

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Tereza Michalčíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Značené peptidy pro *in vivo* multimodální
zobrazování vybraných nádorů**

Bakalářská práce

Tereza Michalčíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: PharmDr. Miloš Petřík, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Značené peptidy pro *in vivo* multimodální zobrazování vybraných nádorů zpracovala samostatně pod odborným vedením PharmDr. Miloše Petříka, Ph.D. s využitím citované literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce PharmDr. Miloši Petříkovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, připomínky a velkou trpělivost během zpracování této práce.

SOUHRN

Využití vhodně značených látek pro multimodální zobrazování biochemických změn, které doprovázejí celou řadu patologických stavů, se ukázalo jako velmi užitečný nástroj hojně využívaný ve vývoji nových léčiv. Vývoj vysoce citlivých a specifických diagnostik pro onkologická onemocnění představuje jednu z nejvyšších priorit v současném biomedicínském výzkumu. Nukleární a optické zobrazovací metody jsou velmi citlivé diagnostické techniky, které lze při použití vhodně označených látek využít pro včasnou a přesnou detekci nádorů. Například cyklický siderofor Fusarinin C (FSC), který je známý svými chelatačními schopnostmi a umožňuje chelátovat radioaktivní Gallium-68, obsahuje tři vazebná místa, na která lze vázat různé vektory a signální skupiny. V této práci byly hodnoceny *in vitro* a *in vivo* vlastnosti dvou biokonjugátů vycházející ze struktury FSC a jejich potenciální využitelnost jako multimodálních látek pro nukleární a optické zobrazování v onkologické diagnostice.

SUMMARY

The use of "smart" labelled agents for the imaging of the biochemical changes that come with any disease has allowed a worldwide recognition of the usefulness of *in vivo* imaging in medicine and biology. The development of highly specific and sensitive diagnostic tools for cancer applications represents the top priority of the current biomedical research. Nuclear as well as optical imaging methods are highly sensitive diagnostic techniques which could provide a suitable methodology for an early and accurate detection of tumours with the use of specific labelled agents. The cyclic siderophore Fusarinine C (FSC) known for excellent chelating abilities towards Gallium-68 has three binding sites allowing the conjugation of targeting vectors as well as additional signalling moieties. In this study two bioconjugates were evaluated regarding their potential as multimodality agents with nuclear and optical signalling for oncological applications.

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 9 |
| 2 ÚVOD..... | 11 |
| 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 12 |
| 3.1 RADIOAKTIVITA | 12 |
| 3.1.1 STRUKTURA ATOMU..... | 12 |
| 3.1.2 TYPY RADIOAKTIVNÍCH PŘEMĚN..... | 13 |
| 3.2 RADIOFARMAKA | 15 |
| 3.2.1 RADIONUKLIDY POUŽÍVANÉ V NUKLEÁRNÍ MEDICÍNĚ..... | 16 |
| 3.2.1.1 VÝROBA RADIONUKLIDŮ | 17 |
| 3.2.1.2 GALLIUM-68 | 18 |
| 3.3 BIFUNKČNÍ CHELÁTORY | 20 |
| 3.3.1 SIDEROFORY | 21 |
| 3.4 RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ PEPTIDY | 22 |
| 3.4.1 RGD PEPTIDY | 25 |
| 3.4.2 MINIGASTRINY (MG)..... | 27 |
| 3.5 ZOBRAZOVACÍ METODY V PREKLINICKÉM VÝZKUMU | 28 |
| 3.5.1 VÝPOČETNÍ TOMOGRAFIE (CT) | 28 |
| 3.5.2 JEDNOFOTONOVÁ EMISNÍ VÝPOČETNÍ TOMOGRAFIE (SPECT) | 29 |
| 3.5.3 POZITRONOVÁ EMISNÍ TOMOGRAFIE (PET)..... | 30 |
| 3.5.4 HYBRIDNÍ SYSTÉMY | 31 |
| 3.5.5 OPTICKÉ METODY | 31 |
| 4 CÍL PRÁCE..... | 34 |
| 5 MATERIÁL A METODIKA | 35 |
| 5.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE | 35 |
| 5.2 RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ PEPTIDŮ | 35 |
| 5.3 KONTROLA KVALITY RADIOAKTIVNÍHO ZNAČENÍ..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 5.4 IN VITRO STABILITA | 36 |
| 5.5 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT (Log P)..... | 36 |
| 5.6 VAZBA NA PROTEINY | 36 |
| 5.7 IN VIVO STABILITA V MOČI..... | 37 |
| 5.8 PET/CT ZOBRAZOVÁNÍ LABORATORNÍCH MYŠÍ..... | 37 |
| 5.9 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ LABORATORNÍCH MYŠÍ | 38 |
| 5.10 EX VIVO BIODISTRIBUCE LABORATORNÍCH MYŠÍ | 38 |
| 6 VÝSLEDKY | 40 |
| 6.1 SID-RGD | 40 |
| 6.1.1 RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ | 40 |
| 6.1.2 IN VITRO STABILITA | 40 |
| 6.1.3 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT | 41 |
| 6.1.4 VAZBA NA PROTEINY | 41 |
| 6.1.5 IN VIVO STABILITA V MOČI..... | 41 |
| 6.1.6 PET/CT ZOBRAZENÍ NENÁDOROVÝCH MYŠÍ | 42 |
| 6.1.7 PET/CT ZOBRAZENÍ NÁDOROVÝCH MYŠÍ..... | 44 |
| 6.1.8 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NENÁDOROVÝCH MYŠÍ..... | 46 |
| 6.1.9 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NÁDOROVÉ MYŠI | 47 |
| 6.1.10 EX VIVO BIODISTRIBUCE NÁDOROVÝCH MYŠÍ | 48 |
| 6.2 SID-MG | 50 |
| 6.2.1 RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ PEPTIDU | 50 |
| 6.2.2 IN VITRO STABILITA | 50 |
| 6.2.3 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT | 51 |
| 6.2.4 VAZBA NA PROTEINY | 51 |
| 6.2.5 IN VIVO STABILITA V MOČI..... | 51 |
| 6.2.6 PET/CT ZOBRAZENÍ NENÁDOROVÝCH MYŠÍ | 52 |
| 6.2.7 PET/CT ZOBRAZENÍ NÁDOROVÝCH MYŠÍ..... | 54 |

| | |
|--|----|
| 6.2.8 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NENÁDOROVÝCH MYŠÍ..... | 56 |
| 6.2.9 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NÁDOROVÝCH MYŠÍ..... | 57 |
| 6.2.10 EX VIVO BIODISTRIBUCE NÁDOROVÝCH MYŠÍ..... | 58 |
| 7 DISKUZE..... | 60 |
| 8 ZÁVĚR..... | 67 |
| 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 68 |

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| ACN | Acetonitril |
| Arg | Arginin |
| Asp | Asparagová kyselina |
| CCK | Cholecystokinin |
| CT | Výpočetní tomografie |
| DAPI | 4',6-diamidin-2-fenylindol |
| DFO | Desferrioxamin |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina |
| DTPA | Diethylentriaminpentaoctová kyselina |
| EDTA | Ethylendiamintetraoctová kyselina |
| EZ | Elektronový záchyt |
| FDG | Fluorodeoxyglukóza |
| FITC | Fluorescein-5-isothiokyanát |
| FSC | Fusarinin C |
| GIT | Gastrointestinální trakt |
| GLP-1 | <i>glucagon-like</i> peptid 1 |
| Glu | Kyselina glutamová |
| Gly | Glycin |
| HPLC | Vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HSA | Lidský sérový albumin |
| HU | Hounsfieldova jednotka |
| IGC | Indocyaninová zeleň |
| J | Játra |
| L | Ledviny |
| Leu | Leucin |
| Lys | Lysin |
| Met | Methionin |
| MG | Minigastrin |

| | |
|----------|--|
| MM | Močový měchýř |
| MRI | Magnetická rezonance |
| MTC | Karcinom štítné žlázy |
| N | Nádor |
| NIR | <i>Near-infrared</i> |
| NN | Negativní nádor |
| NODAGA | 1-(1,3-karboxypropyl)-4,7-karboxymethyl-1,4,7-triazacyklononan |
| NOTA | 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina |
| OC | oktreotid |
| P | Místo podání |
| PBS | Fosfátový pufr |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PET | Pozitronová emisní tomografie |
| Phe | Fenylalanin |
| PN | Pozitivní nádor |
| r.o. | Retroorbitálně |
| RGD | Sekvence aminokyselin arginin-glycin-asparagová kyselina |
| RCHČ | Radiochemická čistota |
| s.c. | Subkutánně |
| SBR | Poměr signálu k pozadí (<i>signal to background ratio</i>) |
| SCLC | Bronchogenní karcinom |
| SD | Směrodatná odchylka |
| SID | Siderofor |
| SPECT | Jednofotonová emisní výpočetní tomografie |
| sst | Subtyp somatostatinového receptoru |
| SulfoCy7 | Sulfo-Cyanin 7 |
| TAFC | Triacetyl-fusarinin C |
| Trp | Tryptofan |
| Tyr | Tyrosin |

2 ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou různorodá skupina chorob, která se vyznačují nekontrolovatelným dělením buněk v určité tělní části v důsledku poruchy regulace buněčného cyklu. Důsledkem takového bujení může být vznik maligního nádoru, který pomocí metastáz zasahuje i do jiných orgánů, kde napadá zdravou tkáň, což vede k oslabení organismu a možné smrti. Vzhledem k závažnosti takového onemocnění je včasná diagnostika patologického stavu klíčová.

V průběhu několika posledních let bylo díky onkologickému výzkumu objeveno a zavedeno do klinické praxe několik nových metod určených k diagnostice nádorových onemocnění. Velký progres byl zaznamenán také v oblasti zobrazovacích metod. Vedle snahy identifikace proteinových markerů nádorů a jejich využití k diagnostice, byl zájem několika výzkumných skupin směřován také na specifické zacílení různých peptidových receptorů pomocí zobrazovacích metod. Základní úvahou ve využití těchto receptorů k diagnostice je, že v některých typech nádorů dochází k jejich nadměrné expresi. S využitím vhodných ligandů pro tyto receptory je poté možné identifikovat nádor v těle pacienta pomocí zobrazovacích metod. Jako ligandy se využívají peptidy specifické pro dané receptory, na které jsou v případě nukleárních zobrazovacích metod navázány vhodné radionuklidy, nebo v případě optických zobrazovacích metod lze využít vhodný chromofor/fluorofor.

V této práci je pozornost věnována dvěma radioaktivně a fluorescenčně značeným peptidům. RGD peptid (arginin-glycin-aspartát), který představuje konzervativní aminokyselinovou sekvenci extracelulárních matrixových proteinů, pomocí které je umožněna vazba na integrinový receptor integrin $\alpha_v\beta_3$ exprimovaný během angiogeneze, a minigastrin, což je gastrinový derivát vázající se specificky na cholecystokininové a gastrinové receptory. U obou studovaných peptidů byla stanovena jejich *in vitro* charakteristika a *in vivo* chování v laboratorních zvířatech. Ze získaných dat se ukázalo, že oba značené peptidy by mohly být využitelné jako multimodální zobrazovací činidla v diagnostice onkologických onemocnění.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 RADIOAKTIVITA

Radioaktivita byla objevena na přelomu 19. a 20. století, kdy Henry Becquerel zjistil při studiu luminiscence krystalů, že některé minerály vyzařují zvláštní záření i bez předchozího ozáření vnějším světlem. Pozoroval, že toto záření dokáže proniknout i obalem fotografických desek a způsobuje jejich začernání. Tímto jevem se dále zabývali manželé Curieovi, kteří ho nazvali radioaktivitou. Později bylo zjištěno, že radioaktivita je doprovázena chemickou změnou radioaktivních prvků, způsobenou přeměnou jader atomů prvku na prvek jiný.

Po dalším zkoumání radioaktivity objevil Ernest Rutherford dvě rozdílné složky radioaktivity, a to α paprsky, které nazval měkkou složkou a které mohly být pohlceny i listem papíru, a záření β , které nazval tvrdou složkou a která je schopná projít i tenkým hliníkovým plechem. Na tento objev navázal Paul Ulrich Villard, který popsal pronikavější záření radia a nazval jej záření γ (Ullmann, 2002).

3.1.1 STRUKTURA ATOMU

Atom se skládá z atomového jádra v jeho středu a z elektronového obalu. V elektronovém obalu se nachází jeden nebo více elektronů, které podle Bohra rotují kolem jádra v různých orbitalech. Elektronová konfigurace udává chemické vlastnosti atomu, kdežto struktura atomového jádra udává stabilitu a charakterizuje formu radioaktivního rozpadu takového jádra.

Velikost atomu se pohybuje v řádech od 10^{-8} cm, velikost jádra poté v řádech 10^{-13} cm (Saha, 2010). Téměř veškerá hmotnost atomu je dána hmotností jeho jádra, a to proto, že hmotnost protonu ($1,67 \times 10^{-27}$ kg) je až 1836krát větší než hmotnost elektronu ($9,109 \times 10^{-31}$ kg). Neutrony, které se spolu s protony nacházejí v jádře, jsou téměř stejně těžké jako protony (Lázníček *et* Komárek, 1998).

Jak bylo zmíněno výše, elektrony se kolem atomového jádra pohybují v energetických orbitalech neboli energetických hladinách. Tyto hladiny jsou v obalu uspořádány podle jejich vzrůstající energie. Při přechodu elektronu z vyšší hladiny do nižší hladiny dojde k uvolnění energie ve formě fotonů. Pokud by došlo k opačnému přechodu, tedy z nižší hladiny do vyšší, musí být pro jeho uskutečnění dodána energie do stejné velikosti, jako by byla při předchozím příkladu uvolněna (Saha, 2010).

Stav elektronu v jeho orbitalu je udáván pomocí čtyř kvantových čísel. Hlavní kvantové číslo n nám udává energii orbitalu a udává tak prostor, ve kterém se nejpravděpodobněji elektron nachází. Vedlejší kvantové číslo l charakterizuje tvar orbitalu, magnetické kvantové číslo m udává prostorovou orientaci elektronu a poslední čtvrté, kvantové číslo spinové s , určuje spin elektronu, tedy směr rotace kolem osy elektronu. Elektrony postupně zaplňují orbitály od nejnižších kvantových stavů elektronu a tím se elektronový obal udržuje ve stabilním stavu (Lázníček *et* Komárek, 1998).

Jádro atomu se skládá z nukleonů, což jsou protony a neutrony. Množství nukleonů v jádře udává nukleonové číslo, protonů číslo protonové a neutronů neutronové číslo. Jádro má sférický tvar a skládá se z těsně uspořádaných nukleonů (Saha, 2010). Mezi nukleony působí jaderné síly, což jsou obrovské síly patřící mezi silné interakce s nepatrným dosahem (asi 1 fm). Mezi další síly působící v mikrosvětě patří síly gravitační, elektromagnetické a slabé. Dále jádro charakterizuje vazebná energie, která udává jeho soudržnost a je udávána jako ekvivalent hmotnostního úbytku jádra.

Mezi jádry existují různé vztahy na základě shod v některých číslech, kterými jsou jádra specifikována. Nuklid je látka složená z několika totožných atomů, tedy mají stejné protonové i nukleonové číslo. Izotopy jsou tvořeny různými nuklidy téhož prvku, tedy se liší pouze nukleonovým číslem a mají stejné protonové číslo (Lázníček *et* Komárek, 1998). V případě, že je izotop nestabilní, nazýváme ho radionuklid.

3.1.2 TYPY RADIOAKTIVNÍCH PŘEMĚN

V případě, že je jádro atomu nestabilní, dojde k přeměně, která ho stabilizuje. Tento proces, při kterém dochází k samovolné přeměně nebo také rozpadu jader atomů nestabilních nuklidů, se nazývá radioaktivita. Takovou změnou dojde ke změně počtu protonů nebo neutronů v jádře a zároveň ke změně vazebné energie (Kupka *et al.*, 2007). Z nestabilního jádra se mění na jádro nové, stabilní, přičemž dochází k emisi nabitě částice nebo vyzáření fotonu. K přeměně radionuklidu může dojít jedním nebo více typy radioaktivních přeměn najednou. Radioaktivní přeměny dělíme na přeměnu alfa, přeměny beta a přeměny gama (Lázníček *et* Komárek, 1998).

Přeměnou alfa dochází k radioaktivní přeměně těžkých nuklidů s protonovým číslem vyšší než 140. Dochází při ní k vyzáření částice α , tedy jádra atomů ${}^4_2\text{He}$, které obsahuje 2 protony a 2 neutrony (Ullman, 2002). Po vyzáření α částice dojde ke snížení protonového čísla o dvě jednotky a nukleonového čísla o čtyři jednotky. Tuto přeměnu může doprovázet ještě

emise gama záření. α částice jsou monoenergetické, což znamená, že všechny emitované α částice mají stejnou energii (Lázníček *et* Komárek, 1998). Tato radioaktivní přeměna má velmi malý dosah ve tkáních okolo 0,03 mm (Kupka *et al.*, 2007)

Beta přeměny jsou nejčastějším typem radioaktivních přeměn a dělí se na tři typy: β^+ , β^- přeměny a zvláštním typem β přeměny je elektronový záchyt (EZ). β^- přeměna se vyskytuje u jader s přebytkem neutronů, kdy dojde k přeměně přebytečného neutronu na proton za emitování částice β^- , kterou je elektron. Vedle elektronu dojde také k emisi antineutrína, což je elementární částice jen s nepatrnou hmotností (Ullman, 2002). Počet protonů v jádře se touto přeměnou zvýší o jednu jednotku a posune se tak v periodické tabulce prvků o jedno místo doprava. Nově vzniklé jádro se může nacházet v excitovaném stavu. Do základního stavu přejde vyzářením fotonu gama. Tento typ radioaktivní přeměny má ve tkáni dosah 1-4 mm (Kupka *et al.*, 2007).

Druhým typem je β^+ přeměna nebo také pozitronová přeměna. K ní dochází v neutron-deficientních jádrech, tedy jádrech, kde počet protonů převládá nad počtem neutronů. Přebytečný proton v jádře se přemění na neutron. Tato reakce je doprovázená emisí β^+ částice, která se nazývá pozitron e^+ , a neutrína. Vznikem nového neutronu nedojde ke změně nukleonového čísla, ale protonové číslo se zmenší o jednu jednotku, tudíž nově vzniklý radionuklid se v periodické tabulce prvků posune o jedno místo doleva (Ullman, 2002).

Zvláštním typem β přeměny je elektronový záchyt, což je alternativní přeměna jádra k β^+ přeměně. U jader s nižším poměrem neutronového a nukleonového čísla, než je normální u stabilních jader, dochází k zachycení jednoho z elektronů z první energetické hladiny jádrem. Tímto záchytem dojde k přeměně jednoho protonu na neutron. Tuto přeměnu doprovází opět emise neutrína jako u přeměny β^+ . Chybějící elektron v elektronovém obalu je doplněn elektronem z další energetické hladiny, tedy dojde k přesunu elektronu v obalu a uvolnění energie ve formě charakteristického X-záření (Lázníček *et* Komárek, 1998).

Přeměna gama patří mezi elektromagnetické radioaktivní přeměny a je spojena s deexcitací dceřiných jader alfa nebo beta přeměny spojené s emisí fotonů. Jedná se o záření o vlnové délce 10^{-11} až 10^{-13} (Ullman, 2002). Je součástí i u tzv. izomerického přechodu, kdy metastabilní formy jádra přecházejí na základní energetický stav. Příkladem radionuklidu, jehož jádro se přeměňuje izomerickým přechodem je ^{99m}Tc .

Pokud dojde k částečnému nahrazení emise gama záření emisí elektronů

z elektronového obalu, mluvíme o vnitřní konverzi. Elektrony tak přímo interagují s excitovaným jádrem a indukují jeho deexcitaci tím, že přijmou jeho přebytečnou energii, která je emituje z jejich orbitalu. Takto emitované elektrony se nazývají konverzní elektrony. Uvolněním elektronu vznikne v orbitalu volné místo, které zaplní elektron z vyšší energetické hladiny. Při tomto přesunu elektronu dochází k uvolnění charakteristického X-záření (Lázníček *et* Komárek, 1998). Takto emitované elektrony se nazývají Augerovy elektrony (Ullmann, 2002).

3.2 RADIOFARMAKA

Radiofarmaka jsou léčivé přípravky obsahující radionuklid, které jsou používány k diagnostickým a léčebným účelům (Liu, 2004). Jejich součástí je chemicky nebo biologicky aktivní látka, jejíž účinnou složku představuje radionuklid. Slouží jako indikátor pro studium kinetiky a metabolismu léčiva, také jeho distribuci ve tkáních a orgánech a způsob jeho vylučování (Lázníček *et* Komárek, 1998).

Diagnostická radiofarmaka jsou látky značené izotopem vyzařujícím gama nebo β^+ záření, využívající se pro jednofotonovou emisní výpočetní tomografii SPECT (*single photon emission computed tomography*) nebo pozitronovou emisní tomografii PET (*positron emission tomography*) (Gijs *et al*, 2015). Používají se při velmi nízkých koncentracích (10^{-6} - 10^{-8} mol.dm⁻³) a většinou tedy nevykazují žádný farmakologický účinek. Primárním cílem aplikace diagnostických radiofarmak je detailní popis morfologické struktury orgánů či tkání, a především testování jejich fyziologických funkcí (Liu, 2004).

Terapeutická radiofarmaka využívají radionuklidy emitující α nebo β^- záření vyvolávající radiotoxicitu, která usmrtí buňky v cílené tkáni. Radionuklid je chemicky navázán na vektor, který je navržen tak, aby se specificky akumuloval v cílené tkáni či orgánu. Částice emitované v důsledku radioaktivní přeměny působí na cílovou tkáň, cytotoxické ionizační záření způsobí neopravitelné dvouřetězcové zlomy DNA, které vyústí ve smrt buňky (Knapp *et* Dash, 2016).

Jelikož jsou radiofarmaka podávána lidem, musejí odpovídat určitým standardům kvality, aby bylo jejich použití bezpečné. Radiofarmaka by měla mít relativně krátký poločas rozpadu, který by neměl ve větší míře přesahovat čas nutný k provedení diagnostického vyšetření. Díky znalosti poločasu přeměny radionuklidu je možné přizpůsobit začátek zobrazování (PET, SPECT). Čím rychlejší akumulace radiofarmaka v cílených tkáních, tím dříve by mělo zobrazování začít. Kromě poločasu rozpadu ale také závisí na množství

aplikované látky. Ve většině případů dochází k aplikaci radiofarmak injekčně (intravenózně), případně i inhalačně, perorálně ve formě tablet nebo lokálně (Lazníček *et* Komárek, 1998).

Další podmínkou pro ideální radiofarmakum je množství emitované energie. Například pro diagnostické studie pomocí SPECT zobrazování musí radionuklid vyzařovat gama radiaci o energii mezi 30-300 keV. Pokud by byla energie nižší než 30 keV, radiace by byla absorbována tkání a její detekce přístroji by byla téměř nulová (Saha, 2010). Při PET zobrazování je hodnota energie anihilačních fotonů 511 keV (Ott *et al.*, 1988). Dále platí, že produktem radioaktivní přeměny radionuklidu použitého v radiofarmaku musí být stabilní nuklid (Lazníček *et* Komárek, 1998).

Prvním radiofarmakem, použitým k lokalizaci nádoru, byl na přelomu 60. a 70. let 20. století ^{131}I -HSA (*human serum albumin*, lidský sérový albumin). Na počátku 70. let byl zaveden ^{67}Ga -citrát, který byl hojně využíván až do počátku 21. století. V 90. letech se začaly využívat radiofarmaka značená ^{111}In , konkrétně například ^{111}In -pentetreotid a ^{111}In -capromab pendetid. Na konci 90. let se většina lokalizačních nádorových skenů prováděla pomocí pozitronové emisní tomografie (PET) s využitím ^{18}F -FDG (fluorodeoxyglukóza) (Drozdovitch *et al.*, 2015). Později bylo ^{111}In nahrazeno ^{68}Ga a to kvůli vyšší specifitě a přesnosti, vyšší míře detekce, rychlejšímu získání výsledků a kratší době nutné k vyšetření, nižší radiační expozici a také nižším nákladům nutným na přípravu ^{68}Ga (Velikyan, 2014). Významným radionuklidem využívaným k přípravě radiofarmak je Technecium-99m, které se rozpadá izomerickým přechodem s poločasem přeměny 6,01 hodin. Dochází při něm k emisi gama vln o energii 140 keV, což ho dělá téměř ideálním pro zobrazování s využitím SPECT. Látky značené $^{99\text{m}}\text{Tc}$ jsou dodnes hojně využívané v preklinických i klinických studiích (Holland *et al.*, 2010).

3.2.1 RADIONUKLIDY POUŽÍVANÉ V NUKLEÁRNÍ MEDICÍNĚ

Radionuklidy nebo také radioaktivní izotopy jsou nestabilní, radioaktivní nuklidy, které se rozkládají spontánním štěpením, elektronovým záchytem, vyzářením částice nebo emisí gama záření. Štěpení radionuklidu je náhodný proces, tedy nemůžeme stanovit přesný čas rozpadu jednoho nuklidu ve skupině nuklidů. Můžeme ale stanovit alespoň průměrné množství radionuklidů rozkládajících se během určitého časového úseku (Saha, 2010).

Každý radionuklid je definován svým poločasem rozpadu. Poločas rozpadu udává dobu, za kterou dojde k rozpadu poloviny radioaktivních atomů specifického radionuklidu. Pokud je tedy poločas rozpadu velmi krátký, dojde k rychlému poklesu radioaktivity (Sharp *et al.*, 2005). Množství radionuklidu, který je součástí radiofarmaka, tedy v důsledku radioaktivní přeměny,

s časem klesá (Kupka *et al.*, 2007).

3.2.1.1 VÝROBA RADIONUKLIDŮ

Radionuklidy používané v nukleární medicíně jsou ve většině případů uměle připravené. Nejčastěji se připravují v cyklotronech, jaderných reaktorech nebo radionuklidových generátorech (Saha, 2010). Obecným pravidlem při výrobě radionuklidů je změna stavby výchozího atomového jádra za vzniku nového radioaktivního jádra (Kupka *et al.*, 2007).

Cyklotron je částicový urychlovač, který pomocí vysokofrekvenčního elektrického a magnetického pole dokáže urychlit pohyb kladně nabitých částic (deutrony, alfa částice, protony). Je tvořen dvěma elektrodami tzv. duanty ve tvaru půlkruhů, ke kterým je připojen oscilátor. Na toto izolované zařízení působí magnetické pole, které je kolmé k elektrodám. Zdroj iontů, umístěný mezi duanty, produkuje ionty ve směru k záporné elektrodě. Magnetické pole na částice působí tak, že zakříví jejich dráhu do tvaru půlkruhu. Dochází ke střídavému prepólování elektrod a s tím spojeným urychlováním částice při každém výstupu z elektrody. Když se ionty dostanou k druhé elektrodě vyšší rychlostí, pohybují se stále po polokruhové dráze, ale s vyšší energií, proto má jejich dráha větší poloměr. Jakmile tyto částice získají dostatečně vysokou energii a rychlost, vyvolají při dopadu na terč jadernou reakci (Mann, 1953).

Radionuklidy získané pomocí cyklotronu jsou většinou neutronově deficientní, a proto se rozkládají β^+ zářením nebo elektronovým záchytem (Saha, 2010). Příkladem radionuklidů připravených na cyklotronu jsou například ^{11}C , ^{123}I , ^{67}Ga , ^{18}F aj.

Princip funkce jaderného reaktoru spočívá v neutronovém záchytu. Neutronový záchyt je absorpce neutronu atomovým jádrem, jehož výsledkem je nový radionuklid. Aby mohlo dojít k produkci radioaktivního prvku neutronovým záchytem, musí mít neutron energii 0,03-100 eV. Takový neutron s nízkou energií se nazývá termální (Ott *et al.*, 1988). V jaderných reaktorech probíhá řízená řetězová štěpná reakce, při které dochází k uvolnění obrovského množství energie. Dochází ke štěpení paliva, např. ^{235}U nebo ^{239}Pu , které se ve formě tyčí nachází uložené v moderátoru, který zpomaluje neutrony uvolněné při štěpení. V průběhu štěpení dochází k zachycení neutronů jádru reaktorového paliva, která jsou následně rozštěpena na dvě středně těžká jádra. Během tohoto štěpení dochází k emisi 2-3 neutronů a uvolnění velkého množství energie. Součástí reaktoru jsou také usměrňující tyče z boru či kadmia, které mohou ovlivňovat chod reaktoru záchytem neutronů a případně ho i zastavit. V jaderném

reaktoru se mohou připravit radionuklidy ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Mo aj. (Lazníček *et* Komárek, 1998).

Radionuklidový generátor je zařízení používané pro extrakci jednoho nuklidu z jiného. Generátory radionuklidů používané v klinické praxi produkují většinou radionuklidy s krátkým poločasem rozpadu a jsou tak ideální pro podání pacientovi, z důvodu minimalizace radiační dávky. Z původního radionuklidu s dlouhým poločasem rozpadu vzniká nový dceřiný radionuklid s krátkým poločasem rozpadu (Navrátil *et* Rosina, 2005). Chemické vlastnosti nově vzniklého radionuklidu se musejí od rodičovského lišit, aby mohlo dojít k jejich separaci.

Ve skleněné nebo plastové koloně generátoru se nachází adsorbční materiál, na který je adsorbovaný rodičovský nuklid. Tento nuklid má dlouhý poločas přeměny a je schopný se přeměnou β^- nebo elektronovým záchytem štěpit na nuklid, který má kratší poločas přeměny. Ten se poté může eluovat pomocí vhodného unášecího roztoku, protože se svými chemickými vlastnosti liší od adsorbovaného, mateřského nuklidu.

Výhodou radionuklidového generátorů oproti cyklotronům nebo jaderným reaktorům je především jejich velikost. Jsou jednoduše transportovatelné a mohou tak sloužit jako zdroj radionuklidů pro instituce, jejichž součástí není cyklotron. Příkladem radionuklidových generátorů jsou $^{123}\text{Te}/^{123}\text{I}$, $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$, $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ aj. (Saha, 2010).

3.2.1.2 GALLIUM-68

Mezi nejčastější radionuklidy používané pro PET a SPECT diagnostické metody patří především pozitronové zářiče ^{11}C , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{124}I a gama zářiče ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In . Většina z nich je produkována cyklotrony, ale galium-68 je kromě cyklotronu možné vyrobit i v radionuklidovém generátoru. I takový faktor, jako je způsob výroby, může značně ovlivnit výběr vhodného radionuklidu pro diagnostická vyšetření, a to především kvůli dostupnosti zařízení pro produkci radionuklidu (Velikyan, 2014).

Gallium je kov poprvé objeven roku 1875 Paul-Emile Lecoq de Boisbaudranem (Chitambar, 2010), který se vyskytuje ve formě až 29 izotopů. Izotopy ^{66}Ga ($t_{1/2} = 9,5$ hod) a ^{68}Ga ($t_{1/2} = 68$ min) se rozkládají za emise β^+ záření a jsou vhodné pro PET zobrazování. Izotop ^{67}Ga ($t_{1/2} = 75$ hod) se štěpí elektronovým záchytem, který doprovází emise gama záření a je tedy vhodný pro SPECT zobrazování (Velikyan, 2014).

Přestože galium nemá žádnou známou fyziologickou funkci v lidském těle, některé z jeho vlastností mu umožňují zasahovat do buněčných procesů a interagovat s proteiny. Tato skutečnost vedla k výrobě sloučenin obsahujících galium, které se využívají při diagnostických

i terapeutických zákrocích, především v oblasti onkologie a infekčních onemocnění (Chitambar, 2010).

Gallium je jedním z prvních pozitron-emitujících radionuklidů používaných v klinické medicíně. První použití gallia se datuje do roku 1960 (Gottschalk *et al.*, 1965). Následně se ale od používání gallia upustilo a začal se používat ^{18}F pro PET zobrazování a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pro SPECT zobrazování. Důvodem byl především tehdejší způsob výroby gallia. Generátory tehdy poskytovaly ^{68}Ga v komplexu s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA) (Banerjee *et al.*, 2013). Aby z něj mohla být vyráběna různá radiofarmaka, bylo nutné takový komplex nejprve rozložit, což představovalo zdlouhavý proces, který byl vzhledem ke krátkému poločasu přeměny ^{68}Ga nevhodný (Velikyan, 2014).

V současné době se využívá pro výrobu gallia-68 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor, jenž je tvořen vhodným adsorbčním materiálem, na kterém je imobilizováno germanium-68. ^{68}Ge má poločas rozpadu 271 dní, což umožňuje dlouhodobější využití jednoho generátoru v laboratoři. Takové generátory umožňují rutinní přípravu ^{68}Ga značených radiofarmak (Fani *et al.*, 2008).

Důležitým aspektem při práci s ^{68}Ga v klinické praxi je jeho chemická forma a koncentrace po eluci z generátoru. Podstatné je také, aby nedocházelo ke kontaminaci eluovaného ^{68}Ga rodičovským ^{68}Ge . Aby se ^{68}Ge neuvolňovalo z kolony, volí se ideální materiál pro jeho adhezi. Nejčastěji používané adsorbční materiály v koloně jsou anorganické oxidy jako je Al_2O_3 , TiO_2 nebo SnO_2 . V současnosti je komerčně nejpoužívanější radionuklidový $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor obsahující TiO_2 , ze kterého se ^{68}Ga eluuje roztokem 0,1 mol/l HCl (Maecke *et al.*, 2005).

^{68}Ga je, stejně jako většina ostatních kovových radionuklidů, se svým oxidačním číslem 3^+ (ve vodném roztoku) tvrdá Lewisovská kyselina a tvoří termodynamicky stabilní komplexy s tvrdými Lewisovskými zásadami (Fani *et al.*, 2012). V roztocích s neutrálním pH je tak Ga^{3+} málo rozpustný, pokud není přítomen vhodný donor elektronů. Ion gallia Ga^{3+} má velkou afinitu k hydroxidové skupině, což znamená, že při vysokém pH je schopný se vyvázat ze svého komplexu a vytvořit anion $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ (Wadas *et al.*, 2010). Ga^{3+} je silně vázán k ligandům, které obsahují několik aniontů, jež slouží jako donoři elektronů. Tyto ligandy obsahují kyslík, síru nebo dusík ve formě karboxylátů, fosfátů, aminů, hydroxamátů nebo fenolátů.

Ga^{3+} musí splňovat několik podmínek, aby bylo vhodným iontem pro tvorbu radiofarmak, a to především termodynamickou stabilitu vůči hydrolázám. Důležitá je také

kinetická inertnost. Ga^{3+} je v mnoha vlastnostech podobný iontu železa Fe^{3+} , což by se mohlo projevit v krevním séru, ve kterém se nachází protein transferrin, který má dvě vazebná místa pro takový kovový ion. Proto musí být komplex radiofarmaka stabilnější než potenciální komplex Ga^{3+} -transferrin nebo kineticky inertní, aby nedošlo k přesunu Ga^{3+} na transferrin, což by poté vyústilo v akumulaci tohoto kovu v játrech nebo plicích. Také tvorbě $\text{Ga}(\text{OH})_3$ se dá zabránit, a to přidáním acetátu nebo citrátu, které představují stabilizující slabé ligandy (Fani *et al.*, 2008).

3.3 BIFUNKČNÍ CHELÁTORY

Ligand, díky kterému může dojít ke kovalentní vazbě s vektorem (peptidem či protilátkou), a který také dokáže navázat kation kovu, se nazývá bifunkční chelátor. Bifunkční chelátor by měl splňovat několik podmínek, a to především schopnost rychle a účinně vázat kation kovu při vazbě na makromolekulu a kinetickou stabilitu v rozmezí pH od 4 do 8. Většina chelátorů navržených pro radionuklid Ga^{3+} jsou šestivazné, mohou být ale i *in vitro* stabilní chelátory, které jsou čtyř nebo pětivazné (Fani *et al.*, 2008).

Existuje několik základních kritérií, která je důležité dodržovat při výrobě vhodného bifunkčního chelátoru. Mezi tato základní kritéria patří především náboj, velikost vazebného místa pro radionuklid a poskytnutí odpovídajícího množství donorových vazebných skupin. Důležitá je také rychlost vzniku komplexu s kovovým nuklidem a rychlost jeho disociace. Existují nejrůznější radionuklidy, které se liší ve svých vlastnostech, a proto nemůže existovat univerzální bifunkční chelátor pro všechny radionuklidy.

Výroba bifunkčních chelátorů je založena na výrobě derivátů z již definovaných a zavedených chelatačních činidel, jako je ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA) a 1,4,7,10-tetraazacyklododekan- $\text{N},\text{N}^{\prime},\text{N}^{\prime\prime},\text{N}^{\prime\prime\prime}$ -tetraoctová kyselina (DOTA). Bifunkční EDTA deriváty se původně používaly s radionuklidy ^{111}In a ^{90}Y , ale kvůli jejich omezené stabilitě se později přiklonilo spíše k využívání bifunkčních derivátů DTPA, které poskytují vhodnější koordinační číslo. Po provedení testů s deriváty DTPA v komplexu s ^{90}Y se ale zjistilo, že stabilita není natolik dokonalá, jak se očekávalo, a docházelo k toxicitě v buňkách. Tento problém se vyřešil použitím oktadentátních makrocyclických bifunkčních DOTA derivátů, které se komplexují s ^{111}In , ^{86}Y , ^{90}Y , radio-lanthanoidy apod. (Brechtel, 2008). Jako vhodné chelátory trojmocných kovů se ukázaly také další makrocyclické sloučeniny, jako například 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina (NOTA) a její deriváty, a to hlavně díky jejich výborné *in vivo* stabilitě

a vhodným farmakokinetickým vlastnostem. Jeden z derivátů NOTA, 1-(1,3-karboxypropyl)-4,7-karboxymethyl-1,4,7-triazacyklononan (NODAGA), se hojně využívá ke tvorbě komplexu s ^{64}Cu , ^{68}Ga a peptidy a poskytuje lepší snímky ze zobrazovacích metod než dříve zmíněná DOTA (Ghosh et al., 2015).

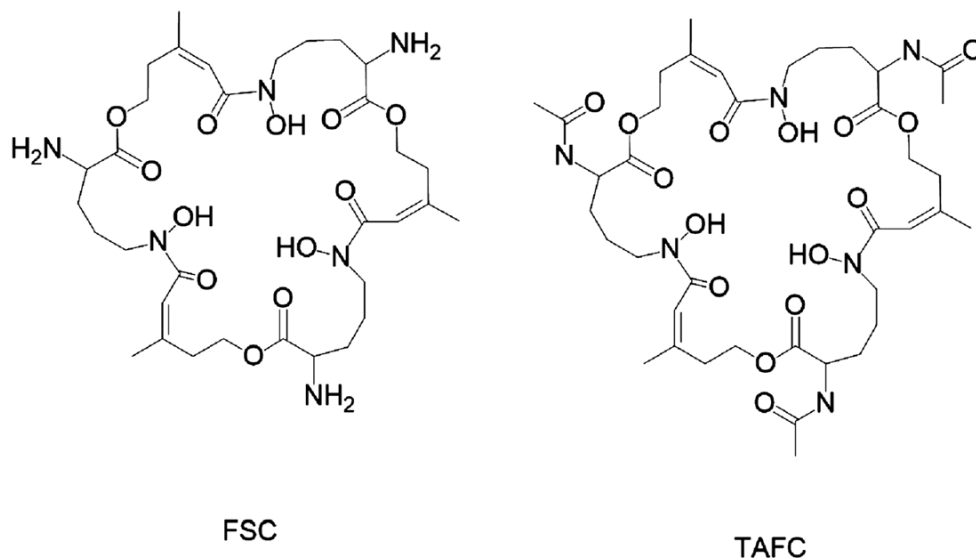
Jeden z prvních záznamů v literatuře o bifunkčním chelátoru, spojeném s protilátkou, byl o desferrioxaminu (DFO), který byl značený ^{111}In (Pritchard *et al.*, 1976). DFO a jemu příbuzné sloučeniny jsou známé pro své schopnosti chelatovat Fe^{3+} , a ukázalo se, že mohou chelatovat i $^{111}\text{In}^{3+}$ a $^{68}\text{Ga}^{3+}$, kvůli jejich vzájemné podobnosti ve struktuře a koordinačních vlastnostech. (Brechtel, 2008). DFO je siderofor produkovaný *Streptomyces pilosus* a využívá se k léčbě nemocí souvisejících s výskytem nadbytku železa v organismu, jako jsou thalassemie, hemochromatóza a myelodysplastický syndrom, a také u pacientů trpících nadbytkem hliníku během hemodialýzy (Zhang *et al.*, 2014).

3.3.1 SIDEROFORY

Jako bifunkční chelátory mohou být tedy použitelné také siderofory. Siderofory jsou malé molekuly s vysokou afinitou vůči železitým iontům, které jsou produkovány houbami, bakteriemi a některými rostlinami. Nejdůležitější rolí těchto látek je vychytávání železa z okolního prostředí a poskytnutí tak neustálého přístupu tohoto esenciálního kovu pro mikrobiální buňky. Siderofory slouží jako cheláty pro železité ionty, které se vyznačují vysokou termodynamickou stabilitou (Neilands, 1995). Kromě železa mají také vysokou afinitu vůči Ga^{3+} iontům, díky podobnostem ve vlastnostech těchto kovů, protože gallium je izosterickým substituentem Fe^{3+} iontů (Petřík *et al.*, 2016).

Siderofory se dělí do tří skupin na základě jejich chemické struktury: katecholy, karboxyláty a hydroxamáty. Známe čtyři hlavní skupiny hydroxamátových sideroforů pocházejících z houbových organismů, které jsou specifické svými chemickými strukturami: coprogeny, rhodotorulové kyseliny, ferrichromy a fusarininy. Ve všech čtyřech skupinách těchto sideroforů je dusík hydroxamátové skupiny získán z N^5 -hydroxyornithinu. K získání kompletní hydroxamátové prostetické skupiny vyžaduje N^5 -acylaci, tedy přidání např. acetylu, anhydromevalonylu nebo methylglutakonylu. Většina sideroforů obsahuje tři hydroxamátové skupiny propojené peptidovou nebo esterovou vazbou tak, aby vytvořily tvar okrahedrálního komplexu.

Základní fusarininový siderofor fusarinin C (FSC) se skládá ze tří N⁵-cis-anhydromevalonyl-N⁵-hydroxyornitninů, propojených esterovými vazbami. N²-acetylací fusarininu C lze získat triacetyl-fusarinin C (TAFC) (Haas, 2003). Struktury FSC a TAFC a jejich podobnost můžeme pozorovat na Obrázku 1.



Obrázek 1: Struktura fusarininu C (FSC) a triacetyl-fusarininu C (TAFC) (převzato z Zhai *et al.*, 2015).

Kromě železitého iontu mohou siderofory vázat i jiné kovy. Kupříkladu TAFC se vyznačuje vysokou afinitou vůči ⁶⁸Ga. Za pokojové teploty se v řádu několika minut váže velmi specificky k ⁶⁸Ga. Obdobně je tomu u FSC. (Knetsch *et al.*, 2015).

TAFC tvoří s radionuklidem ⁶⁸Ga stabilní komplex, který je možné připravit s vysokou specifickou aktivitou. Tyto poznatky vedly k úvahám, zda by nebyl pro tvorbu biokonjugátů značených pomocí ⁶⁸Ga vhodný též FSC, který je deacetylovanou formou TAFC. Po provedení několika *in vivo* a *in vitro* testů biokonjugátu FSC s vhodným RGD peptidem, se prokázalo, že FSC má výborné předpoklady pro funkci bifunkčního chelátoru vhodného k syntéze biokonjugátů, umožňujících značení ⁶⁸Ga (Zhai *et al.*, 2015). Fusarinin C je cyklický hydroxamátový siderofor, který ochotně tvoří komplexy s radionuklidy ⁶⁸Ga a ⁸⁹Zr. Poskytuje tři primární aminoskupiny, díky kterým se na něj mohou konjugovat až tři vektory (Zhai *et al.*, 2016).

3.4 RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ PEPTIDY

Peptidy jsou molekuly skládající se z několika aminokyselin propojených navzájem peptidovou vazbou. Velikost peptidů se může pohybovat od 2 do 50 aminokyselin (Reubi,

2003). Jsou důležitými regulátory růstu, buněčných funkcí a intercelulární komunikace (Ambrosini *et al.*, 2011). Protože se peptidy nevyskytují jen v přírodní formě, ale mohou být připraveny také synteticky, celkové množství jejich variant je obrovské. Toto shrnutí bude dále zaměřeno především na regulační peptidy.

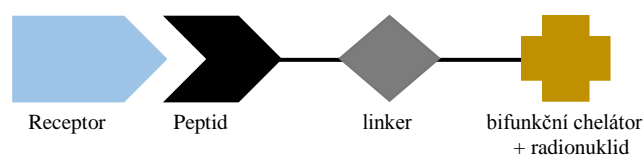
Regulační peptidy představují skupinu různých druhů molekul, které působí na více cílů v lidském těle i při velmi nízkých koncentracích. Cíl může představovat gastrointestinální trakt, mozek, ledviny, endokrinní systém, plíce, ledviny, imunitní, vaskulární či periferní nervový systém, tedy můžeme říct, že regulační peptidy kontrolují a ovlivňují funkce většiny důležitých orgánů a metabolických procesů. Jejich účinek je zprostředkován specifickými membránovými receptory, které jsou ve většině případů spřaženy s G-proteiny. Tyto peptidy mohou mít důležitou roli nejen při normálních fyziologických podmínkách, ale také při patologických procesech. Mohou představovat faktory zánětu, ale také zajišťovat receptory zprostředkovanou komunikaci mezi rakovinnými buňkami (Reubi, 2003).

Jedním z hlavních důvodů zvýšeného zájmu o tyto peptidy a jejich receptory je možnost *receptor targeting* (cíleného směřování na receptory). *Receptor targeting* s radioaktivně značenými peptidy se v posledních letech stal velmi zásadním nástrojem v oblasti nukleární medicíny a onkologie. Pozoruje se biologická aktivita peptidů v různých typech onkologických onemocněních.

Jelikož jsou radioaktivně značené peptidy malé a hydrofilní molekuly, většinou se vyznačují výbornou mobilitou skrze membránu, která jim umožňuje rychlý přístup do nádorových buněk, po jejich aplikaci do organismu (Reubi, 2003). Peptidy bývají často metabolicky nestabilní, ale díky různým syntetickým strategiím procházejí několika úpravami a modifikacemi, které dokáží vylepšit jejich stabilitu i farmakokinetiku (Ambrosini *et al.*, 2011). Z těla jsou po jejich distribuci odbourávány poměrně rychle, a to pomocí močových cest, hepatobiliárním traktem (játra, žlučové cesty) nebo oběma v závislosti na struktuře a vlastnostech použitého peptidu (Reubi, 2003).

Princip přípravy radioaktivně značeného peptidu pro *receptor targeting* se skládá z několika kroků. Nejprve se musí identifikovat cíl, tedy receptor, pomocí imunohistochemie nebo autoradiografie. Dalším krokem je syntéza peptidu nebo jeho analogu. Většinou je struktura tohoto peptidu založena na struktuře endogenního ligandu (peptidu), který vykazuje vysokou afinitu vůči sledovanému receptoru. Endogenní molekula prodělá několik úprav s cílem vzniku metabolicky stabilního analogu, který bude mít stále většinu biologických funkcí

a aktivity původní molekuly. Poté se peptid radioaktivně označí. Peptid je nejčastěji kovalentně spojen pomocí *linkeru* s bifunkčním chelátorem, jak můžeme vidět na Obrázku 2, který na sebe může kromě peptidu vázat také radionuklid. Poté se provádí *in vitro* testování, kdy se zjišťuje, zda radiopeptid neztratil svoji afinitu vůči receptoru, sleduje se jeho internalizace, tedy schopnost jeho přesunu do nitra buňky apod. Následuje *in vivo* testování prováděné na modelových laboratorních zvířatech. Sleduje se farmakokinetika a biodistribuce studovaného radioaktivně značeného peptidu pomocí *ex vivo* biodistribučních studií nebo zobrazovacích metod. Pozornost se také věnuje akumulaci v cílových, a naopak necílových orgánech, rychlosti vylučování látky z těla a jeho metabolické stabilitě. V případě, že všechny výše zmíněné testy dopadly úspěšně, včetně toxikologické studie, radiopeptid může postoupit do klinických studií na lidech. (Fani *et Maecke*, 2012)



Obrázek 2: Struktura radiofarmaka použitého pro *receptor targeting*.

Peptidy určené pro *receptor targeting* mají několik výhod, a to především jejich velikost. Jsou mnohem menší než monoklonální protilátky, které se také využívaly k *receptor targeting*, a mají lepší přístup k nádorové tkáni. Použitím peptidu se také minimalizuje riziko přenosu patogenu nebo vyvolání imunitní reakce (Wang *et al.*, 2013).

Vysoká lipofilita radiofarmaka vede obecně spíše k hepatobiliární exkreci a může být také příčinou vyšší vazby na plazmatické proteiny, což vede k většímu zadržení radioaktivity v krvi. Hepatobiliární exkrece vede ke zhoršení poměru aktivity radiofarmaka v nádorové k nenádorové tkáni, což znamená, že dochází k akumulaci látky i v nesledované nenádorové tkáni. Nicméně existují způsoby, jak farmakokinetiku vylepšit. *Radiotracer* s vhodnými farmakokinetickými vlastnostmi a kumulací v cílové tkáni lze často připravit různými modifikacemi struktury výchozího peptidu. Například záporně nabitě malé peptidové sekvence nebo aminokyseliny byly navrženy jako PKM (pharmacokinetic modifying) *linkery* (spojky upravující farmakokinetiku), aby se snížila akumulace malých biomolekul v ledvinách. *Linker* slouží také k propojení peptidu s radionuklidem pomocí bifunkčního chelátoru. Použita byla například kyselina cysteová jako linker, čímž se urychlilo pročištění krve od radioaktivně značené látky a minimalizovala se aktivita v játrech a ledvinách. Použitím PEG₄ (15-amino-

4,7,10,13-tetraoxapentadekanová kyselina) jako *linkeru* se může zvýšit akumulace látky v nádoru a také rychlost vylučování z organismu (Liu, 2009).

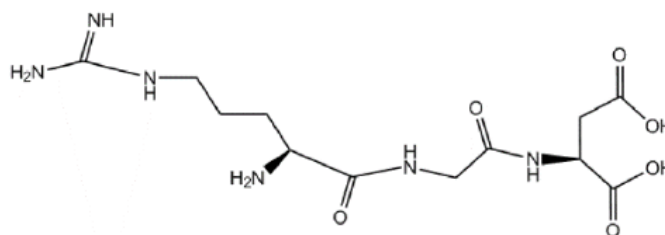
Jedněmi z nejvýznamnějších klinicky používaných radiopeptidů, využívajících se k *receptor targeting* jak v diagnostické, tak i terapeutické praxi, jsou radiopeptidy designované pro vazbu na somatostatinové receptory. Spousta různých lidských nádorů exprimuje somatostatinové receptory, konkrétně existuje až 5 subtypů (sst1-sst5). Všechny jsou na nádoru exprimovány do určitého měřítka, ale sst2 je oproti ostatním nejhojnější. Klinicky nejpoužívanější peptid pro somatostatinové receptory je oktreotid (OC) a jeho deriváty. Využívají se hlavně k diagnostice a léčbě neuroendokrinních nádorů.

Dalším studovaným receptorem je *glucagon-like peptide 1* receptor (GLP-1), který se exprimuje na inzulinomech a gastrinomech. V preklinické studii byl použit nonatriakontamerní peptid (39-merní) exendin-4 značený ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nebo ^{68}Ga . Dále se ve studiích věnuje pozornost substanci P, což je peptid složený z 11 aminokyselin, který se využívá k zobrazování maligních gliomů. Pro zobrazování gastrinového receptoru, který je exprimován v několika nádorech, se používají minigastrinové deriváty, například ^{111}In -DTPA-oktreotid-konjugovaný minigastrinový derivát pro medulární karcinom štítné žlázy. Další využívanou skupinou radioaktivně značených peptidů jsou RGD peptidy, používané k zobrazování integrinů na povrchu nádorů (Ambrosini *et al.*, 2011).

3.4.1 RGD PEPTIDY

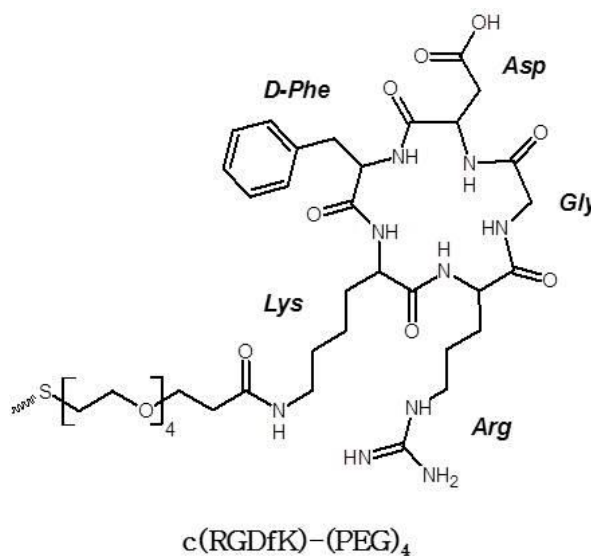
Součástí procesu tvorby nádoru je angiogeneze, což je formace nových krevních cév. Je to základní proces při růstu nádoru a metastáze. Aby mohla angiogeneze probíhat, z nádoru jsou uvolňovány faktory, které aktivují endoteliální buňky v již existujících krevních cévách a indukují endoteliální proliferaci a migraci. Důležitou roli v tomto procesu sehrávají integriny, což je skupiny heterodimerních transmembránových glykoproteinů, které se podílejí na regulaci buněčné adheze, migrace, proliferace, diferenciaci a přenosu signálu. Jeden integrin z této skupiny dimerních transmembránových receptorů se nazývá $\alpha_v\beta_3$ a je exprimován na epiteliálních buňkách. Po aktivaci nových endoteliálních buněk je $\alpha_v\beta_3$ aktivován na jejich povrchu. Několik typů nádoru jako je osteosarkom, neuroblastom, melanom, glioblastom, plicní karcinom nebo karcinom prsu, produkují právě tento integrin $\alpha_v\beta_3$. Tohoto faktu se využívá ke studiu těchto nádorů pomocí zobrazovacích metod, dále ke studiu nádorového růstu, jeho pozice, metastází a také k léčbě.

Integrin $\alpha_v\beta_3$ interaguje s extracelulárními matrixovými proteiny (vitronectin, tenascin, fibronectin, fibrinogen, kolagen aj.) pomocí jejich odhalených aminokyselinových sekvencí arginin-glycin-aspartát (RGD) (viz Obrázek 3) a reguluje tak migraci endoteliálních buněk skrze extracelulární matrix během tvorby cév. Několik těchto RGD peptidových skupin se studuje jako zobrazovací sonda pro sledování exprese integrinu $\alpha_v\beta_3$ v nádorech pomocí zobrazovacích metod jako je například pozitronová emisní tomografie (PET) (Jacobson *et al.*, 2010).



Obrázek 3: Arginin-glycin-aspartátová sekvence (RGD) (převzato z Wang *et al.*, 2013).

Většina RGD peptidů, které se využívají pro radioaktivní značení, jsou cyklické pentapeptidy cyklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (c(RGDfK)) (viz Obrázek 4) nebo cyklo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) (c(RGDyK)), které se od sebe liší pouze v jedné aminokyselině. Studium dimerního, tetramerního a oktamerního c(RGDxK) ($x = y$ nebo f) se zjistilo, že čím vyšší je multiplicita peptidu, tím vyšší je afinita k integrinu $\alpha_v\beta_3$. Ale ukázalo se, že nedochází ke směřování látky pouze do nádoru, ale zvýšilo se také směřování látky do jiných orgánů, a tím se snížila specifita peptidu. Závěrem se testováním zjistilo, že dimer c(RGDxK) je optimální volbou pro radioznačení (Oxboel *et al.*, 2014).



Obrázek 4: Struktura cyklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (c(RGDfK)) s linkerem. PEG – polyethylen glykol

3.4.2 MINIGASTRINY (MG)

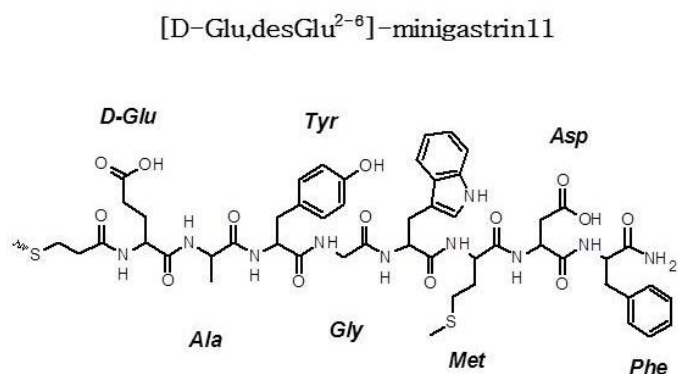
V několika lidských nádorech, jako je medulární karcinom štítné žlázy (MTC), bronchogenní karcinom (SCLC), rakovina vaječníků, gastrointestinální adenokarcinom a mnoha dalších, se vyskytují nadexprimované cholecystokininové-2/gastrinové receptory (CCK2/gastrin-R). Díky této skutečnosti mohou CCK2 receptory sloužit jako cíle pro radiopeptidy při zobrazovacích metodách, jako jsou PET či SPECT (Roosenburg *et al.*, 2014).

Z biochemického hlediska patří CCK2/gastrin receptory mezi receptory spřažené s G-proteiny a skládají se ze 7 transmembránových domén. Cholecystokinin (CCK) a gastrin mají podobné afinity k tomuto receptoru. Známé gastrinové deriváty obsahují peptidy různých velikostí, jako jsou „big-gastriny“, které se skládají ze 34 aminokyselin, gastrin I a II se 17 aminokyselinami a minigastiny, které obsahují 13 aminokyselin. Minimální sekvence aminokyselin nutná k navázání se k CCK2/gastrin receptoru je Trp-Met-Asp-Phe na C'-konci peptidu.

Tyto minigastrinové a gastrinové deriváty se po konjugaci s vhodnou radioaktivní značkou (např. ^{68}Ga) používají k zobrazování CCK2/gastrin receptorů. Akumulace takových radiopeptidů v orgánech, jako jsou například ledviny, se během aplikací pozorně sleduje, kvůli možnosti poškození ozářením, což by mohlo způsobit nefropatie (porucha ledvin). Z tohoto důvodu se radioaktivně značené minigastrinové deriváty upravují nejrozličnějšími postupy tak, aby se snížila pravděpodobnost výskytu nežádoucích účinků (Laabs *et al.*, 2011).

Od 90. lech 20. století se začaly provádět testy s různými peptidy spjatými s CCK2/gastrinovým receptorem na zvířecích modelech. První modely radioaktivně značených minigastrinů, přiravených na základě lidského minigastrinu (Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂), byly spjaty s vysokou retencí radioaktivity v ledvinách. Úpravou aminokyselinové sekvence odstraněním několika terminálních Glu-zbytků vyústilo ve snížení akumulace látky v ledvinách, ale zhoršila se metabolická stabilita tohoto peptidu (Pawlak *et al.*, 2016). Strukturální modifikace minigastrinu v jeho Glu⁶⁻¹⁰-řetězci, například substitucí některých nebo všech Glu-zbytků za Gln, Asp nebo dGlu, vedlo ke zlepšení farmakokinetiky (Kaloudi, 2016). Příklad minigastrinového derivátu (D-Glu, desGlu2-6)-

minigastrin 11 můžeme pozorovat na Obrázku 5.



Obrázek 5: Struktura (D-Glu, desGlu²⁻⁶)-minigastrinu 11.

3.5 ZOBRAZOVACÍ METODY V PREKLINICKÉM VÝZKUMU

Zobrazování malých laboratorních zvířat se v preklinickém výzkumu využívá při studiu mnoha různých onemocnění, včetně rakoviny. K dispozici je několik typů zobrazovacích modalit. Jejich společnou výhodou je možnost provedení opakovaných vyšetření na jednom zvířeti a také schopnost lokalizace pozměněných biochemických a fyziologických procesů *in vivo*. Jednotlivé zobrazovací metody se liší ve způsobu detekce a aplikace zobrazovací sondy, v citlivosti zobrazování sondy a možnosti vedlejších účinků v důsledku ionizující radiace nebo samotné látky.

V preklinickém výzkumu léčiv se podobně jako v klinické praxi využívá široká škála zobrazovacích metod. Patří mezi ně pozitronová emisní tomografie (PET), jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT), výpočetní tomografie (CT), magnetická rezonance (MRI), fotoakustická tomografie, ultrazvuk, zobrazování pomocí magnetických částic a další optické metody jako bioluminiscence či fluorescence (Hildebrandt *et al.*, 2008).

3.5.1 VÝPOČETNÍ TOMOGRAFIE (CT)

Rentgenová výpočetní tomografie (CT) byla vyvinuta v 70. letech 20. století a stala se jednou z nejvýznamnějších metod v oblasti diagnostiky a zobrazování ve výzkumných i klinických zařízeních (Wathen *et al.*, 2013). CT poskytuje obrázky s vysokým rozlišením v poměrně krátkém čase. Obrázky kostních struktur mají vysoký kontrast a výrazné detaily, ovšem nerozeznáme kontrast mezi měkkou tkání a cévami (Ford *et al.*, 2006).

Při této technice zdroj rentgenového záření a detektor rotují kolem pacienta, produkuje sérii 2D obrázků, obsahující anatomické informace o pacientovi (Hildebrandt *et al.*, 2008). Jednotlivé signály, získané z různých úhlů během rotace, jsou v počítači převedeny na

jednotlivé obrázky, ze kterých je poté počítačově sestaven 3D snímek. Míra absorpce záření danou tkání závisí především na hustotě této tkáně. Ve stupních šedi jsou poté znázorněny absorpční vlastnosti tkání ve skenovaném pacientovi. Tyto získaná data jsou často kalibrovány na Hounsfieldovy jednotky (HU), které vyjadřují relativní schopnost absorpce rentgenového záření určitou tkání. K výpočtu HU se využívá následující rovnice:

$$HU = 1000 \times (\mu_x - \mu_{\text{voda}}) / \mu_{\text{voda}}$$

kde 1000 představuje smluvně zvolenou konstantu, μ_x je koeficient zeslabení tkáně a μ_{voda} je koeficient zeslabení vody ($\mu_{\text{voda}} = 0,22 \text{ cm}^{-1}$).

Hounsfieldovy jednotky poté nabývají hodnot od -1000 HU (vzduch) po 3000 HU (kost), 0 HU odpovídá vodě a měkké tkáně, které se skládají především z vody a proteinů, budou nabývat hodnot od 100 do 300 HU. (Wathen *et al.*, 2013).

Rozdílná absorpce rentgenového záření v tělních tkáních generuje kontrast. CT skeny pro malá laboratorní zvířata mohou získat obrázky s vysokým rozlišením i v měřítku několika milimetrů. Přirozeně existuje vysoký kontrast mezi kostní tkání a měkkou tkání, kterou můžeme výborně rozeznat, ale protože kontrast v rámci měkkých tkání je omezený, je zapotřebí použít kontrastní látky, které umožňují vizualizaci tkáňových struktur (Hildebrandt *et al.*, 2008).

3.5.2 JEDNOFOTONOVÁ EMISNÍ VÝPOČETNÍ TOMOGRAFIE (SPECT)

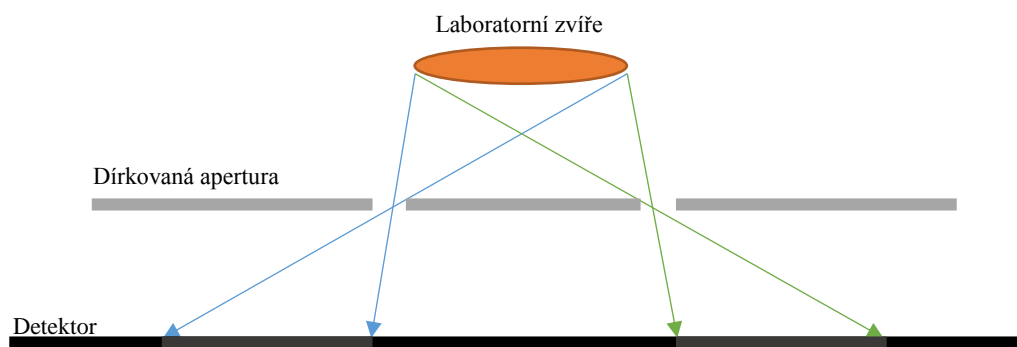
Metoda jednofotonové emisní výpočetní tomografie (*single photon emission computed tomography*, SPECT) slouží k vizualizaci distribuce radiofarmaka ve tkání. Principem SPECT je detekce fotonů emitovaných z radioaktivně značených sond v těle. Využívá gama kamer (detektorů), které rotují kolem pacienta a pořizují několik snímků z různých úhlů k získání 3D obrazu rozložení radioaktivity v těle pacienta. Získané snímky následně zpracovává počítač, který je rekonstruuje do finálního 3D zobrazení.

Radiofarmaka použita při metodě SPECT musejí být značena radionuklidem emitujícím gama záření, jako je například $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Navrátil *et Rosina*, 2005).

SPECT systém se také používá pro aplikace v biomedicinském výzkumu zahrnující malá laboratorní zvířata, a to především při studiu a evaluaci nového radiofarmaka. Ve většině případů se tyto systémy skládají ze série kompaktních detektorových hlavic se zaměnitelnými dírkovanými kolimátory (zajišťují, aby fotony směřovaly určitým směrem), které mají aperturu v rozmezí od 0,3 mm do 2 mm v průměru. Detektory často využívají scintilační zařízení

k získání co nejvyššího rozlišení. Krystalový scintilátor převádí vysokoenergetické fotony na viditelné světlo.

Nejjednodušší zařízení si můžeme představit jako dvě detektorové hlavice, každá s jedním dírkovým kolimátorem, které rotují kolem laboratorního zvířete. SPECT systémy ale mohou využívat různé typy kolimátoru, např. s více otvory pro zvýšení senzitivity. Jednotlivé otvory musí mít mezi sebou dostatečnou vzdálenost, aby se obrazy zvířete, promítané jednotlivými otvory, nepřekrývaly. Zjednodušený náčrt takového SPECT systému zobrazuje Obrázek 6 (Cherry *et al.*, 2012).



Obrázek 6: Ilustrace dírkového systému pro SPECT zobrazování malých laboratorních zvířat. Dva otvory v kolimátoru nedovolují překrytí obrazů.

3.5.3 POZITRONOVÁ EMISNÍ TOMOGRAFIE (PET)

Kromě zobrazení anatomických struktur v pacientovi či laboratorním zvířeti je vhodné zobrazení i fyziologických funkcí. Takové snímky mohou být získány zobrazováním rozpadu radioizotopů navázaných na biologicky účinné molekuly. Kromě SPECT systému k tomuto zobrazování můžeme použít také pozitronové emisní tomografie (*positron emission tomography*, PET), která se ale svým způsobem detekce záření velmi liší od SPECT (Cherry *et al.*, 2012). PET je neinvazivní metoda, při které je sledována distribuce a metabolismus nitrožilně nebo inhalačně aplikovaného radiofarmaka, obsahujícího radionuklid emitující pozitrony (Navrátil *et Rosina*, 2005).

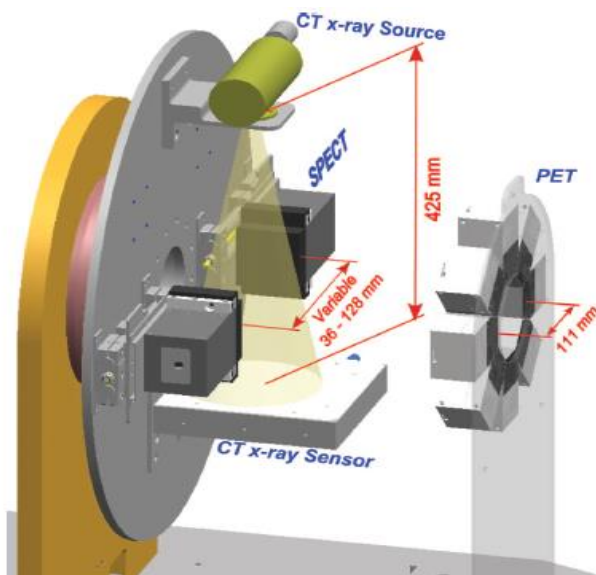
Při rozpadu jader určitých radionuklidů může dojít k emisi pozitronů, což jsou kladně nabitě částice (Cherry *et al.*, 2012). V tkáni pacienta se pozitrony pohybují pouze v měřítku několika milimetrů, dokud nedojde ke kontaktu s elektronem z okolních atomů (Navrátil *et Rosina*, 2005). V okamžiku, kdy dojde k interakci pozitronu s elektronem, nastane děj zvaný anihilace, jejímž výsledkem je pár fotonů. Tyto vysokoenergetické fotony (511 keV) zároveň emitují v opačných směrech. Detekcí této současné emise dvou fotonů PET systémem můžeme zaznamenat přesnou polohu původu těchto částic (Cherry *et al.*, 2012). Trojrozměrnou

rekonstrukcí těchto získaných dat v transputerech (síť procesorů) se získá obraz prostorového rozložení radiofarmaka v těle pacienta (Navrátil *et* Rosina, 2005).

Při vyšetření je pacient obklopen prstencem detektorů, které jsou z vnější strany odstíněny kvůli radiaci. Pomocí fotonů dopadajících na detektory je možné lokalizovat zdroj záření, tedy radiofarmaka v těle pacienta a vytvořit obrazový záznam (Ollinger *et* Fessler, 1997).

3.5.4 HYBRIDNÍ SYSTÉMY

Pro přesnější lokalizace lézí se často snímky z PET nebo SPECT vyšetření fúzí se snímky z CT nebo MRI a vznikají PET/CT(MRI) nebo SPECT/CT(MRI) snímky. Aby se nemusely snímky manuálně k sobě přirovnávat, byly zkonstruovány integrované hybridní systémy, kde PET s CT nebo SPECT s CT se nachází zároveň v jednom systému, CT jednotka v přední části a SPECT nebo PET v zadní části hned za CT. Obě jednotky využívají stejných vstupních informací při zobrazování, což ulehčuje pozdější fúzování snímků získaných z jednotlivých systémů ve speciálním softwaru (Saha, 2010). Takový systém umožňuje získat jak anatomický, tak funkční záznam. Tento způsob získání záznamu o akumulaci radiofarmaka je nejen výhodný pro pacienta, ale i pro vyšetřujícího, protože je potřeba jenom jediného měření k získání dat jak ze systému PET, tak z CT (Cherry *et al.*, 2012). Schéma hybridního systému PET/SPECT/CT je znázorněno na Obrázku 7.



Obrázek 7: Schématický náhled na hybridní systém PET/SPECT/CT (převzato ze Sánchez *et al.*, 2013)

3.5.5 OPTICKÉ METODY

Optické metody jsou založeny na měření optických vlastností látek. Využívají světla a

jeho vlnové délky. Světlo je elektromagnetická vlna, jejíž kvantum můžeme popsat elektromagnetickou částicí fotonem. Pokud molekula vyzáří (emituje) takovou částici, dojde k jejímu přechodu z vyššího energetického stavu na nižší. Pokud by měl emitovaný foton vlnovou délku v oblasti ultrafialového či viditelného spektra, jedná se o jev luminiscence. Příčinou emise fotonu je předešlá excitace molekuly absorpcí fotonu o určité vlnové délce. Excitované částice mají tendenci se vracet do základního stavu vyzářením energie ve formě fotonu. Luminiscence se dělí na fluorescenci a fosforescenci (Kodíček *et* Karpenko, 2000).

Fluorescence představuje světlo emitované atomem nebo molekulou jako důsledek absorpce elektromagnetické energie. Je to fotoluminiscenční děj, při kterém dochází k přechodu molekul do excitovaného stavu (Jameson, 2014). Od fosforescence, což je také luminiscenční děj, se liší tím, že k vyzáření jeho energie dochází velmi rychle, řádově 10^{-8} s, kdežto při fosforescenci luminiscence trvá až 10^{-2} s, protože elektrony se po jejich excitaci dostávají do energetických hladin, ze kterých se nemohou dostat zpět do stabilního stavu tak snadno. Životnost fluoroforu je představována průměrným časem mezi jeho excitací a návratu do stabilního stavu. Kvůli takovému krátkému času fluorescence vyžaduje měření emise sofistikované optické a elektronické zařízení. Fluorescenční data bývají prezentována ve formě emisních spekter, která jsou vyjádřením poměru fluorescenční intenzity k vlnové délce emitovaného světla (Lakowitz, 2010).

Zařízení sloužící ke snímání fluorescence se skládají z několika základních částí. Základem je zdroj excitačního záření, dále se tam nacházejí clony propouštějící pouze vybranou vlnovou délku, optické filtry, které jsou tvořeny sklem obsahující barvivo absorbující určité vlnové délky a trasmitující ostatní, interferenční filtry a monochromátory propouštějící jen úzkou část spektra.

Při dopadu excitačního světla na fluorochrom je emitováno světlo o vyšší vlnové délce než excitační, a to z důvodu uvolnění části energie ve formě tepla (Stokesův posun). Tohoto faktu se využívá při snímání emisního záření, protože můžeme pomocí filtrů odstínit excitační záření, které má odlišnou vlnovou délku (Guilbault *et* Chen, 1973).

Fluorescence se typicky nachází u aromatických molekul. Mezi nejznámější fluorofory patří chinon, FITC (fluorescein-5-isothiokyanát), rhodamin B, DAPI (4',6-diamidin-2-fenylyndol), ethidium bromid, kyaninová barviva apod. (Lakowicz, 2010).

Barviva emitující v blízkosti infračerveného spektra (NIR – *near-infrared*), v komplexu

s malými molekulami využívanými pro *receptor targeting*, jsou v pokročilých fázích klinických studiích pro fluorescenčně-provázené operace a také v preklinických studiích pro optické zobrazování malých laboratorních zvířat. Fluorescenční barviva emitující v blízkosti infračerveného spektra se upřednostňují před chromofory emitujícími ve spektru viditelného světla především kvůli možnosti buněčné autofluorescence v pozadí, která není pro NIR tak častá. NIR záření také dokáže proniknout širší vrstvou, což nám umožňuje zobrazování hlouběji umístěných tkání (König *et Kramer*, 2017). Mezi barviva emitující v blízkosti infračerveného spektra patří například indokarbokyaniny, sulfonované kyaniny (např. *Sulfo-Cyanine7*) *indocyanine green* (IGC) a jeho deriváty jako je SIDAG, *cypate* aj. (Ebert *et al.*, 2011).

Fluorescenčně značený peptid pro *receptor targeting* je injekčně aplikován laboratornímu zvířeti a následně se distribuuje do organismu a specificky se váže na cílovou tkáň. Po excitaci fluoroforu světelným zdrojem dojde k emisi fotonů, které je možné detekovat a získat tak obraz distribuce fluorescenčně značeného peptidu pomocí zobrazovacího zařízení *in vivo*.

Při volbě vhodného fluorescenčního barviva se věnuje pozornost především optimalizaci poměru signálu k pozadí (SBR – *signal to background ratio*), tedy nespecifické fluorescence pozadí. SBR mohou ovlivnit parametry fluoroforu, jako je volba excitační a emisní vlnové délky, rozpustnost, vysvěcování, afinita k cílové tkáni, biodistribuce, farmakokinetika a intenzita fluorescence. (Frangioni, 2003).

4 CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo posouzení *in vitro* a *in vivo* vlastností dvou radioaktivně a fluorescenčně značených peptidů. Testovanými peptidy byly RGD peptid (RGD) a minigastrin (MG), derivatizované chelátorem ze skupiny sideroforů (SID), konkrétně se jednalo o fusarinin C (FSC). Peptidy byly označeny fluorescenčním barvivem SulfoCy7 (Sulfo-Cyanine7) vhodným pro zobrazování v blízké infračervené oblasti, a dále je bylo možné označit radioaktivně pomocí ^{68}Ga . Výsledky *in vitro* a *in vivo* experimentů jsem použila ke zhodnocení jejich využitelnosti jako potenciálních multimodálních zobrazovacích činidel v onkologické diagnostice.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor (Eckert & Ziegler, Berlín, Německo), vysokoúčinný kapalinový chromatograf (Dionex UltiMate 3000, Thermo scientific, Waltham, MA, USA), radiodetektor (Raytest, Straubenhardt, Německo), HPLC kolona Watrex Nucleosil 120 C18 5 μm 250x4 mm (Watrex, Praha, ČR), PET/SPECT/CT systém pro malá laboratorní zvířata (Albira, Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, USA), automatický gama počítáč (Wizard², PerkinElmer, USA), fluorescenční zobrazovací systém pro malá laboratorní zvířata (In vivo MS FX PRO, Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, USA), centrifuga, analytické váhy, termoblok, vortex, třepačka, ionizační komora.

Studované peptidy SulfoCy7-FSC-(mal-RGDfK-(PEG)₄)₂ (SID-RGD) a SulfoCy7-FSC-(mal-MG-Met)₂ (SID-MG) byly syntetizovány na Oddělení nukleární medicíny v Innsbrucku. K vlastním experimentům jsem pak používala vodné roztoky těchto peptidů o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dále jsem používala následující komerčně dostupné chemikálie: Isofluran (Forane, AbbVie, ČR), acetátový pufr ($c = 1,14 \text{ mol/l}$), HCl ($c = 0,1 \text{ mol/l}$), PBS pufr, fyziologický roztok, deionizovaná voda, acetonitril, trifluoroctová kyselina.

5.2 RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ PEPTIDŮ

Z $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru jsem získala izotop gallia ^{68}Ga s použitím 0,1M HCl jako elučního činidla. Pro každé značení peptidů jsem odebírala frakci o objemu asi 1 ml a aktivitě 100-150 MBq. Ke zjištění optimálních podmínek radioaktivního značení jsem testovala různá množství peptidů v reakční směsi (0,1 μg , 1 μg , 5 μg a 10 μg). K jednotlivým množstvím peptidu jsem přidala 30 μl 1,1M acetátového pufru a 300 μl eluátu gallia. Tuto reakční směs jsem nechala inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě (cca 25 °C). Kontrolu kvality radioaktivního značení jsem po uplynutí inkubační doby testovala pomocí HPLC. Ze získaných výsledků jsem vyhodnotila optimální množství peptidu pro radioaktivní značení.

5.3 KONTROLA KVALITY RADIOAKTIVNÍHO ZNAČENÍ

Kontrolu kvality radioaktivního značení jsem testovala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s radioaktivní a UV detekcí. Pro kontrolu kvality jsem používala následující chromatografické podmínky:

- mobilní fáze: A = 99,9 % H₂O s 0,1 % TFA; B = 99,9 % ACN s 0,1 % TFA
- kolona: Watrex Nucleosil 120 C18 5 μl 250x4 mm

- průtoková rychlost: 1 ml/min
- gradient: 0-3 min 0 % B; 3-6 min 0-50 % B; 6-10 min 50 % B; 10-10,1 min 50-80 % B; 10,1-13 min 80 % B; 13-13,1 min 80-0 % B; 13,1-15 min % B
- detekce: radiodetektor, UV detektor (220 nm, 280 nm)

5.4 IN VITRO STABILITA

Testovala jsem *in vitro* stabilitu značeného peptidu při pH upraveném na hodnotu 6-7, které je vhodné pro následnou *in vivo* aplikaci. K radioaktivně značenému preparátu jsem po uplynutí inkubace přidala 100 µl 1,1M acetátového pufru, aby došlo k úpravě pH na požadovanou hodnotu 6-7. pH jsem kontrolovala pomocí indikátorového pH papírku. Stabilitu značeného preparátu jsem měřila na HPLC ihned po přidání pufru, a poté po 30, 60 a 120 minutách.

Při druhém experimentu, studiu *in vitro* stability testované látky v lidském séru, jsem smíchala 100 µl značeného preparátu s 300 µl lidského séra a směs jsem nechala inkubovat v termostatu při teplotě 37 °C. Z této směsi jsem poté v časech 30, 60 a 120 minut odebrala 100 µl a přidala je ke 150 µl ACN v 1,5ml mikrozkušavce. Zkušavku jsem zvortexovala a vzniklou sraženinu jsem oddělila od roztoku centrifugací (15 000 rpm, 3 minuty). Supernatant jsem poté analyzovala pomocí HPLC.

5.5 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT (Log P)

Radioaktivně značený peptid jsem naředila přidáním 500 µl PBS a připravila jsem si šest 1,5ml mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky jsem připipetovala 500 µl oktanolu a 450 µl PBS. Do všech zkušavek jsem poté přidala 50 µl naředěného značeného preparátu. Všechny zkušavky jsem zvortexovala a nechala je na třepačce promíchávat (380 rpm, 20 minut). Z každé zkušavky jsem odebrala dva vzorky, jeden z oktanolové a druhý z vodné fáze, a změřila jsem jejich radioaktivitu v automatickém gama počítáči. Ze získaných dat jsem poté vypočítala rozdělovací koeficient (Log P), což je dekadický logaritmus podílu procenta radioaktivity v oktanolové a vodné fázi.

$$\log P = \log \frac{CPM (\%)_{oktanolová\ fáze}}{CPM (\%)_{PBS}}$$

5.6 VAZBA NA PROTEINY

Pro testování vazby studovaných peptidů na plazmatické proteiny jsem připravila dvě zkušavky. Do jedné jsem odpipetovala 20 µl značeného preparátu a přidala k ní 380 µl lidského

séra, do druhé (kontrolní) jsem odpipetovala 10 µl reakční směsi a přidala k ní 190 µl PBS. Obě zkumavky jsem nechala inkubovat v termostatu při teplotě 37 °C. Mezitím jsem aktivovala gelové mikrokolonky pro měření připravených vzorků. Po 30, 60 a 120 minutách od začátku inkubace jsem ze vzorků odebrala vždy 25 µl a nanasla je na aktivovanou kolonku. Kolonky jsem poté centrifugovala (2000 g, 2 min). Pomocí automatického gama počítáče jsem změřila radioaktivitu zvlášť v eluátu a v gelové kolonce.

Na gelové kolonce se zachytávají nízkomolekulární látky, tedy v našem případě radioaktivně značený peptid, který se nenavázal na proteiny v séru. Vysokomolekulární látky (látky navázané na proteiny v séru) kolonkou protekly a nacházejí se v eluátu. Ze získaných výsledků bylo tedy možné spočítat procento značeného peptidu navázaného na plazmatické proteiny.

5.7 IN VIVO STABILITA V MOČI

Připravený radioaktivně značený peptid jsem retroorbitálně (r.o.) aplikovala (cca 120 µl, 4-5 MBq) laboratorním myším. Po 30, 60 a 120 minutách jsem pokusným myším odebrala vzorek moči a analyzovala jsem ho na HPLC. Zjišťovala jsem tak, zda se značený peptid v organismu metabolizuje nebo se vylučuje v nezměněné podobě.

5.8 PET/CT ZOBRAZOVÁNÍ LABORATORNÍCH MYŠÍ

Všechny experimenty byly prováděny v souladu se zákonem 246/1992 Sb., se souhlasem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-22421/2013-12) a se souhlasem Odborné komise na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Veškeré experimenty byly prováděny na myších kmene balb/c a balb/c nude (Anlab, Praha, ČR).

In vivo experimenty jsem prováděla na nenádorových a nádorových myších. Nádorovým myším používaným pro testování SID-RGD peptidu bylo subkutánně (s.c) aplikováno 5×10^6 U-87 MG (lidský glioblastom) buněk a zvířatům ke studiu SID-MG peptidu bylo s.c. aplikováno 2×10^6 A431 (lidský epidermální karcinom) buněk transferovaných cholecystokininovými receptory 2 (CCK2+) a A431 buněk bez cholecystokininových receptorů (CCK2-). Nádorové myši byly používány k *in vivo* experimentům v okamžiku, kdy velikost nádorů dosáhla 100-300 mm³ (zhruba 4 týdny po aplikaci U-87 MG buněk a 2-3 týdny po aplikaci A431 buněk).

Po přípravě radioaktivně značeného peptidu jsem vždy prováděla kontrolu kvality na

HPLC, abych ověřila jeho radiochemickou čistotu. Laboratorním myším jsem následně r.o. aplikovala cca 100 μ l příslušné látky. Aktivita aplikovaného radioaktivně značeného peptidu se pohybovala v rozmezí 4-6 MBq. Následně jsem experimentální zvířata skenovala pomocí zobrazovacího systému PET/SPECT/CT pro malá laboratorní zvířata. Pomocí tohoto systému jsem s oběma studovanými peptidy prováděla 90minutové dynamické skenování po 5minutových intervalech. Získala jsem tak 18 snímků radioaktivního signálu v čase. Dále jsem také prováděla statické skenování (PET/CT) ve dvou vybraných časových intervalech u každé látky (SID-RGD 30 a 90 minut p.i.; SIG-MG 1 a 2 hod p.i.). Během skenování byly myši udržovány v celkové inhalační anestezii (2% isofluran).

Získaná data ze skenování jsem zpracovávala pomocí Albira software (Bruker Biopsin Corporation, USA), PMOD software (PMOD Technologies LLC, Zurich) a VolView software (Kitware, Inc., NY, USA)

5.9 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ LABORATORNÍCH MYŠÍ

Po aplikaci značených peptidů experimentálním zvířatům jsem sledovala také jejich fluorescenční signál. Měření pro SID-RGD bylo prováděno v časech 30 min, 90 min, 4 h, 24 h a 48 h p.i., a pro SID-MG v časech 1 h, 2 h, 5 h, 24 h, 48 h a 72 h p.i. Fluorescenci jsem měřila na *in vivo* fluorescenčním zobrazovacím zařízení pro malá laboratorní zvířata za následujících podmínek: excitační maximum: 730 nm, emisní maximum: 790 nm, FOV 100 mm, binning: 4x4, délka skenování: 15 s. Během tohoto měření byly laboratorní myši v celkové inhalační anestezii (2% isofluran).

5.10 EX VIVO BIODISTRIBUCE LABORATORNÍCH MYŠÍ

Radioaktivně značené peptidy jsem naředila 600 μ l fyziologického roztoku a následně jsem je r.o. aplikovala laboratorním myším (cca 110 μ l látky o aktivitě v rozmezí 1-2 MBq). Experimentální zvířata byla usmrcena ve vybraných časových intervalech (SID-RGD 30 a 90 min p.i., SID-MG 1 a 2 hod p.i.) a byly jim odebrány tyto orgány: krev, slezina, slinivka, žaludek, střeva, ledviny, játra, srdce, plíce, sval, kost a nádor. Jednotlivé orgány jsem poté zvážila a změřila jsem jejich radioaktivitu na automatickém gama počítací. Naměřené data jsem poté zpracovala jako procento aplikované látky na gram orgánu (%ID/g).

Odebrané orgány jsem také analyzovala na *in vivo* fluorescenčním zobrazovacím zařízení a měřila jsem tak sílu fluorescenčního signálu v jednotlivých orgánech. Naměřená data jsem poté vyhodnotila jako množství fluorescenčního signálu v 1 mm² vzorku za 1 vteřinu a

porovnála je s výsledky získanými z měření radioaktivity.

6 VÝSLEDKY

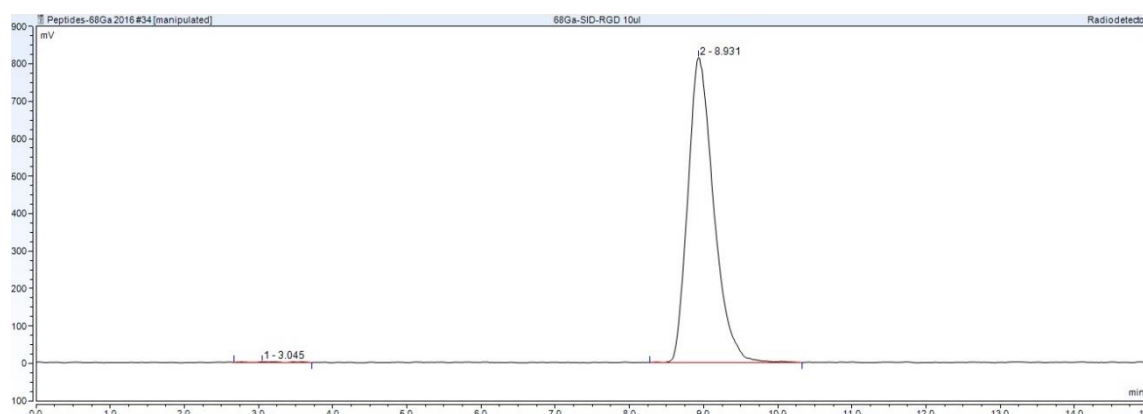
6.1 SID-RGD

6.1.1 RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ

U připravených značených preparátů obsahujících 0,1 μg , 1 μg , 5 μg a 10 μg SID-RGD jsem po inkubaci (15 min) měřila radiochemickou čistotu pomocí HPLC. Výsledky tohoto měření jsem shrnula v Tabulce 1. Vzorek 1 a vzorek 2 nevyhovovaly kvůli nízké radiochemické čistotě. Radiochemická čistota vzorku 3 a vzorku 4 již odpovídala požadovaným hodnotám. Přestože lze SID-RGD označit ^{68}Ga i při menším množství substance, rozhodla jsem používat jako optimální množství peptidu pro radioaktivní značení ^{68}Ga hodnotu odpovídající vzorku 4, tedy 10 μg SID-RGD. Na Obrázku 8 je příklad HPLC radiochromatogramu ^{68}Ga -SID-RGD odpovídající vzorku 4 s 10 μg RGD peptidu.

Tabulka 1: Optimalizace podmínek radioaktivního značení SID-RGD

| Vzorek | Množství peptidu [μg] | Teplota [$^{\circ}\text{C}$] | Inkubační čas [min] | RCHČ [%] |
|----------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------|
| 1 | 0,1 | LT | 15 | 22,1 |
| 2 | 1 | LT | 15 | 73,5 |
| 3 | 5 | LT | 15 | 99,6 |
| 4 | 10 | LT | 15 | 99,8 |



Obrázek 8 : Radiochromatogram ^{68}Ga -SID-RGD (10 μg) z HPLC. Retenční čas RGD peptidu 8,9 minut.

6.1.2 IN VITRO STABILITA

Značený peptid ^{68}Ga -SID-RGD se při pH = 6-7 jevil jako stabilní ve všech měřených časech. Výsledky stability peptidu při fyziologickém pH v různých časech (30, 60 a 90 min)

jsou shrnuty v Tabulce 2.

Stabilitu značeného peptidu jsem měřila také v lidském séru. Značený preparát ^{68}Ga -SID-RGD vykazoval opět vysokou stabilitu ve všech sledovaných časových intervalech. Výsledky měření stability v lidském séru jsem shrnula v Tabulce 2.

6.1.3 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT

Naměřené hodnoty vzorků odebraných z obou fází (oktanolové a vodné), ze šesti měření z automatického gama počítáče, jsem zprůměrovala a vypočítala jsem dekadický logaritmus z podílu procenta radioaktivity v oktanolové a vodné fázi. Výsledná hodnota $\log P$ pro ^{68}Ga -SID-RGD byla $-2,09 \pm 0,04$.

6.1.4 VAZBA NA PROTEINY

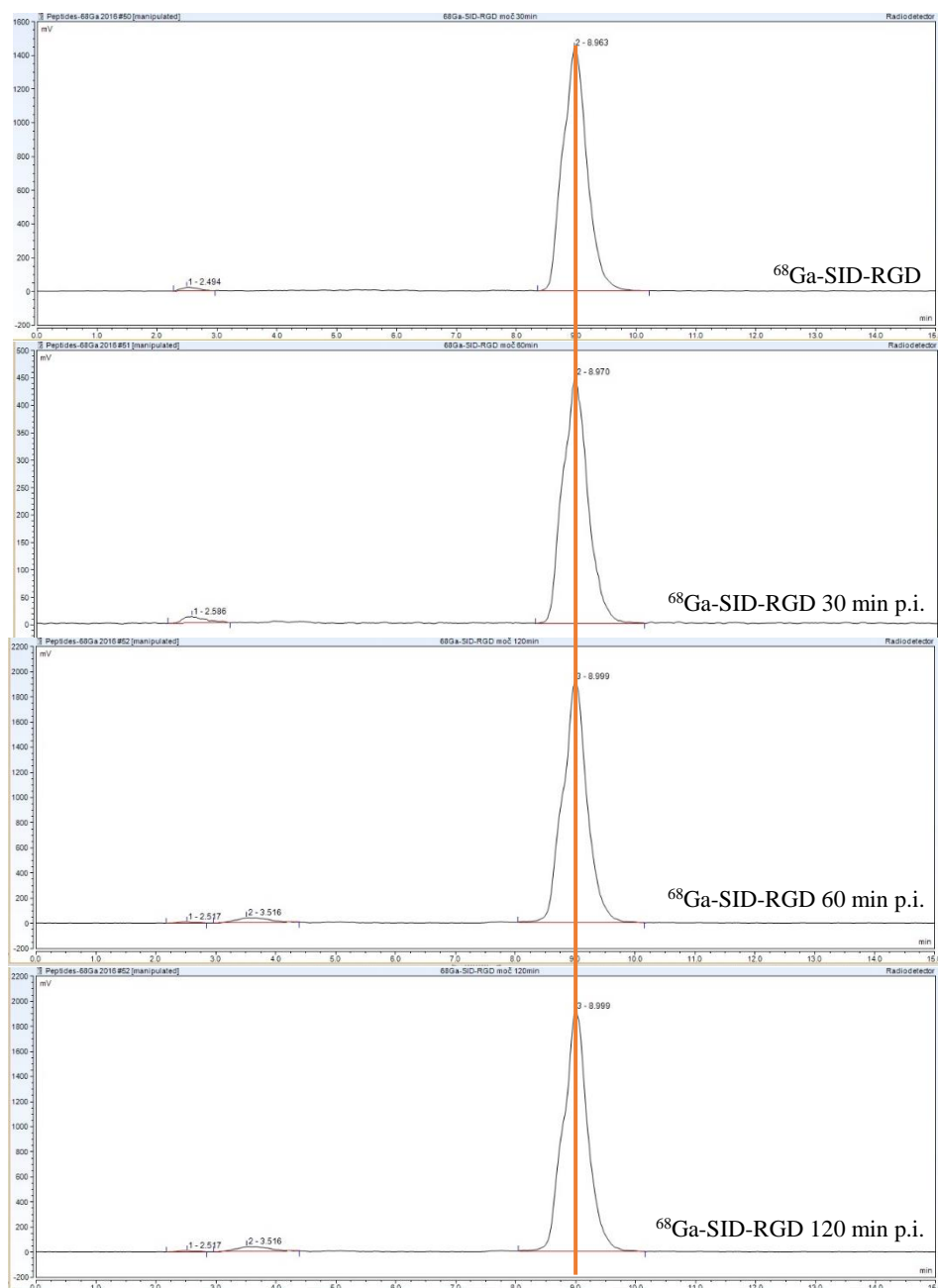
Ze získaných hodnot z automatického gama počítáče jsem spočítala průměrnou procentuální hodnotu radioaktivity v eluátu a na gelové kolonce. Zásadní byla právě hodnota radioaktivity v eluátu, ve kterém se nacházel komplex ^{68}Ga -SID-RGD navázaný na plazmatické proteiny lidského séra. Výsledky měření po 30, 60 a 120 minutách inkubace značeného peptidu ^{68}Ga -SID-RGD s plazmatickými proteiny lidského séra jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Výsledky *in vitro* experimentů ^{68}Ga -SID-RGD.

| Log P \pm SD | Doba inkubace [min] | Stabilita v čase [%] | Stabilita v lidském séru [%] | Vazba na proteiny [%] \pm SD |
|------------------|---------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| $-2,09 \pm 0,04$ | 30 | 99,7 | 99,7 | $16,95 \pm 0,51$ |
| | 60 | 99,6 | 99,7 | $20,08 \pm 0,31$ |
| | 120 | 99,7 | 99,7 | $20,90 \pm 1,18$ |

6.1.5 IN VIVO STABILITA V MOČI

Moč odebranou laboratorním zvířatům 30, 60 a 120 minut po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD jsem analyzovala pomocí HPLC. Získané radiochromatogramy na Obrázku 9 jsem porovnála s radiochromatogramem aplikovaného peptidu (Obrázek 8). Ukázalo se, že ^{68}Ga -SID-RGD je *in vivo* stabilní.

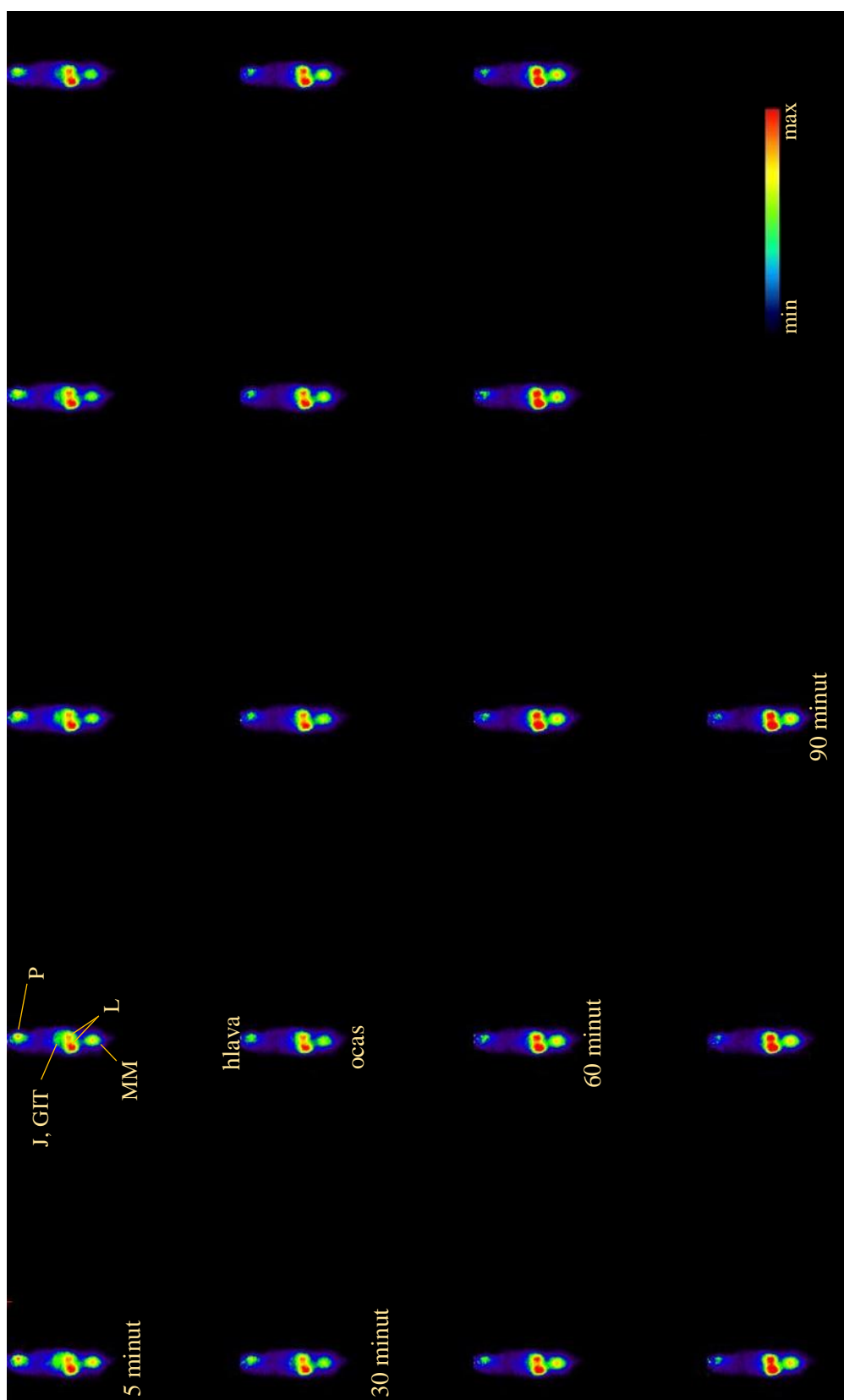


Obrázek 9: Radiochromatogramy znázorňující *in vivo* stabilitu $^{68}\text{Ga-SID-RGD}$

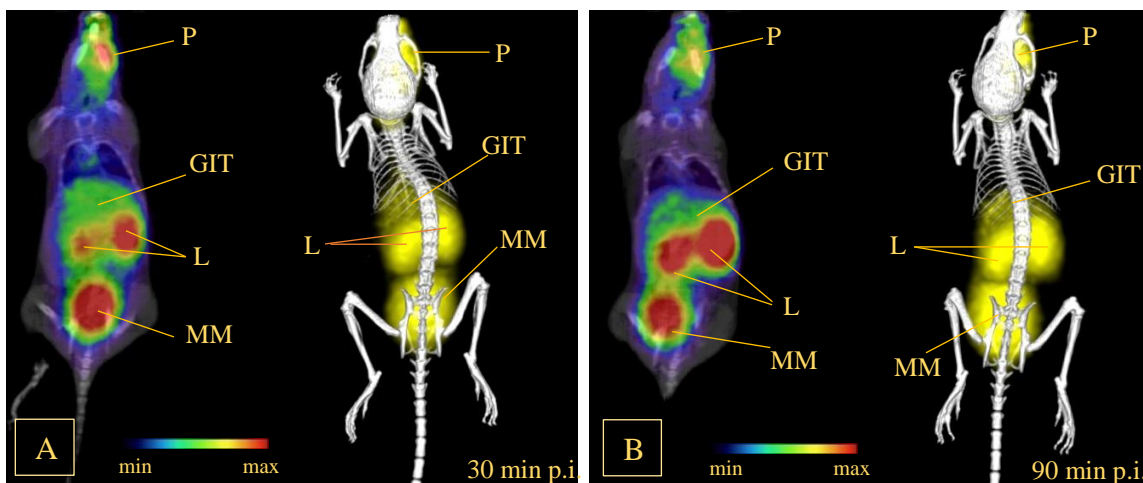
6.1.6 PET/CT ZOBRAZENÍ NENÁDOROVÝCH MYŠÍ

Na snímcích dynamického PET skenování na Obrázku 10 lze vidět, že značený peptid $^{68}\text{Ga-SID-RGD}$ se pozvolně distribuuje z krevního oběhu do organismu a následně je vylučován přes ledviny do močového měchýře. Kromě velmi slabého radioaktivního signálu v GIT a játrech nepozorujeme akumulaci značené látky v jiných orgánech.

Snímky ze statického PET/CT skenování 30 a 90 minut po aplikaci $^{68}\text{Ga-SID-RGD}$ na Obrázku 11 odpovídají snímkům z dynamického skenování.



Obrázek 10: Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD. Koronální řezy (MM – močový měchýř, L – ledviny, P – místo podání, GIT – gastrointestinální trakt, J – játra).

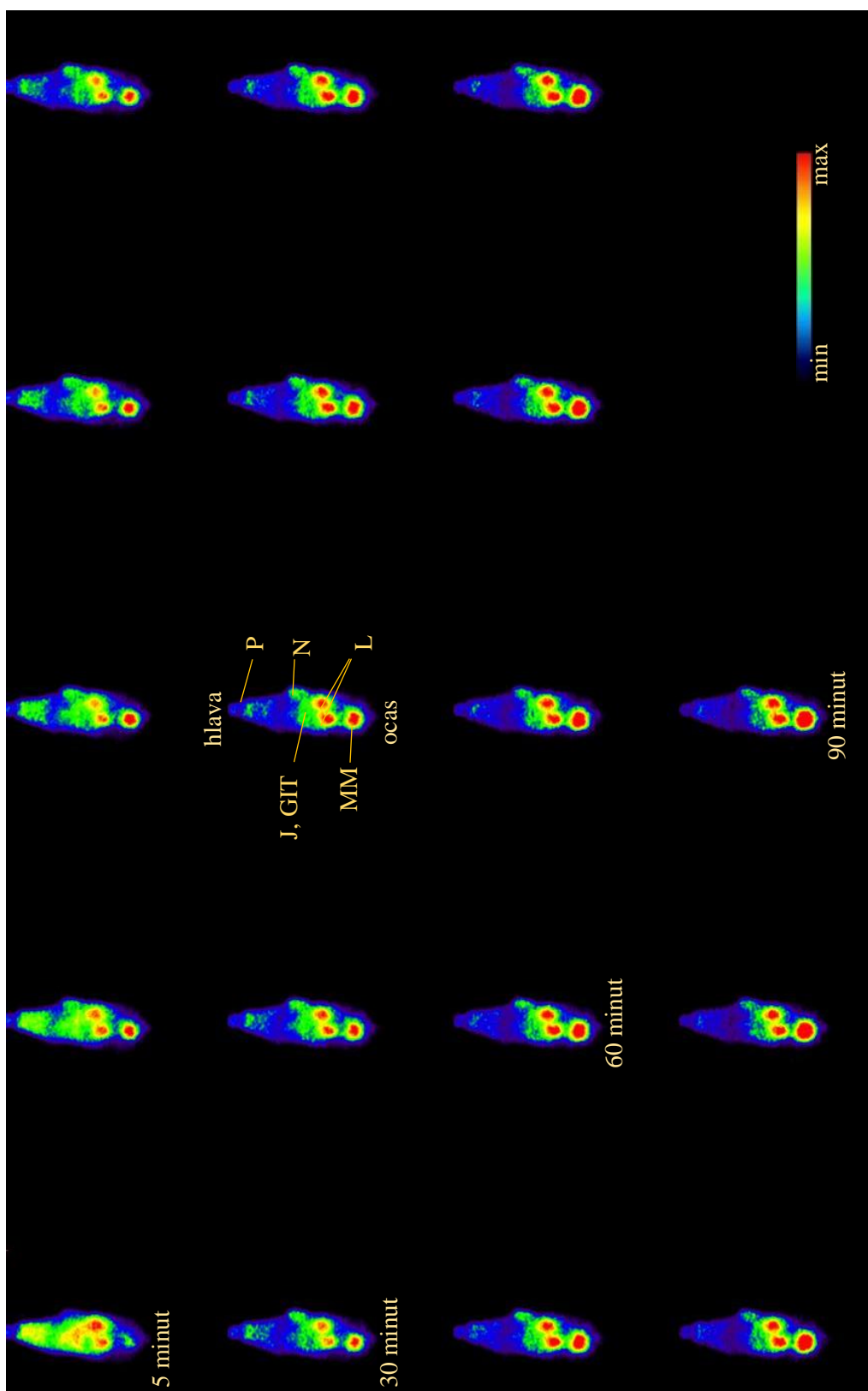


Obrázek 11: Statické PET/CT skenování nenádorové myši 30 minut (Obrázek A) a 90 minut (Obrázek B) po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD. Koronální řezy (P – místo podání, L – ledviny, GIT – gastrointestinální trakt, MM – močový měchýř) a 3D obrázky.

6.1.7 PET/CT ZOBRAZENÍ NÁDOROVÝCH MYŠÍ

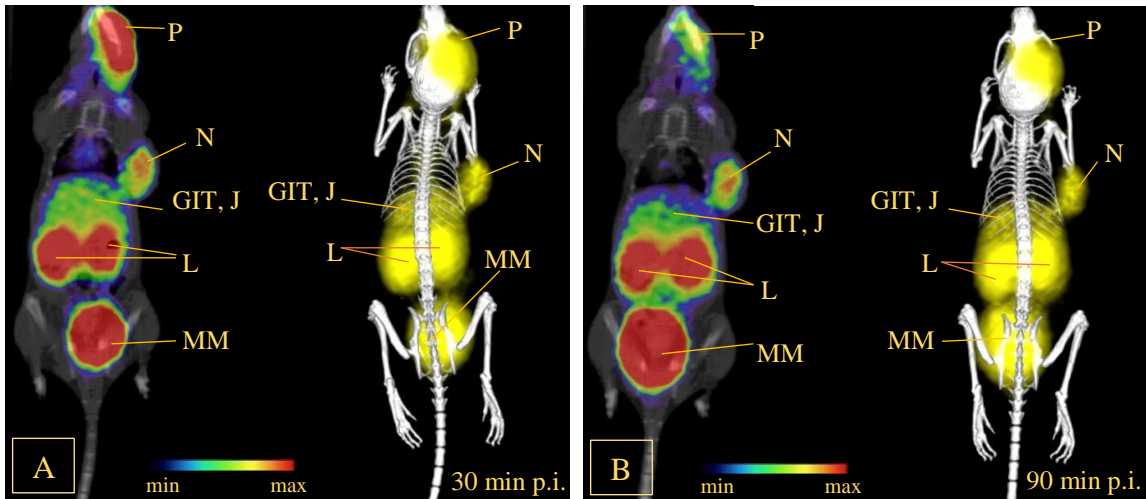
Dynamickým PET skenováním jsem získala snímky koronálních řezů z PET skenu v 5minutových intervalech od aplikace ^{68}Ga -SID-RGD (viz Obrázek 12). Radioaktivně značený RGD peptid se v nádorových zvířatech choval obdobně jako v nenádorových. Pozvolně se tedy akumuluje v ledvinách a následně v močovém měchýři. Zhruba 30 min po aplikaci se látka začíná specificky vychytávat také v nádorové tkáni. Na základě výsledků z dynamického skenování jsem pro statické PET/CT skenování zvolila jako optimální časy zobrazování 30 min a 90 min po aplikaci značeného RGD peptidu.

Na Obrázku 13A jsou prezentovány výsledky statického PET/CT skenování laboratorní nádorové myši 30 minut po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD. Na tomto obrázku můžeme stále pozorovat výrazný signál v místě aplikace značeného peptidu, významnou akumulaci radioaktivity v ledvinách a močovém měchýři, ale i zřetelný radioaktivní signál v nádoru. Na Obrázku 13B ze statického skenování po 90 minutách od aplikace ^{68}Ga -SID-RGD už není radioaktivní signál v místě podání natolik vysoký, nicméně celkové rozložení radioaktivního signálu v laboratorním zvířeti je velmi podobné jako v případě skenování v čase 30 min po aplikaci značeného peptidu.



Obrázek 12: Dynamické PET skenování nádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD. Koronární řezy (MM – močový měchýř,

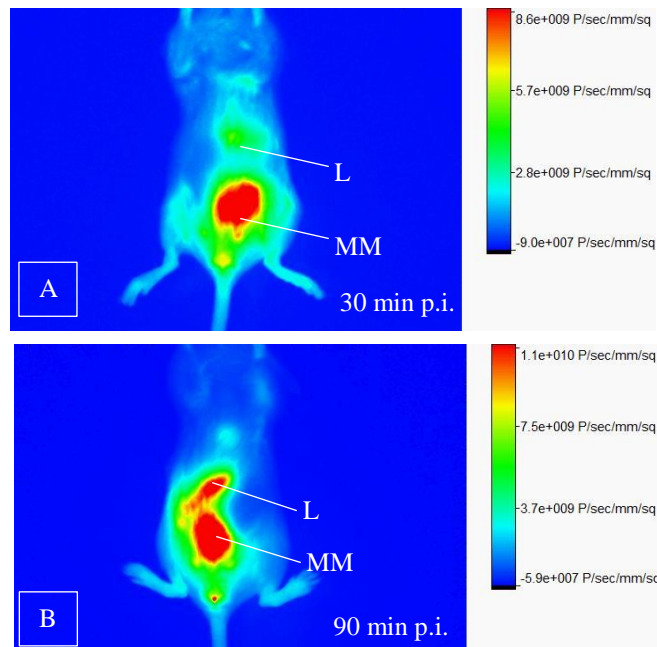
L – ledviny, P – místo podání, GIT – gastrointestinální trakt, N – nádor, J – játra).



Obrázek 13: Statické PET/CT skenování nádorové myši 30 minut (Obrázek A) a 90 minut (Obrázek B) po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD. Koronální řezy (P – místo podání, L – ledviny, GIT – gastrointestinální trakt, MM – močový měchýř, N – nádor, J – játra) a 3D obrázky.

6.1.8 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NENÁDOROVÝCH MYŠÍ

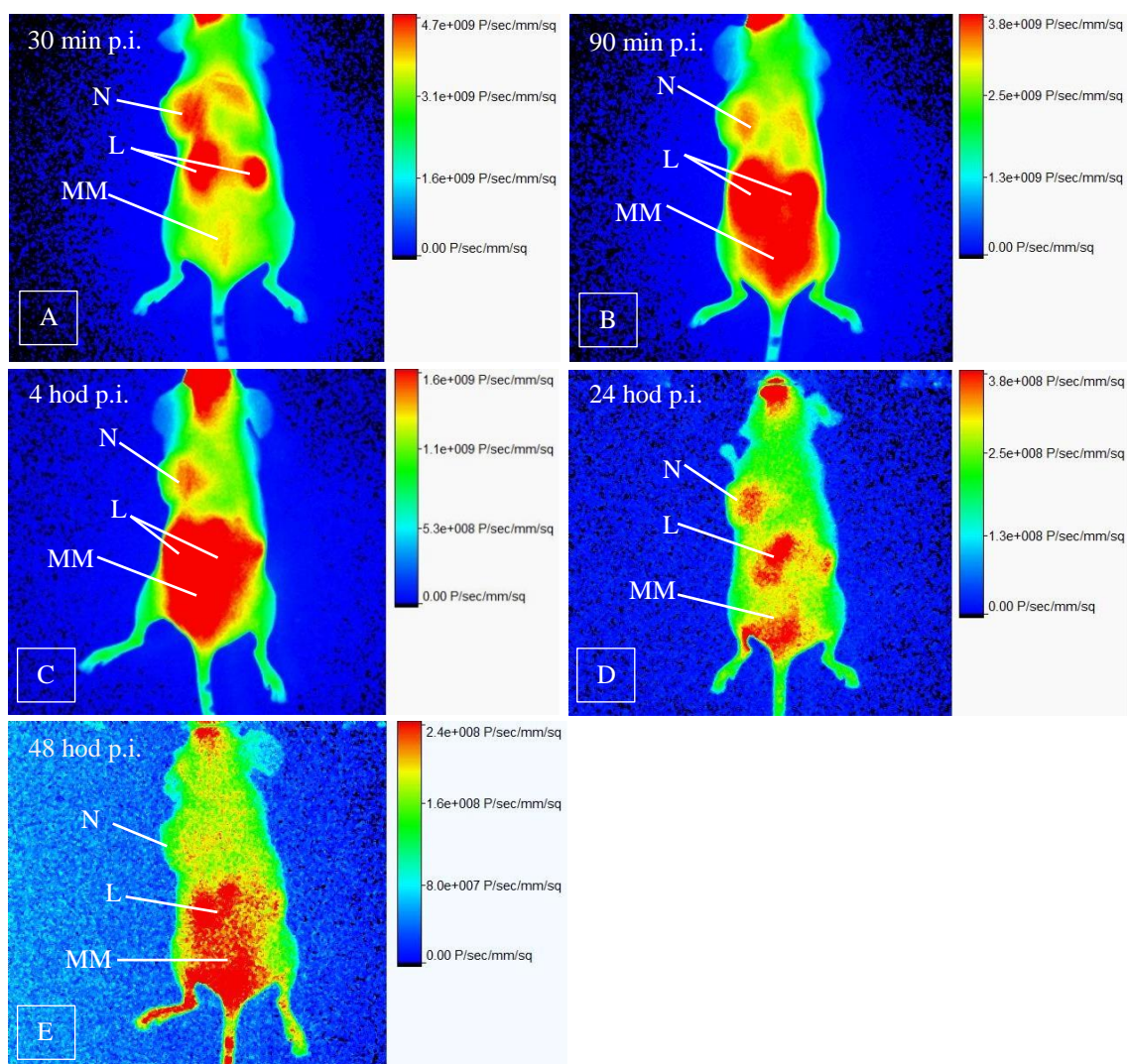
Na snímcích z fluorescenčního zobrazení nenádorových myši 30 a 90 minut po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD (viz Obrázek 14) lze pozorovat kumulaci značeného peptidu v GIT, ledvinách a močovém měchýři, což potvrzuje výsledky ze statického PET/CT skenování nenádorové myši.



Obrázek 14: Fluorescenční zobrazení nenádorové myši 30 minut (Obrázek A) a 90 minut (Obrázek B) po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD (poloha na břichu; L – ledviny, MM – močový měchýř).

6.1.9 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NÁDOROVÉ MYŠI

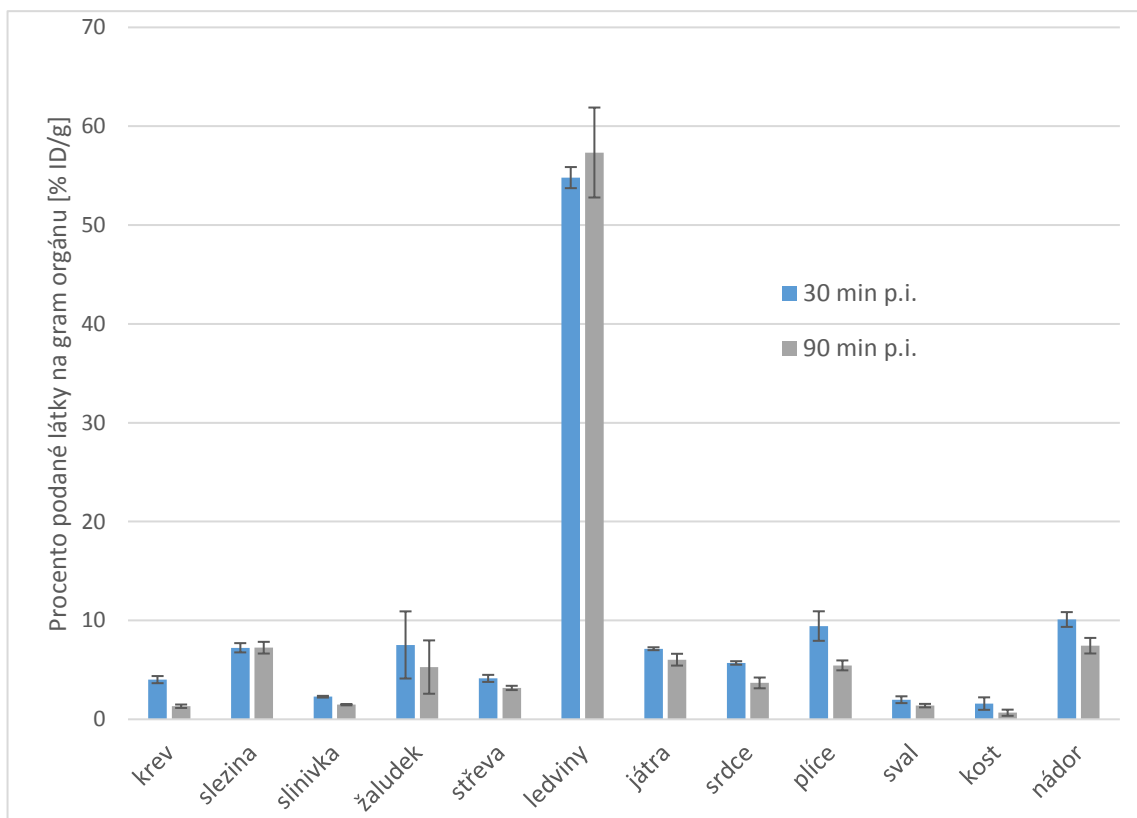
Na snímcích z fluorescenčního zobrazování (viz Obrázek 15) 30 minut (Obrázek 15A) a 90 minut (Obrázek 15B) po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD pozorujeme kumulaci značeného peptidu v oblasti místa podání látky, dále v nádoru a také v ledvinách, močovém měchýři játrech a GIT. Pro dlouhodobější pozorování distribuce látky v nádorové myši jsem fluorescenční zobrazování provedla i 4 hodiny (Obrázek 15C), 24 hodin (Obrázek 15D) a 48 hodin (Obrázek 15E) po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD. Nadále lze pozorovat kumulaci látky ve vylučovacích orgánech. Po 24 hodinách od aplikace se látka ještě nachází v nádoru, po 48 hodinách je již fluorescenční signál v nádoru minimální.



Obrázek 15: Fluorescenční zobrazení nádorové myši 30 min (Obrázek A), 90 min (Obrázek B), 4 hod (Obrázek C), 24 hod (Obrázek D) a 48 hod (Obrázek E) po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD (poloha na zádech; L – ledviny, MM – močový měchýř, N – nádor).

6.1.10 EX VIVO BIODISTRIBUCE NÁDOROVÝCH MYŠÍ

Nejvyšší radioaktivitu po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD jsem zaznamenala v ledvinách. Aktivita v ledvinách po 30 minutách ($54,80 \pm 1,07$ %ID/g) a po 90 minutách ($57,34 \pm 4,55$ %ID/g) byla asi 5x vyšší než u nádoru, ve kterém byla po 30 minutách aktivita $10,10 \pm 0,75$ %ID/g a po 90 minutách $7,45 \pm 0,79$ %ID/g. Všechny naměřené hodnoty jsem zaznamenala do Grafu 1. Výsledky pro každý čas byly získané zprůměrováním hodnot naměřených u tří laboratorních myší.



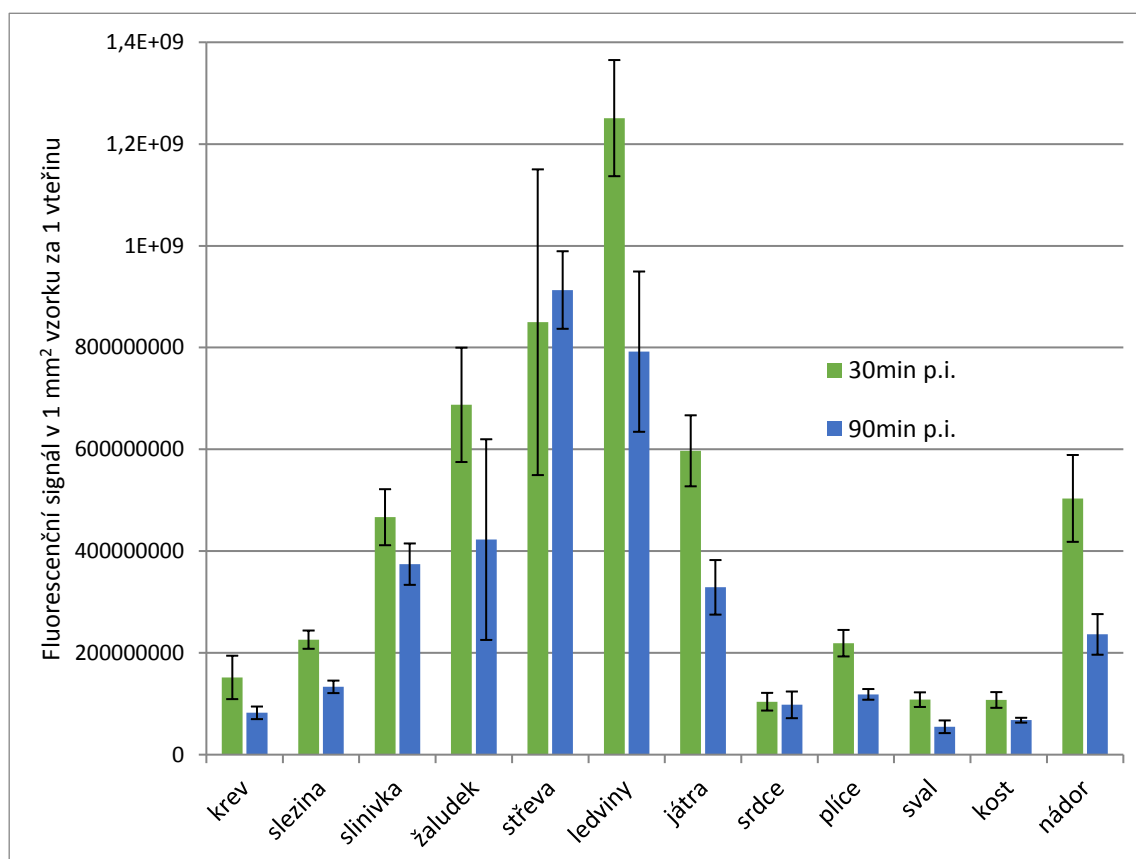
Graf 1: *Ex vivo* biodistribuce u nádorových myší 30 a 90 minut po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD.

Z naměřených hodnot jsem následně vypočítala poměr nádor:sval, nádor:krev a nádor:ledviny. Poměr radioaktivity naměřené v nádoru k radioaktivitě ve svaly, ve kterém by se látka měla kumulovat minimálně, vyjadřuje množství značené látky v nádoru vzhledem k pozadí. Poměr radioaktivity v nádoru k radioaktivitě v ledvinách nám udává, zda nedochází k nežádoucí kumulaci látky v ledvinách. Poměr radioaktivity nádoru k radioaktivitě v krvi nám udává specifickou kumulaci látky v cílové tkáni. Výsledky těchto výpočtů jsem shrnula v Tabulce 3.

Tabulka 3: Poměr radioaktivity nádoru k vybraným orgánům při použití ^{68}Ga -SID-RGD.

| poměr | 30 minut p.i. | 90 minut p.i. |
|---------------|---------------|---------------|
| nádor:krev | 2,51 | 5,63 |
| nádor:ledviny | 0,18 | 0,13 |
| nádor:sval | 5,09 | 5,37 |

U odebraných orgánů jsem následně měřila také míru jejich fluorescence. Nejvyšší fluorescenční signál jsem zaznamenala v ledvinách. Nejvyšší fluorescenci v nádoru jsem naměřila 30 minut po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD. Naměřené výsledky u jednotlivých orgánů jsem zaznamenala v Grafu 2.



Graf 2: *Ex vivo* biodistribuční data získaná měřením fluorescence odebraných orgánů u nádorových myší 30 a 90 minut po aplikaci ^{68}Ga -SID-RGD.

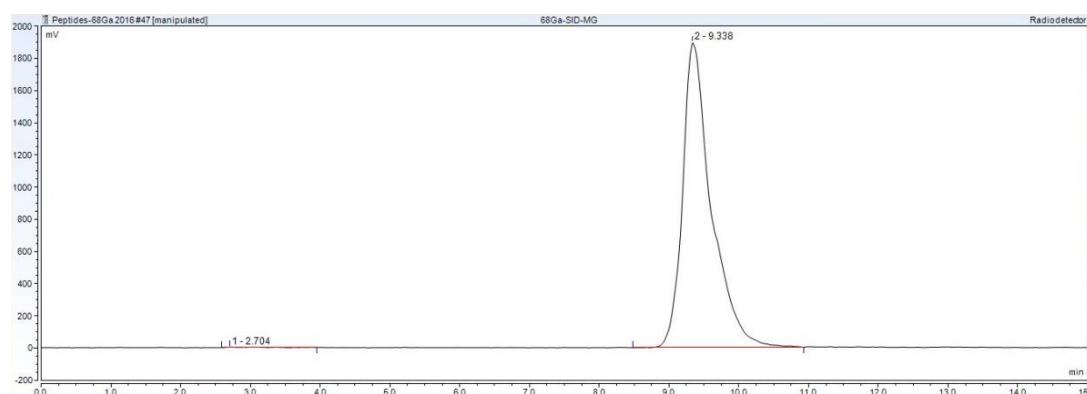
6.2 SID-MG

6.2.1 RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ PEPTIDU

Po připravení značených preparátů obsahujících 0,1 µg, 1 µg, 5 µg a 10 µg SID-MG jsem po inkubaci (15 min) měřila radiochemickou čistotu pomocí HPLC. Výsledky tohoto měření jsem shrnula v Tabulce 4. Vzorek 1 a vzorek 2 nevyhovovaly kvůli nízké radiochemické čistotě. Radiochemická čistota vzorku 3 a vzorku 4 již odpovídala požadovaným podmínkám, a přestože lze SID-MG označit ^{68}Ga i při menším množství (5µg) substance, rozhodla jsem se dále používat jako optimální množství peptidu pro radioaktivní značení ^{68}Ga 10 µg SID-MG, hodnotu odpovídající vzorku 4. Na Obrázku 16 je příklad HPLC radiochromatogramu ^{68}Ga -SID-MG odpovídající vzorku 4 s 10 µg MG.

Tabulka 4: Optimalizace podmínek radioaktivního značení SID-MG

| Vzorek | Množství peptidu [µg] | Teplota [°C] | Inkubační čas [min] | RCHČ [%] |
|----------|-----------------------|--------------|---------------------|-------------|
| 1 | 0,1 | LT | 15 | 8,3 |
| 2 | 1 | LT | 15 | 91,6 |
| 3 | 5 | LT | 15 | 99,4 |
| 4 | 10 | LT | 15 | 99,9 |



Obrázek 16: Radiochromatogram ^{68}Ga -SID-MG (10 µg) z HPLC. Retenční čas MG je 9,3 minut.

6.2.2 IN VITRO STABILITA

Značený peptid ^{68}Ga -SID-MG se při fyziologickém pH (pH = 6-7) jevil jako stabilní ve všech měřených časech. Výsledek stability peptidu při fyziologickém pH v různých časech (30, 60 a 90 minut) jsou shrnuty v Tabulce 5.

Stabilitu značeného peptidu jsem měřila také v lidském séru. Značený preparát ^{68}Ga -SID-MG vykazoval opět stabilitu ve všech sledovaných časových intervalech. Výsledky měření stability v lidském séru jsem shrnula v Tabulce 5.

6.2.3 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT

Naměřené hodnoty vzorků odebraných z obou fází (oktanolové a vodné) ze šesti měření z automatického gama počítače jsem zprůměrovala a vypočítala z nich dekadický logaritmus z podílu procenta radioaktivity v oktanolové a vodné fázi. Výsledná hodnota log P pro ^{68}Ga -SID-MG byla $-1,69 \pm 0,13$.

6.2.4 VAZBA NA PROTEINY

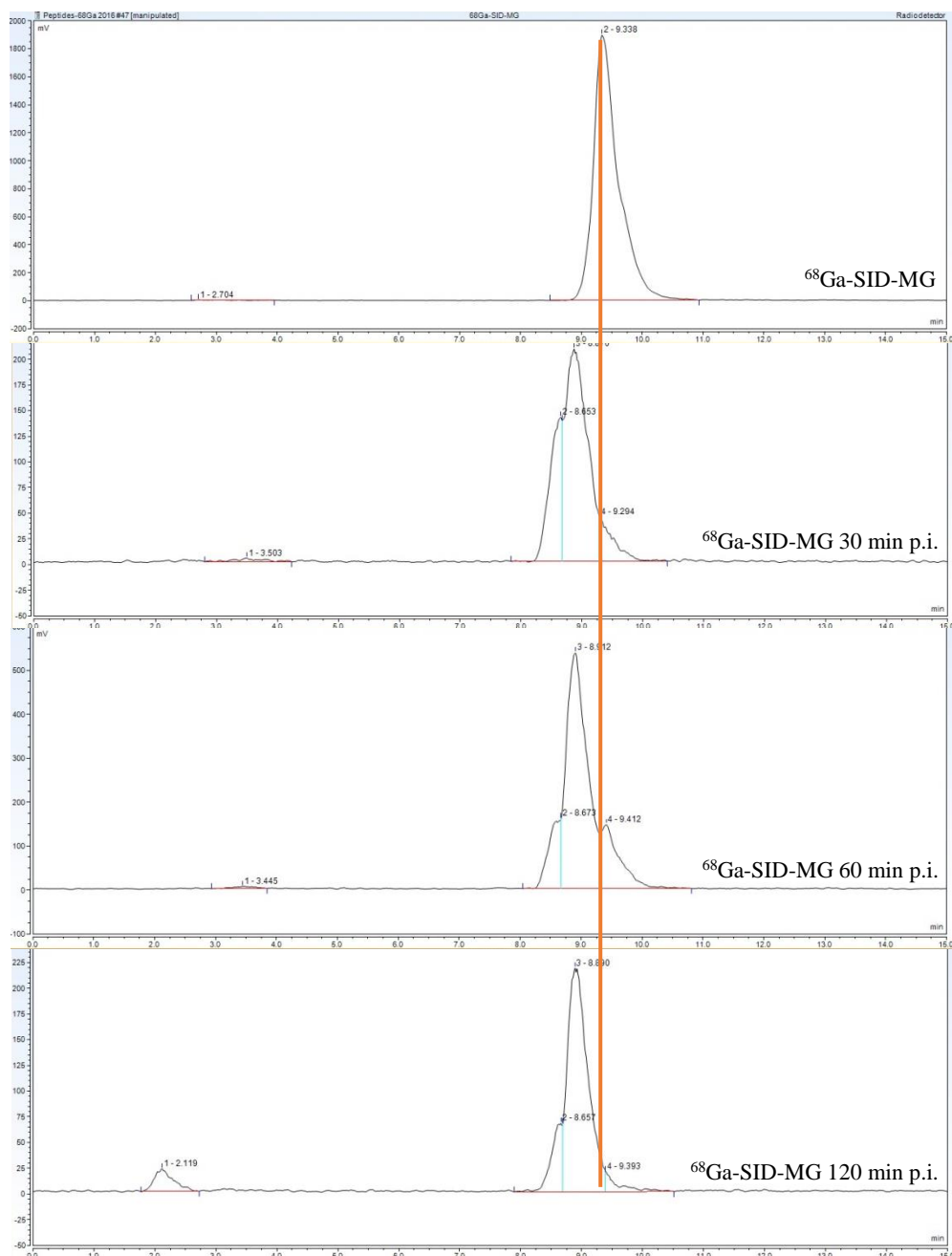
Ze získaných hodnot z automatického gama počítače jsem spočítala průměrnou procentuální hodnotu radioaktivity v eluátu a gelové kolonce. V eluátu se nacházel komplex ^{68}Ga -SID-MG navázaný na plazmatické proteiny lidského séra, proto právě hodnota radioaktivity v eluátu byla zásadní. Výsledky měření po 30, 60 a 120 minutách inkubace značeného peptidu ^{68}Ga -SID-MG s plazmatickými proteiny lidského séra jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky *in vitro* experimentů ^{68}Ga -SID-MG

| Log P \pm SD | Doba inkubace [min] | Stabilita v čase [%] | Stabilita v lidském séru [%] | Vazba na proteiny [%] \pm SD |
|------------------|---------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| $-1,69 \pm 0,13$ | 30 | 99,7 | 99,6 | $49,54 \pm 1,72$ |
| | 60 | 99,9 | 99,4 | $55,51 \pm 1,36$ |
| | 120 | 99,8 | 99,4 | $59,63 \pm 0,53$ |

6.2.5 IN VIVO STABILITA V MOČI

Moč jsem laboratorním zvířatům odebrala 30, 60 a 120 minut pod aplikace ^{68}Ga -SID-MG a analyzovala jsem ji pomocí HPLC. Získané radiochromatogramy jsem porovnávala s radiochromatogramem aplikovaného peptidu (viz Obrázek 17). Retenční časy hlavního píku se neshodovaly. Výsledky poukazují na *in vivo* nestabilitu MG.

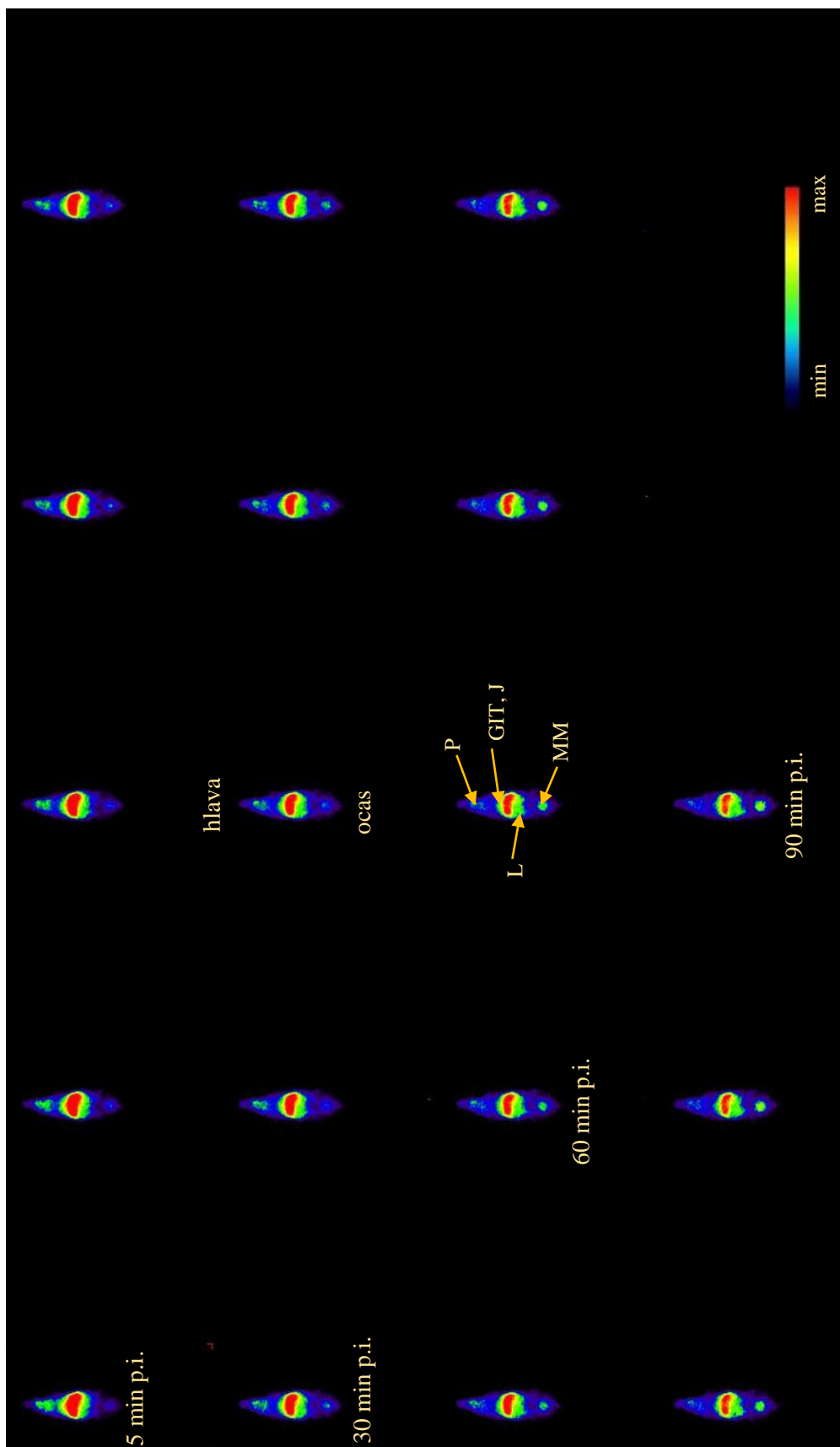


Obrázek 17: Radiochromatogramy znázorňující *in vivo* stabilitu $^{68}\text{Ga-SID-MG}$.

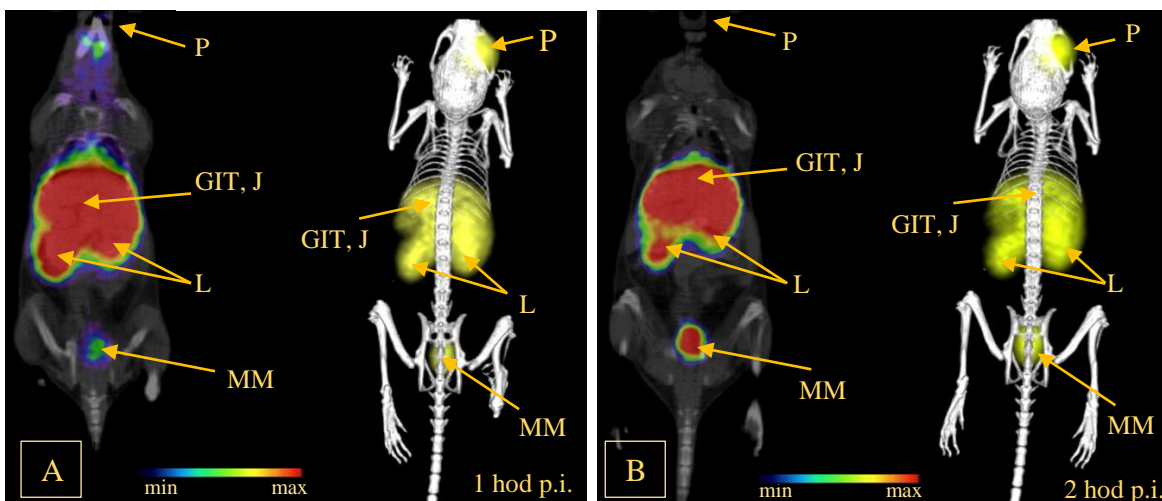
6.2.6 PET/CT ZOBRAZENÍ NENÁDOROVÝCH MYŠÍ

Dynamickým PET skenováním jsem získala snímky koronálních řezů z PET skenu v 5minutových intervalech od aplikace $^{68}\text{Ga-SID-MG}$. Na snímcích dynamického PET skenování na Obrázku 18 můžeme pozorovat pozvolnou distribuci značeného peptidu $^{68}\text{Ga-SID-MG}$ z krevního oběhu do organismu, především do jater, GIT a ledvin.

Snímky ze statického PET/CT skenování 1 a 2 hodiny po aplikaci $^{68}\text{Ga-SID-MG}$ na Obrázku 19 odpovídají snímkům z dynamického skenování.



Obrázek 18: Dynamické PET skenování nenádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG. Koronální řezy (MM – močový měchýř, L – ledviny, P – místo podání, GIT – gastrointestinální trakt, J – játra).

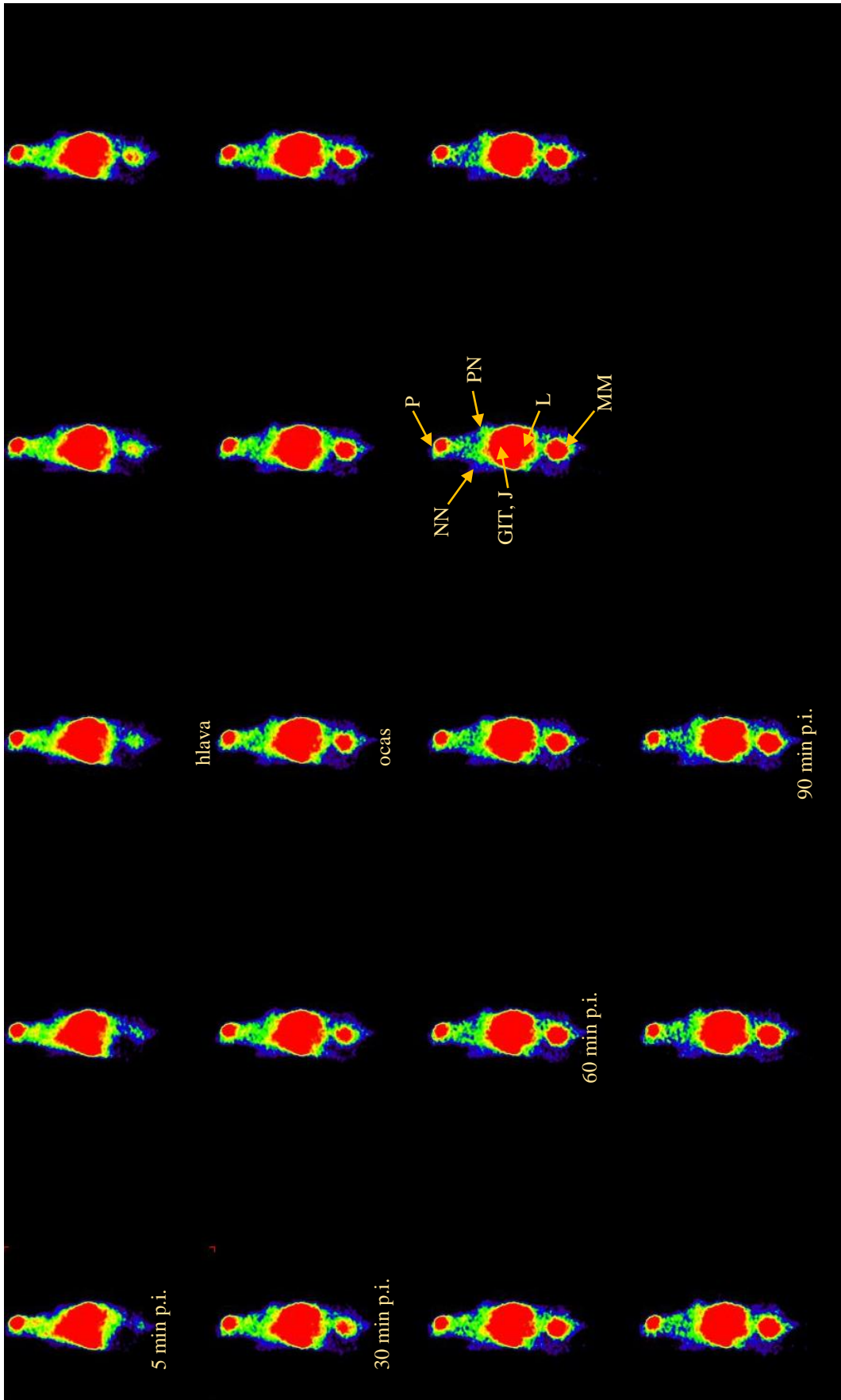


Obrázek 19: Statické PET/CT skenování nenádorové myši 1 hod (Obrázek A) a 2 hod (Obrázek B) po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG. Koronální řezy (P – místo podání, L – ledviny, GIT – gastrointestinální trakt, MM – močový měchýř, J – játra) a 3D obrázky.

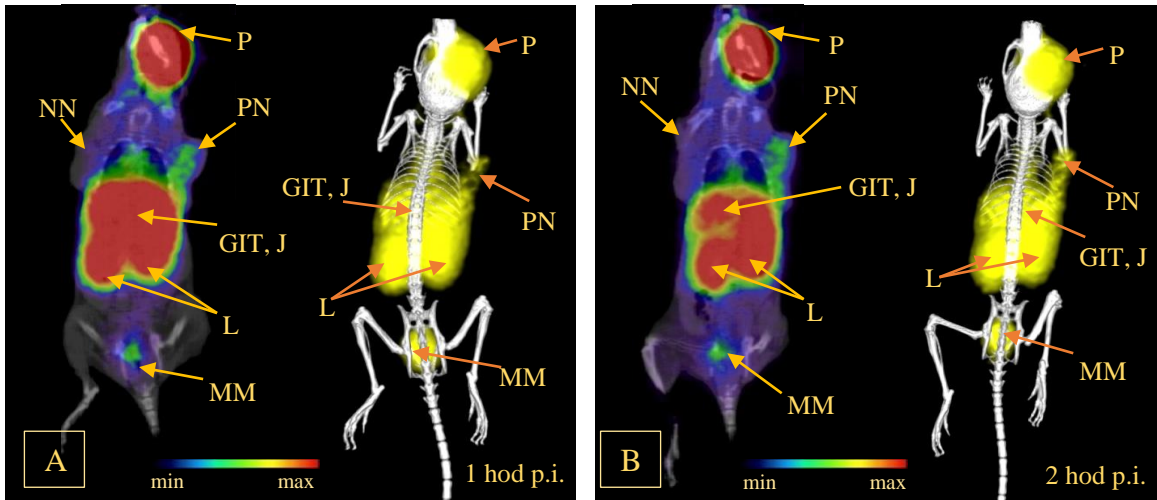
6.2.7 PET/CT ZOBRAZENÍ NÁDOROVÝCH MYŠÍ

Radioaktivně značený peptid ^{68}Ga -SID-MG se choval v nádorových zvířatech podobně jako v nenádorových. Pozvolně se dostává z krevního oběhu do jater a GIT (viz Obrázek 20). Postupně se vylučuje pomocí ledvin do močového měchýře. Radioaktivně značený MG se asi po 1 hodině začíná specificky vychytávat v nádorové tkáni. Na základě výsledků z dynamického skenování jsem pro statické PET/CT skenování zvolila jako optimální časy zobrazování 1 hod a 2 hod po aplikaci značeného MG.

Na Obrázku 21A jsou prezentovány výsledky statického PET/CT skenování laboratorní nádorové myši 1 hod po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG. Můžeme pozorovat výrazný signál v místě podání značeného peptidu, významnou akumulaci radioaktivity v játrech, GIT, ledvinách a močovém měchýři a také radioaktivní signál v pozitivním nádoru. V místě negativního nádoru žádný signál nepozorujeme. Na Obrázku 21B ze statického skenování po 2 hodinách od aplikace ^{68}Ga -SID-MG opět pozorujeme výrazný radioaktivní signál v oblasti místa podání, v GIT, játrech a ledvinách. Značený peptid se také akumuluje v místě pozitivního nádoru, v místě negativního nádoru žádný se nejví žádná radioaktivita.



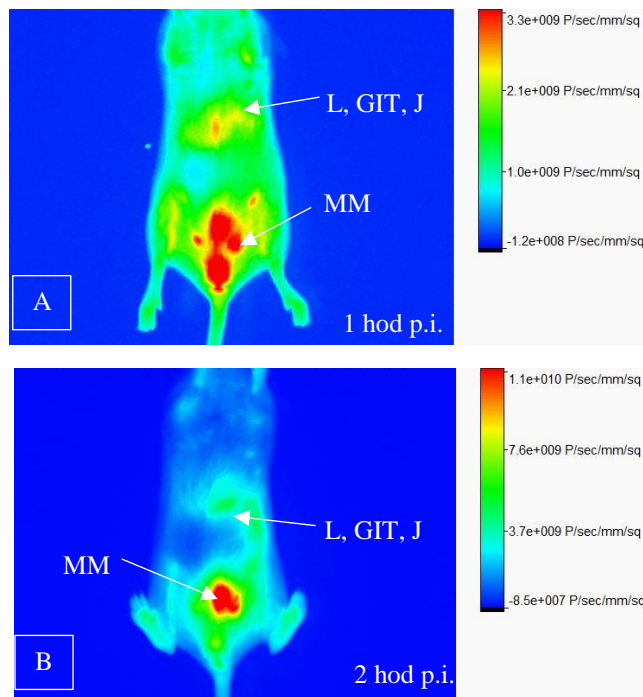
Obrázek 20: Dynamické PET skenování nádorové myši po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG. Koronální řezy (MM – močový měchýř, L – ledviny, P – místo podání, GIT – gastrointestinální trakt, J – játra, NN – negativní nádor, PN – pozitivní nádor).



Obrázek 21: Statické PET/CT skenování nádorové myši 1 hod (Obrázek A) a 2 hod (Obrázek B) po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG. Koronální řezy (P – místo podání, L – ledviny, GIT – gastrointestinální trakt, MM – močový měchýř, J – játra, PN – pozitivní nádor, NN – negativní nádor) a 3D obrázky.

6.2.8 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NENÁDOROVÝCH MYŠÍ

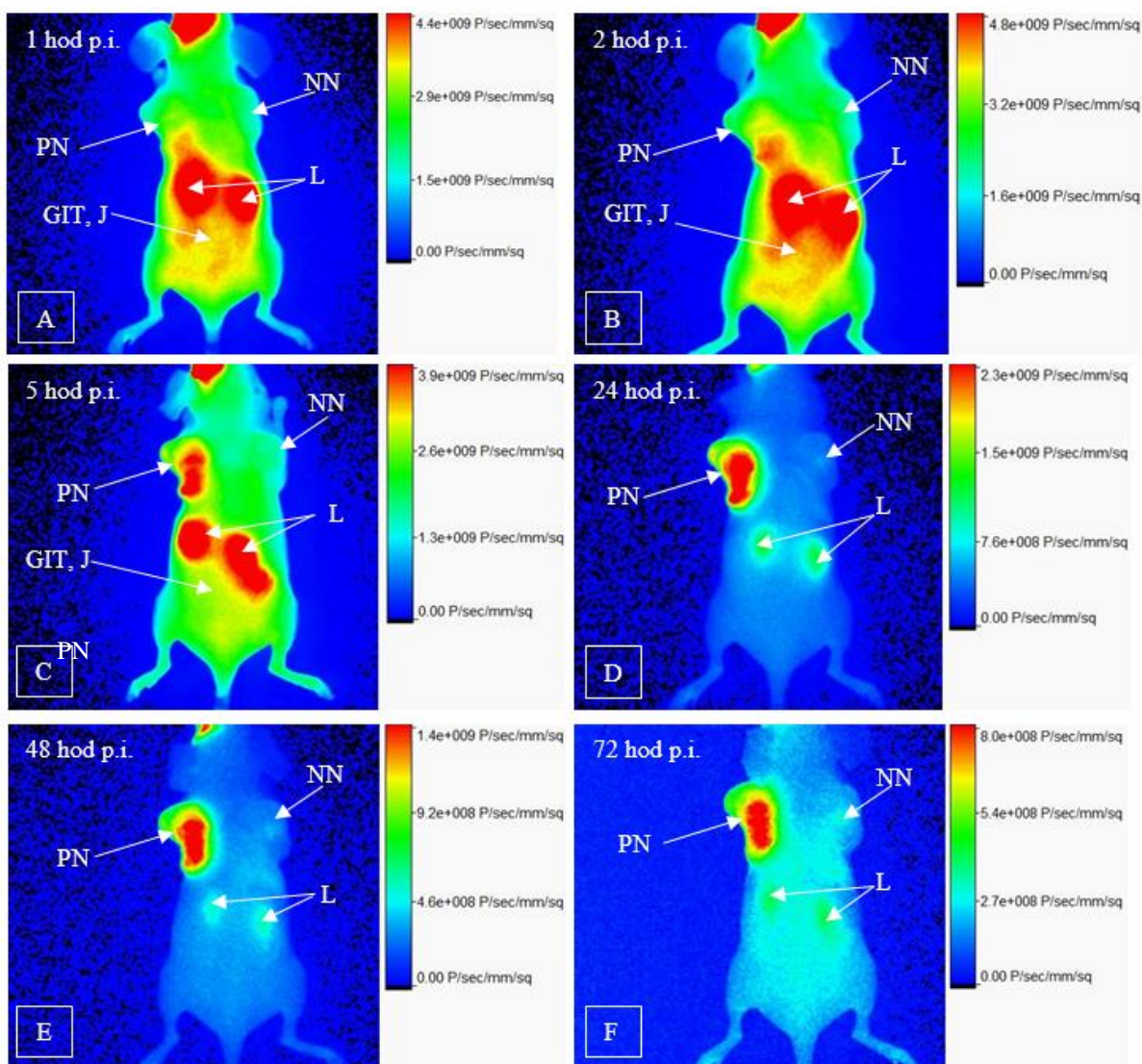
Na snímcích z fluorescenčního zobrazování nenádorových myši 1 a 2 hodiny po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG (viz Obrázek 22) můžeme pozorovat kumulaci značeného peptidu v oblasti jater, GIT, ledvin a močového měchýře, tedy výsledky z fluorescenčního zobrazování tedy odpovídají výsledkům z PET/CT skenování.



Obrázek 22: Fluorescenční zobrazení nenádorové myši 1 hod (Obrázek A) a 2 hod (Obrázek B) po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG (poloha na břichu; L – ledviny, MM – močový měchýř, GIT – gastrointestinální trakt, J – játra).

6.2.9 FLUORESCENČNÍ ZOBRAZOVÁNÍ NÁDOROVÝCH MYŠÍ

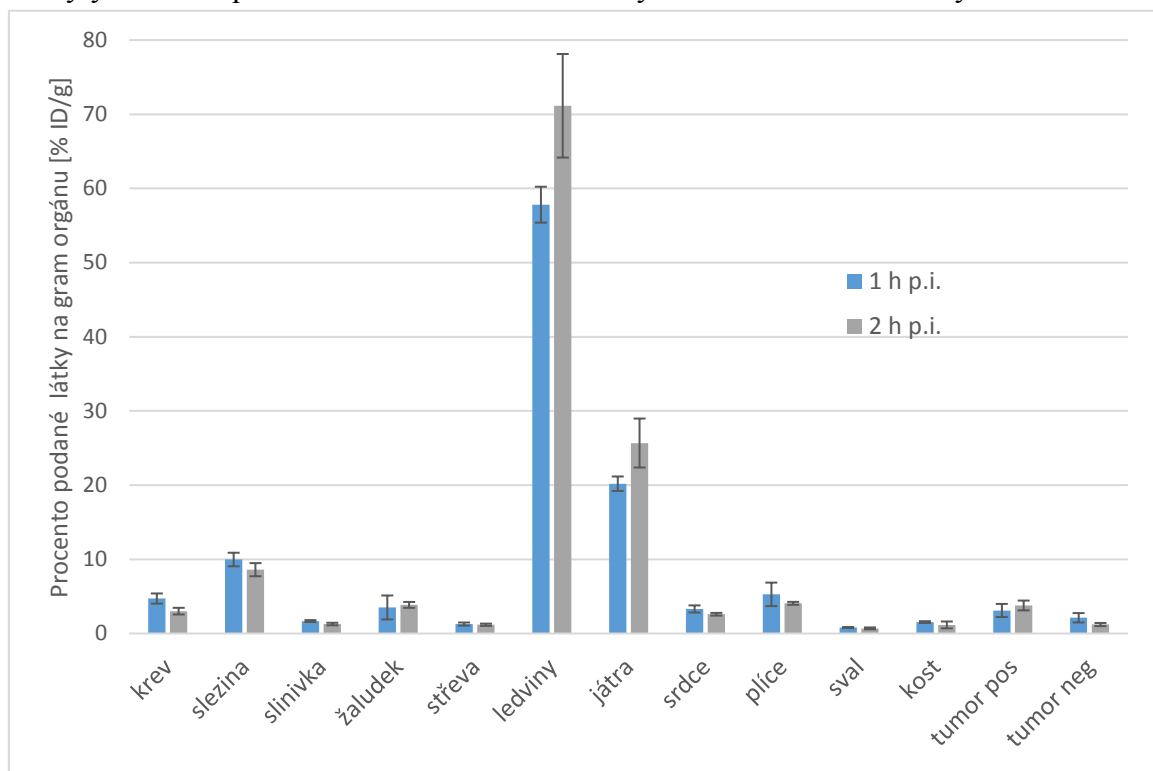
Na snímcích z fluorescenčního zobrazování (viz Obrázek 23) 1 hodinu (Obrázek 23A) a 2 hodiny (Obrázek 23B) po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG je patrný nejvyšší fluorescenční signál v oblasti ledvin, jater a GIT. Fluorescenční signál v nádorové tkáni není příliš výrazný. Na Obrázku 23C pořízeném 5 hodin po aplikaci značeného peptidu pozorujeme značnou akumulaci ^{68}Ga -SID-MG v nádorové tkáni a ledvinách. Na snímcích získaných 24 hodin (Obrázek 23D), 48 hodin (Obrázek 23E) a 72 hodin (Obrázek 23F) pozorujeme kumulaci především v nádorové tkáni. V oblasti negativního nádoru nepozorujeme v žádném čase kumulaci značeného peptidu.



Obrázek 23: Fluorescenční zobrazení nádorové myši 1 hod (Obrázek A), 2 hod (Obrázek B), 5 hod (Obrázek C), 24 hod (Obrázek D), 48 hod (Obrázek E) a 72 hod (Obrázek F) po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG (poloha na zádech; L – ledviny, PN – pozitivní nádor, NN – negativní nádor, GIT – gastrointestinální trakt, J – játra).

6.2.10 EX VIVO BIODISTRIBUCE NÁDOROVÝCH MYŠÍ

Nejvyšší radioaktivitu po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG jsem zaznamenala v ledvinách. Aktivita v ledvinách po 1 hodině ($57,81 \pm 2,42$ %ID/g) a po 2 hodinách ($71,15 \pm 6,98$ %ID/g) byla asi 20x vyšší než u pozitivního nádoru, ve kterém byla po 1 hodině od aplikace značeného peptidu naměřena aktivita $3,11 \pm 0,88$ %ID/g a po 2 hodinách $3,78 \pm 0,66$ %ID/g. Všechny naměřené hodnoty u jednotlivých orgánů jsem zaznamenala do Grafu 3. Výsledky pro každý čas byly získané zprůměrováním hodnot naměřených u tří laboratorních myší.



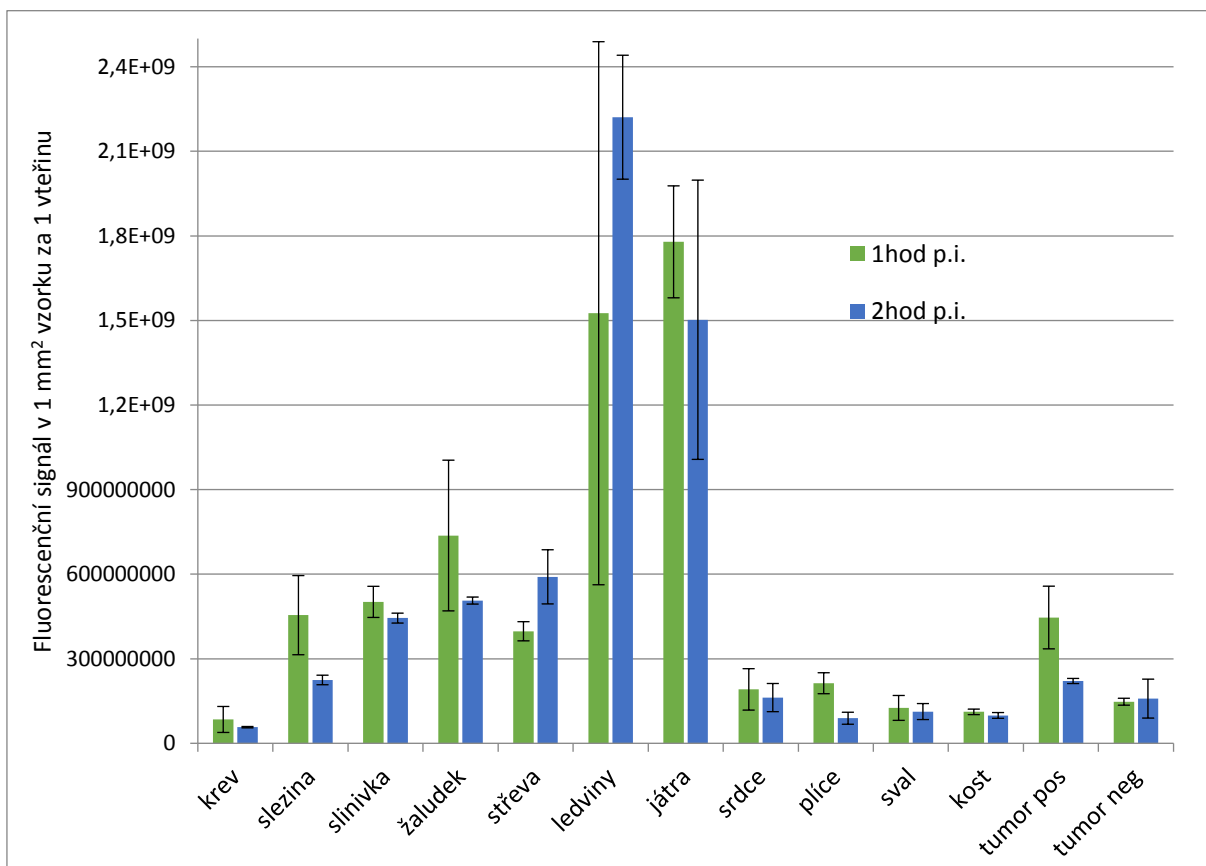
Graf 3: Ex vivo biodistribuce u nádorových myší 1 a 2 hod po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG.

Z naměřených hodnot jsem následně vypočítala průměr pozitivní nádor:sval, pozitivní nádor:krev a pozitivní nádor:ledviny. Poměr radioaktivity nádoru k radioaktivitě ve svalu vyjadřuje množství značené látky v nádoru vzhledem k pozadí, poměr radioaktivity v nádoru k radioaktivitě v ledvinách udává, zda dochází k nežádoucí akumulaci látky v ledvinách a poměr radioaktivity v nádoru k radioaktivitě v krvi udává specifickou kumulaci látky v cílové tkáni. Výsledky těchto výpočtů jsem shrnula v Tabulce 6.

Tabulka 6: Poměr radioaktivity nádoru k vybraným orgánům při použití ^{68}Ga -SID-MG.

| poměr | 1 hod p.i. | 2 hod p.i. |
|-------------------|------------|------------|
| poz.nádor:krev | 0,66 | 1,25 |
| poz.nádor:ledviny | 0,05 | 0,05 |
| poz.nádor:sval | 3,86 | 5,49 |

U odebraných orgánů jsem následně měřila také jejich fluorescenční signál. Nejvyšší fluorescenci jsem naměřila v ledvinách a játrech. Nejvyšší fluorescenční signál v pozitivním nádoru jsem naměřila 1 hodinu po aplikaci $^{68}\text{Ga-SID-MG}$. Naměřené výsledky u jednotlivých orgánů jsem zaznamenala v Grafu 4.



Graf 4: *Ex vivo* biodistribuční data získaná měřením fluorescence v odebraných orgánech u nádorových myši 1 a 2 hodiny po aplikaci $^{68}\text{Ga-SID-MG}$.

7 DISKUZE

Včasná diagnostika hraje zásadní roli v úspěšné léčbě rakoviny. Nádorová onemocnění se rutinně diagnostikují pomocí několika základních typů metod, řadíme mezi ně metody biochemické, genetické, cytologické, bioptické a zobrazovací. Běžně používanými diagnostickými metodami v onkologii jsou zobrazovací metody nukleární medicíny využívající radioizotopy, v současnosti představované především hybridními systémy PET/CT či PET/MR. Pomocí pozitronové emisní tomografie detekujeme patologickou tkáň sledováním kumulace radiofarmaka obsahujícího pozitronový zářič. Výpočetní tomografie či magnetická rezonance nám pak poskytuje informaci anatomickou (Saha, 2010; Sharp *et al.*, 2005).

Radiofarmakum využívané k diagnostice nádorů je léčivo obsahující složku, která mu umožní specifickou akumulaci v nádorové tkáni, a radionuklid, jež emituje radiaci, díky které můžeme detekovat radiofarmakum v těle pacienta. Ideální radiofarmakum použitelné v diagnostice onkologických onemocnění vykazuje vhodné farmakokinetické vlastnosti, obsahuje radionuklid s vhodným poločasem přeměny, specificky se váže do nádorové tkáně, je levné a dostupné a obsažený radionuklid se rozpadá na stabilní dceřiná jádra (Kupka *et al.*, 2007).

V současnosti je jedním z nejpoužívanějších radiofarmak v onkologii ^{18}F -fluorodeoxyglukóza (FDG). Jedná se o analog glukózy, který je transportován do nádorové buňky jako glukóza. Na rozdíl od glukózy však není FDG dále metabolizována a hromadí se proto v buňce. Úroveň akumulace FDG v nádorech odpovídá především intenzitě metabolismu glukózy a v menší míře i prokrvení nádoru. FDG umožňuje široké využití v diagnostice různých onkologických onemocněních. Nádorové buňky mají vyšší energetickou spotřebu než zdravé buňky, což vede ke zvýšení kumulace FDG v nádoru. U velké řady nádorů je dosažen takový kontrast mezi lézí a okolím, že to umožňuje detekovat nádory, které nelze prokázat jinými diagnostickými metodami. Jistou nevýhodou ale představuje distribuce a nespecifická akumulace tohoto radiofarmaka ve většině karcinomů a FDG tak nemůže být použita ke zobrazení konkrétního typu nádoru. Mimoto dochází k hypermetabolismu glukózy i v zánětech či infekcích, což může vést k falešně pozitivním výsledkům. Z tohoto důvodu je snaha nalézt nová radiofarmaka, pomocí kterých by bylo možné zobrazovat nádory s vyšší specificitou (Doležalová *et al.*, 2014).

V méj bakalářské práci jsem se zabývala studiem dvou peptidů značených radioaktivně radionuklidem ^{68}Ga a fluorescenčně pomocí SulfoCy7. Konkrétně jsem studovala RGD peptid

a minigastrin (MG) derivatizované chelátorem Fusarininem C ze skupiny sideroforů (SID). SID-RGD obsahuje aminokyselinovou sekvenci arginin-glycin-aspartát, pomocí které se váže na membránový receptor integrin $\alpha_v\beta_3$, který se vyskytuje ve velkém počtu na povrchu nádorových buněk během angiogeneze. SID-MG se díky minigastrinu ve své struktuře váže na cholecystokininový-2 a gastrinový receptor, které jsou exprimované na povrchu některých typů nádorových buněk. Pomocí široké škály *in vitro* a *in vivo* testů jsem hodnotila vlastnosti těchto dvou biokonjugátů s cílem stanovit, zda by bylo možné je využít k nukleárnímu a optickému zobrazování v onkologické diagnostice.

Při radioaktivním značení jsem testovala optimální množství peptidu, se kterým bych získala stabilní komplex vhodný k dalšímu studiu, tedy komplex, který vykazuje vysokou radiochemickou čistotu. K testování jsem použila různá množství SID-RGD a SID-MG. V Tabulce 1 můžeme pozorovat výsledky získané testováním SID-RGD, kde je patrné, že nejvhodnějším množstvím použitého peptidu je 5 a 10 μg . Při 0,1 μg a 1 μg pozorujeme nízkou radiochemickou čistotu, která nesplňuje podmínky pro využití v biologické aplikaci. Při použitém množství 5 μg SID-RGD je sice splněna podmínka relativně vysoké hodnoty radiochemické čistoty > 95 %, ale i přesto jsem se pro další experimenty rozhodla pracovat s optimálnější hodnotou 10 μg , u které byla pozorována radiochemická čistota 99,8 %.

Obdobné výsledky jsem zaznamenala i u SID-MG, které můžeme pozorovat v Tabulce 4. Při množstvích 0,1 μg a 1 μg použitého peptidu opět pozorujeme nízkou radiochemickou čistotu. Při použití 5 μg SID-MG už dosahuje látka poměrně dobré radiochemické čistoty a mohla by být použita pro další testování, ale stejně jako u SID-RGD jsem se rozhodla pro použití 10 μg , při kterém byla radiochemická čistota komplexu 99,9 %.

Dále jsem studovala *in vitro* stabilitu značených peptidů SID-RGD a SID-MG. Aby bylo možné studovaná radiofarmaka aplikovat pacientovi, musí být zaručena jejich stabilita v čase v různých podmínkách. Oba peptidy jsem inkubovala po dobu 30, 60 a 120 minut, abych zjistila, zda jsou značené preparáty stabilní při laboratorní teplotě i po 2 hodinách od radioaktivního značení. SID-RGD se při fyziologickém pH jevil jako stabilní ve všech měřených časech, jak můžeme pozorovat v Tabulce 2. Stejný výsledek jsem pozorovala i u SID-MG, který byl také ve všech měřených časech při fyziologickém pH stabilní (viz Tabulka 5). Následným testováním stability značených peptidů v lidském séru jsem simulovala prostředí lidské krve. Oba zkoumané peptidy jsem inkubovala po dobu 30, 60 a 120 minut v lidském séru při teplotě 37 °C. SID-RGD vykazoval ve všech časech radiochemickou čistotu > 99 % (viz

Tabulka 2), stejně tomu bylo u SID-MG (viz Tabulka 5). Oba radioaktivně značené peptidy tedy vykazovaly vysokou *in vitro* stabilitu při fyziologickém pH i v lidském krevním séru.

Rozdělovacím koeficientem (Log P) jsem měřila podíl radioaktivity značeného peptidu ve dvoufázovém systému oktanolové a vodné fáze. Principem této metody je studium lipofility potenciálního radiofarmaka, která nám vyjadřuje schopnost transportu značeného peptidu skrze mezifázová rozhraní v těle. Oktanol v tomto systému tedy představuje nepolární rozhraní, voda polární. Látky s vyšším rozdělovacím koeficientem jsou lipofilní (nepolární), kdežto látky s nižším rozdělovacím koeficientem jsou hydrofilní, polární. V případě testovaných radioaktivně značených peptidů byl pro SID-RGD naměřen Log P $-2,09 \pm 0,04$ a pro SID-MG $-1,69 \pm 0,13$. Porovnáním hodnot je patrné, že SID-MG je lehce lipofilnější než SID-RGD.

V dalším *in vitro* testu jsem studovala vazbu značených peptidů na plazmatické proteiny pomocí gelové chromatografie. Zásadní hodnotou byla naměřená radioaktivita v eluátu, ve kterém se nacházel komplex značeného peptidu s plazmatickým proteinem. Procentuální množství SID-RGD v eluátu po 30 minutách inkubace s lidskou plazmou činilo $16,95 \pm 0,51$ %, po 60 minutách $20,08 \pm 0,31$ % a po 120 minutách $20,90 \pm 1,18$ %. Naproti tomu procento SID-MG vázaného na plazmatické proteiny po 30 minutách inkubace bylo $49,54 \pm 1,72$ %, po 60 minutách $55,51 \pm 1,36$ % a po 120 minutách $59,63 \pm 0,53$ %. Získaná data tedy ukazují relativně vysokou afinitu SID-MG k plazmatickým proteinům a dá se tedy očekávat zvýšená retence tohoto peptidu v krvi.

Analýzou *in vivo* stability peptidů v moči odebrané laboratorními myšmi jsem zjišťovala, zda se značené peptidy v organismu myši metabolizují nebo se vylučují v nezměněné podobě. Na Obrázku 9 jsou radiochromatogramy získané měřením odebrané moči laboratorními myšmi po 30, 60 a 120 minutách od r.o. aplikace SID-RGD porovnané s radiochromatogramem aplikované látky (viz Obrázek 8). Porovnáním retenčních časů se ukázalo, že SID-RGD se v organismu laboratorní myši nijak nemetabolizuje a je tedy vysoce stabilní. Na Obrázku 17 jsou vyobrazeny radiochromatogramy SID-MG opět 30, 60 a 120 minut po r.o. aplikaci porovnané s radiochromatogramem podaného SID-MG. Retenční časy hlavních píků se již po 30 minutách od aplikace látky výrazně neshodují, což napovídá tomu, že se SID-MG v organismu velmi rychle rozkládá. Důvodem této rychlé degradace je pravděpodobně methionin obsažen ve struktuře minigastrinu, který v organismu podléhá oxidaci (Pfister *et al.*, 2015).

Součástí experimentální části této bakalářské práce byly také testy s použitím

zobrazovacího hybridního zařízení PET/CT, pro studium chování značených peptidů v laboratorních myších. Značené peptidy byly nejprve podány nenádorovým myším pro studium jejich distribuce v organismu. Na Obrázku 10, který zobrazuje snímek z dynamického PET skenování SID-RGD můžeme pozorovat pozvolnou distribuci značeného peptidu z krevního oběhu do ledvin a následně do močového měchýře. Snímky na Obrázku 11 ze statického PET/CT skenování nenádorové myši 30 a 90 minut po aplikaci SID-RGD potvrzují výsledky získané z dynamického skenování. Poměrně vysoká radioaktivita naměřená v ledvinách a močovém měchýři napovídá tomu, že bude docházet k pozvolné eliminaci značeného peptidu z organismu močovými cestami.

Distribuci SID-MG v nenádorových laboratorních myších můžeme pozorovat na snímku z dynamického skenování (viz Obrázek 18). Podobně jako u SID-RGD pozorujeme pozvolnou distribuci značeného peptidu z krevního oběhu do organismu, ale kromě akumulace SID-MG v ledvinách dochází u tohoto peptidu na rozdíl od ^{68}Ga -SID-RGD také k výrazné akumulaci v oblasti jater a gastrointestinálního traktu. Tyto výsledky potvrzují i snímky získané ze statického PET/CT skenování nenádorové myši 1 a 2 hodiny po aplikaci SID-MG (viz Obrázek 19), kdy můžeme pozorovat kromě ledvin také výrazný signál v oblasti jater a GIT. Získaná data potvrzují lipofilnější povahu SID-MG.

Dynamickým PET skenováním nádorové myši po aplikaci SID-RGD je možné pozorovat kromě výrazné aktivity v ledvinách a močovém měchýři také akumulaci radioaktivity v nádoru (viz Obrázek 12). Na základě získaných výsledků jsem následně provedla PET/CT statické skenování 30 a 90 minut od aplikace SID-RGD (viz Obrázek 13). Po 90 minutách od aplikace značeného peptidu je stále možné pozorovat specifickou akumulaci radioaktivity v nádoru a stejně tak vysokou akumulaci radioaktivity v močovém měchýři a ledvinách.

SID-MG na snímcích z dynamického PET skenování nádorové myši vykazuje velmi intenzivní radioaktivní signál v oblasti ledvin, jater a GIT, podobně jako u experimentu s nenádorovými zvířaty (Obrázek 20). Zhruba po 1 hodině od aplikace značeného peptidu se začíná specificky akumulovat v pozitivním nádoru, tedy nádoru obsahujícím CCK2/gastrinový receptor, a proto jsem se rozhodla provádět statické PET/CT skenování 1 a 2 hodiny od aplikace SID-MG. Na Obrázku 21 pozorujeme na obou snímcích získaných 1 a 2 hodiny po aplikaci SID-MG výraznou aktivitu v oblasti ledvin, jater a GIT a poměrně slabý signál v pozitivním nádoru. V žádném z měření nepozorujeme aktivitu látky v negativním nádoru, který

neobsahuje CCK2/gastrinové receptory.

Vzhledem k tomu, že radionuklid ^{68}Ga použitý ke značení má poločas rozpadu 68 minut, neumožňuje zobrazování akumulace značeného peptidu v těle laboratorní myši déle než pár hodin od jeho aplikace. Také z toho důvodu byly studované peptidy derivatizované fluorescenčním barvivem SulfoCy7, které umožnilo pozorovat značené peptidy v laboratorních myších i v delších časových intervalech od aplikace (až 72 hodin).

Na Obrázku 14 jsou referenční snímky z fluorescenčního zobrazování pořízené 30 a 90 minut po aplikaci SID-RGD nenádorové myši. Distribuce značeného peptidu odpovídá výsledkům z PET/CT zobrazování, látka se kumuluje především v ledvinách a močovém měchýři. U nádorových zvířat na Obrázku 15 pozorujeme signál v nádoru ještě po 24 hodinách, ale 48 hodin od aplikace SID-RGD už pozorujeme signál v nádoru velmi slabě, ale stále je možné pozorovat fluorescenční signál v ledvinách a močovém měchýři. Na snímcích z fluorescenčního zobrazování nenádorových myší 1 a 2 hodiny po aplikaci SID-MG na Obrázku 22 můžeme vidět výsledky analogické s těmi z PET/CT zobrazování. Značený peptid se akumuloval v oblasti močového měchýře, ledvin, jater a GIT. Na Obrázku 23 se snímky z fluorescenčního zobrazování nádorové myši pozorujeme výrazný fluorescenční signál v pozitivním nádoru ještě po 72 hodinách od aplikace SID-MG a již nepozorujeme výrazný signál v eliminačních orgánech. Z těchto výsledků vyplývá, že SID-MG se velmi specificky váže do pozitivního nádoru a dochází zde k jeho internalizaci. Dále se ukázalo, že pro zobrazovací akumulace SID-MG v nádorové tkáni jsou vhodnější delší časové intervaly po aplikaci tohoto peptidu do organismu a tedy v tomto případě se jeví jako výhodnější metoda fluorescenční zobrazování.

In vivo chování značených peptidů jsem dále studovala prostřednictvím *ex vivo* biodistribučních experimentů, díky kterým bylo možné kvantifikovat množství aktivity v jednotlivých orgánech nádorových myší po aplikaci značených peptidů. Při měření radioaktivity v jednotlivých orgánech nádorových myší 30 a 90 minut po aplikaci SID-RGD jsem zaznamenala v obou časech nejvyšší aktivitu v ledvinách a druhou nejvyšší naměřenou aktivitu jsem pozorovala v nádoru (viz Graf 1). Získaná data plně korespondují s výsledky získanými PET/CT zobrazováním. V Grafu 3 s daty z *ex vivo* biodistribuce nádorové myši 1 a 2 hodiny po aplikaci SID-MG je zřetelná vysoká radioaktivita v ledvinách a v játrech. V porovnání s ostatními orgány, jako je slezina či plíce, není aktivita v pozitivním nádoru v těchto časových intervalech příliš vysoká. Radioaktivita naměřená u negativního nádoru

přibližně odpovídá radioaktivitě naměřené v pozadí (sval). Ve srovnání radioaktivity naměřené v negativním nádoru 2 hodiny po aplikaci SID-MG byla v pozitivním nádoru naměřena 3x větší radioaktivita.

Výsledky získané z *ex vivo* biodistribučních studií měřením radioaktivity jsem se pokusila porovnat s daty získanými měřením fluorescence. Při měření fluorescence jednotlivých orgánů odebraných z nádorových zvířat 30 a 90 minut po aplikaci SID-RGD byl nejvyšší fluorescenční signál pozorován opět u ledvin (viz Graf 2). Rozdílem oproti měření radioaktivity orgánů, je detekovaný vysoký fluorescenční signál ve střevech, játrech a žaludku. Vyšší fluorescenční signál byl opět pozorován také v nádoru. Nejvyšší fluorescenci u nádorových myší 1 a 2 hodiny po aplikaci ^{68}Ga -SID-MG jsem zaznamenala opět u ledvin a jater v obou časech (viz Graf 4). Vyšší fluorescenční signál jsem stejně jako u ^{68}Ga -SID-RGD naměřila také u střeva, žaludku, slinivky a sleziny. U pozitivního nádoru byla zaznamenána asi 3x nižší fluorescenci než u ledvin a fluorescenční signál negativního nádoru opět odpovídat signálu pozadí, jako tomu bylo u měření radioaktivity.

Ze získaných výsledků pro ^{68}Ga -SID-RGD pozorujeme, že se jedná o hydrofilnější látku, která se pozvolna akumuluje v příslušné nádorové tkáni a lze ji použít jak pro PET, tak pro fluorescenční zobrazení nádorů exprimujících $\alpha_v\beta_3$ integriny. Porovnáním SID-RGD a NODAGA-RGD testovaném v rámci bakalářské práce Jany Štěpánkové vykazuje SID-RGD v *ex vivo* biodistribučních testech 2x větší aktivitu než NODAGA-RGD (Štěpánková, 2015). Oba značené RGD peptidy vykazují podobnou stabilitu, ale NODAGA-RGD se jeví hydrofilnější než SID-RGD. Důvodem může být například rozdílný bifunkční chelátor nebo přítomnost fluorescenční značky na SID-RGD.

Oproti tomu SID-MG ukázal lipofilnější charakter a horší farmakokinetické vlastnosti. Nicméně díky akumulaci SID-MG v nádorech s CCK2 receptory a následné internalizaci je možné fluorescenční signál pozorovat až 3 dny po aplikaci látky. Radioaktivně značené miniagastriny jsou studovány různými výzkumnými skupinami. Porovnáním SID-MG a DOTA-PP-F11, kde PP-F11 je analog minigastrinu, testovaný Dr. Roosenburgem spolu s NOTA-PP-F11 a NODAGA-PP-F11 (Roosenburg *et al.*, 2014), SID-MG vykazoval v nádoru přibližně stejnou aktivitu, jako NOTA-PP-F11 a NODAGA-PP-F11, ale téměř 2x menší aktivitu než u DOTA-PP-F11. Ve srovnání SIG-MG s DOTA-cyclo-MG1, DOTA-cyclo-MG2 a DOTA-linear-MG1 testovanými Dr. von Guggenbergem, kde MG1 je cyklo[γ -D-Glu-Ala-Tyr-DLys]-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ a MG2 cyclo[γ -D-Glu-Ala-Tyr-D-Lys]-Trp-Nle-Asp-Phe-

NH2 (von Guggenberg *et al.*, 2011), vykazoval SID-MG v nádoru přibližně stejnou aktivitu jako DOTA-cyclo-MG1 a DOTA-cyclo-MG2, ale téměř 6x větší aktivitu než DOTA-linear-MG1.

Oba studované peptidy bylo možné radioaktivně označit ^{68}Ga s vysokou radiochemickou čistotou. *In vivo* experimenty prokázaly specifickou akumulaci studovaných látek v příslušných nádorech. Ukázalo se, že i přes určitá omezení daná primárně farmakokinetickými vlastnostmi testovaných biokonjugátů, je možné fusarinin C použít jako vhodný skelet pro přípravu multimodálních zobrazovacích činidel využitelných k diagnostice nádorových onemocnění.

8 ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na preklinické testování RGD peptidu a minigastrinu, derivatizovaných chelátorem ze skupiny sideroforů – Fusarininem C. Zkoumané peptidy byly značeny fluorescenčně barvivem Sulfo-Cyanine7, vhodným pro zobrazování v blízké infračervené oblasti, a radioaktivně radionuklidem Gallia-68. Preklinické testy zahrnovaly *in vitro* charakterizaci a studium *in vivo* chování testovaných látek v laboratorních zvířatech.

Oba peptidy bylo možné radioaktivně označit s vysokou radiochemickou čistotou. ^{68}Ga -SID-RGD i ^{68}Ga -SID-MG, vykazovaly hydrofilní charakter a uspokojivou *in vitro* stabilitu v lidském séru. Obě látky se ve zvýšené míře vázaly na plazmatické proteiny a ^{68}Ga -SID-MG prokázal významnou *in vivo* instabilitu. *In vivo* experimenty ukázaly spíše pomalejší farmakokinetiku obou peptidů s rozdílnou exkrecí. ^{68}Ga -SID-RGD se vylučoval primárně přes ledviny, zatímco ^{68}Ga -SID-MG vykazoval i významnou hepatobiliární exkreci. ^{68}Ga -SID-RGD i ^{68}Ga -SID-MG se specificky akumulovali v příslušných nádorech, které bylo možné zobrazit jak pomocí PET/CT, tak pomocí fluorescenčního zobrazovacího systému.

Na základě výsledků získaných z této studie lze koncept multimodálních zobrazovacích činidel pro diagnostiku onkologických onemocnění považovat za nadějný. Jistá omezení ve využitelnosti studovaných látek se týkají zejména jejich pomalejší farmakokinetiky, která je v kombinaci s PET/CT zobrazováním pomocí radionuklidů s krátkým poločasem přeměny nevhodná. Popisovaná strategie však nabízí širokou škálu možností dalšího zlepšení a optimalizace *in vivo* vlastností multimodálních zobrazovacích činidel záměnou chelátoru, fluoroforu i použitého radionuklidu.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ambrosini, V., Fani, M., Fanti, S., Forrer, F., Maecke, H. (2011). Radiopeptide Imaging and Therapy in Europe. *Journal of Nuclear Medicine*, 52(Supplement_2), pp.42S-55S.
- Banerjee, S. et Pomper, M. (2013). Clinical applications of Gallium-68. *Applied Radiation and Isotopes*, 76, pp.2-13.
- Brechbiel, M. (2008). Bifunctional Chelates for Metal Nuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 52(2), pp.166-173.
- Cherry, S., Sorenson, J., Phelps, M. (2012). *Physics in nuclear medicine*. 1st ed. Philadelphia, Pa.: Saunders.
- Chitambar, C. (2010). Medical Applications and Toxicities of Gallium Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(5), pp.2337-2361.
- Doležalová, I., Bolčák, K., Kuba, R. (2014). Využití pozitronové emisní tomografie (PET) v neurologii. *Neurol. praxi*, 15(1), pp.16-21.
- Drozdovitch, V., Brill, A., Callahan, R., Clanton, J., DePietro, A., Goldsmith, S., Greenspan, B., Gross, M., Hays, M., Moore, S., Ponto, J., Shreeve, W., Melo, D., Linet, M., Simon, S. (2015). Use of Radiopharmaceuticals in Diagnostic Nuclear Medicine in the United States. *Health Physics*, 108(5), pp.520-537.
- Ebert, B., Riefke, B., Sukowski, U., Licha, K. (2011). Cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging in vivo: acute tolerance, pharmacokinetics, and fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 16(6), p.0666003.
- Efferth, T. et Langguth, P. (2011). Transport processes of radiopharmaceuticals and -modulators. *Radiation Oncology*, 6(1), p.59.
- Fani, M. et Maecke, H. (2012). Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 39(S1), pp.11-30.
- Fani, M., André, J., Maecke, H. (2008). ⁶⁸Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 3(2), pp.53-63.
- Ford, N., Graham, K., Groom, A., MacDonald, I., Chambers, A., Holdsworth, D. (2006). Time-Course Characterization of the Computed Tomography Contrast Enhancement of an Iodinated Blood-Pool Contrast Agent in Mice Using a Volumetric Flat-Panel Equipped Computed Tomography Scanner. *Investigative Radiology*, 41(4), pp.384-390.
- Frangioni, J. (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(5), pp.626-634.
- Gijs, M., Aerts, A., Impens, N., Baatout, S., Luxen, A. (2016). Aptamers as radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy. *Nuclear Medicine and Biology*, 43(4), pp.253-271.
- Ghosh, S., Pinkston, K., Robinson, H., Harvey, B., Wilganowski, N., Gore, K., Sevick-Muraca, E., Azhdarinia, A. (2015). Comparison of DOTA and NODAGA as chelators for ⁶⁴Cu-labeled immunoconjugates. *Nuclear Medicine and Biology*, 42(2), pp.177-183.

- Gottschalk, A. et Anger, H. (1965). Renal Scintiphotography with the Gamma-Ray Scintillation Camera and Hg203-Neohydrin. *Radiology*, 84(5), pp.861-867.
- Guilbault, G. et Chen, R. (1973). *Practical fluorescence*. 1st ed. New York, N.Y.: Dekker.
- Haas, H. (2003). Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(4), pp.316-330.
- Hildebrandt, I., Su, H., Weber, W. (2008). Anesthesia and Other Considerations for in Vivo Imaging of Small Animals. *ILAR Journal*, 49(1), pp.17-26.
- Holland, J. P., Williamson, M. J., Lewis, J. S. (2010). Unconventional Nuclides for Radiopharmaceuticals. *Molecular Imaging*, 9(1), pp.1–20.
- Jacobson, O., Zhu, L., Niu, G., Weiss, I., Szajek, L., Ma, Y., Sun, X., Yan, Y., Kiesewetter, D., Liu, S., Chen, X. (2010). MicroPET Imaging of Integrin $\alpha_v\beta_3$ Expressing Tumors Using ^{89}Zr -RGD Peptides. *Molecular Imaging and Biology*, 13(6), pp.1224-1233.
- Jameson, D. (2014). *Introduction to fluorescence*. 1st ed. London: Taylor & Francis.
- Kaloudi, A. (2016). *Radiolabeled Gastrins in CCK2R-Positive Tumor Targeting – Toward Improved Diagnostic Efficacy Via In Situ Enzyme-Inhibition Approaches*. Disertační práce. Erasmus University Rotterdam. Department of Nuclear Medicine and Radiology.
- Knapp, F. et Dash, A. (2016). *Radiopharmaceuticals for therapy*. 1st ed.
- Knetsch, P., Zhai, C., Rangger, C., Blatzer, M., Haas, H., Kaeopookum, P., Haubner, R., Decristoforo, C. (2015). [^{68}Ga]FSC-(RGD) $_3$ a trimeric RGD peptide for imaging $\alpha_v\beta_3$ integrin expression based on a novel siderophore derived chelating scaffold—synthesis and evaluation. *Nuclear Medicine and Biology*, 42(2), pp.115-122.
- Kodíček, M. et Karpenko, V. (2000). *Biofyzikální chemie*. 1st ed. Praha: Academia.
- König, S. et Krämer, R. (2017). Accessing Structurally Diverse Near-Infrared Cyanine Dyes for Folate Receptor-Targeted Cancer Cell Staining. *Chemistry - A European Journal*.
- Kupka, K., Kubinyi, J., Šámal, M. (2007). *Nukleární medicína*. 1st ed. [Praha]: P3K. ISBN 978-809-0358-492.
- Laabs, E., Béhé, M., Kossatz, S., Frank, W., Kaiser, W., Hilger, I. (2011). Optical Imaging of CCK2/Gastrin Receptor-Positive Tumors With a Minigastrin Near-Infrared Probe. *Investigative Radiology*, 46(3), pp.196-201.
- Lakowicz, J. (2010). *Principles of fluorescence spectroscopy*. 1st ed. New York: Springer.
- Lázníček, M. et Komárek, P. (1998). *Základy radiofarmacie*. 1st ed. Praha: Karolinum. ISBN 80-718-4781-X.
- Liu, S. (2004). The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*, 33(7), p.445-461.

- Liu, S. (2009). Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency. *Bioconjugate Chemistry*, 20(12), pp.2199-2213.
- Maecke H., Hofmann M., Haberkorn U. (2005). ^{68}Ga -Labeled Peptides in Tumor Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*, 46(1), p.172-178.
- Mann, W. (1953). *The Cyclotron, etc. (Fourth edition, enlarged.)*. 1st ed. London: Methuen & Co.
- Navrátil, L. et Rosina, J. (2005). *Medicínská biofyzika*. 1st ed. Praha: Grada.
- Neilands, J. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), pp.26723-26726.
- Ollinger, J. et Fessler, J. (1997). Positron-emission tomography. *IEEE Signal Processing Magazine*, 14(1), pp.43-55.
- Ott, R., Flower, M., Babich, J., Marsden, P. (1988). The Physics of Radioisotope Imaging. *The Physics of Medical Imaging*. ISBN: 978-0-85274-349-2.
- Oxboel, J., Brandt-Larsen, M., Schjoeth-Eskesen, C., Myschetzky, R., El-Ali, H., Madsen, J., Kjaer, A. (2014). Comparison of two new angiogenesis PET tracers ^{68}Ga -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂ and ^{64}Cu -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂; in vivo imaging studies in human xenograft tumors. *Nuclear Medicine and Biology*, 41(3), pp.259-267.
- Pawlak, D., Rangger, C., Kolenc Peitl, P., Garnuszek, P., Maurin, M., Ihli, L., Kroselj, M., Maina, T., Maecke, H., Erba, P., Kremser, L., Hubalewska-Dydejczyk, A., Mikołajczak, R., Decristoforo, C. (2016). From preclinical development to clinical application: Kit formulation for radiolabelling the minigastrin analogue CP04 with In-111 for a first-in-human clinical trial. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, pp.1-9.
- Petrik, M., Zhai, C., Haas, H., Decristoforo, C. (2016). Siderophores for molecular imaging applications. *Clinical and Translational Imaging*, 5(1), pp.15-27.
- Pfister, J., Summer, D., Rangger, C., Petrik, M., von Guggenberg, E., Minazzi, P., Giovenzana, G., Aloj, L., Decristoforo, C. (2015). Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue. *EJNMMI Research*, 5(1).
- Pritchard, J., Ackerman, M., Tubis, M., Bland, W. (1976). Indium-III-Labeled Antibody Heavy Metal Chelate Conjugates: A Potential Alternative to Radioiodination. *Experimental Biology and Medicine*, 151(2), pp.297-302.
- Reubi, J. (2003). Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocrine Reviews*, 24(4), pp.389-427.
- Roosenburg, S., Laverman, P., Joosten, L., Cooper, M., Kolenc-Peitl, P., Foster, J., Hudson, C., Leyton, J., Burnet, J., Oyen, W., Blower, P., Mather, S., Boerman, O., Sosabowski, J. (2014). PET and SPECT Imaging of a Radiolabeled Minigastrin Analogue Conjugated with DOTA, NOTA, and NODAGA and Labeled with ^{64}Cu , ^{68}Ga , and ^{111}In . *Molecular Pharmaceutics*, 11(11), pp.3930-3937.

- Saha, G. (2010). *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 1st ed. New York: Springer. ISBN 978-1-4419-5859-4.
- Sánchez, F., Orero, A., Soriano, A., Correcher, C., Conde, P., González, A., Hernández, L., Moliner, L., Rodríguez-Alvarez, M., Vidal, L., Benlloch, J., Chapman, S., Leevy, W. (2013). ALBIRA: A small animal PET/SPECT/CT imaging system. *Medical Physics*, 40(5), p.051906.
- Sharp, P., Gemmell, H., Murray, A. (2005). *Practical Nuclear Medicine*. 1st ed. London: Springer-Verlag London Ltd. ISBN 978-184-6280-184.
- Štěpánková, J. (2015). *Preklinický vývoj ⁶⁸Ga značených peptidů pro zobrazování glioblastomu*. Bakalářská práce. Palackého Univerzita v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Katedra organické chemie.
- Ullman, V. (2002). Jaderná fyzika a fyzika ionizujícího záření [online]. Dostupné z: <http://astronuklfyzika.cz/Fyzika-NuklMed.htm>, staženo dne: 6. 11. 2016.
- Velikyan, I. (2014). Prospective of ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical Development. *Theranostics*, 4(1), pp.47-80.
- von Guggenberg, E., Rangger, C., Sosabowski, J., Laverman, P., Reubi, J., Virgolini, I., Decristoforo, C. (2011). Preclinical Evaluation of Radiolabeled DOTA-Derivatized Cyclic Minigastrin Analogs for Targeting Cholecystokinin Receptor Expressing Malignancies. *Molecular Imaging and Biology*, 14(3), pp.366-375.
- Wadas, T., Wong, E., Weisman, G., Anderson, C. (2010). Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chemical Reviews*, 110(5), pp.2858-2902.
- Wang, F., Li, Y., Shen, Y., Wang, A., Wang, S., Xie, T. (2013). The Functions and Applications of RGD in Tumor Therapy and Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), pp.13447-13462.
- Wathen, C., Foje, N., Avermaete, T., Miramontes, B., Chapman, S., Sasser, T., Kannan, R., Gerstler, S., Leevy, W. (2013). In vivo X-Ray Computed Tomographic Imaging of Soft Tissue with Native, Intravenous, or Oral Contrast. *Sensors*, 13(6), pp.6957-6980.
- Zhai, C., Summer, D., Rangger, C., Haas, H., Haubner, R., Decristoforo, C. (2015). Fusarinine C, a novel siderophore-based bifunctional chelator for radiolabeling with Gallium-68. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 58(5), pp.209-214.
- Zhai, C., Franssen, G., Petrik, M., Laverman, P., Summer, D., Rangger, C., Haubner, R., Haas, H., Decristoforo, C. (2016). Comparison of Ga-68-Labeled Fusarinine C-Based Multivalent RGD Conjugates and [⁶⁸Ga]NODAGA-RGD—In Vivo Imaging Studies in Human Xenograft Tumors. *Molecular Imaging and Biology*, 18(5), pp.758-767.
- Zhang, J., Cui, L., Xu, M., Zheng, Y. (2014). Restoring the Secretory Function of Irradiation-Damaged Salivary Gland by Administering Deferoxamine in Mice. *PLoS ONE*, 9(11).