

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TATJANA JANŽOVNIK

**SINTEZA DOTA-KONJUGIRANIH ANALOGOV
IN METABOLITOV MINIGASTRINA**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



TATJANA JANŽOVNIK

**SINTEZA DOTA-KONJUGIRANIH ANALOGOV IN
METABOLITOV MINIGASTRINA**

**SYNTHESIS OF DOTA-CONJUGATED ANALOGS
AND METABOLITES OF MINIGASTRIN**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Oddelku za radiofarmacijo in klinično radiokemijo na Kliniki za nuklearno medicino v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana in na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag.farm. in somentorstvom dr. Petre Kolenc Peitl, mag.farm. Masnospektrometrične meritve so bile izvedene v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan. Tudi meritve cirkularnega dihiroizma smo izvedli na Inštitutu Jožef Štefan.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag.farm in somentorici dr. Petri Kolenc Peitl, mag.farm za izkazano zaupanje, neprecenljivo strokovno vodenje ter vsestransko pomoč pri nastajanju diplomskega dela. Zahvala gre tudi vsem zaposlenim na Oddelku za radiofarmacijo in klinično radiokemijo in Katedri za farmacevtsko kemijo za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela.

Posebno zahvalo pa namenjam družini in prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani, me podpirali in spodbujali.

IZVAJA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag.farm. in somentorstvom dr. Petre Kolenc Peitl, mag.farm.

Tatjana Janžovnik

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag.farm.
Član diplomske komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm

VSEBINA

VSEBINA.....	i
POVZETEK	iii
ABSTRACT	iv
SEZNAM OKRAJŠAV.....	v
1 UVOD	1
1.1 GASTRIN	1
1.2 GASTRINSKI RECEPTORJI	4
1.3 IZRAŽANJE GASTRINSKIH RECEPTORJEV V TUMORJIH.....	6
1.4 NUKLEARNA MEDICINA	8
1.5 RAZVOJ RADIOPEPTIDOV ZA CILJANJE GASTRINSKEGA (CCK2) RECEPTORJA	12
1.5.1 PREDKLINIČNI RAZVOJ LIGANDOV GASTRINSKEGA RECEPTORJA	13
1.5.2 KLINIČNE ŠTUDIJE Z GASTRINSKIMI ANALOGI.....	17
1.6 IZLOČANJE RADIOPEPTIDOV	18
1.7 METABOLNA STABILNOST.....	20
1.8 CIRKULARNI DIHROIZEM (CD).....	22
2 NAMEN DELA.....	24
3 MATERIALI IN METODE	26
3.1 KEMIJSKI DEL	26
3.2 STABILNOST V SERUMU	28
3.3 CIRKULARNI DIHROIZEM	29
4 EKSPERIMENTALNI DEL	31
4.1 SINTEZA DOTA-KONJUGIRANIH METABOLITOV MINIGASTRINA NA TRDNEM NOSILCU.....	31
4.1.1 POSTOPEK DODAJANJA PRVE AMINOKISLINE NA NOSILEC	31

4.1.2	POSTOPEK ODSTRANJEVANJA Fmoc ZAŠČITNE SKUPINE S TERMINALNE –NH ₂ SKUPINE	31
4.1.3	POSTOPEK DODAJANJA DRUGE IN VSEH NASLEDNJIH AMINOKISLIN	32
4.1.4	TNBS TEST	32
4.1.5	POSTOPEK VEZAVE DOTA-e (1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraocetna kislina) NA KONČEN PEPTID	33
4.1.6	ODSTRANJEVANJE ZAŠČITNIH SKUPIN IN HKRATNA CEPITEV PEPTIDA Z REZINE	34
4.2	SINTEZA DOTA-KONJUGIRANIH ANALOGOV MINIGASTRINA NA TRDNEM NOSILCU	52
4.2.1	ODSTRANJEVANJE ZAŠČITNE SKUPINE S PREDHODNO SINTETIZIRANE PEPTIDNE SEKVENCE NA REZINI	52
4.2.2	POSTOPEK DODAJANJA AMINOKISLIN	52
4.2.3	KEISER TEST	53
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	56
5.1	SINTEZA DOTA-KONJUGIRANIH ANALOGOV MINIGASTRINA IN NJIHOVIH METABOLITOV	56
5.2	OZNAČEVANJE Z RADIOAKTIVNIM IN NERADIOAKTIVNIM INDIJEM....	65
5.3	CIRKULARNI DIHROIZEM (CD)	70
5.4	ENCIMSKA STABILNOST V SERUMU	71
6	SKLEP	72
7	LITERATURA	73

POVZETEK

Poleg normalne, fiziološke prisotnosti je CCK2/gastrinski receptor visoko izražen v različnih tipih tumorjev. Izraženost CCK2 receptorjev na celičnih membranah različnih tumorjev je osnova za možnost prikaza teh tumorjev z uporabo različnih nuklearno-medicinskih tehnik (PET in SPECT) in osnova za ciljano molekularno terapijo, ki jo lahko izvajamo z uporabo ustreznih radioaktivno označenih analogov gastrina oziroma minigastrina.

Zadnjih nekaj let se na področju razvoja analogov minigastrina, ustreznega tudi za ciljano radionuklidno terapijo, pozornost posveča ustrežnejšim farmakokinetičnim lastnostim, predvsem v smislu povečane metabolne stabilnosti in znižanju zadrževanja radioaktivnosti v ledvicah. Do nedavnega se je zadrževanje obstoječih analogov minigastrina v ledvicah povezovalo z N-terminalnim glutamatnim koncem, vendar zadnje raziskave kažejo drugače. V eni od zadnjih študij so ugotovili, da zadrževanje ni določeno zgolj z nabojem, temveč tudi s stereokemijo minigastrinskega analoga. Pri primerjavi ^{111}In -DOTA-(L-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (PP13) in njegovega D-Glu₆ stereoizomera (PP11) je slednji izkazoval boljše lastnosti za terapijo v smislu manjšega zadrževanja v ledvicah in boljše stabilnosti v serumu. Razlog naj bi bila različna sekundarna struktura teh dveh minigastrinskih analogov.

Z namenom potrditve te domneve smo sintetizirali analoge minigastrina in potencialne metabolite PP11 in PP13 po principu sinteze peptidov na trdnem nosilcu z uporabo Fmoc metode, Rink Acid[®] oziroma Rink Amide[®] rezine kot nosilca in HATU kot aktivacijskega reagenta COOH skupine. Vsak metabolit je imel na N-terminalnem koncu vezan bifunkcionalni kelator DOTA, ki služi kot močan kompleksator radionuklida. Metabolite smo po končani sintezi čistili s preparativnim HPLC in pri vseh dosegli ustrezno čistoto (>90 %).

Določene DOTA-konjugirane peptide smo označili z neradioaktivnim indijem in jim s pomočjo cirkularnega dihiroizma določili sekundarno strukturo. Pri vseh D-Glu metabolitih oziroma analogih smo opazili podobno tendenco definiranih struktur, β -zavoj, in nedefinirano naključno zvito strukturo, ki ob dodatku TFE prehaja v α -vijačnico pri pripadajočih L-Glu parih.

V poskusu ugotavljanja metabolne stabilnosti in potencialnih mest encimske restrikcije smo z ^{111}In označili starševski analog PP11 in potencialne metabolite (STJ7 – STJ12) in jih nato inkubirali v svežem humanem serumu. Iz nam neznanega razloga praktično ni bilo zaznati razgradnje starševskega radiopeptida ali potencialnih metabolitov niti 48 ur po začetku inkubacije.

ABSTRACT

Gastrin is a regulatory peptide that binds with high affinity to the gastrin (CCK2) receptor mainly expressed in the gastric mucosa, endocrine pancreas and brain. Since the CCK2/gastrin receptor is also highly expressed in various types of tumors, these tumors can be visualized with nuclear medicine imaging techniques (PET and SPECT) or treated with peptide receptor radionuclide therapy if labeled with a particle emitting radionuclide.

The development of metabolically stable radiolabelled gastrin (minigastirin) analogues with suitable pharmacokinetics (primarily reduced retention in the kidneys) for radionuclide imaging and therapy has been a topic of recent research activity. Till now high kidney retention of minigastirin analogs has been related to the N-terminal glutamic acid, but the latest research suggests otherwise. In one recent study [1] they showed that high kidney retention is not determined only by the charge of the ligand, but rather by the stereochemistry of the ligand. They compared ^{111}In -DOTA-(L-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (PP13) and its D-Glu₆ stereoisomer (PP11). PP11 showed better properties for therapy in terms of reduced retention in the kidneys and better stability in serum which is most likely due to difference in secondary structures of both analogues (type II reverse-turn conformation of PP11 versus random coiled conformation of PP13).

In order to confirm this assumption, we synthesized minigastirin analogues and potential metabolites of PP11 and PP13 employing the peptide synthesis on solid phase using the Fmoc method, Rink Acid[®] resin and HATU as a coupling reagent. Each metabolite was on the N-terminus bound to bifunctional chelator DOTA, which serves as a powerful chelator for various radionuclides. Metabolites were purified after synthesis on preparative HPLC and for all of them we achieved the necessary purity (>90 %).

Certain DOTA-conjugated peptides were labeled with non-radioactive indium and circular dichroism measurements were performed to elucidate the secondary structure. All D-Glu metabolites or analogues demonstrated similar trend of defined structures, β -turn. The corresponding L-Glu pairs showed undefined, random coil, structure which with the addition of TFE passes in the α -helix.

In an attempt to ascertain the metabolic stability and potential sites of enzyme restriction parent analogue PP11 and its potential metabolites (STJ7 - STJ12) were labeled with ^{111}In and then incubated in fresh human serum. For some reason there was no detectable degradation of parent radiopeptide or potential metabolites not even 48 hours after the start of incubation.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACE	angiotenzinska konvertaza	DOTAGA	2,2',2''-(10-(2,6-dioksotetra
Ala	alanin		hidro-2H-piran-3-il)-1,4,7,10-
AK	aminokislina		tetraazaciklododekan-1,4,7-
Asp	aspartat		triil)triocetna kislina
Asn	asparagin	EDTA	etilenediamintetraocetna
Boc	t-butil karbamat		kislina
BOP	(benzotriazol-1-iloksi)tris	FDG	fluoro-2-deoksiglukoza
	(dimetilamino)fosfonij	Fmoc	9-fluorenilmetoksikarbonil
	heksafluorofosfat	FRALB	fragmenti albumina
cAMP	ciklični adenzin monofosfat	GIT	gastrointestinalni trakt
CCK	holecistokinin	Gln	glutamin
CCK1R	holecistokininski 1 receptor	Glu	glutamat
CCK2R	holecistokininski 2 (gastrinski)	Gly	glicin
	receptor	GPCR	z G-proteinom sklopljeni
CD	cirkulatni dihiroizem		receptorji
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat	HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-
CT	računalniška tomografija		N,N,N',N'-tetrametiluronij
Cys	cistein		heksafluorofosfat
DAG	diacilglicerol	HBTU	O-(benzotriazol-1-il)-
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-		N,N,N',N'-tetrametiluronij
	7-en		heksafluorofosfat
DCCI	N,N'-dicikloheksilkarbodiimid	HCTU	O-(6-klorobenzotriazol-1-il)-
DCE	dikloroetan		N,N,N',N'-tetrametiluronij
DCM	diklorometan		heksafluorofosfat
DIC	N,N'-diizopropilkarbodiimid	HEHA	1,4,7,10,13,16-heksaazaciklo
DIPEA	N,N'-diizopropiletilamin		octadekan-N,N',N'',N''',N''''
DMAP	4-dimetilaminopiridin		N''''-heksaocetna kislina
DMF	dimetilformamid	HOBt	N-hidroksibenzotriazol
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekan	HPLC	tekočinska kromatografija
	-1,4,7,10-tetraocetna kislina		visoke ločljivosti
DTPA	dietilentriaminpentaocetna	HSA	humani serumski albumin
	kislina		

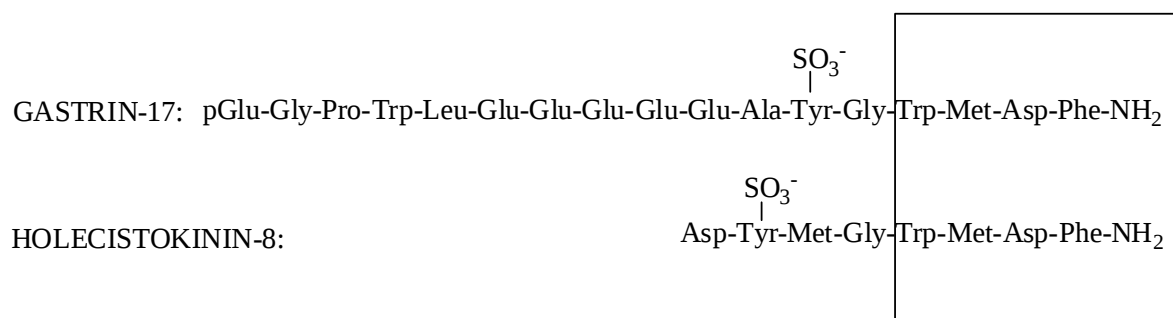
ID/g	% injicirane doze na gram tumorja	PRRT	peptidno-receptorska radionuklidna terapija
Ile	izolevcin	PyBOP	(benzotriazol-1-iloksi)
IP ₃	inozitol trifosfat		tripirolidinofosfonij
LDL	lipoprotein nizke gostote		heksafluorofosfat
Leu	leucin	SPECT	eno-fotonska emisijska
Met	metionin		računalniška tomografija
MF	mobilna faza	SPPS	sinteza peptidov na trdnem nosilcu
MG	magnetna resonanca		
mRNA	informacijska RNA	TBTU	O-(benzotriazol-1-il)-
MTC	medularni rak ščitnice		N,N,N',N'-tetrametiluronij
NMP	N-metilpirolidon		tetrafluoroborat
OBt	oksibenzotriazol	tBu	t-butil
QC	kontrola kakovosti	TES	trietilsilan
OPfp	pentafluorofenil	TFA	trifluoroocetna kislina
PEPA	2-[4-nitrobenzil]-1,4,7,10,13- pentaazaciklopentadekan-N,N', N'',N''',N''''-pentaocetna kislina	TFE	trifluoroetanol
		TIS	triizopropilsilan
		TNBS	2,4,6-trinitrobenzen
PEG	polietilen glikol		sulfonska kislina
PET	pozitronska emisijska tomografija	Trp	triptofan
		Trt	tritol
Phe	fenilalanin	Tyr	tirozin
PKC	proteinkinaza C	Val	valin
PLC	fosfolipaza C		

1 UVOD

1.1 GASTRIN

Leta 1905 je Edkins v ekstraktu sluznice antruma odkril snov, ki je spodbujala izločanje želodčne kisline. Poimenoval jo je »gastric secretin« (gastrični sekretin) in ime kasneje skrajšal v gastrin. Gastrin je bil drugi odkriti hormon, takoj za sekretinom. Nekaj let kasneje sta Ivy in Oldberg našla dokaze za obstoj hormona, ki spodbuja praznjenje žolčnika in ga poimenovala holecistokinin (CCK). Gastrin je 17 aminokislin dolg peptid, ki se pod vplivom hrane, bogate s proteini, izloči v želodcu (antrumu) iz G-celic in spodbuja izločanje želodčne kisline iz parietalnih celic v sluznici fundusa. CCK pa je sestavljen iz 33 aminokislin in se izloča iz I celic tankega črevesa pod vplivom maščob in proteinov v hrani. Spodbuja izločanje encimov iz pankreasa in kontrakcijo žolčnika.[1]

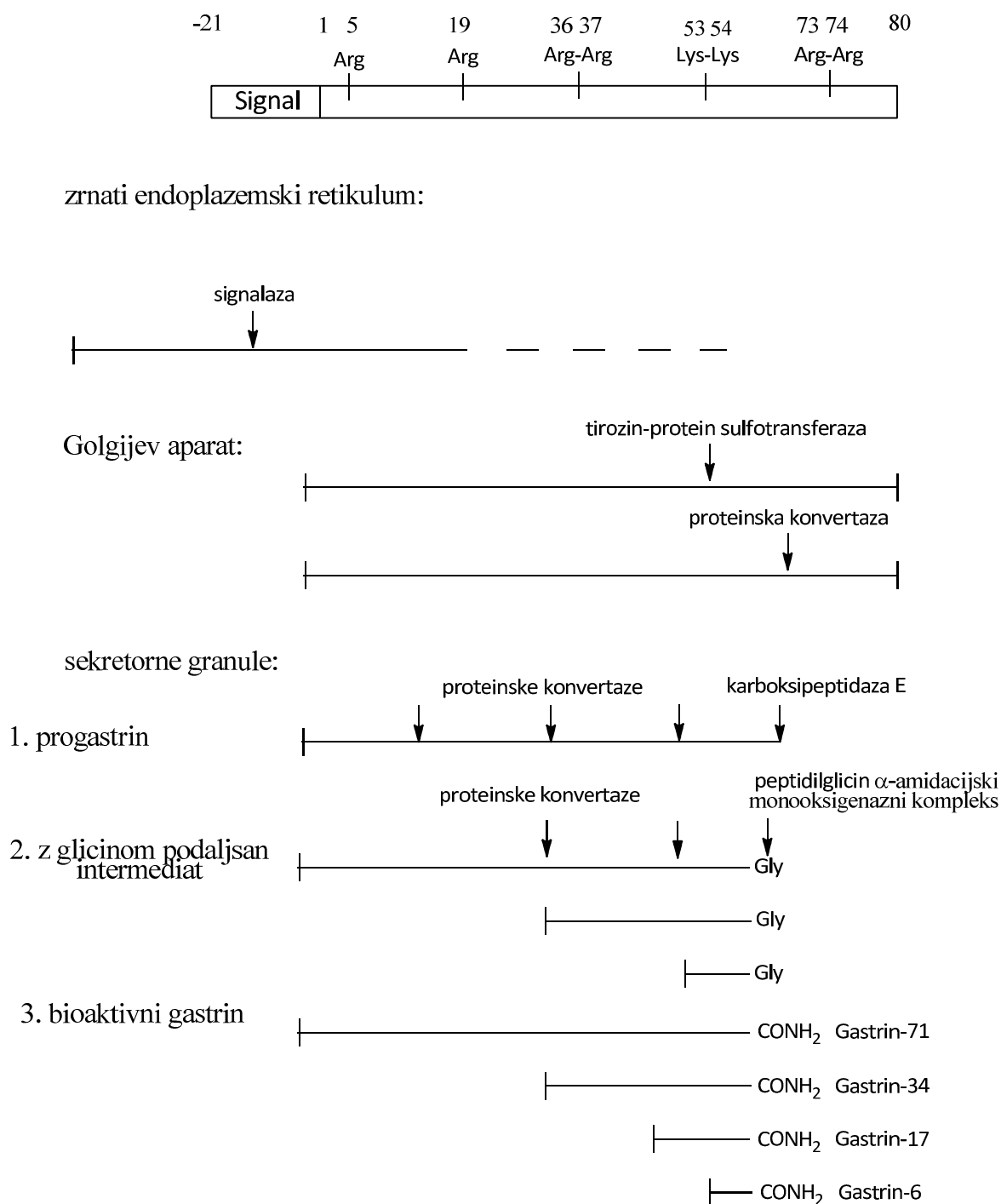
Strukturna identifikacija je pokazala presenetljivo homologijo med posameznimi peptidi. Posledično lahko polovico hormonov v GIT razvrstimo v družine, ki imajo za osnovo prav strukturno podobnost. Gastrin in CCK sodita v isto družino, v tako imenovano gastrinsko družino. Homologija te družine je omejena na točno definirano vezavno mesto, C-terminalni tetrapeptid -Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. Kakršnakoli sprememba tega zaporedja v veliki meri zmanjša ali onemogoči vezavo na receptor in posledično biološki učinek hormona. Pri primerjavi propeptidov in strukture genov opazimo podobnost v urejanju progastrina in proCCK, kot tudi njihovih genov, vendar zelo malo podobnosti v aminokislinskem zaporedju in DNK sekvenci zunaj skupnega C-terminalnega konca. Za gastrinsko družino je značilen še O-sulfatiran tirozinski ostanek (slika 1).



Slika 1: Aminokislinsko zaporedje gastrina-17 in CCK-8. Označen je skupen C-terminalnidel, ki se veže na receptor in položaj sulfatne skupine. Pri gastrinu-17 je sulfat vezan na Tyr, ki je od C-terminalnega konca oddaljen 6 AK ostankov, pri CCK-8 pa 7. Povzeto po viru [2] in[1].

Pred četrto stoletje so verjeli, da en gen kodira en peptid oziroma hormon. Z razvojem kemije peptidov in molekularne biologije se je izkazala ta dogma za preveč poenostavljena. Sočasno s pojasnjevanjem strukture evkariontskega gena in izboljšanim razumevanjem izražanja genov je postalo očitno, da gen za določen hormon pogosto izraža vrsto različnih bioaktivnih peptidov. V primeru gastrina en gen kodira samo en prohormon in izrazi se samo en prohormon z enim aktivnim mestom, ampak na ta način, da dobimo številne peptide različnih dolžin z enakim bioaktivnim C-koncem.[1]

Do sedaj so nastanek progastrina v G-celicah preučili še posebej podrobno. Po translaciji gastrinske mRNA na ribosomih in odcepitvi NH_2 -terminalnega signalnega peptida iz preprogastrina, se progastrin prenese v Golgijev aparat. Tam pride do prvih posttranslacijskih modifikacij, in sicer O-sulfatiranja tirozina 66, in prvih endoproteolitičnih cepitev. Vezikli prenesejo nastale intermediate progastrina iz Golgijevega aparata proti bazalnemu delu G celic, kjer se shranijo v sekretorne granule. Rehfeld[1] domneva, da se endoproteolitične cepitve s peptidno konvertazo in eksoproteolitično prirezovanje s karboksipeptidazo E, kot tudi poznejša glutamilna ciklizacija, nadaljujejo tudi med samim transportom v granule. Dokončen korak se zgodi med shranjevanjem in dozorevanjem v sekretornih granulah. Te namreč vsebujejo amidacijski encimski kompleks (peptidilglicin α -amidacijska monooksigenaza ali PAM), ki odstrani glioksilat iz prekursorja gastrina. Amidacija gastrina je bistven, vse ali nič aktivacijski proces, ki je skrbno nadzorovan. Kot rezultat vseh teh posttranslacijskih modifikacij se iz granul sprosti heterogena mešanica gastrinov. Nekaj procentov je neamidiranih, v glavnem z glicinom podaljšanih gastrinov. Večina, več kot 90 %, so α -amidirani bioaktivni gastrini. Najdaljši je gastrin-71. Med amidiranimi je 90 % gastrina-17, 5 % je gastrina-34, ostalo pa so gastrin-71, gastrin-52 in gastrin-14 (minigastrin). Približno polovica amidiranih gastrinov je sulfatiranih na tirozinu. Zaradi velikih razlik v metabolnem očistku se delež posameznih gastrinov v periferni plazmi spremeni, tako da daljši gastrini z daljšim razpolovnim časom prevladajo nad krajšim.[1] Shematski potek posttraslacijskega dogajanja prikazuje slika 2.



Slika 2: Postrnlacijske modifikacije preprogastrina v G-celica antruma. Proces vključuje endoproteolitične cepitve (s signalazo in proteinsko konvertazo), eksoproteolitično prerezovanje (s karboksipeptidazo E) in modifikacijo aminokislin (s tirozin-peptid sulfotransferazo in peptidilglicin α-amidacijskim monooksigenaznim kompleksom). Povzeto po viru [1].

1.2 GASTRINSKI RECEPTORJI

Gastrin in CCK v svoji dozoreli obliki interagirata z membranskim, z G-proteinom sklopljenim receptorjem, imenovanim CCK receptor.[2]

Poznamo dva tipa CCK receptorjev, CCK1 receptor (včasih imenovan tudi CCK A) in CCK2 receptor (včasih CCK B). CCK1 receptor (CCK1R) so prvič našli v pankreatičnih acinarnih celicah. V glavnem se nahaja v žolčniku, želodčni gladki muskulaturi, pankreasu, perifernem živčnem sistemu, nekaj pa tudi v centralnem živčnem sistemu.[3] Sodeluje pri uravnavanju množice fizioloških procesov, kot so krčenje žolčnika, sproščanje Oddijevega sfinktra, stimulacija izločanja pankreatičnih sokov, sproščanje spodnjega sfinktra požiralnika, zaviranje praznjenja želodca in regulacija sitosti. Vloga CCK1R v centralnem živčnem sistemu ostaja nepoznana, vendar rezultati raziskav na živalih kažejo na vpletenost pri zaznavanju bolečinskih dražljajev in spomina/učenju. Gastrin preko aktivacije receptorja spodbuja izločanje želodčne kisline in rast želodčne sluznice. Študije na genetsko modificiranih miših kažejo, da bi inhibicija praznjenja želodca lahko bila fiziološka funkcija gastrina, medtem ko študije centralnega živčnega sistema dokazujejo, da je CCK2 receptor (CCK2R) pomemben pri uravnavanju spomina/učenja in pri odzivu na stres.[4] CCK2R je izražen predvsem v želodčni sluznici, endokrinem pankreasu in v možganih.[3]

Receptorja izkazujeta 48 % homologijo[4], razlikujeta pa se v afiniteti do vezave gastrina, distribuciji v telesu in molekularni strukturi. Endogeni ligand z največjo afiniteto do CCK1R je sulfatirani oktapeptid CCK-8, ki se veže na receptor s 500-1000 krat večjo afiniteto kot nesulfatirani CCK-8. Gastrin je pri fizioloških koncentracijah slab aktivator CCK1 receptorja. Njegova afiniteta je 100-500 krat nižja kot pri sulfatiranem CCK8. Študije so pokazale, da je sulfatiranje tirozina na mestu 2 odločilno za vezavo na CCK1R. CCK2R ima kar dva endogena liganda s približno enako afiniteto. To sta sulfatirani gastrin-17 in sulfatirani CCK-8. Nesulfatirani gastrin-17 izkazuje 3-10 krat nižjo afiniteto do receptorja kot sulfatirani.[5] Zdi se, da bi lahko bil negativni naboj (sulfat pri CCK in pentaglutamatni ostanek pri gastrinu) vpleten pri vezavi na CCK2 receptor. Behr in Béhé[6] sta preiskovala biodistribucijo dveh gastrinskih analogov s podobno polarnostjo in razliko v naboju. Izkazalo se je, da negativni naboj glutamatov skupaj s tetrapeptidno sekvenco na C-terminalnem koncu tvori kombinacijo za vezavo na CCK2R z visoko afiniteto in selektivnostjo.

Po obroku so koncentracije gastrina 5-10 krat višje kot holecistokinina, zato je sulfatirani gastrin-17 prednostni ligand in verjetno tudi fiziološki ligand za večino CCK2R na periferiji. Po drugi strani pa je CCK8 zaradi obilne prisotnosti v možganih po vsej verjetnosti ligand, ki

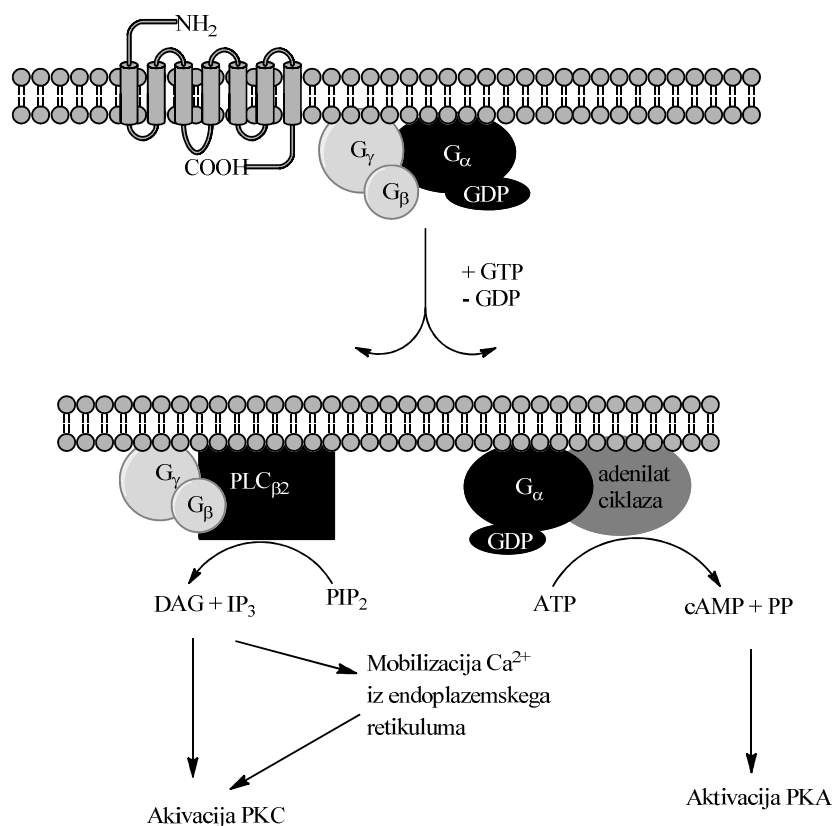
ponavadi aktivira CCK2R v možganih.[2] Najprej je prevladovalo mnenje, da sta gastrinski receptor v želodcu in CCK2R v možganih dva različna receptorja zaradi njune različne relativne afinitete za CCK in gastrin. Kasnejše raziskave so pokazale, da sta strukturno enaka. CCK2R se imenuje tudi gastrinski receptor.[5]

Oba CCK receptorja sodita v skupino s proteinom G sklopljenih receptorjev (GPCR). GPCR-ji so zasidrani v membrano s sedmimi hidrofobnimi α -vijačnicami, ki jih povezujejo 3 zunajcelične in 3 znotrajcelične zanke. N-terminalni del je zunaj celice, C-terminalni del pa v notranjosti celice. Prenos signala se začne z vezavo liganda (gastrina) na zunajcelično domeno receptorja.

Prva ključna informacija glede vezavnega mesta na CCK2R je bila identifikacija petih aminokislin v drugem ekstracelularnem zavoju, ki so se izkazale kot nujne za visoko afiniteto vezave gastrina na receptor. V nadaljnjih študijah so ugotovili, da je izmed teh aminokislin histidin bistven za prepoznavanje CCK in interakcijo s predzadnjim aspartatom v CCK. Poleg tega so odkrili veliko aminokislin in regij v transmembranskih vijačnicah IV in VI, ki interagirajo z amidiranim C-terminalnim fenilalaninom na CCK/gastrinu.[2]

Po vezavi liganda se receptor konformacijsko spremeni in omogočena je interakcija z bližnjim G-proteinom. To izzove spremembe, α -podenota G-proteina se aktivira. Od tu poteka prenos signala po različnih poteh, kar prikazuje slika 3:

- Fosfolipaza C- β /DAG/ Ca^{2+} /protein kinaza C: G-protein aktivira fosfolipazo C (PLC), ki hidrolizira fosfatidilinozitol bifosfat, pri čemer nastane inozitol trifosfat (IP_3) in diacilglicerol (DAG). Oba, tako IP_3 kot DAG, sprožita mobilizacijo kalcija iz znotrajceličnih zalog in spodbudita več izoform protein kinaze C (PKC). Mehanizem uravnavanja kalcija kot odgovor na aktivacijo CCK2R je še zelo slabo raziskan. Odkrili so hitro mobilizacijo znotrajceličnega kalcija, ki narašča do konstantnega platoja in nihanja v koncentraciji kalcija.
- Adenilat ciklaza/cAMP: Ta pot prenosa signala je prisotna samo pri receptorjih CCK1R. Pod vplivom G-proteina se aktivira adenilat ciklaza, ki generira cAMP. Ta deluje kot sekundarni obveščevalec.
- NO/cGMP
- Ostale poti.[2]



Slika 3: Shematski prikaz sedem transmembranskih domen z G-proteinom sklopljenega CCK receptorja in nastanka sekundarnega obveščevalca (preko adenilat ciklaze ali fosfolipaze C). Povzeto po viru [6].

Običajno se CCK2R po vezavi liganda internalizira. Fiziološko to vodi do razgradnje ali recikliranja internaliziranega receptorja na površini celice. Internalizacija je omejena na ligande z agonistično aktivnostjo (agoniste), medtem ko se internalizacija pri antagonistih pojavlja v manjšem obsegu. Internalizacija CCK2R se izkorišča kot način kopičenja in zadrževanja radioaktivno označenih analogov minigastrina v tumorskih celicah.[6]

1.3 IZRAŽANJE GASTRINSKIH RECEPTORJEV V TUMORJIH

Vedno več dokazov je, da CCK in gastrin delujeta preko svojih receptorjev kot rastna in invazivnostna faktorja. S tem spodbujata rast in napredovanje raka. V zadnjem času so te raziskave deležne velike pozornosti zaradi novih perspektiv na področju uporabe v diagnostiki in terapiji, kot je scintigrafija receptorjev, terapija tumorjev z radioaktivnimi ali citotoksičnimi analogi. Obenem je potrebno upoštevati dejstvo, da se lahko CCK receptorji izražajo v zgodnjih fazah razvoja raka, v poznejših fazah pa se to izražanje izgubi.[2]

Gastrinski receptorji (CCK2R) so fiziološko prisotni v številnih organih in tkivih, hkrati pa se je izkazalo, da so visoko izraženi v nekaterih tumorjih. Reubi[5] je s svojo skupino

identificiral nepričakovano visoko (več kot 90 %) pojavnost CCK2R v medularnem raku ščitnice (MTC). Že kmalu po letu 1970 so opazili izločanje kalcitonina iz živalske in človeške ščitnice kot odgovor na sistemsko administracijo gastrina.[6] Visoka občutljivost in specifičnost pentagastrin stimulacijskega testa, ki lahko potrdi pojav ali ponovitev MTC, kaže na prisotnost CCK2R na malignih parafolikularnih celicah (C-celicah) ščitnice, v katerih nastaja kalcitonin. S testi vezave, avtoradiografijo in RT-PCR so pokazali visoko izraženost teh receptorjev v MTC, njihovo odsotnost pri nemedularnih ščitničnih karcinomih kot tudi pri normalnih žlezah. Vendar pa zadnje raziskave kažejo na izražanje CCK2R tudi pri nemalighnih, normalnih C-celicah ščitnice.[2] V tem kontekstu so sklepali na prisotnost ščitnično-enterične osi in njeno pomembnost v uravnavanju kalcija. MTC izhaja iz malignih nediferenciranih parafolikularnih celic. Identificiral ga je Hazard leta 1959 kot klinično-patološki proces, ki je drugačen od ostalih diferenciranih rakov ščitnice, ki nastanejo iz tirocitov, kot tudi od drugih nediferenciranih rakov ščitnice. Klinično MTC pogosto ostane prikrit ali počasi napreduje. Odkrit je slučajno zaradi multinodularne golše ali pri bolnikih z vztrajno, od terapije neodvisno diarejo. Ponavadi tudi metastaze ostanejo klinično neopazne dolga leta, dokler se agresivnost MTC ne spremeni v hitrejšo metastazirajočo obliko z endokrino simptomatiko.[6] MTC predstavlja 3-12 % vseh rakov ščitnice. Približno 30 % bolnikov z MTC preživi 10 let, kar je brez dvoma slabše kot pri bolnikih z drugimi oblikami diferenciranih rakov ščitnice. Eden od glavnih razlogov za tako slabo stopnjo preživelosti pri tem tipu karcinoma ščitnice je dejstvo, da MTC ne akumulira radioaktivnega joda, kar naredi terapijo z radioaktivnim jodom pri bolnikih s tem tipom raka ščitnice neuporabno.[5]

Poleg visoke izraženosti CCK2R pri MTC so CCK2R potrdili še pri stromalnem raku jajčnikov (pojavnost je 100 %), astrocitomu (pojavnost je 65 %), meningiomu, endometrijskem in ovarijskem adenokarcinomu in karcinomu dojke. Občasno so izraženi tudi pri gastroenteropankreatičnih tumorjih.[5] Čeprav so zgodnje študije poročale o CCK2R pri raku želodca in debelega črevesa, nadaljnje raziskave niso uspele potrditi prisotnosti CCK2R z visoko afiniteto do liganda pri večini od teh tumorjev. Drobnocelični rak pljuč velikokrat izraža CCK2R (pojavnost je 89 %), medtem ko jih nedrobnocelični rak pljuč ne (pojavnost je manjša od 6 %).[5]

Aktivacija CCK2R prav tako uravnava proliferacijo celic imunskega sistema. Jasno je bilo določeno, da gastrin spodbuja rastne in z rastjo povezane gene pri človeških limfoblastnih Jurkat T celicah in levkemičnih celicah.[2]

Eno od področij, ki se poslužuje znanj o razširjenosti CCK2R pri posameznih tipih tumorjev in dejstva, da sta gastrin in holecistokinin fiziološka liganda za ta receptor, je radiofarmacija oziroma širše nuklearna medicina. Za lažje razumevanje te povezave in dejstva, da aplikativnost naše diplomske naloge sega na to področje, nuklearno medicino podrobneje predstavljamo v naslednjem poglavju.

1.4 NUKLEARNA MEDICINA

Nuklearna medicina je veja medicine, ki uporablja radioaktivne snovi (izotope). Cilj nuklearne medicine je odkriti in zdraviti patološki proces z radiofarmaki. Radiofarmaki spadajo med radiofarmacevtske izdelke, kamor uvrščamo še:

- radiofarmacevske predhodnike,
- komplete za pripravo radiofarmakov in
- radionuklidne generatorje.

Radiofarmaki so radiofarmacevtski izdelki, ki jih vnašamo v človeški organizem in vsebujejo enega ali več radionuklidov (radioaktivnih izotopov). Glede na namen uporabe jih delimo na radiodiagnostike in radioterapevtike. Radioaktiven izotop dobimo iz radionuklidnega generatorja. To je sterilni sistem, ki vsebuje trdno vezan starševski radioaktivni izotop, iz katerega nastaja potomčev izotop, ki ga lahko odstranimo z izpiranjem (eluiranjem) ali z drugo primerno metodo. Eluat se uporablja neposredno kot radiofarmak ali kot radiofarmacevtski predhodnik. V večini primerov je komplet za pripravo radiofarmaka liofilizat določene učinkovine ali pomožne snovi v sterilnih in apirogenih vialah, kateremu ob pripravi na nuklearno-medicinskem oddelku bolnišnice dodamo raztopino radioaktivnega izotopa (radiofarmacevtskega predhodnika).

Izotopi so atomi istega elementa, ki se razlikujejo po masnem številu in imajo enako vrstno število (v jedru imajo isto število protonov, razlikujejo se po številu nevtronov). Izotopi z nestabilnimi jedri (vsebujejo nestabilno razporeditev protonov in nevtronov) razpadajo oziroma spontano prehajajo v stabilnejša stanja z oddajanjem α - oziroma β -delcev in/ali elektromagnetnega valovanja. Po razpadu nastane nov izotop istega elementa, katerega jedro je lahko stabilno ali nestabilno. Nestabilno jedro razpada toliko časa, dokler ne doseže stabilne oblike, ki je zadnji člen v verigi radioaktivnega razpada elementa. Takim izotopom pravimo, da so radioaktivni in jih imenujemo radionuklidi. V nuklearni medicini se uporabljajo predvsem radioaktivni izotopi, ki razpadejo v stabilen izotop ali v izotop z zelo dolgo razpolovno dobo.

V nuklearni medicini se največ uporabljajo gama- in beta-sevalci. V primeru γ -sevanja vzbujeno jedro z oddajo fotona γ preide v manj vzbujeno oziroma v osnovno stanje. Sestava jedra se ne spremeni, zmanjša se samo njegova notranja energija. γ -žarki imajo zelo dolg doseg v zraku in tkivu. Gostota nastalih poškodb na njihovi poti je najmanjša, zato jih uporabljamo v diagnostične namene (radiodiagnostiki). β -sevanje je z razliko od γ -sevanja masno sevanje. Poznamo dve vrsti β -sevanja, to sta sevanje β^+ in β^- . Delci β imajo doseg v zraku približno 10 cm in v tkivu nekaj mm, gostota nastalih poškodb na njihovi poti je velika, vendar mnogo manjša kot pri delcih α . Uporabljamo jih v terapevtske namene (radioterapevtiki).

Radioaktivnost je naravni pojav, pri katerem nekatera atomska jedra razpadajo. Ob tem sproščajo energijo v obliki elektromagnetnega valovanja ali materialnih delcev. Radioaktivnost je definirana kot število razpadov v enoti časa. Mednarodna enota za radioaktivnost je Bq (becquerel). Bq je 1 razpad v sekundi. Ker je Bq majhno merilo za podajanje aktivnosti, to ponavadi podajamo v MBq (10^6 Bq) ali GBq (10^9 Bq). Včasih uporabljamo enoto Ci (Curie), kjer je 1 Ci aktivnost 1 g ^{226}Ra oziroma je 1 Ci enak $3,7 \times 10^{10}$ Bq.[7]

Z radioaktivnimi snovmi ne more operirati vsak. V prostore, ki so namenjeni izvajanju sevalne dejavnosti lahko, po Pravilniku o obveznostih izvajalca sevalne dejavnosti in imetnika virov ionizirajočih sevanj, vstopijo samo osebe, ki so seznanjene s tveganjem povezanim z delom, imajo ustrezno znanje o zaščitnih ukrepih varstva pred sevanji, so seznanjene s pisnimi navodili za delo, so na podlagi zdravniškega pregleda sposobne opravljati dela in naloge, kjer je prisotno sevanje in so vključene v osebno dozimetrijo.[8]

Zaradi negativnih učinkov sevanja (poškodba dednega materiala) mora biti uporaba radioaktivnih izotopov upravičena glede na pričakovane rezultate. Uporabljajo se čim manjše doze sevanja, tako majhne, kot je to smiselno doseči, kar imenujemo optimizacija doze sevanja. Pred zunanjo obsevanostjo se je mogoče zaščititi z omejitvijo časa izpostavljenosti, z delom na čim večji razdalji od vira sevanja in uporabi ščitov, ki oslabijo sevanje.[9]

Prednost diagnostičnih pristopov v nuklearni medicini pred ostalimi radiološkimi postopki, kot na primer slikanje z magnetno resonanco (MG) ali računalniško tomografijo (CT), je prikaz biokemičnega procesa. Pri MG in CT dobimo podatke o morfoloških značilnostih.[6]

Slikovni tehniki, ki se uporabljata v nuklearni medicini, sta pozitronska emisijska tomografija (PET) in eno-fotonska emisijska računalniška tomografija (SPECT). Pri PET-u uporabljamo kratko živeče beta-/pozitrone-sevalce (β^+). Izsevani pozitron na svoji poti praktično takoj

sreča svoj antidelec elektron. Pozitron in elektron se izničita (anihilirata), pri čemer nastaneta dva nasprotno usmerjena γ -fotona z energijo 511 keV. PET skener zaznava to sevanje in ga prevede v sliko z visoko ločljivostjo. V primeru slikanja s SPECT gre za zaznavanje direktno oddanih γ -žarkov iz gama-sevalca, ki je del apliciranega radiofarmaka.[5]

Kombinaciji SPECT/CT in PET/CT sta dokaj novi možnosti slikanja. PET/CT je medicinsko slikovna naprava, ki združuje pozitronsko emisijsko tomografijo in rentgensko-računalniško tomografijo, tako da lahko slike, posneti zaporedoma v isti seji na bolniku, sestavimo v eno samo nadgrajeno sliko. Na ta način so lahko slike pridobljene s PET (SPECT), ki prikazujejo prostorsko razporeditev presnove ali biokemične aktivnosti v telesu, bolj natančno usklajene in povezane z anatomsko sliko pridobljeno s CT.[10]

Tako za radiodiagnostiko kot tudi za radioterapijo je na voljo veliko različnih radionuklidov. ^{99m}Tc se velikokrat uporablja pri slikanju s SPECT zaradi njegovih idealnih fizikalnih značilnosti ($t_{1/2}^1 = 6 \text{ h}$, $E_\gamma = 140 \text{ keV}$) in dostopnosti ($^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}$ generator). Razpolovna doba je dovolj dolga za sintezo s ^{99m}Tc označenega radiofarmaka, ustrezno kontrolo kvalitete in izvedbo slikanja in obenem dovolj kratka za nizko izpostavljenost bolnika sevanju. Tudi ^{111}In pogosto uporabljamo kot radionuklid v radiofarmaku. Glede na njegov razpolovni čas 2,8 dni, lahko slikanje izvedemo s časovnim zamikom. Pomemben je tudi za študijo dozimetrije, saj služi kot surogat za beta-sevalec ^{90}Y . ^{123}I kot natrijev jodid lahko služi za slikanje ščitnice ali vezan v posameznih drugih radiofarmakih za množico različnih preiskav.[5, 6]

^{18}F je pomemben izotop pri slikanju s PET skenerji. Najpogosteje uporabljen ^{18}F označen radiofarmak je 2-fluoro-2-deoksi-D-glukoza (FDG). Za pridobivanje ^{18}F potrebujemo pospeševalnik (ciklotron).

V zadnjih letih se povečuje uporaba ^{68}Ga kot radionuklida pri PET. Ker je primeren za kompleksacijo z bifunkcionalnim kelatorjem DOTA (glej poglavje 5.2), se uporablja kot radionuklid izbora pri diagnostiki nevroendokrinih tumorjev (z ^{68}Ga označeni analogi somatostatina).[5]

Pri peptidno-receptorski radionuklidni terapiji (PRRT) potrebujemo radionuklide z visokim citotoksičnim potencialom. Dobra citotoksična sredstva so sevalci β -delcev. Tisti z visoko energijo, kot je ^{90}Y , so primerni za terapijo večjih tumorjev, medtem ko so radionuklidi z manjšo energijo, na primer ^{177}Lu ali ^{131}I , ustrenejši za zdravljenje manjših metastaz.[5, 6]

¹ Razpolovna doba radioaktivnega izotopa

Tabela I: Najpogostejše uporabljeni radionuklidi v radioterapiji in radiodiagnostiki

Radionuklid	Razpolovna doba ($t_{1/2}$) (h)	Energija (keV)
^{99m}Tc	6	γ 140
^{111}In	67	γ 171, 245 auger e^- 2-30
^{18}F	1,8	β^+ 634 γ 511
^{68}Ga	1,1	β^+ 1899 γ 511
^{131}I	192	β^-_{max} 606 γ 363
^{90}Y	65	β^-_{max} 2964
^{177}Lu	161	β^-_{max} 498 γ 113208
^{123}I	13	γ 159

Radiofarmak, tako radiodiagnostik kot tudi radioterapevtik, naj bi imel dokaj hiter plazemski očistek, vendar še vedno takšen, da bi omogočal razporeditev po tarčnem organu. Ves nevezan radiofarmak pa naj bi se hitro izločil iz telesa, tako da je radioaktivnost lokalizirana samo v tarčnem organu. Pri tradicionalnih zdravilih ni problem, če se zdravilna učinkovina porazdeli tako po tarčnem kot po netarčnem organu, vsaj tako dolgo ne, dokler obstaja biološki učinek v tarčnem organu. Pri radiofarmakih pa to ni zaželeno, ker bi kopičenje v ostalih organih povzročilo nizko razmerje tarča-ozadje oziroma signal-šum. Prav to razmerje je ključno in osrednjega pomena za razvoj idealnega radiofarmaka:

- V smislu kinetike vezave na tarčni organ/tkivo naj bi radiofarmak s tarčno molekulo interagiral z visoko afiniteto. Tarčna molekula naj bi bila visoko izražena v tkivu z namenom podpiranja vezave radiofarmaka na tarčo tudi v razmeroma nizkih koncentracijah v ekstracelularnem prostoru tarčnega tkiva.
- Nespecifična vezava naj bi bila minimalna, saj predstavlja glavni vir ozadja (šuma). Močno je odvisna od kemijskih značilnosti samega radiofarmaka. Zelo lipofilna spojina se bo na primer kopičila v jetrih in s tem povzročila povišano raven radioaktivnosti v netarčnem organu. Drug takšen problem je vezava na plazemske proteine, saj dobimo visok nivo aktivnosti v krvnem obtoku.

- Kritična je tudi stabilnost same spojine (njena integriteta). Radiofarmak mora ostati neokrnjen ustrezno dolgo. Aktivnost mnogih faktorjev (encimov) v plazmi lahko povzroči razgradnjo spojine in posledično nastanek radioaktivnih metabolitov z drugačnimi lastnostmi, kot jih je imela prvotna spojina. Posledično lahko dobimo drugačno porazdelitev po telesu in celo izgubimo afiniteto do tarče.
- Poleg stabilnosti same nosilne molekule je pomembno tudi, da radioaktivni izotop ostane več čas vezan na to molekulo. Nekatere spojine, označene z radioaktivnim jodom, so na primer nagnjene k dejodaciji.
- Kapilarna permeabilnost naj bila visoka, da bi omogočila radiofarmaku hitro doseganje ekstracelularnega prostora. To običajno lažje dosežemo pri molekulah z nižjimi molskimi masami (peptidi vs. proteini).
- Plazemski očistek, kot je bilo že prej omenjeno, mora biti hiter. Spojina naj bi bila prisotna v plazmi dovolj dolgo, da zagotovi ustrezno razpoložljivost tarčnemu organu, ampak naj bi se potem hitro izločila.
- Pot izločanja nevezanega radiofarmaka ne sme vplivati na prikaz radioaktivnosti v tarčnem organu. Glavne poti izločanja so preko urinarnega trakta in hepatobiliarnega sistema. Renalna eliminacija je primernejša, ker je hitrejša, poleg tega pa se lahko velika količina radioaktivnosti izloči preko urina. Izločanje preko jeter lahko povzroči kopičenje radioaktivnosti v gastrointestinalnem traktu.

V zadnjem času je moč opaziti velik napredek v razvoju radioaktivno označenih peptidov (radiopeptidov). Napredek v kemiji peptidov, ki je omogočil načrtovanje peptidov, analizo strukture in sintezo dostopno, je v veliki meri prispeval k njihovi uporabi.[11]

1.5 RAZVOJ RADIOPEPTIDOV ZA CILJANJE GASTRINSKEGA (CCK2) RECEPTORJA

Gastrin je endogeni ligand za regulatorne receptorje, CCK2 receptorje, ki so visoko izraženi v nekaterih tumorjih. Gastrin je majhen peptid in z lahkoto prehaja v vsa tkiva, razen v možgane, ker je preveč hidrofilen, da bi lahko prečkal hematoencefalno bariero. Zato centralni živčni sistem in periferija tvorita dva različna regulatorna sistema, ki uporabljata isto signalno molekulo brez nevarnosti za interakcijo med obema. Specifično vezavo gastrina na CCK2 receptor lahko izkoristimo za označevanje gastrina in njegovih analogov z radionuklidi in uporabo teh peptidov kot dostavnih sistemov, ki prenesejo radioaktivnost do tkiv, kjer so izraženi specifični receptorji za gastrin (slika 4).



Slika 4: Shematičen prikaz radiofarmaka z vektorsko molekulo (gastrinski motiv), distančnikom in bifunkcionalnim kelatorjem, ki kompleksira radioaktivni izotop.

1.5.1 PREDKLINIČNI RAZVOJ LIGANDOV GASTRINSKEGA RECEPTORJA

Opravljenih je bilo že veliko raziskav na področju razvoja ustreznega radiopeptida za ciljanje CCK2 receptorja *in vivo*. Veliko raziskovalnih skupin je sintetiziralo raznolike radiooznačene gastrinu podobne peptide in jih okarakteriziralo. Vsi ti peptidi so imeli enako C-terminalno tetrapeptidno sekvenco Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, ki je bistvena za vezavo na receptor, čeprav lahko metionin zamenjamo tudi z levcinom ali norlevcinom. V poznih devetdesetih je Behr s sodelavci[6] dobil obetajoče rezultate na področju diagnostike in terapije z ¹³¹I označenim človeškim gastrinom-1. Ta sintezni peptid, sestavljen iz sedemnajstih aminokislin, je izkazoval afiniteto do CCK2R v nizkem nanomolarnem območju, do CCK1R pa za vsaj štiri velikostne razrede nižjo. Na N-terminalnem koncu ga je piroglutamat ščitil pred hitro encimsko razgradnjo. Slaba stran radiojodiranih peptidov je hitra odcepitev joda iz peptida po internalizaciji v lizosomu celice. Mono- in di-jodotirozine celica naglo izloči. Za razliko od radiojodiranih tirozinov se aminokislina z vezanim bifunkcionalnim kelatorjem ujamejo v lizosom in ne morejo zapustiti celice.

Kot osnovo za razvoj z ¹¹¹In označenih ligandov za ciljanje CCK2R sta Béhé in Behr[6] izbrala minigastrin (Leu-Glu₅-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) in njegov D-Leu analog. Izkazalo se je namreč, da zamenjava L-Leu z D-izomerom vodi do večje serumske stabilnosti. Pripravila sta DTPA derivate minigastрина in njegovega D-Leu analoga, vendar med njima nista opazila signifikantne razlike.

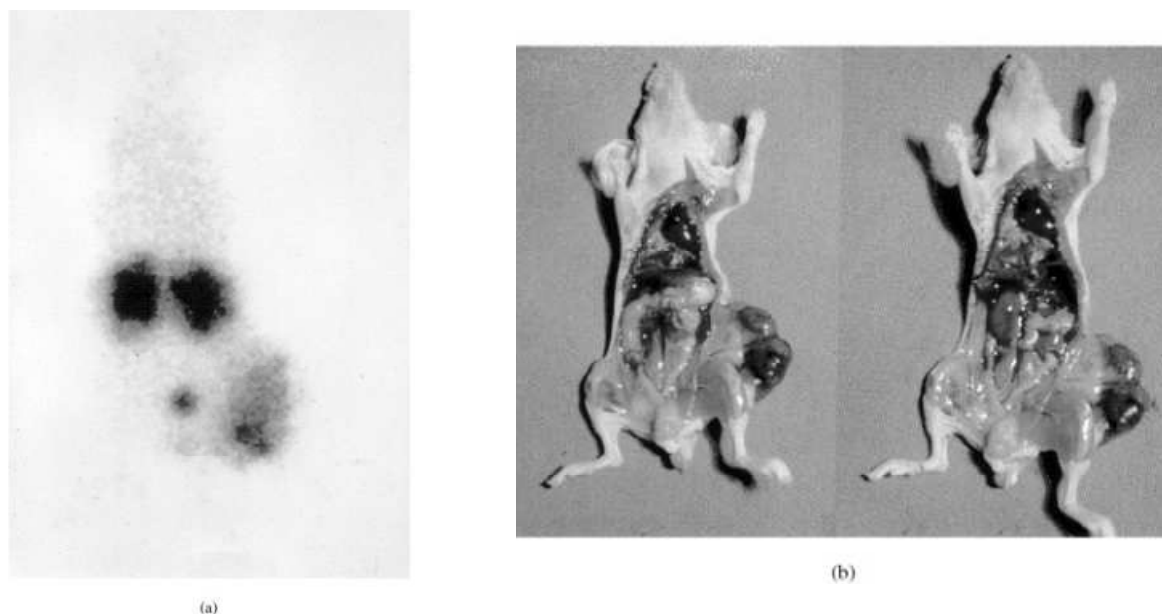
Študijo biodistribucije z ¹¹¹In-DTPA-minigastrinom sta Béhé in Behr[6] izvedla na golih miših¹ s TT² ksenograftom. Biodistribucijo izbranega analoga prikazuje slika 5. ¹¹¹In-DTPA-

¹ »Gole miši« je vzdevek in prevod za t.i. »nude mice«, ki so laboratorijske miši z gensko mutacijo, ki povzroči, da so brez timusa in posledično brez limfocitov T, kar omogoči, da pri vsaditvi ksenografta ne pride do zavrnitvene reakcije.

² TT je celična linija humanega medularnega karcinoma ščitnice.

minigastrin je pokazal maksimalen privzem v tumor do 5 % ID/g že po eni uri, kot tudi dober privzem v sluznico želodca. Izkazoval je hiter očistek iz krvi in organov (pljuča, jetra, vranica, mišice in kosti). Izločanje je bilo po večini renalno z maksimalnim privzemom v ledvica 45 % ID/g. Aciklični kelator DTPA je pokazal zadostno serumsko stabilnost za indij, vendar ne za ostale potencialno terapevtske radionuklide. Kot odlična alternativa DTPA so se izkazali makrociklični kelatorji. Za razliko od DTPA 1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraocetna kislina (DOTA) ali 1-(1-karboksil-3-karboksil-propil)-1,4,7,10-tetraazaciklododekan-4,7,10-trioctna kislina (DOTAGA) ponujata visoko stabilnost in na ta način signifikantno preprečujeta dekompleksacijo širokega spektra radioaktivnih izotopov: ^{111}In , $^{86/90}\text{Y}$, $^{67/68}\text{Ga}$, $^{64/67}\text{Cu}$. [3] To je razlog, zakaj je DOTA najpogosteje uporabljen bifunkcionalni kelator za terapijo z radiopeptidi. Slabost DOTA-e je občutljivost na kovinske nečistote. Poleg tega pri označevanju zahteva segrevanje, kar potencialno ogroža strukturo peptida. [6]

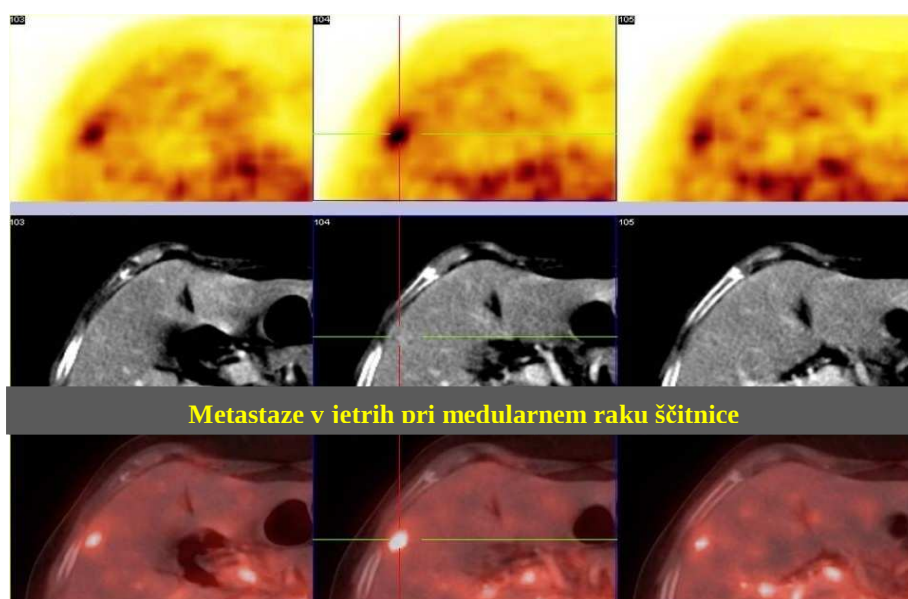
Pri nadaljnjem razvoju DTPA-konjugiranih analogov minigastrina sta Béhé in Behr [6] prvo aminokislino minigastrina zamenjala z D-Glu, na peptid pripela benzilizotiocianatni derivat DTPA in ga označila z ^{111}In oziroma ^{90}Y . DTPA-D-Glu-minigastrin je v primerjavi z DTPA-minigastrinom imel boljšo biokemijsko stabilnost in sta ga zato izbrala za nadaljnjo raziskavo. Prednost konjugacije DTPA s peptidom preko izotiocianata je v tem, da ima končna spojina na voljo pet karboksilnih skupin za kompleksacijo kovine in ne samo štiri, kot je to pri DTPA, direktno vezanim na peptid. Dodatna karboksilna skupina lahko zagotovi boljšo stabilnost kelirajoče radioaktivne kovine, na primer ^{90}Y , za katerega je znano, da tvori precej nestabilne komplekse z DTPA konjugiranim peptidom. [5] DTPA-D-Glu-minigastrin sta testirala za terapevtske namene. Delo na celičnih kulturah je privedlo do spoznanja, da je ta ligand kmalu po vezavi na receptor podvržen internalizaciji. Ponovno sta izvedla biodistribucijske študije na golih miših s ksenotransplantiranim MTC. Golim mišim sta injicirala različne radiopeptide, kontrolna skupina pa ni prejela ničesar. Opazovala sta miotoksičnost, toksičnost za ostale organe in rast tumorja. Ledvica so se izkazala pri vseh radiopeptidih za organ, ki omejuje dozo sevanja. Pri α - in β -sevalcih so doze, večje od 90 Gy, ki so jih prejela ledvica, povzročile akutno, večje od 60 Gy pa kronično radiacijsko nefropatijo. Sevalci Auger elektronov (kot je ^{111}In) imajo približno za polovico manjše mejne vrednosti. Gastrointestinalne oblike sevalne bolezni pri β -sevalcih ni bilo opaziti, medtem ko so Auger elektron in α -sevalci povzročili hemoragični gastritis. Pri enaki dozi so bili sevalci z večjo energijo (Auger elektroni in α -delci) signifikantno terapevtsko bolj učinkoviti od β -sevalcev. [6]



Slika 5: Biodistribucija ^{111}In -DTPA-minigastrina. (a) Scintigrafija golih miših s TT ksenograftom 1 uro po injiciranju ^{111}In -DTPA-minigastrina. (b) Ista žival po seciranju.[6]

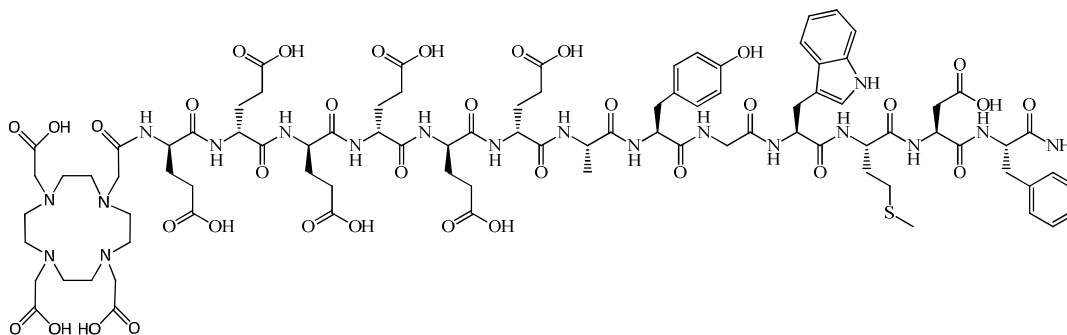
Nock in sodelavci[12] so pripravili tri s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ označene minigastrinske analoge z acikličnim tetraaminom, vezanim direktno na minigastrin ali preko različnih distančnikov. Problem je bil privzem v ledvica, ki so ga zmanjšali s ko-injiciranjem peptidov s poliglutamatno sekvenco. Naslednja raziskovalna skupina je nameravala razviti radiopeptid, ki bi imel relativno visok privzem v tumor in majhno zadrževanje v ledvicah. Pripravili so knjižnico DOTA- in DTPA-peptidov, ki so imeli za osnovo C-terminalni del minigastrina. Za najbolj obetavnega se je izkazal DOTA analog z dvema histidinoma namesto pentaglutaratnega zaporedja, vendar je radiooznačevanje v tem primeru zahtevalo segrevanje na 100 °C in posledično je prišlo do oksidacije metionina. Za razliko od preteklih ugotovitev je zamenjava metionina z norlevcinom vodila do zmanjšane afinitete do receptorja *in vitro* in privzema v tumor *in vivo*. Odstranitev pentaglutaratne sekvence se je odražala v močno zmanjšanem privzemu v ledvica iz 60 % na 3% ID/g, hkrati pa se je zmanjšal tudi privzem v tumor za faktor 3. Na podlagi teh rezultatov so povezali zadrževanje v ledvicah z negativnim nabojem glutamatov. Do podobnih spoznanj je prišel tudi Good[3], ko je primerjal DTPA-D-Glu-minigastrin z in brez pentaglutaratnega zaporedja. Pristop k okrnjenim analogom minigastrina je dejansko v študijah biodistribucije na izbranem živalskem modelu vodil k izboljšanem razmerju tumor/ledvica, vendar pa se je obenem pojavil problem nizke metabolične stabilnosti, kar hkrati pomeni, da so takšni analogi minigastrina slabi kandidati za klinično uporabo.[5, 13]

Zadrževanje radiopeptida v ledvicah lahko bistveno zmanjšamo s ko-injiciranjem poliglutaminskih kislin ali plazma ekspanderja na osnovi želatine. Alternativni pristop k zmanjšanju zadrževanja radioaktivnosti v ledvicah pa je seveda sprememba strukture molekule kot take, t.j. sinteza novih analogov minigastrina. S tem namenom so Peitl in sodelavci[10, 14] sintetizirali analoge minigastrina z različnimi distančniki do bifunkcionalnega kelatorja DOTA. Obdržali so C-terminalni del, ki je odgovoren za vezavo na receptor in zamenjali pentaglutamatno zaporedje z neionskimi distančniki, kot so dPEG_n in D-izomeri različnih aminokislin, za katere je znano, da v izbranih primerih zvišajo metabolično stabilnost. Vsako spojino so označili z radioaktivnim izotopom ¹¹¹In. Za študijo biodistribucije na živalskem modelu so izbrali kandidate, ki so izkazovali najboljše lastnosti v *in vitro* testiranjih. Študijo so izvedli z ¹¹¹In označenima analogoma z različno dolžino neionskih D-Gln distančnikov (D-Gln₃ in D-Gln₆) in ju primerjali z analogom z ionskim, L-Glu₆, distančnikom. Pokazali so, da je zadrževanje radiofarmaka v ledvicah signifikantno zmanjšano v primeru izbranih analogov z neionskim distančnikom in da se posledično razmerje tumor/ledvica izboljša za faktor 30. Analog z D-Gln₆ distančnikom, označen z ⁶⁸Ga, so uporabili kot spojino izbora za zgodnjo humano uporabo na pacientu z MTC (slika 6), vendar so potrebne nadaljnje klinične študije, ki bodo pokazale, če izboljšano razmerje tumor/ledvica ni značilno samo za izbrani živalski model, temveč velja tudi za človeka.[10, 14]



Slika 6: PET/CT CCK2 receptorja medularnega raka ščitnice v primeru metastaz v jetrih 70 min po injiciranju z ⁶⁸Ga označenega minigastrinskega analoga z distančnikom iz šestih D-Gln. Prva vrsta prikazuje slikanje s PET, druga s CT in tretja je kombinacija obeh. Povzeto po viru [14].

V primerjalni študiji, ki je potekala v okviru COST projekta BM0607, kjer so primerjali najboljše analoge iz različnih evropskih laboratorijev, je bil minigastrinski analog z D-Glu₆ distančnikom-PP11 (slika 7) ocenjen kot najbolj obetajoč in se z njim načrtuje klinična študija, ki bo pokazala, če je ta spojina dejansko primerna tudi za PRRT.[13]



Slika 7: Strukturna formula najbolj obetavnega kandidata v okviru COST projekta minigastrinskega analoga z D-Glu₆ PP11[10].

1.5.2 KLINIČNE ŠTUDIJE Z GASTRINSKIMI ANALOGI

Petim zdravim prostovoljcem sta Béhé in Behr s sodelavci[6] injicirala ¹¹¹In-DTPA-minigastrin in/ali njegov D-Glu derivat. Skladno s predkliničnimi raziskavami so minigastrin opazili v tkivih, kjer se fiziološko nahaja CCK2R. Privzem je bil omejen na želodec kot organ z največjim fiziološkim izražanjem CCK2R, kot tudi na ledvica kot organ izločanja. Manjši privzem so opazili v žolčniku in tkivu dojke pri premenopavzalnih ženskah. Kot je bilo za pričakovati iz predkliničnih raziskav, gre glavna pot izločanja ¹¹¹In-DTPA-minigastrina preko ledvic, nekaj pa se ga izloči tudi z žolčem.[6]

Behr in sodelavci so konec 90. let predstavili pilotno klinično študijo z ¹¹¹In-DTPA-D-Glu-minigastrinom na štirih bolnikih z MTC. CCK2R je bil prisoten v tkivih, kjer se receptor fiziološko izraža, kot tudi v metastatskih MTC lezijah. 3 leta kasneje pa sta Behr in Béhé objavila klinično študijo z istim analogom minigastrina, v katero je bilo vključenih 75 bolnikov z MTC. Injicirali so 185-259 MBq ¹¹¹In-DTPA-D-Glu-minigastrina in izvedli slikanje celotnega telesa v več časovnih točkah po injiciranju. Opazili so fiziološki privzem v želodec in ledvica kot pri zdravih prostovoljcih. Pri bolnikih z znano boleznijo so vse tumorje, ki so jih že pred tem odkrili z običajnimi slikovnimi metodami, zaznali že po eni uri, čeprav je optimalni čas slikanja 24 ur po injiciranju. Pri kar 29 od 32 bolnikov z okultno (prikrito) obliko MTC so odkrili vsaj eno lezijo. Privzem v jetra in vranico je bil zelo nizek.[5, 6]

Pri osmih bolnikih s hitro napredujočim metastatskim MTC so poskusili z visokimi dozami z ^{90}Y označenim DTPA-D-Glu-minigastrinom. Trije bolniki, ki so prejeli najnižje odmerke aktivnosti, niso kazali nobenih znakov toksičnosti. Vsi trije bolniki, zdravljeni z $1,48 \text{ GBq/m}^2$, so razvili prehodno in blago hematološko toksičnost. Eden od obeh bolnikov zdravljenih z $1,85 \text{ GBq/m}^2$ je razvil prehodno trombocitopenijo 4. stopnje in nefrotoksičnost 1. stopnje. Štirje bolniki so doživeli stabilizacijo sicer hitro napredujočega medularnega raka ščitnice. Vendar sta dva bolnika razvila resno ledvično odpoved 1-2 leti po radioterapiji. Čeprav so bili terapevtski učinki ^{90}Y -DTPA-D-Glu-minigastrina obetajoči, je bila toksičnost za ledvica preresna.[5, 6]

Klinične študije z ^{111}In -DTPA-D-Glu-minigastrinom so delale tudi druge raziskovalne skupine. Gotthardtova je opazila 87 % stopnjo detekcije pri scintigrafiji z izbranim analogom minigastrina na 26 bolnikih z MTC. Večina teh bolnikov je imela znane metastaze, vendar so tumorske lezije opazili samo pri enem iz skupine pacientov z okultno obliko bolezni.[5]

Pred kratkim je Fröberg s sodelavci prikazal [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] $_{2}\text{N}_4\text{-Gly-D-Glu-minigastrin}$ kot najbolj obetavnega kandidata za diagnostiko MTC. Z njim je bilo mogoče opaziti vse znane lezije pri šestih bolnikih z MTC, pri štirih bolnikih pa so odkrili nove lezije v možganih, kosteh, vratu in jetrih.[5]

1.6 IZLOČANJE RADIOPEPTIDOV

Kot je že bilo omenjeno, je eliminacija skozi ledvica ponavadi glavna pot izločanja radiopeptidov, ker zagotavlja hitro eliminacijo radioaktivnosti iz telesa. Na ta način je skupna absorbirana doza na bolnika zmanjšana, kar je zlasti pomembno pri radioterapiji. Problem, ki se pojavi pri izločanju skozi ledvica, je podaljšano zadrževanje radioaktivnosti v njih. V ledvicah se po glomerulni filtraciji del filtrata reabsorbira nazaj v proksimalnih tubulih. Na ta način so ledvica izpostavljena relativno visokim radiacijskim odmerkom. Pri bolnikih in na živalskih modelih so opisali akutne in kronične poškodbe ledvic.[15]

Radiacijska nefropatija je dobro poznan problem pri zunanjem obsevanju. Edina znaka bolezni sta izolirana hipertenzija in asimptomatska proteinurija. Akutna radiacijska nefropatija se odraža v proteinuriji, hipertenziji, srčni odpovedi, azotemiji in anemiji in se razvije 6 do 12 mesecev po izpostavitvi sevanju. Lahko je reverzibilna ali pa napreduje do kronične radiacijske nefropatije. Kronična se lahko prav tako razvije po nekaj letih po obsevanju in se kaže v izgubi mase in funkcije ledvic. Malo pa je podatkov o nefrotoksičnosti povzročeni pri radioterapiji. Pri pacientih so opisali akutno radiacijsko nefropatijo, ki se je

razvila 6 mesecev po terapiji z ^{90}Y -oktreotidom (7,4 GBq na kvadratni meter), kot tudi kronično nefropatijo po PRRT z ^{90}Y -somatostatinom in ^{90}Y -gastrinom.[16]

Molekule z molsko maso manjšo od 12 kDa se prosto filtrirajo skozi pore glomerulne membrane, medtem ko se večje molekule z molsko maso večjo od 70 kDa filtrirajo samo v zelo majhnem odstotku. Majhne molekule, ki so vezane na večje transportne proteine, kot je albumin, ne bodo prestopile glomerulne membrane. Večina radiopeptidov, med njimi tudi minigastrin, je manjših od 12 kDa in ni vezana na proteine, zato se lahko v glomerulu prosto filtrirajo.[16] Po glomerulni filtraciji se proteini in peptidi v ultrafiltratu vežejo na receptorje na luminalni površini celic proksimalnega tubula in se internalizirajo. Nato se prenesejo do lizosomov, kjer poteče proteolitična razgradnja do aminokislin. Te zapustijo celice preko bazolateralne membrane in se vrnejo v kri. Preostali bifunkcionalni kelator z radionuklidom ostane ujet v lizosomu celic tubulov. S tem glomerule in ledvične tubule izpostavlja visokim dozam sevanja.[15, 17]

Pri tubularni reabsorpciji naj bi pomembno vlogo igral 660 kDa velik transmembranski LDL receptor megalin. Megalin ima štiri velika, s cisteinom bogata vezavna mesta in omogoča reabsorpcijo strukturno nepovezanih proteinov in peptidov, kot so albumin, β_2 -mikroglobulini in aprotinin. De Jong s sodelavci je poročal o signifikantno manjšem privzemu ^{111}In -oktreotida na živalskem modelu, pri katerem so odstranili megalin v primerjavi z divjo različico. Vegt s sodelavci je na podobnem živalskem modelu dokazal to tudi za minigastrin. V ex vivo biodistribucijski študiji je pri živalskem modelu brez megalina prikazal za 74 % manjši privzem v ledvica kot pri živalih z megalinom.[15]

Raziskanih in odkritih je bilo že veliko različnih pristopov z namenom izogniti se zadrževanju radiopeptidov v ledvicah. Že v sedemdesetih letih so opisali inhibicijo tubularne reabsorpcije s ko-administracijo pozitivno nabitih aminokislin. Sedem let kasneje so poročali o zmanjšanem privzemu somatostatina v ledvica ob prisotnosti lizina in arginina.[16] Vendar lahko bazične aminokislone vodijo do stranskih učinkov, kot so slabost, hiperkaliemija, aritmije in celo nefrotoksičnost.[15] Privzem v ledvica se pri minigastrinu ni zmanjšal s hkratno infuzijo lizina. Béhé je s sodelavci ugotovil, da negativno nabita veriga najmanj petih glutaminskih kislin zmanjša privzem minigastrina v ledvica za do 90 %. Pri tem je ostal privzem v ostale organe in tumorje nespremenjen.[18] Vegt s sodelavci meni, da je to posledica štirih vezavnih domen na megalinu. Lizin in poliglutaminska kislina naj bi se selektivno vezala na različna vezavna mesta in s tem vplivala na vezavo samo določenega radiopeptida, tistega, ki se veže na isto vezavno domeno kot izbrana aminokislina. Lizin tako

vpliva samo na vezavo in privzem somatostatina, poliglutaminska kislina pa na minigastрина, medtem ko na privzem somatostatina nima nobenega vpliva.[16]

Gelofuzin, derivat želatine, ki je sestavljen iz mešanice peptidov dobljenih iz kolagena, je v različnih študijah učinkovito zmanjšal tubulno reabsorpcijo oktreotida, minigastрина, bombezina in eksendina.[16, 19, 20] Je dobro znan, pogosto uporabljen plazma ekspander, ki inhibira reabsorpcijo večine radioaktivno označenih peptidov.[19] Ta lastnost je verjetno posledica vezave gelofuzina na dve ali več različnih domen na megalinu. S tem se zmanjša vezava in reabsorpcija številnih radiooznačenih peptidov. Podobno Vegt domneva tudi za albumin, kot naravni substrat za megalin, in njegove fragmente.[15] V raziskavi na živalskem modelu so fragmenti albumina (FRALB) signifikantno zmanjšali privzem oktreotida, eksendina in minigastрина v ledvici. Najbolj učinkoviti so bili FRALB z molsko maso med 3 in 50 kDa.[17]

1.7 METABOLNA STABILNOST

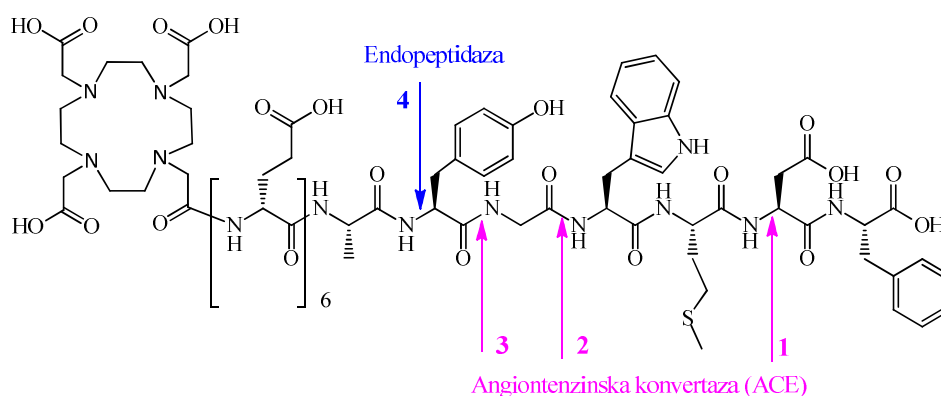
Kot je že omenjeno, minigastrianski analogi kažejo boljše razmerje tumor/ledvica, če odstranimo nekaj glutamatnih ostankov, vendar se s tem zmanjša encimska stabilnost v serumu. Ta ugotovitev kaže na pomembnost dolžine distančnika in kemijske strukture ne samo na privzem v ledvica, ampak tudi na serumsko stabilnost.[14] Serumsko stabilnost lahko izboljšamo na več načinov, na primer z zamenjavo L-aminokislin z D-aminokislinami, N-metiliranjem, ciklizacijo in uporabo peptidomimetikov.[11]

Dubreuil[21] se je ukvarjal s preučevanjem metabolizma različnih gastrinskih analogov. Tatrastastрина Boc-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ je angiotenzinska konvertaza (ACE) cepila med Leu in Asp (oziroma med Met in Asp, Met so zamenjali z Leu). Glavna produkta cepitve sta tako bila Boc-Trp-Leu in dipeptid Asp-Phe-NH₂. Nadaljnje raziskave so izvedli na [Leu¹⁵] gastrinu(11-17) (Ala¹¹-Tyr¹²-Gly¹³-Trp¹⁴-Leu¹⁵-Asp¹⁶-Phe¹⁷-NH₂). Encim je cepil vez, kot je bilo za pričakovati, med Asp in Leu, tako da je nastal glavni produkt hidrolize Asp-Phe-NH₂, nadalje je encim odcepil dipeptid Trp-Leu od Ala-Tyr-Gly. Peptida Ala-Tyr-Gly-Trp-Leu niso opazili, kar kaže na to, da ACE najprej odcepi C-terminalni dipeptid in nato hitro izvede še cepitev med Gly in Trp. Med stranskimi produkti je bilo moč opaziti tudi tripeptid Gly-Trp-Leu.[21]

Ker se [Leu¹⁵]gastrin(5-17) skoraj ni razgradil z ACE, [Leu¹⁵]gastrin(11-17) pa se je popolnoma, so se odločili raziskati celo serijo gastrinskih analogov s podaljšano verigo na N-terminalnem koncu z glutamatnimi ostanki. Čeprav hidroliza teh peptidov z naraščanjem

števila glutamatnih ostankov upada, ostane glavno in začetno mesto cepitve enako, torej med Leu in Asp. Možna razlaga, ki jo Dubreluil ponuja, je, da vključitev glutamatnega ostanka povzroči strukturno spremembo.[21]

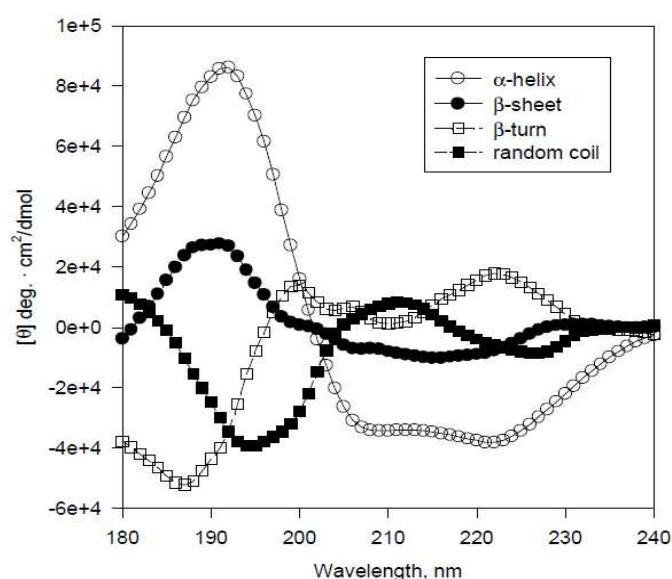
V eni izmed zadnjih raziskav je Peitl s sodelavci[10, 14] preučevala vpliv različnih distančnikov na metabolno stabilnost minigastrinskih analogov v serumu. Potrdila je, kar je bilo znano že od prej, in sicer, da se s podaljševanjem verige in z zamenjavo L-AK z D-AK povečuje razpolovni čas peptida v serumu. Metabolno pot enega izmed najmanj stabilnih z ^{111}In označenih minigastrinskih analogov (z distančnikom PEG₆) je preučila bolj podrobno. Razlika v razpolovni dobi tega analoga v serumu in v serumu z EDTA (EDTA inaktivira metaloencime) kaže na prisotnost različnih metabolnih poti. Ena od poti naj bi bila preko ACE. Prvotna cepitev se zgodi med Met in Asp, pri čemer nastane dipeptid Asp-Phe-NH₂, druga pa med Gly in Trp. Naslednje cepitveno mesto je med Tyr in Gly. Cepitev med Ala in Tyr pa naj bi zaključila to pot razgradnje. Cepitvena mesta prikazuje slika 8. Zadnjo cepitev verjetno katalizira drug encim, verjetno endopeptidaza, ki odcepi gastrin-6 (Tyr-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂). Ko so namreč minigastrinski analog inkubirali 24 ur v plazmi z EDTA, so kot razgradni produkt opazili samo ^{111}In -DOTA-PEG₆-Ala-OH. Drugi analog z distančnikom iz šestih D-glutaminov, je izkazoval veliko večjo stabilnost z manj metaboliti, kar nakazuje, da je razgradnja z ACE v tem primeru onemogočena. Že Dubreluil je predvideval, da je to posledica spremenjene strukture. Zato so s cirkularnim dihroizmom (glej poglavje 1.8) določili sekundarno strukturo obeh minigastrinskih analogov. Pri manj stabilnem analogu niso opazili nobene posebne konformacije, medtem ko je šest D-glutaminov drugega analoga dejansko oblikovalo tip II β -zavoja. Relativno stabilna sekundarna struktura slednjega je verjetno odgovorna za visoko metabolno stabilnost, saj ovira vezavo v aktivno mesto encima.[10, 14]



Slika 8: Cepitvena mesta na peptidu PP11. Številke predstavljajo zaporedje cepitev. Povzeto po viru [10].

1.8 CIRKULARNI DIHROIZEM (CD)

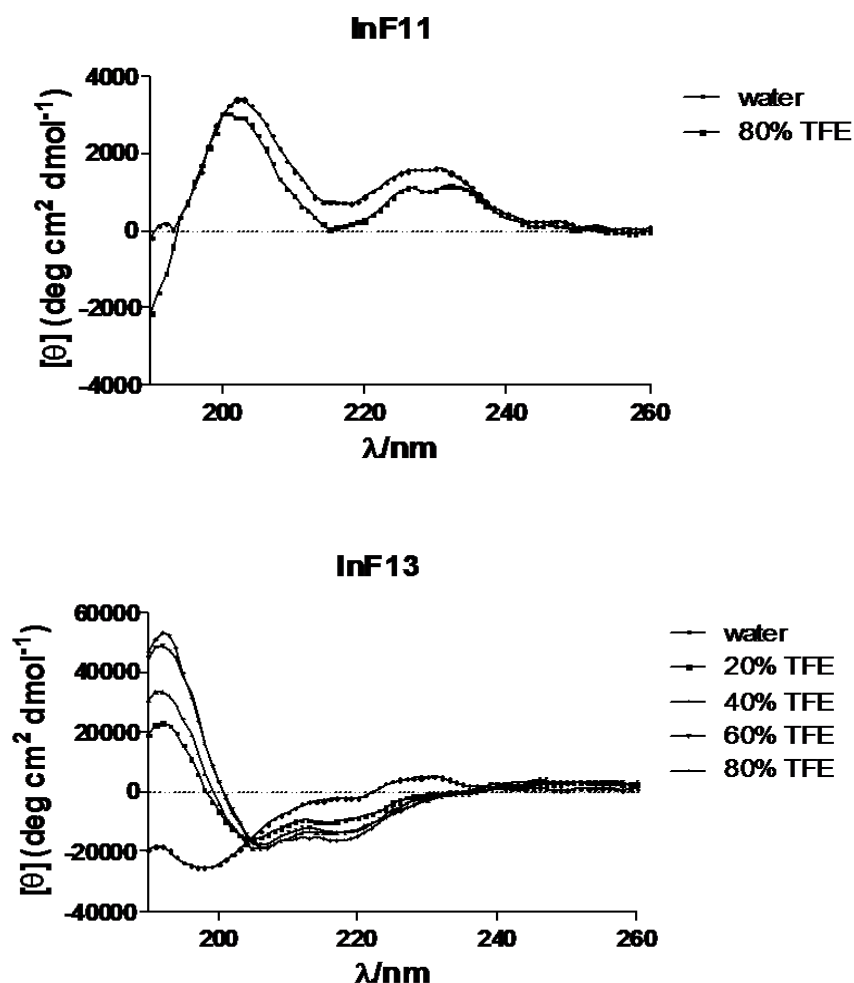
CD je oblika spektrometrije, ki je osnovana na različni absorpciji levo- in desno- sučne cirkularno polarizirane svetlobe. Pojav merimo kot funkcijo valovne dolžine svetlobe, temperature ali kemijskega okolja s CD spektrofotometrom. CD je značilen za optično aktivne molekule, med katere sodijo tudi proteini. Uporabljamo ga lahko za določanje sekundarne strukture proteinov, saj imajo alfa-vijačnica, beta-plošča in neurejena oblika specifični ciklarni dihroizem.[22]



Slika 9: Tipični CD spektri za α -vijačnico (α -helix), β -strukturo (β -sheet), β -zavoj (β -turn) in neurejeno zvite (random-coil) peptide in protein.

Konvencionalni (tipični) CD spektri so posneti v daljnem-UV območju, od 180 do 250 nm. Slika 9 prikazuje tipične UV CD spektre za α -vijačnico, β -strukturo, β -zavoj in naključno zvite protein. V tipičnem CD spektru pomeni odsotnost nekega signala odsotnost cirkularnega dihroizma, negativni signal pomeni absorpcijo leve cirkularno (krožno) polarizirane svetlobe in pozitiven signal pomeni absorpcijo desno cirkularno polarizirane svetlobe. Spekter proteina, ki je povsem v konformaciji α -vijačnice, ima dva negativna pasova podobne jakosti pri 222 in 208 nm in pozitivni pas pri cca 190 nm. Spekter za proteine, ki so v konformaciji β -strukture (površine), imajo v grobem negativni pas v območju 210–220 nm in pozitivni pas med 195 in 200 nm. Ti spektri so precej raznoliki, ker so lahko prisotni kot paralelne, antiparalelne in mešane konformacije in so lahko zasukani na veliko različnih načinov.

Spekter za naključno zvit (random coil) peptid oziroma protein ima negativen pas visoke jakosti v področju okrog 200 nm.



Slika 10: CD spekter starševskih DOTA-konjugiranih peptidov [^{nat}In]-PP11 (oznaka InF11 na sliki) in [^{nat}In]-PP13 (oznaka InF13 na sliki). Povzeto po [10].

Na sliki 10 sta prikazana CD spektra za analoga minigastrina ^{nat}In -DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ in L-Glu-stereoizomer ^{nat}In -DOTA-(L-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. V primeru D-Glu stereoizomera vidimo definiran tip II β -obrat, pri L-Glu-stereoizomeru pa naključno zvit tip sekundarne strukture, oziroma α -vijačnico ob dodajanju TFE. TFE deluje kot nekakšen mimetik celične membrane oziroma okolja, v katerem se peptid znajde po aplikaciji v človeško telo. TFE prednostno stabilizira proteine in peptide v konformaciji vijačnice, tako da znižuje dielektrično konstanto medija.

2 NAMEN DELA

Poleg normalne, fiziološke prisotnosti je CCK2/gastrinski receptor visoko izražen v različnih tipih tumorjev, kot so medularni rak ščitnice, drobno-celični rak pljuč, astrocitom, stromalni rak jajčnikov, gastroenteropankreasni tumorji, adenokarcinom dojk, endometrija in ovarijev. Izraženost CCK2 receptorjev na celičnih membranah različnih tumorjev je osnova za možnost prikaza teh tumorjev z uporabo različnih nuklearno-medicinskih tehnik (PET in SPECT) in osnova za ciljno molekularno terapijo, in sicer z uporabo ustreznih radioaktivno označenih analogov gastrina oziroma minigastrina.

Zadnjih nekaj let se na področju razvoja analogov minigastrina, ustreznega tudi za ciljno radionuklidno terapijo, pozornost posveča ustreznejši farmakokinetiki, predvsem izboljšani metabolni stabilnosti in zmanjšani renalni retenciji. Glavni problem do danes je ostal zadrževanje radiooznačenega analoga v ledvicah, kar omejuje maksimalno radioaktivnost, ki jo lahko pacient prejme.

Do nedavnega se je zadrževanje obstoječih analogov minigastrina v ledvicah povezovalo z N-terminalnim glutamatnim koncem, vendar zadnje raziskave kažejo drugače. V eni od zadnjih študij[10] so ugotovili, da zadrževanje ni določeno zgolj z nabojem, temveč tudi s stereokemijo minigastrinskega analoga. Primerjali so ^{111}In -DOTA-(L-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (PP13) in njegov D-Glu₆ stereoizomer (PP11). Analoga sta izkazovala podobno afiniteto vezave za CCK2R in podobno stopnjo internalizacije, hkrati pa precej različno encimsko stabilnost. Biodistribucijska študija na živalskem modelu je dodatno pokazala signifikantno razliko v zadrževanju obeh radiopeptidov v ledvicah. Predvideva se, da je razlika posledica različnih sekundarnih struktur teh dveh minigastrinskih analogov, kar je predstavljalo osnovo za našo diplomsko nalogo.

Ena od tehnik, ki se lahko uporablja za ugotavljanje sekundarne strukture peptidov, je cirkularni dihroizem (CD). Pri tej tehniki merimo razlike v absorpciji levo- in desnosične krožno polarizirane svetlobe, kar predstavlja osnovo za analizo konformacijskih stanj. CD študija PP11 in PP13 je pokazala, da prvi analog izkazuje dobro definiran tip II β -obrata, medtem ko analog z (L-Glu)₆ distančnikom v vodi izkazuje lastnosti naključno zvitega klobčiča oziroma ob določenih pogojih α -heličnost. Če drži, da razlika v sekundarni strukturi povzroči spremembo pri zadrževanju v ledvicah, bi v primeru, da krajši metaboliti D-Glu₆ minigastrinskega analoga (PP11) izgubijo definirano sekundarno strukturo tip II β -zavoja in preidejo v naključno zvit klobčič, pričakovali primerljivo zadrževanje v ledvicah kot pri posameznem paru iz skupine metabolitov L-Glu₆ minigastrinskega analoga.

V ta namen bomo z uporabo poznanih principov kemijske sinteze na trdnem nosilcu sintetizirali analoge minigastrina s skrajšano verigo ionskega distančnika in potencialne metabolite starševskih analogov z (D-Glu)₆ in (L-Glu)₆ distančnikom, ki bodo ustrezno modificirani na N-terminalnem koncu, v smislu možnosti radiooznačevanja z različnimi gama- in beta-sevalci.

S pomočjo CD-ja (cirkularni dihroizem) bomo določili sekundarno strukturo analogov minigastrina in izbranih metabolitov, kar bo predstavljalo osnovo za nadaljnje študije biodistribucije z istimi radiopeptidi. Serijo D-Glu starševskega analoga (PP11) in njegovih metabolitov bomo radioaktivno označili in poskušali ugotoviti mesto metabolne restrikcije ter rezultate primerjali z znanimi metabolno labilnimi analogi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIJSKI DEL

- **Reagenti in topila:**

Pri sintezah in kromatografskih ločbah smo uporabili reagente in topila proizvajalcev Sigma-Aldrich, Fluka, Lexchem, Merck, TCI, Riedel-de Haën in Baxter. Uporabili smo jih brez predhodnega čiščenja.

Rezini Rink Acid[®] in Rink Amide[®], HATU in s Fmoc zaščitene aminokisline, ki smo jih uporabili, proizvaja Merck, NovaBiochem.

Peptid PP20 je bil sintetiziran v Peptide Specialty Laboratories v Heidelbergu (Nemčija).

Peptid PP11 in aminokislinsko zaporedje Fmoc-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-Rink Amide[®] rezina sta bila predhodno sintetizirana na Kliniki za nuklearno medicino v UKC Ljubljana.

Uporabili smo DOTA-tris (tBu-ester) proizvajalca Chematechu.

- **Tehtanje:**

Tehtanje smo izvedli na analitski tehtnici Mettler Toledo AX 105 Delta Range[®] (Švica).

- **Segrevanje:**

Pri izvedbi Keiser testa smo segrevanje izvajali v termobloku tipa TBTS (Labo d.o.o., Ljubljana, Slovenija) pri temperaturi 95°C.

- **UV/VIS spektroskopija:**

Uporabili smo Lambda 2 UV/VIS spektrofotometer proizvajalca Perkin Elmer (Nemčija). Absorbanco Fmoc zaščitne skupine smo merili v 1 cm široki kiveti iz kvarčnega stekla pri valovni dolžini 300 nm ($\epsilon = 7800 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

- **Centrifugiranje:**

Oborjene peptide smo centrifugirali s centrifugo Rotonda 460 RS (Hettichlab, Nemčija). Centrifugirali smo pri 2000g ($g = 9,8 \text{ m/s}^2$) 10 min ($r = 201$, $T = 4^\circ\text{C}$).

- **Analitski HPLC:**

Analitsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo izvedli na sistemu Agilent Technologies 1100 series. Za detekcijo smo uporabili detektor s fotodiodnim nizom DAD

(Diode Array Detektor) proizvajalca Agilent in detektor radioaktivnosti Gabi Star (Raytest, Nemčija). Ločevanje se je vršilo na koloni Phenomenex Gemini 5u C18 110A (150x4.6 mm) oziroma na koloni Kinetex 2.6u C18 100A (50x4.6 mm) (tabela II) za vrednotenje radiooznačevanja (QC),

mobilna faza: A = 0,1 % TFA v vodi in B = acetonitril.

Tabela II: Gradient in pretok pri posamezni od kolon.

kolona	Phenomenex Gemini	Kinetex
gradient	0-20 min 5-50 % B	0-5 min 10-50% B
pretok	0,75 ml/min	1,5 ml/min

- **Preparativni HPLC:**

Za čiščenje sintetiziranih peptidov smo uporabili preparativno HPLC na sistemu Agilent Technologies 1200 series z diode array detektorjem in preparativno kolono Phenomenex Jupiter 4u Proteo 90R (250x10.0 mm).

Volumen injiciranja: 10 ml.

Mobilna faza: A = 0,1 % TFA v vodi in B = acetonitril.

Gradient 1: 0-20 min 5-30 % B (za peptide STJ1, STJ2, STJ3, STJ4, STJ7, STJ8, STJ9 in STJ10).

Gradient 2: 0-20 min 5-50 % B (za peptida STJ5 in STJ11).

Gradient 3: 0-20 min 10-50 % B (za peptide STJ6, STJ12, STJ13 in STJ14).

Pretok: 8 ml/min.

- **Masna spektrometrija:**

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Waters-Micromass z ESI tehniko ionizacije v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan.

- **Liofilizacija:**

Za liofiliziranje spojin smo uporabili liofilizator Christ Alpha proizvajalca BioBlock (Francija). Liofilizirali smo pri podtlaku 0,32 mbar in temperaturi plošče -30°C ter temperaturi kondenzatorja -80°C.

- **Risanje struktur:**

Za risanje struktur smo uporabili ChemBioDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft.

3.2 STABILNOST V SERUMU

- **Reagenti:**

Uporabili smo reagente proizvajalcev Fluka, Sigma-Aldrich in Baxter.

$^{111}\text{InCl}_3$ je bil proizvajalca Perkin Elmer (ZDA).

Kri za test encimske stabilnosti je bila odvzeta na Kliniki za nuklearno medicino UKC Ljubljana dvema prostovoljcema (kri somentorice naloge in avtorice naloge). Kri je bila odvzeta v epruvete za serumski odvzem, brez aktivatorja koagulacije. Po koagulaciji pri sobni temperaturi smo kri centrifugirali in za nadaljnji poskus preverjanja stabilnosti v serumu odvzeli supernatant, v danem primeru serum.

- **Priprava matičnih raztopin posameznih DOTA-konjugiranih peptidov**

DOTA-konjugirane peptide smo raztopili v vodi in jim z uporabo Lambda 2 UV/VIS spektrofotometer proizvajalca Perkin Elmer (Nemčija) določili koncentracijo. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 280 nm, pri čemer smo za izračun koncentracije upoštevali naslednje ekstinkcijske faktorje: ϵ (280 nm) = $6970 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ za STJ10, STJ11, STJ12, PP11 in ϵ (280 nm) = $1280 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ za STJ8 in STJ9.

- **Označevanje z radioaktivnim ^{111}In :**

Z ^{111}In smo označili DOTA-konjugirane peptide PP11, STJ7, STJ8, STJ9, STJ10, STJ11, STJ12. Iz matične raztopine smo vzeli alikvot, ki je ustrezal 10-20 μg (5-16 nmol) peptida in ga dodali v Eppendorf epruveto z 200 μl acetatnega pufra (0,4 M, pH = 5). Z namenom izogniti se oksidaciji spojin na metioninskem preostanku smo dodali še raztopino selenometionina (20 μl , c = 1 mg/100 μl). V zadnjem koraku smo dodali raztopino $^{111}\text{InCl}_3$ (cca 130 MBq) in inkubirali v termobloku tipa TBTS (Labo d.o.o., Ljubljana, Slovenija) 30 min pri 95°C.

- **Ugotavljanje radiokemijske čistote (QC)**

Za ugotavljanje radiokemijske čistote s HPLC metodo smo iz vsake Eppendorf epruvete vzeli 5 μl vzorca in ga dodali 50 μl raztopine CaDTPA (c = 1 mM). Kot ustrezno radiokemijsko čistoto smo obravnavali vzorce, kjer je bila površina pod krivuljo nevezanega ^{111}In pod 10 %.

Pogoji ločevanja na HPLC so opisani pod 3.1 (Analitski HPLC). Če/ko je radioaktivno označen peptid tem zahtevam ustrezal, smo mu dodali 0,01% raztopino humanega serumskega albumina (HSA) do skupnega volumna 1000 μ l in ga čez noč shranili v hladilnik.

- **Encimska stabilnost PP11 v humanem serumu in identifikacija metabolitov (STJ7, STJ8, STJ9, STJ10, STJ11 in STJ12):**

K 1 ml svežega humanega seruma, ki smo ga predhodno inkubirali pri 37°C 5% CO₂ smo dodali po 50 ng (0,025-0,04 nmol) radioaktivno označenega, DOTA-konjugiranega peptida in vzeli vzorec ob času nič. Vse skupaj smo ponovno inkubirali na 37°C 5% CO₂ in ob različnih časovnih točkah (0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h) jemali alikvote po 100 μ l, jim dodali 200 μ l absolutnega EtOH, da smo oborili serumske proteine, centrifugirali (4900 g, 10 min) in supernatant odlili ter ga analizirali s pomočjo radio HPLC. Na kolono smo injicirali po 200 μ l supernatanta.

- **Inkubacija:**

Za inkubiranje posameznih radiooznačenih metabolitov izbranega analoga minigastrina smo uporabili inkubator Sanyo (Sanyo Electric Co., Japonska). Inkubirali smo pri temperaturi 37°C in 5% CO₂.

3.3 CIRKULARNI DIHROIZEM

- **Reagenti:**

Uporabili smo reagente proizvajalcev Fluka, Sigma-Aldrich in Baxter.

Tudi ^{nat}InCl₃ je bil od proizvajalca Fluka.

- **Označevanje z neradioaktivnim (^{nat}In) indijem (hladno označevanje):**

DOTA-konjugiran peptid STJ2, STJ6, STJ8, STJ12, PP11, PP20 (1-2 mg; 0,6-1 μ mol) smo raztopili v 500 μ l acetatnega pufra (0,4 M, pH = 5). Raztopini smo dodali 3-kraten presežek ^{nat}InCl₃ (0,5 M) in 30 min inkubirali v termobloku tipa TBTS (Labo d.o.o., Ljubljana, Slovenija) pri 95°C. Po ohlajanju smo nevezani indij odstranili s pomočjo SPE (Solid Phase Extraction) na Sep-Pak C18 koloni (Waters). Po nanosu raztopine na kolono se peptid veže na C18 stacionarno fazo, prosti ^{nat}In pa enostavno odstranimo s spiranjem z vodo. Peptidno frakcijo smo nato iz stacionarne faze eluirali z metanolom. Z metanolom namreč spremenimo (znižamo) dielektrično konstanto in na ta način prekinemo hidrofobne interakcije med C18

stacionarno fazo in peptidom. Metanol smo odstranili z uparovanjem topila pri znižanem tlaku in hladno označen peptid liofilizirali (liofilizator in pogoji liofilizacije so opisani pod 3.1 (Liofilizacija)).

- **Odstranjevanje topil pri znižanem tlaku:**

Za odstranjevanje topil pri znižanem tlaku (uparovanje) smo uporabili rotavapor Büchi rotavapor R-114. Uparovanje je potekalo pri temperaturi vodne kopeli med 40 in 50°C.

- **Cirkularni dihroizem (CD)**

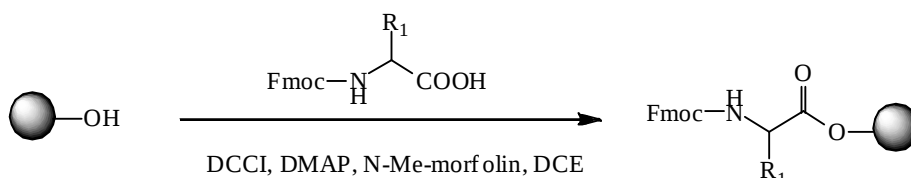
CD spektre smo posneli pri 25°C s spektrometrom Aviv Lakewood, N J. model 62A DS na Inštitutu Jožef Štefan. Napravo smo prepihovali z dušikom pol ure pred uporabo in med samimi meritvami. Vse spektre smo posneli med 250 nm in 186 nm pri spektralni širini 1 nm in resolucijskem koraku 1 nm. Resolucijski korak pomeni, za koliko nm dvigujemo oziroma nižamo valovno dolžino za/med posameznimi meritvami. V vsaki od teh točk (valovnih dolžin) je meritev trajala 4 s. Pri meritvah smo uporabili kiveto iz kvarčnega stekla dolžine 1 mm. Hladno označene (z ^{nat}In) peptide smo prvotno raztopili v vodi, tako da je bila koncentracija peptida približno 0,1 mmol/l oziroma 0,2 g/l. Spektre vzorcev smo nato posneli v vodi in z dodatkom različnih deležev trifluoroetanol (TFE).

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 SINTEZA DOTA-KONJUGIRANIH METABOLITOV MINIGASTRINA NA TRDNEM NOSILCU

Z DOTA-o konjugirane metabolite dveh minigastrinskih analogov (D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (PP11) in (L-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (PP13) smo sintetizirali na Rink Acid[®] rezini (peptidnem nosilcu) z uporabo Fmoc metode. Zaščitna skupina za stransko verigo Trp je bila Boc, za Asp, Tyr, L-Glu in D-Glu pa tBu.

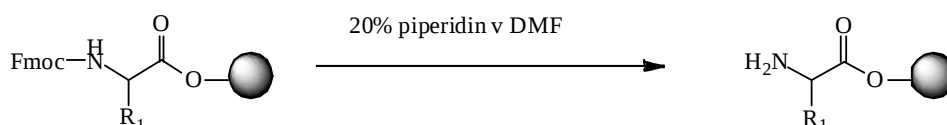
4.1.1 POSTOPEK DODAJANJA PRVE AMINOKISLINE NA NOSILEC



Slika 11: Shema pripenjanja prve aminokisline na nosilec.

1. Rezino, cca 0,1 g (podrobnejše količine so podane v tabelah od III do XIV), smo pustili v približno 3 ml dimetilformamida (DMF) za pol ure, da je nabreknila. Uporabimo lahko tudi N-metilpirolidon (NMP). Rezino smo sprali z DMF.
2. Ustrezno aminokislino (AK) smo suspendirali v 2 ml dikloroetana (DCE), jo popolnoma raztopili z dodatkom 1 ml NMP in jo dodali k rezini.
3. Tudi N,N'-dicikloheksilkarbodiimid (DCCl) v DCE, 4-dimetilaminopiridin (DMAP) v DCE in N-metilmorfolin smo po tem vrstnem redu dodali k rezini. Pri tem smo upoštevali stehiometrijsko razmerje: rezina:AK:DCCl:DMAP:N-metilmorfolin = 1:4:4,2:0,2:1.
4. Reakcijo smo pustili potekati 3-5 ur pri sobni temperaturi ob počasnem mešanju.

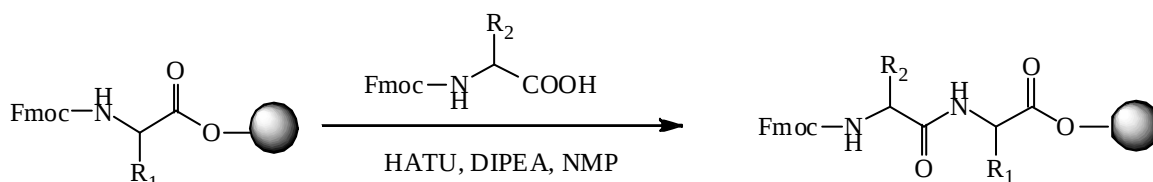
4.1.2 POSTOPEK ODSTRANJEVANJA Fmoc ZAŠČITNE SKUPINE S TERMINALNE – NH₂ SKUPINE



Slika 12: Shema odstranjevanja Fmoc zaščitne skupine.

1. Po reakciji (4.1.1) smo rezino sprali z DMF ali NMP in izopropanolom (iPrOH). Z iPrOH povzročimo, da se rezina skrči in na ta način iztisnemo vse nezreagirane reagente.
2. Fmoc zaščitno skupino iz α -amino skupine AK smo odstranili z 2 ml 20 % piperidina v DMF (1 x 10 min in 2 x 5 min) in rezino po odstranitvi dobro sprali z DMF in iPrOH.
3. Posamezne Fmoc frakcije smo zbirali v bučki, redčili z absolutnim etanolom, izmerili absorbanco pri valovni dolžini 300 nm ($\epsilon = 7800 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in izračunali množino aminokisline, ki je dejansko reagirala, s čimer smo ugotavljali uspešnost reakcije.

4.1.3 POSTOPEK DODAJANJA DRUGE IN VSEH NASLEDNJIH AMINOKISLIN



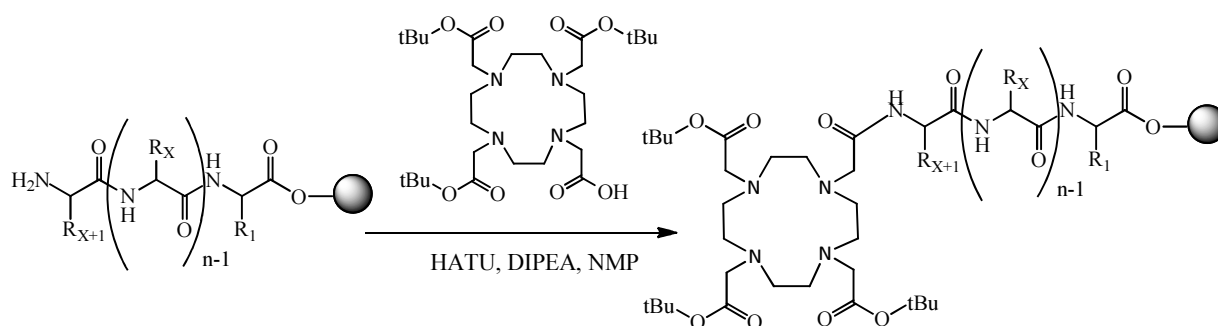
Slika 13: Shema vezave aminokisline na nastajajoč peptid.

1. Ustrezno količino aminokisline (količine so podane v tabelah od III do XVI) in O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronijheksafluorofosfata (HATU) (rezina:AK:HATU:DIPEA = 1:3:3:5) smo raztopili v 3 ml NMP ter pustili približno 15 min, da poteče aktivacija COOH skupine na aminokislini.
 2. Diizopropilkarbodiimid (DIPEA) smo dodali po 15 minutah, premešali in dodali rezini, ki smo jo predhodno nabrekli.
 3. Reakcija je potekala pri sobni temperaturi približno 1 uro, ob počasnem mešanju.
- #### 4.1.4 TNBS TEST: kvalitativen test, ki pokaže prisotnost ali odsotnost prostih amino skupin.
1. Po končani reakciji smo rezino sprali z DMF oziroma NMP.
 2. Rezino smo skrčili s spiranjem z iPrOH.
 3. Pripravili smo raztopino 10 % DIPEA v DMF (reagent 1) ter 1 % 2,4,6-trinitrobenzensulfonske kisline (TNBS) (reagent 2) v DMF.
 4. Nekaj kroglic rezine smo sprali z DMF in jih v tem topilu suspendirali.

5. Dodali smo po 50 μ l vsakega od obeh pripravljenih reagentov ter pustili 5 min pri sobni temperaturi.
6. Rezino smo nato sprali z DMF. Rdeče obarvana rezina pomeni pozitiven rezultat (prisotnost prostih amino skupin).

Sledi odstranjevanje Fmoc zaščitne skupine (4.1.2), pripenjanje nove aminokisline (4.1.3), TNBS test (4.1.4) in spet odstranjevanje Fmoc zaščite. To smo ponavljali tako dolgo, da smo dobili želen peptid - ustrezen minigastrinski metabolit. Kvantitativni podatki za pripenjanje prve aminokisline, vseh ostalih aminokislin in odstranjevanje Fmoc zaščitne skupine so za vsak DOTA-konjugiran peptid posebej podani v tabelah od III do XVI.

4.1.5 POSTOPEK VEZAVE DOTA-e (1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraocetna kislina) NA KONČEN PEPTID



Slika 14: Shema vezave DOTA-e na peptid.

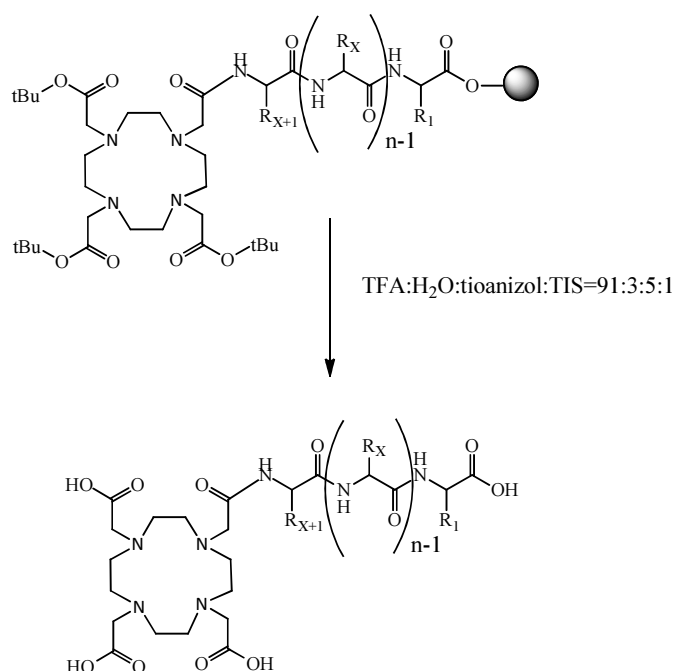
1. DOTA-o smo na peptid vezali na koncu, ko smo že imeli sintetizirano ustrezno zaporedje aminokislin.
2. Rezino smo dobro posušili. Empirično je bilo namreč ugotovljeno, da reakcija poteče bolje, če je rezina predhodno dobro posušena. Nato smo rezino pustili 1 uro v NMP, da je nabreknila.
3. Ustrezno količino 2-(4,7,10-tris(2-(tercbutoksi)-2-oksoetil)-1,4,7,10-tetraazaciklo dodekan-1-il)ocetna kislina (DOTA(tBu)₃) in HATU kot aktivacijskega reagenta smo raztopili v 3 ml NMP in pustili 10-15 min, da se prosta COOH skupina na DOTA(tBu)₃ aktivira.
4. Nato smo dodali DIPEA-o (rezina:DOTA(tBu)₃:HATU:DIPEA=1:3:3:5) in preverili pH pripravljene reakcijske zmesi. Tu je potrebno še posebej paziti, da je pH nad 8, sajv nasprotnem primeru reakcija vezave DOTA-e ne poteče.

5. Reakcija je potekala 3-5 ur.

6. Po negativnem TNBS testu smo rezino zopet dobro sprali in jo posušili.

Podrobnejši podatki o vezavi DOTA-e so podani v zadnji vrstici tabel od 3 do 16.

4.1.6 ODSTRANJEVANJE ZAŠČITNIH SKUPIN IN HKRATNA CEPITEV PEPTIDA Z REZINE

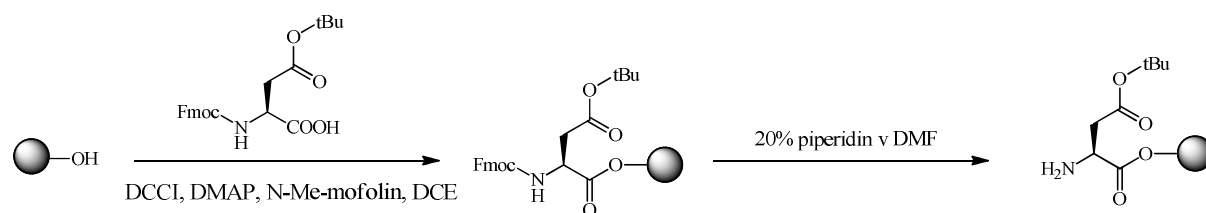


Slika 15: Shema odstranjevanja zaščitnih skupin in hkratne cepitvepeptida z rezine.

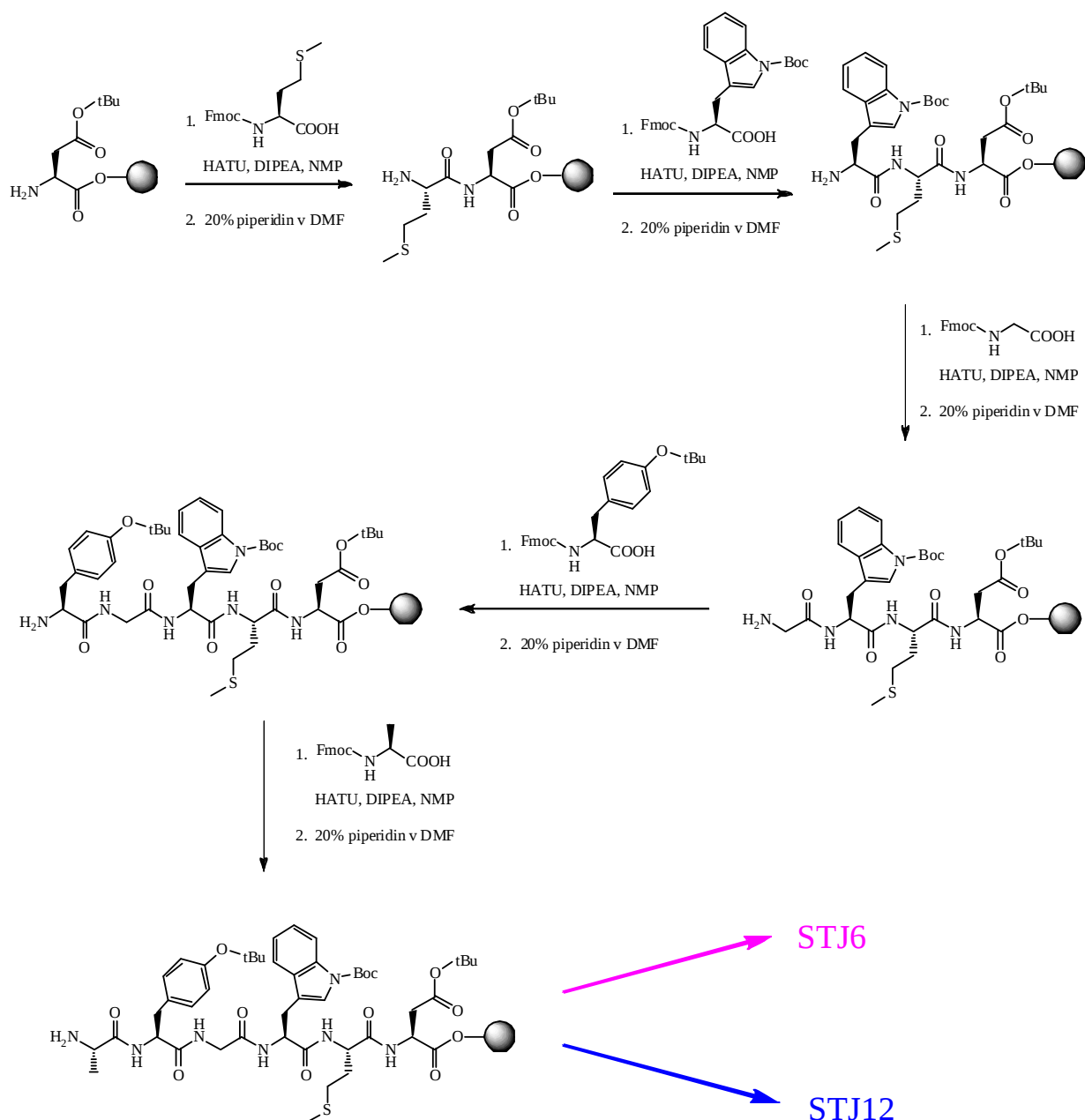
1. Zaščitne skupine smo odstranili in obenem tudi cepilipeptid z rezine z reagentom, ki je zmes trifluoroocetne kisline (TFA), vode, tioanizola in triizopropilsilana (TIS) (TFA:voda:tioanizol:TIS = 91:3:5:1).
2. Približno 2 ml reagenta smo pustili na rezini 2-3 ure (2x1,5 ure).
3. Da smo odstranili res vse zaščitne skupine (predvsem tBu), smo reagent še za dodatne 2-3 ure pustili reagirati s peptidom, ki smo ga že cepili z rezine.
4. Peptid smo oborili z mešanico etra in petroletra v razmerju 1:1, centrifugirali, oddekantirali supernatant in produkt posušili pod znižanim tlakom.

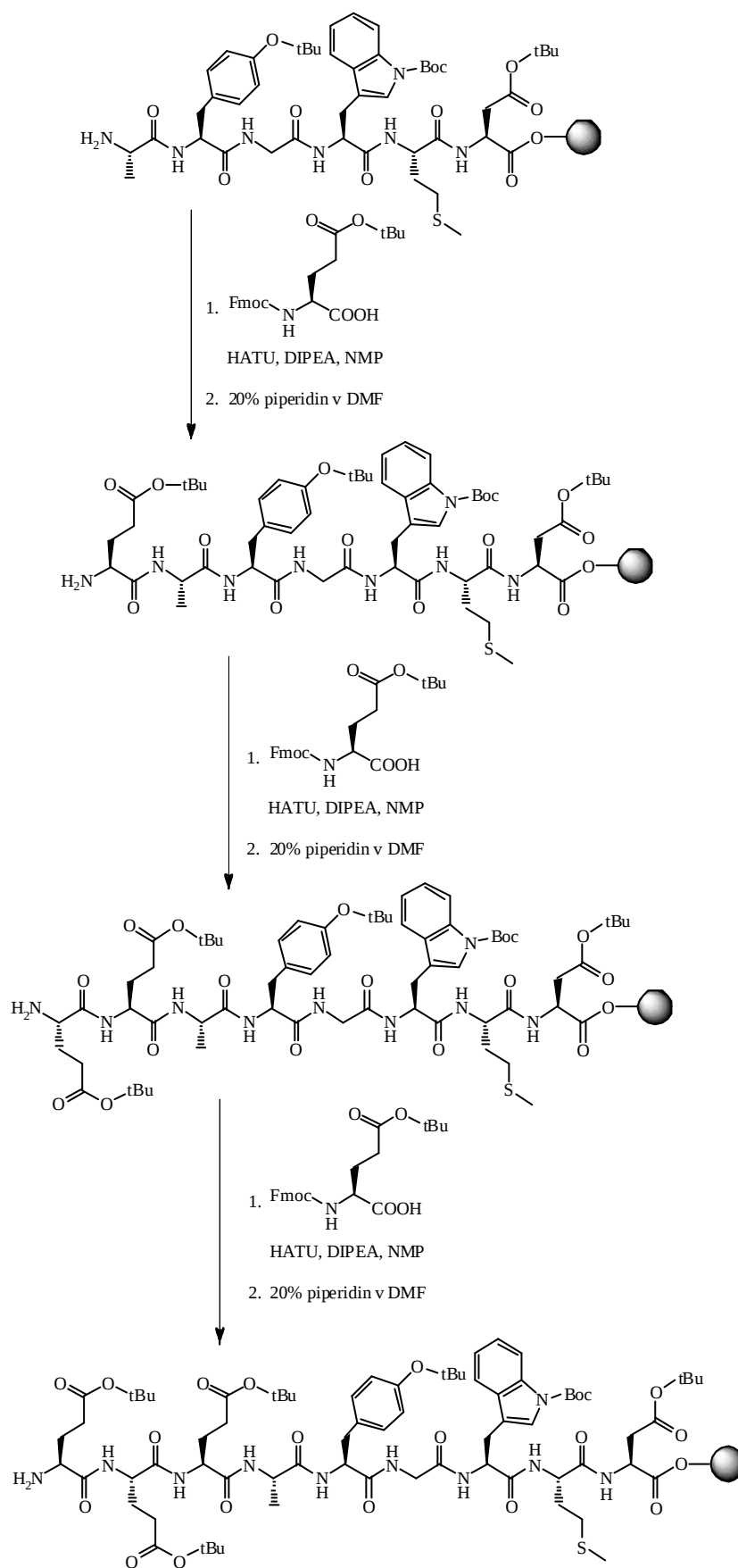
V nadaljevanju je prikazana reakcijska shema najdaljših metabolitov DOTA-(L-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (STJ6) in DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (STJ12) po korakih.

KORAK 1- skupna pot sinteze za **STJ6** in **STJ12**:

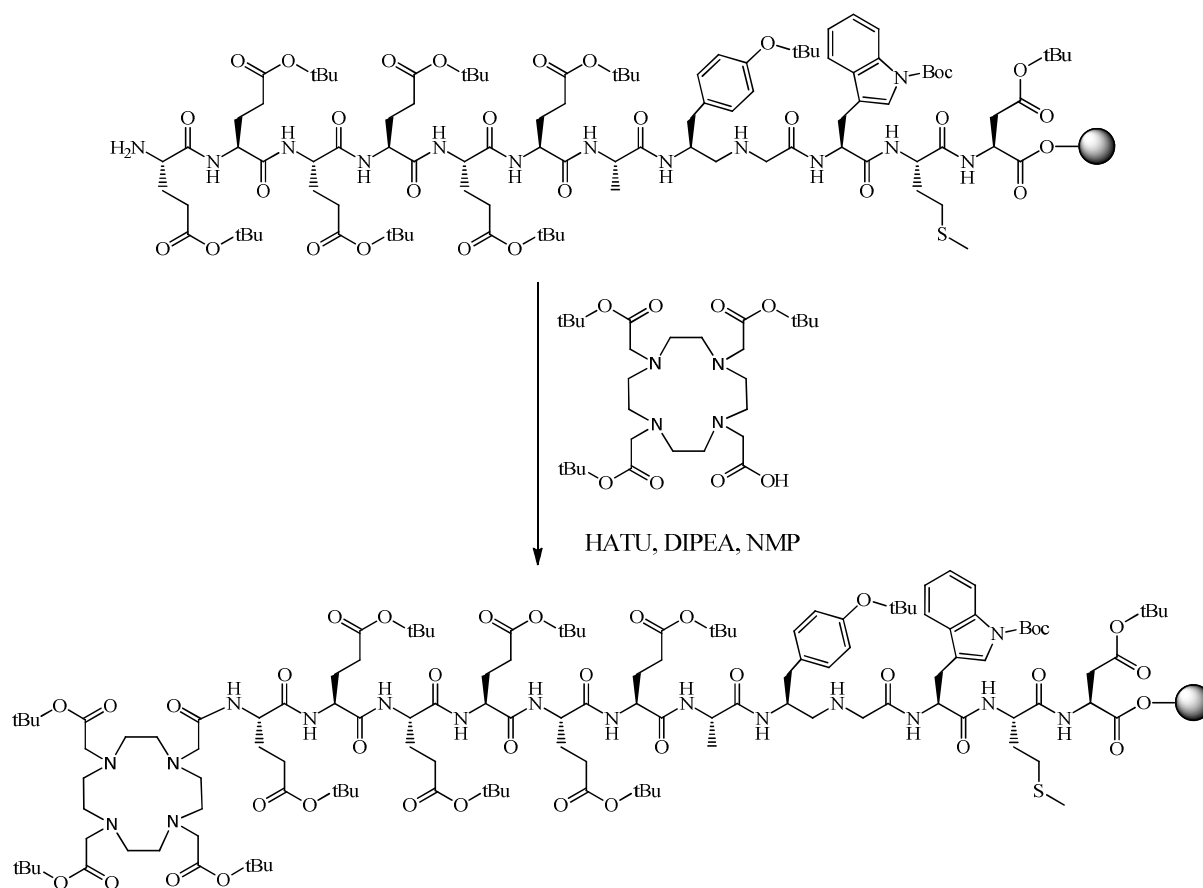
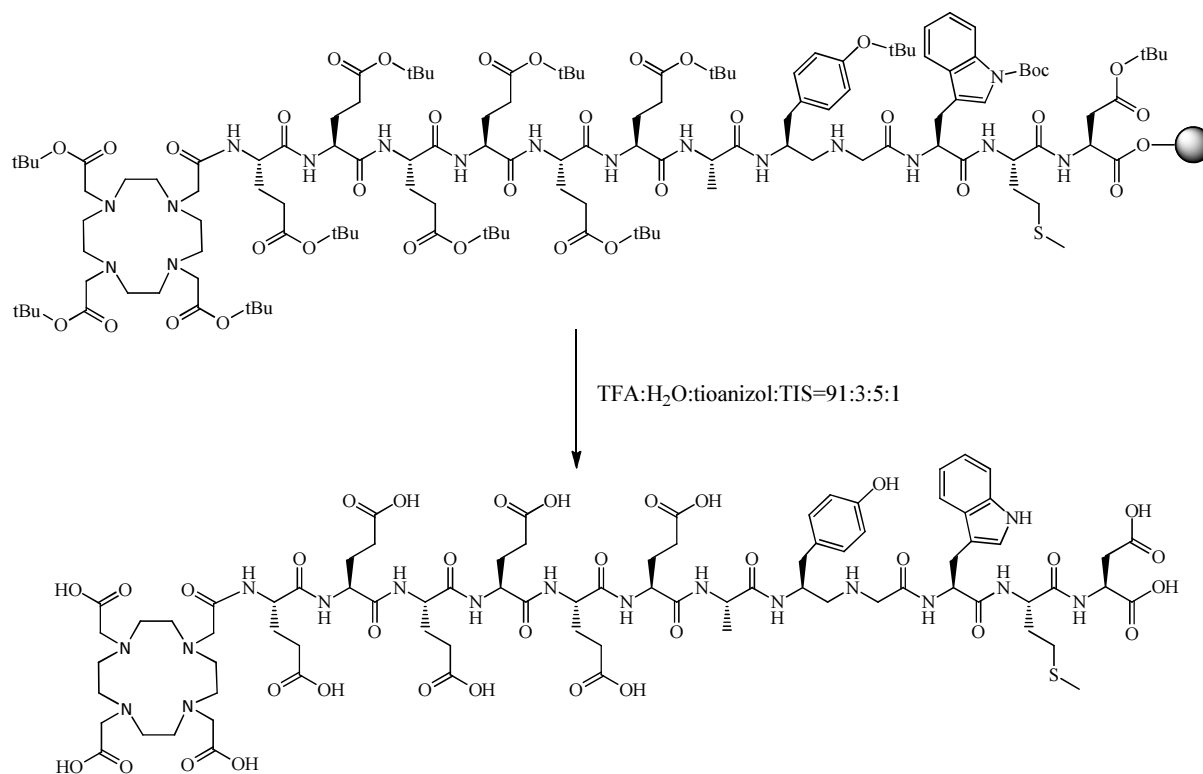


KORAK 2- skupna pot sinteze za **STJ6** in **STJ12**:

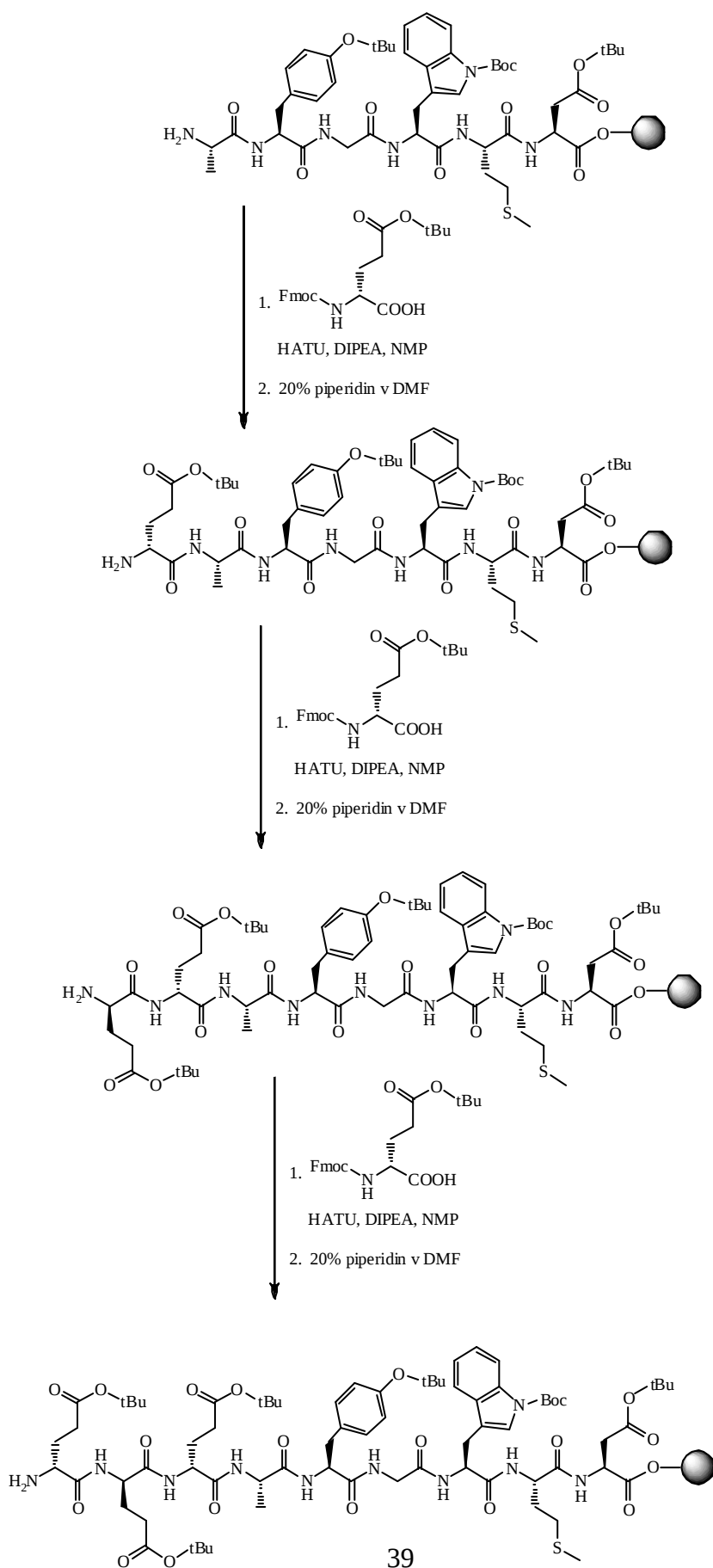


KORAK 3- sinteza **STJ6**:

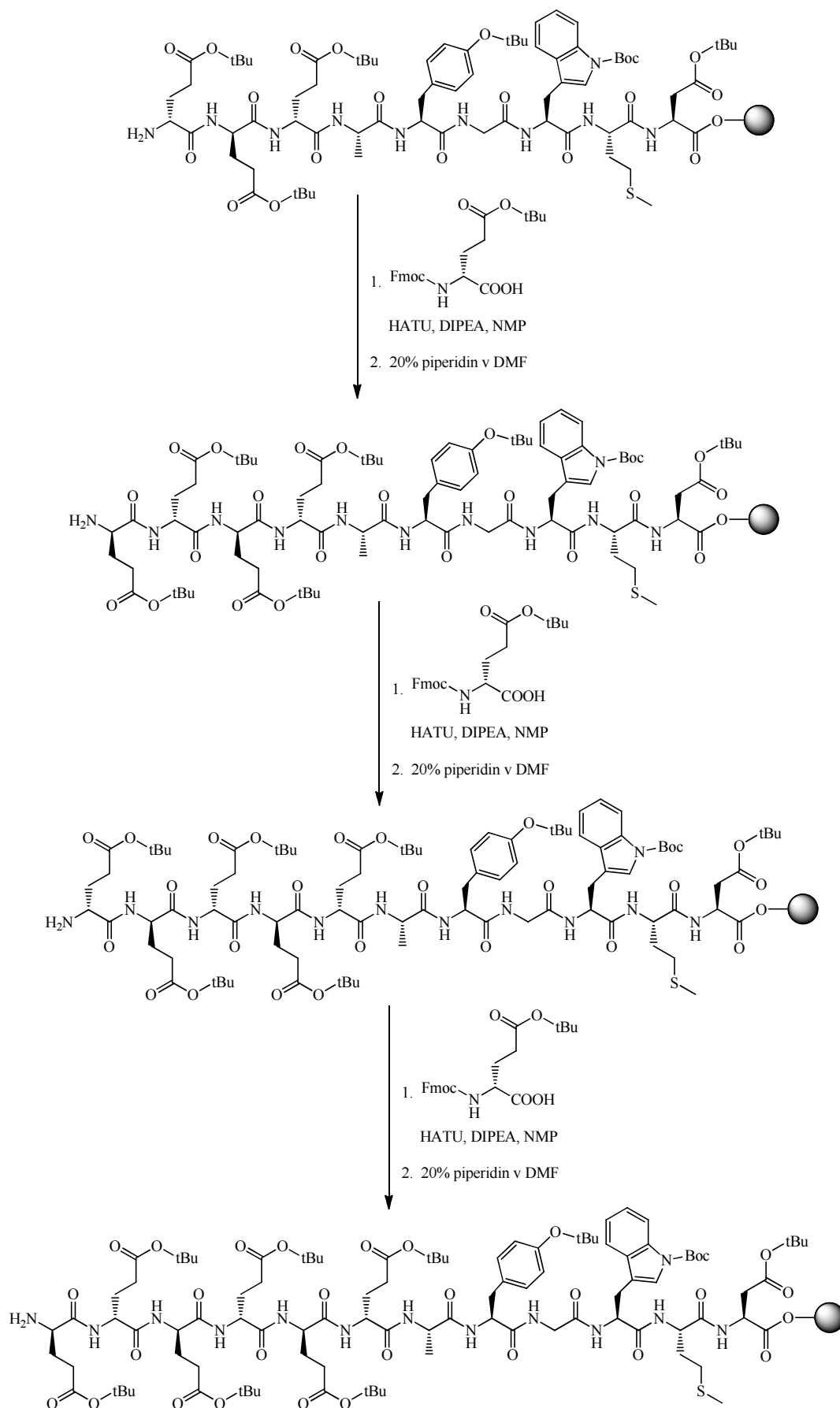
[illegible]

KORAK 5- sinteza **STJ6**:KORAK 6- sinteza **STJ6**:

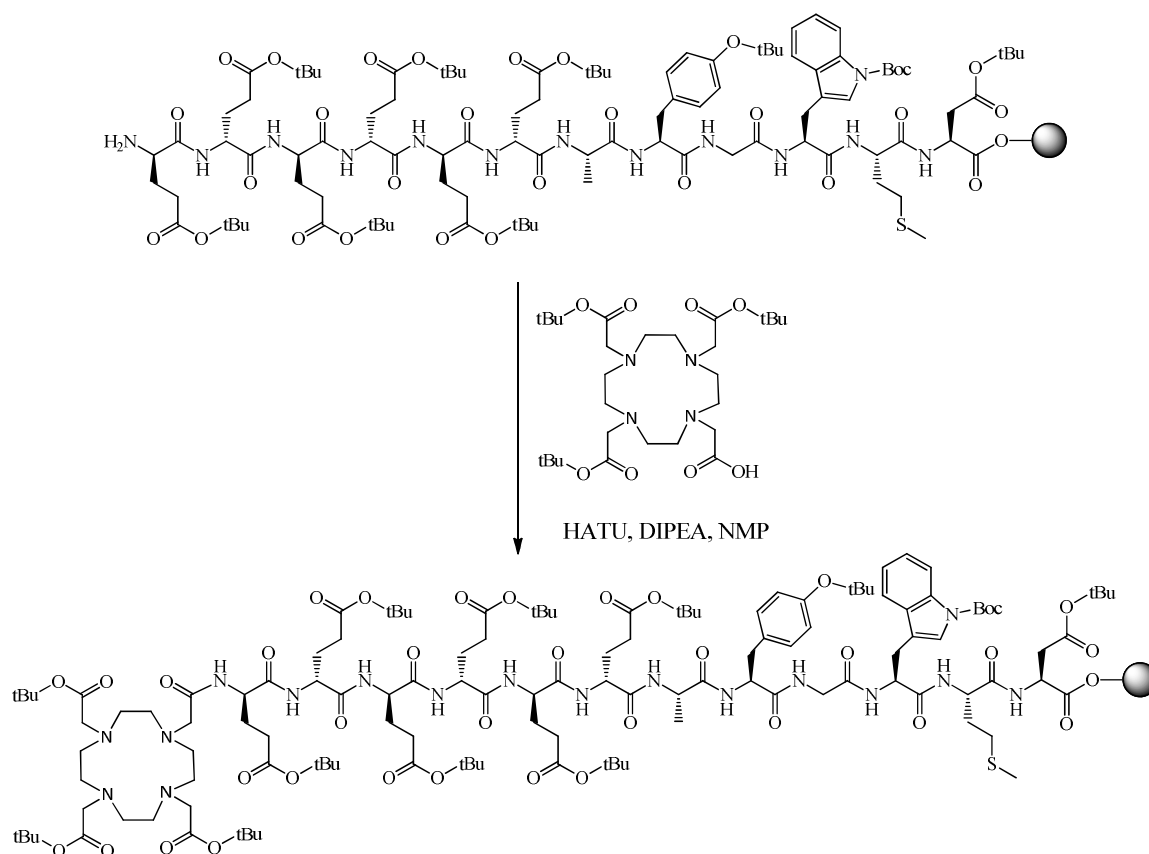
KORAK 3- sinteza STJ12:



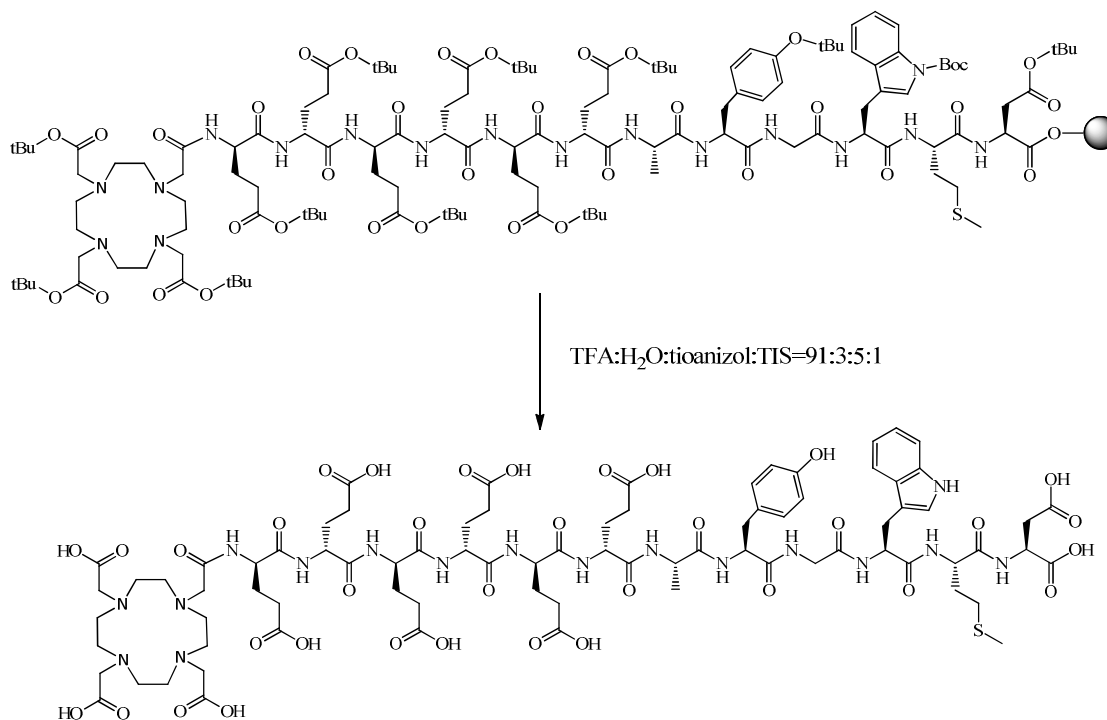
KORAK 4- sinteza STJ12:



KORAK 5- sinteza STJ12:



KORAK 6- sinteza STJ12:



Slika 16: Reakcijska shema prikazuje sintezo najdaljših metabolitov (L-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ STJ6 in (D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ STJ 12 po korakih.

V naslednjih tabelah so predstavljeni kvantitativni podatki sintez. Ker je C-terminalni del peptidov po parih enak, smo za STJ6 in STJ12 (STJ5 in STJ11) sintezo izvajali kar skupaj in pred vezavo distančnika (L-Glu/D-Glu) nosilec z vezanim C-terminalnim delom delili na pol.

Tabela III: Kvantitativni podatki za sintezo DOTA-konjugiranega peptida STJ1.

STJ1				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
alanin	Fmoc-Ala-OH	0,150	0,097	0,047
1.L-glutamat	Fmoc- Glu(OtBu)-OH		0,100	0,046
2.L-glutamat			0,096	0,042
3.L-glutamat			0,096	0,041
4.L-glutamat			0,093	0,043
5.L-glutamat			0,093	0,038
6.L-glutamat			0,084	0,036
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH		0,047	/

Tabela IV: Kvantitativni podatki za sintezo DOTA-konjugiranega peptida STJ2.

STJ2				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0,150	0,143	0,065
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,065	0,079
1.L-glutamat	Fmoc-Glu(OtBu)- OH		0,100	0,075
2.L-glutamat			0,096	0,074
3.L-glutamat			0,096	0,072
4.L-glutamat			0,093	0,073
5.L-glutamat			0,093	0,066
6.L-glutamat			0,084	0,063
DOTA	DOTA(tBu)3-OH		0,079	/

¹ Razmerje med množino aminokislina, ki jo želimo dodati in množino Fmoc zaščitne skupine, ki smo jo predhodno odstranili je 3:1.

Tabela V: Kvantitativni podatki za sintezo DOTA-konjugiranega peptida STJ3.

STJ3				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
glicin	Fmoc-Gly-OH	0,150	0,166	0,061
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH		0,092	0,065
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,065	0,060
1.L-glutamat	Fmoc-Glu(OtBu)- OH		0,076	0,066
2.L-glutamat			0,084	0,058
3.L-glutamat			0,074	0,053
4.L-glutamat			0,068	0,052
5.L-glutamat			0,067	0,049
6.L-glutamat			0,063	0,047
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH	0,059	/	

Tabela VI: Kvantitativni podatki za sintezo DOTA-konjugiranega peptida STJ4.

STJ4				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
triptofan	Fmoc-Trp(Boc)-OH	0,150	0,279	0,067
glicin	Fmoc-Gly-OH		0,060	0,066
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH		0,092	0,060
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,065	0,064
1.L-glutamat	Fmoc-Glu(OtBu)- OH		0,100	0,061
2.L-glutamat			0,096	0,058
3.L-glutamat			0,096	0,055
4.L-glutamat			0,093	0,053
5.L-glutamat			0,093	0,049
6.L-glutamat			0,084	0,048
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH	0,063	/	

¹ Razmerje med množino aminokislina, ki jo želimo dodati in množino Fmoc zaščitne skupine, ki smo jo predhodno odstranili je 3:1.

Tabela VII: Kvantitativni podatki za sintezo DOTA-konjugiranega peptida STJ7.

STJ7				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
alanin	Fmoc-Ala-OH	0,104	0,130	0,078
1.D-glutamat	Fmoc-D- Glu(OtBu)-OH		0,204	0,072
2.D-glutamat			0,191	0,065
3.D-glutamat			0,185	0,063
4.D-glutamat			0,179	0,059
5.D-glutamat			0,166	0,056
6.D-glutamat			0,166	0,049
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH		0,063	/

Tabela VIII: Kvantitativni podatki za sintezo DOTA-konjugiranega peptida STJ8.

STJ8				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0,099	0,182	0,167
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,159	0,155
1.D-glutamat	Fmoc-D- Glu(OtBu)-OH		0,204	0,142
2.D-glutamat			0,191	0,140
3.D-glutamat			0,185	0,131
4.D-glutamat			0,179	0,124
5.D-glutamat			0,166	0,120
6.D-glutamat			0,166	0,104
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH		0,139	/

¹ Razmerje med množino aminokislina, ki jo želimo dodati in množino Fmoc zaščitne skupine, ki smo jo predhodno odstranili je 3:1.

Tabela IX: Kvantitativni podatki za sintezoDOTA-konjugiranega peptida STJ9.

STJ9				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
glicin	Fmoc-Gly-OH	0,094	0,111	0,112
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH		0,154	0,113
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,106	0,096
1.D-glutamat	Fmoc-D- Glu(OtBu)-OH		0,144	0,098
2.D-glutamat			0,144	0,093
3.D-glutamat			0,144	0,086
4.D-glutamat			0,140	0,080
5.D-glutamat			0,127	0,071
6.D-glutamat			0,127	0,064
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH	0,082	/	

Tabela X: Kvantitativni podatki za sintezoDOTA-konjugiranega peptida STJ10.

STJ10				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
triptofan	Fmoc-Trp(Boc)-OH	0,088	0,186	0,109
glicin	Fmoc-Gly-OH		0,098	0,110
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH		0,154	0,098
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,106	0,090
1.D-glutamat	Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH		0,144	0,085
2.D-glutamat			0,191	0,082
3.D-glutamat			0,185	0,074
4.D-glutamat			0,179	0,075
5.D-glutamat			0,166	0,066
6.D-glutamat		0,166	0,060	
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH	0,076	/	

¹ Razmerje med množino aminokislina, ki jo želimo dodati in množino Fmoc zaščitne skupine, ki smo jo predhodno odstranili je 3:1.

Tabela XI: Kvantitativni podatki za sintezo skupnega C-terminaknega konca peptidov STJ5 in STJ11.

STJ5 in STJ11		(skupen C-terminalni del)		
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
metionin	Fmoc-Met-OH	0,156	0,232	0,183
triptofan	Fmoc-Trp(Boc)-OH		0,289	0,174
glicin	Fmoc-Gly-OH		0,156	0,170
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH		0,234	0,167
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,159	0,169

Tabela XII: Kvantitativni podatki za sintezo L-Glu distančnika DOTA-konjugiranega peptida STJ5.

STJ5 (L-Glu distančnik)			
aminokislina	formula AK	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
1.L-glutamat	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,109	0,079
2.L-glutamat		0,102	0,078
3.L-glutamat		0,102	0,074
4.L-glutamat		0,102	0,075
5.L-glutamat		0,102	0,072
6.L-glutamat		0,102	0,066
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH	0,113	/

Tabela XIII: Kvantitativni podatki za sintezo D-Glu DOTA-konjugiranega distančnika peptida STJ11.

STJ11 (D-Glu distančnik)			
aminokislina	formula AK	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
1.D-glutamat	Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH	0,109	0,112
2.D-glutamat		0,144	0,086
3.D-glutamat		0,144	0,077
4.D-glutamat		0,140	0,068
5.D-glutamat		0,127	0,062
6.D-glutamat		0,127	0,061

¹ Razmerje med množino aminokislina, ki jo želimo dodati in množino Fmoc zaščitne skupine, ki smo jo predhodno odstranili je 3:1.

DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH	0,078	/
------	----------------------------	-------	---

Tabela XIV: Kvantitativni podatki za sintezo skupnega C-terminaknega konca peptidov STJ6 in STJ12.

STJ6 in STJ12 (skupen C-terminalni del)				
aminokislina	formula AK	masa rezine [g]	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
aspartat	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0,156	0,257	0,184
metionin	Fmoc-Met-OH		0,205	0,176
triptofan	Fmoc-Trp(Boc)-OH		0,289	0,166
glicin	Fmoc-Gly-OH		0,156	0,161
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH		0,234	0,164
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,159	0,155

Tabela XV: Kvantitativni podatki za sintezo L-Glu distančnika DOTA-konjugiranega peptida STJ6.

STJ6 (L-Glu distančnik)			
aminokislina	formula AK	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
1.L-glutamat	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,109	0,079
2.L-glutamat		0,102	0,067
3.L-glutamat		0,102	0,066
4.L-glutamat		0,102	0,065
5.L-glutamat		0,102	0,063
6.L-glutamat		0,102	0,055
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH	0,096	/

Tabela XVI: Kvantitativni podatki za sintezo D-Glu distančnika DOTA-konjugiranega peptida STJ12.

STJ12 (D-Glu distančnik)			
aminokislina	formula AK	masa AK ¹ [g]	množina Fmoc [mmol]
1.D-glutamat	Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH	0,109	0,083
2.D-glutamat		0,144	0,078
3.D-glutamat		0,144	0,070

¹ Razmerje med množino aminokislinske, ki jo želimo dodati in množino Fmoc zaščitne skupine, ki smo jo predhodno odstranili je 3:1.

4.D-glutamat		0,140	0,069
5.D-glutamat		0,127	0,062
6.D-glutamat		0,127	0,058
DOTA	DOTA(tBu) ₃ -OH	0,100	/

Po končani sintezi je sledilo čiščenje peptidov. Nismo očistili celotne količine posameznega DOTA-konjugiranega peptida, ampak samo določen del. Za označevanje z ¹¹¹In namreč potrebujemo le malo DOTA-konjugiranega peptida, prav tako tudi pri hladnem označevanju z ^{nat}In. Mase surovega produkta in mase peptida, ki smo ga čistili, so podane v tabeli XVII.

Tabela XVII: Mase surovih produktov in mase peptidov za čiščenje skupaj steoretično maso DOTA-konjugiranega peptida in izkoristkom sinteze peptidnega dela.

oznaka	masa surovega produkta [mg]	teoretična masa DOTA-konjugiranega peptida [mg] ¹	izkoristek reakcije ² [%]	masa surovega produkta za čiščenje [mg] ³
STJ12	145	179,2	58,8	10,0
STJ11	95	191,6	50,3	3,8
STJ10	94	180,6	55,0	4,1
STJ9	85	164,7	57,1	17,0
STJ8	187	236,1	62,3	20,8
STJ7	71	97,5	62,8	20,0
STJ6	/ ⁴	170,1	58,6	10,5
STJ5	145	135,5	77,1	12,3
STJ4	83	111,0	71,6	9,6
STJ3	74	89,7	77,0	13,4
STJ2	94	91,9	97,0	16,0
STJ1	43	58,8	76,6	11,2

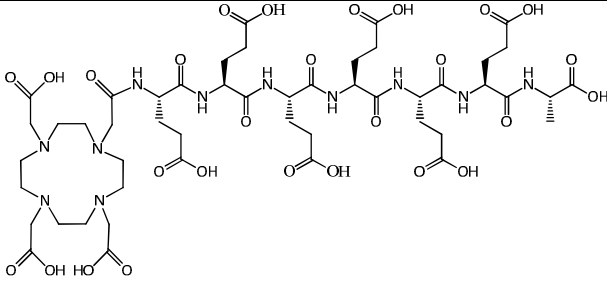
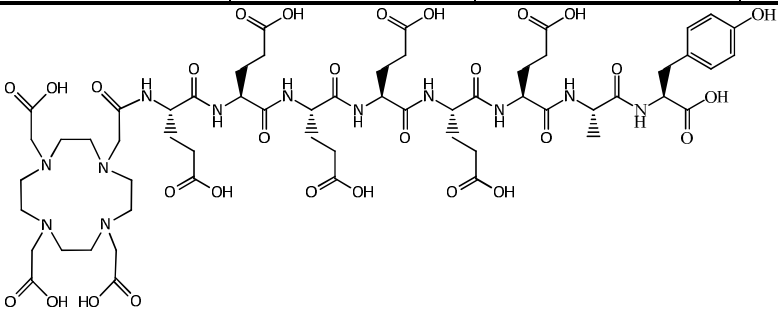
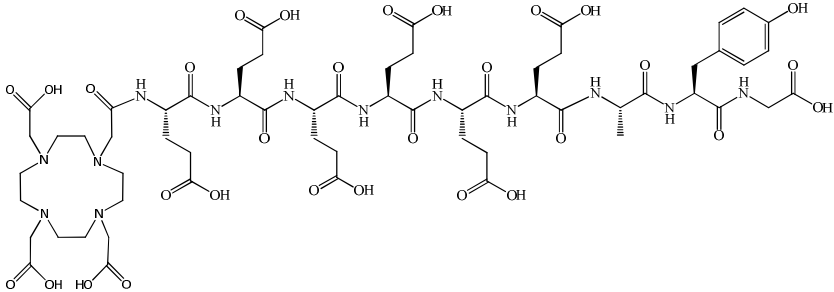
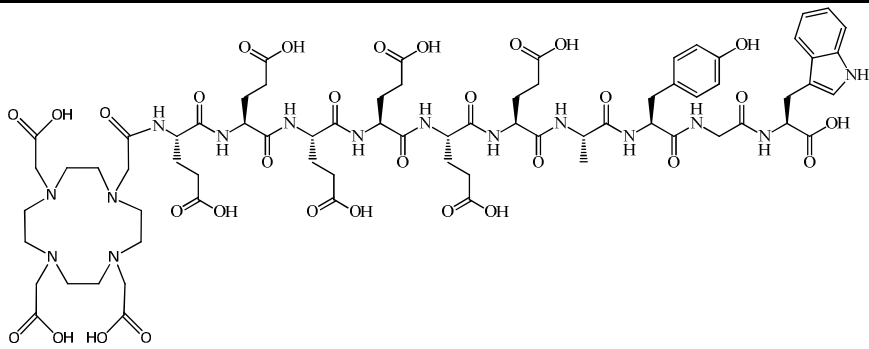
¹ Teoretična masa DOTA-konjugiranega peptida glede na množino aminokislino, ki smo jo kot prvo vezali na nosilec.

² Izkoristek se nanaša samo na peptidni del, do DOTA-e. Izračunan je iz množin Fmoc.

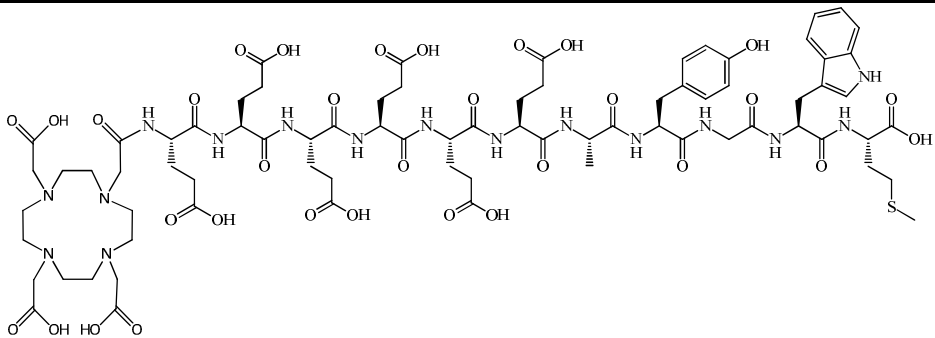
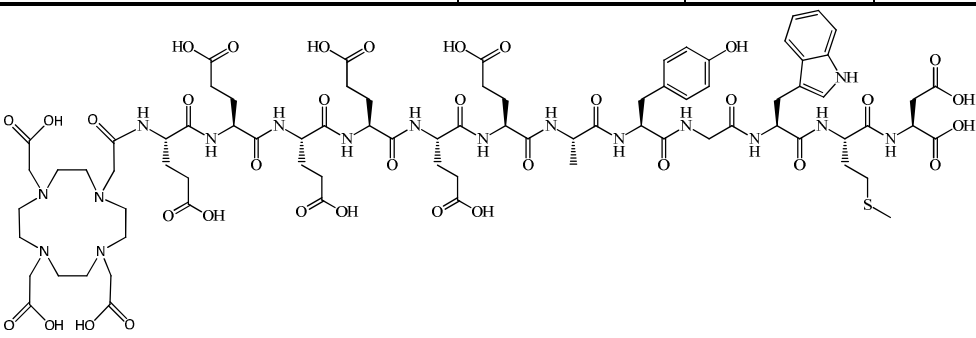
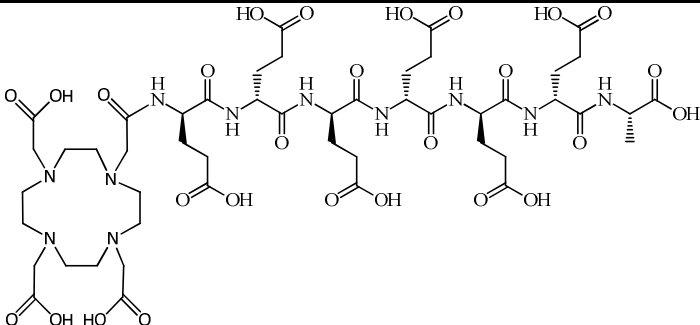
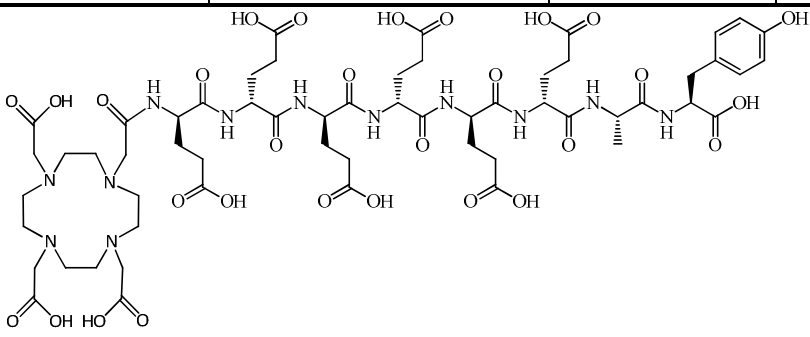
³ Mase so pri nekaterih peptidih zelo majhne, ker je zaradi neuspelega prvega čiščenja prišlo do velikih izgub.

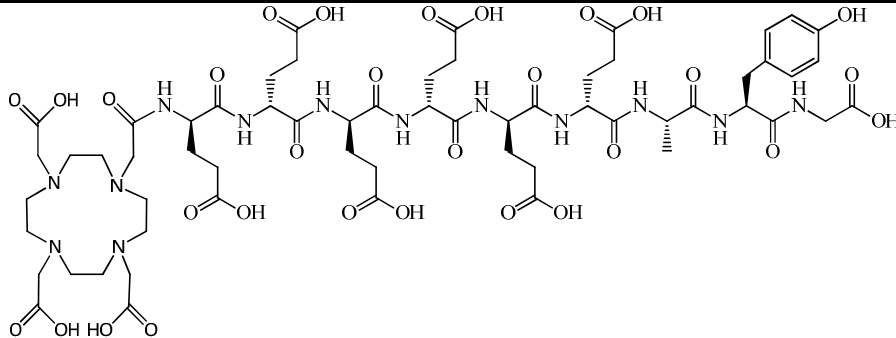
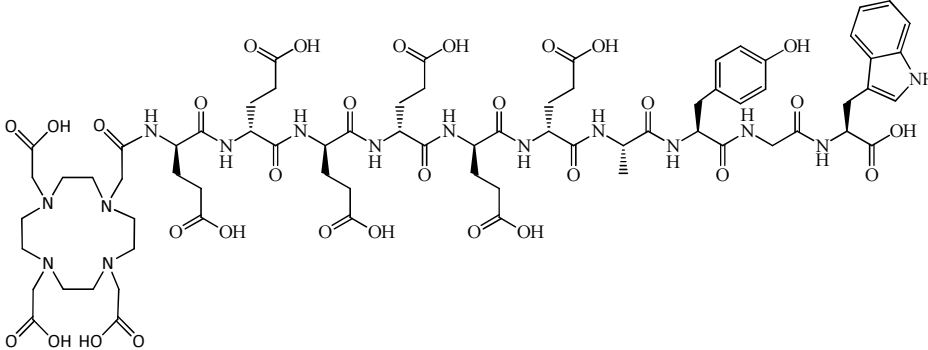
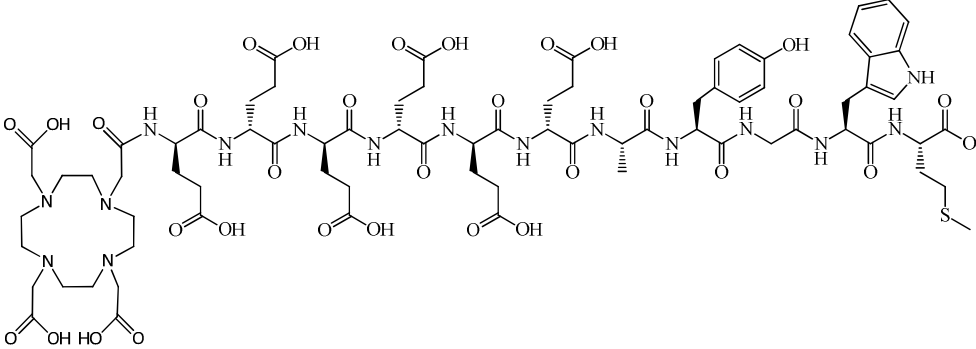
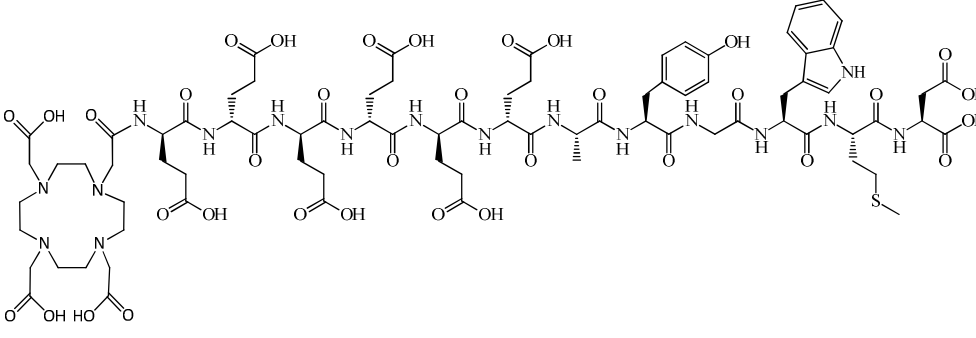
⁴ Podatek o masi surovega produkta STJ6 manjka, ker smo peptid raztopili v vodi, preden smo ga stehali.

Tabela XVIII: Sintetizirani metaboliti minigastrinskih analogov (D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (PP11) in (L-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (PP13).

oznaka	strukturna formula				t _r [min]
	AK zaporedje	molekulska formula	MW(ESI/MS)	čistota ¹	
STJ1					6,23
	DOTA-(L-Glu) ₆ -Ala-OH	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₁ O ₂₇	1251,9 [M+H ⁺]	100%	
STJ2					8,55
	DOTA-(L-Glu) ₆ -Ala-Tyr-OH	C ₅₈ H ₈₄ N ₁₂ O ₂₉	1412,9 [M-H ⁻]	98,6%	
STJ3					8,22
	DOTA-(L-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-OH	C ₆₀ H ₈₇ N ₁₃ O ₃₀	1469,0 [M-H ⁻]	98,4%	
STJ4					12,47
	DOTA-(L-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-OH	C ₇₁ H ₉₇ N ₁₅ O ₃₁	1655,7 [M-H ⁻]	100%	

¹ Čistoto smo detektirali na analitskem HPLC(MF: A = 0,1 % TFA v vodi in B = acetonitril, gradient: 0-20 min 5-50% B, pretok: 0,75 ml/min). V tabeli so dodani retencijski časi za posamezen peptid (t_r).

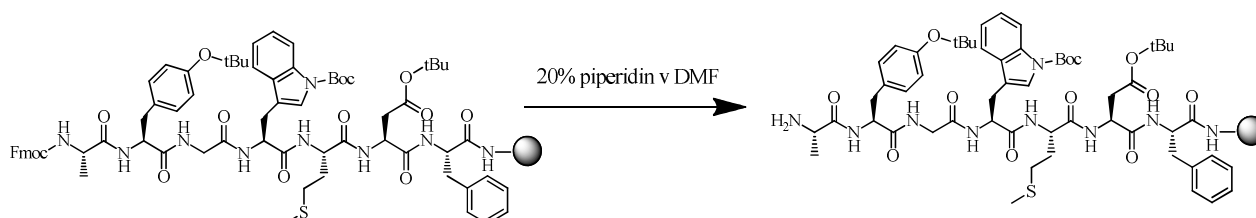
STJ5					13,95
	DOTA-(L-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-OH	C ₇₆ H ₁₀₃ N ₁₆ O ₃₂ S	1786,1 [M-H] ⁻	97,1%	
STJ6					13,25
	DOTA-(L-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-OH	C ₈₀ H ₁₁₁ N ₁₇ O ₃₅ S	1903,4 [M+H] ⁺	99,1%	
STJ7					6,50
	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-OH	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₁ O ₂₇	1251,9 [M+H] ⁺	100%	
STJ8					8,40
	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-OH	C ₅₈ H ₈₄ N ₁₂ O ₂₉	1413,0 [M-H] ⁻	97,1%	

STJ9				7,93
	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-OH	C ₆₀ H ₈₇ N ₁₃ O ₃₀	1469,0 [M-H] ⁻	98,0%
STJ10				12,50
	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-OH	C ₇₁ H ₉₇ N ₁₅ O ₃₁	1655,7 [M-H] ⁻	92,0%
STJ11				13,97
	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-OH	C ₇₆ H ₁₀₃ N ₁₆ O ₃₂ S	1786,1 [M-H] ⁻	95,7%
STJ12				13,28
	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-OH	C ₈₀ H ₁₁₁ N ₁₇ O ₃₅ S	1903,4 [M+H] ⁺	98,6%

4.2 SINTEZA DOTA-KONJUGIRANIH ANALOGO MINIGASTRINA NA TRDNEM NOSILCU

Pri sintezi DOTA-konjugiranih analogov minigastrina smo uporabili Rink Amide[®] rezino. Podobno kot pri sintezi metabolitov smo tudi tu uporabili Fmoc metodo. Zaščitna skupina za stransko verigo Trp je bila Boc, za Asp, Tyr, L-Glu in D-Glu pa tBu. C-terminalni del, zaščiten z Fmoc skupino in vezan na rezino je bil že predhodno sintetiziran.

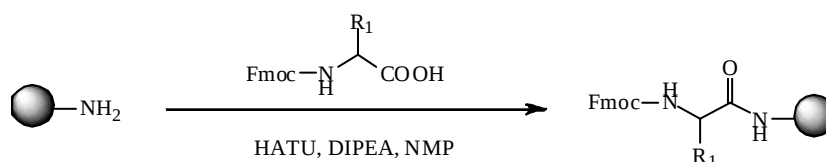
4.2.1 ODSTRANJEVANJE ZAŠČITNE SKUPINE S PREDHODNO SINTETIZIRANE PEPTIDNE SEKVENCE NA REZINI



Slika 17: Odstranjevanje Fmoc zaščite z alanina na predhodno sintetiziranem peptidu.

1. Ustrezno količino peptida na rezini (približno 100 μmol) smo najprej nabrekli z 3 ml DMF ali NMP ter jo dobro sprali z istim topilom.
2. Nato smo ga izpostavili 2 ml 20 % piperidina v DMF (1x10 min in 2x5 min), da smo odstranili Fmoc zaščitno skupino na terminalni $-\text{NH}_2$ skupini in jo naknadno sprali z DMF in iPrOH.
3. Frakcije smo zbrali in jih kvantitativno ovrednotili ($\lambda = 300 \text{ nm}$, $\epsilon = 7800 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2.2 POSTOPEK DODAJANJA AMINOKISLIN



Slika 18: Shema vezave aminokislin na nosilec in kasneje na nastajajoč peptid.

1. Ustrezno količino aminokisline (glej tabeli XIX in XX) in HATU (rezina:AK:HATU:DIPEA = 1:3:3:5) smo raztopili v 3 ml NMP ter pustili približno 15 min, da poteče aktivacija COOH skupine na aminokislini.
2. DIPEA-o smo dodali po 15 minutah, premešali in dodali rezini, ki mora biti nabreklijena.
3. Reakcija je potekala pri sobni temperaturi približno 1 uro ob počasnem mešanju.

4.2.3 KEISER TEST: kvalitativen test, ki pokaže prisotnost ali odsotnost prostih amino skupin.

1. Po končani reakciji smo rezino sprali z DMF oziroma NMP.
2. Rezino smo skrčili s spiranjem z iPrOH.
3. K raztopini 8 g fenola v 2 ml etanola smo dodali 0,2 ml 0,001 M vodne raztopine KCN v 9,8 ml piridina (raztopina A).
4. 0,5 g ninhidrina smo raztopili v 10 ml etanola (raztopina B).
5. Nekaj kroglic rezine smo dobro sprali z etanolom.
6. Dodali smo po 50 µl raztopine A in raztopine B.
7. Vse skupaj smo premešali in pustili 10 min segrevati pri temperaturi 95°C. Če se rezina obarva modro to pomeni pozitiven izid testa oziroma prisotnost prostih amino skupin. To pomeni, da reakcija ni potekla in jo je treba ponoviti, da zreagirajo še preostale proste amino skupine.

Po uspešni reakciji je sledilo odstranjevanje Fmoc zaščitne skupine (4.1.2) na novo pripete aminokisline, pripenjanje druge aminokisline (4.2.2), Keiser test (4.2.3) in spet odstranjevanje zaščitne skupine. To se ponavlja tako dolgo, da dobimo ustrezen minigastriński analog. Nato je sledilo še pripenjanje DOTA-e (4.1.5) in odstranjevanje zaščitnih skupin na novo sintetiziranega peptida ob hkratni cepitvi peptida z rezine (4.1.6). Kvantitativne podatke za posamezen DOTA-konjugiran peptid prikazujeta tabela XIX in tabela XX.

Tabela XIX: Kvantitativni podatki zavezavo distančnika na peptid STJ13.

STJ13				
aminokislina	formula AK	množina rezine ¹ [mmol]	masa AK ² [g]	množina Fmoc [mmol]
1.L-glutamat	Fmoc-Glu(OtBu)- OH	približno 0,100	0,128	0,100
2.L-glutamat			0,128	0,096
3.L-glutamat			0,123	0,090
DOTA	DOTA(tBu)3-OH		0,113	/

Tabela XX: Kvantitativni podatki zavezavo distančnika na STJ14.

STJ14				
aminokislina	formula AK	množina rezine ¹ [mmol]	masa AK ² [g]	množina Fmoc [mmol]
1.D-glutamat	Fmoc-D- Glu(OtBu)-OH	približno 0,100	0,128	0,099
2.D-glutamat			0,128	0,090
3.D-glutamat			0,116	0,090
DOTA	DOTA(tBu)3-OH		0,113	/

Po uspešno zaključeni sintezi je sledilo čiščenje peptidov. Zopet smo očistili samo del sintetiziranega DOTA-konjugiranega peptida. Podatki so podani v tabeli XXI..

Tabela XXI: Mase surovih produktov in mase peptidov za čiščenje skupaj z gradientom čiščenja.

oznaka	masa surovega produkta [mg]	teoretična masa DOTA- konjugiranega peptida [mg] ³	izkoristek reakcije ⁴ [%]	masa surovega produkta za čiščenje [mg]
STJ13	163,3	166,3	90,0	33,7
STJ14	161,7	166,3	90,9	31,4

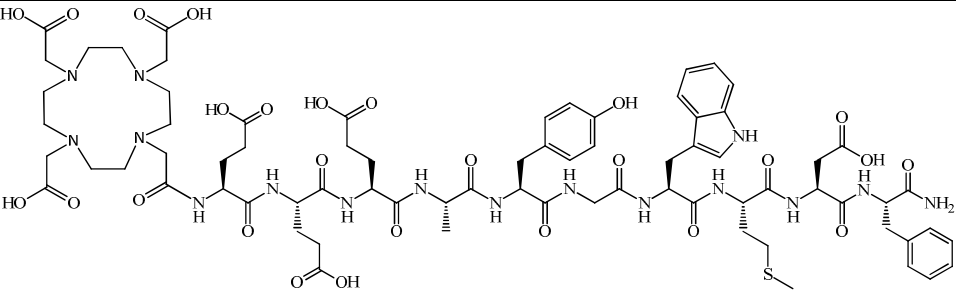
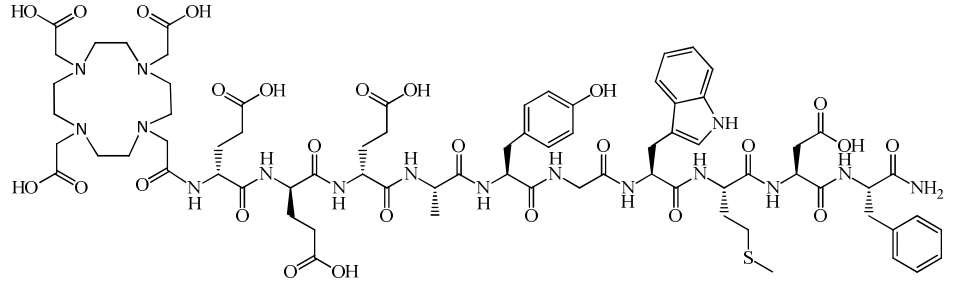
¹ Mišljena je množina predhodno sintetizirane aminokislinske sekvence na nosilcu.

² Razmerje med množino aminokislinske, ki želimo dodati in množino Fmoc zaščitne skupine, ki smo jo predhodno odstranili je 3:1.

³ Teoretična masa DOTA-konjugiranega peptida glede na množino aminokislinske, ki smo jo kot prvo vezali na nosilec.

⁴ Izkoristek se nanaša samo na peptidni del do vezave DOTA-e.

Tabela XXII: Sintetizirana minigastrinska analoga.

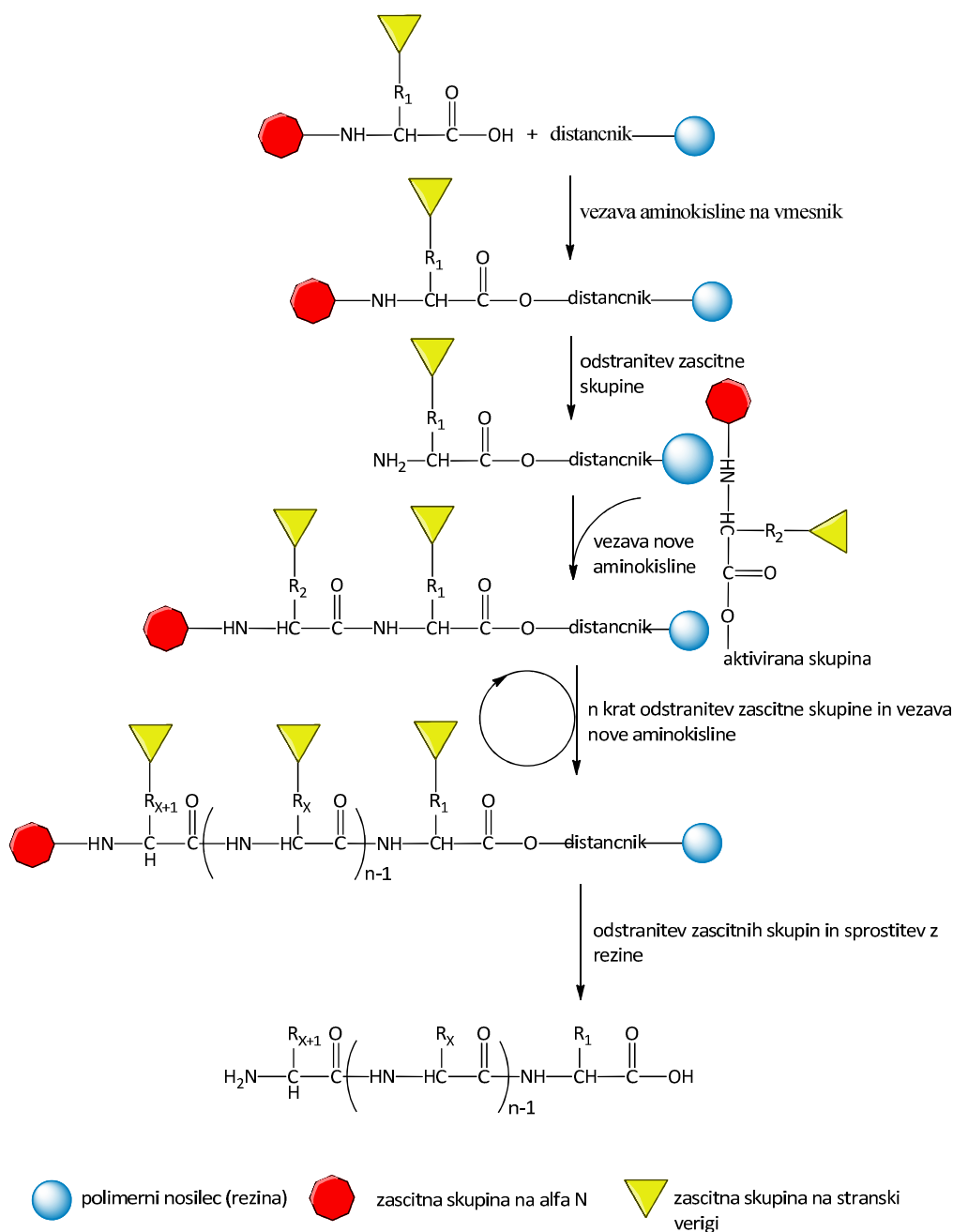
oznaka	strukturna formula				t _r [min]
	AK zaporedje	molekulska formula	MW(ESI/MS)	čistota ¹	
STJ13					15,40
	DOTA-(L-Glu) ₃ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	C ₇₄ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₂₆ S	1661,6 [M-H] ⁻	95,3%	
STJ14					15,53
	DOTA-(D-Glu) ₃ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	C ₇₄ H ₁₀₀ N ₁₆ O ₂₆ S	1661,7 [M-H] ⁻	100 %	

¹ Čistoto smo preverili na analitskem HPLC (MF: A = 0,1 % TFA v vodi in B = acetonitril, gradient: 0-20 min 5-50% B, pretok: 0,75 ml/min).

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 SINTEZA DOTA-KONJUGIRANIH ANALOGO MINIGASTRINA IN NJIHOVIH METABOLITOV

DOTA-konjugirane analoge minigastrina in njihove metabolite smo sintetizirali po principu sinteze peptidov na trdnem nosilcu (SPPS).



Slika 19: Splošna shema sinteze peptidov na trdnem nosilcu (SPPS).

Prednosti sinteze na trdnem nosilcu so:

- separacija peptida z nosilca je enostavna (filtracija in spiranje),
- avtomatizacija,
- minimalne izgube, ker ostane peptid skozi celotno sintezo vezan na nosilec.

Vendar pa ima sinteza na trdnem nosilcu tudi svoje slabosti:

- produkti stranskih reakcij, nepopolnih reakcij ali nečistote, ki izhajajo iz reagentov, se kopičijo na rezini in lahko kontaminirajo končni produkt,
- nečistote so lahko zelo podobne produktu in jih zato težje odstranimo,
- že vsaka najmanjša izguba v vsaki stopnji doprinese veliko k celotni izgubi,
- reakcijo težko spremljamo sproti, po navadi lahko uporabljamo samo teste, ki temeljijo na spremembi barve.[23]

Osnovni princip sinteze peptidov na trdnem nosilcu prikazuje slika 19. C-terminalno aminokislino vežemo na trden nosilec preko COOH skupine. Vse funkcionalne skupine na stranskih verigah aminokislin morajo biti zaščitene z ustrezno zaščitno skupino, ki ni občutljiva na reakcijske pogoje, ki jih uporabimo med samo reakcijo. Nato odstranimo zaščitno skupino na α -amino skupini vezane aminokisline. Drugo aminokislino aktiviramo, tvori se aktiviran ester, in jo pripnemo na že vezano aminokislino na rezini (nosilcu). Po vezavi rezino speremo, da odstranimo nezreagirane reagente, odstranimo zaščitno skupino iz druge (ravno pripete) aminokisline in po enakem postopku, kot je opisano zgoraj, dodamo tretjo aminokislino. Proces ponavljamo, dokler nimamo želenega peptida. Na koncu odstranimo peptid z nosilca in zaščitne skupine na stranskih verigah aminokislin. Če je možno, izberemo takšen reagent, s katerim izvedemo vse te sintezne stopnje hkrati.[23]

Ločimo dve metodi, Boc (Marrifield) SPPS in Fmoc SPPS. Pri Marrifield metodi se Boc zaščitna skupina uporablja za zaščito α -amino skupine. Običajno jo odstranimo s TFA ali TFA v diklorometanu. Nastali trifluoroacetat nevtraliziramo pred vezavo aminokisline z DIPEA-o v DCM ali *in situ* med vezavo aminokisline. Prvotno so za aktivacijo aminokisline uporabljali DCCI v DCM. Danes se bolj uporabljajo v naprej pripravljene simetrični anhidridi aminokislin ali benzotriazolilni estri v DMF ali NMP. Stranske verige so zaščitene z benzilnimi zaščitnimi skupinami. Slabost Boc metode je uporaba nevarnega brezvodnega vodikovega fluorida (HF) za cepitev peptida iz nosilca in draga laboratorijska oprema.[23, 24]

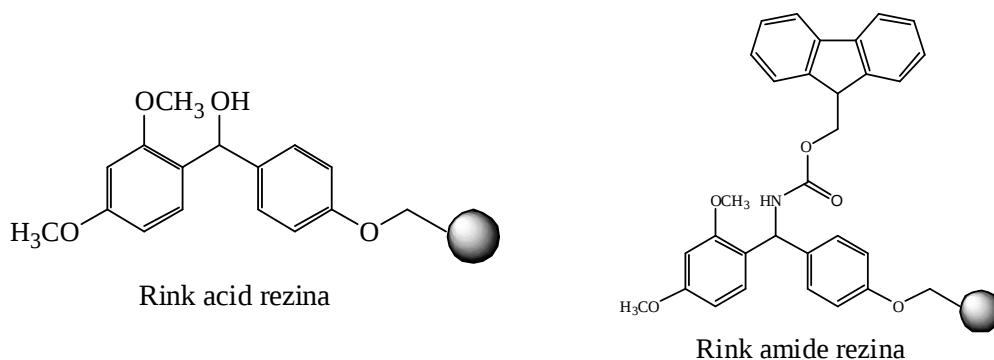
Za razliko od Boc SPPS, ki izkorišča različne koncentracijski gradient kisline za selektivno odstranjevanje zaščitnih skupin na NH_2 in stranski verigi, temelji Fmoc metoda na ortogonalnih zaščitnih skupinah. Uporablja se bazično občutljiva Fmoc skupina za zaščito α -

amino skupine in kislo občutljive zaščitne skupine za zaščito funkcionalnih skupin na stranskih verigi. Ker se zaščiti na α -amino skupini in na stranskih verigah odstranjujeta pod čisto drugačnimi pogoji, lahko za odstranitev produkta z rezine in zaščitnih skupin na stranskih verigah uporabimo bistveno milejše pogoje kot pri Boc metodi. V praksi se za odstranjevanje t-butil (tBu), tritilnih (Trt) in alkoksibenzilnih skupin uporablja TFA. TFA je odlično topilo za peptide, uporabljamo lahko standardno laboratorijsko steklovino in ker je hlapna, jo lahko enostavno odstranimo v odparevanjem.[23]

V Fmoc sintezi se kot topilo največkrat uporablja dimetilformamid (DMF). Mora biti brez primesi aminov, ki bi lahko odcepili Fmoc zaščitno skupino aminokislini, ki jo želimo vezati. DMF lahko očistimo z destilacijo pod znižanim tlakom ali refluksom nad ninhidrinom. N-metilpirolidon (NMP) je odlično topilo in lahko izboljša izkoristek vezave aminokisline na rezino, ker prepreči zvijanje in agregacijo (združevanje) nastajajočega peptida. Uporabljamo ga lahko samega ali pa v kombinaciji z DMF.[24]

Zaradi izboljšave distančnikov, zaščitnih skupin in postopkov odstranitve peptida iz rezine je najpogostejši problem pri sintezi peptidov agregacija. Nastajajoč peptid na rezini lahko tvori sekundarne strukture ali aggregate z ostalimi peptidnimi verigami ali polimernimi verigami nosilca. To zmanjša izkoristek reakcije. Vzrok agregacijam so vodikove in hidrofobne interakcije. Posledice teh asociacij so nepopolna hidratacija kompleksa peptid-rezina, nenadno stisnjenje nosilca in zmanjšano prodiranje reagentov, kar se v končni fazi kaže kot nepopolno odstranjevanje Fmoc zaščitne skupine ali pa nepopolno pripenjanje aminokisline. Agregacija se začne pojavljati takrat, ko dodamo peti aminokislinski ostanek. Tendencia agregacije je odvisna od peptida, zaščitnih skupin na stranskih verigah in od števila sekvenc na peptidu z veliko Ala, Val, Ile, Asn ali Gln ostankov.[23]

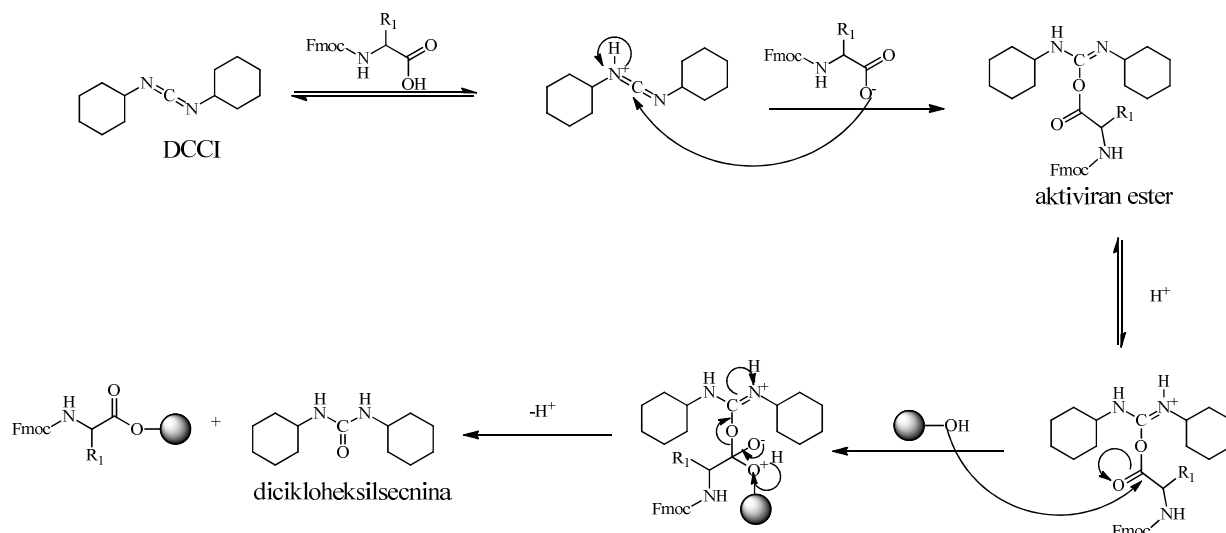
Kadar želimo imeti več kot 50 μmol peptida, sintezo izvedemo na trdnem nosilcu (rezini).[23] V naših sintezah smo uporabili Rink Acid[®] rezino za sintezo metabolitov PP11 in PP13 ter Rink Amide[®] rezino za sintezo minigastrinskih analogov (slika 20). Rink Amide[®] rezina je standardni nosilec za sintezo karboksi- in sulfonamidov. Benzilhidroksilamin je povezan direktno na polistirensko osnovo preko etrske vezi. Ko odstranimo Fmoc zaščitno skupino, lahko aminske skupino (ki predstavlja vezavno mesto na rezini) aciliramo s standardnimi metodami sinteze amidov. Čeprav je nastala amidna vez stabilna v različnih reakcijskih pogojih, jo enostavno cepimo s 95 % TFA.[24] Rink Acid[®] rezina je zelo občutljiva na kisle pogoje. Cepitev z rezine dosežemo že z 10 % AcOH v DCM. Zato je med samo sintezo potrebna pazljivost, da preprečimo potencialne izgube zaradi labilnosti v kislem.[24]



Slika 20: Rink Acid[®] in Rink Amide[®] nosilca.

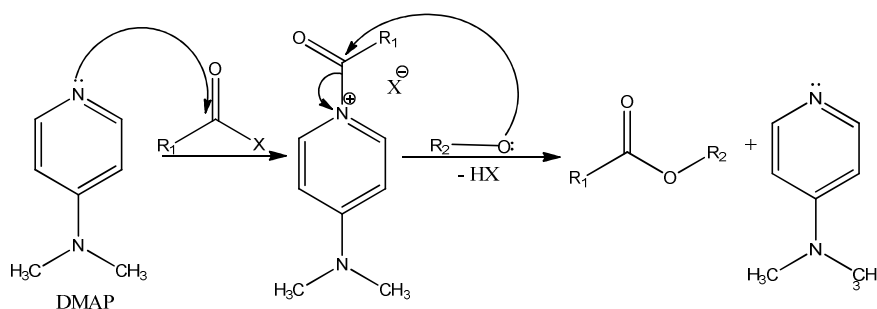
Več kot polovica aminokislin ima stranske verige, na katerih so reaktivne funkcionalne skupine. Pri sintezah na trdnem nosilcu je pomembno, da so te funkcionalne skupine zaščitene zaradi relativno ostrih pogojev med reakcijo in zahteve po čim večji uspešnosti reakcije. Po navadi se uporabljajo zaščitne skupine, ki jih odstranjujemo s TFA, ker to omogoča hkratno odstranjevanje peptida iz nosilca.[23] Pri naših sintezah smo uporabili Boc zaščitno skupino pri Trp (Fmoc-Trp(Boc)-OH) in tBu skupino za zaščito stranskih verig Asp (Fmoc-Asp(OtBu)-OH), D-Glu (Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH), L-Glu (Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH) in Tyr (Fmoc-Tyr(OtBu)-OH).

Prva stopnja v sintezi peptida na trdnem nosilcu je vezava C-terminalne aminokisline na nosilec oziroma njegov distančnik. Ta stopnja je zelo pomembna, ker izkoristek te stopnje vpliva na celokupen izkoristek reakcije, poleg tega pa se lahko vezavna mesta na rezini zasedejo v katerikoli naslednji stopnji, če se v prvi stopnji ne in tako dobimo poleg zelenega peptida še številne nečistote.[23] Pri rezinah, ki imajo vezavno mesto za peptid hidroksilno skupino, kot ga ima Rink Acid[®] rezina, prvo aminokislino vežemo preko estra. Tvorba estra je običajno zahteven proces. Nastanejo lahko dipeptidi, pride do racemizacije ali pa je izkoristek reakcije zelo nizek, če reakcije ne izvajamo pod nadzorovanimi pogoji. Najenostavnejši način priprave estra je s simetričnim anhidridom zaščitene aminokisline in DMAP kot katalizatorjem, vendar lahko zaradi bazičnih lastnosti te spojine pričakujemo zgoraj omenjene stranske reakcije. Priporočilo izumitelja Rink Acid[®] rezine je uporaba DCC kot aktivacijskega reagenta COOH skupine, kar smo upoštevali pri naših sintezah. Z DCCI smo najprej aktivirali karboksilno skupino aminokisline, pri čemer je nastal aktiviran ester (slika 21). Sledila je adicija hidroksilne skupine trdega nosilca na elektrofilni C-atom karbonilne skupine aktiviranega estra aminokisline z DCCI.



Slika 21: Mehanizem esterifikacije z DCCl.

DMAP (4-dimetilaminopiridin) je igral vlogo pomožnega nukleofila in/ali katalizatorja (glej sliko 22.)



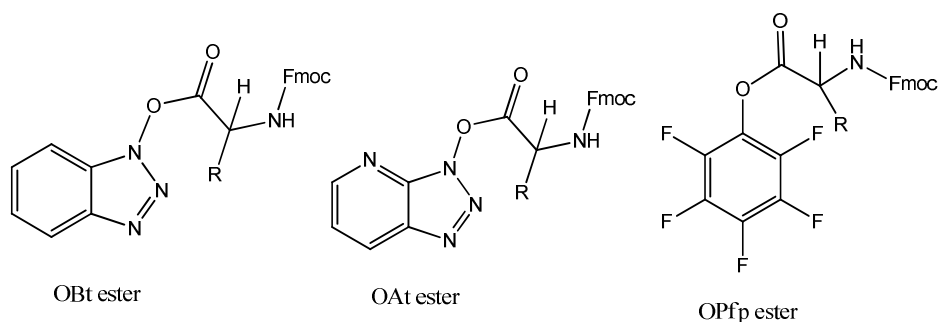
Slika 22: Mehanizem DMAP v vlogi pomožnega nukleofila/katalizatorja.

Sledila je druga stopnja, tvorba amidne vezi z naslednjo aminokislino. Največ metod vključuje aktivacijo karboksilne kisline na aminokislino. Pristopi, ki jih po navadi za takšne reakcije uporabljamo v organski kemiji, so preostri, saj lahko nastanejo preveč reaktivni intermediati, ki so neselektivni in posledično vodijo do nastanka stranskih produktov. V sintezi peptidov poznamo zato milejše metode, ki jih v glavnem razdelimo na štiri tipe:

- **KARBODIIMIDI:** Karbodiimidi so bili v preteklosti eni od najpogostejše uporabljenih *in situ* aktivacijskih reagentov. DCCl, ki se je prvič omenjal 1950, ostaja najbolj poznan in zlasti primerna izbira v nepolarnem okolju polistirenskih nosilcev. Reakcija se običajno izvaja pri sobni temperaturi v DCM, 12 ur. Z namenom povečanja topnosti

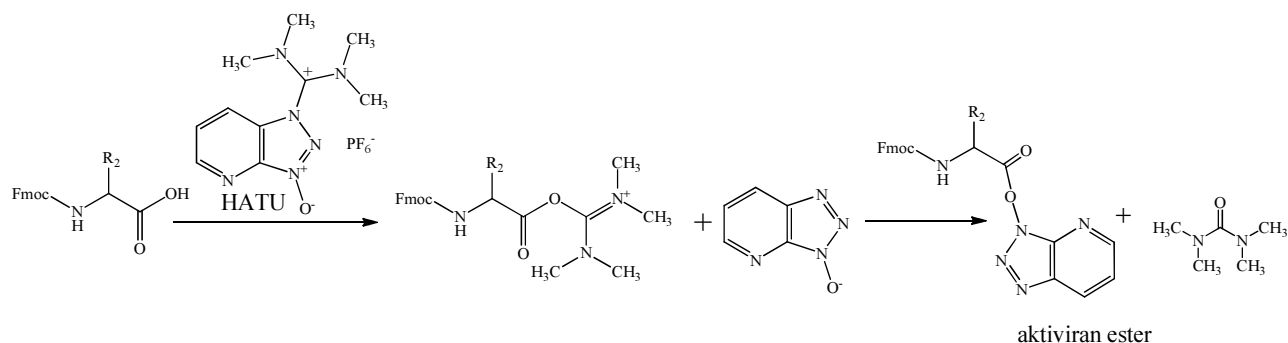
lahko dodamo tudi DMF. Glavna slabost DCCI je eliminacija vode (dehidracija) iz Asn in Gln ostankov. Dodatek HOBt-a lahko dehidracijo prepreči in obenem deluje kot katalizator. Druga slabost pa je nastanek netopne dicikloheksilsečnine.

- **SIMETRIČNI ANHIDRIDIDI:** Simetrične anhidride je uporabljalo veliko raziskovalnih skupin zaradi njihove dobre reaktivnosti. Tvorimo jih *in situ* iz dveh ekvivalentov zaščitene aminokisline in enega ekvivalenta DCC v DCM. Nastalo dicikloheksilsečnino odstranimo s filtriranjem in reakcijo nadaljujemo na rezini v DMF. Veliko aminokislin (Ala, Gly, Nle, Cys, Gln, Asn) v DCM ni topnih. Poleg tega je aktivacija s simetričnimi anhidridi potraten proces, ker za vezavo ene molekule aminokisline porabimo dva ekvivalenta te aminokisline.
- **AKTIVIRANI ESTRI:** Med mnogimi aktivirani estri so samo pentafluorofenilni estri (OPfp) in OBt estri našli mesto v SPPS (slika 23). OBt estre enostavno pripravimo z DCCI, DIC ali DIPCDI/HOBt *in situ*. Tudi OPfp estri so učinkoviti reagenti pri N-aciliranju. Gre za vnaprej pripravljene estre. Njihova kemijska struktura dopušča malo možnosti za stranske reakcije. Reagirajo nekoliko počasneje kot simetrični anhidridi. Dodatek HOBt-a reakcije pospeši. Vendar trenutno ni na voljo vseh aminokislin v obliki teh estrov, ker nekateri težko kristalizirajo in jih je težje očistiti.
- **AKTIVACIJSKI REAGENTI COOH SKUPINE:** In situ aktivacijski reagenti so splošno sprejeti, ker so enostavni za uporabo, dajejo hitre reakcije in po navadi ne prihaja do stranskih reakcij. Večina je osnovana na fosfonijevih ali aminijevih soleh, ki ob prisotnosti terciarnega amina enostavno pretvorijo aminokislino do aktivnih intermediatov. Najpogosteje uporabljeni BOP, PyBOP, HBTU in TBTU tvorijo OBt estre. Reagenta HATU in HCTU ob prisotnosti baze pretvorita karboksilno kislino do ustreznega OAt oziroma 6-CIOBt estra. Takšni estri so bolj reaktivni kot njihovi OBt analogi zaradi nižjega pKa HOAt in HOCt v primerjavi z HOBt. Razen tega ima HOAt dodano prednost zaradi piridinskega dušika.[23, 24]



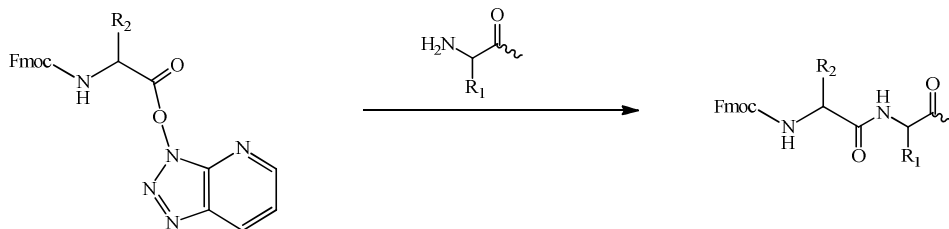
Slika 23: Različni aktivirani estri aminokislin.

Izkazalo se je, da je najbolj učinkovit aktivacijski reagent COOH skupine HATU, zato se uporablja pri reakcijah, ki težje potečejo. HATU brez težav pretvori z Fmoc zaščiteno aminokislino ob prisotnosti terciarnega amina (DIPEA) do ustreznega 9-azabenzotriazolilnega estra (OAt estra). Mehanizem prikazuje slika 24.[23]



Slika 24: Mehanizem reakcije aminokislino s HATU do aktiviranega estra.

V naslednji stopnji aktiviran ester reagira z aminokislino, tako da nukleofilna aminska skupina na aminokislini reagira z elektrofilnim karbonilnim C-atomom aktiviranega estra, pri čemer nastane amida (peptidna) vez (slika 25).



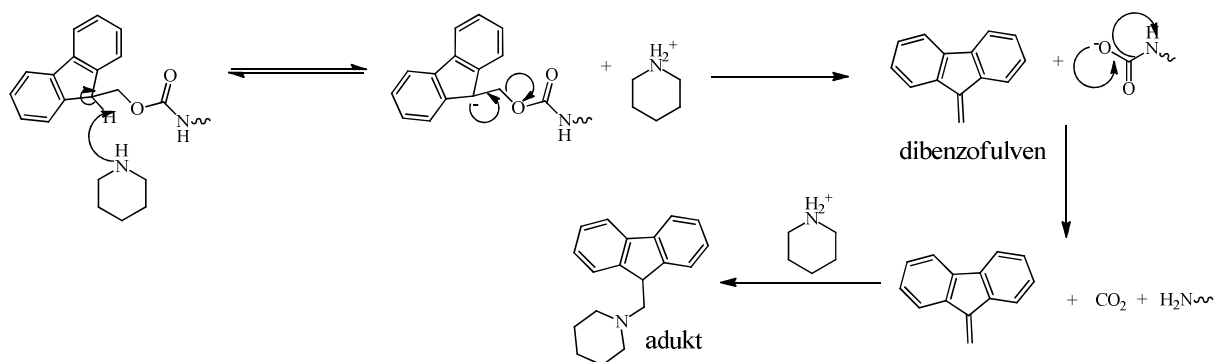
Slika 25: N-aciliranje s pomočjo aktiviranega estra.

Po istem principu smo vezali tudi prvo aminokislino na Rink Amide[®] rezino, le da je v tem primeru z aktiviranim estrom reagirala aminska skupina distančnika. Prav tako smo s HATU aktivirali bifunkcionalni kelator DOTA in ga na peptid vezali na enak način. Posebej smo bili pozorni na ustrezen pH. Le v alkalnem, pri pH nad 8, nastane amidna vez med DOTA-o in zadnjo vezano aminokislino. Alkalen pH je tudi sicer pomemben pri nastanku amide vezi med dvema aminokislinama. Reakcija poteka dlje kot pri aminokislinah, in sicer 3-5 ur. Med reakcijo smo preverili pH in ga z dodatkom DIPEA-e naravnali nazaj na 8, če je padel.

Najbolj poznan kvalitativni test za preverjanje prisotnosti oziroma odsotnosti prostih amino skupin je razvil Keiser, po katerem nosi Keiser test tudi ime.[24] Pri testu potrebujemo dve

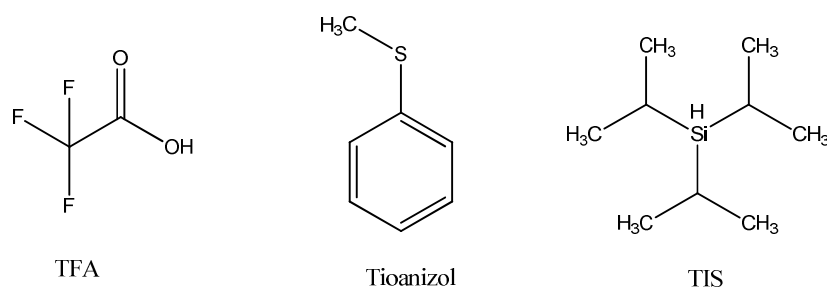
raztopini: raztopino ninhidrina v etanolu in raztopino fenola v etanolu, kateremu dodamo vodno raztopino kalijevega cianida v piridinu. Če so prisotne proste aminske skupine oziroma če reakcija vezave nove aminokisline ni potekla v celoti, se raztopina po segrevanju na 100°C obarva temno modro, v nasprotnem primeru pa ostane rumena. V primeru modre barve je potrebno reakcijo vezave nove aminokisline ponoviti, ker lahko nastanejo stranski produkti in slabši izkoristki reakcije.[25] Test je občutljiv, hiter in enostaven, vendar je potrebno poudariti, da nekatere aminokisline s prosto aaminsko skupino (serin, asparagin, aspartat) ne kažejo pričakovane temno modre barve, ki je značilna za prisotnost primarnih amino skupin. Tudi prolin, kot sekundarni amin, je ne kaže. Občasno dobimo lažno negativen rezultat testa, posebno pri zaporedjih, ki so močno agregirana. Zaradi vseh teh vzrokov moramo biti zelo previdni pri oceni poteka reakcij (vezave nove aminokisline in odstranitvi zaščitne skupine) na trdnem nosilcu. Na razpolago je še več testov, in sicer masna spektrometrija, TNBS test, detekcija pikrinske kisline in test s kloranilom, ki se priporoča za določanje iminokislin (prolin).[23, 24]

Običajno Fmoc zaščitno skupino odstranimo z 20-50 % piperidinom v DMF. Mehanizem odstranjevanja prikazuje slika 26. Ključni korak je deprotoniranje fluorenskega obroča s piperidinom, pri čemer nastane aromatski ciklopentadienski tip intermediata. Ta se hitro odcepi, iz nega pa nastane dibenzofulven, ki s piperidinom tvori adukt. Produkt reakcije dobro absorbira v UV področju, kar lahko izkoriščamo za spremljanje reakcije. Zbiramo alikvote in nato pri 300 nm izmerimo absorbanco. Na ta način lahko kvantitativno vrednotimo uspešnost vezave aminokisline na nastajajočo peptidno verigo. V večini primerov je odstranitev Fmoc uspešna, pri dolgih peptidih pa tudi pri visokih koncentracijah piperidina ne moremo doseči popolne odstranitve. V tem primeru je dobro povečati čas izpostavitve piperidinu ali pa uporabiti močnejšo bazo (DBU).[23]



Slika 26: Mehanizem odstranitve Fmoc zaščitne skupine s piperidinom v DMF.

Pred cepitvijo peptida z nosilca je pomembno, da rezino dobro speremo in s tem odstranimo vse sledi DMF. V splošnem cepitev dosežemo z 95 % TFA v 1-3 urah. S TFA se odstranijo tudi vse t-butilne zaščitne skupine, le da je čas izpostavljenosti kemikaliji nekoliko daljši. Med procesom nastajajo zelo reaktivni kationski intermedii, ki lahko reagirajo in spremenijo aminokisline z elektronegativnimi funkcionalnimi skupinami (tirozin, triptofan, metionin, cistein). Zato se TFA dodajajo različni nukleofilni reagenti (lovilci radikalov), ki te ione ujamejo. Kot lovilec radikalov se velikokrat uporablja voda, ki je zmerno učinkovita za tBu katione in produkte cepitve arilsulfonil zaščitnih skupin. 1,2-etanditiol (EDT) je najboljši lovilec radikalov za katione iz tBu skupine, obenem pa, kot voda, nudi zaščito nezaščitenemu Trp pred sulfoniranjem. Oksidacijo metionina preprečimo z dodatkom etilmetilsulfida, etanditiola ali tioanizola. Za fenol velja, da zaščiti Tyr in Trp aminokislinske ostanke. Trialkilsilani, med njimi tudi triizopropilsilan (TIS) in trietilsilan (TES), so se izkazali za odlične nadomestke EDT, zlasti za peptide, ki vsebujejo Arg in z Boc zaščiten Trp. So brez močnega vonja in lovijo zelo stabilne katione, ki nastanejo pri odcepitvi Trt in Tmob zaščitnih skupin ter Rink Amide[®] rezine. Če je uporabljena katera od teh, se priporočajo trialkilsilani. Na razpolago so številne zmesi za cepitev z nosilca in odstranitev zaščitnih skupin.[23] Uporabili smo zmes po protokolu TFA:voda:tioanizol:TIS v razmerju 91:3:5:1 (slika 27). Po cepitvi z nosilca peptid običajno oborimo s hladnim dietiletom ali tBu metilnim etrom. Peptid lahko oborimo direktno v raztopini s TFA ali pa TFA najprej odparimo. Slednji način po navadi daje boljše izkoristke, še posebej v primeru kratkih peptidov. [23]



Slika 27: Strukture sestavin zmesi, ki smo jo uporabili za cepitev peptida z nosilca.

Na koncu je bilo potrebno DOTA-konjugirane peptide še očistiti. Med samo sintezo, če reakcije ne potekajo kvantitativno, nastajajo različno dolga zaporedja aminokislin, ki jih je potrebno odstraniti. V splošnem se uporabljajo kromatografske metode, ki temeljijo na razliki v naboju (ionsko-izmenjevalna kromatografija) in hidrofobnosti (reverzno-fazna

kromatografija). Slednji način smo uporabili tudi mi. Kromatografski pogoji so opisani pri poglavju Materiali in metode (Preparativni HPLC). Čistili smo dvakrat, po neuspešnem čiščenju v Heidelbergu je sledilo čiščenje še na Kliniki za nuklearno medicino.

5.2 OZNAČEVANJE Z RADIOAKTIVNIM IN NERADIOAKTIVNIM INDIJEM

Kot je bilo že omenjeno v uvodu, je pri radiofarmaku pomembna integriteta radioaktivne oznake (radionuklida). Uporabiti je potrebno ustrezen način označevanja, ki bo omogočal, da ostane radioaktivni izotop pripet na nosilno molekulo (peptid). Če je radiofarmak namenjen ne samo diagnostiki, ampak tudi terapiji, je integriteta še toliko bolj pomembna. Trivalentne kovine (M^{3+}), kot so galij, indij, itrij, lutecij, se enostavno obarjajo v vodni raztopini z anioni OH^- , fosfati in karbonati. Visoka afiniteta do fosfata pojasni afiniteto do lokalizacije v kosteh. Rezultat je potencialna toksičnost za kostni mozeg pri β -sevalcih z dolgo razpolovno dobo. Rešitev se ponuja v bifunkcionalnem kelatorju (slika 28), delu radiofarmaka, ki je na eni strani kovalentno vezan na nosilno molekulo in na drugi močno kompleksira radionuklid. Kelator mora zaradi zgoraj omenjenih razlogov tvoriti kelat z visoko termodinamsko stabilnostjo, da ohrani integriteto radiofarmaka v tekmi proti fiziološkim kelatorjem, na primer transferinu. Drug, skoraj bolj pomemben parameter, je kinetična inertnost in se nanaša na stopnjo disociacije radionuklida z radiofarmaka. Medtem, ko je hitra disociacija značilna za komplekse radionuklida z acikličnim kelatorjem, so kompleksi z makrocikličnim kelatorjem veliko bolj kinetično inertni. Dober bifunkcionalni kelator mora biti odporen na radiolizo, ker velike doze β -sevanja povzročijo nastanek reaktivnih radikalov, ti pa znaten del razgradnje kelata. Poleg tega je pomembna hidrofilnost kelatorja, kar pospeši očistek radiofarmaka iz krvi in izločanje skozi ledvica.[26, 27]

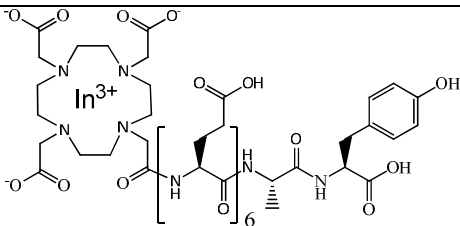
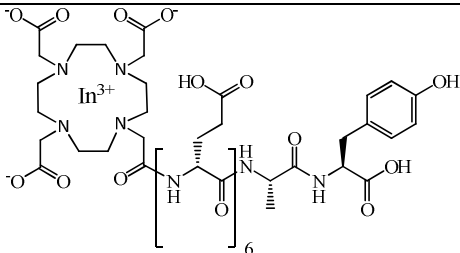
Prednost acikličnega kelatorja DTPA je v samem postopku radiooznačevanja, saj je označevanje hitro in poteka pod milimi pogoji (sobna temperatura in pH od 4 do 7). V nasprotju je kinetika označevanja DOTA-konjugiranih peptidov počasna in veliko bolj odvisna od pogojev označevanja. Faktorji, kot so količina DOTA-konjugiranega peptida, pH reakcijske zmesi, temperatura in čas segrevanja, pufer, koncentracija pufra, stabilizacijski faktor in njegova koncentracija in prisotnost kovin v sledih (Fe^{3+} in Zn^{2+}), vplivajo na izkoristek radiooznačevanja. Nastane manj kelata, če so prisotne sledi kovinskih ionov, zato se priporoča, da teh nečistoč ni. Visoke temperature in segrevanje ponavadi izboljšajo izkoristek označevanja, vendar lahko ta pristop uporabljamo le, če molekula ni termolabilna.

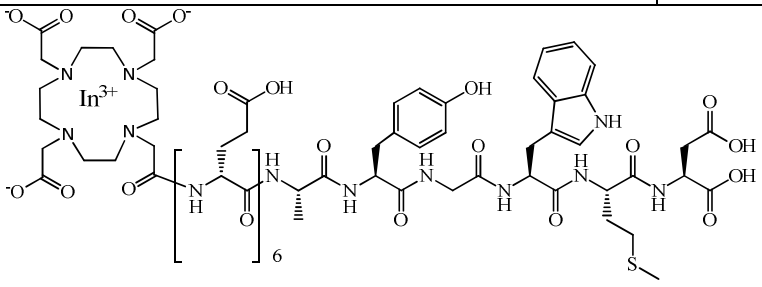
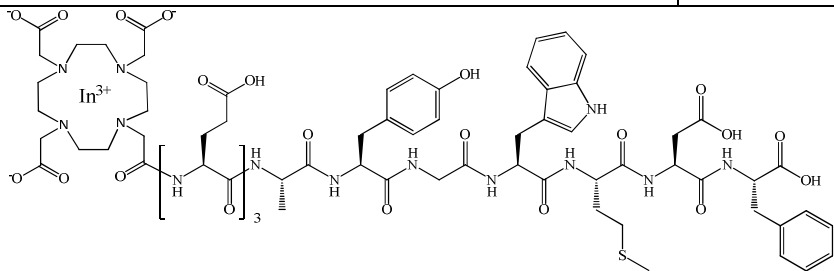
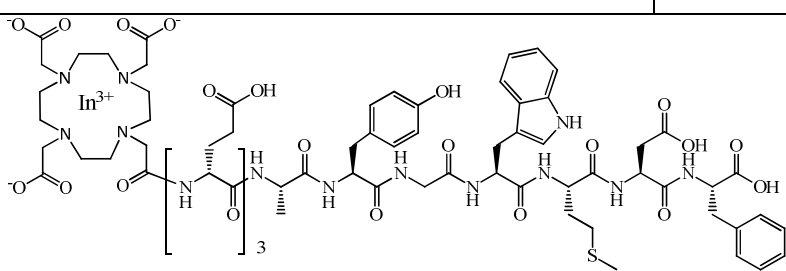
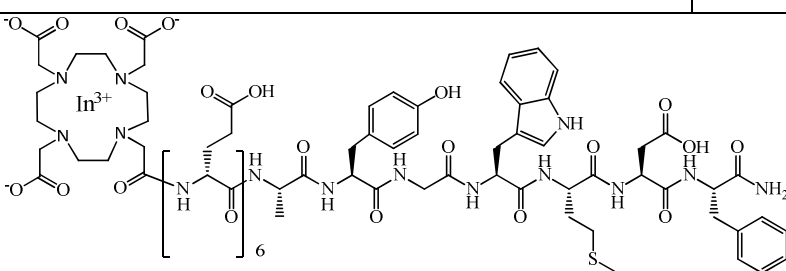
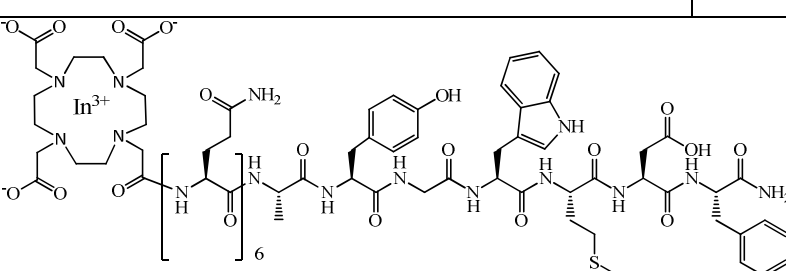
Izbira pufra je odvisna od pH, pri katerem je kompleksacija optimalna. Izogibamo se uporabi fosfatnega in karbonatnega pufra zaradi izobarjanja. Amonijev acetatni in citratni pufer sta boljša izbira.[26]

Za izvedbo raziskave serumske stabilnosti smo DOTA-konjugirane analoge minigastrina in njegove metabolite označili z gama-sevalcem ^{111}In , za preiskave s CD-jem (cirkularnim dikroizmom) pa z neradioaktivnim indijem ($^{\text{nat}}\text{In}$). Indij se nahaja v 3. skupini (po novem IUPAC poimenovanju v 13. skupini) periodnega sistema. Ta redka, mehka in lahko taljiva kovina ima močno težnjo, da tvori $3+$ ione, ki interagirajo s polidentatnimi ligandi z anionskim kisikom (karboksilat) in dušikom kot donorskim atomom. DOTA se zato izkaže kot primeren kelator za kompleksacijo indija.

Minigastrinske analoge smo hladno označili po protokolu opisanem pod Označevanje z neradioaktivnim ($^{\text{nat}}\text{In}$) indijem (hladno označevanje) v poglavju Materiali in metode. Uporabili smo presežek InCl_3 , da je bil izkoristek označevanja čim večji. Poleg tega smo lahko presežek prostega $^{\text{nat}}\text{In}^{3+}$ enostavno odstranili med spiranjem kolone z vodo. Te hladno označene minigastrinske analoge smo uporabili za preučevanje sekundarne strukture s cirkularnim dihidroizmom. Iz kemijsko/farmacevtsko/biološkega vidika je namreč povsem enako, če je peptid označen z radioaktivnim ali pa stabilnim $^{\text{nat}}\text{In}$ oziroma drugim izotopom. V tabeli XXIII so predstavljeni pripravljene hladno označeni minigastrinski analogi.

Tabela XXIII: Analiza masnih spektrov neradioaktivno označenih minigastrinskih analogov in nekaterih metabolitov PP11.

oznaka	strukturna formula	
	AK zaporedje	MW(ESI/MS)
$[\text{natIn}]\text{-STJ2}$		
	$[\text{natIn}\text{-DOTA}]\text{-Glu}_6\text{-Ala-Tyr-OH}$	1524,4 [M-H]
$[\text{natIn}]\text{-STJ8}$		

	$[\text{natIn-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-OH}$	1524,4 [M-H ⁻]
$[\text{natIn}]\text{-STJ12}$		
	$[\text{natIn-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-OH}$	2013,7 [M-H ⁻]
$[\text{natIn}]\text{-STJ13}$		
	$[\text{natIn-DOTA}]\text{-Glu}_3\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$	1773,5 [M-H ⁻]
$[\text{natIn}]\text{-STJ14}$		
	$[\text{natIn-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_3\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$	1773,5 [M-H ⁻]
$[\text{natIn}]\text{-PP11}$		
	$[\text{natIn-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$	2158,8 [M-H ⁻]
$[\text{natIn}]\text{-PP20}$		
	$[\text{natIn-DOTA}]\text{-(Gln)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$	2153,9 [M-H ⁻]

Označevanje minigastrinskih analogov z radioaktivnim ^{111}In je potekalo po protokolu, opisanem v poglavju Materiali in metode (Označevanje z radioaktivnim ^{111}In). V primeru radiooznačevanja uporabimo presežek DOTA-konjugiranega peptida in ne obratno, saj želimo imeti čim manj prostega ^{111}In ($< 10\%$), in sicer brez dodatnega čiščenja (kot je npr. SPE). Pri vseh je bilo označevanje uspešno, radiokemijska čistota je bila v vseh primerih večja od 90% oziroma je bila površina pod krivuljo s CaDTPA kompleksiranega ^{111}In pod 10% . CaDTPA kompleksira ^{111}In , tako da na radio-HPLC detektiramo prosti ^{111}In kot ^{111}In -DTPA, kar prepreči morebitno zadrževanje prostega ^{111}In na koloni. Radioaktivno označeni minigastrinski metaboliti PP11 so predstavljeni v tabeli XXIV.

Tabela XXIV: HPLC analiza radiooznačenega analoga minigastrina in njegovih metabolitov.

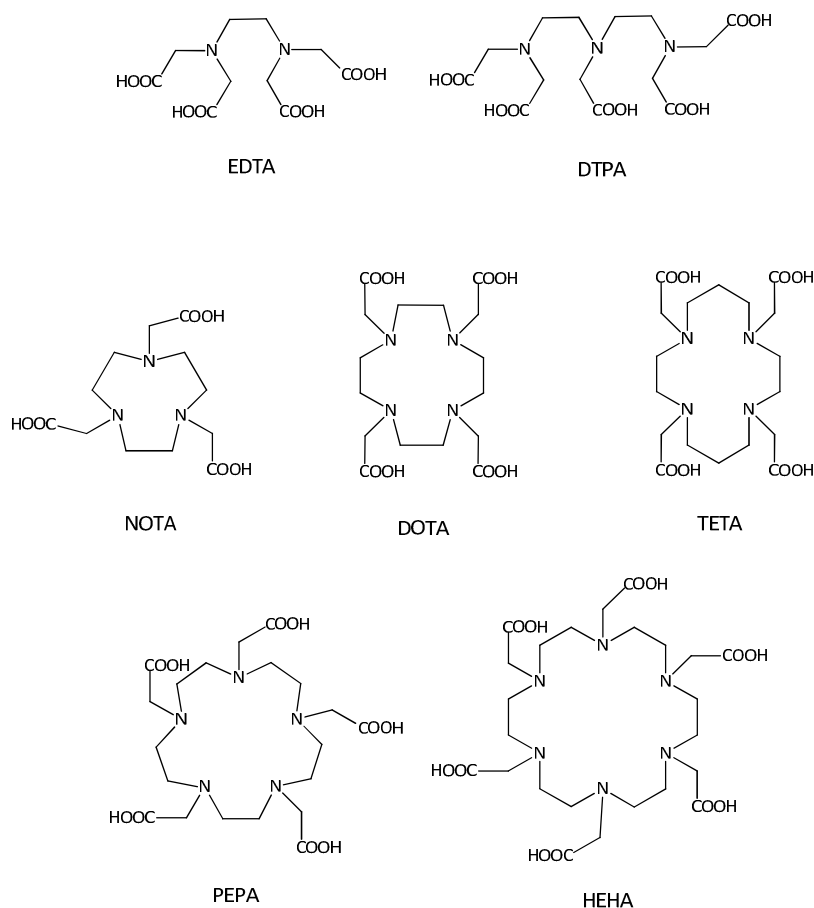
oznaka	AK zaporedje	t_r [min]	čistota
$[^{111}\text{In}]$ -STJ7	$[^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-OH}$	6,27	91,3 %
$[^{111}\text{In}]$ -STJ8	$[^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-OH}$	8,53	93,2 %
$[^{111}\text{In}]$ -STJ9	$[^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-OH}$	7,95	94,5 %
$[^{111}\text{In}]$ -STJ10	$[^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-OH}$	12,88	96,3 %
$[^{111}\text{In}]$ -STJ11	$[^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-OH}$	14,52	95,3 %
$[^{111}\text{In}]$ -STJ12	$[^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-OH}$	13,68	93,3 %
$[^{111}\text{In}]$ -PP11	$[^{111}\text{In}\text{-DOTA}]\text{-(D-Glu)}_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$	16,32	93,0 %

Radioliza je eden izmed izzivov, s katerim se je potrebno spoprijeti pri razvoju novega radiofarmaka. Lovilci radikalov, kot sta gentinska (2,5-dihidroksibenzojska) in askorbinska kislina, se uporabljajo kot preprečevalci radiolize. Dodamo jih lahko pred ali po radiooznačevanju. Slednji postopek je bolj uporaben, ker bi lahko velike količine stabilizatorja motile označevanje.[28] V našem primeru smo uporabili kot lovilca radikalov selenometionin, ki je med drugim preprečil oksidacijo metionina do sulfoksida.

Peptidi se radi adsorbirajo na steno epruvet, kot so Eppendorf epruvete, ki smo jih uporabili v naših poskusih. S tem pa lahko izgubimo zanten del radiooznačenega minigastrinskega analoga, zato smo po uspešnem označevanju reakcijski zmesi dodali raztopino humanega serumskega albumina (HSA), ki praktično prepreči adsorpcijo.

Kompleksi z makrocikličnimi kelatorji so pogosto izjemno odporni na disociacijo. Potrebno je uporabiti veliko moč, da se cepi prva vez kovina-donorski atom. Pravzaprav to tudi pomeni,

da so iste ovire prisotne tudi med nastankom kompleksa in je zato nastanek kovinskega kompleksa počasen in potrebuje ostre pogoje. Če peptide uporabimo kot vektorske molekule, lahko počasno kinetiko označevanja pospešimo s segrevanjem, ki običajno ne povzroči spremembe molekule.[10]

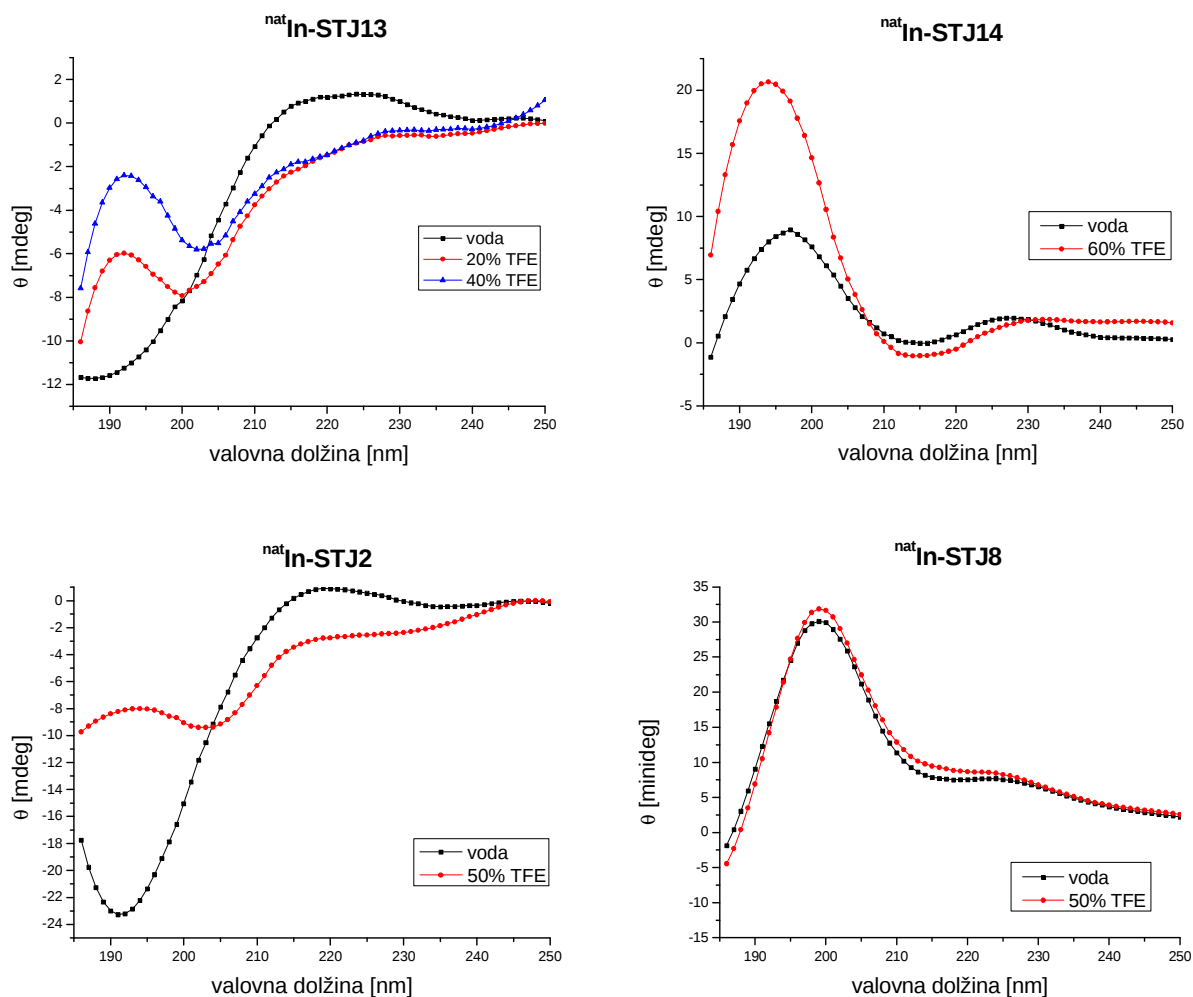


Slika 28: Aciklični poliazaalkanski kelatorji (prva vrsta) s karboksilnimi funkcionalnimi skupinami in makrociklični kelatorji (druga in tretja vrsta), ki imajo za osnovo poliazamakrociklično jedro s karboksilnimi skupinami. PEPA in HEHA sta novejša kelatorja s hitrejšo kinetiko označevanja kot pri DOTA, vendar še vseeno manjšo kot pri DTPA.[10]

Po inkubiranju 30 min na 95°C smo dobili radiooznačene metabolite PP11 z radiokemijsko čistostjo večjo od 90 % pri specifični radioaktivnosti od 8 do 27 GBq/μmol. Različni kationi v sledih v topilih in reagentih lahko motijo označevanje, če uporabimo DOTA-o kot bifunkcionalni kelator. Temu problemu se izognemo z uporabo ultra čistih reagentov. Izogibamo se tudi uporabi kovinskih predmetov (kovinske posode, spatule).

5.3 CIRKULARNI DIHROIZEM (CD)

CD spektre smo posneli za L-Glu/D-Glu pare peptidov STJ2 in STJ8 ter STJ13 in STJ14 na napravi in pod pogoji, ki so opisani pod poglavjem Materiali in metode (cirkularni dihroizem). Pred tem smo posneli še spekter starševskega peptida PP11 in dobljeni spekter primerjali s predhodno posnetim spektrom na drugi napravi (slika 10) in opazili ujemanje teh dveh spektrov. To nam je služilo kot neke vrste kontrola. Pri parih STJ13 vs. STJ14 in STJ2 vs. STJ8 opazimo podobno tendenco definiranih struktur pri D-Glu metabolitih oziroma analogih in nedefinirano naključno zvito strukturo, ki ob dodatku TFE prehaja v strukturirano obliko, pri pripadajočih L-Glu parih. Pri nadaljnjih študijah biodistribucije na živalskem modelu bomo lahko videli, če se tudi pri danih parih, ki očitno izkazujejo različno sekundarno strukturo, ohranja razlika v zadrževanju v ledvicah.



Slika 29: CD spektri parov $^{nat}\text{In-STJ13}$ in $^{nat}\text{In-STJ14}$ ter $^{nat}\text{In-STJ2}$ in $^{nat}\text{In-STJ8}$. Eliptičnost (θ) je podana v milideg in ni preračunana na $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, ker gre zgolj za prikaz tipa sekundarne strukture.

5.4 ENCIMSKA STABILNOST V SERUMU

Z ^{111}In smo označili starševski analog PP11 in njegove potencialne metabolite (STJ7 – STJ12). V našem poskusu ugotavljanja metabolne stabilnosti in potencialnih mest encimske restrikcije smo ^{111}In -PP11 ter ^{111}In -STJ7 do ^{111}In -STJ12 inkubirali v humanem serumu (v skladu z poglavjem iz Materialov in metod: Encimska stabilnost PP11 v humanem serumu in identifikacija metabolitov (STJ7, STJ8, STJ9, STJ10, STJ11 in STJ12)) in ob definiranih časovnih točkah jemali vzorce za HPLC analizo. Tekom eksperimenta smo hitro ugotovili, da praktično ni razgradnje ^{111}In -PP11, čeprav je bil enak poskus že večkrat uspešno opravljen na oddelku ($t_{1/2} = 175 \pm 71$ h). Kljub temu, da smo že prvič uporabili svež serum brez vidne hemolize ali fibrinskega čepa, smo ponovno opravili odvzem krvi drugega prostovoljca, vendar so bili rezultati enaki. Praktično ni bilo zaznati razgradnje starševskega radiopeptida ali potencialnih metabolitov niti 48 ur po začetku inkubacije, tako da je bil ta del, ugotavljanje razpolovnega časa in mesta restrikcije, neuspešen. Razlog za takšen rezultat bi lahko bil v starem serumu, vendar smo izvajali poskus na dveh različnih sveže pripravljenih serumih, ali lepljenju peptida na stene epruvet, vendar smo imeli posebne epruvete s prevleko, ki so bile že večkrat uspešno uporabljene. Možna bi bila inaktivacija peptidaz zaradi zdravil, vendar jih noben prostovoljec ne jemlje, tako da ta del do nadaljnjega ostaja neznanka in bo eksperiment potrebno ponoviti.

6 SKLEP

S pomočjo poznanih principov sinteze peptidov na trdnem nosilcu smo sintetizirali potencialne DOTA konjugirane metabolite minigastrinskih analogov PP11 in PP13 ter dodatna minigastrinska analoga s skrajšanim distančnikom (L-Glu₃ oziroma D-Glu₃) do bifunkcionalnega kelatorja DOTA. Uporabili smo standardno Fmoc metodo na Rink amide[®] oziroma Rink Acid[®] rezini. Zaradi dobrih predhodnih izkušenj s HATU, predvsem v smislu izkoristkov reakcij, smo pri vseh reakcijah uporabili ta aktivacijski reagent COOH skupine. Na koncu vsakega metabolita oziroma analoga minigastrina je bila vezana DOTA. Ta makrociklični kelator ponuja visoko stabilnost nastalega kompleksa z radionuklidom in na ta način signifikantno preprečuje dekompleksacijo pri širokem spektru radioaktivnih izotopov. Slabost DOTA-e je občutljivost na kovinske nečistote in segrevanje pri samem postopku radiooznačevanja, kar potencialno ogroža strukturo peptida. Po končanem sinteznem delu je sledilo čiščenje nastalih peptidov na preparativnem HPLC, pri čemer smo pri vseh dosegli ustrezno čistoto.

Za potrebe raziskav cirkularnega dihiroizma smo določene DOTA-konjugirane peptide označili z neradioaktivnim (hladnim) indijem. Pri D-Glu analogih smo opazili urejeno strukturo, imenovano β -zavoj, medtem ko so pripadajoči L-Glu pari izkazovali nedefinirano, naključno zvito strukturo, ki je ob dodatku TFE prehajala v α -vijačnico. Urejeno strukturo smo opazili pri vseh D-Glu peptidih, pri enem od kratkih potencialnih metabolitov PP11, pri PP11 kot tudi pri analogu minigastrina s samo tremi D-glutamati do bifunkcionalnega kelatorja.

Z ¹¹¹In smo označili starševski analog PP11 in potencialne analoge (STJ7 – STJ12) za poskus ugotavljanja metabolne stabilnosti in potencialnih mest encimske restrikcije. Radioaktivno označene peptide smo inkubirali v svežem humanem serumu in ob definiranih časovnih točkah jemali vzorce za HPLC analizo. Tekom eksperimenta smo hitro ugotovili, da praktično ni razgradnje ¹¹¹In-PP11, čeprav je bil enak poskus že večkrat uspešno opravljen. Razloga za stabilnost tudi 48 ur po začetku inkubacije nismo našli, zato bo eksperiment potrebno ponoviti.

7 LITERATURA

1. Rehefeld JF: **The new biology of gastrointestinal hormones.** *Physiological Reviews* 1998, **78**:1087-1108.
2. Dufresne M, Seva C, Fourmy D: **Cholecystokinin and gastrin receptors.** *Physiological Reviews* 2006, **86**:805-847.
3. Good S, Walter MA, Waser B, Wang X, Müller-Brand J, Behe MP, Reubi JC, Maecke HR: **Macrocyclic chelator-coupled gastrin-based radiopharmaceuticals for targeting of gastrin receptor-expressing tumours.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008.
4. Berna MJ, Tapia JA, Sancho V, Jensen RT: **Progress in developing cholecystokinin (CCK)/gastrin receptor ligands which have therapeutic potential.** *Curr Opin Pharmaol* 7(6) 2007:583-592.
5. Roosenburg S, Laverman P, van Delft FL, Boerman OC: **Radiolabeled CCK/gastrin peptides for imaging and therapy of CCK2 receptor-expressing tumors.** *Amino Acids* 2011, **41**.
6. Behe M, Behr TM: **Cholecystokinin-B (CCK-B)/gastrin receptor targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other CCK-B receptor expressing malignancies.** *Biopolymers* 2002, **66** 399-418.
7. <http://www.kemija.org/index.php/okolje-mainmenu-40/25-okoljecat/217-radioaktivnost-2-del-razpad>
8. **Pravilnik o obveznostih izvajalca sevalne dejavnosti in imetnika vira ionizirajočih sevanj.** In: 13-512/2004. Slovenija: Uradni list RS, stran 1293; 2004.
9. <http://www.ujv.gov.si/fileadmin/ujv.gov.si/pageuploads/si/medijsko-sredisce/knjiga-delo-z-viri-sevanj.pdf>
10. Peitl Kolenc P: **Radiooznačeni analogi gastrina kot ligandi za holecistokinin-2 (CCK2/gastrinski) receptor (doktorska disertacija).** Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2011.
11. Aloj L, Panico MR, Caraco C, Zannetti A, Del Vecchio S, Di Nuzzo S, Arra C, Morelli G, Tesaro D, De Lauca S *et al*: **Radiolabeling approaches for cholecystokinin B receptor imaging.** *Biopolymers* 2002, **66** 370-380.
12. Nock BA, Maina T, Béhé M, Nikolopoulou A, Gotthardt M, Schmitt JS, Behr TM, Macke HR: **CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with (99m)Tc-labeled minigastrin analogs.** *J Nucl Med* 2005, **46**:1727-1736.
13. Laverman P, Joosten L, Eek A, Roosenburg S, Peitl Kolenc P, Maina T, Mäcke H, Aloj L, von Guggenberg E, Sosabowski JK *et al*: **Comparative biodistribution of 12 111In-labelled gastrin/CCK2 receptor-targeting peptides.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011, **38**:1410-1416.
14. Peitl-Kolenc P, Mansi R, Tamma ML, Stopar-Gmeiner T, Sollner-Dolenc M, Waser B, Baum RP, Reubi JC, Maecke HR: **Highly Improved Metabolic Stability and Pharmacokinetics of Indium-111-Gastrin Conjugates for Targeting of the Gastrin Receptor.** *J Med Chem* 2011, **54** 2602–2609.
15. Vegt E, Melis M, Eek A, de Visser M, Brom M, Oyen WJ, Gotthardt M, de Jong M, Boerman O: **Renal uptake of different radiolabelled peptides is mediated by megalin: SPECT and biodistribution studies in megalin-deficient mice.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010, **38**:623-632.
16. Vegt E, de Jong M, Wetzels JF, Masereeuw R, Melis M, Oyen WJ, Gotthardt M, Boerman O: **Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention.** *J Nucl Med* 2010, **51**:1049-1058.

17. Vegt E, van Eerd JE, Eek A, Oyen WJ, Wetzels JF, de Jong M, Russel FG, Masereeuw R, Gotthardt M, Boerman OC: **Reducing renal uptake of radiolabeled peptides using albumin fragments.** *J Nucl Med* 2008, **49**(9):1506-1511.
18. Behe M, Kluge G, Becker W, Gotthardt M, Behr TM: **Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys.** *J Nucl Med* 2005, **46**(6):1012-1015.
19. Gotthardt M, van Eerd-Vismale J, Oyen WJ, de Jong M, Zhang H, Rolleman E, Maecke HR, Behe M, Boerman O: **Indication for different mechanisms of kidney uptake of radiolabeled peptides.** *J Nucl Med* 2007, **48**(4):596-601.
20. van Eerd JE, Vegt E, Wetzels JF, Russel FG, Masereeuw R, Corstens FH, Oyen WJ, Boerman OC: **Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of ¹¹¹In-octreotide in mice and rats.** *J Nucl Med* 2006, **47**(3):528-533.
21. Dubreuil P, Fulcrand P, Rodriguez M, Fulcrand H, Laur J, Martinez J: **Novel activity of angiotensin-converting enzyme. Hydrolysis of cholecystokinin and gastrin analogues with release of the amidated C-terminal dipeptide.** *Biochem J* 1989, **262**(1):125-130.
22. Smole A: **Priprava in biološka aktivnost kompleksov imunostimulativnih nukleinskih kislin za stabilizacijo, tarčno dostavo in postopno sproščanje (diplomska naloga).** Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta; 2010.
23. Chan WC, White PD: **Fmoc solid phase peptide synthesis (a practical approach).** New York: Oxford University Press; 2000.
24. Novabiochem-Merck: **Peptide Synthesis.** In.; 2008/2009.
25. <http://de.wikipedia.org/wiki/Kaiser-Test>
26. Liu S, Edwards DS: **Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals.** *Bioconjug Chem* 2001, **12**(1):7-34.
27. Ando A, Ando I, Hiraki T, Hisada K: **Relation between the location of elements in the periodic table and various organ-uptake rates.** *Int J Rad Appl Instrum B* 1989, **16**(1):57-80.
28. Liu S, Edwards DS: **Stabilization of (90)Y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid.** *Bioconjug Chem* 2001, **12**(4):554-558.