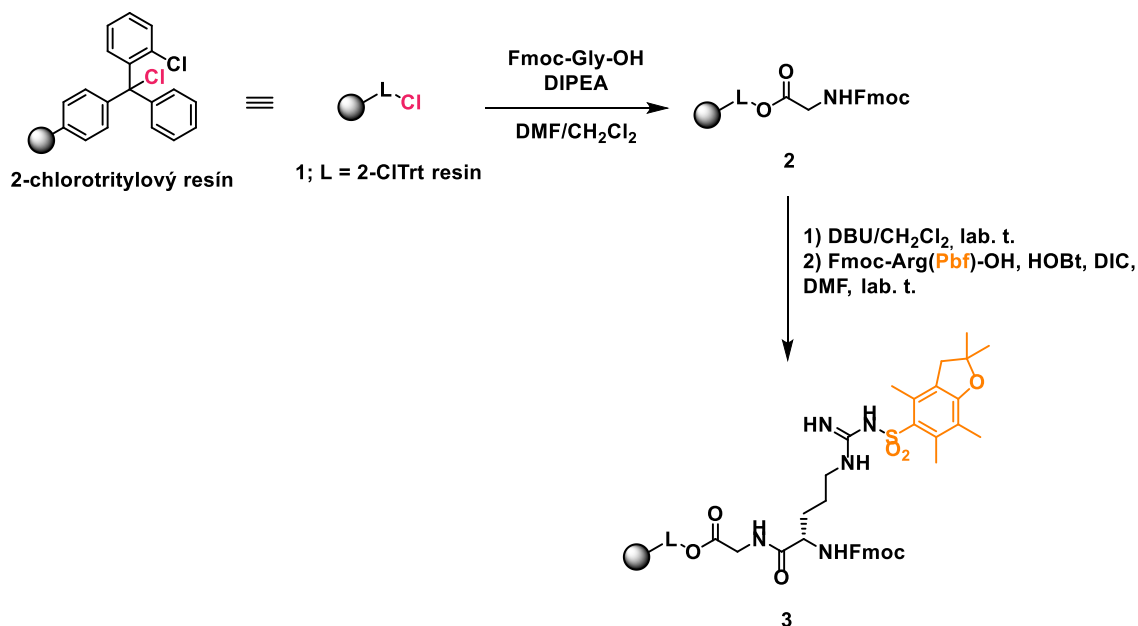


Schéma 2- Acylácia 2-chlorotritylového resinu prvými dvomi aminokyselinami

Následne bol opakovaný cyklus odchránenia Fmoc chrániacej skupiny a pridania ďalšej aminokyseliny až do vzniku príslušného lineárneho a ochráneného pentapeptidu **6** (schéma 3). Použitie lysínu ochráneného na bočnom reťazci so 4,4-dimetyl-2,6-dioxocyklohex-1-ylidénetylom (Dde) bolo zvolené pre jeho ortogonalitu s kyslo labilnými chrániacimi skupinami bočných reťazcov ostatných aminokyselín ako aj s bázicky labilnou Fmoc chrániacou skupinou.⁷⁸ Táto ortogonalita s Fmoc pramení z rozdielneho mechanizmu ich odchraňovania. Zatiaľ čo Fmoc je odchraňovaný pomocou E1cB mechanizmu za vzniku dibenzofulvenu, Dde podlieha odštiepeniu pravdepodobne mechanizmom Michaelovej adície v prítomnosti silného nukleofilu a následnému zacykleniu za vzniku izoxazolu.⁷⁹

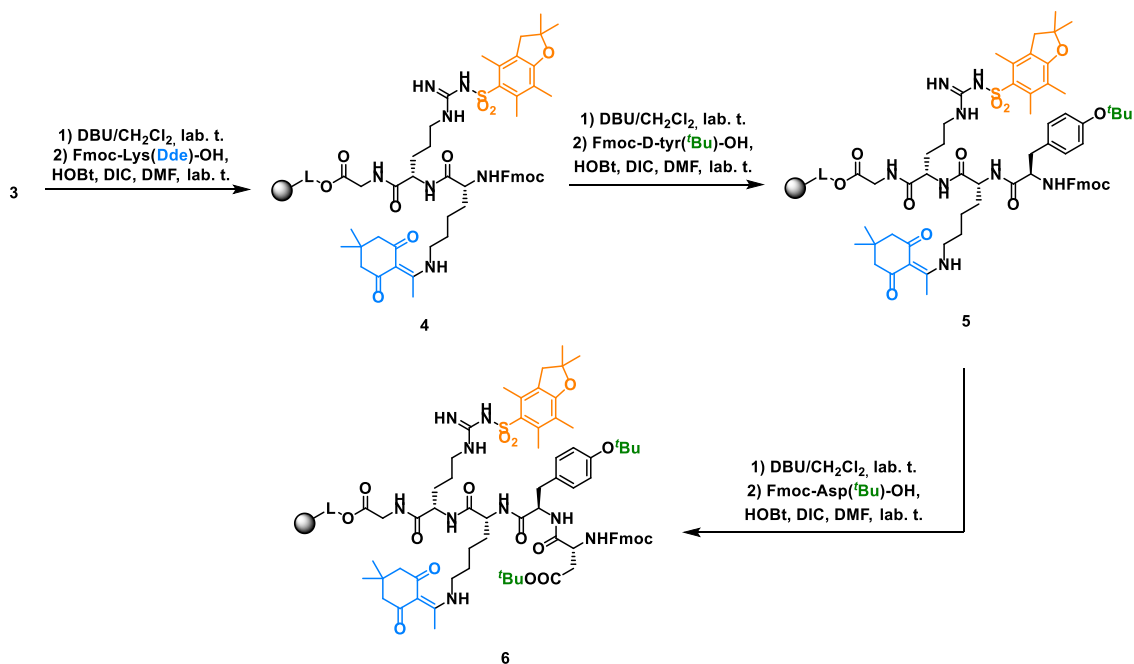


Schéma 3- Dokončenie sekvencie pentapeptidu

V ďalšom kroku bolo nutné lineárny peptid odštiepiť z resínu a cyklizovať. Keďže bolo taktiež nutné zachovať chrániace skupiny na bočných reťazcoch aminokyselín, z dôvodu prevencie vzniku prípadných vedľajších produktov cyklizácie, bola pre štiepenie z resínu, namiesto štandardne používanej kyseliny trifluóroctovej, použitá zmes hexafluóroizopropanolu a CH₂Cl₂, ktorá toto požadované zachovanie zabezpečila. Následná cyklizácia za vzniku novej amidovej väzby prebiehala za použitia benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinofosfónium hexafluórofosfátu (PyBOP) v prítomnosti báze, čo je štandardne používané činidlo pre podobné transformácie (schéma 4).

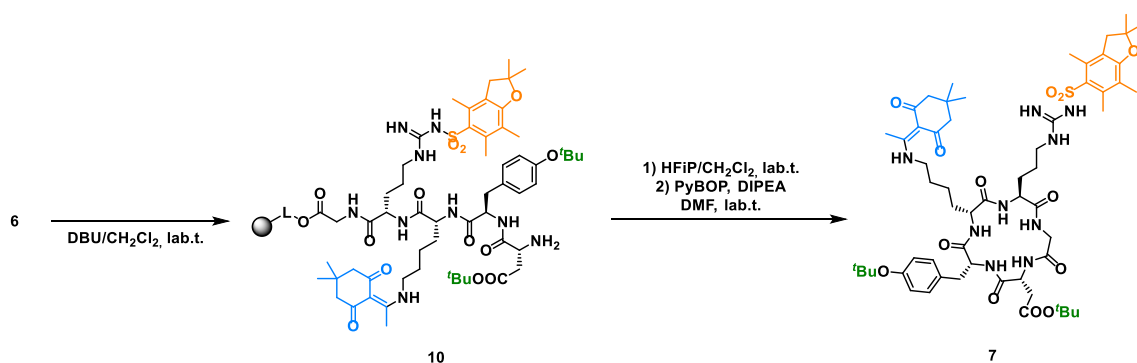


Schéma 4- Štiepenie z resínu a cyklizácia

Ako už bolo spomenuté, Dde chrániaca skupina lyzínu sa ukázala ako skvelá voľba pre následné ortogonálne ochránenie a už aj v prítomnosti veľmi malej koncentrácie (2 %) hydrazín hydrátu bola jej deprotektácia úspešná a kvantitatívna

(schéma 5), za súčasného zachovania ostatných chrániacich skupín. Vznikol tak kľúčový intermediát pre finálnu transformáciu.

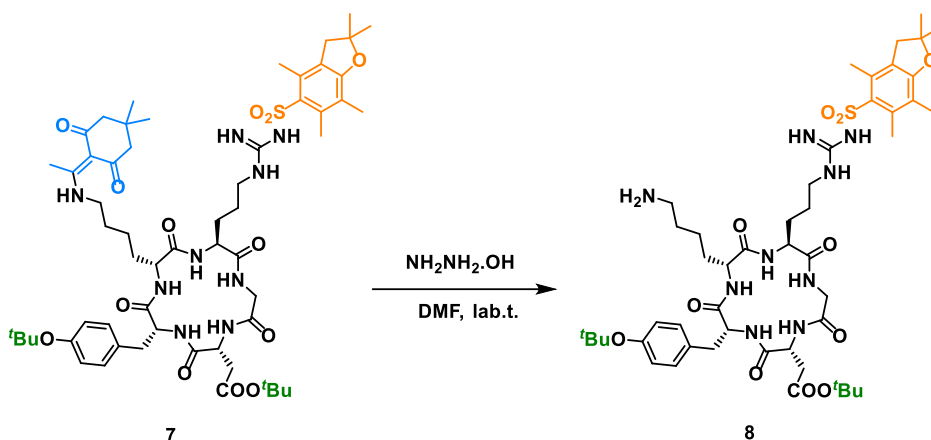


Schéma 5- Odchránenie Dde chrániacej skupiny

7.1.2 Acylácia s deferoxamínom

Na úvod by som rada uviedla, že posledné dva finálne kroky pre prípravu nášho požadovaného konjugátu s deferoxamínom (DFO), ako aj finálne čistenie na semipreparatívnom HPLC, boli prevedené v skupine doc. Sourala (konkrétne doktorkou Krajčovičovou) a to z niekoľkých dôvodov. Bolo to jednak z dôvodu veľkého počtu nutných optimalizácií vedúcich ku konjugácii deferoxamínu s pentapeptidom, ktoré boli nad časový rámec syntetickej práce bakalárskeho študenta, ako aj kvôli vysokej komerčnej cene potrebného reagentu DFO-Bn-NCS (50 mg = 208 €). Pre úplnosť našej práce však tieto kroky uvádzam v schéme 6.

Prvý krok sekvencie teda predstavovala konjugácia s našim predpripraveným intermediátom 8 s aktivovaným izotiokyanátom-DFO za vzniku tiomočoviny. Finálne odchránenie chrániacich skupín za vzniku požadovaného konjugátu 9 prebiehalo už štandardnou cestou a to s použitím zmesi kyseliny trifluóroctovej a dichlórmétanu.

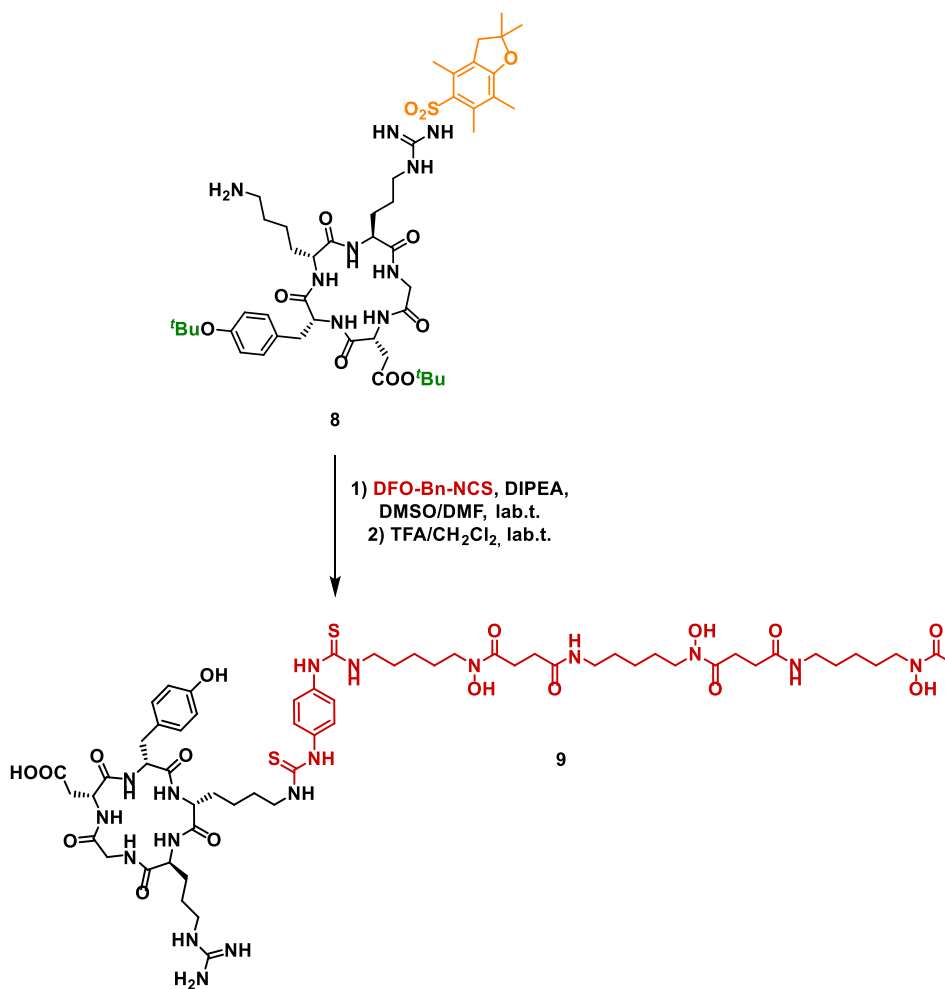


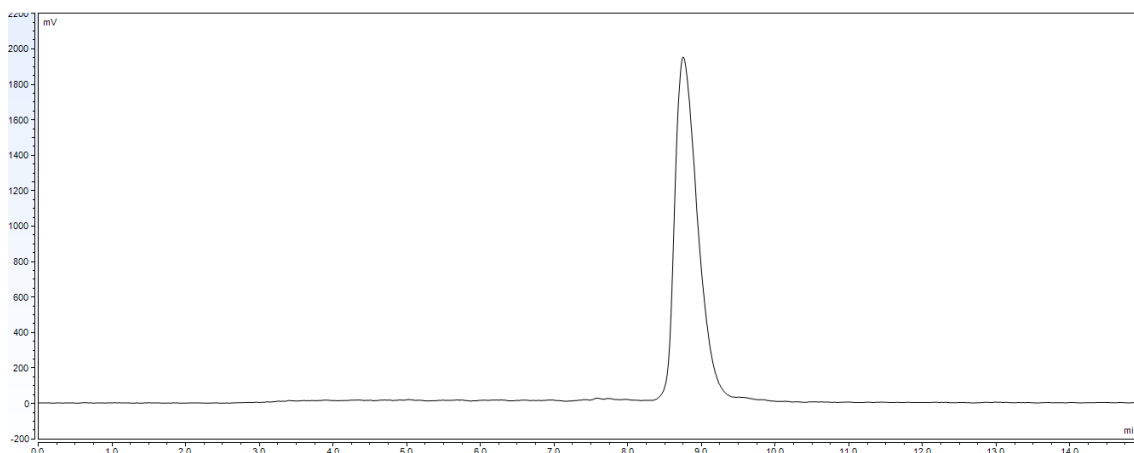
Schéma 6- Finálna konjugácia za vzniku látky 9

7.2 Rádioaktívne značenie

Na základe stanovenia rádiochemickej čistoty boli zvolené optimálne podmienky rádioaktívneho značenia DFO-c(RGDyK). Ako optimálne množstvo peptidu pre rádioaktívne značenie gáliom-68 bolo zvolených 10 µg DFO-c(RGDyK). Toto množstvo DFO-c(RGDyK) poskytovalo výťažky s rádiochemickou čistotou > 98%. 20 µg vykazovalo taktiež vysokú čistotu, avšak pre nasledujúce experimenty bolo zvolené menšie množstvo peptidu z dôvodu aplikácie čo najnižšej dávky laboratórnym myšiam. Všetky testované časy spĺňali požiadavky na vysokú rádiochemickú čistotu (> 95%). Ako optimálne podmienky pre značenie DFO-c(RGDyK) boli teda zvolené tieto parametre: 10 µg DFO-c(RGDyK), 5 min pri 85°C. V tabuľke 2 sú zhrnuté výsledky jednotlivých meraní, obrázok 17 zobrazuje rádiokromatogram ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK).

Tabuľka 2- Optimalizácia podmienok rádioaktívneho značenia DFO-c(RGDyK) gáliom-68

Množstvo peptidu (µg)	RCHČ (%)	Reakčný čas (min)	RCHČ (%)
0,1	34,5	1	97,1
1	94,5	5	99,1
10	98,1	10	98,6
20	98,5	20	98,1
50	97,7	30	97,1



Obrázok 17- Rádiochromatogram ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK)

7.3 Testy stability

Komplex ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) vykazoval vysokú stabilitu v prostredí s vyšším pH a v ľudskom séru (> 95%). Naopak v prostredí s konkurenčným chelátorom a kationom dochádzalo ku transchelatácii. V prostredí s nadbytkom chloridu železitého bolo ^{68}Ga z komplexu ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) vytesnené železitými iónmi a v prípade nadbytku DTPA je ^{68}Ga vyviazané týmto chelátorom. V prípade roztoku FeCl_3 k tomu dochádza veľmi rýchlo po pridaní Fe^{3+} do preparátu. V tabuľke 3 sú zhrnuté výsledky rádiochemických čistôt po 30, 60 a 120 minútach získané pomocou HPLC.

Tabuľka 3- Výsledky *in vitro* testov komplexu ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK). Hodnoty RCHČ testov stability v príslušných prostrediach sú získané pomocou HPLC po 30, 60 a 120 minútach a sú uvádzané v percentách.

Doba inkubácie (min)	Zvýšenie pH (pH = 6–7)	Ľudské sérum	6 mmol dm ⁻³ DTPA	0,1 mol dm ⁻³ FeCl ₃
30	98,3	97,1	77,0	0,1
60	98,7	97,4	67,5	0,1
120	97,3	96,6	45,4	0,1

7.4 Rozdeľovací koeficient

Stanovenie rozdeľovacieho koeficientu $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ ukázalo hydrofilný charakter testovaného komplexu. Hodnota rozdeľovacieho koeficientu ($\log P$) pre komplex $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ uvedená v tabuľke 4 je rovná $-2,01 \pm 0,08$. Predstavuje priemernú hodnotu získanú zo šiestich meraní.

7.5 Väzba na plazmatické proteíny

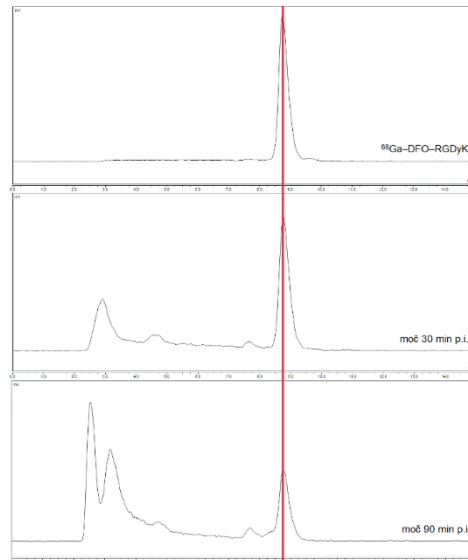
Z nameraných dát získaných pomocou automatického gama počítača bolo vypočítané percentuálne zastúpenie rádioaktivity na kolónke a v eluáte. Dôležitá bola hodnota nameraná v eluáte, ktorá predstavuje väzbu komplexu $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ na krvné proteíny. Vo všetkých testovaných časoch sa väzba $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ na plazmatické proteíny pohybovala okolo 30 %. Výsledky merania po 30, 60 a 120 minútach sú zhrnuté v tabuľke 4.

Tabuľka 4- Výsledky *in vitro* testov komplexu $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$. Hodnota rozdeľovacieho koeficientu $\log P$ a miera väzby na plazmatické proteíny.

$\log P \pm \text{SD}$	Doba inkubácie (min)	Väzba na proteíny (%)
$-2,01 \pm 0,08$	30	31,34
	60	30,04
	120	30,70

7.6 Testovanie *in vivo* stability v moči

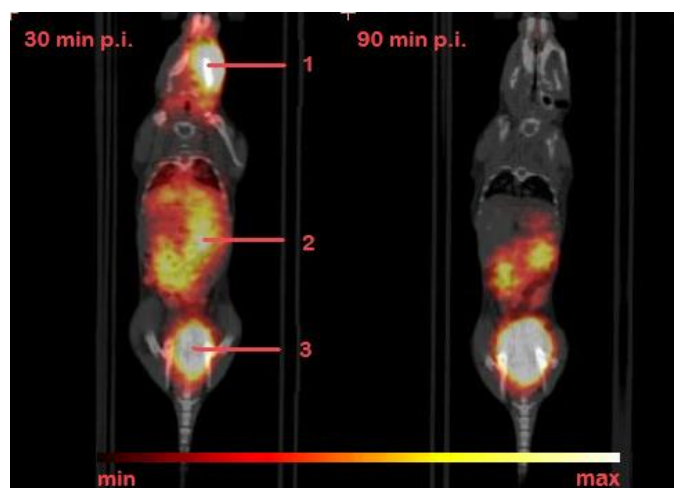
Na obrázku 18 sú zobrazené rádiochromatogramy predstavujúce stabilitu komplexu $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ *in vivo* v moči laboratórnej myši 30 a 90 minút po aplikácii. Po 30 minútach bola nameraná hodnota stability 59,1 %, po 90 minútach hodnota odpovedala 19,8 %, teda stabilita komplexu výrazne klesala. Z nameraných dát a získaných rádiochromatogramov môžeme vidieť, že nami testovaná látka je nestabilná a metabolizuje v organizme.



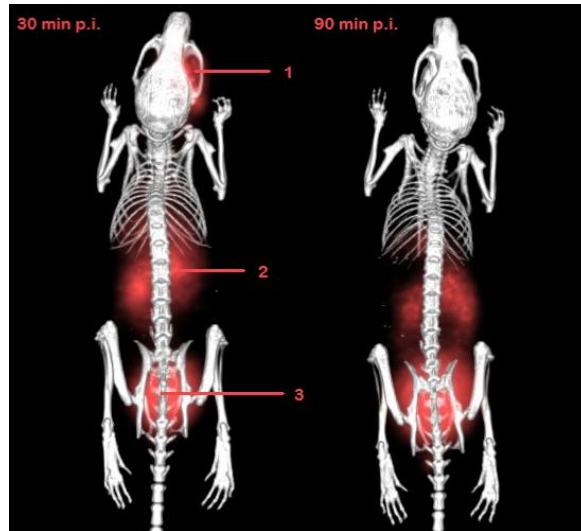
Obrázok 18- Rádiochromatogramy zobrazujúce *in vivo* stabilitu komplexu $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ v moči laboratórnej myši 30 a 90 minút po aplikácii.

7.7 PET/CT zobrazovanie zdravých myší

Výsledky statického PET/CT vyšetrenia u zdravých myší (obr. 19, 20) ukázali na vysokú kumuláciu $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ v obličkách 30 minút po podaní. Slabší signál bolo možné pozorovať v gastrointestinálnom trakte a močovom mechúre. 90 minút po podaní bol rádioaktívny signál výrazný najmä v močovom mechúre. Oproti tomu v obličkách bol signál výrazne slabší oproti 30 minútam po podaní a v ostatných orgánoch sa testovaná látka nekumulovala.



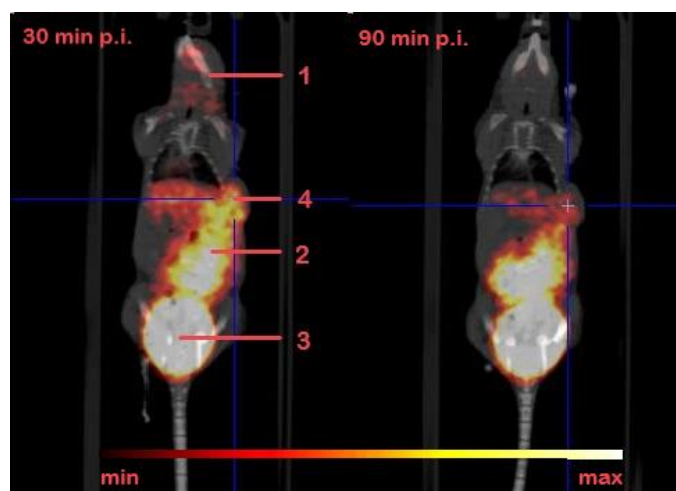
Obrázok 19- Statické PET/CT vyšetrenie zdravých myší 30 a 90 minút po aplikácii $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ (koronárne rezy, 1 – miesto aplikácie, 2 – obličky, 3 – močový mechúr)



Obrázok 20- Statické PET/CT vyšetrenie zdravej myši 30 a 90 minút po aplikácii ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) (3D zobrazenie, 1 – miesto aplikácie, 2 – obličky, 3 – močový mechúr)

7.8 PET/CT zobrazovanie nádorových myší

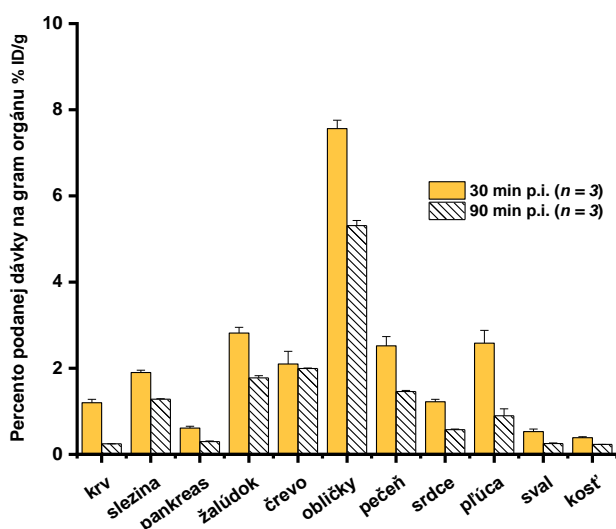
Výsledky statického PET/CT vyšetrenia u nádorových myší (obr. 21) ukázali podobne ako u zdravých myší na vysokú kumuláciu ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) v obličkách a močovom mechúre 30 minút po podaní. Rádioaktívny signál bolo navyše možné pozorovať i v mieste nádoru, aj keď akumulácia ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) tu bola nižšia v porovnaní s obličkami a močovým mechúrom. Snímky zhotovené 90 minút po podaní ukázali na vysokú kumuláciu študovaného peptidu v obličkách a močovom mechúre, zatiaľ čo rádioaktívny signál v mieste nádoru bol výrazne nižší než 30 minút po aplikácii.



Obrázok 21- Statické PET/CT vyšetrenie nádorových myší 30 a 90 minút po aplikácii ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) (koronárne rezy, 1 – miesto aplikácie, 2 – obličky, 3 – močový mechúr, 4 – nádor)

7.9 Ex vivo biodistribúcia u zdravých myší

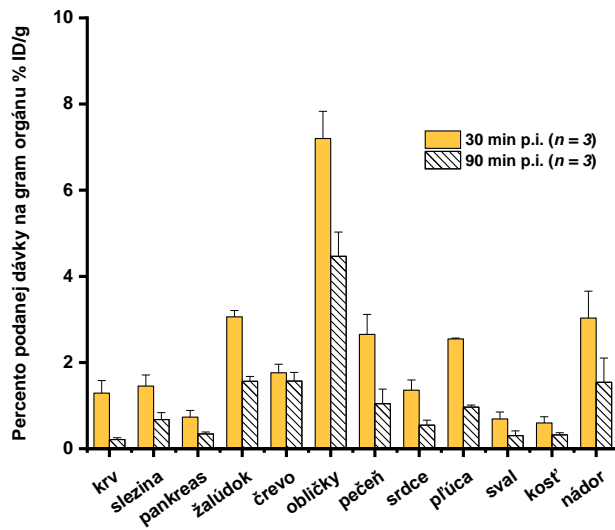
Najvyššia hodnota rádioaktivity u zdravých myší bola nameraná v obličkách 30 minút po podaní ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) ($7,56 \pm 0,20$ % ID/g), nasledoval žalúdok ($2,82 \pm 0,13$ % ID/g) a pľúca ($2,58 \pm 0,30$ % ID/g). V krvi bola nameraná hodnota $1,20 \pm 0,08$ % ID/g. 90 minút po podaní hodnota rádioaktivity v krvi klesla na $0,25 \pm 0,01$ % ID/g. Najvyššiu nameranú hodnotu predstavovali naďalej obličky ($5,31 \pm 0,12$ % ID/g). Získané dáta pre jednotlivé orgány zdravých myší sú zobrazená v grafe 1.



Graf 1- Ex vivo biodistribúcia u zdravých myší 30 a 90 minút po aplikácii ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK)

7.10 Ex vivo biodistribúcia u nádorových myší

V prípade nádorových myší bola nameraná najvyššia rádioaktivita 30 minút po podaní v obličkách ($7,20 \pm 0,63$ % ID/g), žalúdku ($3,06 \pm 0,15$ % ID/g) a nádore ($3,03 \pm 0,63$ % ID/g). Hodnota v krvi sa pohybovala okolo $1,29 \pm 0,29$ % ID/g. Po 90 minútach sa hodnota v krvi znížila na $0,21 \pm 0,04$ % ID/g a hodnota v nádore klesla na $1,54 \pm 0,56$ % ID/g. Hodnota v obličkách naďalej predstavovala najvyššie nameranú hodnotu ($4,46 \pm 0,56$ % ID/g). Hodnoty rádioaktivity jednotlivých orgánov nádorových myší sú zaznamenané v grafe 2. V tabuľke 5 môžeme vidieť zhrnuté pomery nádor/krv, nádor/obličky a nádor/sval po 30 a 90 minútach od aplikácie ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK).



Graf 2- Ex vivo biodistribúcia u nádorových myší 30 a 90 minút po aplikácii $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$

Tabuľka 5- Hodnoty pomeru nádor/krv, nádor/sval, nádor/obličky 30 a 90 min po aplikácii $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$

pomer nádor/krv		pomer nádor/obličky		pomer nádor/sval	
30 min p.i.	90 min p.i.	30 min p.i.	90 min p.i.	30 min p.i.	90 min p.i.
2,35	7,30	0,42	0,34	4,40	5,07

8 Diskusia

Multiformný glioblastóm predstavuje jeden z najmálignejších typov nádorov centrálného nervového systému. Napriek pokroku v možnostiach liečby zostáva naďalej do značnej miery nevyliciteľný. Aj keď je k dispozícii niekoľko variant liečebných postupov, vrátane chirurgického zákroku, spolu s podpornou chemoterapiou a rádioterapiou, ochorenie má veľmi zlú prognózu a pacienti sa vo všeobecnosti nedožívajú viac ako 12 mesiacov od potvrdenia diagnózy.

Na potvrdenie prítomnosti nádorových buniek a určenie rozsahu ochorenia sa používajú rôzne invazívne a neinvazívne zobrazovacie techniky. Práve včasná a presná diagnóza zlepšuje kvalitu a dĺžku života mnohých pacientov. Zobrazovacie techniky používané u pacientov s podozrením na mozgové nádory zahŕňajú invazívne postupy ako katetrická angiografia a mnoho neinvazívnych testov, medzi ktoré sa radí výpočtová tomografia, magnetická rezonancia, pozitronová emisná tomografia, či jednofotónová emisná výpočtová tomografia.⁸⁰ Najväčšie uplatnenie našli v posledných rokoch najmä hybridné zobrazovacie systémy ako sú PET/CT, PET/MR a SPECT/CT, ktoré umožňujú získať komplexnejšie diagnostické dáta.

Molekulárne zobrazovanie vizualizuje a meria biologické procesy na bunkovej a subcelulárnej úrovni. Podstatnou časťou tohto typu zobrazovania je ligand, ktorým môže byť napr. peptid, proteín alebo protilátka. Naň sa viaže cez vhodný chelátor rádionuklid, ktorý umožňuje PET a SPECT zobrazovanie. V prípade MR a CT je potrebná pre zobrazovanie vhodná kontrastná látka a pri optickom zobrazovaní zas organické fluorescenčné farbivo.⁶¹ Ideálne by mala mať rádioaktívne značená látka vysokú väzbovú afinitu a špecifickosť pre konkrétnu cieľovú štruktúru (napr. receptor). Taktiež je dôležitá vysoká stabilita a integrita vo fyziologickom stave, nízka imunogenita a toxicita pre ľudský organizmus.

Pre efektívne PET/CT zobrazovanie nádorov pomocou rádionuklidov boli skúmané rôzne skupiny biologicky aktívnych látok. Ako veľmi nádejné sa ukázali napr. RGD peptidy, úspešne značené fluórom-18 a gáliom-68. Z nich najvýznamnejšie sú najmä ¹⁸F-galakto-RGD, ¹⁸F-RGD-K5, či ⁶⁸Ga-DOTA-RGD.⁸¹ Sekvencia Arg-Gly-Asp sa špecificky viaže na integrínové receptory, ktoré sú počas angiogenézy nadmerne exprimované na endotelových bunkách, pričom u väčšiny zdravých orgánov sú sotva pozorovateľné. Napriek svojej špecifickej schopnosti zacieliť sa na integríny a žiaducej farmakokinetiky sa natívne peptidy len zriedka využívajú priamo na *in vivo* zobrazovanie. Peptidy majú veľmi krátky biologický polčas, zvyčajne len niekoľko minút. V dôsledku enzymatickej degradácie a rýchleho renálneho clearance môžu stratiť svoju biologickú

aktivitu ešte pred dosiahnutím cieľa. Avšak peptidy možno jednoducho modifikovať, čo dokáže zvýšiť ich proteolytickú stabilitu, zlepšiť ich rozpustnosť vo vode a najmä, znížiť ich renálny clearance. Aby sa tomu predišlo, skúmajú sa mnohé stratégie ako je fúzia polyméru, pripojenie na proteíny s dlhšou životnosťou, či použitie dimérov, tetramérov a heterodimérov, ktoré by dokázali zvýšiť afinitu ku integrínovým receptorom oproti svojim monomérom. Cyklizácia často zvyšuje metabolickú stabilitu peptidov.⁴⁵ Predĺžená biologická aktivita je spôsobená najmä tým, že cyklizácia môže pomôcť zabrániť degradácii znížením tvorby konformérov citlivých na proteolytické enzýmy a chráni N- alebo C- koniec peptidovej sekvencie, ktorá je miestom štiepenia exoproteáz. Začlenenie stabilnejších aminokyselín, ako sú *D*-aminokyseliny a β -Ala, sa tiež široko používajú na zlepšenie enzymatickej stability. Podobne substitúcia *D*-tyrozínu za *D*-fenylalanín u cyklických RGD pentapeptidov, ktoré sú v posledných rokoch predmetom intenzívneho výskumu v nukleárnej medicíne, vedie ku zvýšenej stabilite.⁶¹ V porovnaní s c(RGDyK) je c(RGDfK) stabilnejší počas experimentov, ktoré zahŕňajú zvýšenú teplotu, zmeny pH, či inkubáciu v ľudskom sére. Vzhľadom k tomu, že vyššie teploty môžu spôsobiť oxidáciu tyrozínu v c(RGDyK), c(RGDfK) predstavuje stabilnejší a vhodnejší peptid. Avšak veľkou nevýhodou mnohých modifikácií je zvýšená kumulácia testovanej rádioaktívne značenej látky v orgánoch ako sú obličky a pečeň, namiesto kumulácie cielene v mieste nádora.⁸²

Rádioaktívne značené RGD peptidy sú stále predmetom štúdia mnohých výskumných skupín, pretože predstavujú vysoký potenciál pri diagnostike rôznych typov nádorov. Jedným z najúspešnejších rádioaktívne značených RGD peptidov používaných ku zobrazovaniu expresie $\alpha_v\beta_3$ je ¹⁸F-galakto-RGD. Avšak syntéza tejto rádioaktívne značenej látky je pomerne zložitá a časovo náročná, čím sa komplikuje rutinné používanie v klinickej praxi. Práve z tohto dôvodu je skúmaných viacero iných rádioaktívne značených RGD peptidov, ktoré by mohli nahradiť používanie ¹⁸F-galakto-RGD. Ako príklad možno uviesť ⁶⁸Ga-NODAGA-c(RGDyK)⁸³, ktorého značenie možno previesť rýchlo a efektívne, pričom vykazuje podobné výsledky v porovnaní s ¹⁸F-galakto-RGD. Práve preto sa javí ⁶⁸Ga-NODAGA-c(RGDyK) ako vhodná alternatíva. V tejto práci som sa zamerala na ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK), pričom som sa snažila preskúmať jeho vlastnosti a potvrdiť alebo vyvrátiť možnosti využitia tejto látky pri diagnostike glioblastómu.

Cieľom mojej bakalárskej práce bola teda syntéza konjugátu cyklického RGD peptidu s deferoxamínom (DFO) pomocou syntézy na pevnej fáze a následné preklinické testovanie pripraveného konjugátu značeného rádioaktívnym izotopom gália-68.

Deferoxamín je najviac študovaným chelátorom železa, používaným v klinickej praxi už viac ako 50 rokov. Má vynikajúci profil bezpečnosti a účinnosti a preukázal významný vplyv na zvýšenie miery prežitia a zníženie morbiditu u pacientov s akútnou intoxikáciou a chronickým predávkovaním železom. V posledných rokoch sa tiež presadzuje jeho využitie v nukleárnej medicíne. Predstavuje vhodný chelátor pre značenie ^{89}Zr , pre ktorý je momentálne jediným dostupným chelatačným činidlom s efektívnym značením a kvantitatívnymi výťažkami. Okrem toho je známe, že tvorí komplexy s ^{67}Ga , či ^{111}In . Práve z dôvodu možnosti využitia DFO ako chelátora pre viaceré rádionuklidy, a pre jeho účinné chelatačné vlastnosti, som sa v tejto práci zamerala na jeho správanie po označení gáliom-68 v podobe $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ monoméru pri diagnostike multiformného glioblastómu. Bolo prevedené základné *in vitro* a *in vivo* testovanie $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ monoméru a následne diagnostika multiformného glioblastómu metódou pozitronovej emisnej tomografie v myších nádorových modeloch.

Pre preklinické testovanie $^{68}\text{Ga-DFO-c(RGDyK)}$ bola ako modelová bunková línia zvolená ľudská bunková línia glioblastómu U-87 MG. Existuje veľké množstvo bunkových línií, ktoré simulujú ľudský glioblastóm, a sú široko využívanými líniami vo výskume. Medzi najbežnejšie možno zaradiť bunkové línie U-251 a U-87 odvodené od človeka, myšie bunkové línie GL261 a potkanie bunkové línie 9L/LacZ, F98, RG2, CNS-1 a C6.⁸⁴ Ideálny gliómový model by mal byť podobný ľudskému glioblastómu, z hľadiska jeho morfológických vlastností, invazívneho charakteru a vaskulárneho správania, a jeho imunitného mikroprostredia. Línie U-251 a U-87 patria medzi xenoštepové modely, ktoré sú schopné vývoja len u imunokomprimovaných hlodavcov, zatiaľ čo ostatné bunkové línie sa môžu vyvíjať v imunokompetentných syngénnych modeloch. Každý gliómový model je schopný vytvoriť svoju vlastnú vaskulárnu sieť s cievami rôznej dĺžky a priemeru. Všetky modely vykazujú vysokú neovaskularizáciu. Ukázalo sa, že U-87 vykazuje silnú neovaskularizáciu a bežne sa používa na štúdium angiogenézy glioblastómu. Avšak neovaskularizácia pozorovaná v modeloch hlodavcov je fenotypovo odlišná od tých ľudských. Aj keď sa ukázalo, že bunky môžu indukovať proliferáciu endoteliálnych buniek *in vitro*, neprítomnosť endoteliálnej proliferácie v nádoroch U-87 *in vivo* môže byť spôsobená rýchlou kinetikou vývoja nádoru v modeloch v porovnaní so spontánnym vývojom glioblastómu u ľudí. Taktiež to môže byť spôsobené nedostatkom zložiek extracelulárnej matrice zapojenej do migrácie a proliferácie endoteliálnych buniek v myších modeloch. Napriek tomu sa tieto modely široko používajú a ukázali sa ako užitočné pri hodnotení angiogenézy glioblastómu a antiangiogénnych terapeutických prístupov.^{84,85}

Biologické testovanie predstavovalo posúdenie potenciálu pripraveného rádioaktívne značeného peptidu, ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK), pre zobrazovanie glioblastómu. DFO-c(RGDyK) bolo možné veľmi jednoducho rádioaktívne označiť ^{68}Ga s vysokou rádiochemickou čistotou, podobne ako iné RGD peptidy značená Ga-68.^{47,83,86}

^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) vykazoval vysokú stabilitu v prostredí s vyšším pH a v ľudskom séru (96–99 %). To však nemožno tvrdiť o prostredí s konkurenčným chelátorom a kationom. V prípade nadbytku chelátora DTPA postupne dochádzalo ku transchelatacii gália-68 a v prostredí s nadbytkom železitých iónov bol gálium-68 ihneď po pridaní roztoku FeCl_3 z komplexu vytesnený. V porovnaní s inými rádioaktívne značenými RGD peptidmi, ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) vykazuje omnoho horšie výsledky stabilitných experimentov.⁸⁶ Testované peptidy ^{68}Ga -DOTA-c(RGDfK), ^{68}Ga -NODAGA-c(RGDyK) a ^{68}Ga -NODAGA-c(RGDyK)₂ vykazujú vysokú stabilitu vo všetkých spomínaných prostrediach (> 95%).⁴⁷ Je tomu tak kvôli vhodnejšiemu chelátoru, keďže DOTA a NODAGA majú lepšie chelatačné vlastnosti, než nami testovaný chelátor DFO, a v prípade ^{68}Ga -NODAGA-c(RGDyK)₂ sa tiež jedná o dimérový analóg. Taktiež je dôležité podotknúť, že DOTA a NODAGA sú cyklické chelátory, zatiaľ čo DFO, podobne ako EDTA patria medzi lineárne chelátory. Tým sa výrazne zvyšuje stabilita komplexu a chelatacia. U cyklických chelátorov je Ga^{3+} viazaný v dutine cyklu, zatiaľ čo u lineárnych chelatačných činidiel sa tvoria slabšie väzby a reťazec chelátora sa stáča, pričom sa snaží zaujať podobu cyklu a vytvoriť tak vhodnú dutinu, do ktorej pomocou koordinačnej väzby viaže Ga^{3+} .

Hodnota rozdeľovacieho koeficientu (log P) ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) bola stanovená ako $-2,01 \pm 0,08$, čo naznačuje, že rádioaktívne značený preparát vykazuje skôr hydrofilný charakter, čo bolo následne potvrdené aj experimentami na myšiach. Pre porovnanie, hodnota rozdeľovacieho koeficientu ^{68}Ga -NODAGA-RGD bola stanovená ako $-4,05 \pm 0,12$.⁸³ Mierne vyššia hodnota rozdeľovacieho koeficientu ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) môže mať za následok jeho pomalšiu farmakokinetiku a vyššiu akumuláciu v gastrointestinálnom trakte.

Hodnota väzby na plazmatické proteíny sa pohybovala v rozmedzí 30–32 %. Aj napriek zvýšenej väzbe na plazmatické proteíny, čo môže mať za následok zvýšenú koncentráciu aktivity v krvi a môže viesť ku horším zobrazovacím vlastnostiam, vykazoval ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) pomerne uspokojujúce farmakokinetické vlastnosti. V porovnaní s inými rádioaktívne značenými RGD peptidmi⁴⁷, ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) preukázal vyššie hodnoty rádioaktivity v krvnom riečisku, čo je plne v súlade s jeho vyššou väzbou na plazmatické proteíny.

Stanovením *in vivo* stability ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) v moči bolo zistené, že peptid rýchlo metabolizuje a vylučuje sa z tela v rôznych formách v porovnaní s pôvodnou

molekulou, čo môžeme zreteľne vidieť na rádiochromatogramoch zobrazujúcich *in vivo* stabilitu komplexu 30 a 90 minút po aplikácii (obr. 18). V porovnaní s inými rádioaktívne značenými RGD peptidmi, podlieha študovaný preparát výraznej metabolizácii.⁴⁷

Následné *in vivo* experimenty mali za cieľ určiť biodistribúciu ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK) u zdravých a nádorových myší. Pomocou PET/CT zobrazovania sme mohli určiť, v ktorých orgánoch sa primárne preparát kumuluje vo vybraných časoch po aplikácii. U zdravých myší bolo možné pozorovať výraznú akumuláciu ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK) v obličkách, z ktorých sa látka vylučovala do močového mechúra, kde bol signál 90 minút po aplikácii najsilnejší (obr. 19, 20). Podobne tomu bolo aj v prípade nádorových myší, kde sa signál kumuloval prevažne v obličkách, keďže sa jedná o hlavný orgán vylučovania, a v močovom mechúre 30 a 90 minút po podaní. Určitý rádioaktívny signál v mieste nádoru bol viditeľný najmä 30 minút po aplikácii preparátu, pričom po uplynutí 90 minút sa javil výrazne slabší (obr. 21).

Ex vivo experimenty nám poskytli presné hodnoty rádioaktivity v jednotlivých odobraných orgánoch 30 a 90 minút po aplikácii ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK), na základe ktorých boli zhotovené grafy *ex vivo* biodistribúcie u zdravých (graf 1) a nádorových (graf 2) myší. Získané hodnoty odpovedajú *in vivo* zobrazovacím experimentom, a môžeme potvrdiť, že látka sa kumuluje najmä v obličkách, a čiastočne tiež v gastrointestinálnom trakte, u oboch, zdravých i nádorových myší 30 a 90 minút po podaní. Z grafu 2 môžeme pozorovať, že nameraná hodnota rádioaktivity v nádore je minimálne o polovicu nižšia než hodnota nameraná v obličkách. Tieto výsledky sa zhodujú s nameranými hodnotami iných testovaných rádioaktívne značených RGD peptidov.^{47,87} Po stanovení pomeru nádor/obličky sme získali hodnotu 0,42 po 30 minútach po podaní a hodnotu 0,34 po uplynutí 90 minút. Tieto výsledky sú plne v súlade s hlavnou cestou vylučovania u väčšiny RGD peptidov značených rádioaktívnym izotopom gália-68.⁴⁷ Avšak na rozdiel od dát získaných 90 minút po aplikácii pri testovaní preparátov ⁶⁸Ga-NODAGA-RGD a ⁶⁸Ga-DOTA-RGD⁸⁶, môžeme vidieť výrazný rozdiel v nameraných hodnotách, a to najmä pri porovnaní hodnôt rádioaktivity nameraných v nádore a obličkách, ktoré sa pohybujú v rovnakých percentách podanej dávky na gram orgánu. Hodnota pomeru akumulácie nádor/krv bola stanovená na 2,35 30 minút po podaní, po 90 minútach bola hodnota rovná 7,30 (tab. 5). Táto zvyšujúca sa hodnota odpovedá špecifickému vychytávaniu ⁶⁸Ga-DFO-c(RGDyK) v cieľovom tkanive. Po porovnaní s inými gáliom-68 značenými RGD peptidmi hodnota rádioaktivity v nádore stúpa len mierne, zatiaľ čo u ⁶⁸Ga-DOTA-c(RGDfK), ⁶⁸Ga-NODAGA-c(RGDyK), či ⁶⁸Ga-NODAGA-c(RGDyK)₂ je nárast pomeru nádor/krv v čase výraznejší. Hodnoty sa pohybujú v rozmedzí 1,09–2,30 po 30 minútach, a v rozmedzí 14,70–23,12 po 90 minútach.⁴⁷ Tieto rádioaktívne značené RGD peptidy vykazujú omnoho lepšie hodnoty pomerov nádor/krv než je tomu v prípade

^{68}Ga -DFO-c(RGDyK), čo môže byť mimo iné spôsobené rýchlou metabolizáciou. Takisto môžeme pozorovať zvyšujúcu sa hodnotu pomeru nádor/sval, ktorá odpovedala hodnote 4,40 30 minút po aplikácii preparátu a 5,07 po uplynutí 90 minút. Z týchto hodnôt môžeme potvrdiť, že ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) vykazuje špecifickú akumuláciu v nádorovom tkanive.

Touto štúdiou bolo zistené, že testovaný preparát ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) bolo jednoduché rádioaktívne označiť gáliom-68 s vysokou rádiochemickou čistotou (> 95%). Bol potvrdený jeho hydrofilný charakter a uspokojivé *in vitro* charakteristiky, okrem stability v prítomnosti konkurenčného chelátora a kovu. Testovaním *in vivo* stability bola preukázaná nestabilita komplexu ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) v moči laboratórnej myši. Po vykonaní všetkých *in vitro* a *in vivo* experimentov nemožno považovať testovaný preparát DFO-c(RGDyK) značený rádioaktívnym gáliom-68 za látku s vysokým potenciálom pri diagnostike multiformného glioblastómu metódami nukleárnej medicíny.

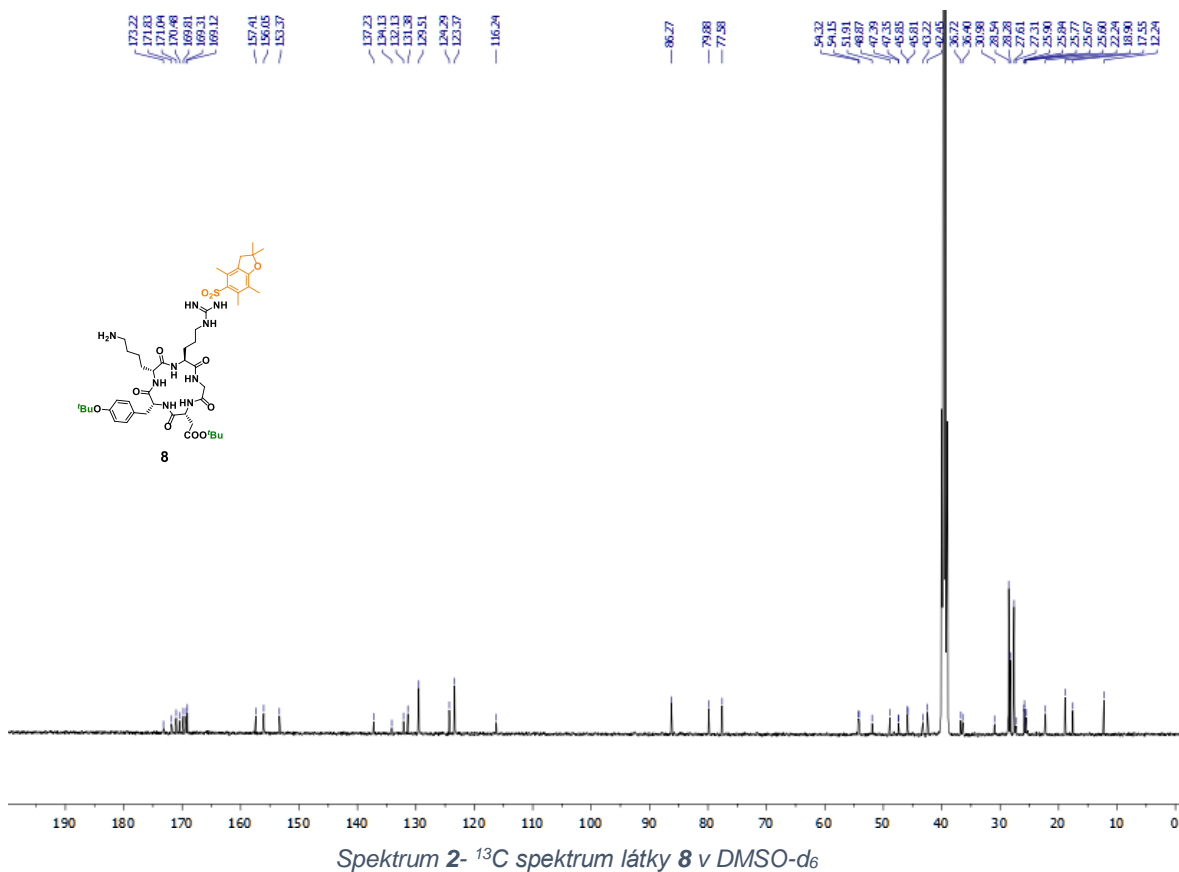
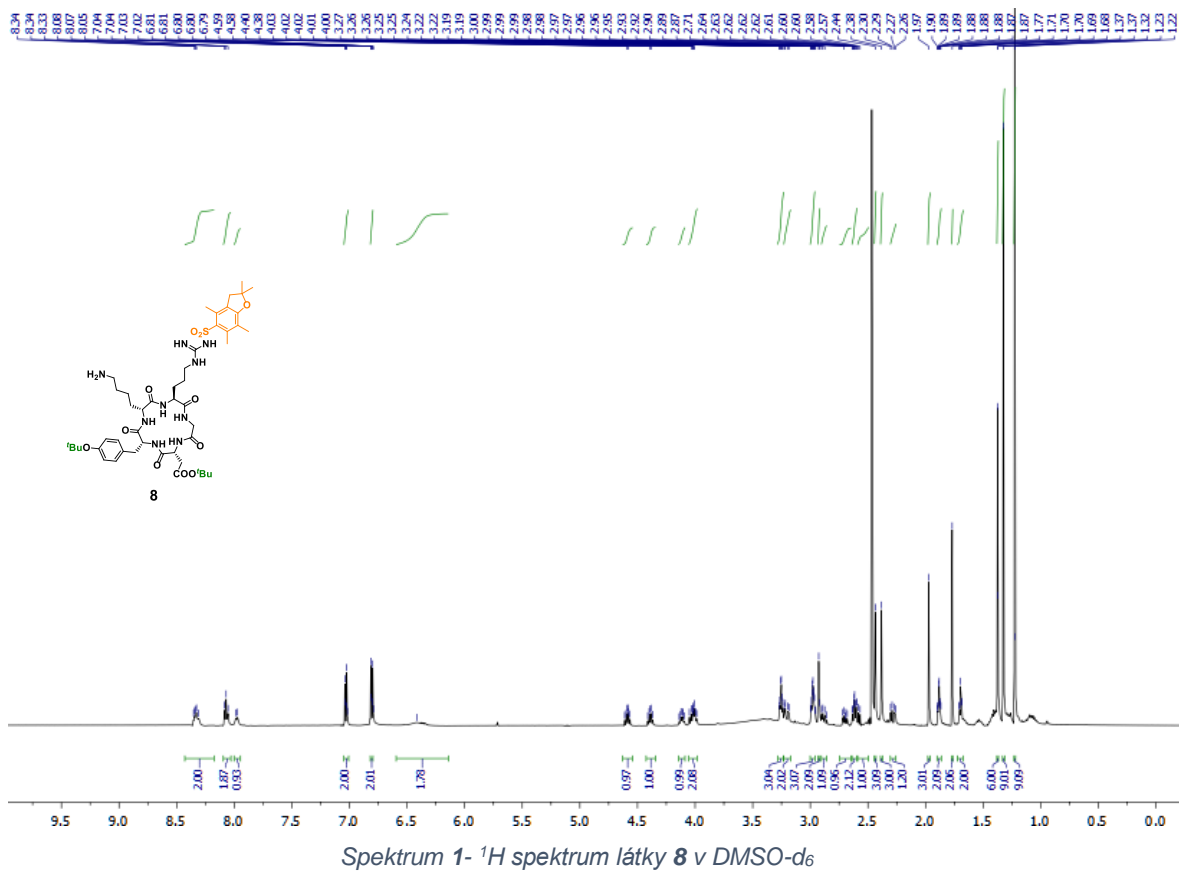
9 Záver

Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce bola príprava a preklinické testovanie preparátu ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) ako potenciálneho rádiofarmaka pri diagnostike multiformného glioblastómu. Práca zahrňovala syntézu konjugátu s deferoxamínom pomocou syntézy na pevnej fáze a základnú *in vitro* a *in vivo* charakterizáciu rádioaktívne značeného DFO-c(RGDyK).

DFO-c(RGDyK) bolo možné rádioaktívne označiť gáliom-68 s vysokou rádiochemickou čistotou ($> 95\%$). ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) preukázal hydrofilný charakter ($\log P = -2,01 \pm 0,08$) a hodnota väzby na plazmatické proteíny sa pohybovala medzi 30–32 %. Testy stability poukázali na vysokú stabilitu v prostredí so zvýšeným pH a v prítomnosti ľudskej plazmy. Naopak v prostredí s konkurenčným chelátorom DTPA a v prostredí s konkurenčným kationom Fe^{3+} sa preparát správal vysoko nestabilne. Rovnako testy v laboratórnych myšiach ukázali výraznú nestabilitu ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) *in vivo*. Získané dáta z *in vivo* a *ex vivo* experimentov poukázali na určitú kumuláciu preparátu v nádore, no výrazne vyššie hodnoty boli zaznamenané v obličkách, gastrointestinálnom trakte a močovom mechúre. V porovnaní s inými rádioaktívne značenými RGD peptidmi, ako sú napr. ^{68}Ga -NODAGA-RGD a ^{68}Ga -DOTA-RGD, sa javil skúmaný konjugát ako menej efektívny.

V posledných rokoch je výskum zameriavaný na využitie rádioaktívnych látok značených izotopom gália-68, a to najmä pre relatívne jednoduché možnosti značenia, vhodné vlastnosti a rýchly polčas rozpadu, čím sa znižuje množstvo radiačnej záťaže, ktorej sú pacienti vystavení počas vyšetrenia. Pri diagnostike multiformného glioblastómu sa využíva viacero efektívnych, rádioaktívne značených látok. Na základe výsledkov experimentov prevedených v rámci tejto bakalárskej práce nemožno bohužiaľ zaradiť testovaný ^{68}Ga -DFO-c(RGDyK) medzi rádioaktívne značené látky s vysokým potenciálom pri diagnostike multiformného glioblastómu pomocou pozitronovej emisnej tomografie.

10 Spektrálna charakteristika



Zoznam obrázkov

Obrázok 1- Štandardná liečba glioblastómu ¹¹	15
Obrázok 2- Chemická štruktúra Temozolomide (TMZ)	16
Obrázok 3- CT, MR, PET/CT sken multiformného glioblastómu ¹⁶	17
Obrázok 4- Schéma generátora ²⁹	22
Obrázok 5- Rozdiel medzi normálnou fyziologickou biodistribúciou ⁶⁷ Ga-citrátu pomocou celotelovej scintigrafie a ⁶⁸ Ga-citrátu pomocou PET /CT ³⁴	23
Obrázok 6- Štruktúra RGD aminokyselín.....	25
Obrázok 7- Schematické znázornenie preskupení počas aktivácie integrínu ⁵⁷	27
Obrázok 8- Chemická štruktúra c(RGDyK), c(RGDfK).....	28
Obrázok 9- Štruktúrny vzorec chelatačného činidla DOTA	31
Obrázok 10- Štruktúrny vzorec chelatačného činidla NOTA	31
Obrázok 11- Komplex deferoxamín-gálium	32
Obrázok 12- Chemická štruktúra ¹⁸ F-galacto-RGD.....	33
Obrázok 13- Chemická štruktúra ¹⁸ F-RGD-K5.....	34
Obrázok 14- Chemická štruktúra ⁶⁸ Ga-DOTA-RGD	34
Obrázok 15- Chemická štruktúra ⁶⁸ Ga-NOTA-RGD	35
Obrázok 16- Chemická štruktúra ⁶⁸ Ga-NODAGA-RGD	35
Obrázok 17- Rádiochromatogram ⁶⁸ Ga-DFO-c(RGDyK)	53
Obrázok 18- Rádiochromatogramy zobrazujúce in vivo stabilitu komplexu ⁶⁸ Ga-DFO-c(RGDyK) v moči laboratórnej myši 30 a 90 minút po aplikácii.	55
Obrázok 19- Statické PET/CT vyšetrenie zdravých myší 30 a 90 minút po aplikácii ⁶⁸ Ga-DFO-c(RGDyK).....	55
Obrázok 20- Statické PET/CT vyšetrenie zdravej myši 30 a 90 minút po aplikácii ⁶⁸ Ga-DFO-c(RGDyK).....	56
Obrázok 21- Statické PET/CT vyšetrenie nádorových myší 30 a 90 minút po aplikácii ⁶⁸ Ga-DFO-c(RGDyK).....	56

Referencie

- (1) Nagai, H.; Kim, Y. H. *J Thor Dis.* **2017**, *9*, 448–451.
- (2) Schiffman, J. D.; Fisher, P. G.; Gibbs, P. *Am Soc Clin Oncol Educ B.* **2015**, *35*, 57–65.
- (3) World Health Organization. (2018). *Cancer*.
Získané (2020, marec 17) na URL:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- (4) Cancer.Net. (2020). *Brain Tumor: Statistics*.
Získané (2020, marec 17) na URL:
<https://www.cancer.net/cancer-types/brain-tumor/statistics>.
- (5) Holland, E. C. *Proc Natl Acad Sci.* **2000**, *97*, 6242–6244.
- (6) Nelson, J. S.; et al. *J Neurooncol.* **2012**, *109*, 315–321.
- (7) Bailly, C.; et al. *Front Pharmacol.* **2019**, *10*, 772.
- (8) Silantjev, A. S.; et al. *Cells.* **2019**, *8*, 863.
- (9) Ozdemir-Kaynak, E.; Qutub, A. A.; Yesil-Celiktas, O. *Front Physiol.* **2018**, *9*, 170.
- (10) Fine, H. A.; et al. *Cancer.* **1993**, *71*, 2585–2597.
- (11) von Neubeck, C.; et al. *Br J Radiol.* **2015**, *88*, 20150354.
- (12) Bouzinab, K.; et al. *CDR.* **2019**, *2*, 1018–1031.
- (13) Mann, J.; et al. *Front Neurol.* **2018**, *8*, 748.
- (14) Khan, I.; Mahfooz, S.; Hatiboglu, M. A. *Med Chem.* **2020**, *16*, 1.
- (15) Alexiou, G. A.; et al. *Curr Radiopharm.* **2012**, *5*, 308–313.
- (16) Rieken, S.; et al. *Radiat Oncol.* **2012**, *7*, 41.
- (17) Maher, E. A.; Bachoo, R. M. Glioblastoma. In *Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease: Fifth Edition*; Elsevier. **2014**, pp 909–917.
- (18) Chen, W.; Silverman, D. H. S. *Semin Nucl Med.* **2008**, *38*, 240–250.
- (19) Othman, S. A. B.; et al. Preface. In *Applications of Radiopharmaceutical in Nuclear Medicine Series 1*; Penerbit UTHM. **2019**, VIII .
- (20) Gupta, T. K. Nuclear Radiation, Ionization, and Radioactivity. In *Radiation, Ionization, and Detection in Nuclear Medicine*; Springer. **2013**, pp 1–57.
- (21) Donya, M.; et al. *Glob Cardiol Sci Pract.* **2014**, *2014*, 57.
- (22) Gamma Energy (KeV).
Získané (2020, marec 9) na URL:

- <https://www.cpp.edu/~pbsiegel/bio431/genergies.html>.
- (23) National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. *Gallium, Ga (Element)*.
Získané (2020, marec 19) na URL:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/element/Gallium#section=Melting-Point>.
- (24) Meisenheimer, M.; Saenko, Y; Eppard, E. Gallium-68: Radiolabeling of Radiopharmaceuticals for PET Imaging - A Lot to Consider. In *Medical Isotopes*; IntechOpen. **2019**, pp 1–21.
- (25) Lever, S. Z.; et al. Radioactive Metals in Imaging and Therapy. In *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier. **2003**, pp 883–911.
- (26) Freeman, T. (**2019**). *Cyclotron-based gallium-68 generator breaks production records*. Získané (2020, máj 22) na URL:
<https://physicsworld.com/a/cyclotron-based-gallium-68-generator-breaks-production-records/>.
- (27) Rösch, F. 68Ge/68Ga Generators: Past, Present, and Future. In *Recent results in cancer research*; Springer. **2013**, pp 3–16.
- (28) Sudbrock, F.; et al. *EJNMMI Res.* **2014**, 4, 1–10.
- (29) Clinical Gate. (**2015**). *Emergency Nuclear Radiology*.
Získané (2020, marec 10) na URL:
<https://clinicalgate.com/emergency-nuclear-radiology/>.
- (30) Banerjee, S. R.; Pomper, M. G. *Appl Radiat Isot.* **2013**, 76, 2–13.
- (31) Mettler, F. A.; Guiberteau, M. J. Non-PET Neoplasm Imaging and Radionuclide Therapy. In *Essentials of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: Seventh Edition*; Elsevier. **2019**, pp 315–327.
- (32) Velikyan, I. *Thno.* **2014**, 4, 47–80.
- (33) Lin, M.; et al. *SOJ Pharm Sci.* **2018**, 5, 1–12.
- (34) Nanni, C.; Orsola-Malpighi, P. S. *J Nucl Med.* **2010**, 51, 1932–1936.
- (35) Moreau, A.; et al. *Front Oncol.* **2019**, 9, 1134.
- (36) Gallamini, A.; Zwarthoed, C.; Borra, A. *Cancers.* **2014**, 6, 1821–1889.
- (37) Sharma, P.; et al. *Indian J Nucl Med.* **2014**, 29, 2–12.
- (38) Lindenberg, L.; Choyke, P.; Dahut, W. *Curr Urol Rep.* **2016**, 17, 1–8.
- (39) Ceci, F.; Fanti, S. *CATI.* **2019**, 7, 377–379.
- (40) Kapp, T. G.; et al. *Sci Rep.* **2017**, 7, 1–13.
- (41) Ruoslahti, E. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **1996**, 12, 697–715.
- (42) Takagi, J. *Biochem Soc Trans.* **2004**, 32, 403–406.
- (43) Eble, J.; Haier, J. *Curr Cancer Drug Targets.* **2006**, 6, 89–105.
- (44) Gaertner, F. C.; et al. *EJNMMI.* **2012**, 39, 126–138.

- (45) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *J Biol Chem.* **1987**, *262*, 17294–17298.
- (46) Roxin, Á.; Zheng, G. *Future Med Chem.* **2012**, *4*, 1601–1618.
- (47) Novy, Z.; Stepankova, J.; et al. *Molecules.* **2019**, *24*, 2496.
- (48) Vhora, I.; et al. Protein and Peptide Drug Conjugates: An Emerging Drug Delivery Technology. In *Protein Chemistry and Structural Biology*; Elsevier Inc. **2015**, pp 1–55.
- (49) Raab-Westphal, S.; Marshall, J. F.; Goodman, S. L. *Cancers.* **2017**, *9*, 110.
- (50) Humphries, M. J. *Biochem Soc Trans.* **2000**, *28*, 311–340.
- (51) Hynes, R. O. *Cell.* **2002**, *110*, 673–687.
- (52) Nieberler, M.; et al. *Cancers.* **2017**, *9*, 116.
- (53) Wilder, R. L. *ARD.* **2002**, *61*, 96–99.
- (54) Liu, Z.; Wang, F.; Chen, X. *Drug Develop Res.* **2008**, *69*, 329–339.
- (55) Huang, T. F. *Cell Mol Life Sci.* **1998**, *54*, 527–540.
- (56) Kharb, R.; et al. *J Chem Pharm Res.* **2011**, *3*, 173–186.
- (57) Nevo, J. Novel Players in the Integrin Signaling Orchestra: Tcctp and Mdgi. Ph.D. Thesis, University of Turku, **2010**.
- (58) Eo, J. S.; Jeong, J. M. *Semin Nucl Med.* **2016**, *46*, 419–427.
- (59) Haubner, R.; et al. *J Nucl Med.* **1999**, *40*, 1061–1071.
- (60) Welch, M. J.; Redvanly, C. S. Radiolabeled Peptides for Tumor Imaging. In *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*; Wiley. **2002**, pp 643–684.
- (61) Sun, X.; et al. *Adv Drug Deliv Rev.* **2017**, *110-111*, 38–51.
- (62) Hlaváč, J.; Soral, M.; Krchňák, V. Practical Aspects of Combinatorial Solid-Phase Synthesis. In *Solid-Phase Organic Synthesis: Concepts, Strategies, and Applications*; Wiley. **2011**, pp 95–130.
- (63) Krajčovičová, S. High-Throughput Conjugation of Drug-like Molecules for Chemical Biology. Ph.D. Thesis, Univerzita Palackého v Olomouci, **2019**.
- (64) Sosabowski, J.; Mather, S. Q *J Nucl Med.* **2003**, *47*, 223–237.
- (65) Spang, P.; Herrmann, C.; Roesch, F. *Semin Nucl Med.* **2016**, *46*, 373–394.
- (66) Švec, P.; Hrubý, M. Radiopharmaceuticals for Diagnostics and Therapy of Neuroendocrine Tumors. *Chem listy.* **2017**, *111*, 3–10.
- (67) Tsionou, M. I.; et al. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 49586–49599.
- (68) Di Nicola, M.; et al. *Biomed Res Int.* **2015**, *2015*, 1–13.
- (69) Renn, O.; Meares, C. F. *Bioconjug Chem.* **1992**, *3*, 563–569.
- (70) Aaseth, J.; Crisponi, G.; Anderson O. Chelating Agents as Therapeutic Compounds - Basic Principles. In *Chelation Therapy in the Treatment of Metal Intoxication*; Elsevier. **2016**, pp 35–61.

- (71) Van Reyk, D. M.; Dean, R. T. *Free Radic Res.* **1996**, *24*, 55–60.
- (72) Zhou, H.; Theil, F. P. Labeling and Imaging Techniques for Quantification of Therapeutic Biologics. In *ADME and Translational Pharmacokinetics/ Pharmacodynamics of Therapeutic Proteins*; Wiley. **2016**, pp 271–294.
- (73) Israel, I.; et al. *Curr Cancer Drug Targets.* **2014**, *14*, 371–379.
- (74) Haubner, R.; Maschauer, S.; Prante, O. *Biomed Res Int.* **2014**, *2014*, 871609.
- (75) Shachar, M.; et al. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 152–162.
- (76) Wang, F.; et al. *Int J Mol Sci.* **2013**, *14*, 13447–13462.
- (77) Gil, E. S.; et al. *Biomaterials.* **2010**, *31*, 8953–8963.
- (78) Díaz-Mochón, J. J.; Bialy, L.; Bradley, M. *Org Lett.* **2004**, *6*, 1127–1129.
- (79) Bialy, L.; Díaz-Mochón, J. J.; et al. *Tetrahedron.* **2005**, *61*, 8295–8305.
- (80) Hanif, F.; et al. *APJCP.* **2017**, *18*, 3–9.
- (81) Durante, S.; et al. *EJNMMI.* **2020**, *10*, 47.
- (82) Dijkgraaf, I.; et al. *CMMI.* **2013**, *8*, 238–245.
- (83) Pohle, K.; et al. *Nucl Med Biol.* **2012**, *39*, 777–784.
- (84) Giakoumettis, D.; Kritis, A.; Foroglou, N. *Hippokratia.* **2018**, *22*, 105–112.
- (85) Candolfi, M.; et al. *J Neurooncol.* **2007**, *85*, 133–148.
- (86) Knetsch, P. A.; et al. *EJNMMI.* **2011**, *38*, 1303–1312.
- (87) Li, Z. B.; Chen, K.; Chen, X. *EJNMMI.* **2008**, *35*, 1100–1108.