

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEVENKA LAPANJA

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEVENKA LAPANJA

**SINTEZA IN RADIOOZNAČEVANJE ANALOGOV
MINIGASTRINA, KONJUGIRANIH Z RAZLIČNIMI
BIFUNKCIONALNIMI KELATORJI**

**SYNTHESIS AND RADIOLABELING OF MINIGASTRIN
ANALOGUES, CONJUGATED WITH DIFFERENT
BIFUNCTIONAL CHELATORS**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Oddelku za radiofarmacijo 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., spec. Masnospektrometrične meritve so opravili v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za pomoč pri izbiri teme magistrske naloge ter za vso podporo in usmerjanje pri nastajanju le-te. Najlepša hvala somentorici dr. Petri Kolenc Peitl, mag. farm, spec., ki mi je nudila neprecenljivo strokovno vodenje ter mi vedno stala ob strani s svojim znanjem in nasveti. Obema se zahvaljujem za izkazano zaupanje, potrpežljivost in prijazno besedo.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Oddelku za radiofarmacijo, še posebej Marku Krošlju za pomoč pri radioaktivnem označevanju peptidov ter Aljažu Sočanu, ki mi je prav tako priskočil na pomoč vedno, ko je bilo potrebno.

Posebno zahvalo na tem mestu namenjam vsem, ki so mi tekom študija in pri nastajanju magistrskega dela stali ob strani in me spodbujali, še zlasti mojim domačim, mojemu fantu Simonu in vsem zvestim prijateljem. Hvala, ker verjamete vame!

IZJAVA

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

Nevenka Lapanja

Ljubljana, 2014

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA.....	i
POVZETEK.....	iii
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1 UVOD.....	1
1.1 GASTRIN IN HOLECISTOKININ	1
1.2 GASTRINSKI IN HOLECISTOKININSKI RECEPTORJI.....	2
1.3 IZRAŽANJE GASTRINSKIH RECEPTORJEV NA POVRŠINI TUMORSKIH CELIC.....	3
1.4 NUKLEARNA MEDICINA IN RADIOFARMACIJA.....	4
1.5 RAZVOJ RADIOOZNAČENIH GASTRINSKIH ANALOGOVI.....	7
1.5.1 RAZVOJ IDEALNEGA RADIOFARMAKA	7
1.5.2 RAZVOJ RADIOFARMAKOV ZA CILJANJE RECEPTORJEV <i>IN VIVO</i>	7
1.5.3 RAZVOJ RADIOPEPTIDOV ZA CILJANJE GASTRINSKEGA (CCK2) RECEPTORJA	8
1.6 BIFUNKCIONALNI KELATORJI	12
1.6.1 BIFUNKCIONALNI KELATORJI ZA OZNAČEVANJE Z GALIJEM IN INDIJEM	15
2 NAMEN DELA	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 SINTEZNI DEL	18
3.2 RADIOOZNAČEVANJE Z ⁶⁸ Ga.....	20
4 EKSPERIMENTALNO DELO	21
4.1 SINTEZA DOTA, NOTA IN NODAGA KONJUGIRANIH ANALOGOVI MINIGASTRINA.....	21
4.1.1 PRIPRAVA NOSILCA	21
4.1.2 PRIPENJANJE AMINOKISLIN NA NOSILEC	21
4.1.3 PREVERJANJE USPEŠNOSTI REAKCIJE S KAISER TESTOM	22
4.1.4 ODSTRANJEVANJE Fmoc ZAŠČITNE SKUPINE S TERMINALNE –NH ₂ SKUPINE AMINOKISLINE	22

4.1.5 VEZAVA BIFUNKCIONALNIH KELATORJEV NA KONČEN PEPTID	23
4.1.6 ODSTRANJEVANJE ZAŠČITNIH SKUPIN IN HKRATNA CEPITEV PEPTIDA Z NOSILCA	25
4.2 RADIOOZNAČEVANJE Z ^{68}Ga	39
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	42
5.1 SINTEZA DOTA, NOTA IN NODAGA KONJUGIRANIH ANALOGOVI MINIGASTRINA.....	42
5.2 RADIOOZNAČEVANJE Z ^{68}Ga	51
6 SKLEPI	56
LITERATURA	57
PRILOGE	60

POVZETEK

Gastrinski ali CCK2 receptorji so visoko izraženi v nekaterih nevroendokrinih tumorjih, kot je medularni karcinom ščitnice. Na področju nuklearne medicine oziroma radiofarmacije lahko z razvojem ustreznih radiooznačenih gastrinskih analogov izraženost teh receptorjev izkoristimo za prikaz tumorjev in/ali ciljano radionuklidno terapijo. Za prikaz tumorjev se odvisno od vrste sevalca uporabljata dve tehniki slikanja: eno-fotonska emisijska računalniška tomografija (SPECT) in pozitronska emisijska tomografija (PET).

Radiofarmaki za ciljanje receptorjev *in vivo* so običajno sestavljeni iz štirih osnovnih delov: nosilne molekule, ki je pomembna za vezavo na tarčni receptor, distančnika, s katerim lahko vplivamo na farmakokinetiko radiofarmaka, radionuklida kot izvora sevanja ter bifunkcionalnega kelatorja (BFC), ki zagotavlja stabilnost vezave kovinskega iona (npr. ^{111}In ali ^{68}Ga) na molekulo. Za ciljanje CCK2 receptorjev je bilo razvitih že veliko različnih analogov gastrina oziroma njegove krajše različice - minigastrina (Leu-(Glu)₅-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂). Dve izmed glavnih težav pri razvoju sta neustrezna metabolična stabilnost in visok privzem v ledvica, na kar lahko vplivamo s spreminjanjem distančnika in posledično farmakokinetike analoga. Pri tem mora nov potencialni analog obdržati sposobnost vezave na receptor. Poleg ustreznih farmakokinetičnih lastnosti je pomembna tudi izbira radionuklida in optimalnega BFC za vezavo le-tega. Različni kovinski ioni zahtevajo različne kelatorje, izbira pa je odvisna predvsem od velikosti, naboja in koordinacijske kemije.

V okviru magistrske naloge smo po principu sinteze peptidov na trdnem nosilcu sintetizirali šest različnih analogov minigastrina. Uporabljena je bila Fmoc metoda, Rink Amide MBHA[®] nosilec in HATU reagent za aktivacijo COOH skupine. Trije analogi so imeli skupen distančnik in C-terminalni del -(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, pri treh pa smo uvedli modifikacijo in na metabolno nestabilnem mestu C-terminalnega dela na Met uvedli N-metilno skupino. Na N-terminalnem delu smo peptide konjugirali s tremi različnimi bifunkcionalnimi kelatorji: DOTA-o, NOTA-o in NODAGA-o. Po končani sintezi na trdnem nosilcu smo odstranili zaščitne skupine, odcepili konjugirane peptide z nosilca in jih očistili s preparativnim HPLC. Izolirati nam je uspelo samo analoge z modifikacijo na metioninu in pri slednjih smo dosegli ustrezno čistoto (> 95 %). V naslednjem koraku smo jih označili s pozitronskim sevalcem ^{68}Ga . ^{68}Ga smo eluirali iz $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generatorja in z metodo frakcijske elucije v HEPES pufru izvedli

označevanje izoliranih treh peptidov. S HPLC metodo z detektorjem radioaktivnosti smo določili radiokemijsko čistoto radiooznačenih analogov, ki je bila pri vseh treh ustrezna (> 90 %).

Ključne besede: minigastrin, gastrinski receptor, diagnostika tumorjev, ^{68}Ga , bifunkcionalni kelatorji

ABSTRACT

Gastrin or CCK2 receptors are overexpressed in certain neuroendocrine tumors, such as medullary thyroid cancer. By developing suitable radiolabeled gastrin analogues mentioned receptors can be targeted, which can be used for tumor imaging and/or targeted radiotherapy in nuclear medicine or radiopharmacy. Depending on the type of emitter, two different techniques can be used for tumor imaging: single-photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET).

Radiopharmaceuticals for targeting receptors *in vivo* have four basic parts: targeting molecule, which is responsible for binding to target receptor, linker as a pharmacokinetics modifier, radionuclide as a radiation source and bifunctional chelator (BFC), which binds the radiometal, such as ^{111}In or ^{68}Ga , to the carrier molecule and ensures its integrity. There have been many different gastrin or minigastrin (shorter version of gastrin: Leu-(Glu)₅-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) analogues for targeting of CCK2 receptors developed so far. However, two major issues in development of potential analogues are low metabolic stability and high kidney retention. We can influence this by modifying the structure of the linker and consequently the pharmacokinetics of the analogue, while the receptor binding capability of new potential analogue has to be preserved. In addition to proper pharmacokinetics the choice of radionuclide and bifunctional chelator is also important. Different metal ions require different chelators and the choice depends mainly on the size, charge and coordination chemistry of the radiometal.

In our work we synthesized six different minigastrin analogues, using solid phase peptide synthesis. All peptides were assembled on Rink Amide MBHA[®] resin, using Fmoc method and HATU coupling reagent. Three of the analogues had common linker and C-terminal sequence -(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. The other three analogues were modified on the metabolically unstable Met of C-terminal part, i.e. the methyl group was introduced. All analogues were on their N-terminus conjugated with three different bifunctional chelators: DOTA, NOTA and NODAGA. After completed solid phase synthesis the protecting groups were removed and the conjugated peptides were cleaved from the resin. Then the purification was done by preparative HPLC, but only analogues with modification on methionine were successfully isolated. For the latter we achieved the adequate purity (> 95 %). In the next step we have radiolabeled them with positron emitter ^{68}Ga . ^{68}Ga was eluted from $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator. For radiolabelling of isolated peptides

method of fractional elution and HEPES buffer were used. The radiochemical purity of radiolabeled analogues was determined by HPLC method with radioactivity detector and was adequate for all three analogues (> 90 %).

Key words: minigastrin, gastrin receptor, tumor imaging, ^{68}Ga , bifunctional chelators

SEZNAM OKRAJŠAV

AK	aminokislina
Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	aspartat
BFC	bifunkcionalni kelator
CCK	holecistokinin
CCK1R	holecistokininski 1 receptor
CCK2R	holecistokininski 2 (gastrinski) receptor
CT	računalniška tomografija
CŽS	centralni živčni sistem
DCC	dicikloheksilkarbodiimid
DCM	diklorometan
DIPEA	N,N'-diizopropiletilamin
DMAP	p-dimetilaminopiridin
DMF	dimetilformamid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraocetna kislina
dPEG	“diskretni” polietilenglikol
DTPA	dietilentriaminpentaocetna kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FDG	2-fluoro-2-deoksi-D-glukoza
Fmoc	9-fluorenilmetoksikarbonil
GIT	gastrointestinalni trakt
Glu	glutamat
Gly	glicin
GPCR	z G-proteinom sklopljeni receptor
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronij heksafluorofosfat
HEHA	1,4,7,10,13,16-heksaazaciklooktadekan-N,N',N'',N''',N''',N''''-heksaocetna kislina
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-etansulfonska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
Leu	levcin
Met	metionin

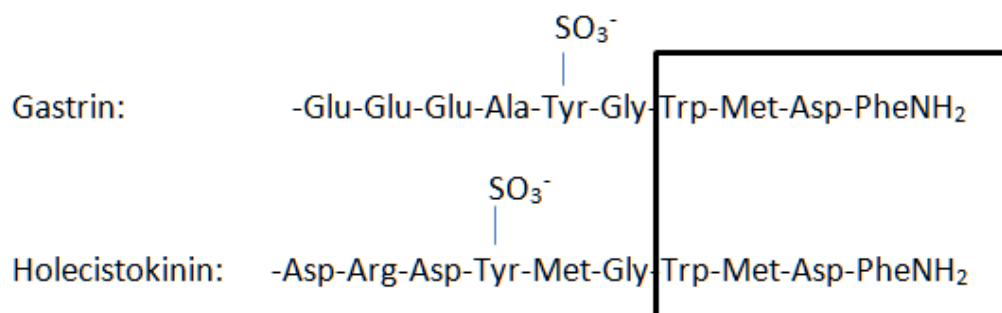
MG	minigastrin
MTC	medularni karcinom ščitnice
Nle	norlevcin
NMP	N-metilpirolidon
NODAGA	1,4,7-triazaciklononan-N-glutaminska kislina- N',N''-diocetna kislina
NODASA	1,4,7-triazaciklononan-N-jantarna kislina-N',N''-diocetna kislina
NOTA	1,4,7-triazaciklononan-N,N',N''- triocetna kislina
PAM	peptidilglicin α -amidacijska monooksigenaza
PEPA	1,4,7,10,13-pentaazaciklopentadekan-N,N',N'',N''',N''''-pentaocetna kislina
PET	pozitronska emisijska tomografija
pGlu	piroglutamat
Phe	fenilalanin
PRRT	peptidno-receptorska radionuklidna terapija
RPM	obrati na minuto
RT-PCR	polimerazna verižna reakcija z reverzno transkriptazo
SPECT	eno-fotonska emisijska računalniška tomografija
SPE	ekstrakcija na trdni fazi
SPPS	sinteza peptidov na trdnem nosilcu
sst ₂	somatostatinski receptor 2
tBu	terc-butilna skupina
TETA	1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan-N,N',N'',N'''- tetraocetna kislina
TFA	trifluorocetna kislina
TFE	trifluoroetanol
TFMSA	trifluormetansulfonska kislina
TIS	triizopropilsilan
Trp	triptofan
Tyr	tirozin

1 UVOD

1.1 GASTRIN IN HOLECISTOKININ

Kmalu zatem, ko sta Bayliss in Starling leta 1902 iz sluznice dvanajstnika izolirala prvi odkrit hormon in ga poimenovala sekretin, je Edkins v ekstraktu sluznice antruma odkril snov, ki je spodbujala izločanje želodčne kisline. To je bil drugi odkrit hormon, zaradi svojega izvora pa je dobil ime »gastric secretin« (gastrični sekretin), kasneje skrajšano v gastrin. Leta 1928 je Ivy odkril še tretji gastrointestinalni (GIT) hormon, holecistokinin (CCK). CCK je 33 aminokislin (AK) dolg peptid, ki se pod vplivom maščob in proteinov v hrani izloča iz I-celic v tankem črevesu. Spodbuja izločanje encimov iz trebušne slinavke in krčenje žolčnika. Gastrin je sestavljen iz 17 AK in se pod vplivom hrane, bogate s proteini, izloča iz G-celic v antrumu želodca ter spodbuja izločanje želodčne kisline iz parietalnih celic v sluznici fundusa. (1)

Na podlagi podobnosti v strukturi lahko hormone v GIT razdelimo v različne družine. Gastrin in CCK spadata v tako imenovano gastrinsko družino, za katero je značilno točno določeno vezavno mesto: C-terminalni tetrapeptid -Trp-Met-Asp-Phe-NH₂. Zunaj C-terminalnega vezavnega mesta je opaziti zelo malo podobnosti v AK zaporedju in DNK sekvenci. Poleg točno določenega vezavnega mesta je za gastrinsko družino značilen še O-sulfatiran tirozinski ostanek (slika 1). (1)



Slika 1: Strukturne podobnosti med gastrinom in holecistokininom: skupno C-terminalno vezavno mesto in sulfatna skupina na tirozinu, ki je od C-terminalnega dela oddaljena 6 AK ostankov pri gastrinu in 7 pri CCK. (Povzeto po viru 1.)

Zelo pogosto se z genom, ki kodira določen hormon, izrazi več različnih bioaktivnih peptidov in ne en sam, kot so sprva verjeli. V primeru gastrina en gen kodira en prohormon. Pri tem se izrazi en progastrin z enim aktivnim mestom, vendar na tak način, da se tvorijo številni različno dolgi peptidi z enakim bioaktivnim C-koncem. (1)

Progastrin nastaja v G-celicah antruma. Po translaciji gastrinske mRNA v zrnatem endoplazmatskem retikulumu in odcepitvi NH₂-terminalnega signalnega peptida s preprogastrina, se progastrin prenese v Golgijev aparat, kjer potečejo prve potranslacijske modifikacije. Tirozin 66 se O-sulfatira, pride pa tudi do prvih endoproteolitičnih cepitev. Iz Golgijevega aparata se progastrinski intermediati prenesejo v sekretorne granule v bazalnem delu G-celic. Med transportom do tja najverjetneje potekajo endoproteolitične cepitve, eksoproteolitično prirezovanje ter glutamilna ciklizacija, v samih sekretornih granulah pa poteče zadnji korak v sintezi hormona, tj. amidacija gastrina. Le-ta se zgodi pod vplivom amidacijskega encimskega kompleksa (peptidilglicin α -amidacijska monooksigenaza ali PAM) in je ključen, skrbno nadzorovan vse ali nič proces. Rezultat te kompleksne sintezne poti je heterogena mešanica gastrinov, ki se sprosti iz sekretornih granul v G-celicah antruma. Več kot 90 % gastrinov je α -amidiranih, med njimi je 90 % gastrina-17, ostalo pa je mešanica gastrina-34, gastrina-71, gastrina-52 in gastrina-14 (minigastrina). Približno polovica amidiranih gastrinov je sulfatiranih na tirozinu (1).

1.2 GASTRINSKI IN HOLECISTOKININSKI RECEPTORJI

Hormona gastrin in holecistokinin izražata svoj učinek preko vezave na tako imenovani CCK receptor. To je membranski, z G-proteinom sklopljeni receptor (GPCR), najdemo pa ga tako v celicah centralnega živčnega sistema (CŽS) kot tudi na periferiji. Poznamo dva tipa CCK receptorjev, CCK1 in CCK2 receptor (prvotno CCK-A in CCK-B) (2). Receptorja izkazujeta 48 % homologijo (3), razlikujeta pa se v afiniteti do gastrina, distribuciji v telesu in strukturi (4). Na CCK1 receptor (CCK1R) se prednostno veže sulfatiran CCK, ki do receptorja izkazuje od 500- do 1000-krat večjo afiniteto kakor nesulfatiran CCK ali sulfatiran gastrin. Za vezavo na CCK1R je ključno sulfatiranje tirozina na mestu 2. Nasprotno je CCK2 receptor (CCK2R) precej manj selektiven; s podobno afiniteto se nanj vežeta tako CCK kot gastrin, večjih razlik ni niti v vezavi sulfatiranih in nesulfatiranih peptidov. Ker je po obroku koncentracija gastrina v krvi od 5- do 10-krat višja kot koncentracija CCK, je sulfatirani gastrin-17 najverjetneje fiziološki ligand za večino CCK2R na periferiji. V možganih to vlogo prevzame prevladujoči sulfatirani CCK-8. CCK2R lahko imenujemo tudi »gastrinski receptor«. (2)

CCK1R se nahaja predvsem v žolčniku, gladkih mišicah želodca, trebušni slinavki in perifernem živčevju. CCK2R najdemo v sluznici želodca, trebušni slinavki in možganih. (5) Gastrin preko vezave na CCK2R stimulira izločanje želodčne kisline in rast želodčne

sluznice. Študije na genetsko spremenjenih miših kažejo na inhibicijo praznjenja želodca kot fiziološko funkcijo gastrina, študije v ČŽS pa ponujajo dokaze o tem, da so CCK2R pomembni pri uravnavanju spomina/učenja in pri odzivu na stres. (3)

CCK receptor je kot GPCR sestavljen iz sedmih hidrofobnih α -vijačnic, ki so zasidrane v membrani celice. Vijačnice so povezane s tremi zunajceličnimi in tremi znotrajceličnimi zankami. Za vezavo gastrina na CCK2R je odgovornih 5 AK v drugi zunajcelični zanki receptorja, znotraj katerih igra najpomembnejšo vlogo histidin. Le-ta interagira s predzadnjim aspartatom v CCK. Kasneje so prepoznali še več AK in regij v transmembranskih vijačnicah IV in VI, ki interagirajo z amidiranim COOH-terminalnim fenilalaninom CCK/gastrina. Po vezavi liganda se receptor konformacijsko spremeni, kar omogoči interakcijo z G-proteinom. Sledi aktivacija α -podenote G-proteina in prenos signala po različnih signalnih poteh. (2)

Po vezavi liganda se kompleks ligand-receptor običajno internalizira. Internalizacija je pomembna pot inaktivacije, ki fiziološko vodi do razgradnje ali pa reciklacije receptorja. Proces je omejen na ligande z agonistično aktivnostjo, pri antagonistih se namreč pojavlja v manjšem obsegu. Proces internalizacije CCK2R lahko izkoristimo za intracelularno dostavo radioaktivno označenih analogov gastrina z namenom zdravljenja in lokalizacije določenih tumorjev, ki izražajo CCK2R. (6)

1.3 IZRAŽANJE GASTRINSKIH RECEPTORJEV NA POVRŠINI TUMORSKIH CELIC

Številne raziskave dokazujejo, da hormona CCK in gastrin preko svojih receptorjev spodbujata rast in napredovanje raka. V raziskovanje izražanja CCK receptorjev v tumorjih je usmerjenih veliko študij, saj se obetajo nove možnosti na področju diagnostike in terapije, kot sta scintigrafija receptorjev ter terapija tumorjev z radioaktivnimi ali citotoksičnimi analogi. Pri tem je treba upoštevati možnost, da se izražanje CCK receptorjev v poznejših stadijih raka lahko izgubi. (2)

CCK2R so odkrili v številnih tumorskih tkivih: medularni karcinom ščitnice (> 90 % izražanje CCK2R), drobnocelični rak pljuč (89 %), stromalni rak jajčnikov (100 %), astroцитom (65 %). Pri nekaterih drugih oblikah, kot so meningiom, endometrijski in ovarijski karcinom, rak dojke ter gastroenteropankreatični tumorji, opazimo občasno izražanje CCK2R. (7) Zgodnje študije so kazale na prisotnost CCK2R tudi pri raku na želodcu in debelem črevesu, kar pa so novejšje študije ovrgle. Tudi nedrobnocelični rak

pljuč v nasprotju z drobnoceličnim ne izraža teh receptorjev. (4) CCK1R se v človeških tumorjih pojavlja zelo redko. (7)

Medularni karcinom ščitnice (MTC) izhaja iz malignih nediferenciranih parafolikularnih celic (C celic) ščitnice, ki proizvajajo kalcitonin. Prepoznal ga je Hazard leta 1959 ter ugotovil, da se razlikuje od drugih oblik diferenciranih in nediferenciranih rakov ščitnice. Diferencirani rak ščitnice izhaja iz tirocitov (6) in ne izraža CCK2R (4). Kmalu po letu 1970 so ugotovili, da se po aplikaciji gastrina iz ščitnice pospešeno sprošča kalcitonin. (6) Tako se je razvil visoko občutljiv in specifičen pentagastrin stimulacijski test, ki kaže na prisotnost CCK2R na malignih C-celicah ščitnice. Z njim lahko potrdimo pojav ali ponovitev MTC. Prisotnost CCK2R v MTC in njihovo odsotnost v nemedularnem raku ščitnice ter normalnih žlezah so dokazali s testi vezave, avtoradiografijo in metodo RT-PCR. Vendar pa so novejša raziskava odkrile izražanje CCK2R tudi v nemalignih C-celicah ščitnice. (2)

MTC predstavlja 3-12 % vseh rakov ščitnice. Stopnja preživelosti pacientov z MTC je veliko slabša kot pri drugih diferenciranih rakih ščitnice. Zgolj okoli 30 % bolnikov preživi 10 let, vzrok za tako slabo preživelost pa je v slabem privzemu in akumulaciji radioaktivnega joda (^{131}I), ki se sicer uporablja v terapiji hiperfunkcije in raka ščitnice. (4) MTC velikokrat ostane prikrit ali zelo počasi napreduje več let. Odkrijejo ga slučajno zaradi multinodularne golše, občasno pa tudi zaradi vztrajne, od terapije neodvisne diareje. Tudi ko MTC razvije metastaze, ostane bolezen več let klinično neopazna. Z napredovanjem raka in pojavom endokrine simptomatike pa je uspešnost terapije veliko slabša. (6) Pri iskanju novih terapevtskih možnosti igrata pomembno vlogo nuklearna medicina ter znotraj nje radiofarmacija, zato ju predstavljamo v naslednjem poglavju.

1.4 NUKLEARNA MEDICINA IN RADIOFARMACIJA

Nuklearna medicina je področje medicine, ki uporablja radioaktivne izotope, vgrajene v radioaktivna zdravila – radiofarmake, z namenom diagnosticiranja ali zdravljenja bolezni. (6, 8) Radioaktivni izotopi so izotopi z nestabilnim jedrom, ki ob prehajanju v stabilnejše stanje oddajajo energijo v obliki alfa (α), beta (β) ali gama (γ) sevanja. α -sevanje je tok delcev α (helijevih jeder), ki nastane ob razpadu atomskih jeder težkih elementov. Ta vrsta sevanja ni zelo prodorna, saj ga zaustavi že list papirja, vendar lahko ob vnosu v telo povzroči zelo hude poškodbe. Sevanje β je tok delcev β (elektronov β^- ali pozitronov β^+). Je prodornejše kakor sevanje α , gostota nastalih poškodb pa je manjša. β -sevalci se zato

uporabljajo v terapevtske namene (radioterapevtiki). γ -sevanje je tok fotonov γ . Je najprodornejše od vseh sevanj ter z najmanjšo gostoto nastalih poškodb, zato se uporablja v diagnostične namene (radiodiagnostiki). Prodornost sevanja je povezana z energijo sevanja, ki se izraža z enoto eV (elektronvolt). Mednarodna enota za radioaktivnost je Bq (Becquerel), ki pomeni število razpadov nestabilnih jeder v 1 sekundi ($1 \text{ Bq} = 1 \text{ razpad v } 1 \text{ s}$). Včasih se je uporabljala enota Ci (Curie), ki je merilo za aktivnost 1 g radija ($1 \text{ Ci} = 37\,000 \text{ MBq}$). Razpolovni čas ($t_{1/2}$) radioaktivnega izotopa je čas, v katerem se njegova aktivnost zmanjša za polovico. (8)

Z diagnostičnimi pristopi v nuklearni medicini lahko prikažemo poteke različnih biokemijskih procesov, kar je velika prednost pred ostalimi radiološkimi tehnikami, ki ponujajo zgolj informacije o morfoloških značilnostih. (6) V nuklearni medicini se uporabljata dva načina slikanja, pozitronska emisijska tomografija (PET) in eno-fotonska emisijska računalniška tomografija (SPECT). Pri PET-u uporabljamo kratkožive pozitronske sevalce (β^+), kot sta ^{18}F in ^{68}Ga . Pozitron se po izsevanju zelo hitro združi s svojim antidelcem elektronom. Pri tem pride do anihilacije oz. izničenja in nastanka dveh nasprotno usmerjenih γ -fotonov z energijo 511 keV. PET skener zazna nastalo sevanje in ga prevede v sliko visoke ločljivosti. SPECT skener zazna γ -fotone neposredno iz sevalca. (4) PET in SPECT tehniki se danes združujeta z rentgensko-računalniško tomografijo (CT) v preiskave imenovane PET/CT oz. SPECT/CT. CT nam da informacijo o morfologiji, v kombinaciji pa se uporablja predvsem za korekcijo oslabitve gama žarkov zaradi potovanja skozi tkiva (korekcija atenuacije). Na ta način se natančnost preiskave občutno izboljša. (9) Na voljo je veliko različnih radionuklidov za diagnostiko in terapijo (preglednica I). Pri slikanju s SPECT se veliko uporablja $^{99\text{m}}\text{Tc}$, saj ima odlične fizikalne lastnosti ($t_{1/2} = 6 \text{ h}$, $E_\gamma = 140 \text{ keV}$) in je lahko dostopen, saj obstaja kot generatorski sistem $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Njegov razpolovni čas je dovolj dolg, da omogoča sintezo radiofarmaka in izvedbo slikanja, hkrati pa dovolj kratek, da se zmanjša bolnikovo izpostavljenost sevanju. Kot radionuklid se pogosto uporablja tudi ^{111}In . Zaradi daljše razpolovne dobe ($t_{1/2} = 2,8 \text{ dni}$) se lahko slikanje izvede s časovnim zamikom. (4)

Pri slikanju s PET ima pomembno vlogo ^{18}F . Z ^{18}F označena glukoza, 2-fluoro-2-deoksi-D-glukoza ($[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$), je najpogosteje uporabljan PET radiofarmak. Uporablja se predvsem v diagnostiki rakavih bolezni. Zaradi kratkega razpolovnega časa ($t_{1/2} = 110 \text{ min}$) je potreben hiter in avtomatiziran proces pridobivanja ^{18}F (pridobiva se s pomočjo ciklotrona oz. pospeševalnika), sinteze $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$, čiščenja, kontrole kvalitete in prevoza

do uporabnika. V zadnjih letih se v diagnostiki kot PET sevalec vedno bolj uporablja tudi ^{68}Ga . Slednjega eluiramo iz $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generatorja in ga lahko kompleksiramo z različnimi bifunkcionalnimi kelatorji. (4)

Za peptidno-receptorsko radionuklidno terapijo (PRRT) so potrebni radionuklidi z visokim citotoksičnim potencialom. Primerna izbira so β -sevalci s srednje dolgo razpolovno dobo. Za zdravljenje večjih tumorjev se uporablja ^{90}Y , ki ima višjo energijo, medtem ko se ^{177}Lu in ^{131}I zaradi nižje energije uporabljata za terapijo manjših metastaz. (4)

Preglednica I: Radionuklidi, ki se najpogosteje uporabljajo v diagnostiki in zdravljenju.

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

Izpostavljenost celice sevanju povzroča manjše ali večje število poškodb DNK in drugih molekul, posledice pa so odvisne od energije in vrste sevanja. Zaradi tega mora biti uporaba virov sevanja upravičena glede na pričakovane rezultate. To pomeni, da mora biti korist sevanja večja kakor škoda za zdravje ljudi, ki jo uporaba sevanja povzroči. Vse prejete doze naj bodo najnižje možne, to pa dosežemo z omejitvijo časa izpostavljenosti sevanju, z delom na čimvečji razdalji od vira sevanja ter z uporabo zaščitnih sredstev, ki oslabijo sevanje. (8) Po Pravilniku o obveznostih izvajalca sevalne dejavnosti in imetnika vira ionizirajočih sredstev lahko v prostore, kjer se izvaja sevalna dejavnost, vstopajo samo osebe, ki so seznanjene s tveganjem in navodili v zvezi z delom, imajo ustrezno znanje o zaščitnih ukrepih, so opravile zdravniški pregled in so vključene v osebno dozimetrijo. (10)

1.5 RAZVOJ RADIOOZNAČENIH GASTRINSKIH ANALOGOVI

1.5.1 RAZVOJ IDEALNEGA RADIOFARMAKA

Pri razvoju radiofarmakov je treba upoštevati določene posebnosti, ki ločijo radiofarmake od tradicionalnih zdravil. Radiofarmaki, tako tisti za diagnostične kot tudi tisti za terapevtske namene, naj bi imeli hiter plazemski očistek, ki zagotavlja ravno dovolj časa za doseg in porazdelitev v tarčnem organu. Nevezan radiofarmak naj bi se hitro izločil iz telesa, tako da se radioaktivnost zazna samo v tarčnem organu. Prav tako je pomembno, da se radiofarmak ne kopiči v netarčnih organih, saj bi to pomenilo nizko razmerje tarča-ozadja oz. signal-šum. To razmerje je najpomembnejši faktor pri razvoju idealnega radiofarmaka, katerega odlikujejo naslednje lastnosti:

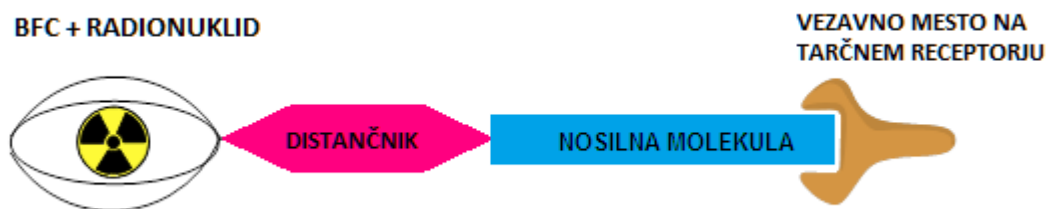
1. Izkazovanje visoke afinitete do tarčne molekule (receptorja, antigena, ipd). Poleg tega je pomembna tudi visoka izraženost slednje v tarčnem tkivu.
2. Nizka nespecifična vezava, saj le-ta predstavlja glavni vir ozadja oz. šuma na scintigrafskih slikah. Nespecifična vezava je v veliki meri odvisna od kemijskih lastnosti radiofarmaka (npr. kopičenje lipofilnih spojin v jetrih, vezava na plazemske proteine).
3. Radiofarmak naj bi imel ustrezno stabilnost. Z razpadom molekule imajo nastali radioaktivni metaboliti pogosto drugačne lastnosti kot prvotna spojina, kar pomeni, da lahko pričakujemo tudi drugačen način porazdelitve po telesu.
4. Radioaktivni izotop naj bi ostal ves čas vezan na nosilno molekulo.
5. Radiofarmak naj bi hitro dosegel izvencelični prostor (imel naj bi visoko kapilarno permeabilnost). Pri tem so bolj uspešne molekule z nižjimi molekulskimi masami.
6. Hiter plazemski očistek. V plazmi naj bi bil radiofarmak prisoten dovolj časa, da se porazdeli po tarčnem tkivu, nato pa naj bi se hitro izločil.
7. Pot izločanja nevezanega radiofarmaka naj ne bi vplivala na prikaz radioaktivnosti v tarčnem organu. Zaželeno je izločanje preko ledvic, saj je hitrejše in izloči se lahko velika količina radioaktivne snovi. Z izločanjem preko jeter se lahko radioaktivna snov zadrži v GIT. (11)

1.5.2 RAZVOJ RADIOFARMAKOV ZA CILJANJE RECEPTORJEV *IN VIVO*

Radiofarmaki, ki so zasnovani za ciljanje receptorjev *in vivo*, igrajo vedno bolj pomembno vlogo v zgodnjem prepoznavanju in terapiji raka. Sestavljeni so iz štirih osnovnih delov: nosilna molekula, distančnik, bifunkcionalni kelator (BFC) in radionuklid (slika 2).

Nosilna molekula je del radiofarmaka, ki je prepoznan s strani tarčnega receptorja. Služi kot dostavni sistem, ki prenese radionuklid do tkiva z izraženimi tarčnimi receptorji, radionuklid pa predstavlja vir sevanja. Z različnimi distančniki lahko spreminjamo farmakokinetiko radiofarmaka, s čimer lahko vplivamo na razmerje tarča-ozadje. BFC je pomemben pri radioaktivnem označevanju nosilne molekule, saj je njegova funkcija stabilna vezava radionuklida. BFC je na enem koncu kovalentno vezan na molekulo (direktno ali prek distančnika), na drugem koncu pa je močno usmerjen proti kovinskemu ionu. (12) Zaradi teme magistrskega dela bomo različne BFC podrobneje predstavili v poglavju 1.6 BIFUNKCIONALNI KELATORJI.

Pri razvoju radiofarmakov je zelo razširjena uporaba peptidov kot nosilnih molekul. Peptidi omogočajo veliko možnosti za optimizacijo strukture, s čimer se lahko čim bolj približamo lastnostim idealnega radiofarmaka (glej poglavje 1.5.1 RAZVOJ IDEALNEGA RADIOFARMAKA). Molska masa peptidnih radiofarmakov je relativno nizka, zato jih odlikujeta ustrezna kapilarna permeabilnost za hiter doseg izvenceličnega prostora ter hiter plazemski očistek. (11)



Slika 2: Shematski prikaz radiofarmaka in njegovih štirih osnovnih delov: nosilna molekula, distančnik, bifunkcionalni kelator (BFC) in radionuklid.

1.5.3 RAZVOJ RADIOPEPTIDOV ZA CILJANJE GASTRINSKEGA (CCK2) RECEPTORJA

Kot je bilo že omenjeno, nekatere tumorske celice na svoji površini v veliki meri izražajo različne regulatorne peptidne receptorje. Tako je CCK2R s svojim endogenim ligandom gastrinom odlična tarča za diagnosticiranje in terapijo nekaterih tumorjev v nuklearni medicini. Gastrin je majhna molekula, ki zlahka prehaja v vsa tkiva, razen v možgane, saj zaradi hidrofilnosti ne more prečkati hematoencefalne bariere. Če torej gastrin oz. njegove analoge radioaktivno označimo, bodo ti peptidi delovali kot dostavni sistemi, ki prenesejo radioaktivnost do tkiv z izraženimi CCK2R. (6)

Veliko raziskovalnih skupin se je usmerilo v razvoj radiooznačenih analogov gastrina oziroma krajše različice minigastrina (MG=Leu-(Glu)₅-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂), ki bi bili primerni za klinično uporabo. Na podlagi njihovih ugotovitev lahko razvoj slednjih strnemo v nekaj ključnih točk:

- AFINITETA IN SELEKTIVNOST

Za vezavo na CCK2R je bistveno C-terminalno zaporedje –Trp-Met-Asp-PheNH₂, pri čemer je lahko metionin zamenjan z levcinom ali norlevcinom. (6) Z zamenjavo Met z (NMet)Nle dobimo agoniste z zelo visoko afiniteto do CCK2R, kar je lep primer, kako lahko majhne razlike v strukturi vplivajo na afiniteto in selektivnost do receptorjev. (13) Desulfatiranje ali odstranitev tirozina vodita do zmanjšanja afinitete za več velikostnih razredov, ugotovili pa so tudi, da negativni naboj pentaglutamatnega zaporedja pripomore k visoki afiniteti in selektivnosti za CCK2R podobno kot pripomore sulfatni ester k vezavi na CCK1R. (6)

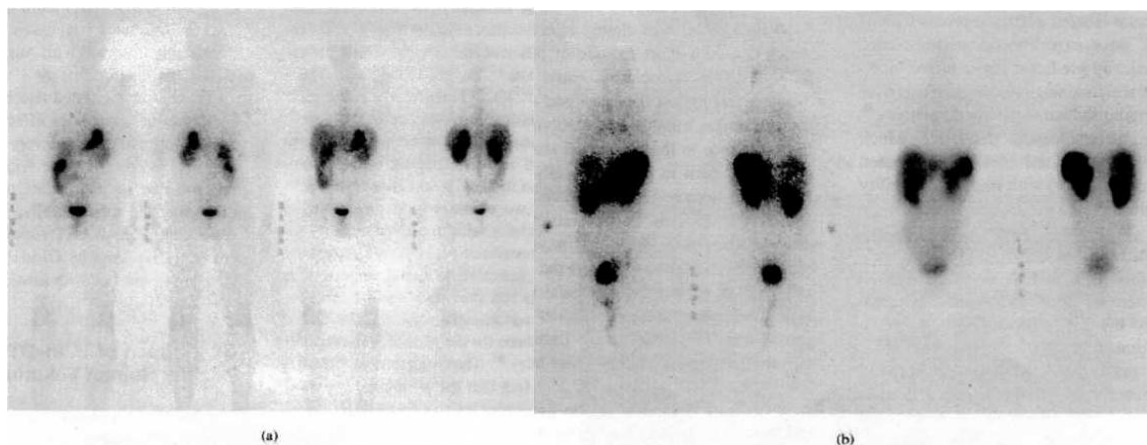
- METABOLIČNA STABILNOST

Na voljo so različni pristopi za povečanje serumske stabilnosti peptidov: N-metiliranje, uporaba nenaravnih aminokislin, D-aminokislin, cikliziranih peptidov in peptidomimetikov. (11) Stabilnost različnih gastrinskih analogov so raziskovalci testirali *in vitro* v človeškem serumu pri temperaturi 37 °C. Behe in Behr (6) sta pri tem ugotovila, da imajo peptidi z N-terminalno vezanim piroglutamatom (pGlu) bistveno daljši razpolovni čas v serumu kakor tisti s prosto N-terminalno amino skupino. Prav tako je k izboljšanju stabilnosti vodila zamenjava L-levcina z D-levcinom minigastrina. Vpliv podaljšanja verige in zamenjave L-AK z D-AK na izboljšano metabolično stabilnost je potrdila tudi Peitl s sodelavci (14, 15).

- BIODISTRIBUCIJA

Študije biodistribucije so izvedli na golih miših s TT ksenograftom (celična linija humanega MTC). Sulfatirani peptidi so v primerjavi z nesulfatiranimi izkazovali bistveno večji privzem in daljši čas zadrževanja v tkivih z izraženimi CCK2R (tumorji, želodec, žolčnik in trebušna slinavka). (6)

Rezultati študij porazdelitve na zdravih preiskovancih so se skladali s predkliničnimi raziskavami. Po injiciranju ¹¹¹In-DTPA(D-Leu¹)-MG in/ali njegovega D-Glu¹ derivata so slednja zaznali v tkivih s fiziološko prisotnimi CCK2R. Največji privzem radiopeptida je bil v želodec, sledijo mu ledvica kot organ izločanja (slika 3). (6)



Slika 3: Ciljanje CCK2R pri 32-letnem zdravemu prostovoljcu. (a) Scintigrafija celega telesa 4 ure (levo) in 24 ur (desno) po injiciranju kaže na velik privzem v želodec, žolčnik in ledvica. (b) Primerjava ^{111}In -DTPA-(D-Leu¹)-MG (levo) in njegovega D-Glu¹ analoga (desno) kaže na veliko večjo stabilnost zadnjega (manjši privzem v jetra in kostni mozeg). (Povzeto po viru 6.)

• IZLOČANJE

Glavna pot izločanja radiofarmakov je skozi ledvica. Večina radiopeptidov se v glomerulih prosto filtrira, nato pa se internalizirajo v celicah proksimalnih tubulov. V lizosomih tubulov peptid razpade na AK, ki se vrnejo v krvni obtok, BFC z radionuklidom pa ostane ujet v lizosomu. Na ta način so ledvica izpostavljena visokim dozam sevanja, kar lahko povzroči akutno ali kronično radiacijsko nefropatijo. Omejitev zadrževanja radioaktivnosti v ledvicah zato predstavlja enega izmed glavnih izzivov pri razvoju radiopeptidov. Eden izmed pristopov k zmanjšanju vpliva sevanja na ledvica je sočasna aplikacija gelofuzina. Gelofuzin je plazma ekspander, ki je v različnih študijah uspešno inhibiral reabsorpcijo radiopeptidov, med drugim tudi MG. Podobno delovanje so uspeli dokazati tudi z albuminom in njegovimi fragmenti, reabsorbcijo MG pa prav tako zmanjša ko-administracija negativno nabitih poliglutaminskih kislin. Različne raziskovalne skupine so ugotovile, da odstranitev pentaglutamatnega distančnika vodi k zmanjšanju privzema radiopeptidov v ledvica, a so take spojine metabolično nestabilne. V tem primeru je dobra rešitev uporaba neionskih distančnikov, kot so D-izomeri različnih aminokislin (npr. D-Gln), ki obenem izkazujejo tudi boljšo metabolično stabilnost. (15) V kasnejših študijah so ugotovili, da uvedba ionskega (D-Glu)₆ distančnika kot stereoizomerna zamenjava za L-Glu distančnik minigastrina pri nespremenjenem obsegu privzema v tumor prav tako izkazuje nizko zadrževanje v ledvicah in visoko metabolično stabilnost. (14) Spojina DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp- Met-Asp-Phe-NH₂ je bila tako v primerjalni študiji, ki

je potekala v okviru COST projekta BM0607 Targeted Radionuclide Therapy, izbrana kot najprimernejša za nadaljnje raziskave na ljudeh. (16, 17)

- **KLINIČNA UČINKOVITOST**

Analoge z obetavnimi rezultati v predkliničnih testiranjih so preizkusili še na bolnikih. Po injiciranju ^{111}In -DTPA-D-Glu¹-MG 75 bolnikom z metastatskim MTC je bilo tumorje moč zaznati že po 1 uri, optimalni čas slikanja pa je bil po 24 urah. Od skupno 75 preiskovancev jih je 23 imelo že diagnosticiran MTC. Pri 29 od 32 bolnikov s prikritim MTC so odkrili vsaj eno lezijo. Opazili so enak privzem v želodec in ledvica kot pri zdravih prostovoljcih. Da bi preizkusili še terapevtsko učinkovitost, so osmim bolnikom s hitro napredujočim metastatskim MTC v 4-6 tedenskih intervalih injicirali visoke odmerke z ^{90}Y označenega DTPA-D-Glu¹-MG. Slednji se je izkazal za hudo toksičnega (višji odmerki so sicer privedli do stabilizacije prej hitro napredujoče bolezni, vendar so bolniki razvili trombocitopenijo in ledvično odpoved), zato so morali raziskave nadaljevati z manj nevarnimi radionuklidi, kot je npr. ^{111}In . (6)

V drugi klinični študiji z ^{111}In -DTPA-D-Glu¹-MG so pri 26 bolnikih z MTC opazili 87 % stopnjo detekcije tumorjev, vendar je večina teh bolnikov imela že znane metastaze. Tumorske lezije so odkrili samo pri enem izmed bolnikov s prikritim MTC. V raziskavi, v kateri so primerjali $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demogastrin 2 z ^{111}In -DOTA-CCK8 in ^{111}In -DOTA-MG11 (formule vseh treh analogov so prikazane v preglednici II), se je $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demogastrin 2 izkazal za najboljšega diagnostika. Z njim so zaznali vse že znane lezije pri šestih bolnikih z MTC, pri štirih pa so odkrili še nove lezije. (4)

Preglednica II: Analogi, ki so omenjeni v nalogi ter njihove kemijske formule.

ANALOG	KEMIJSKA FORMULA
^{111}In -DTPA-(D-Leu ¹)-MG	^{111}In -DTPA-D-Leu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
^{111}In -DTPA-(D-Glu ¹)-MG	^{111}In -DTPA-D-Glu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demogastrin 2	$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]_2\text{N}_4^{0-1}\text{-Gly-D-Glu-(Glu)}_5\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2$
^{111}In -DOTA-CCK8	^{111}In -DOTA-D-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
^{111}In -DOTA-MG11	^{111}In -DOTA-D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂

N₄=N,N',N'',N'''-tetra-(tert-butoksikarbonil)-6-(karboksi)-1,4,8,11-tetraazaundekan

V teku je projekt v okviru evropskega raziskovalnega programa Framework Programme 7 (FP7), ERA-NET s področja Translational Cancer Research (**TRANSCAN**), "Validation

of biomarkers for personalised cancer medicine", Prva faza klinične študije z uporabo novega radiooznačenega peptida za lokalizacijo CCK2/gastrinskih receptorjev z namenom individualne diagnostike in terapije pri bolnikih s progresivnim ali metastatskim medularnim karcinomom ščitnice." Kot peptid v tej študiji je proučevan DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂.

1.6 BIFUNKCIONALNI KELATORJI

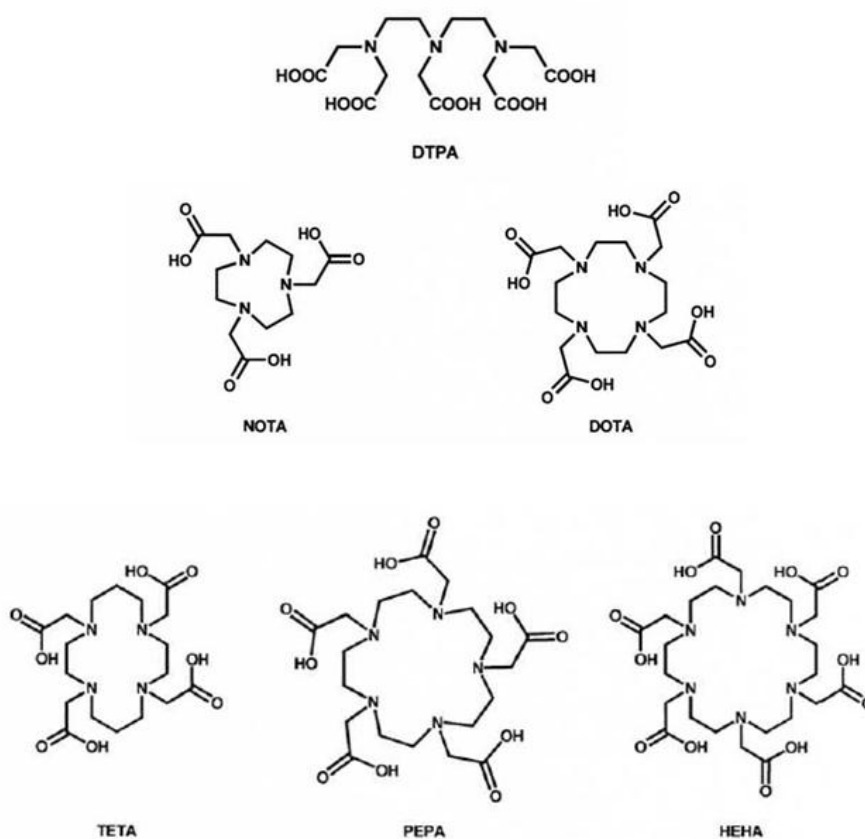
Z uporabo radioaktivnih kovin v nuklearni medicini se je pojavila potreba po razvoju različnih BFC. Glavna vloga BFC je, da kompleksira in stabilizira kovinski radioizotop ter na ta način prepreči njegovo odpuščanje z radiofarmaka v fiziološkem okolju. Ker služi kot povezovalni člen med nosilno molekulo in kovinskim radioizotopom, mora imeti poleg ustrezne koordinacijske kemije za tvorbo kovinskih kelatov tudi primerno funkcionalno skupino za vezavo na nosilno molekulo. (18)

Pri razvoju BFC je treba upoštevati številne kriterije, s katerimi zagotovimo stabilnost kovinskih kompleksov v serumu. Ključni elementi so naboj, ujemanje velikosti ionskega radija radionuklida z velikostjo koordinacijske kletke kelatorja ter ustrezno število donorskih skupin s primernimi kemijskimi lastnostmi. Poleg naštetih sta pomembni tudi stopnja tvorbe kompleksov in stopnja disociacije. (19) Na disociacijo radionuklida vplivajo različni faktorji, kot so prisotnost protonov in kovinskih ionov (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) ter hidroksidov, fosfatov in nativnih kelatorjev (npr. transferina) v krvi. Prvi tekmujejo za vezavo na BFC, zadnji pa lahko vežejo radionuklid ali z njim tvorijo netopne hidrokside. Zaradi odcepitve ali disociacije radionuklida lahko pride do kopičenja radioaktivnosti v netarčnih organih. Tako se lahko ^{90}Y in izotopi lantanoidov vežejo na hidroksiapatit in na ta način povečajo sevanje v kostnem mozgu. (20) V primeru radioterapevtikov bo posledica disociacije predvsem radiotoksičnost, v primeru radiodiagnostikov pa slabo razmerje tarča-ozadje. (19)

Idealen BFC mora biti odporen na radiolizo, s kovinskim ionom mora tvoriti kelat z visoko termodinamsko stabilnostjo in kinetično inertnostjo pri nevtralnem pH ter imeti mora minimalno število izomerov. Termodinamska stabilnost je pomemben faktor pri ohranjanju integritete radiofarmaka v fiziološkem okolju, kjer naravni kelatorji, kot je transferin, tekmujejo za vezavo radionuklida. Še pomembnejši faktor je kinetična inertnost, ki se nanaša na stopnjo disociacije radionuklida iz radiofarmaka. Nadalje so zaželeni hidrofilni

BFC, saj se bodo le-ti hitreje izločili iz krvi in skozi ledvica. Pomembno je tudi, da BFC preko konjugacijske skupine zlahka vežemo na biomolekulo (peptid). (20)

Razvitih je bilo veliko acikličnih in makrocikličnih BFC. Kot prve so po vzoru etilendiamintetraocetne kisline (EDTA) razvili aciklične kelatorje, vendar so bili njihovi kompleksi *in vivo* zelo slabo stabilni. Kot odgovor na to slabost so razvili dietilentriaminpentaocetno kislino (DTPA) in njene derivate. Še bolj stabilne komplekse kot DTPA tvorijo makrociklični kelatorji. Njihova splošna struktura je poliazamakrociklična, najbolj pogosto uporabljeni predstavniki te skupine pa so 1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraocetna kislina (DOTA) in 1,4,7-triazaciklononan-1,4,7-triocetna kislina (NOTA) ter njuni derivati. Ker je zanje značilna zelo počasna tvorba kompleksov, so razvili večje makrociklične BFC, ki temeljijo na 14-, 15- in 18-členskih obročih. Primeri takih BFC so 1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan-N,N',N'',N'''-tetraocetna kislina (TETA), 1,4,7,10,13-pentaazaciklopentadekan-N,N',N'',N''',N''''-pentaocetna kislina (PEPA) in 1,4,7,10,13,16-heksaazaciklooktadekan-N,N',N'',N''',N'''',N'''''-heksaocetna kislina (HEHA). Kljub izboljšani kinetiki označevanja je njihova pomanjkljivost slaba stabilnost. (18) Strukture nekaterih acikličnih in makrocikličnih BFC so predstavljene na sliki 4.

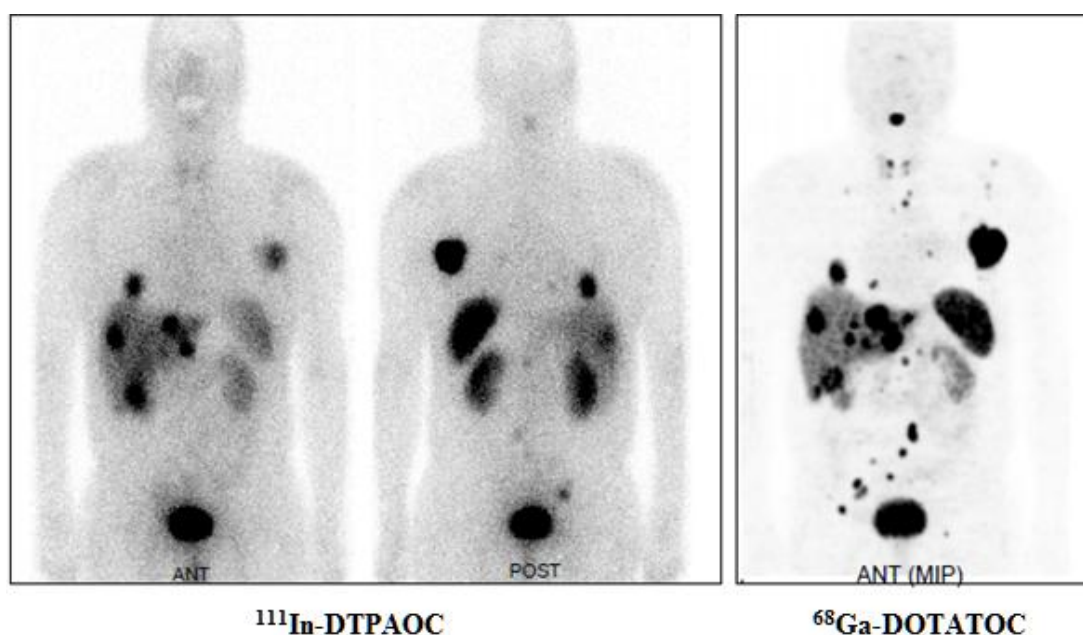


Slika 4: Strukture nekaterih acikličnih (DTPA) in makrocikličnih (NOTA, DOTA, TETA, PEPA, HEHA) BFC.

DOTA je najverjetneje komercialno najbolj dostopen ter v praksi najbolj pogost BFC. Kelira lahko veliko različnih di- in tri-valentnih kovin ter z njimi tvori termodinamsko zelo stabilne in kinetično inertne komplekse. Ker ima v svoji strukturi acetat, so kompleksi zelo hidrofilni in hitro zapustijo telo. Poleg tega nizka pK_a vrednost karboksilne skupine zmanjša možnost disociacije radioaktivne kovine v kislem. Glavna slabost DOTA-e je v samem procesu označevanja. Pri sobni temperaturi je namreč tvorba kompleksov zelo počasna in močno odvisna od pogojev označevanja (temperatura in čas poteka reakcije, vrsta in koncentracija pufra, pH reakcijske zmesi, količina konjugata DOTA-peptid, prisotnost drugih kovinskih ionov, kot sta $Fe(III)$ in $Zn(II)$). Čeprav aciklični BFC (DTPA analogi) v primerjavi z DOTA-o ne izkazujejo tako visoke kinetične inertnosti, je njihova glavna prednost ravno hiter potek označevanja pod milimi pogoji (sobna temperatura, pH 4-7). (18)

1.6.1 BIFUNKCIONALNI KELATORJI ZA OZNAČEVANJE Z GALIJEM IN INDIJEM

V preteklosti sta se za označevanje radiodiagnostikov uporabljala predvsem gama-sevalca ^{99m}Tc in ^{111}In , ki sta postala dobro uveljavljena radionuklida za slikanje s SPECT tehniko. V zadnjem desetletju pa je razvoj precej bolj usmerjen v uporabo PET radiofarmakov. Poleg ^{18}F je na tem področju zelo zanimiv ^{68}Ga . Zaradi kratkega razpolovnega časa je ^{68}Ga idealen za označevanje peptidov, saj je zanje značilen zelo hiter plazemski očistek in doseg tarče. (21) Tako galij kot indij spadata v skupino IIIB kovin in imata zelo podobno koordinacijsko kemijo. To je razlog, da lahko v mnogih primerih radioznačevanja ^{111}In zamenjamo z ^{68}Ga . ^{68}Ga pridobivamo dnevno iz $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generatorja, tako da je to primerna rešitev tudi za nuklearno-medicinske centre, kjer nimajo ciklotrona. Primerjavo dveh radiofarmakov, označenih z gama sevalcem ali PET sevalcem in hkrati primerjavo obeh slikovnih tehnik (SPECT vs. PET) prikazuje slika 5. V prid ^{68}Ga govorijo tudi rezultati raziskav na pacientih z nevroendokrinimi tumorji. V primerjavi z ^{111}In je bil ^{68}Ga veliko boljši v zaznavanju manjših tumorjev in tumorjev z manjšo izraženostjo somatostatinskih receptorjev 2 (sst_2). Poleg odličnih diagnostičnih lastnosti je dosegel tudi visoko razmerje tarča-ozadje (slika 5). (22, 23)



Slika 5: Primerjava diagnostičnih slik istega pacienta z nevroendokrinim tumorjem na pljučih po aplikaciji radiooznačenih analogov somatostatina $^{111}\text{In-DTPA-OC}$ (SPECT) in $^{68}\text{Ga-DOTATOC}$ (PET). (Povzeto po viru 23.)

Zaradi podobne kemije galija in indija v nadaljevanju predstavljamo lastnosti in najbolj primerne BFC za oba radioizotopa.

Prevladujoče oksidacijsko stanje galija in indija v vodnih raztopinah je +3. Zaradi velike gostote naboja so zanju primerni močni donorji elektronov, kot sta npr. amski dušik ali karboksilatni kisik polidentatnih kelatorjev. Tako Ga(III) kot In(III) sta po koordinacijski kemiji podobna Fe(III). Zanju značilna hidroliza pri $\text{pH} > 4$ predstavlja glavni problem pri radioaktivnem označevanju. (12) Koordinacijsko število Ga(III) je odvisno od liganda lahko 3, 4, 5 ali 6. Najbolj stabilni so 6-koordinirani Ga(III) kompleksi. Koordinacijsko število In(III) je običajno 6 ali 7, redko 8. (18) Za označevanje majhnih molekul z ^{68}Ga in ^{111}In se veliko uporabljajo DTPA, DOTA in NOTA. Med različnimi cikličnimi in acikličnimi kelatorji sta za označevanje z ^{68}Ga najbolj primerna 1,4,7-triazaciklononan-N-jantarna kislina-N',N''-diocetna kislina (NODASA) in 1,4,7-triazaciklononan-N-glutaminska kislina- N',N''-diocetna kislina (NODAGA), saj so njuni kelati z ^{68}Ga zelo hidrofilni in stabilni. Z NOTA-o tvori ^{68}Ga 4-krat bolj stabilen kompleks kakor ga tvori ^{111}In . Ravno obratno je z DOTA-o, ki tvori bolj stabilne komplekse z ^{111}In . Razlog je v tem, da je koordinacijska kletka DOTA-e prevelika za ^{68}Ga in se lahko z N_4O_4 donorji tvori le šest povezav. Posledično je konstanta za termodinamsko stabilnost Ga(NOTA) veliko večja kakor za Ga(DOTA). (12)

Z raziskavami na somatostatinskih antagonistih so ugotovili, da lahko zamenjava BFC vpliva tudi na farmakokinetiko, afiniteto in privzem v tumor, zato je izbira primerne BFC še kako pomemben faktor pri razvoju radiopeptida, primerne za klinično uporabo. (22)

2 NAMEN DELA

Namen tega magistrskega dela je sintetizirati različne analoge minigastrina kot potencialne kandidate za detekcijo tumorjev, ki na svoji površini izražajo gastrinske (CCK2) receptorje. Sintezo bomo izvedli po principu sinteze peptidov na trdnem nosilcu (SPPS). Izhajali bomo iz analoga minigastrina DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, s katerim trenutno poteka priprava na multicentrično študijo prve faze kliničnega testiranja. DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ nam predstavlja spojino vodnico, ki jo bomo modificirali na N-terminalnem delu in sicer z namenom optimizacije vezave PET radionuklida ⁶⁸Ga. Na ta način bomo pripravili spojino za PET slikovno diagnostiko, ki je boljša v primerjavi s konvencionalno SPECT slikovno tehniko. V ta namen bomo izvedli konjugacijo s tremi različnimi bifunkcionalnimi kelatorji, poleg osnovne DOTA-e še z NOTA-o ali NODAGA-o. Izbira bifunkcionalnega kelatorja je odvisna predvsem od koordinacijske kemije kovinskega radionuklida, vendar tudi znotraj iste skupine kovin določen kelator ne kelira vseh kovin enako dobro. Za naše magistrsko delo bomo izbrali pozitronski sevalec ⁶⁸Ga, ki se v klinični praksi zaradi svoje dostopnosti in dobrih diagnostičnih lastnosti vedno bolj uporablja. Eluirali ga bomo iz ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generatorja in preverili, če so naši sintetizirani analogi primerni za označevanje z njim. Dodatno bomo sintetizirali še analoge minigastrina, prav tako konjugirane z DOTA-o, NOTA-o ali NODAGA-o, vendar z dodatno modifikacijo na metabolno nestabilnem mestu C-terminalnega dela, kjer bomo na Met uvedli metilno skupino. Tudi te bomo označili z ⁶⁸Ga.

V preglednici III predstavljamo kemijske formule in oznake analogov, ki jih bomo sintetizirali.

Preglednica III: Z različnimi bifunkcionalnimi kelatorji konjugirani analogi minigastrina, ki jih bomo sintetizirali v nalogi. V desnem stolpcu so analogi z modifikacijo na metioninu.

<u>SNL1</u>	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	<u>SNL4</u>	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH ₂
<u>SNL2</u>	NOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	<u>SNL5</u>	NOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH ₂
<u>SNL3</u>	NODAGA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	<u>SNL6</u>	NODAGA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH ₂

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SINTEZNI DEL

Reagenti in topila:

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

Kot nosilec za sintezo peptida smo uporabili Rink Amide MBHA[®], proizvajalca Merck, Novabiochem (Nemčija). S Fmoc zaščitene aminokisline ter aktivacijski reagent HATU so prav tako proizvedeni v Mercku, Novabiochem.

Aminokislinsko zaporedje Fmoc-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-Rink Amide[®] je bilo predhodno sintetizirano na Kliniki za nuklearno medicino v UKC Ljubljana.

Raztopini za Kaiser test smo pripravili v laboratoriju na Kliniki za nuklearno medicino. Reagent A je sestavljen iz raztopine 8 g fenola v 2 mL etanola in 0,2 mL 0,001 M vodne raztopine KCN v 9,8 mL piridina. Reagent B je raztopina 0,5 g ninhidrina v 10 mL etanola. Raztopino za odstranitev zaščitnih skupin in hkratno cepitev peptida z nosilca smo prav tako pripravili svežo v laboratoriju na Kliniki za nuklearno medicino. Sestavljena je iz 91 % trifluorocetne kisline (TFA), 3 % H₂O, 5 % tioanizola in 1 % triizopropilsilana (TIS).

Bifunkcionalni kelatorji DOTA-tris(tBu)ester, NOTA-bis(tBu)ester in NODAGA(tBu)₃ so proizvedeni v podjetju Chemsynth (Francija).

Tehtanje:

Uporabili smo analitsko tehtnico Mettler Toledo AX105 Delta Range[®] (Švica).

Segrevanje:

Pri izvajanju Kaiser testa smo vzorec segrevali v Termoproc segrevalnem bloku tipa TBTS, proizvajalca Labo d.o.o. (Slovenija) pri temperaturi 100 °C.

UV/VIS spektroskopija:

Absorbanco raztopin z odstranjeno Fmoc zaščitno skupino smo merili z Lambda 12 UV/VIS spektrofotometrom, proizvajalca Perkin Elmer (Nemčija). Meritve smo izvajali pri valovni dolžini 300 nm ($\epsilon = 7800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), uporabili pa smo 1 cm široko kiveto iz kvarčnega stekla.

Centrifugiranje:

Za centrifugiranje oborjenih peptidov smo uporabili centrifugo Rotanta 460 RS, proizvajalca Hettich Zentrifugen (Nemčija). Centrifugirali smo 12 min pri 4 °C in 2400 RPM.

Sušenje peptidov:

Oborjene peptide smo sušili pod znižanim tlakom. Uporabili smo vakuumsko črpalko, proizvajalca Merck Millipore (Nemčija), sušenje pa je potekalo 20 min pri sobni temperaturi in pod tlakom 650 mmHg (0,87 bar).

Analitski HPLC:

Analitsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo izvedli na sistemu Agilent Technologies 1100 Series (ZDA) z detektorjem s fotodiodnim nizom DAD (Diod Array Detector). Ločevanje je potekalo na koloni Phenomenex Gemini 5u C18 110A (150 x 4,6 mm, velikost delcev 5 µm).

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

Volumen injiciranja: 20 µL

Gradient: 5-50 % v 20 min

Pretok: 1 mL/min

Preparativni HPLC:

Peptide smo čistili s preparativnim HPLC in sicer na sistemu Agilent Technologies 1100 Series (ZDA) z detektorjem s fotodiodnim nizom DAD. Ločevanje je potekalo na koloni Phenomenex Jupiter 4u Proteo 90A (250 x 10 mm, velikost delcev 4 µm).

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

Volumen injiciranja: 5 mL

Gradient: 10-40 % v 20 min

Pretok: 5 mL/min

Masna spektrometrija:

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru Q-TOF Premier, proizvajalca Waters-Micromass (ZDA), z ESI tehniko ionizacije v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Odstranjevanje topil pod znižanim tlakom:

Vzorci smo koncentrirali s pomočjo Christ Rotational Vacuum Concentrator RVC 2-18 CD plus (Nemčija) in sicer pri temperaturi 50 °C, tlaku 4,02 mbar in 1500 RPM.

Liofiliziranje:

Za liofiliziranje spojin smo uporabili liofilizator Christ Alpha, proizvajalca BioBlock (Francija). Liofilizacija je potekala 48 ur pri podtlaku 0,47 mbar, temperaturi plošče -30 °C ter temperaturi kondenzatorja -80 °C.

Risanje struktur:

Strukture smo narisali v programu ChemBioDraw Ultra 13.0, proizvajalca CambridgeSoft (ZDA).

3.2 RADIOOZNAČEVANJE Z ^{68}Ga

Reagenti in topila:

Za radiooznačevanje peptidov z ^{68}Ga smo uporabili 2,5 M pufer 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin-etansulfonsko kislino (HEPES) s pH 3-4, proizvajalca Sigma Aldrich.

Radiooznačevanje:

$^{68}\text{GaCl}_3$ smo eluirali iz $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generatorja tipa IGG100-30M in aktivnostjo 1103 MBq, določeno na dan 15.5.2012.

Radiooznačevanje je potekalo v avtomatskem sinteznem modulu Modular-Lab Microcell, proizvajalca Eckert & Ziegler (Nemčija).

Določanje radiokemijske čistote:

Radiokemijsko čistoto smo določili z analitskim HPLC-jem in sicer na sistemu Agilent Technologies 1100 series (ZDA) z detektorjem radioaktivnosti Gabi Star (Raytest, Nemčija). Ločevanje je potekalo na koloni Kinetex 2.6u C18 100A (50 x 4.6 mm).

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

Gradient: 10-50 % B v 0-5 min

Pretok: 1,5 mL/min

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SINTEZA DOTA, NOTA IN NODAGA KONJUGIRANIH ANALOGO MINIGASTRINA

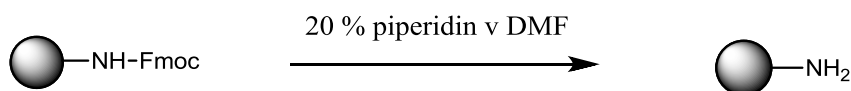
4.1.1 PRIPRAVA NOSILCA

Pred pričetkom z delom smo izračunali količino peptidnega nosilca, ki je potrebna za sintezo 10 mg peptida pri izkoristku reakcije 10 %. Uporabili smo z 9-fluorenilmetoksikarbonilom (Fmoc) zaščiteno Rink Amide MBHA[®] nosilec (0,34 mmol/g).

1. Cca. 0,5 g nosilca (natančne količine so podane v preglednicah IV in VI) smo sprali z dimetilformamidom (DMF) in ga nato 30 min namakali v približno 3 mL enakega topila, da je nabrekli.

2. Nabrekli nosilec smo 3 x 5 min namakali v 2-3 mL 20 % raztopine piperidina v DMF, da smo odstranili Fmoc zaščitno skupino (slika 6). Fmoc frakcije smo zbrali v merilno bučko, dopolnili z absolutnim etanolom do oznake, pripravili redčitev z absolutnim etanolom v razmerju 1:6 ter merili absorbanco pri valovni dolžini 300 nm ($\epsilon = 7800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Iz enačbe za absorbanco smo izračunali množino odstranjene Fmoc. Rezultat predstavlja množino AK, ki jo lahko večemo na prosta mesta na nosilcu.

3. Nosilec smo dobro sprali z DMF in izopropanolom. Nato smo ga namočili v N-metilpirolidonu (NMP), v katerem poteka pripenjanje prve AK.

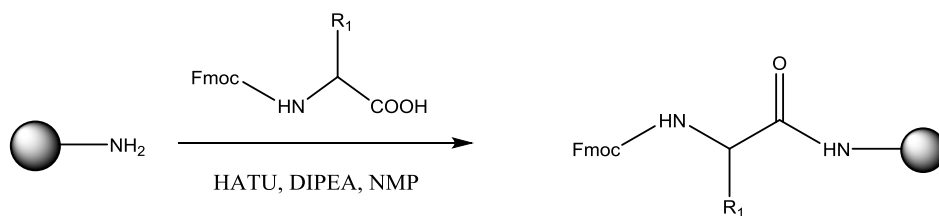


Slika 6: Shema odstranjevanja Fmoc zaščitne skupine z nosilca.

4.1.2 PRIPENJANJE AMINOKISLIN NA NOSILEC

1. Ustrezno AK smo skupaj z O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronij heksafluorofosfatom (HATU) raztopili v 3 mL NMP. Dodali smo N,N'-diizopropiletilamin (DIPEA), dobro premešali in mešanico nanесли na nosilec (slika 7). Pri pripravi reakcijske zmesi smo upoštevali stehiometrijsko razmerje nosilec: AK: HATU: DIPEA=1: 3: 3,3: 5. Količine vseh AK in reagentov so podane v preglednicah IV in VI.

2. Reakcija je ob počasnem mešanju pri sobni temperaturi potekala 1-2 uri.



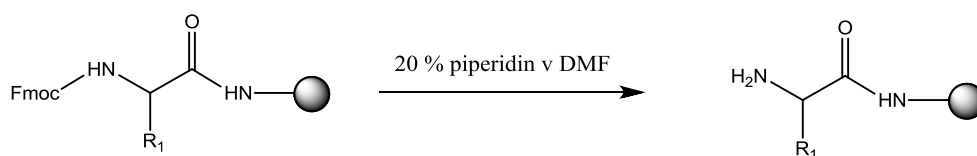
Slika 7: Shema pripenjanja prve AK na peptidni nosilec.

4.1.3 PREVERJANJE USPEŠNOSTI REAKCIJE S KAISER TESTOM

1. Po poteku reakcije smo nosilec najprej sprali 3x z DMF in nato še 3x z izopropanolom. Slednji »ožame« nosilec in na ta način odstrani vse nezreagirane reagente.
2. Odvzeli smo majhen delček nosilca in ga 3x sprali z brezvodnim etanolom.
3. Odvzetemu delčku nosilca smo dodali 50 μ L reagenta A in 50 μ L reagenta B.
4. Vse skupaj smo dobro premešali in segrevali pri temperaturi 100 °C 10 min. Modro obarvanje kroglic nosilca pomeni prisotnost prostih amino skupin oz. da reakcija ni popolnoma potekla, zato je treba v tem primeru postopek pripenjanja ponoviti. V primeru prozornih kroglic lahko nadaljujemo z odstranjevanjem Fmoc zaščitne skupine.

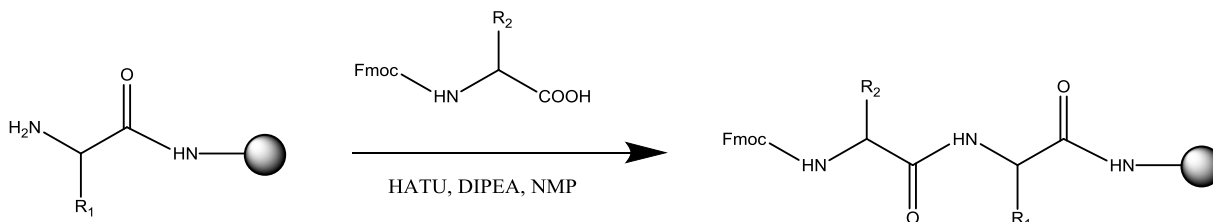
4.1.4 ODSTRANJEVANJE Fmoc ZAŠČITNE SKUPINE S TERMINALNE $-NH_2$ SKUPINE AMINOKISLINE

1. Nosilec smo 4 x 3 min namakali v 2 mL 20 % piperidina v DMF, da smo odstranili Fmoc zaščitno skupino (slika 8). Fmoc frakcije smo zbrali v 200 mL bučko.
2. Nato smo nosilec dobro sprali z DMF in izopropanolom, izpirek zbrali v bučko s Fmoc frakcijo, dopolnili z brezvodnim etanolom do oznake in merili absorbanco pri valovni dolžini 300 nm.
3. Iz enačbe za absorbanco smo izračunali množino odstranjene Fmoc (rezultati so podani v preglednicah IV in VI).
4. Nosilec smo namočili v NMP, da smo ga pripravili na pripenjanje naslednje AK.



Slika 8: Shema odstranjevanja Fmoc zaščitne skupine z $-NH_2$ skupine AK.

Sledi pripenjanje druge AK (4.1.2), preverjanje reakcije s Kaiser testom (4.1.3), odstranjevanje Fmoc zaščitne skupine novo pripete AK (4.1.4) ter vezava naslednje AK (4.1.2) (slika 9). Postopke ponavljamo v enakem zaporedju, vse dokler ne dobimo željenega peptida.



Slika 9: Shema vezave druge in vseh naslednjih AK na nastajajoč peptid.

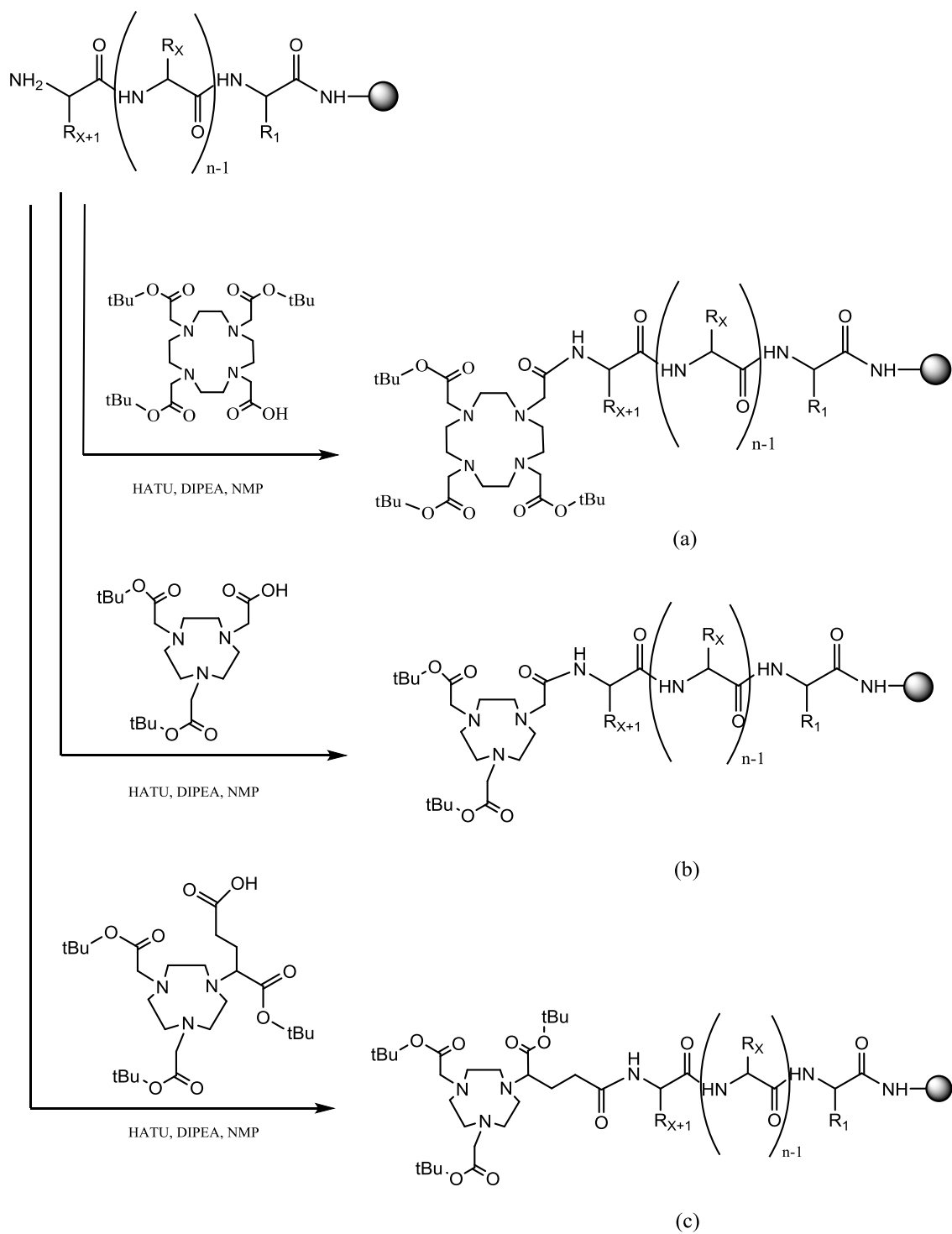
V primeru sinteze peptidov **SNL1**, **SNL2** in **SNL3** je bil velik del AK zaporedja že sintetiziran na nosilcu, zato smo namesto s pripravo nosilca (4.1.1) začeli z odstranjevanjem Fmoc skupine s terminalne $-NH_2$ skupine AK (4.1.4) in nadaljevali s pripenjanjem (D-Glu)₆ distančnika (4.1.2).

4.1.5 VEZAVA BIFUNKCIONALNIH KELATORJEV NA KONČEN PEPTID

Po uspešni vezavi zadnje AK je sledilo pripenjanje treh različnih BFC: DOTA-e, NOTA-e in NODAGA-e.

1. Nosilec s končnim peptidom smo razdelili na tri po volumnu približno enake dele.
2. Sledilo je odstranjevanje Fmoc zaščitne skupine z vseh treh delov nosilca posebej po enakem postopku, kot je opisan pod točko 4.1.4. Frakcije Fmoc smo kvantitativno ovrednotili in izračunali količine kelatorjev za vezavo.
3. Nosilec smo dobro sprali z dietil etrom in posušili pod znižanim tlakom. Iz izkušenj je bilo namreč ugotovljeno, da reakcija vezave kelatorja poteče bolje, če je nosilec predhodno posušen.
4. Posušen nosilec je nato najmanj 30 min nabrekal v 3 mL NMP.
5. Natehtali smo reagente v stehiometrijskem razmerju nosilec: NOTA/DOTA/NODAGA: HATU: DIPEA = 1: 3: 3: 7 (natančne količine so podane v preglednicah V in VII), jih raztopili v 1,5 mL NMP, dobro premešali in vse skupaj nanесли na nosilec (slika 10).
5. Reakcije so ob počasnem mešanju pri sobni temperaturi potekale čez noč.
6. Uspešnost reakcij smo preverili s Kaiser testom (4.1.3).

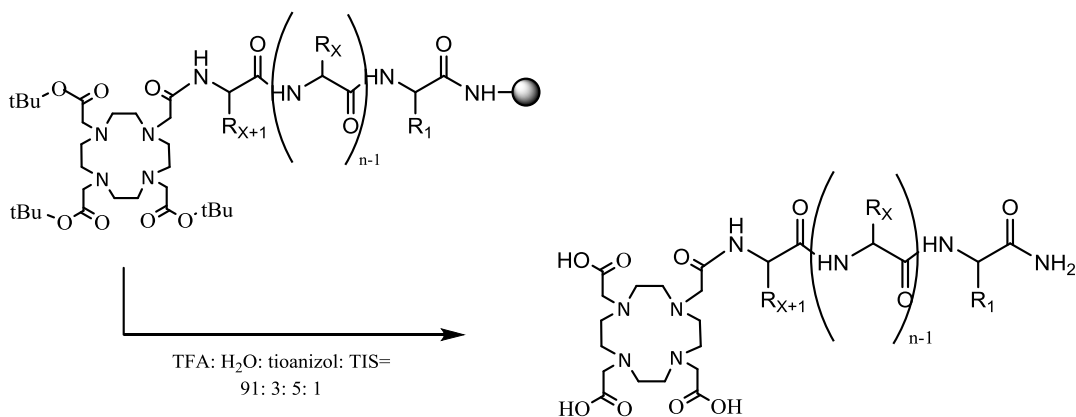
7. Nosilec z uspešno vezanim BFC smo dobro sprali z dietil etrom in posušili pod znižanim tlakom.



Slika 10: Shema vezave DOTA-e (a), NOTA-e (b) in NODAGA-e (c) na peptid.

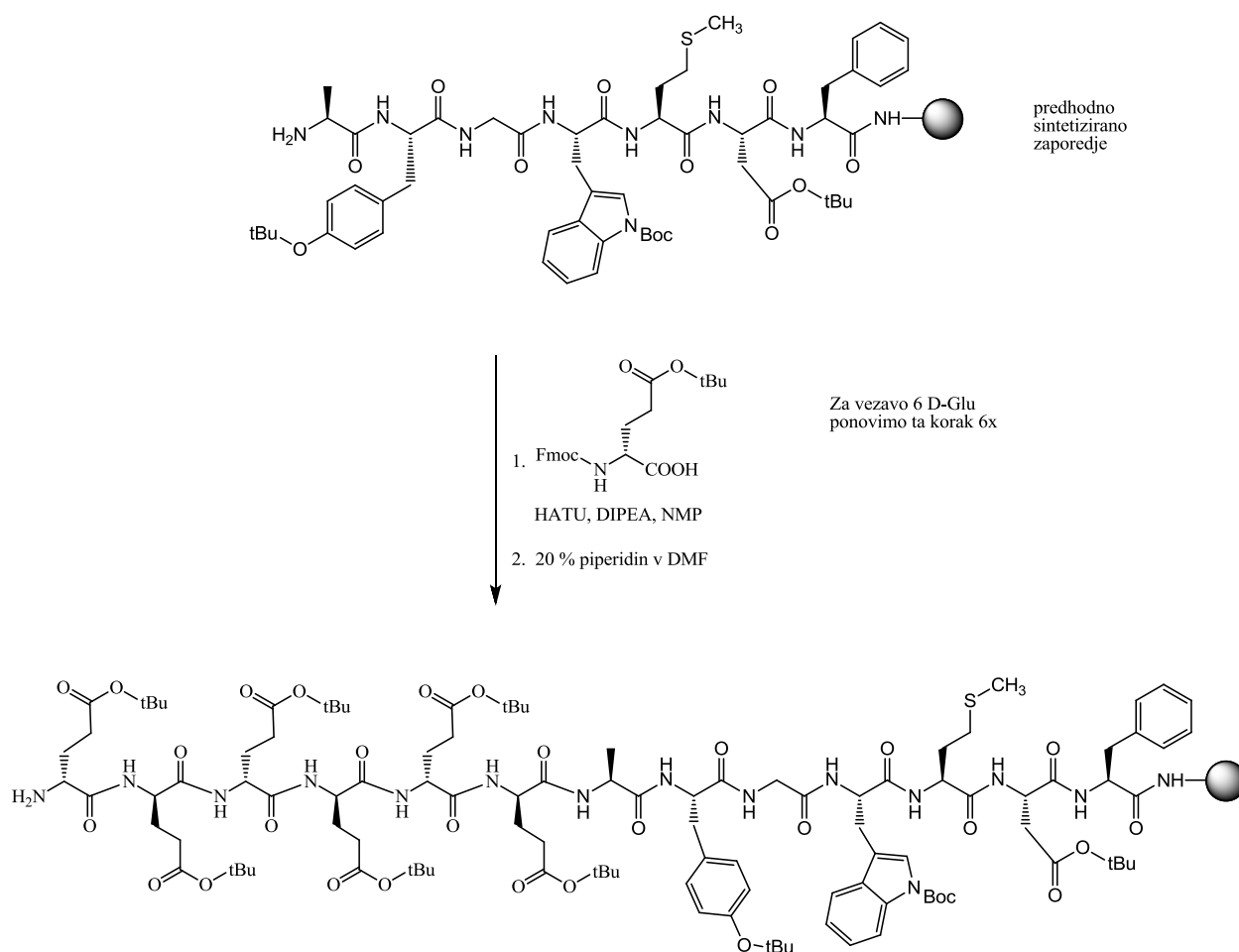
4.1.6 ODSTRANJEVANJE ZAŠČITNIH SKUPIN IN HKRATNA CEPITEV PEPTIDA Z NOSILCA

1. Posušen peptidni nosilec smo namakali 2 uri v 1-1,5 mL raztopine za odstranitev zaščitnih skupin in cepitev peptida z nosilca (slika 11).
2. Raztopinam s sproščenimi peptidi smo dodali mešanico dietil etra in petroletra (1:1), da so se peptidi oborili. Nato smo 30 min hladili v zamrzovalniku na -80°C , da je izoboritev potekla.
3. Nosilce smo ponovno 2 uri namakali v raztopini za odstranitev zaščitnih skupin in cepitev z nosilca. Raztopino s sproščenim peptidom smo dodali usedlini, ki smo jo po ohlajanju v zamrzovalniku centrifugirali in odlili supernatant.
4. Ponovili smo postopek obarjanja, vse skupaj še enkrat ohladili ter centrifugirali. Odlili smo supernatant in usedlino posušili pod znižanim tlakom.
5. Da bi popolnoma odstranili tudi terc-butilno (tBu) zaščitno skupino, ki se odstrani nekoliko težje, smo posušene produkte raztopili v 2 mL raztopine TFA (raztapljanje smo pospešili z namakanjem v ultrazvočni kadički). Reakcija je potekala 2 uri, vmes pa smo raztopino občasno pretresli.
6. Nato smo ponovno sprožili obarjanje z dietil etrom/petroletrom, ohlajali na -80°C in centrifugirali. Usedline smo dobro sprali z dietil etrom in jih posušili pod znižanim tlakom.

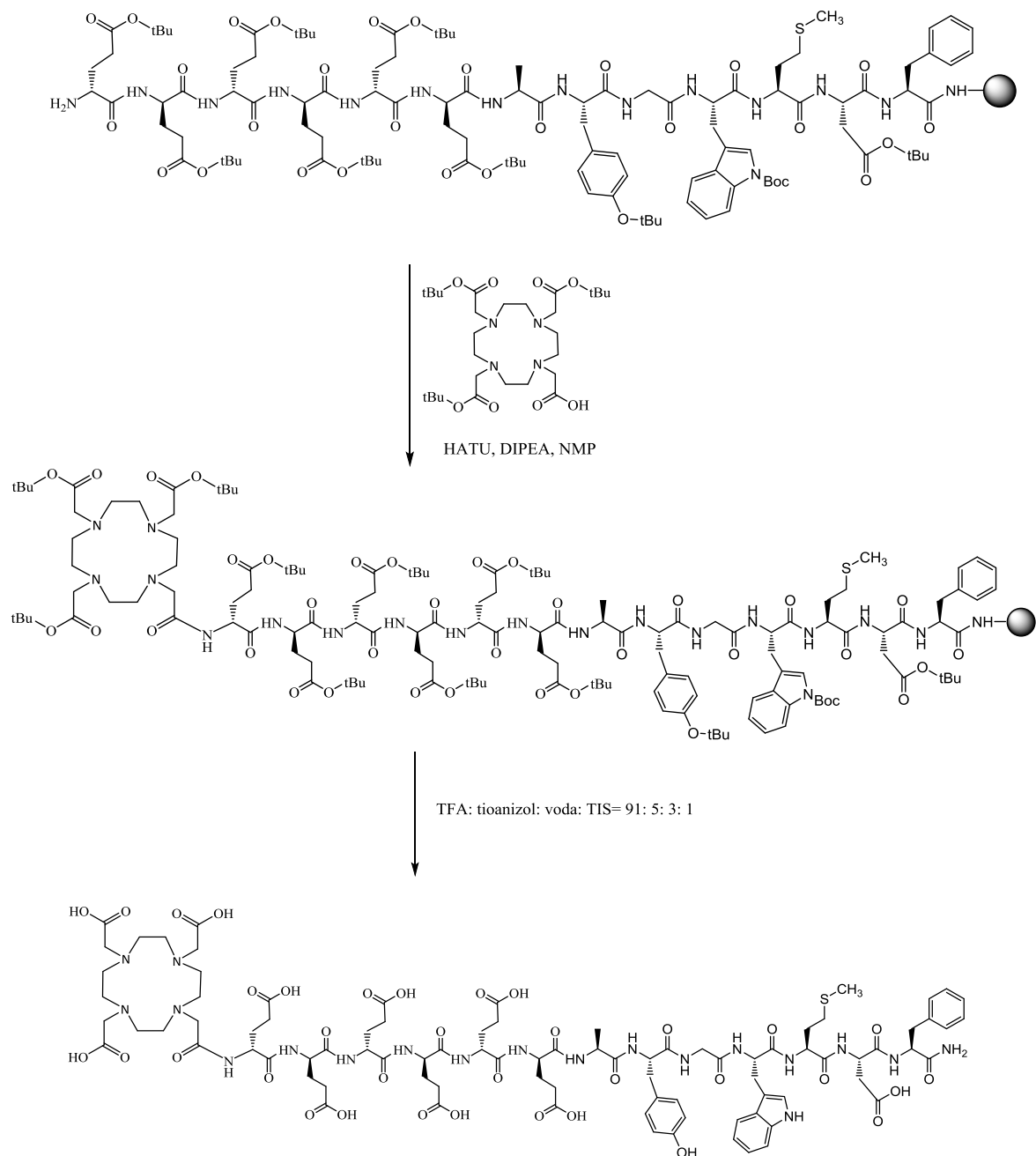


Slika 11: Shema odstranjevanja zaščitnih skupin in hkratna cepitev peptida z nosilca.

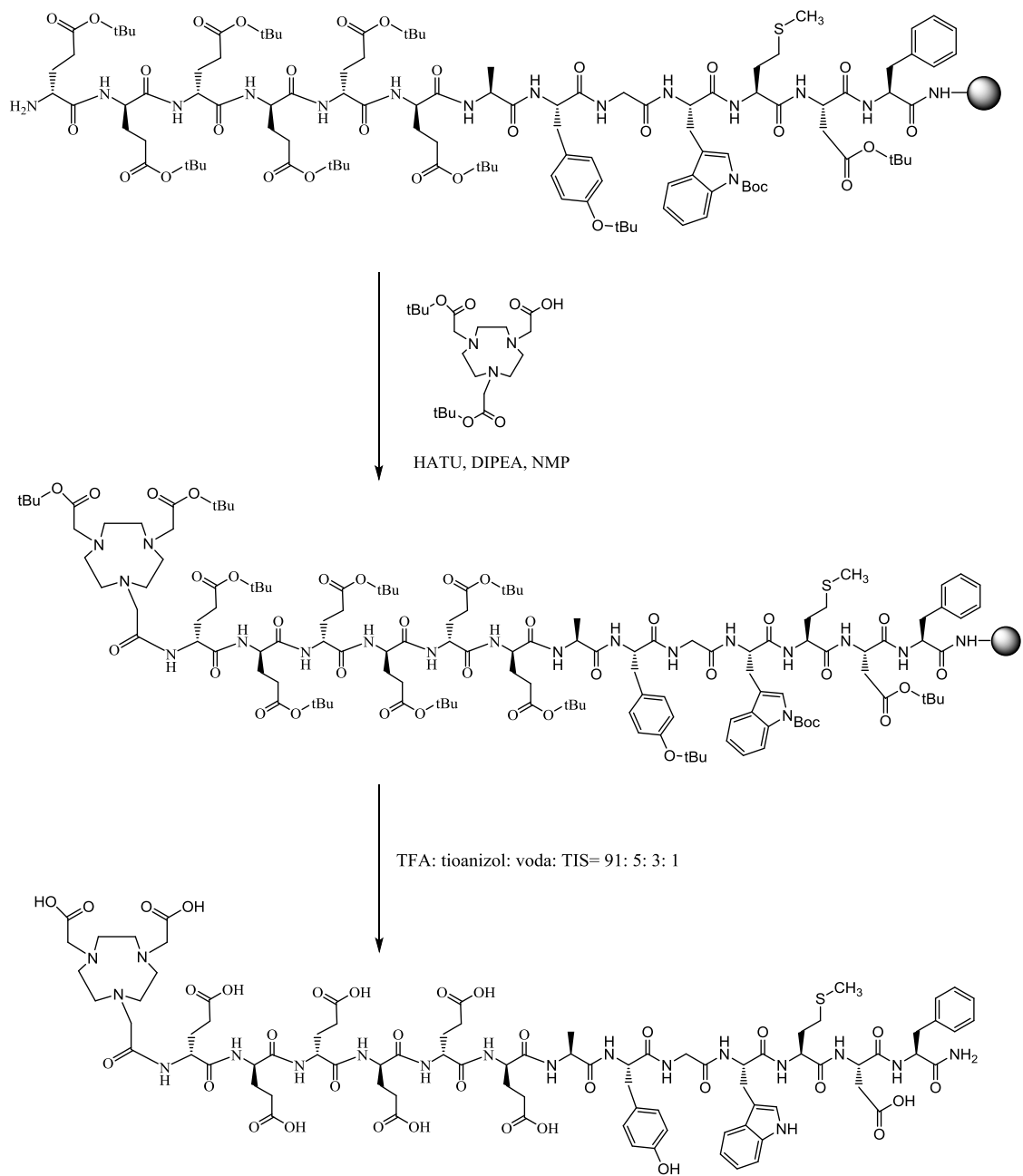
V nadaljevanju (slike 12-19) so prikazane reakcijske sheme za sintezo DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (**SNL1**), NOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (**SNL2**), NODAGA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (**SNL3**), DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH₂ (**SNL4**), NOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH₂ (**SNL5**) in NODAGA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH₂ (**SNL6**).



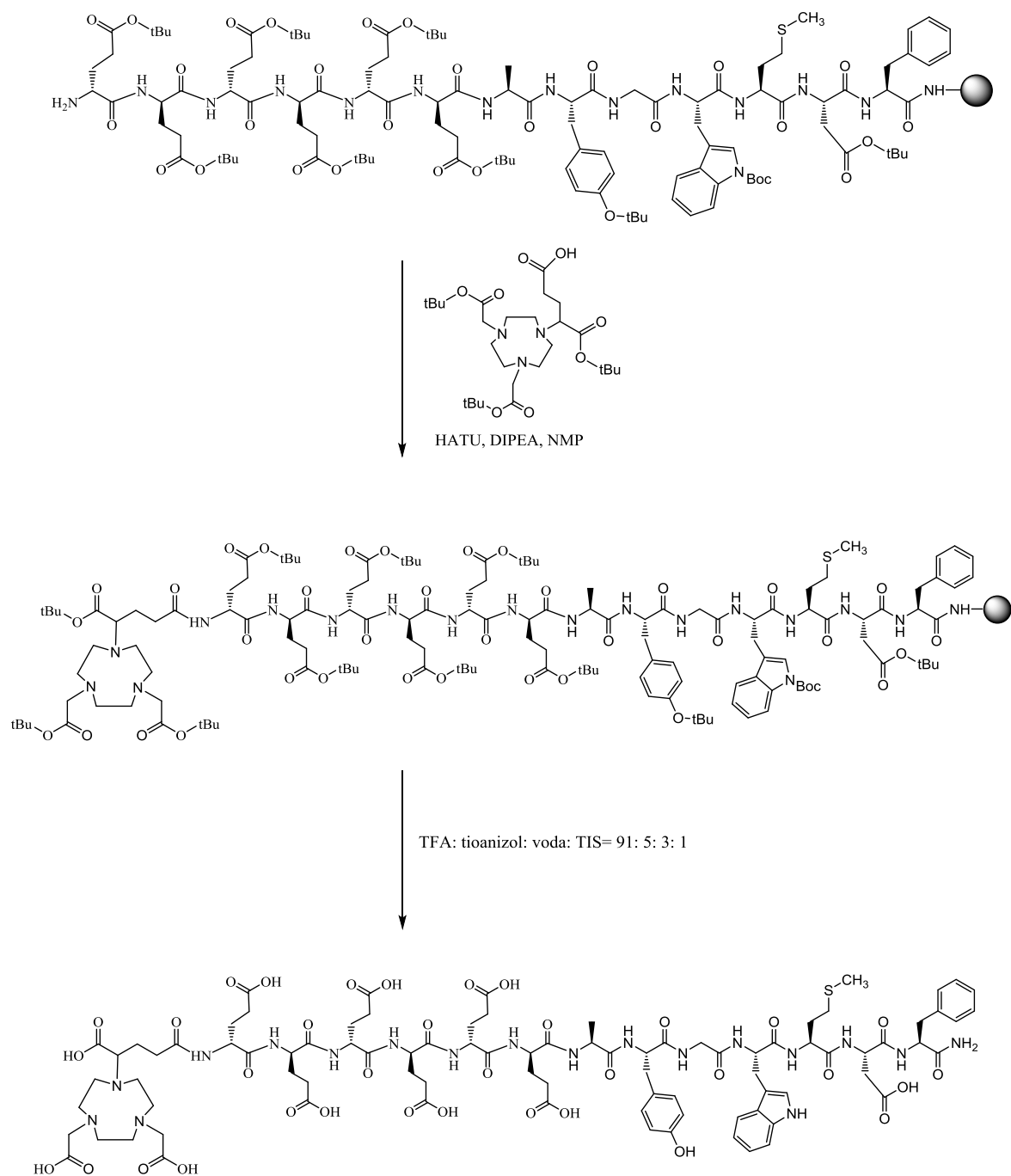
Slika 12: Sintezna pot za skupno izhodno spojino za končno sintezo spojin **SNL1**, **SNL2** in **SNL3** (vezava (D-Glu)₆ distančnika na predhodno sintetizirano AK zaporedje).



Slika 13: Sintezna pot za spojino SNL1 (vezava DOTA-e na peptid ter odstranitev zaščitnih skupin in hkratna cepitev peptida z nosilca).

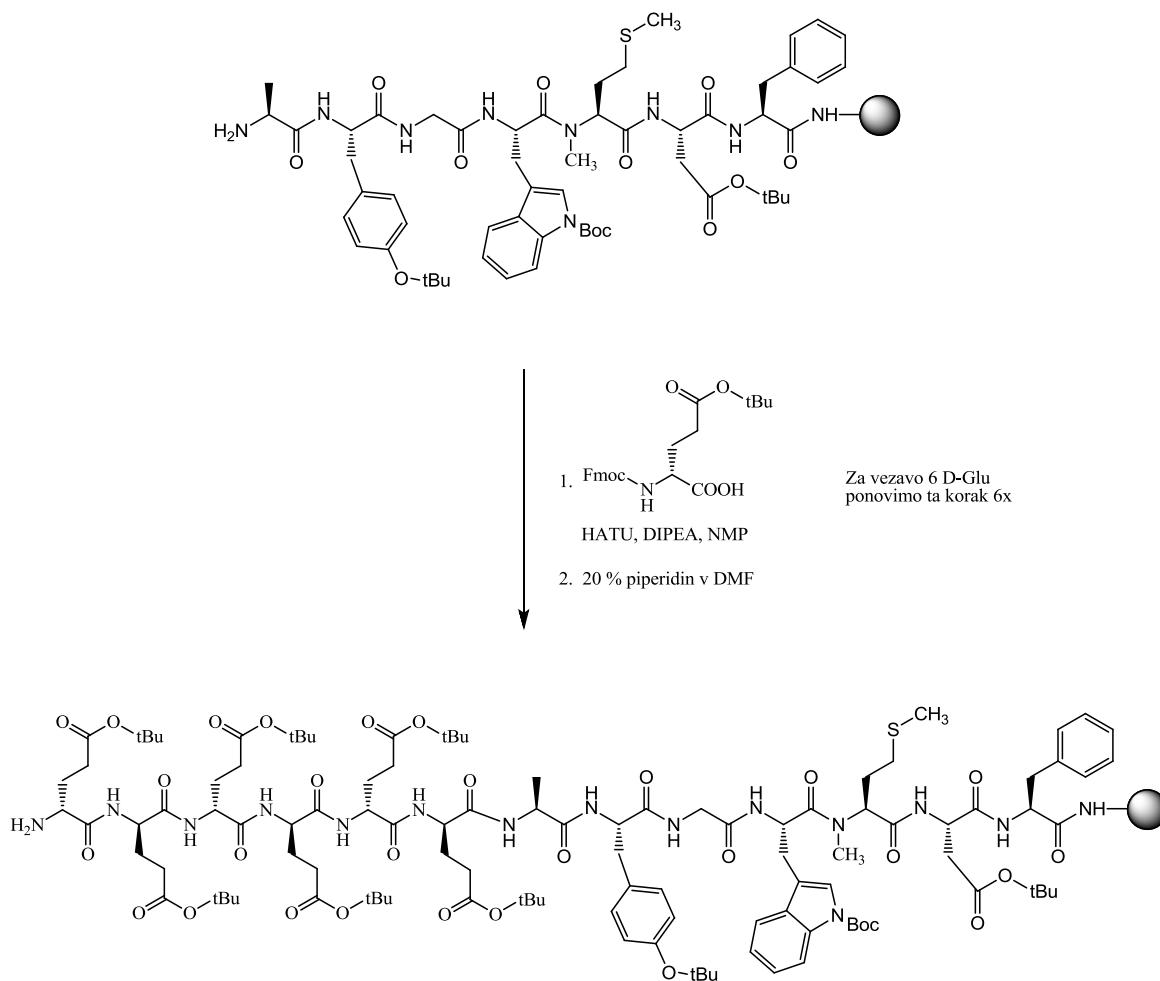


Slika 14: Sintezna pot za spojino **SNL2** (vezava NOTA-e na peptid ter odstranitev zaščitnih skupin in hkratna cepitev peptida z nosilca).

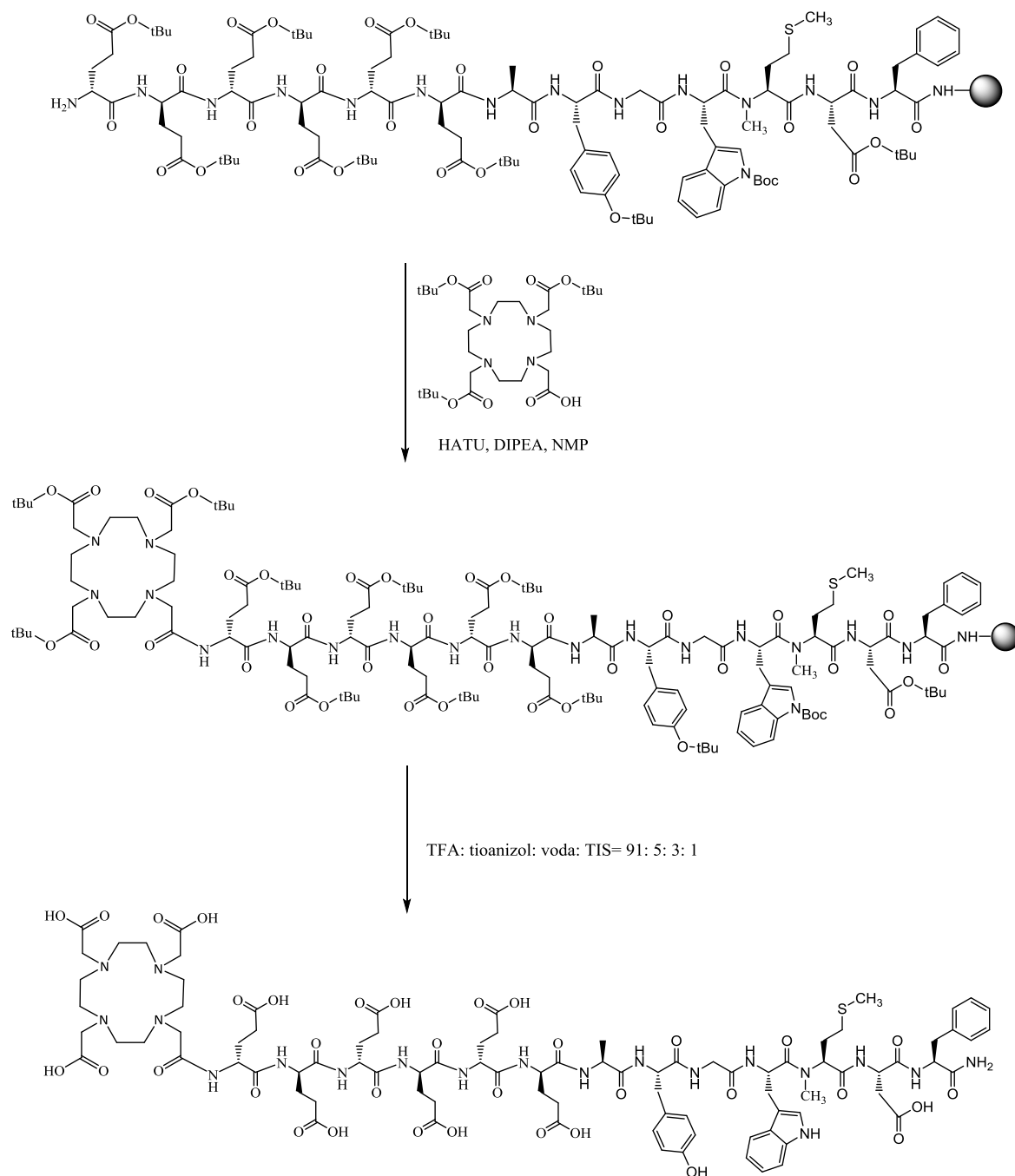


Slika 15: Sintezna pot za spojino **SNL3** (vezava NODAGA-e na peptid ter odstranitev zaščitnih skupin in hkratna cepitev peptida z nosilca).

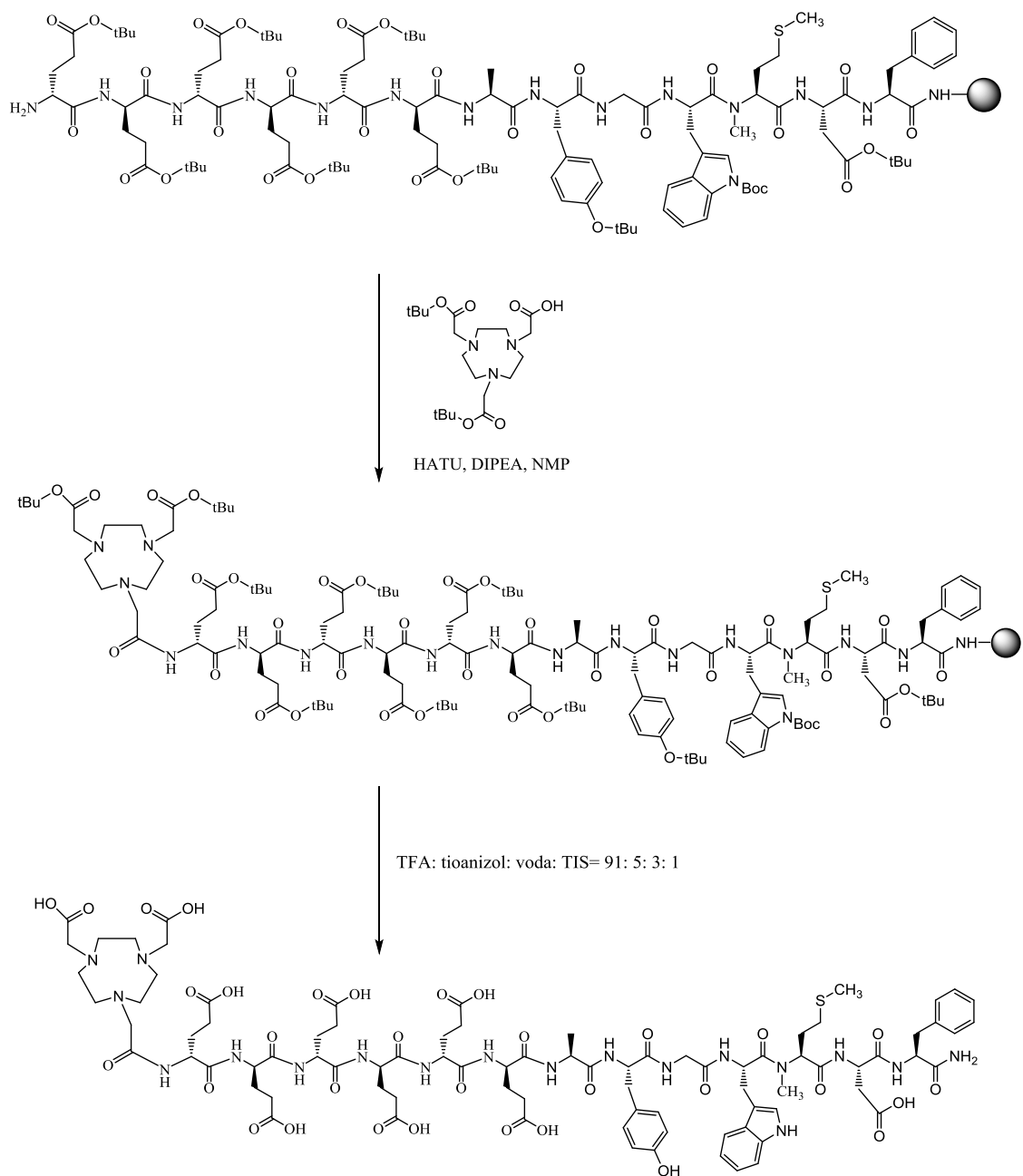




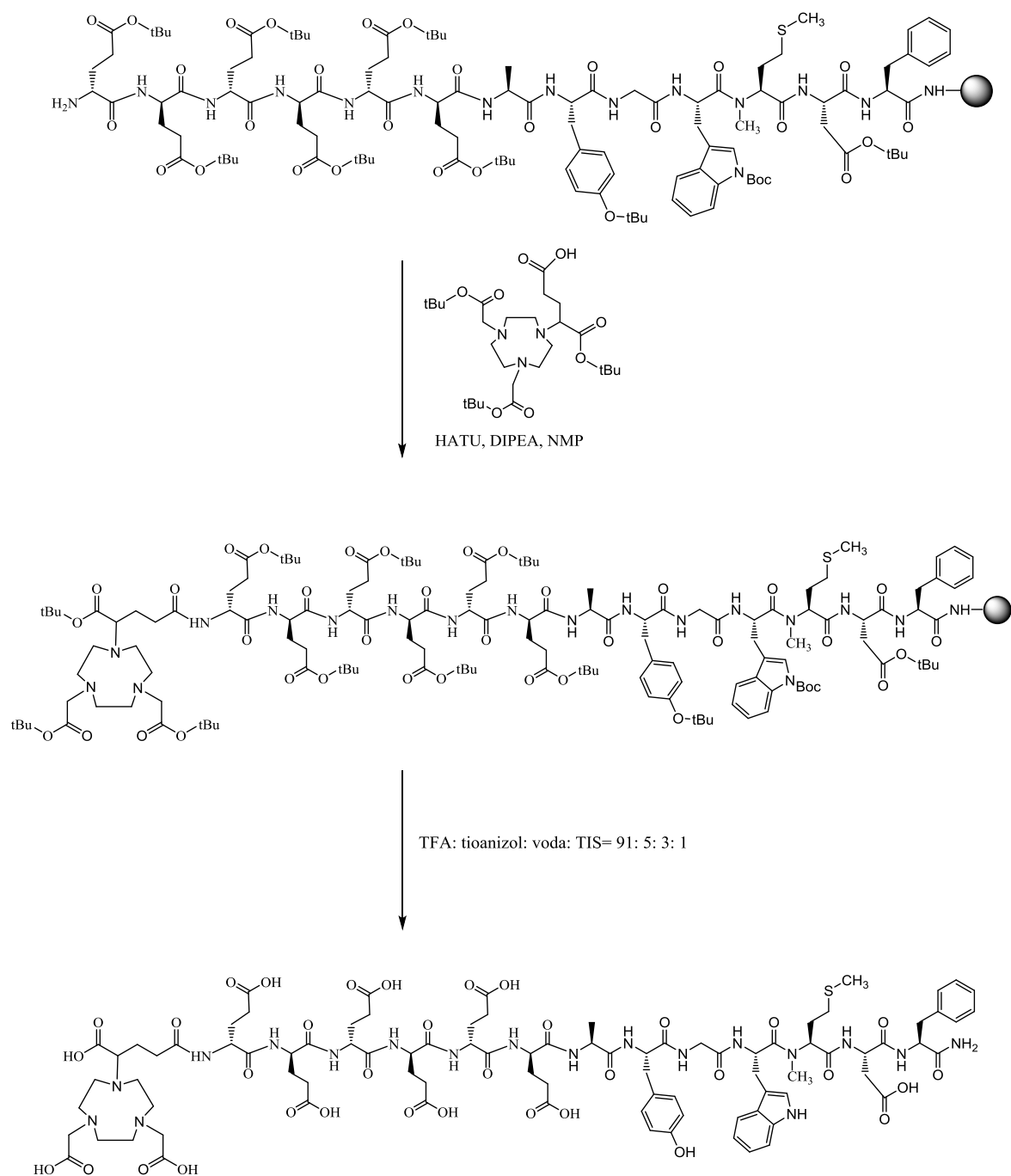
Slika 16- II. del: Sintezna pot za skupno izhodno spojino za končno sintezo spojin SNL4, SNL5 in SNL6 (vezava celotnega AK zaporedja).



Slika 17: Sintezna pot za spojino **SNL4** (vezava DOTA-e na peptid ter odstranitev zaščitnih skupin in hkratna cepitev peptida z nosilca).



Slika 18: Sintezna pot za spojino **SNL5** (vezava NOTA-e na peptid ter odstranitev zaščitnih skupin in hkratna cepitev peptida z nosilca).



Slika 19: Sintezna pot za spojino SNL6 (vezava NODAGA-e na peptid ter odstranitev zaščitnih skupin in hkratna cepitev peptida z nosilca).

Preglednica IV: Kvantitativni podatki za sintezo distančnika (D-Glu)₆ peptidov SNL1, SNL2 in SNL3.

AK	FORMULA AK	MASA NOSILCA [g]	MASA AK [g]	MNOŽINA Fmoc [mmol]	IZKORISTEK GLEDE NA Fmoc [%]
D-glutamat	Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH	0,490	0,180	0,122	100,0
D-glutamat			0,181	0,100	81,8
D-glutamat			0,158	0,092	75,4
D-glutamat			0,130	0,072	59,0
D-glutamat			0,129	0,060	49,2
D-glutamat			0,105	0,051 (2x0,018+0,015)	41,8

Preglednica V: Kvantitativni podatki za sintezo peptidov SNL1, SNL2 in SNL3.

OZNAKA PEPTIDA	BFC	FORMULA BFC	MNOŽINA Fmoc zadnje AK [mmol]	MASA BFC [g]
<u>SNL1</u>	DOTA	DOTA-tris(tBu)ester	0,015	0,026
<u>SNL2</u>	NOTA	NOTA-bis(tBu)ester	0,018	0,025
<u>SNL3</u>	NODAGA	NODAGA(tBu) ₃	0,018	0,029

Preglednica VI: Kvantitativni podatki za sintezo AK zaporedja peptidov SNL4, SNL5 in SNL6.

AK	FORMULA AK	MASA NOSILCA [g]	MASA AK [g]	MNOŽINA Fmoc [mmol]	IZKORISTEK GLEDE NA Fmoc [%]
fenilalanin	Fmoc-Phe-OH	0,500	0,169	0,142	100,0
aspartat	Fmoc-Asp(OtBu)-OH		0,178	0,141	99,3
(N-Me) metionin	Fmoc-N-Me-Met-OH		0,172	0,143	100,7
triptofan	Fmoc-Trp(Boc)-OH		0,228	0,140	98,6
glicin	Fmoc-Gly-OH		0,130	0,137	96,5
tirozin	Fmoc-Tyr(tBu)-OH		0,193	0,132	93,0
alanin	Fmoc-Ala-OH		0,129	0,126	88,7
D-glutamat	Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH		0,170	0,123	86,6
D-glutamat			0,171	0,110	71,8
D-glutamat			0,160	0,102	71,8
D-glutamat			0,144	0,098	69,0
D-glutamat			0,144	0,094	66,2
D-glutamat			0,145	0,076 (0,024+0,021+0,031)	53,5

Preglednica VII : Kvantitativni podatki za sintezo peptidov SNL4, SNL5 in SNL6.

OZNAKA PEPTIDA	BFC	FORMULA BFC	MNOŽINA Fmoc zadnje AK [mmol]	MASA BFC [g]
<u>SNL4</u>	DOTA	DOTA-tris(tBu)ester	0,024	0,039
<u>SNL5</u>	NOTA	NOTA-bis(tBu)ester	0,021	0,028
<u>SNL6</u>	NODAGA	NODAGA(tBu) ₃	0,031	0,052

Preglednica VIII: Mase surovih (neprečiščenih) produktov ter mase prečiščenih produktov z izračunom teoretičnih mas in celotnega izkoristka reakcij.

OZNAKA PEPTIDA	TEORETIČNA MASA PRODUKTA [mg] ¹	MASA SUROVEGA PRODUKTA [mg] ²	MASA PREČIŠČENEGA PRODUKTA [mg] ³	CELOTEN IZKORISTEK [%] ⁴
<u>SNL1</u>	75,0	58	/	/
<u>SNL2</u>	83,2	74	/	/
<u>SNL3</u>	86,3	82	/	/
<u>SNL4</u>	92,5	25	2,740	3,0
<u>SNL5</u>	76,9	36	0,456	0,6
<u>SNL6</u>	117,8	40	3,712	3,2

Za ovrednotenje sinteze smo izračunali dva izkoristka. Prvi je izkoristek glede na množino odstranjene Fmoc zaščitne skupine prve AK, ki je predstavljen v preglednicah IV in VI. Izkoristek je izračunan za vsako posamezno stopnjo, tako da lahko vidimo, kako je z vsakim pripenjanjem nove AK padal. Drugi izkoristek je celotni izkoristek, ki je izračunan samo za prečiščene in izolirane spojine SNL4, SNL5 in SNL6 (preglednica VIII).

Na naslednjih straneh so v preglednicah IX in X strukturno predstavljeni vsi sintetizirani analogi. Za analoge SNL1, SNL2 in SNL3, ki jih nismo uspeli izolirati, prilagamo kromatograme in masne spektre v prilogah na koncu naloge.

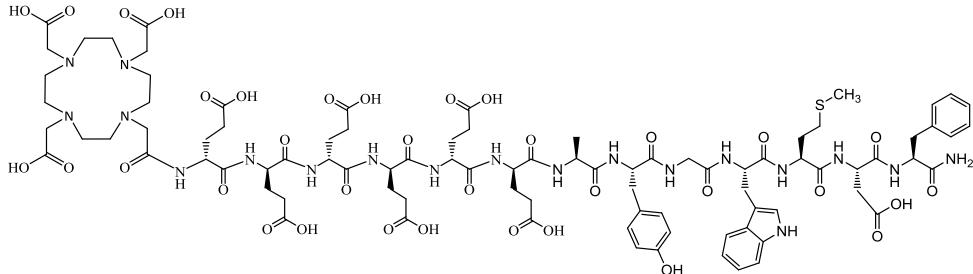
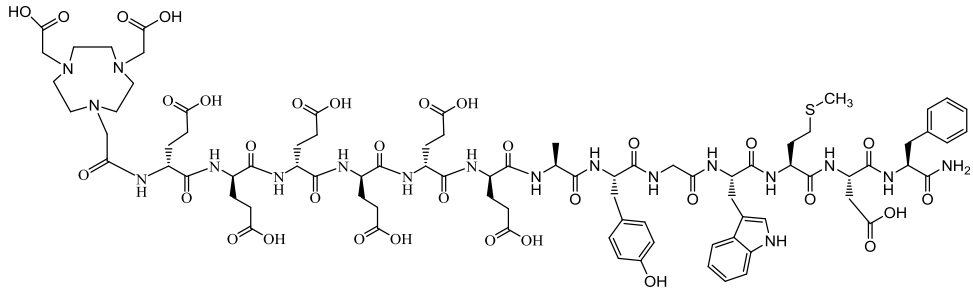
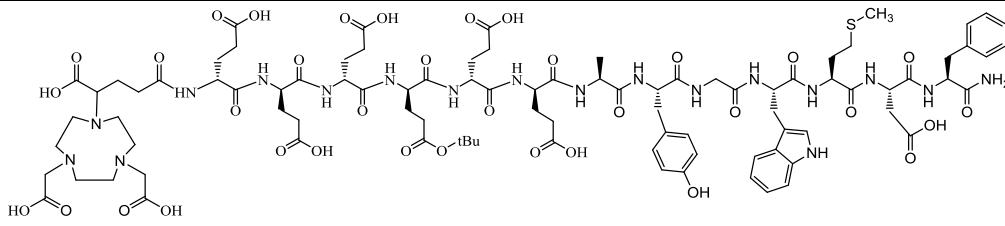
¹ Teoretična masa konjugiranega produkta, izračunana glede na množino Fmoc prve AK.

² Zapisane mase ne odražajo dejanskih vrednosti, saj so se produkti med sušenjem nabrali na stenah centrifugirke, od kjer jih ni bilo mogoče postrgati, da bi stehali celotno maso. V nadaljnjih postopkih se je uporabila celotna masa, saj smo produkte z raztapljanjem odstranili s sten.

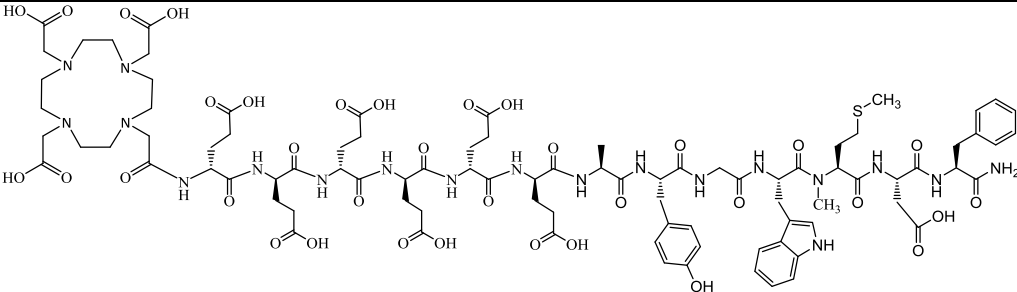
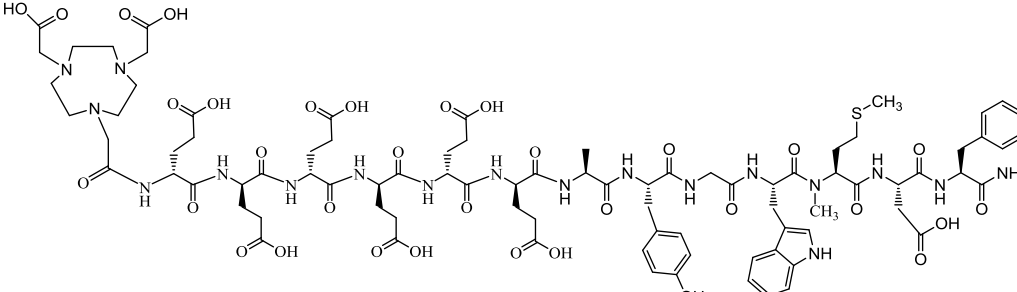
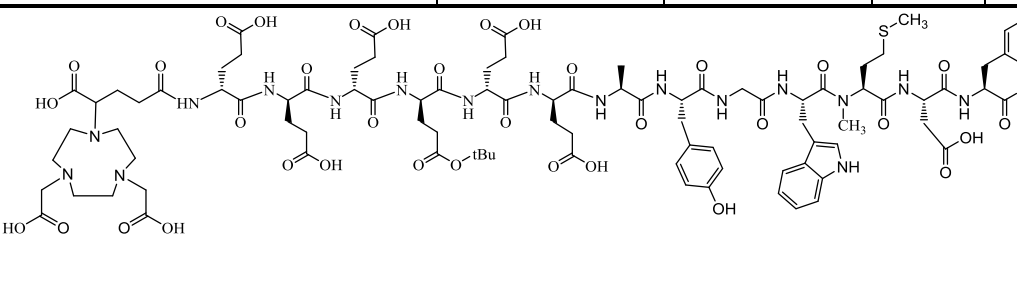
³ V primeru produktov SNL1, SNL2 in SNL3 nam zaradi nejasnih kromatogramov in velike količine primesi ni uspelo očistiti in izolirati produktov. Mase preostalih treh so izračunane iz absorbanc liofiliziranih produktov.

⁴ Izkoristek reakcije je izračunan glede na teoretično maso in maso prečiščenega produkta.

Preglednica IX: Sintetizirani DOTA-, NOTA- in NODAGA- konjugirani minigastrinski analogi (D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, ki jih nismo uspeli izolirati.

OZNAKA	STRUKTURNA FORMULA		
	AK ZAPOREDJE	MOLEKULSKA FORMULA	MM [g/mol]
<u>SNL1</u>			
	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	C ₈₉ H ₁₂₁ N ₁₉ O ₃₅ S	2050,4
<u>SNL2</u>			
	NOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	C ₈₅ H ₁₁₄ N ₁₈ O ₃₃ S	1949,3
<u>SNL3</u>			
	NODAGA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	C ₈₈ H ₁₁₈ N ₁₈ O ₃₅ S	2021,4

Preglednica X: Sintetizirani, izolirani ter spektroskopsko potrjeni DOTA-, NOTA- in NODAGA-konjugirani minigastrinski analogi (D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH₂.

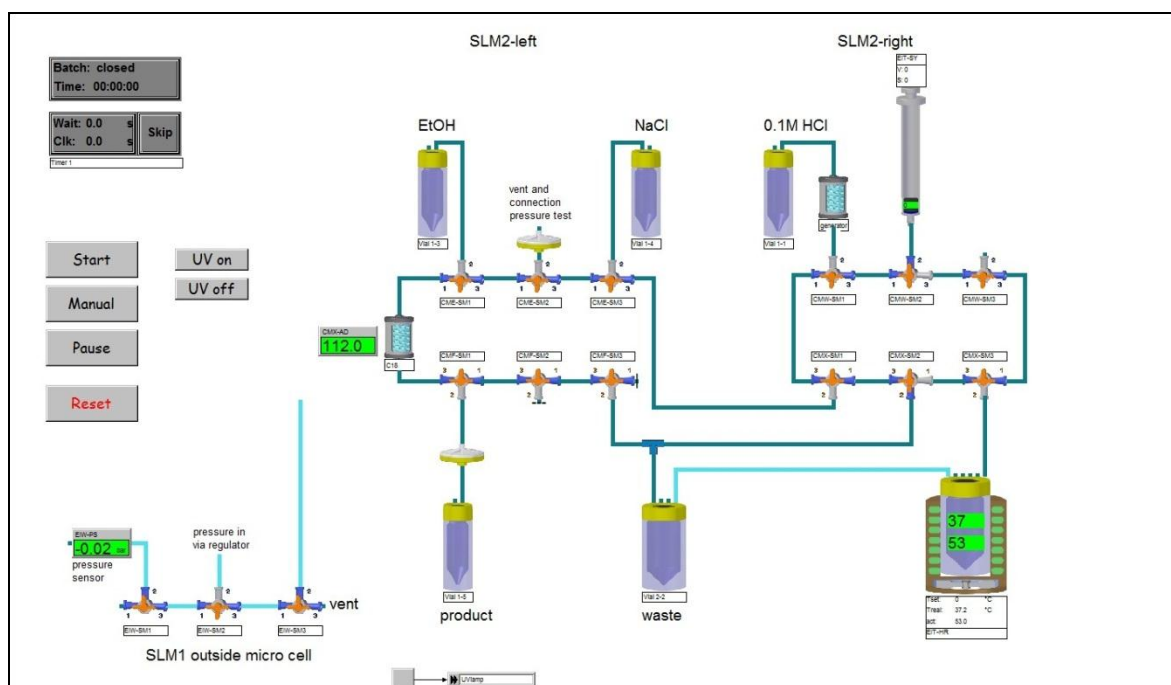
OZNAKA	STRUKTURNA FORMULA				
	AK ZAPOREDJE	MOLEKULSKA FORMULA	MM (ESI/MS)	ČISTOTA	t _r [min]
<u>SNL4</u>					
	DOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH ₂	C ₉₀ H ₁₂₃ N ₁₉ O ₃₅ S	2064,1 [M+H ⁺]	98,0 %	15,92
<u>SNL5</u>					
	NOTA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH ₂	C ₈₆ H ₁₁₆ N ₁₈ O ₃₃ S	1962,9 [M+H ⁺]	98,7 %	16,57
<u>SNL6</u>					
	NODAGA-(D-Glu) ₆ -Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH ₂	C ₈₉ H ₁₂₀ N ₁₈ O ₃₅ S	2035,0 [M+H ⁺]	98,6 %	16,67

4.2 RADIOOZNAČEVANJE Z ^{68}Ga

Za radiooznačevanje peptidov smo potrebovali 250 μL 2,5 M HEPES pufru (pH 3-4). Pufru smo dodali 40 μL vodne raztopine sintetiziranega DOTA/NOTA/NODAGA-minigastrijskega analoga s koncentracijo 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sledil je dodatek 1,85 mL $^{68}\text{GaCl}_3$ (uporabili smo frakcijo z najvišjo aktivnostjo). Slednjega smo s 6 mL 0,1 M HCl eluirali iz $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ - generatorja. Mešanici smo nazadnje dodali še 200 μL brezvodnega etanola kot lovilca radikalov. Sledila je inkubacija pri 95 $^{\circ}\text{C}$ za 300 s.

Reakcijsko zmes smo očistili s C18 SPE kolono, peptid pa s 50 % etanolom eluirali v končno vialo. Nazadnje smo produkt sprali z ustrezno količino fiziološke raztopine.

Celotna sinteza je potekala v avtomatskem sinteznem modulu, potek pa je prikazan na sliki 20. Podatki o aktivnosti za sintezo posameznih ^{68}Ga -peptidov so zbrani v preglednicah XI-XIII.



Slika 20: Shema poteka radiooznačevanja v avtomatskem sinteznem modulu.

Preglednica XI: Podatki o izmerjeni aktivnosti ter aktivnosti preračunani na uro sinteze za sintezo ^{68}Ga -SNL4.

Sinteza FR ^{68}Ga - SNL4					
30.9.2013 m(peptid) = 41 µg					
	Ura sinteze	Ura meritve	Δ t	A [MBq]	A(t=0) [MBq]
Produkt	12:28	14:15	107,00	62,8	186,86958
Odpad	12:28	14:15	107,00	50,4	149,97177
C-18	12:28	14:15	107,00	40,8	121,40572
Reakcijska viala	12:28	14:15	107,00	2,05	6,1000421
Filter	12:28	14:15	107,00	0,9	2,6780673
				SUM	467,02518
				Izkoristek [%]	40,0
1.10.2013					
	Ura sinteze	Ura meritve	Δ t	A	A(t=0)
Produkt	12:35	13:50	75,00	35,1	75,379802
Odpad	12:35	13:50	75,00	17,1	36,723493
C-18	12:35	13:50	75,00	14,1	30,280775
Reakcijska viala	12:35	13:50	75,00	1,6	3,4361163
Filter	12:35	13:50	75,00	0,48	1,0308349
				SUM	146,85102
				Izkoristek [%]	51,3
2.10.2013					
	Ura sinteze	Ura meritve	Δ t	A	A(t=0)
Produkt	12:14	12:54	40,00	71,6	107,6346
Odpad	12:14	12:54	40,00	24,4	36,679947
C-18	12:14	12:54	40,00	1,423	2,1391625
Reakcijska viala	12:14	12:54	40,00	1,69	2,5405373
Filter	12:14	12:54	40,00	0,89	1,3379161
				SUM	150,33216
				Izkoristek [%]	71,6

Preglednica XII: Podatki o izmerjeni aktivnosti ter aktivnosti preračunani na uro sinteze za sintezo ^{68}Ga -SNL5.

Sinteza FR ^{68}Ga - SNL5					
4.10.2013 m(peptid) = 40 µg					
	Ura sinteze	Ura meritve	Δ t	A [MBq]	A(t=0) [MBq]
Produkt	12:00	12:20	20,00	72,3	88,64571
Odpad	12:00	12:20	20,00	21,6	26,48337
C-18	12:00	12:20	20,00	1,263	1,548541
Reakcijska viala	12:00	12:20	20,00	0,99	1,213821
Filter	12:00	12:20	20,00	0,566	0,693962
				SUM	118,5854
				Izkoristek [%]	74,75263

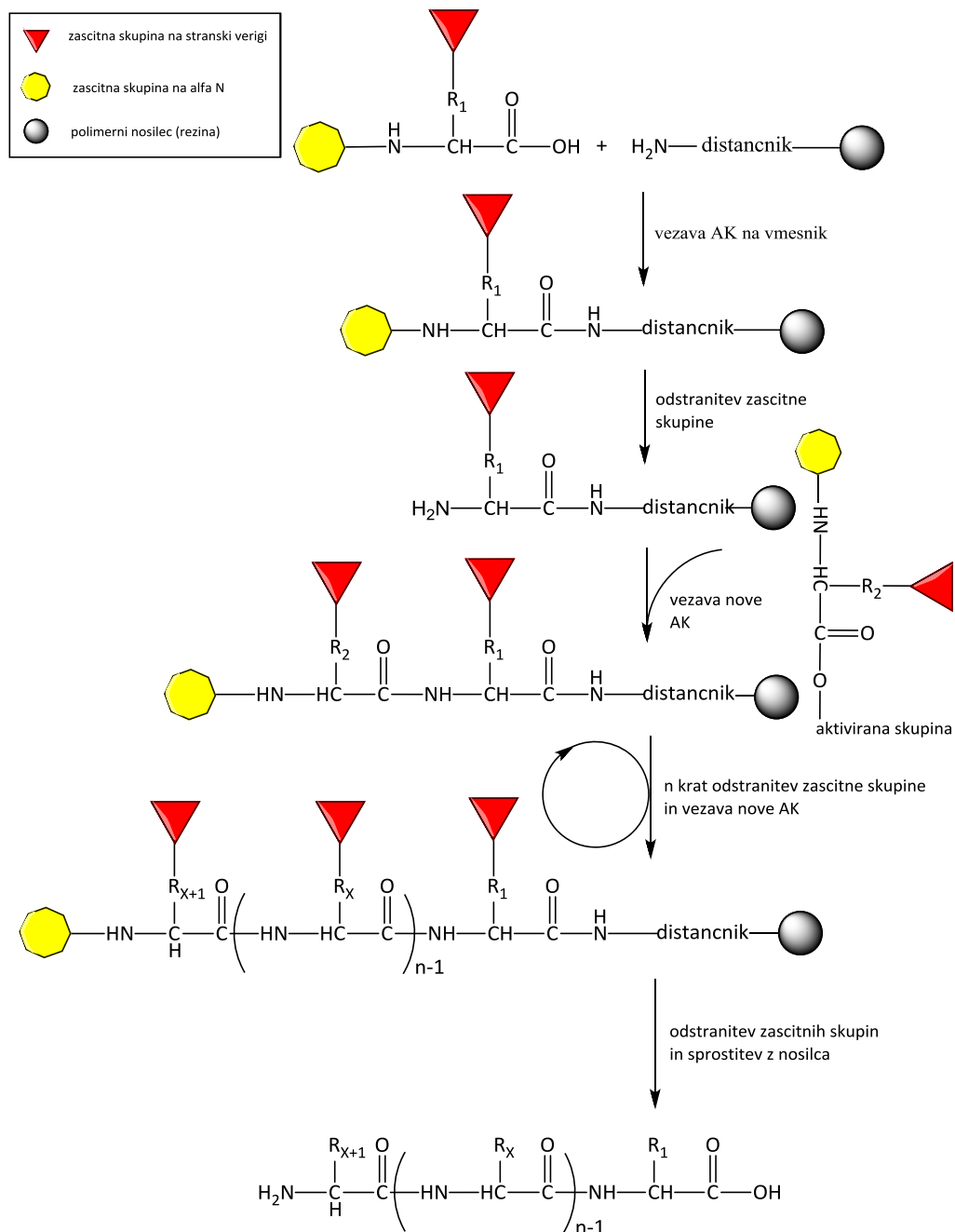
Preglednica XIII: Podatki o izmerjeni aktivnosti ter aktivnosti preračunani na uro sinteze za sintezo ^{68}Ga -SNL6.

Sinteza FR ^{68}Ga – SNL6					
3.10.2013 m(peptid) = 178 μg					
	Ura sinteze	Ura meritve	Δt	A [MBq]	A(t=0) [MBq]
Produkt	11:40	12:40	60,00	61,2	112,8002
Odpad	11:40	12:40	60,00	13,28	24,4769
C-18	11:40	12:40	60,00	0,497	0,916041
Reakcijska viala	11:40	12:40	60,00	0,56	1,032158
Filter	11:40	12:40	60,00	0,389	0,716981
				SUM	139,9422
				Izkoristek [%]	80,6
7.10.2013 m(peptid) = 40 μg					
	Ura sinteze	Ura meritve	Δt	A	A(t=0)
Produkt	11:11	11:32	21,00	54,3	67,2582
Odpad	11:11	11:32	21,00	32,6	40,37969
C-18	11:11	11:32	21,00	1,872	2,318736
Reakcijska viala	11:11	11:32	21,00	1	1,238641
Filter	11:11	11:32	21,00	0,682	0,844753
				SUM	112,04
				Izkoristek [%]	60,03051
8.10.2013 m(peptid) = 40 μg					
	Ura sinteze	Ura meritve	Δt	A	A(t=0)
Produkt	13:07	13:20	13	71,4	81,51468
Odpad	13:07	13:55	48	42	68,50085
C-18	13:07	13:55	48	2,21	3,604449
Reakcijska viala	13:07	13:55	48	1,467	2,392637
Filter	13:07	13:55	48	0,522	0,851368
				SUM	156,864
				Izkoristek [%]	51,9652

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 SINTEZA DOTA, NOTA IN NODAGA KONJUGIRANIH ANALOGOVI MINIGASTRINA

Sintezo smo izvedli po principu sinteze peptidov na trdnem nosilcu (SPPS). SPPS temelji na zaporednem dodajanju α -amino zaščenih AK z zaščenimi stranskimi skupinami na netopen polimerni nosilec, kot je prikazano na sliki 21. (24)



Slika 21: Shematičen prikaz sinteze peptidov na trdnem nosilcu (SPPS). (Povzeto po viru 24.)

Kot zaščitni skupini na N- α se uporabljata terc-butoksikarbonil (Boc) in 9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc) skupina. Boc zaščitna skupina je nestabilna v kislem in se jo odstrani s trifluorocetno kislino (TFA), medtem ko je Fmoc zaščitna skupina nestabilna v bazičnem, zato se za odstranjevanje uporablja piperidin. Po odstranitvi zaščitne skupine lahko uvedemo naslednjo zaščiten AK, pri tem pa uporabimo bodisi ustrezen aktivacijski reagent bodisi že predhodno aktivirano AK. Nastajajoč peptid je s svojim C-terminalnim delom preko distančnika vezan na nosilec. Zaščitne skupine za stranske verige se izbere tako, da je možna odstranitev vseh zaščitnih skupin ob sočasni cepitvi peptida z nosilca. Za cepitev peptida z nosilca je potrebna močna kislina, kot sta npr. vodikov fluorid (HF) ali trifluormetansulfonska kislina (TFMSA) v primeru Boc metode ter TFA v primeru Fmoc metode. Če primerjamo Boc in Fmoc metodo, je za povprečnega uporabnika boljša izbira Fmoc. Ponavljajoče izpostavljanje acidolizi s TFA pri odstranjevanju Boc zaščite lahko namreč vodi do sprememb občutljivih peptidnih vezi ali nastanka kislinsko kataliziranih stranskih reakcij. Fmoc metoda zahteva uporabo TFA samo v zadnjem koraku sinteze, ko hkrati odstranimo vse zaščitne skupine s stranskih verig AK in cepimo peptid z nosilca. Pri Boc metodi se v tem koraku uporablja nevaren HF in draga laboratorijska oprema, zaradi česar je ta metoda tudi manj dostopna. (24) Za sintezo peptidov v naši nalogi smo izbrali Fmoc metodo.

Prednosti izgradnje peptidne verige na trdnem nosilcu so:

- enostavna odstranitev topil in topnih reagentov s filtracijo ali spiranjem,
- za zagotovitev popolnega poteka reakcije lahko dodamo prebitne količine reagentov,
- masne izgube med sintezo so minimalne, saj ostane peptid skozi celoten proces vezan na nosilec,
- proces je možno v večini korakov avtomatizirati.

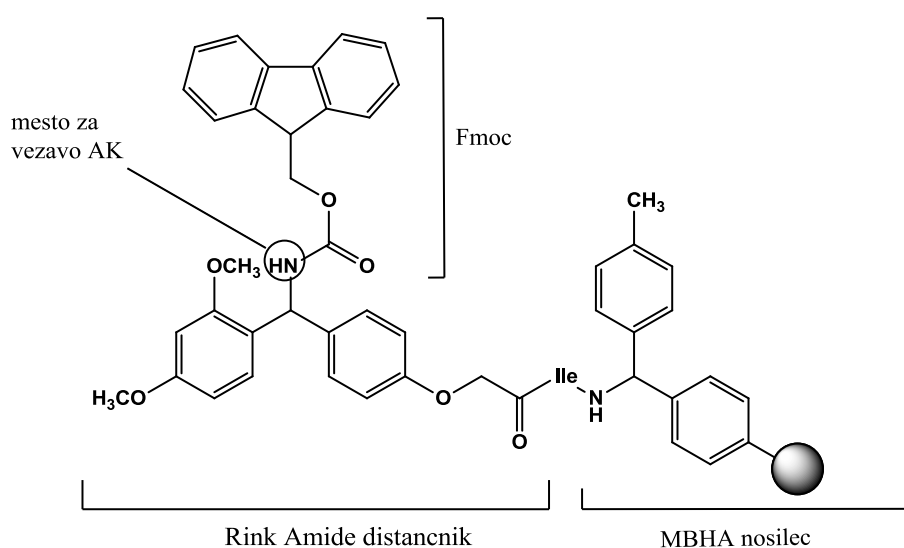
SPPS pa ima tudi številne slabosti:

- med sintezo lahko nastanejo razni stranski produkti, ki se zadržujejo na nosilcu in kontaminirajo končni produkt. Ker so nastale nečistote po svoji naravi zelo podobne željenemu produktu, jih zelo težko odstranimo.
- spremljanje poteka reakcij z analitskimi tehnikami ni mogoče, zato lahko uporabljamo zgolj kvalitativne barvne reakcije za dokazovanje prisotnosti prostih amino skupin,

- končni izkoristek sinteze je v veliki meri odvisen od števila posameznih korakov, saj ima izguba v določeni stopnji sinteze zelo velik vpliv na končno izgubo. (25)

PEPTIDNI NOSILEC

Na voljo je veliko različnih nosilcev za SPPS. Za sintezo naših analogov smo uporabili Rink Amide MBHA[®] peptidni nosilec. Le-ta je sestavljen iz modificiranega Rink Amide distančnika, ki je prek norlevcina (vezni člen) vezan na MBHA nosilec. Na tem nosilcu je možna sinteza spojin, ki jih med seboj vežemo z amidno vezjo, z nosilca pa jih enostavno odstranimo s 95 % TFA. Na sliki 22 je predstavljen uporabljen nosilec z označenim mestom za vezavo AK. Pred pričetkom vezave je potrebno odstraniti Fmoc zaščitno skupino.



Slika 22: Rink Amide MBHA[®] nosilec.

IZBIRA ZAŠČITNIH SKUPIN ZA STRANSKE VERIGE AK

Večina AK, ki gradi peptide, ima v stranskih verigah reaktivne funkcionalne skupine. Zaradi ostrih pogojev med sintezo na trdnem nosilcu moramo te funkcionalne skupine zaščititi. Za rutinsko sintezo se največkrat uporablja zaščitne skupine, ki jih je možno odstraniti s TFA ob hkratni cepitvi peptida z nosilca. (25) Za sintezo minigastrijskih analogov v naši nalogi smo uporabili Boc skupino za zaščito triptofana (Fmoc-Trp(Boc)-OH) ter tBu skupino za zaščito stranskih verig aspartata (Fmoc-Asp(OtBu)-OH), D-glutamata (Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH) in tirozina (Fmoc-Tyr(tBu)-OH).

VEZAVA PRVE AK NA NOSILEC

Vezave C-terminalne AK na nosilec je zelo pomembna stopnja sinteze, saj je od njenega poteka odvisen izkoristek celotne reakcije. Če ostanejo vezavna mesta na nosilcu v tej stopnji nezasedena, lahko le-ta reagirajo v katerikoli drugi stopnji, kar pomeni nastanek stranskih produktov reakcije. (25) Način vezave AK na nosilec je odvisen od vrste distančnika. Če je vezavno mesto za peptid na distančniku hidroksilna skupina, potem vezava AK poteče preko nastanka estrske vezi. Tvorba estra je zahteven proces, ki zahteva kontrolirane pogoje, s katerimi se izognemo nepopolnemu poteku reakcije, nastanku enantiomerov ali dipeptidov. Ena izmed enostavnejših metod esterifikacije je uporaba simetričnega anhidrida zaščitene AK ob prisotnosti katalizatorja p-dimetilaminopiridina (DMAP). Zaradi bazičnosti tega katalizatorja lahko pričakujemo nastanek enantiomerov in dipeptidov. (24) V našem primeru smo uporabili Rink amide distančnik, zato je vezava prve AK na nosilec potekla preko nastanka amidne vezi. Pri tem smo uporabili aktivacijski reagent HATU (opisano v nadaljevanju).

TVORBA PEPTIDNE VEZI

Za tvorbo peptidne vezi je potrebna aktivacija karboksilne skupine N- α -zaščitene AK. Za pripenjanje AK se v SPPS uporabljajo štiri različne metode:

➤ Sinteza s karbodiimidi

Med karbodiimidi se najpogosteje uporablja dicikloheksilkarbodiimid (DCC). Reakcijo se izvaja 12 ur pri sobni temperaturi v diklorometanu (DCM). Za povečanje topnosti lahko dodamo DMF, vendar naj bo le-ta v majhnih količinah, da ne bi upočasnil aktivacije. Glavna omejitev uporabe karbodiimidov je dehidracija AK ostankov Asn in Gln, kar lahko preprečimo z dodatkom 1-hidroksibenzotriazola (HOBt) v reakcijsko zmes. HOBt poleg tega deluje tudi kot katalizator. V primeru uporabe DCC lahko pride do tvorbe v DCM netopne dicikloheksilsečnine. Uporabljajo se tudi diizopropilkarbodiimid (DIPCDI), t-butil-metilkarbodiimid in t-butiletikarbodiimid. Našteti tvorijo sečnine, ki so v DCM bolj topne. (24)

➤ Sinteza s simetričnimi anhidridi

Simetrične anhidride se pripravi *in situ* iz dveh ekvivalentov zaščitene AK in enega ekvivalenta DCC v DCM. Pri tem se tvori sečnina, ki jo odstranimo s filtracijo. Nadaljevanje reakcije poteka v DMF. Slabost te metode je, da zahteva porabo dveh ekvivalentov AK za tvorbo enega ekvivalenta aktivirane AK. Priporočljivo je, da jih

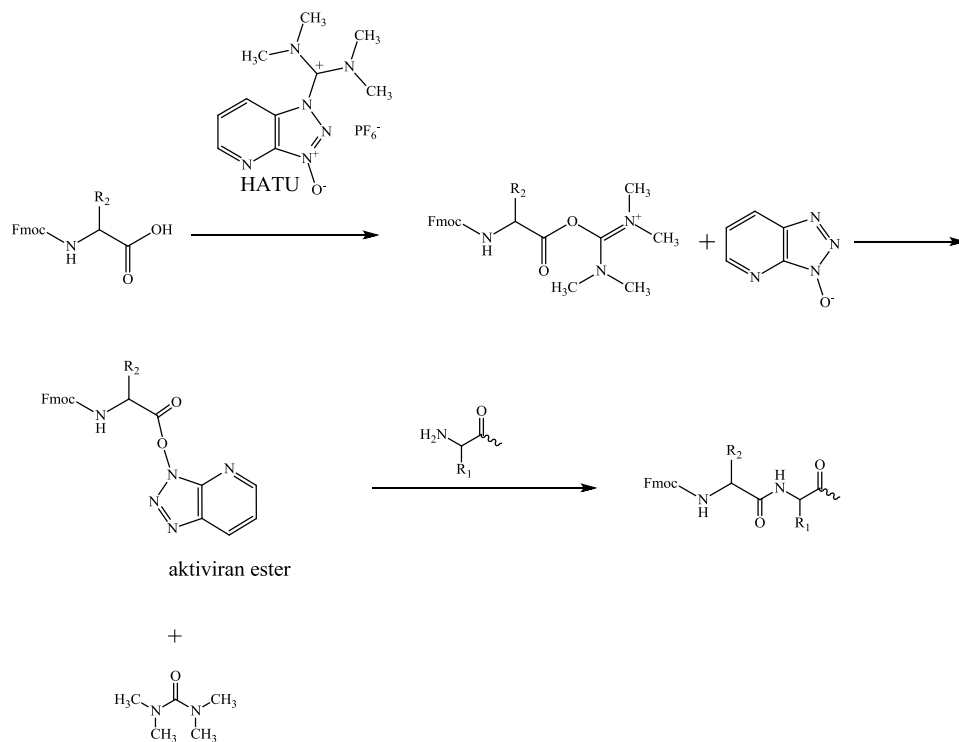
pripravimo tik pred uporabo, težava pa je tudi v slabi topnosti nekaterih AK v DCM. V tem primeru je potrebno dodati večjo količino DMF, kar pa upočasni potek aktivacije. (24)

➤ Sinteza z aktiviranimi estri

Za uporabo v SPPS so primerni benzotriazolni (OBt) in pentafluorofenilni (OPfp) estri. OBt estri reagirajo z zaščitenimi AK v DCM/DMF ob prisotnosti karbodiimidov (npr. DIPCDI). Pri tem se tvorijo aktivirani estri, ki so primerni reagenti za N-aciliranje. OPfp estri reagirajo nekoliko počasneje, zato se jim dodaja HOBt. (24)

➤ Sinteza z ostalimi reagenti za aktivacijo karboksilne skupine

In situ aktivacijski reagenti so enostavni za uporabo, reagirajo hitro in brez nastanka stranskih reakcij. Večina jih je na osnovi fosfonijevih ali aminijevih soli, ki lahko ob prisotnosti terciarne baze pretvorijo zaščiteni AK v aktivirano obliko. V SPPS se najpogosteje uporabljajo benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat (BOT), PyBOT, HBTU in TBTU. Slednji tvorijo OBt estre. Na voljo so tudi aktivacijski reagenti, ki tvorijo še bolj reaktivne estre, kakor so OBt. Taka sta reagenti HATU in HCTU, ki ob prisotnosti baze pretvorita karboksilno kislino do OAt ali 6-CLOBt estrov. HATU velja za najbolj učinkovitega med aktivacijskimi reagenti, zato se uporablja predvsem za sinteze, ki težje potečejo (npr. pri uporabi obsežnih AK z velikimi funkcionalnimi skupinami) ter za sintezo daljših peptidov. HATU kot aktivacijski reagent smo uporabili tudi za aktivacijo Fmoc zaščitenih AK v naši nalogi. Aktivacija do 9-azabenzotriazolnega (OAt) estra je potekla ob prisotnosti terciarnega amina DIPEA (slika 23). (24)



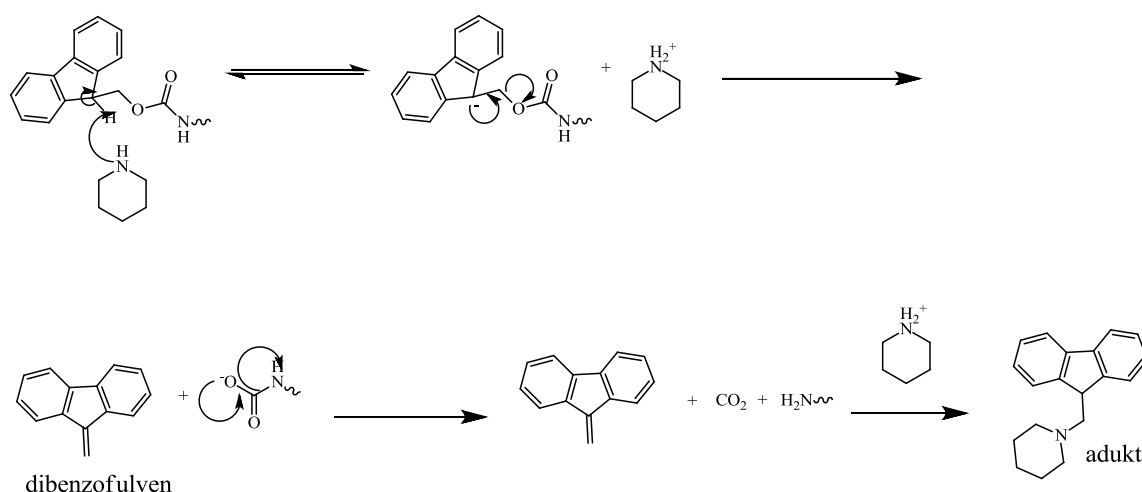
Slika 23: Mehanizem nastanka aktiviranega estra z uporabo HATU aktivacijskega reagenta in terciarnega amina DIPEA ter nadaljnja reakcija N-aciliranja.

TOPILO IN SOLVATACIJA

Zelo pomemben dejavnik v sintezi peptida je solvatacija nosilca. Slab izkoristek reakcije je namreč lahko posledica slabe solvatacije rastoče peptidne verige. Za sintezo peptidov v naši nalogi smo uporabili polarni topili DMF in NMP. Ob dodatku teh topil se v večini primerov poveča topnost Fmoc-AK ter učinkovitost reakcije. Da bi preprečili nastanek stranskih reakcij ali akumulacijo nečistot, smo uporabili samo topila, ki so ustrezno čista. Za Fmoc sintezo peptidov na trdnih nosilcih se največ uporablja DMF. Pri našem delu smo ga uporabljali za spiranje nosilca ter pri odstranjevanju Fmoc zaščitnih skupin, medtem ko smo za reakcije pripenjanja AK ter BFC uporabili NMP. NMP zmanjša zvijanje in agregacijo rastoče peptidne verige ter na ta način izboljša izkoristek reakcije. Lahko se uporablja samega ali v kombinaciji z DMF. Agregacija peptidne verige zaradi hidrofobnih interakcij in tvorbe vodikovih vezi med verigami je velik problem v SPPS. Posledica je lahko nepopolna vezava AK ali nepopolna odstranitev zaščitnih skupin. Nastanek vodikovih vezi naj bi preprečil dodatek topnih sečnin ali kaotropnih soli v reakcijsko zmes. Uspešno naj bi bilo tudi izvajanje reakcij pri višjih temperaturah. (24)

ODSTRANITEV ZAŠČITNIH SKUPIN

Odstranjevanje N-terminalnih Fmoc zaščitnih skupin se navadno izvaja z 20-50 % raztopino piperidina v DMF. Pri našem delu smo za odstranjevanje uporabili 20 % raztopino piperidina v DMF, saj je ta koncentracija običajno zadostna za uspešno odstranjevanje. V primeru dolgih peptidov se lahko zgodi, da niti z visokimi koncentracijami piperidina ne moremo popolnoma odstraniti vseh zaščitnih skupin. V tem primeru je priporočljivo podaljšati čas odstranjevanja ali pa uporabiti močnejšo bazo, kot je npr. 1,8-diazabicyklo-[5.4.0]undek-7-en (DBU). Ključni korak pri odstranitvi Fmoc zaščitne skupine je deprotoniranje fluorenskega obroča s piperidinom, da nastane aromatski ciklopentadienski intermediat. Po odcepitvi le-tega nastane dibenzofulven, ki tvori adukt s piperidinom (slika 24). Produkti deprotekcije močno absorbirajo v UV območju, zato smo lahko reakcije odstranjevanja kvantitativno ovrednotili z merjenjem absorbance raztopin z odstranjenimi Fmoc zaščitnimi skupinami. (24, 25)

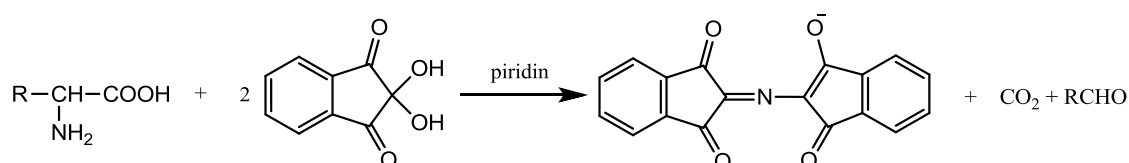


Slika 24: Mehanizem odstranitve Fmoc zaščitne skupine s piperidinom v DMF.

SPREMLJANJE POTEKA REAKCIJ S KVALITATIVNIMI TESTI

Za ugotavljanje prisotnosti oz. odsotnosti prostih amino skupin se najpogosteje uporablja Kaiser oz. ninhidrinski test, katerega smo uporabili tudi pri našem delu. Test temelji na reakciji ninhidrina z amini (slika 25), njegova izvedba pa je hitra in preprosta. Test je zelo občutljiv, vendar z daljšanjem peptidne verige njegova občutljivost pada. Ob prisotnosti prostih amino skupin se obod kroglic peptidnega nosilca po segrevanju na 100 °C obarva temno modro. Segrevanje izvedemo zato, da se »skrite« NH₂ skupine razkrijejo in na ta

način postanejo lažje zaznavne. (26) V primeru modrega obarvanja smo reakcijo pripenjanja AK na nosilec ponovili, saj bi drugače tvegali nastanek stranskih reakcij in slabši izkoristek. Nekatere AK, kot so serin, asparagin in aspartat ter tudi sekundarni amin prolin, ne dajejo pozitivne reakcije v primeru prostih amino skupin. V nekaterih primerih, še posebno pri močno agregiranih zaporedjih, je možen tudi lažno negativen rezultat testa. Na voljo so še drugi testi, kot so spremljanje pikrinske kisline, masna spektrometrija in TNBS test. Spremljanje pikrinske kisline je v primerjavi z ninhidrinskim testom manj občutljiva metoda. TNBS test ima podobno občutljivost kakor ninhidrinski test in se uporablja za detekcijo primarnih amino skupin, ob prisotnosti katerih se reagent obarva oranžno-rdeče. Za določanje prolina se priporoča uporaba testa s kloranilom, ki je bil razvit predvsem za detekcijo sekundarnih aminov (temno modro do zeleno obarvanje). (24, 25)



Slika 25: Reakcijska shema reakcije ninhidrina s prosto amino skupino AK.

CEPITEV PEPTIDA Z NOSILCA IN ODSTRANITEV ZAŠČITNIH SKUPIN NA STRANSKIH VERIGAH AK

Po uspešni vezavi peptida sledi cepitev z nosilca s sočasno odstranitvijo zaščitnih skupin stranskih verig AK. Kot smo že omenili, se v Fmoc sintezi ta korak izvede z izpostavitvijo nosilca TFA. Med samim procesom cepitve in odstranjevanja nastajajo visoko reaktivne kationske zvrsti, ki lahko reagirajo z AK, ki imajo elektronegativne funkcionalne skupine. Pri sintezi naših peptidov so takšne AK Trp, Met in Tyr. Da bi to preprečili, se k TFA dodaja razne nukleofilne reagente, ki »lovijo« nastale ione. Pred cepitvijo smo nosilec dobro sprali, da smo odstranili vse sledi DMF ter nato posušili. Optimalni pogoji za cepitev so odvisni od uporabljenih AK, njihovega števila in zaporedja, vrste zaščitnih skupin na stranskih verigah ter vrste distančnika. Za večino peptidov je primerna raztopina TFA/TIS/voda v razmerju 95: 2,5: 2,5. Voda pri tem igra vlogo nukleofila. V naši nalogi smo za cepitev in odstranjevanje uporabili raztopino TFA: tioanizol: voda: TIS v razmerju 91: 5: 3: 1. Z dodatkom tioanizola namreč preprečimo oksidacijo Met. V ta namen bi lahko dodali tudi etilmetilsulfid (EMS) ali pa 1,2-etanditiol (EDT). EDT je zelo dober lovilec t-

butilnih kationov, pomaga pri odstranjevanju zaščitne skupine s Cys ter je zelo učinkovit v preprečevanju kislinsko katalizirane oksidacije Trp. Trialkilsilani, kot sta triizopropilsilan (TIS) in trietilsilan (TES), so odličen nadomestek za EDT. Slednji nimajo močnega vonja, še posebej pa so primerni za peptide, ki vsebujejo Arg in Trp. Dodatek fenola naj bi zaščitil Tyr in Trp. Čas odstranjevanja je odvisen predvsem od stabilnosti zaščitnih skupin. (24, 25)

IZOLACIJA PEPTIDA IN ČIŠČENJE

Peptid lahko izoliramo s precipitacijo in z naknadnim centrifugiranjem. V nalogi smo uporabili postopek centrifugiranja, obarjanje pa smo izzvali z dietil etrom. Za čiščenje peptidov se uporabljajo kromatografske metode, kot je preparativni HPLC. V nalogi smo s preparativnim HPLC uspešno očistili tri izmed šestih analogov. Pri čiščenju peptidov s preparativnim HPLC je bil glavni cilj pridobiti čim bolj čist produkt, zato smo »lovili« samo osrednji del kromatografskega vrha. Kromatografske pogoje smo določili na podlagi dobro preizkušenega analitskega HPLC. Izhajali smo iz gradienta za analitski HPLC ter slednjega prilagodili glede na rezultat ločbe. Na račun izgube peptida med čiščenjem ter zaradi padanja izkoristka skozi samo sintezo je končni (celotni) izkoristek precej majhen (preglednica VIII, str. 36). Ker pa so za klinično uporabo potrebne zelo majhne količine radiofarmaka (10-20 µg), je količina sintetiziranih peptidov povsem zadostna. Pomembno je predvsem, da smo izolirali peptide z ustrezno čistoto (v našem primeru je bila za vse tri peptide > 95 %).

5.2 RADIOOZNAČEVANJE Z ^{68}Ga

Kot smo opisali že v poglavju 3 MATERIALI IN METODE, smo ^{68}Ga eluirali iz $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generatorja, ki velja za visoko učinkovit sistem za pridobivanje ^{68}Ga .

Uveljavljene so štiri različne metode za eluiranje ^{68}Ga iz generatorja, čiščenje radionuklida in potek radiooznačevanja. Prva je koncentriranje in čiščenje ^{68}Ga preko anionskega izmenjevalca. Pri tej metodi se ^{68}Ga klorid iz $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generatorja ob dodatku koncentrirane HCl pretvori v galatni anion $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$. Slednji se ujame na anionski izmenjevalec, zato ga lahko preprosto eluiramo z majhno količino vode direktno v pufer za označevanje (npr. HEPES). Po končanem označevanju je potrebno z dodatnimi postopki čiščenja HEPES pufer odstraniti. Ker je možna tudi prisotnost starševskega radionuklida ^{68}Ge , le-tega odstranimo z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE), končni produkt pa eluiramo z etanolom.

Druga metoda temelji na dejstvu, da se lahko ^{68}Ga odvisno od pH in koncentracije klorida pojavlja v kationski $^{68}\text{Ga}^{3+}$ ali anionski $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$ obliki. ^{68}Ga se pri tej metodi ujame na močan kationski izmenjevalec in pretvori v $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$. Po eluciji s HCl sledi adsorbcija $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$ na močan anionski izmenjevalec. Z vodo lahko nato eluiramo $^{68}\text{Ga}^{3+}$. Ta metoda je še posebej primerna za označevanje zelo občutljivih peptidov, saj dodatno čiščenje po končanem označevanju načeloma ni potrebno.

Tretja metoda za pridobivanje ^{68}Ga -peptidov je metoda frakcionirne elucije. Pri tej metodi se uporabi eluat neposredno iz $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generatorja, vendar se zbere samo frakcijo z najvišjo aktivnostjo. Frakciji nato dodamo ustrezen pufer (npr. HEPES), da dosežemo za radiooznačevanje primeren pH. Slabost metode je ta, da se uporabi samo frakcija eluirane ^{68}Ga -aktivnosti, kar potencialno zmanjša specifično aktivnost končnega produkta, ki bi jo lahko dosegli.

Četrta metoda je sestavljena iz dveh korakov. ^{68}Ga se eluira iz generatorja z razredčeno HCl, nato pa se ujame na kationskem izmenjevalcu, od koder ga eluiramo z dvema različnima HCl/acetona raztopinama. Večina acetona se odstrani skozi sam postopek radiooznačevanja, ki se izvaja pri 100 °C. Dodatno se izvede še čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi. Čeprav je opisana metoda učinkovita in zanesljiva, je njena slabost uporaba organskih topil (acetona, etanola). Za uporabo metode v klinične namene je zato potrebno pripravljenemu radiofarmaku poleg standardnih testov kontrole kvalitete (pH, radiokemijska čistota, radionuklidna čistota) določiti tudi vsebnost rezidualnih topil.

Najnovejša metoda temelji na eluiranju ^{68}Ga z raztopino NaCl. Metoda sestoji iz adsorpcije na kationski izmenjevalec in pretvorbe $^{68}\text{Ga}^{3+}$ v $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$ z uporabo 5 M NaCl. Pretvorba nazaj v $^{68}\text{Ga}^{3+}$ poteče s pomočjo acetatnega pufra. (27)

Sinteza ^{68}Ga -peptidov se je sprva izvajala ročno ali pa kvečjemu s pomočjo polavtomatskih sistemov. S povečevanjem uporabe tega PET radiofarmaka v bolnišnicah ter zaradi vedno strožjih regulatornih zahtev in potreb po zaščiti pred sevanjem se je pojavila potreba po avtomatizaciji procesa pridobivanja. Prednost popolnoma avtomatiziranega sinteznega sistema je poleg zaščite pred sevanjem tudi večja možnost ponovljivosti sinteze in lažje zagotavljanje sterilnosti radiofarmaka. V zadnjih letih je tako postalo komercialno dostopnih več različnih avtomatiziranih sistemov, ki vključujejo eluiranje iz generatorja, post-elucijsko obdelavo, radiooznačevanje ter čiščenje radiofarmaka. V proces avtomatizacije so bile zajete vse metode, ki smo jih opisali v prvem delu tega poglavja. Za naše magistrsko delo smo izbrali metodo frakcioniranja, saj je enostavna za uporabo, je stroškovno učinkovita ter zmanjša čas sinteze. Glavne težave, s katerimi se srečujemo pri eluiranju ^{68}Ga , so prisotnost starševskega radionuklida ^{68}Ge , velik volumen eluata ter visoka koncentracija HCl. Poleg tega je možna tudi prisotnost kovinskih nečistot, kar vpliva na izkoristek radiooznačevanja in specifično aktivnost označenega produkta. Pri frakcionirni metodi je volumen eluata majhen, saj metoda sloni na dejstvu, da se 2/3 celotne aktivnosti ^{68}Ga eluirata znotraj 1-2 mL največje aktivnosti. Na račun manjšega volumna eluata se prisotnost ^{68}Ge in kovinskih nečistot minimizira, vendar se jih ne odstrani. Radiooznačevanje je v našem primeru potekalo v avtomatskem sinteznem modulu, ki temelji na uporabi sterilnih kaset za enkratno uporabo (sliki 26 in 27). Njihova prednost je v enostavni uporabi, zagotovljeni sterilnosti in apirogenosti ter v tem, da zaradi enostavnega menjanja kaset ni potrebno vsakokratno čiščenje opreme. (28)

Kot smo že omenili, je za doseganje visoke radiokemijske čistote in izkoristka reakcije zelo pomembna odsotnost kovinskih nečistot v eluatu in reakcijski zmesi. Zato je potrebno uporabljati ultračiste reagente ter preprečiti stik s kovinskimi predmeti. Ena izmed težav pri sintezi radiofarmakov je tudi radioliza. Da bi preprečili nastanek radikalov, se poslužujemo uporabe raznih antioksidativnih sredstev, kot je npr. askorbinska kislina. V našem primeru smo kot lovilec radikalov uporabili etanol.

Za uspešen potek radiooznačevanja je pomembna tudi izbira pufra. Po Evropski farmakopeji je predpisana uporaba acetatnega pufra, ki je primeren predvsem za označevanje DOTA-konjugiranih peptidov. Za označevanje v naši nalogi sintetiziranih

analogov smo zato najprej uporabili slednjega, vendar se je izkazal za neprimerne. Z njim smo namreč dosegli zelo slab izkoristek sinteze (večino aktivnosti ^{68}Ga smo izmerili v odpadu, kar pomeni, da se radionuklid ni vezal na peptid). Nato smo uporabili HEPES puffer, s katerim je radiooznačevanje uspešno poteklo. Omejitev HEPES pufra je le v tem, da je njegova primernost za uporabo pri človeku vprašljiva.



(a)



(b)

Slika 26: Avtomatski sintezni modul za sintezo ^{68}Ga -peptidov (Oddelek za radiofarmacijo in klinično radiokemijo v UKC Ljubljana). (a) Med delovanjem je modul (levo na sliki) zaprt, da ščiti uporabnika pred sevanjem. Na desni je del z generatorjem. (b) Modul s pogledom v notranjost ter sterilno zapakiran kasetni sistem za enkratno uporabo.



Slika 27: Notranjost avtomatskega sinteznega modula, kjer poteka radiooznačevanje. V osrednjem delu je reakcijska viala s peptidom, v katero se steka ^{68}Ga eluat. Ob levi strani stene je pritrjen kasetni sistem.

Uspešno smo radiooznačili vse tri analoge, konjugirane z različnimi bifunkcionalnimi kelatorji. Pri vseh treh smo dosegli dober izkoristek in ustrezno radiokemijsko čistoto ($> 90\%$) (Preglednica XIV). Analogi so po radiokemijski čistoti med sabo primerljivi. Iz Preglednic XI – XIII pa vidimo, da imamo pri radiooznačevanju še prostor za povečanje samega izkoristka.

Preglednica XIV: HPLC analiza z ^{68}Ga označenih minigastrijskih analogov.

OZNAKA	AK ZAPOREDJE	t_r [min]	RADIOKEMIJSKA ČISTOTA
<u>$[^{68}\text{Ga}]$-SNL 4</u>	$[^{68}\text{Ga-DOTA}]-(\text{D-Glu})_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH}_2$	16,07	91,0 %
<u>$[^{68}\text{Ga}]$-SNL 5</u>	$[^{68}\text{Ga-NOTA}]-(\text{D-Glu})_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH}_2$	16,00	91,8 %
<u>$[^{68}\text{Ga}]$-SNL 6</u>	$[^{68}\text{Ga-NODAGA}]-(\text{D-Glu})_6\text{-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH}_2$	17,10	97,8 %

S tem, ko smo sintetizirane minigastrinske analoge radiooznačili z ^{68}Ga , smo dobili radiofarmake, ki so potencialno primerni za diagnostiko nekaterih tumorjev, kot je medularni karcinom ščitnice, s PET slikovno tehniko v nuklearni medicini. Pripravljeni radiofarmaki so primerni za nadaljnje testiranje in sicer v *in vitro* celičnih študijah, s katerimi bi pridobili informacije o privzemu in zadrževanju radiofarmakov v celicah.

6 SKLEP

Na osnovi do sedaj že razvitih minigastrinskih analogov smo sintetizirali analoge, ki bi bili primerni za označevanje s pozitronskim sevalcem ^{68}Ga ter tako primerni za prikaz s PET slikovno tehniko. Za sintezo peptidov smo izbrali dobro uveljavljen princip sinteze peptidov na trdnem nosilcu, Fmoc metodo ter Rink Amide MBHA[®] nosilec, za aktivacijo COOH skupine pa smo uporabili HATU reagent. Da bi omogočili stabilno vezavo ^{68}Ga na sintetizirane peptide, smo vse analoge na N-terminalnem koncu konjugirali s tremi različnimi bifunkcionalnimi kelatorji: DOTA-o, NOTA-o in NODAGA-o. Po končani sintezi in konjugaciji smo vse peptide očistili s preparativnim HPLC. Pri tem smo uspešno izolirali zgolj peptide z modifikacijo na metabolno nestabilnem metioninu C-terminalnega dela, pri katerih smo tudi dosegli ustrezno čistoto (> 95 %). Sintetizirali smo za klinično uporabo zadostno količino peptidov, čeprav so bili izkoristki reakcij majhni. Pri ostalih treh peptidih smo dobili zelo nejasne kromatograme, na katerih ni bilo mogoče prepoznati kromatografskega vrha, ki bi pripadal našemu produktu. Tudi z analizo z masno spektroskopijo nam ni uspelo identificirati produktov. Možen vzrok je nastanek velikega števila stranskih produktov reakcij. Čeprav smo uporabljali sveže pripravljene reagente, je možna slaba detekcija prostih amino skupin. Posledica so nezasedena mesta na nosilcu, ki reagirajo v naslednji stopnji, kar da drugačen produkt od pričakovanega. Neizolirani peptidi so sledeči:

- DOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂
- NOTA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂
- NODAGA-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

V drugem delu naloge smo tri uspešno izolirane analoge označili z radioaktivnim ^{68}Ga :

- [^{68}Ga -DOTA]-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH₂
- [^{68}Ga -NOTA]-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH₂
- [^{68}Ga -NODAGA]-(D-Glu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-(N-Me)Met-Asp-Phe-NH₂

Za radiooznačevanje smo izbrali metodo frakcijske elucije in HEPES pufer. Označevanje je bilo uspešno ter dosežena je bila ustrezna radiokemijska čistota (> 90 %). Analogi so bili glede na radiokemijsko čistoto med sabo primerljivi. Da bi lahko ugotovili, kateri izmed sintetiziranih analogov, konjugiranih z različnimi bifunkcionalnimi kelatorji, je najprimernejši kot radiofarmak, bi bilo potrebno analoge testirati na celičnih linijah ter živalih, kar pa presega obseg magistrske naloge.

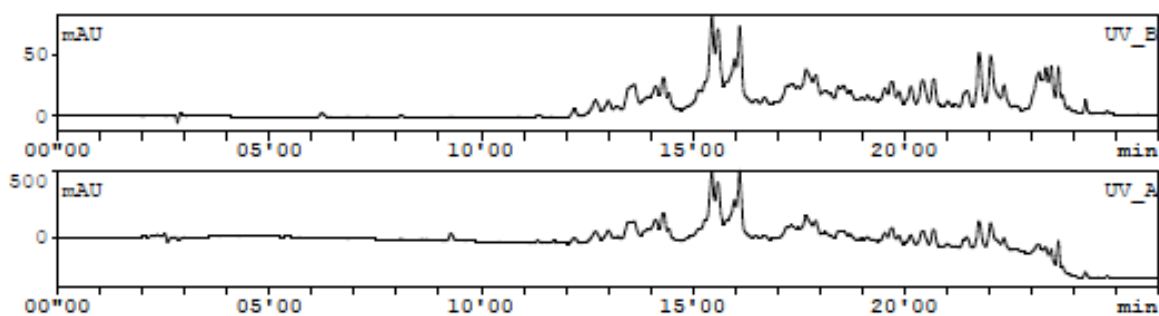
LITERATURA

1. Rehfeld JF: The New Biology of Gastrointestinal Hormones. *Physiol Rev* 1998; 78: 1087-1108.
2. Dufresne M, Seva C, Fourmy D: Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiol Rev* 2006; 86: 805-847.
3. Berna MJ, Tapia JA, Sancho V, Jensen RT: Progress in developing cholecystokinin (CCK)/gastrin receptor ligands which have therapeutic potential. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7(6): 583-592.
4. 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: 1049-1058.
5. 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; 35: 1868-1877.
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. Reubi JC, Schaer JC, Waser B: Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 1377-1386.
8. Koželj M, Erman R, Istenič R, Radež ČM: Delo z viri sevanj, Ministrstvo za okolje in prostor, Uprava RS za jedrsko varnost, Ljubljana, 2006.
9. Cherry SR, Sorenson JA, Phelps ME: Physics in Nuclear Medicine, 3rd edition, Saunders, Philadelphia, 2003.
10. Pravilnik o obveznostih izvajalca sevalne dejavnosti in imetnika vira ionizirajočih sevanj. In: 13-512/2004. Slovenija: Uradni list RS, stran 1293; 2004.
11. Aloj L, Panico MR, Caraco C, Del Vecchio S, Di Nuzzo C, Arra C, Morelli G, Tesaro D, De luca S, Pedone C, Salvatore M: Radiolabeling approaches for cholecystokinin B receptor imaging. *Biopolymers* 2002; 66: 370-380.
12. Liu S: Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1347-1370.

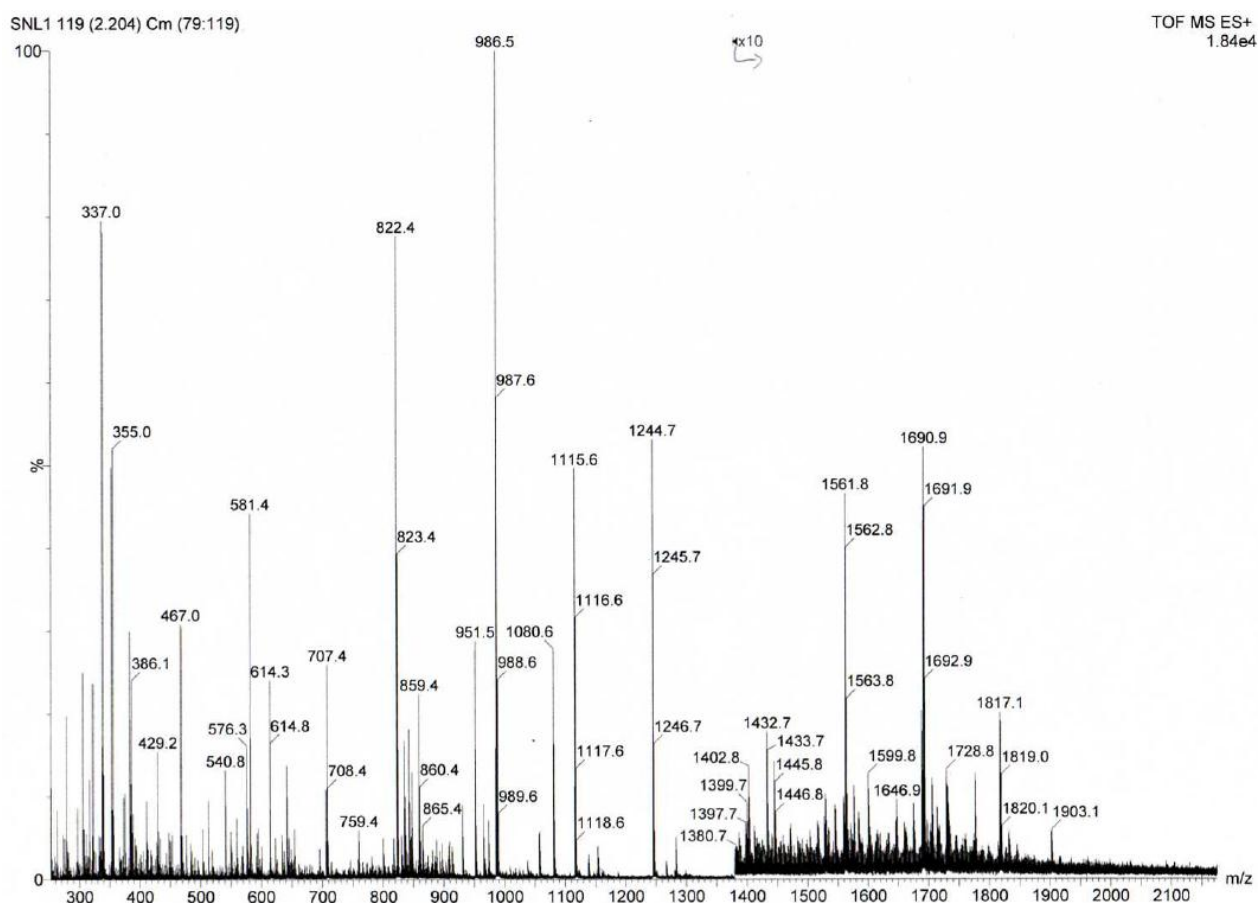
13. Noble F, Roques BP: CCK-B receptor: chemistry, molecular biology, biochemistry and pharmacology. *Prog Neurobiol* 1999; 58: 349-79.
14. Kolenc-Peitzl P: Radiooznačeni analogi gastrina kot ligandi za holecistokinin-2 (CCK2/gastrinski) receptor (doktorska disertacija). Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2011.
15. Kolenc-Peitzl P, Mansi R, Tamma ML, Stopar T, Sollner Dolenc M, Waser B, Baum RP, Reubi JC, Maecke HR: Highly improved metabolic stability and pharmacokinetics of indium-111-DOTA-gastrin-conjugates for targeting of the gastrin receptor. *J Med Chem* 2011; 54 (8): 2602-2609.
16. Aloj L, Aurilio M, Rinaldi V, D'Ambrosio L, Tesauro D, Peitzl PK, Maina T, Mansi R, von Guggenberg E, Joosten L, Sosabowski JK, Breeman WA, De Blois E, Koelewijn S, Melis M, Waser B, Beetschen K, Reubi JC, de Jong M: Comparison of the binding and internalization properties of 12 DOTA-coupled and (111)In-labelled CCK2/gastrin receptor binding peptides: a collaborative project under COST Action BM0607. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38 (8): 1417-1425.
17. Ocak M, Helbok A, Rangger C, Peitzl PK, Nock BA, Morelli G, Eek A, Sosabowski JK, Breeman WA, Reubi JC, Decristoforo C: Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38 (8): 1426-1435.
18. Sarko D, Eisenhut M, Haberkorn, Mier W: Bifunctional chelators in the design and application of radiopharmaceuticals for oncological diseases. *Curr Med Chem* 2012; 19: 2667-2688.
19. Brechbiel WM: Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 52 (2): 166-173.
20. Liu S, Edwards DS: Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chem* 2001; 12: 7-34.
21. Maecke HR, Hofmann M, Haberkorn U: ⁶⁸Ga labeled peptides in tumor imaging. *J Nucl Med* 2005; 46: 172S-178S.
22. Fani M, Braun F, Waser B, Beetschen K, Cescato R, Erchegyi J, Rivier JE, Wolfgang AW, Maecke HR, Reubi JC: Unexpected sensitivity of sst2 antagonists to N-terminal radiometal modifications. *J Nucl Med* 2012; 53: 1481-1489.

23. Strobel S, Bohle W, Welzel TM, Zoller WG, Eichele T, Bihl H: Imaging of somatostatin-receptor expressing neuroendocrine tumors (NETs) with Ga-68 DOTATOC-PET/CT versus In-111 DTPA-octreotide SPECT/CT. *Z Gastroenterol* 2009; 47: P2-30.
24. Novabiochem-Merck: Peptide Synthesis. In.; 2008/2009.
25. Chan WC, White PD: Fmoc solid phase peptide synthesis (a practical approach). New York: Oxford University Press; 2000.
26. Spletini vir: <http://www.chempep.com/ChemPep-Fmoc-Solid-Phase-Peptide-Synthesis.htm> (Dosegljivo: junij 2014)
27. Mueller D, Klette I, Baum PR, Gottschaldt M, Schultz KM, Breeman APW: Simplified NaCl based ^{68}Ga concentration and labeling procedure for rapid synthesis of ^{68}Ga radiopharmaceuticals in high radiochemical purity. *Bioconjugate Chem* 2012; 23: 1712-1717.
28. Boschi S, Malizia C, Lodi F: Overview and perspectives on automation strategies in ^{68}Ga radiopharmaceutical preparations. *Recent Res Cancer* 2013; 94: 17-29.

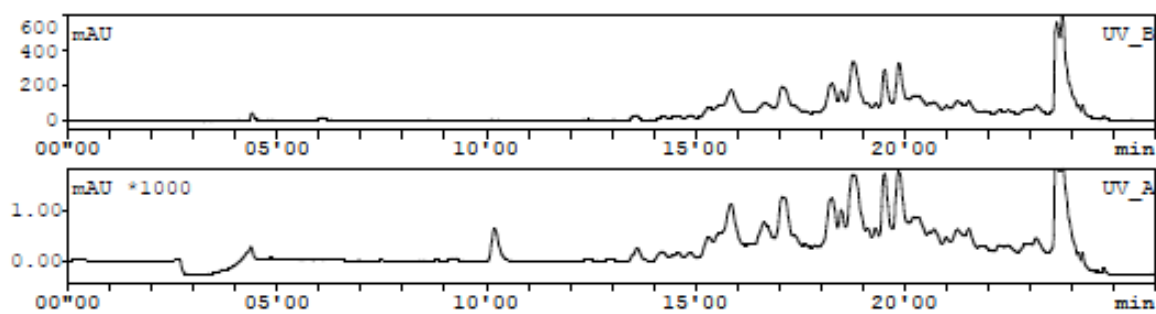
PRILOGE



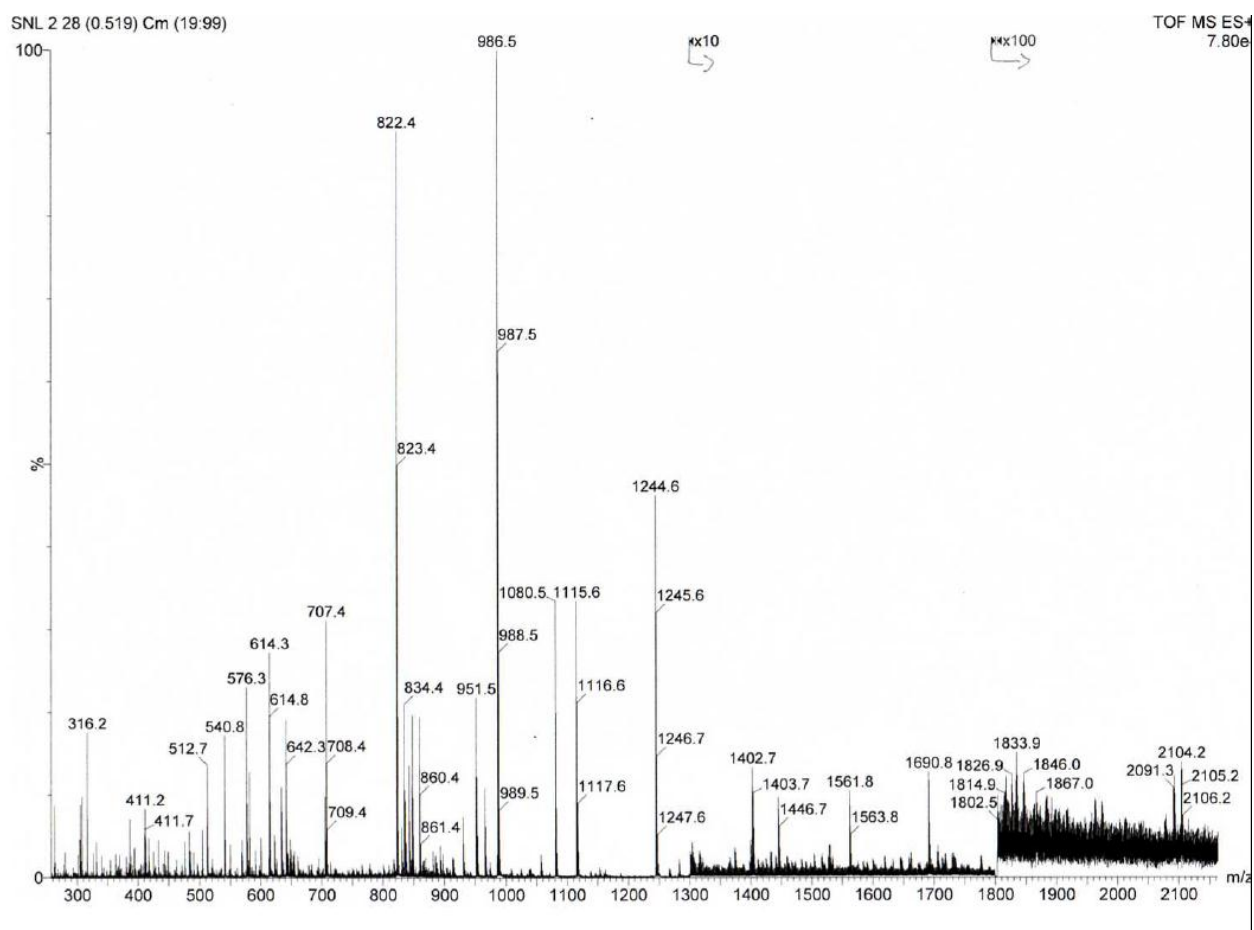
Priloga 1: Kromatogram za spojino SNL1.



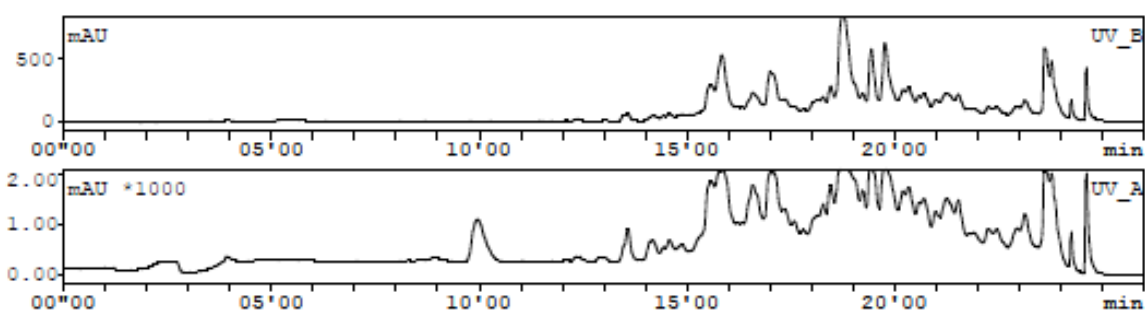
Priloga 2: Masni spekter za spojino SNL1.



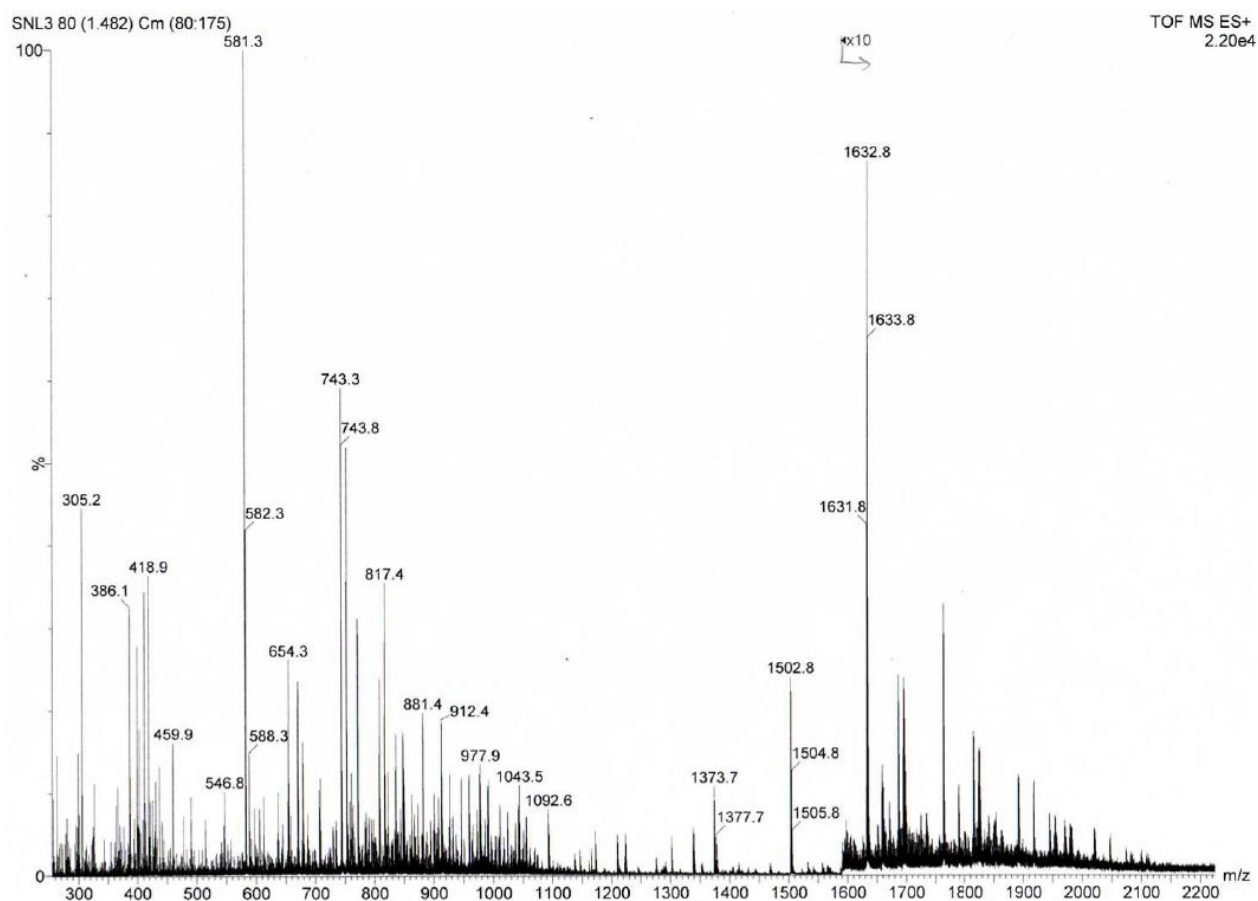
Priloga 3: Kromatogram za spojino SNL2.



Priloga 4: Masni spekter za spojino SNL2.



Priloga 5: Kromatogram za spojino SNL3.



Priloga 6: Masni spekter za spojino SNL3.