

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI  
KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

## **DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**Studium transportních mechanismů  
receptorově specifických radiofarmak  
v ledvinných buňkách**

Vědní obor: Farmakologie a toxikologie

Hradec Králové

2009

Mgr. Jan Cihlo



## **Poděkování:**

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školitelovi Prof. PharmDr. Ing. Milanu Lázníčkoví, CSc. za odborné vedení mého postgraduálního studia, které vedlo k vypracování této dizertační práce.

Za cenné rady, připomínky a pomoc při řešení problematiky radioaktivního značení studovaných sloučenin bych chtěl dále poděkovat Doc. Ing. Alici Lázníčkové, CSc. a PharmDr. Miloši Petříkovi, Phd..

Poděkování patří také všem členům katedry farmakologie a toxikologie za jejich ochotu a vstřícnost při řešení problémů a za vytvoření přátelského pracovního prostředí. V poslední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během studia.

## **Prohlášení:**

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

Jan Cihlo



## Obsah

<b><u>1</u></b>	<b><u>ÚVOD .....</u></b>	<b><u>9</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>RADIOFARMAKA V NUKLEÁRNÍ MEDICÍNĚ .....</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>RADIOFARMAKA V ONKOLOGII.....</u></b>	<b><u>11</u></b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY .....</u></b>	<b><u>12</u></b>
<b>4.1</b>	<b>CHARAKTERISTIKA MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK .....</b>	<b>12</b>
4.1.1	MYŠÍ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY .....	13
4.1.2	CHIMERICKÉ A HUMANIZOVANÉ PROTILÁTKY .....	13
4.1.3	FRAGMENTY PROTILÁTEK .....	13
<b>4.2</b>	<b>IMUNOTERAPIE .....</b>	<b>14</b>
<b>4.3</b>	<b>RADIOIMUNOSCINTIGRAFIE A RADIOIMUNOTERAPIE .....</b>	<b>14</b>
4.3.1	SOUČASNÉ TRENDY V RADIOIMUNOTERAPII .....	15
<b><u>5</u></b>	<b><u>RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ PEPTIDY .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b>5.1</b>	<b>CHARAKTERISTIKA RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ .....</b>	<b>17</b>
<b>5.2</b>	<b>CÍLE VYUŽITÍ RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ.....</b>	<b>17</b>
5.2.1	NÁDORY NEUROENDOKRINNÍHO PŮVODU .....	18
5.2.2	NÁDORY NON-NEUROENDOKRINNÍHO PŮVODU.....	19
<b>5.3</b>	<b>VÝVOJ RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ .....</b>	<b>21</b>
<b>5.4</b>	<b>TERAPEUTICKÉ UPLATNĚNÍ RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ .....</b>	<b>23</b>
5.4.1	ANALOGY ZNAČENÉ <sup>111</sup> IN .....	23
5.4.2	ANALOGY ZNAČENÉ ZÁŘIČI BETA ( <sup>90</sup> Y, <sup>177</sup> LU, <sup>153</sup> SM, <sup>64</sup> CU, <sup>188</sup> RE).....	24
<b>5.5</b>	<b>SOMATOSTATIN.....</b>	<b>26</b>
5.5.1	SOMATOSTATINOVÉ RECEPTORY (SSTR).....	27
5.5.2	RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÉ ANALOGY SOMATOSTATINU .....	30
<b>5.6</b>	<b>DALŠÍ PEPTIDY STUDOVANÉ V SOUVISLOSTI S DIAGNOSTIKOU A TERAPIÍ NÁDORŮ .....</b>	<b>32</b>
5.6.1	BOMBESIN-LIKE PEPTIDY .....	32
5.6.2	NEUROTENSIN.....	33
5.6.3	CHOLECYSTOKININ A GASTRIN.....	34

5.6.4	VASOAKTIVNÍ INTESTINÁLNÍ PEPTID .....	36
5.6.5	RGD PEPTIDY, ANTAGONISTÉ $\alpha_v\beta_3$ INTEGRINU.....	37
5.6.6	NEUROPEPTID Y.....	38
<b>5.7</b>	<b>NOVÉ STRATEGIE VYUŽITÍ RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ .....</b>	<b>39</b>
5.7.1	ZAVÁDĚNÍ NOVÝCH RADIOAKTIVNÍCH SLOUČENIN A METOD .....	39
5.7.1	ZVÝŠENÍ ODPOVĚDI CÍLOVÝCH NÁDOROVÝCH BUNĚK .....	40
5.7.2	KOMBINACE PŘÍSTUPŮ A OVLIVNĚNÍ NEŽÁDOUCÍCH ÚČINKŮ .....	40
<b>6</b>	<b><u>NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY RADIOFARMAK S CÍLENOU DISTRIBUCÍ .....</u></b>	<b>45</b>
<b>6.1</b>	<b>RADIOFARMAKA S CÍLENOU DISTRIBUCÍ – PŘÍNOS VERSUS NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY .....</b>	<b>45</b>
6.1.1	RADIONEFROTOXICITA.....	46
6.1.2	DALŠÍ TOXICKÉ ÚČINKY RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ .....	47
<b>6.2</b>	<b>LEDVINY – LIMITNÍ ORGÁN RADIONUKLIDOVÉ TERAPIE.....</b>	<b>47</b>
6.2.1	TUBULÁRNÍ REABSORPCE PEPTIDICKÝCH RADIOFARMAK.....	47
6.2.2	MEGALIN A CUBILIN.....	50
6.2.3	NOVÉ POZNATKY.....	53
<b>6.3</b>	<b>MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ RADIONEFROTOXICITY .....</b>	<b>53</b>
6.3.1	POZITIVNĚ NABITÉ AMINOKYSELINY .....	54
6.3.2	MALÁT SODNÝ .....	54
6.3.3	FRUKTÓZA.....	55
6.3.4	PLAZMA EXPANDÉR GELOFUSIN® .....	55
6.3.5	POLYGLUTAMOVÁ KYSELINA .....	56
6.3.6	AMIFOSTIN .....	56
6.3.7	KOLCHICIN .....	57
6.3.8	DALŠÍ LÉČIVA JAKO POTENCIÁLNÍ INHIBITORY .....	57
<b>7</b>	<b><u>METODY VYUŽÍVANÉ V EXPERIMENTECH.....</u></b>	<b>59</b>
<b>7.1</b>	<b>RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ BIOAKTIVNÍCH MOLEKUL .....</b>	<b>59</b>
7.1.1	CHARAKTERISTIKA POUŽÍVANÝCH RADIOIZOTOPŮ .....	59
7.1.2	RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ $^{111}\text{In}$ , $^{177}\text{Lu}$ , $^{90}\text{Y}$ .....	59
7.1.3	RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	60
7.1.4	RADIOAKTIVNÍ ZNAČENÍ $^{123/125/131}\text{I}$ .....	60
<b>7.2</b>	<b>KONTROLA RADIOCHEMICKÉ ČISTOTY RADIOFARMAK CHROMATOGRFICKÝMI METODAMI .....</b>	<b>61</b>
7.2.1	CHROMATOGRFIE PAPIROVÁ .....	61

7.2.2	CHROMATOGRAFIE NA TENKÉ VRSTVĚ (TLC).....	62
7.2.3	INSTANTNÍ TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRAFIE (ITLC-SG) .....	62
7.2.4	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC) .....	63
<b>7.3</b>	<b>GELOVĚ PERMEAČNÍ CHROMATOGRAFIE .....</b>	<b>65</b>
7.3.1	VYUŽITÍ GELOVÉ CHROMATOGRAFIE .....	67
<b>8</b>	<b><u>ÚVOD DO EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI, CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE .....</u></b>	<b>68</b>
<b>8.1</b>	<b>CHARAKTERISTIKA OK BUNĚČNÁ LINIE.....</b>	<b>70</b>
<b>8.2</b>	<b>CHARAKTERISTIKA ZKOUMANÝCH (RADIO)FARMAK .....</b>	<b>71</b>
8.2.1	ALBUMIN .....	71
8.2.2	PROTILÁTKY .....	71
8.2.3	PEPTIDY .....	72
<b>9</b>	<b><u>MATERIÁLY A PŘÍSTROJE.....</u></b>	<b>73</b>
<b>9.1</b>	<b>MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE K RADIOAKTIVNÍMU ZNAČENÍ A ANALÝZE .....</b>	<b>73</b>
<b>9.2</b>	<b>MATERIÁLY PRO BIOLOGICKÉ EXPERIMENTY.....</b>	<b>74</b>
<b>9.3</b>	<b>PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b><u>METODIKA, POSTUP PRÁCE.....</u></b>	<b>75</b>
<b>10.1</b>	<b>OK BUNĚČNÁ LINIE.....</b>	<b>75</b>
10.1.1	OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK.....	75
<b>10.2</b>	<b>ALBUMIN.....</b>	<b>75</b>
10.2.1	FITC-ALBUMIN .....	76
10.2.2	<sup>99m</sup> Tc-ALBUMIN.....	77
<b>10.3</b>	<b>PEPTIDY .....</b>	<b>79</b>
10.3.1	DOTA-TYR <sup>3</sup> -OKTRETOTÁT .....	79
10.3.2	DOTA-1-NAL <sup>3</sup> -OKTRETOTID (DOTA-NOC).....	82
10.3.3	POROVNÁNÍ INTERNALIZACE ZKOUMANÝCH PEPTIDŮ RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH <sup>111</sup> IN 83	
10.3.4	IN VIVO BIODISTRIBUCE RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ DO LEDVIN POTKANŮ ....	83
<b>10.4</b>	<b>PROTILÁTKY.....</b>	<b>84</b>
10.4.1	<sup>111</sup> IN/ <sup>90</sup> Y/ <sup>99m</sup> Tc-ANTICD66.....	84
<b>11</b>	<b><u>VÝSLEDKY.....</u></b>	<b>87</b>

<b>11.1</b>	<b>OK BUNĚČNÁ LINIE .....</b>	<b>87</b>
11.1.1	OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK .....	87
<b>11.2</b>	<b>ALBUMIN.....</b>	<b>90</b>
11.2.1	FITC-ALBUMIN .....	90
11.2.2	<sup>99m</sup> Tc-ALBUMIN .....	93
<b>11.3</b>	<b>PEPTIDY.....</b>	<b>95</b>
11.3.1	DOTA-TYR <sup>3</sup> -OKTRETÁT (DOTA-TATE) .....	96
11.3.2	DOTA-1-NAL <sup>3</sup> -OKTRETID (DOTA-NOC) .....	103
11.3.3	POROVNÁNÍ INTERNALIZACE ZKOUMANÝCH PEPTIDŮ RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH <sup>111</sup> In 108	
11.3.4	IN VIVO BIODISTRIBUCE RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH PEPTIDŮ DO LEDVIN POTKANŮ.	109
<b>11.4</b>	<b>PROTILÁTKY .....</b>	<b>112</b>
11.4.1	<sup>111</sup> In/ <sup>90</sup> Y/ <sup>99m</sup> Tc-ANTICD66 .....	112
<b>12</b>	<b><u>DISKUZE .....</u></b>	<b><u>117</u></b>
<b>13</b>	<b><u>ZÁVĚR .....</u></b>	<b><u>123</u></b>
<b>14</b>	<b><u>SOUHRN .....</u></b>	<b><u>124</u></b>
<b>15</b>	<b><u>SUMMARY .....</u></b>	<b><u>125</u></b>
<b>16</b>	<b><u>SEZNAM ZKRATEK UVEDENÝCH V TEXTU .....</u></b>	<b><u>126</u></b>
<b>17</b>	<b><u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</u></b>	<b><u>128</u></b>
<b>18</b>	<b><u>PŘÍLOHY .....</u></b>	<b><u>137</u></b>
18.1	ČLÁNKY A MONOGRAFIE.....	137
18.2	VÝSTUPY Z KONFERENCÍ .....	137
18.3	KONFERENCE NAVŠTÍVENÉ BĚHEM STUDIA .....	137
18.4	SCANY VYBRANÝCH ČLÁNKŮ.....	137



# 1 Úvod

Nádorová onemocnění představují jedno z nejběžnějších a nejtěžších onemocnění v klinické medicíně. Podle údajů České onkologické společnosti postihne v současné době určitá forma nádorového onemocnění více než třetinu populace a každý čtvrtý ve vyspělých zemích na rakovinu umírá.<sup>1</sup> Z tohoto důvodu jsou velice cenné vědecké práce informující o dílčích úspěších v diagnostice a léčbě tohoto onemocnění.

Kromě dnes již standardně využívaných diagnostických (CT, magnetická rezonance, ultrazvuk) a terapeutických (chirurgický zákrok, chemoterapie, externí ozařování) metod se jeví velice perspektivně neinvazivní postupy využívající potenciálu některých látek specificky se kumulovat v nádorových strukturách. Mezi tyto látky se řadí také receptorově specifické peptidy a monoklonální protilátky. Jejich cílená nádorová lokalizace je založena na skutečnosti, že hustota peptidických receptorů, případně hustota specifických antigenů je u některých typů nádorů podstatně vyšší než u zdravých tkání. Radioaktivní značení receptorově specifických peptidů a monoklonálních protilátek vhodnými radioizotopy umožňuje jak diagnostickou identifikaci a lokalizaci, tak terapii disponovaných malignit. Hlavní předností využití těchto radiofarmak před ostatními zmíněnými zobrazovacími a léčebnými technikami spočívá v možnosti diagnostikovat a léčit i velmi malé dislokované metastatické nádory.

Ale ani tyto metody nelze označit za bezproblémové. Aplikace radioaktivně značených monoklonálních protilátek a receptorově specifických peptidů může být spojena s výskytem nežádoucích účinků souvisejících s jejich kumulováním v jiných než nádorových tkáních. Především agresivní záření radionuklidů užívaných při nádorové terapii může být příčinou závažných radiotoxických účinků. Mezi tyto nežádoucí efekty se konkrétně u radioaktivně značených peptidů a fragmentů monoklonálních protilátek řadí radionefrotoxicita způsobená částečnou reabsorpcí vylučovaných radiofarmak v ledvinách. Riziko nefrotoxického účinku limituje dávku podávaného radiofarmaka, která je nutná k efektivní radioterapii nádorového onemocnění. Z tohoto důvodu je naprosto opodstatněná snaha objasnit mechanismus vychytávání radioaktivně značených peptidů/monoklonálních protilátek v ledvinách, případně se pokusit inhibovat tento renální transport tak, aby dávka radiofarmaka mohla být aplikována v potřebné velikosti pro zničení nádorové tkáně při způsobení minimálních nežádoucích účinků.

## 2 Radiofarmaka v nukleární medicíně

Nukleární medicína je podle definice České společnosti nukleární medicíny klinickým oborem zabývajícím se diagnostikou a léčbou pomocí otevřených radioaktivních zářičů ve formě radiofarmak.<sup>2</sup> Naopak radiofarmaka lze definovat jako léčiva, která díky přítomnosti radioaktivních izotopů (radionuklidů) umožňují realizovat hlavní cíle nukleární medicíny. Mezi tyto cíle patří posuzování klinického stavu, funkce a morfologie orgánů a tkání *in vivo* (člověka nebo zvířete), léčba a laboratorní diagnostika imunoanalytickými metodami.<sup>2</sup> Radiace je hlavní a neodmyslitelná vlastnost radiofarmak.<sup>3</sup>

Metody nukleární medicíny využívající radiofarmaka se dnes v řadě případů spolupodílejí na určení nebo zpřesnění diagnózy celé řady patologických stavů, popřípadě mohou být využity k jejich terapii.

### 3 Radiofarmaka v onkologii

Svou nezastupitelnou roli mají radiofarmaka v onkologii při diagnostice a léčbě nejrozličnějších maligních procesů.

Hlavní obecné indikace k radionuklidovému zobrazování nádorů jsou: <sup>4,5</sup>

- primární detekce nádoru
- stanovení jeho stadia (staging) a případných metastáz před zvolením terapeutické strategie
- sledování nemocných (follow-up) s nádorem během a po terapii
- ověření akumulace radiofarmaka v tumoru před podáním radiofarmaka s terapeutickým efektem
- využití k určení prognózy onemocnění
- určení místa pro punkční biopsii

Radionuklidy působící svým ionizačním zářením na nádorovou tkáň jsou používány k přípravě radiofarmak určených k terapii.

Využití radionuklidů k zobrazování a popřípadě k terapii nádorů je spojeno s nutností akumulace radiofarmaka v nádorové tkáni, ke které může docházet několika způsoby. Nespecifická radiofarmaka se akumulují v nádorech mnoha různými mechanismy (např. zvýšenou afinitou značených bílkovinných nosičů k nádorům, zvýšenou permeabilitou cév a podobně). Radioimunoscintigrafie a radioimunoterapie využívá schopnosti radionuklidy značených protilátek nebo jejich fragmentů navázat se na nádorové antigeny. Některá radiofarmaka jsou vychytávána fyziologickými mechanismy, a umožňují tak zobrazení těchto tkání (<sup>131</sup>I v diferencovaných karcinomech štítné žlázy). V mnoha nádorech byla zjištěna přítomnost velké hustoty receptorů, které po navázání vhodných ligandů umožňují scintigrafické zobrazení nádoru.<sup>5</sup>

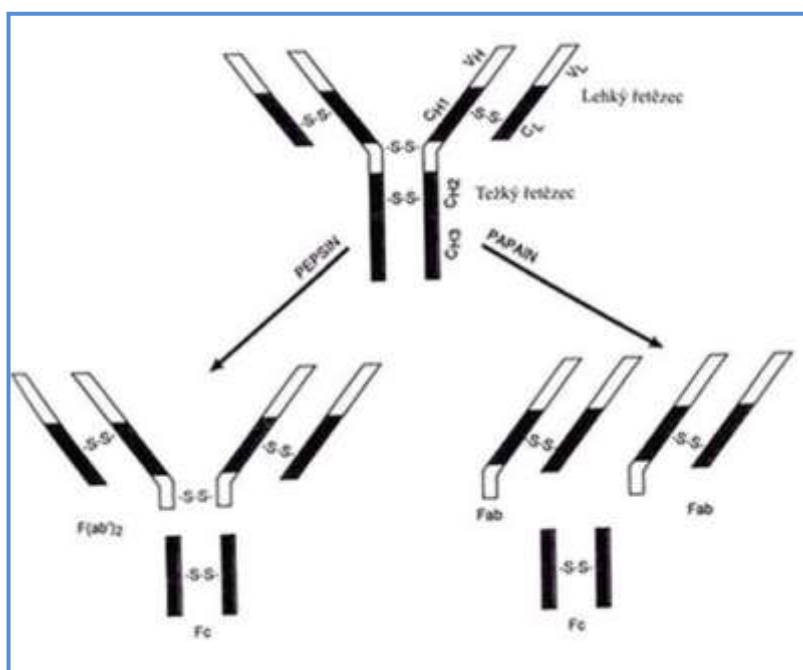
V současné době dochází díky intenzivnímu výzkumu nových radiofarmak k přechodu od neselektivně působících k vysoce selektivním. Tato selektivní radiofarmaka umožňují akumulaci radionuklidů v cílené tkáni ve vyšší koncentraci než v okolních orgánech.<sup>5</sup> Mezi tato radiofarmaka patří také radioaktivně značené protilátky a radioaktivně značené peptidy.

## 4 Radioaktivně značené monoklonální protilátky

### 4.1 Charakteristika monoklonálních protilátek

Protilátky, obecně, jsou imunoglobuliny (Ig) tvořené *in vivo* jako odpověď na výskyt antigenu, na který se specificky váží a vytváří komplex antigen-protilátka. Během imunitní odpovědi jsou syntetizovány a vylučovány plazmatickými buňkami, diferencovanými B-lymfocyty. Monoklonální protilátky se liší od polyklonálních svou specifitou ke konkrétnímu antigenu. Molekula protilátky má tvar písmene Y a je tvořena dvěma identickými těžkými a dvěma identickými lehkými polypeptidickými řetězci, které jsou kovalentně spojeny disulfidickými vazbami. Na lehkých i těžkých řetězcích se vyskytují úseky (domény), které se mohou lišit (V – variable), a úseky, které jsou konstantní pro protilátky daného živočišného druhu (C – constant). Každá V-doména se skládá ze tří hypervariabilních oddílů, které určují antigenní specifitu protilátek (komplementarity determining regions – CDRs). Jednotka tvořená VL-VH (variabilní úseky lehkého a těžkého řetězce) se označuje  $F_v$  protilátky a je zodpovědná za vazbu antigenu, konstantní úsek označený  $F_c$  je zodpovědný za imunitní odpověď organismu.<sup>5-8</sup>

**Obrázek 1 Molekulární struktura protilátky a fragmentů protilátek získaných po enzymatickém štěpení. Úseky označené CH1, CH2, CH3 jsou konstantní úseky těžkého řetězce, VH je variabilní úsek lehkého řetězce. CL a VL jsou konstantní, respektive variabilní úseky lehkého řetězce.<sup>9</sup>**



### 4.1.1 Myší monoklonální protilátky

Myší monoklonální protilátky (označované v generickém názvu koncovkou „-momab“) se získávají imunizací myši vhodnými antigeny, které způsobí tvorbu protilátek. Organismus může reagovat na podání takto získaných MoAbs (jde o cizorodé bílkoviny) tvorbou vlastních protilátek (tzv. HAMA – Human Anti-Mouse Antibodies). Tato reakce se objevuje až u 10 % nemocných, kterým jsou myší MoAbs aplikovány. Při opakovaných vyšetřeních může tvorba HAMA znehodnotit vyšetření, popř. způsobit anafylaktickou reakci.<sup>7, 10</sup>

Jako současně využívaného zástupce této skupiny protilátek lze zmínit ibritumomab - Zevalin<sup>®</sup>.<sup>11</sup>

### 4.1.2 Chimerické a humanizované protilátky

Ve snaze zcela eliminovat imunitní odpověď organismu jsou využívány rekombinantní technologie, pomocí nichž dochází k výměně cizího (myšího) konstantního úseku F<sub>c</sub> MoAbs za lidský (tzv. chimerické protilátky označované příponou „-ximab“) nebo včlenění myší hypervariabilní domény CDR do struktury lidského IgG (humanizované protilátky označované příponou „-zumab“).<sup>7, 10</sup>

Jako klinický příklad chimérické protilátky lze uvést rituximab - Mabthera<sup>®</sup> nebo cetuximab - Erbitux<sup>®</sup>, příkladem humanizované monoklonální protilátky je transtuzumab - Herceptin<sup>®</sup> nebo bevacizumab - Avastin<sup>®</sup>.<sup>11</sup>

Pro kompletnost je třeba zmínit, že čistě lidské protilátky používané v klinické praxi mají ve svém generickém názvu koncovku „-mumab“ (panitumumab - Vectibix<sup>®</sup>).<sup>11</sup>

### 4.1.3 Fragmenty protilátek

Nevýhodou velkých molekul MoAbs (50 000 – 150 000 Da) je pomalá extravasace, což snižuje dostupnost pro cílové antigeny. Rozštěpením molekuly imunoglobulinu pomocí vhodných specifických proteolytických enzymů lze získat menší fragmenty s variabilními úseky (F(ab')<sub>2</sub> nebo Fab'). Tyto fragmenty jsou menší, rychleji se váží na antigen, mají menší antigenní aktivitu (absence konstantního úseku) a nedochází tedy ke zvýšené tvorbě HAMA.<sup>7, 10</sup>

## 4.2 Imunoterapie

Samotné protilátky (nekonjugované) mohou být nástrojem imunoterapie nádorů, kde se využívá následujících imunologických procesů ústících v destrukci buňky: <sup>6,7</sup>

- aktivace buněčné cytotoxicity ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity).
- aktivace komplementové kaskády
- přímý účinek (indukce apoptózy, zábrana tvorby proteinů nezbytných pro zachování maligního fenotypu buňky, interference s vazbou mezi receptorem a jeho ligandem, ovlivnění účinnosti klasických cytostatik)

Současná onkologie využívá jak nekonjugované protilátky zaměřené proti cílovému proteinu (např. rituximab - Rituxan<sup>®</sup>, trastuzumab - Herceptin<sup>®</sup>, bevacizumab - Avastin<sup>®</sup>) jako součást rutinní terapeutické praxe, tak i konjugované systémy, z nichž některé již byly úspěšně vyzkoušeny v klinických studiích (imunokonjugát BR96-doxorubicin, anti-disialogangliosid GD2/IL-2), jiné jsou předmětem výzkumu. Protilátky lze dále konjugovat s efektorovými složkami (např. toxiny, cytokiny, cytostatiky, radionuklidy) a použít jako transportní systémy k cílové buňce. <sup>6,7</sup>

## 4.3 Radioimunoscintigrafie a radioimunoterapie

Pro rozmanitost, biologickou aktivitu a specifčnost MoAbs bylo snahou využít tyto protilátky jako specifické nosiče radionuklidů k lokalizaci zánětů ale i nádorů (radioimunodetekce nebo radioimunoscintigrafie) nebo terapii (radioimunoterapii). K detekci nádorů je dnes k dispozici několik značených protilátek proti řadě nádorových antigenů (př. OncoScint<sup>®</sup>, ProstaScint<sup>®</sup>, CEA-Scan<sup>®</sup>).<sup>5</sup> Radioimunoterapie je atraktivní terapeutická metoda kombinující specifitu protilátky k antigenu s toxicitou radionuklidu. Radioaktivně značené protilátky (<sup>131</sup>I) tositumomab - Bexxar<sup>®</sup> a (<sup>90</sup>Y) ibritumomab - Zevalin<sup>®</sup> byly schváleny FDA a jsou úspěšně používány k léčbě hematologických malignit (nehodgkinských lymfomů) v klinické praxi.<sup>11, 12</sup>

Po označení vhodným radionuklidem a po nitrožilní aplikaci se značená protilátka nebo její fragment selektivně váží na antigen nádoru, což umožní detekci popř. terapii tumoru. V případě radioimunoterapie můžeme ke značení použít protilátku s vlastním cytotoxickým účinkem. Radioaktivní izotop emitující záření  $\beta$  může letálně působit na

sousední nádorové buňky, na které se pro špatné cévní zásobení protilátka nenavázala, čímž se stupňuje intenzita léčby.<sup>6</sup>

### 4.3.1 Současné trendy v radioimunoterapii

Přehled látek využívaných nebo testovaných k účelům radioimunoterapie v roce 2006 byl publikován Goldenbergem a je uveden v tabulce 1. V současné době jsou preferovány především fragmenty MoAbs a je snahou syntetizovat stále menší antigen-vázající molekuly s rychlejší farmakokinetikou, redukovanou vazností na normální tkáň a sníženou imunitní odpovědí.

Další metodou, jak překonat pomalý tkáňový uptake, omezenou penetraci a neadekvátní retenci je spojení radioprotilátek s buňkou-penetrujícími peptidy (cell-penetrating peptides - CPPs) nebo jaderně lokalizujícími se peptidy (nuclear localizing peptides - NLSs).<sup>13</sup> CPPs jsou kationaktivní peptidické sekvence schopné zprostředkovávat transport mnoha sloučenin přes plasmatickou membránu nezávisle na počtu buněk, receptorů a energii, jestliže jsou podány současně nebo chemicky/geneticky spojeny s danou sloučeninou.<sup>12</sup> Ačkoliv mechanismus transdukce není zatím zcela objasněn, byl potvrzen podíl CPP na transportu mnoha sloučenin jako peptidů, proteinů, mnoha virových částic, lipozómů a nanočástic. K nejstudovanějším patří dva peptidy. TAT peptid získaný z HIV1-TAT proteinu a penetratin získaný z homeodomény proteinu Antennapedia. CPP navázaný na radioaktivně značenou protilátku umožňuje internalizaci celého komplexu do buňky.<sup>12</sup> Tím se radiotoxické záření dostává do blízkosti jaderné DNA a úpravou dynamické rovnováhy mezi navázanou protilátkou a nenavázanou v tkáních s příslušným přestupem protilátky z cévního řečiště dochází ke zvýšené kumulaci radiofarmaka.<sup>12</sup> Podrobně je o těchto peptidických motivech pojednáno v kapitole o radioaktivně značených peptidech.

**Tabulka 1 Přehled protilátek využívaných nebo testovaných k účelům radioimunoterapie v roce 2006. <sup>8</sup>**

Indikace	Radiofarmakum
Hematologické malignity	
Nehodgkinské lymfomy	<sup>90</sup> Y-Ibritumomab tiuxetan <sup>b</sup> <sup>131</sup> I-Tositumomab <sup>b</sup>
Lymfomy T-buněk, hodgkinské, nehodgkinské, Leukémie	<sup>90</sup> Y-Epratuzumab anti-CD22 IgG <sup>90</sup> Y-Anti-Tac IgG <sup>131</sup> I-BC8 anti-CD45 IgG <sup>213</sup> Bi-HuM195 anti-CD33 IgG <sup>188</sup> Re- or <sup>90</sup> Y-anti-CD66 IgG
Solidní malignity	
Kolorektální karcinom	<sup>90</sup> Y-T84.66 anti-CEA IgG <sup>131</sup> I- and <sup>90</sup> Y-labetuzumab (anti-CEA IgG) <sup>125</sup> I- and <sup>131</sup> I-A33 IgG
Ovariální karcinom	<sup>131</sup> I-CC49-DCH2 <sup>90</sup> Y-Biotin pre-targeted by CC49-StAv fusion <sup>177</sup> Lu- and <sup>90</sup> Y-CC49 <sup>131</sup> I-Anti-CEA IgG <sup>90</sup> Y-Biotin pre-targeted by biotinylated mAb cocktail
Prostatický karcinom	<sup>90</sup> Y-Hu3S193
Pankreatický karcinom	<sup>177</sup> Lu-J591 IgG
Plicní karcinom	<sup>90</sup> Y-PAM4 IgG
Hepatocelulární karcinom	<sup>131</sup> I-chTNT <sup>131</sup> I-Hepama-1 IgG <sup>90</sup> Y-hAFP IgG
Renální karcinom	<sup>131</sup> I-cG250 IgG
Prsní karcinom	<sup>90</sup> Y-BrE3
Gliomy	<sup>131</sup> I-81C6 antitenascin <sup>211</sup> At-81C6 <sup>90</sup> Y-BC2 and BC4 antitenascin <sup>90</sup> Y-Biotin pre-targeted by biotin-BC4 <sup>125</sup> I-425 IgG
CNS nebo leptomeningeální karcinom	<sup>131</sup> I-8H9 IgG
Medulloblastomy	<sup>131</sup> I-3F8 IgG
Nádory hlava a krku	<sup>86</sup> Re-Bivatuzumab IgG
Nádory štítné žlázy	<sup>131</sup> I-Hapten pre-targeted by anti-CEA bsmAb



## 5 Radioaktivně značené peptidy

### 5.1 Charakteristika radioaktivně značených peptidů

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy se v posledních dvaceti letech profilovaly jako významná léčiva výrazně rozšiřující diagnostické a terapeutické možnosti neuroendokrinních ale i dalších nádorů, pro jejichž buňky je typický výskyt specifických membránových receptorů. Peptidy jsou vybaveny podobnou specifitou jako MoAbs, ale jsou menší. Molekuly peptidů se snáze syntetizují, jsou méně imunogenní a mají rychlou krevní clearance.<sup>14</sup> Kvůli těmto parametrům jsou peptidy atraktivnější než MoAbs v diagnostických a terapeutických aplikacích. Specifické vychytávání radioaktivity na peptidických receptorech je základním předpokladem využití radioaktivně značených peptidů v diagnostice (SRI – scintigrafie receptor imaging) a/nebo léčbě nádorů (PRRT – peptide receptor radionuclide therapy).<sup>15</sup>

V popředí zájmu jsou především peptidy ze skupiny tzv. regulačních peptidů projevujících se v organismu širokou škálou farmakologických účinků. Mezi těmito peptidy to jsou somatostatin, vasoaktivní intestinální peptid, cholecystokinin, gastrin, gastrin-releasing hormon, neurotensin, bombesin, substance P, atriální natriuretický peptid. Zatímco fyziologické působení somatostatinu je spíše inhibičního charakteru a zahrnuje například útlum sekrece růstového hormonu, inzulínu, glukagonu, gastrinu, cholecystokininu a dalších hormonů, ostatní peptidy této skupiny naopak často sekreci bioaktivních látek stimulují a vyvolávají tak odpovídající farmakologický efekt.<sup>16-18</sup> Toto rozsáhlé fyziologické působení je na cílových orgánech zprostředkováno stejnými membránovými receptory, které se ve velké hustotě vyskytují také v nádorových tkáních.

### 5.2 Cíle využití radioaktivně značených peptidů

Radioaktivně značené peptidy nalézají své uplatnění u onkologických malignit s vysokou hustotou peptidických receptorů. Těžištěm jejich použití jsou především neuroendokrinní nádory. Následující dvě kapitoly uvádějí základní charakteristiku a přehled těchto nádorů.

## 5.2.1 Nádory neuroendokrinního původu

Neuroendokrinní nádory, jak již vyplývá z názvu, jsou nádory vycházející z buněk neuroendokrinního systému. Tento systém se v zásadní míře podílí na řízení a koordinaci řady důležitých fyziologických funkcí nejrůznějších buněčných tkání a orgánů. Neuroendokrinní nádory GITu byly dříve označovány jako APUDomy (amine precursors uptake and decarboxylation), hlavně kvůli schopnosti syntetizovat aminy a polypeptidy a secernovat gastrointestinální hormony, které jsou za normálních okolností produkovány v buňkách roztroušených v celém zažívacím traktu. Vzhledem k tomu, že ne všechny nádory endokrinního systému mají tuto biologickou vlastnost, doporučuje se užívat pojem neuroendokrinní nádory, který zahrnuje i nádory jiných než GIT lokalizací.<sup>4</sup>

### 5.2.1.1 Charakteristika neuroendokrinních nádorů

Jde o heterogenní skupinu nádorů difúzního endokrinního systému, které se mohou lišit velikostí, histologií, biologickým a klinickým chováním.<sup>19</sup> Většinou jde o benigní metastazující nádory s pouze výjimečným přechodem do malignity. Jejich počáteční diagnóza bývá ve většině případů založena na klinických symptomech (flushing, průjem) způsobených nadprodukcí hormonů. Pouze malá část klinických příznaků je obecně onkologických souvisejících například s růstem nádoru.<sup>20, 21</sup>

### 5.2.1.2 Dělení neuroendokrinních nádorů

Neuroendokrinní nádory se vyskytují v nejrůznějších lokalizacích, přičemž převažuje výskyt v gastrointestinálním traktu, kde bylo popsáno až 15 odlišných endokrinních typů, ze kterých pouze některé dávají vznik neuroendokrinním nádorům. Nomenklatura neuroendokrinních nádorů není dosud sjednocena, a tak některé nádory mohou být označovány různě. Podle mikroskopické struktury a biologických vlastností lze neuroendokrinní nádory rozlišit na typické, dobře diferencované a atypické, špatně diferencované. Mohou se vyskytovat sporadicky nebo jako součást mnohačetné endokrinní neoplazie. Dalším možným kritériem hodnocení je sekreční aktivita nádorů. Nádory pak dělíme na biologicky aktivní se zachovalou či zvýšenou sekreční aktivitou tkáně, ze které jsou odvozeny, a biologicky neaktivní, které neprodukují biologicky aktivní hormony.<sup>4</sup>

V současné době jsou rozlišovány dvě hlavní kategorie neuroendokrinních nádorů: gastroenteropankreatické (GEP) (gastrinom, inzulinom, glukagom, vipom) a karcinoidní nádory.<sup>19</sup> Dále se k neuroendokrinním nádorům řadí medulární karcinom štítné žlázy, nádory dřeně nadledvin, nádory thymu a malobuněčné karcinomy plic.<sup>4</sup>

GEP nádory tvoří nejpočetnější skupinu neuroendokrinních nádorů a tvoří asi 2 % všech maligních nádorů GITu. Do širšího okruhu neuroendokrinních nádorů lze zařadit i neuroblastické nádory a nádory vycházející z ganglií a paraganglií (neuroblastom, ganglioneuroblastom, ganglioneurom, feochromocytom, paragangliom).<sup>4</sup>

### 5.2.1.3 Diagnostické markery neuroendokrinních nádorů

K imunohistochemickému či biochemickému průkazu neuroendokrinních nádorů lze využít nejrůznějších nádorových markerů (cytoplasmatické, granulární) a indikátorů, z nichž řada je pro neuroendokrinní nádory specifická.<sup>4</sup> Receptory pro peptidické hormony jsou dalšími důležitými diagnostickými prostředky, které se používají při diagnostice neuroendokrinních nádorů. Typickým znakem neuroendokrinních nádorů je výskyt somatostatinových receptorů, receptorů pro vasoaktivní intestinální peptid a dalších (tabulka 2). Těchto receptorů se využívá také při *in vivo* diagnostických a terapeutických vyšetřeních jako specifických vazebných míst pro vhodně radioaktivně značené peptidy.

### 5.2.2 Nádory non-neuroendokrinního původu

Kromě neuroendokrinních nádorů byla nalezena velká hustota peptidických receptorů také v jiných nádorových tkáních (tabulka 2). Pozitivita somatostatinových receptorů byla potvrzena také u dalších neoplazií jako jsou tumory hypofýzy, meningiomy, melanomy, lymfoproliferativní choroby (hodgkinské a nehodgkinské lymfomy), u některých karcinomů (kolorektální karcinomy, karcinomy ovaria, mamy, karcinomy exokrinního pankreatu a prostaty).<sup>4</sup> Receptory pro bombesin (gastrin releasing peptid) lze identifikovat u prsních nádorů a nádorů prostaty, receptory cholecystokininu v medulárních karcinomech štítné žlázy a receptory neurotenzinu v exokrinních nádorech pankreatu.<sup>15, 22, 23</sup>

**Tabulka 2** Příklady fyziologických peptidů studovaných z hlediska potencionálního využití v diagnostice a terapii nádorů.<sup>14, 15, 21, 24-26</sup>

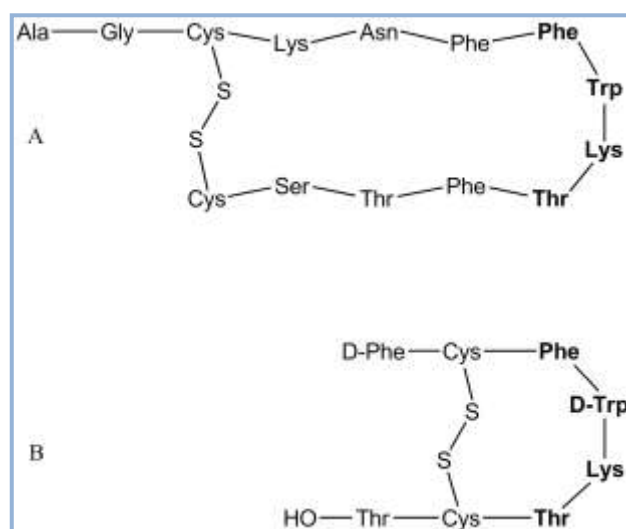
Peptid (počet AMK v řetězci)	Receptory	Příklady patologického výskytu receptorů
Somatostatin, SSM-14 (28)	SSTR 1-5	SSTR1 - karcinomy a sarkomy prostaty; SSTR2 - neuroblastomy, meningiomy, meduloblastomy, prsní karcinomy, lymfomy, karcinomy renálních buněk, paragangliomy, SCLC, karcinomy jater; SSTR2 a 3 - neaktivní adenomy hypofýzy; SSTR2 a 5 - růstový hormon produkující adenomy hypofýzy; SSTR 2 a/nebo 1 gastroenteropankreatické nádory, feochromocyto
Vasoaktivní intestinální peptid (28)	VIP	adenokarcinomy, plicní (SCLC i NSCLC), pankreatické, ovariální, prostatické nádory, nádory močového měchýře
Bombesin (40)	GRP-bombesin	plícní nádory, nádory prostaty a prsu, gastroenteropankreatické nádory, glioblastomy
Neurotensin (13)	NTR 1, 2, 3	karcinomy exokrinního pankreatu, Ewingovy sarkomy
Cholecystokinin (variabilní)	CCK A, B	CCK A - zřídka, CCK B - medulární karcinomy štítné žlázy, malobuněčný karcinom plic
Gastrin (34, 17, 14)	CCK B	(SCLC), stromatální nádory ovaria, astrocytomy
RGD-sekvence (Arg-Gly-Asp)	GPIIb/IIIa	nádory různého původu - obecně nádory indukovaná angiogeneze
Substance P (11)	NK1	mozkové nádory, medulární karcinomy štítné žlázy, prsní nádory
$\alpha$ - melanocyty stimulující hormon (13)	Melanokortin 1-5	melanomy

AMK - aminokyselina, CCK - cholecystokinin, GRP - gastrin releasing peptid, NK - neurokinin, NSCLC (non small cell lung cancer) nemalobuněčný nádor plic, NTR - neurotensinové receptory, RDG - jednopísmenné označení aminokyselin Arg-Gly-Asp, SCLC (small cell lung cancer) - malobuněčný nádor plic, SSTR - somatostatinové receptory, VIP - vasoaktivní intestinální peptid.

## 5.3 Vývoj radioaktivně značených peptidů

Jako specifické nosiče radioaktivity se využívají převážně syntetické analogy fyziologických peptidů. Za jejich prototypy lze bezesporu označit analogy odvozené od endogenního hormonu somatostatinu. Tohoto cyklického peptidu nelze pro účely (nukleární) medicíny použít.<sup>21, 27</sup> Podobně jako u většiny ostatních fyziologických peptidů je limitou jeho použití krátký biologický poločas, který je zapříčiněn rychlým štěpením struktury nativního peptidu sérovými endo- a exopeptidázami. Obměnami v sekvenci aminokyselin přirozených peptidů (zkrácení peptidického řetězce, jeho amidace, acetylace, zavedení atypických D-aminokyselin, aminoalkoholů, neobvyklých aminokyselin nebo postraních řetězců) bylo dosaženo prodloužení biologického poločasu. Tyto stabilní peptidické struktury umožňují použití, ať už ve formě radioaktivně značených sloučenin (k diagnostice a terapii nádorů), nebo ve formě neznačených peptidů, například k inhibici symptomů souvisejících se zvýšenou hormonální sekrecí (analogy somatostatinu u adenomu hypofýzy produkujícího růstový hormon).<sup>16, 28-30</sup> Příkladem stabilních peptidických derivátů s dostatečně dlouhým biologickým poločasem, které jsou používány/testovány v souvislosti s nádory, mohou být analogy somatostatinu - oktreatid, lanreotid, vapreotid, oktreatát, 1-Nal<sup>3</sup>-oktreatid (tabulka 5). U oktreatidu bylo například dosaženo prodloužení biologického poločasu až na 90 minut oproti původní 1 až 3 minutám nativního somatostatinu, a to při zachování většiny jeho biologických funkcí.<sup>16, 31</sup>

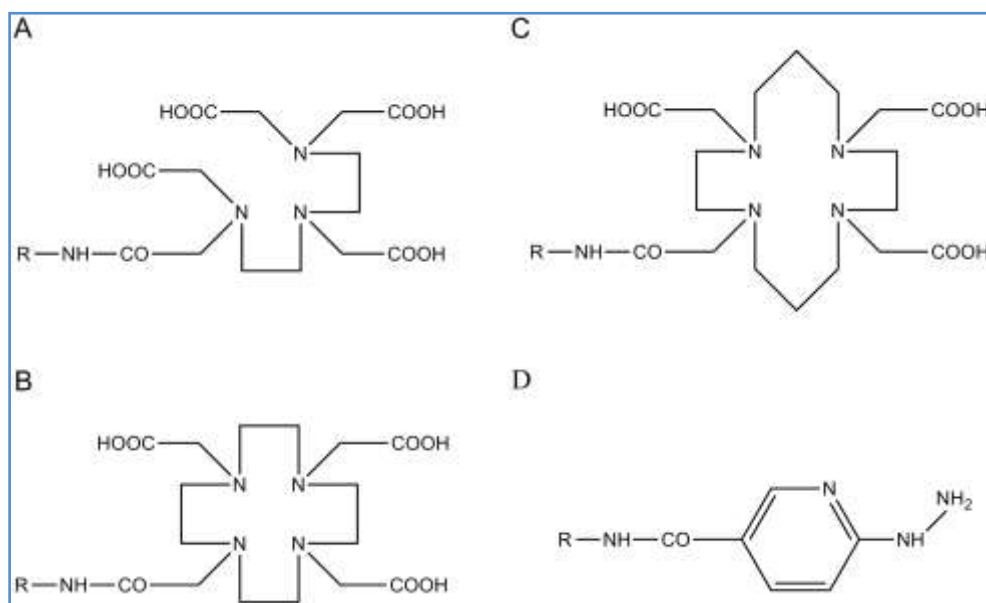
**Obrázek 2 A – Struktura somatostatinu; B – Struktura oktreatidu; zvýrazněné aminokyseliny se bezprostředně podílejí na vazbě k somatostatinovým receptorům.<sup>32</sup>**



Zatímco afinita přirozeně se vyskytujících peptidů je ke všem receptorovým subtypům přibližně stejná, tedy vysoká, může se afinita syntetických analogů k jednotlivým receptorům značně lišit.

Obměna peptidického řetězce podílející se na vzniku stabilních analogů není jediným parametrem, který ovlivňuje afinitu peptidických sloučenin k receptorům. Připojení chelatační části (DTPA - diethylentriaminpentaoctová kyselina, DOTA - 1,4,7,10-tetraazacyklododekan- N,N',N'',N'''- tetraoctová kyselina, HYNIC - hydrazinonikotinamid; TETA - 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan- N,N',N'',N'''- tetraoctová kyselina; obrázek 5) k těmto stabilním strukturám, které umožňují radionuklidové značení a nakonec i chemické vlastnosti zvoleného radionuklidu, mohou

**Obrázek 3 Bifunkční chelatační činidla. A – DTPA - diethylentriaminpentaoctová kyselina; B – DOTA-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina; C – TETA – 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina; D – HYNIC – hydrazinonikotinamid.**



mít podstatný vliv na výslednou receptorovou afinitu diagnostického nebo terapeutického radioaktivně značeného peptidu.<sup>33</sup> Dalšími důležitými parametry, které se mohou významně spolupodílet na výsledném nukleárně medicínském potenciálu diskutovaných peptidů, jsou molekulová hmotnost a lipofilita peptidů, vazebnost na plasmatické proteiny a v neposlední řadě také náboj radioligandu.<sup>21, 34</sup> Tyto parametry ovlivňující farmakokinetický profil peptidů mají významný vliv na biodistribuci a clearance a významně tak předurčují typ exkrece nebo případnou míru kumulace radioaktivně značených receptorově specifických peptidů.

## 5.4 Terapeutické uplatnění radioaktivně značených peptidů

Úspěšné použití receptorově specifických peptidů značených gama zářiči k vizualizaci nádorů a metastáz, o kterých pojednávají další kapitoly, otevřelo fascinující možnost využít tyto peptidy značené terapeutickými radionuklidy k léčbě nádorů a ovlivnit tak stav a progresi onemocnění. Základním faktorem tohoto způsobu terapie je cílená distribuce efektivní radiační dávky k nádorovým buňkám, respektive k jejich jaderné DNA. Tato forma terapie je především vhodná pro maligní, roztroušené nebo příliš malé nádory nevhodné pro odstranění klasickými chirurgickými postupy nebo pro využití externích ozařovacích technik.

Výběr radiofarmaka/radionuklidu je kritickou částí plánování terapie, při které by měl být dbán zřetel na individuální vlastnosti nádorů (velikost a lokalizace) se zvláštním ohledem také na přiléhající tkáň.<sup>19, 35</sup>

### 5.4.1 Analogy značené $^{111}\text{In}$

Na počátku testování terapeutických možností receptorově specifických peptidů byly vysoké dávky  $^{111}\text{In}$  značeného somatostatinového analogu (Octreoscanu). Možnost využití  $^{111}\text{In}$  k terapii nádorů je dána spektrem emitovaného záření tohoto radioizotopu, který je kromě zdroje gama záření také emitorem Augerových elektronů s prokázaným antiproliferativním účinkem.<sup>36</sup> Radiotoxicita přípravků značených  $^{111}\text{In}$  je však omezena krátkým dosahem těchto emitovaných částic.<sup>16</sup> Jejich terapeutický efekt je přímo podmíněn těsnou lokalizací u DNA rakovinných buněk, respektive procesu internalizace (receptorově zprostředkovanému endocytickému transportu), který je za tuto lokalizaci zodpovědný.<sup>37</sup> K tomuto transportu je snaha využít peptidické sekvence CPPs, případně jaderně lokalizujících se peptidů (NLPs) jako konjugátů napomáhajících intracelulární, respektive jaderné lokalizaci těchto peptidů.<sup>13</sup> Právě použití NLPs je novou perspektivní metodou zaručující lokalizaci radionuklidů emitujících Augerovy elektrony ( $^{111}\text{In}$ ) v jádru po navázání a internalizaci na specifický receptor. V takové blízkosti u DNA působí tyto elektrony letální poškození DNA řetězců.<sup>13</sup> Indiované peptidické analogy vystřídaly analogy značené  $^{177}\text{Lu}$  a  $^{90}\text{Y}$ , při kterých byla nejednou pozorována stabilizace onemocnění či úplná remise nádorů.<sup>19, 22, 38</sup>

## 5.4.2 Analogy značené zářiči beta ( $^{90}\text{Y}$ , $^{177}\text{Lu}$ , $^{153}\text{Sm}$ , $^{64}\text{Cu}$ , $^{188}\text{Re}$ )

Účinek radiopeptidů značených radionuklidy emitující beta částice s dostatečnou energií a dosahem není bezprostředně spojen s těsnou penetrací do nádorových struktur. Jejich značení si vyžádalo zavedení chelatačních činidel (DOTA, TETA) stabilně vázajících hlavní terapeuticky využívané beta zářiče  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ , ale i jejich případné alternativy  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ .<sup>29, 39-41</sup> Radiobiologické vlastnosti terapeutických izotopů naznačily, že každý radionuklid vlastní specifický potenciál pro terapii určitého typu nádorů. Částice  $^{90}\text{Y}$  mají v porovnání s  $^{177}\text{Lu}$  vyšší energii a vyšší maximální dosah v tkáních a jsou tedy vhodné pro větší nádory i s heterogenní distribucí receptorů. Naopak menší nádory nejsou schopné vzhledem ke své velikosti absorbovat celou emitovanou energii  $^{90}\text{Y}$ , která pak může toxicky působit na zdravou tkáň. Pro tyto menší nádory a metastázy se jeví příhodněji využití radioizotopu  $^{177}\text{Lu}$  s nižší energií a nižším tkáňovým dosahem, což bylo dokázáno výsledky preklinických studií, ve kterých byly testovány analogy somatostatinu  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-oktreotid a  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-oktreotát.<sup>36,42</sup>  $^{188}\text{Re}$  je radioizotopem emitujícím cytotoxické beta záření s energií a dosahem porovnatelným s  $^{90}\text{Y}$  ovšem s mnohem kratším fyzikálním poločasem.<sup>21, 43</sup> Tento radionuklid má podobné dispozice ke značení jako  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .<sup>44</sup> Z tohoto důvodu je snaha převést diagnostické peptidické analogy ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotid) s chelatační částí vazající  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  také na terapeuticky využitelné peptidy radioaktivně značené  $^{188}\text{Re}$ .<sup>43</sup>

### 5.4.2.1 Výhody využití smíšených zářičů (beta<sup>-</sup>/gama, beta<sup>-</sup>/beta<sup>+</sup>)

Většina zmíněných radioizotopů emitujících terapeuticky prospěšné beta záření je také zdrojem gama záření ( $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ), případně zdrojem pozitronů ( $^{64}\text{Cu}$ ). Tohoto paralelního záření lze za pomoci scintigraficko-dozimetrického vyšetření využít k přibližné kvantifikaci retence absorbované dávky v cílových a limitních orgánech, a tudíž k vyhodnocení prospěšnosti/nevhodnosti zvolené strategie léčby. U analogů značených  $^{90}\text{Y}$  ( $^{90}\text{Y}$  je pouze čistý beta zářič) je k simulaci terapie možno využít peptidy značené  $^{111}\text{In}$  nebo k radioaktivnímu značení daného peptidu použít izotop  $^{86}\text{Y}$ , který je zdrojem pozitronového záření. Tento posledně jmenovaný přístup může být výhodný z hlediska odfiltrování zkreslení vazebné receptorové afinity způsobené rozdílnou chemickou povahou  $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}$ . Nevýhodou je omezená dostupnost  $^{86}\text{Y}$  a poměrně krátký fyzikální poločas limitující získání pozdějších dat.<sup>35,45,46</sup>  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-oktreotid,  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-lanreotid,  $^{177}\text{Lu}/^{90}\text{Y}/^{153}\text{Sm}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát nebo peptid značený  $^{188}\text{Re}$ ,



prozatím pojmenovaný P2045, jsou příklady radioaktivně značených peptidů, které jsou klinicky testovány v souvislosti s využitím v terapii neuroendokrinních nádorů.

**Tabulka 3** Přehled radionuklidů využívaných ke značení peptidů.

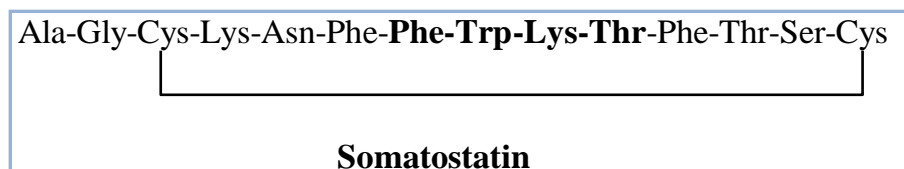
Radio-nuklid	Typ záření	Energie záření	Dosah v tkáních průměrný (maximum) /mm/	$T_{1/2}$	Příklad diagnostického/ terapeutického peptidu	Lit. odkaz
$^{123}\text{I}$	$\gamma$	$E_{\gamma}$ : 159 keV		13,2 h	$^{123}\text{I}$ -Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{123}\text{I}$ -VIP	47
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	$\gamma$	$E_{\gamma}$ : 140 keV		6,0 h	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotid $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demotát 1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demotát 2	47-52
$^{111}\text{In}$	Aug. $e^{-}$  $\gamma$	$E$ : 0,5-25 keV  $E_{\gamma}$ : 173(87 %); 247(94 %) keV	0,01	2,8 dne	$^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotid $^{111}\text{In}$ -DTPA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{111}\text{In}$ -DOTA-lanreotid $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát $^{111}\text{In}$ -růstový hormon	47, 53
$^{90}\text{Y}$	$\beta^{-}$	$E_{\text{max}}\beta^{-}$ : 2280 keV $E_{\text{p}}\beta^{-}$ : 935 keV	4,1 (11,3)	64,8 h	$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát $^{90}\text{Y}$ -DOTA-1-Nal <sup>3</sup> -oktreotid	16, 53
$^{86}\text{Y}$	$\beta^{+}$	$E_{\text{max}}\beta^{+}$ : 1220(13 %); 1550(6 %); 2000(4 %) keV $E_{\text{p}}\beta^{+}$ : 660 keV		14,7 h	$^{86}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{86}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát	53
$^{177}\text{Lu}$	$\beta^{-}$  $\gamma$	$E_{\text{max}}\beta^{-}$ : 497 keV $E_{\text{p}}\beta^{-}$ : 149 keV $E_{\gamma}$ : 113(6 %); 208(11 %) keV	0,5 (2)	6,73 dne	$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát	53-55
$^{153}\text{Sm}$	$\beta^{-}$  $\gamma$	$E_{\text{max}}\beta^{-}$ : 810 keV $E_{\text{p}}\beta^{-}$ : 235 keV  $E_{\gamma}$ : 103 keV	0.6 (3,1)	1,95 dne	$^{153}\text{Sm}$ -CMDTPA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát	56
$^{188}\text{Re}$	$\beta^{-}$  $\gamma$	$E_{\text{max}}\beta^{-}$ : 1960 (20 %); 2120 (78 %) keV $E_{\text{p}}\beta^{-}$ : 765 keV  $E_{\gamma}$ : 155(10 %) keV	3,8 (11)	16,9 h	$^{188}\text{Re}$ -P2045	43
$^{64}\text{Cu}$	$\beta^{-}$  $\beta^{+}$	$E_{\text{max}}\beta^{-}$ : 570 keV $E_{\text{max}}\beta^{-}$ : 653 keV $E_{\text{p}}\beta^{+}$ : 278 keV	0,4	12,8 h	$^{64}\text{Cu}$ -TETA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát $^{64}\text{Cu}$ -TETA-oktreotid	53, 57, 58

Aug.  $e^{-}$  - Augerovy elektrony,  $E_{\text{max}}$  - maximální energie záření,  $E_{\text{p}}$  - průměrná energie záření, CMDTPA - penta/tri-terc-butylykarboxymethyl DTPA ; DTPA - diethyltriaininpentaocetová kyselina, DOTA - 1,4,7,10-tetraazacyklododekan- N,N',N'',N'''- tetraoctová kyselina, HYNIC - hydrazinonikotinamid; TETA - 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan- N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina.

## 5.5 Somatostatin

Somatostatin (SST-14 nebo SST) je endogenní cyklický peptid sestávající ze čtrnácti aminokyselin obsahující ve své struktuře jeden disulfidický můstek. Prosomatostatin (SST-28) je přirozeně se vyskytující prekursor, který se skládá z 28 aminokyselin s SST-14 na C-konci. Má podobnou biologickou aktivitu jako SST-14. Tyto dva peptidy jsou syntetizovány v různých množstvích různými SST-produkujícími buňkami. Preprosomatostatiny jsou prekursorové formy SST-14 a SST-28 skládající se ze 120 nebo více aminokyselin s SST-28 na C-konci. Biologická aktivita těchto prekursorů se může lišit. Somatostatin (SST-14 a SST-28) je uložen v zásobních granulích a po odpovídajících stimulech je uvolňován do organismu.<sup>30</sup>

Obrázek 4 Struktura somatostatinu-14.<sup>28</sup>



Somatostatin byl identifikován v centrálním nervovém systému (v mozkové kůře, mozečku, hypotalamu, v mozkovém kmeni, hypofýze, epifýze a míše) a v C-buňkách štítné žlázy. Největší množství tohoto peptidu však bylo nalezeno v GIT v endokrinních buňkách gastrointestinální sliznice a v D-buňkách ostrůvků pankreatu.<sup>30</sup> Patří do skupiny tzv. brain-gut hormonů. Somatostatin se vyskytuje prakticky ve všech orgánech, kde vykonává různé funkce podle své lokalizace. Je lokalizován v řadě periferních sensorických nervů a zapojuje do vnímání sensorických funkcí (bolest, teplo, dotyk).<sup>4</sup>

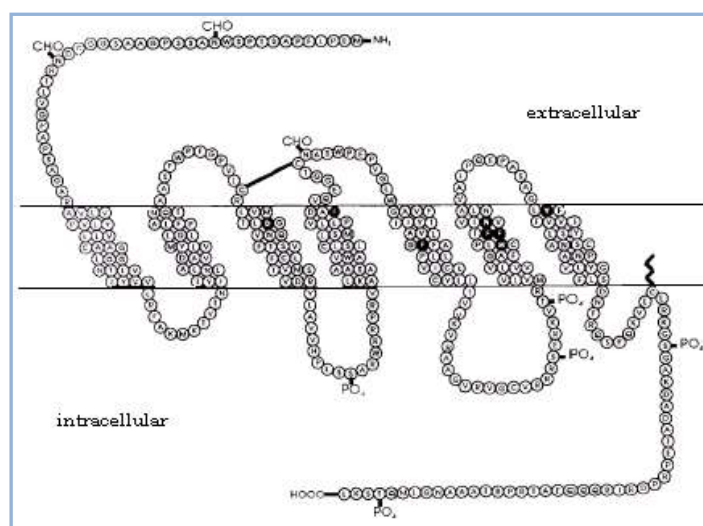
Přirozený somatostatin bývá charakterizován jako regulační inhibiční peptid, který inhibuje exokrinní, endokrinní, parakrinní a autokrinní sekreci. Inhibiční funkce SST je velice rozsáhlá a ovlivňuje řadu orgánových systémů. Inhibuje uvolňování růstového hormonu a všech dosud poznaných gastrointestinálních hormonů, ale také sekreci žaludeční kyseliny. Dále tlumí žaludeční motilitu, intestinální absorpci, enzymatickou a bikarbonátovou sekreci pankreatu. Selektivně snižuje krevní průtok splanchnickou oblastí a portálním systémem.<sup>30</sup> Kromě inhibičních vlastností ve fyziologické regulaci má inhibiční vliv na proliferační aktivitu normálních a neoplastických buněk. Inhibuje angiogenezi a/nebo cévní zásobení peritumorální oblasti, má vliv na imunitní systém a

inhibuje uvolňování humorálních promotorů buněčného růstu. Kromě třech posledně zmíněných aktivit ovlivňujících buněčný růst jsou všechny somatostatinem zprostředkované procesy receptorově závislé.<sup>4</sup>

### 5.5.1 Somatostatinové receptory (SSTR)

Účinky SST na různé orgánové systémy jsou v naprosté většině případů zprostředkovány specifickými somatostatinovými receptory (SSTR). Jde o membránové proteinové řetězce vytvářející sedm transmembranových domén s extracelulární doménou pro navázání ligandů a intracelulární doménou s místy zapojenými do aktivace druhých posílů.<sup>16, 30, 59</sup>

**Obrázek 5 Schématické vykreslení SSTR5 znázorňující transmembránové rozložení a intracelulární a extracelulární domény.**<sup>17</sup>



Navázání ligandu na extracelulární část receptoru vyvolá:<sup>18</sup>

- snížení tvorby intracelulárního cAMP inhibicí adenylátcyklázy ( $G_i$  protein)
- snížení koncentrace intracelulárního  $Ca^{2+}$  inhibicí napětově řízených  $Ca^{2+}$  kanálů a aktivací  $K^+$  kanálů
- aktivace proteinových tyrozinových fosfatáz

Kromě uvedených aktivit jsou jednotlivé subtypy receptorů spojeny s dalšími buněčnými systémy, včetně účinků STAT 5 (signal transducer and activator of transcription) a MAP-kinázy a aktivace fosfolipázy A, C a dalších. Přenos signálu mezi

povrchově lokalizovaným membránovým receptorem a efektorovým proteinem (adenylátcykláza, fosfolipáza C) je u všech somatostatinových receptorů realizován přes regulační prvek G-protein.<sup>4</sup>

Snížení koncentrace intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a cAMP způsobí potlačení cAMP a  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní hormonální sekrece. Aktivace tyrozinových fosfatáz je zodpovědná za antiproliferativní efekt somatostatinu a jeho analogů.<sup>18</sup>

### 5.5.1.1 Typy somatostatinových receptorů

Dodnes bylo popsáno 5 různých typů lidských somatostatinových receptorů (SSTR) lišících se mimo jiné počtem aminokyselin v proteinovém řetězci (364 až 418 AMK). Byly označeny jako SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5. Všechny tyto receptory mají afinitu jak k SST-14, tak i k SST-28. V různých orgánech je různé zastoupení jednotlivých SSTR. Každý SSTR je kódován jedním genem, přičemž jednotlivé geny jsou lokalizovány v různých chromozomech. Čtyři geny neobsahují introny, výjimkou je SSTR2. Ten vytváří 2 izoformy – SSTR2a a SSTR2b. Funkce SSTR2b nebyla dosud objasněna.<sup>4, 16, 30</sup>

### 5.5.1.2 Exprese somatostatinových receptorů

Fyziologický výskyt SSTR je v mozku (mozkové kůře, adenohipofýze, hypotalamu), míše, v GITu, endokrinním a exokrinním pankreatu, nadledvinkách, štítné žláze a ledvinách. V různých tkáních mohou být zastoupeny různé typy a množství SSTR. Některé fyziologické funkce mohou být přiřazeny různým typům SSTR. Např. SSTR2 a SSTR5 regulují uvolňování růstového hormonu a za kontrolu uvolňování inzulínu a glukagonu se zdá být odpovědný SSTR5.<sup>16, 17, 59</sup> SSTR3 a v menší míře SSTR2 mohou inhibovat apoptózu, SSTR1 a SSTR5 mají inhibiční vliv na buněčný cyklus. SSTR1 má zřejmě vliv na angiogenezi, role SSTR4 nebyla zatím objasněna.<sup>4</sup>

U některých nádorů dochází, v porovnání s ostatními tkáněmi, k vysoké expresi SSTR na povrchu buněk. Tyto nádory obsahují většinou jeden či dva dominantní typy receptoru (tabulka 4). Bylo prokázáno, že exprese určitých typů receptorů je závislá na typu tumoru.

**Tabulka 4 Expresse somatostatinných receptorů v jednotlivých typech nádorů.** <sup>26</sup>

SSTR-pozitivní nádory	celkový počet případů	počet případů	typ somatostatinného receptoru				
			SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
<b>Typ nádoru s převahou SSTR2</b>							
Neuroblastomy	8	8	-	+++	-	-	-
Meningiomy	6	6	-	+++	-	-	-
Meduloblastomy	5	5	-	+++	-	-	-
Karcinomy prsu	31	29	-	++	-	-	-
		1	-	++	-	-	-
		1	+++	-	-	-	-
Lymfomy	7	4	-	+++	-	-	-
		3	-	+++	-	-	-
Karcinomy renálních buněk	7	5	-	+++	-	-	-
		2	-	++	-	-	-
Paragangliomy	10	6	-	+++	-	-	-
		2	+++	-	-	-	-
		2	-	+++	+	-	-
Malobuněčné nádory plic	2	2	-	+++	-	-	-
Hepatomy	2	2	-	+++	-	-	-
<b>Nádorů s převahou SSTR1</b>							
Karcinomy prostaty	6	4	+++	-	-	-	-
		1	++	-	-	-	-
		1	++	-	-	-	+
Sarkomy	9	6	+++	-	-	-	-
		2	++	-	-	-	-
		1	-	++	-	++	-
<b>Nádory s převahou SSTR3</b>							
Inaktivní adenomy hypofýzy	30	12	-	-	+++	-	-
		8	-	+++	-	-	-
		4	-	+	+++	-	-
		3	-	++	-	-	+
		1	+++	-	-	-	-
		1	-	++	++	-	-
		1	-	-	-	-	++
<b>Nádory s převahou SSTR2 + SSTR 5</b>							
Adenomy hypofýzy produkující GH	24	9	-	+++	-	-	-
		7	-	++	-	-	++
		4	-	++	-	-	-
		2	-	-	-	-	+++
		1	-	++	+	-	-
		1	-	+	+	-	++
<b>Nádory s SSTR2 a/nebo SSTR1</b>							
Gastroenteropankreatické nádory	22	11	-	++	-	-	-
		3	+++	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	++
		1	++	-	-	-	-
		1	-	+++	-	-	-
		1	-	+	-	-	-
		1	-	+	-	-	+
		1	++	-	-	-	++
		1	++	++	-	-	-
Feochromocyatomy	19	13	-	+++	-	-	-
		3	+++	-	-	-	-
		1	++	-	-	-	-
		1	-	++	-	-	+
		1	++	++	-	-	-
<b>Jiné nádory</b>							
Žaludeční karcinomy	5	2	+++	-	-	-	-
		1	-	+++	-	-	-
		1	-	-	-	-	+++
		1	+	-	-	-	+++
Ependymomy	2	1	-	-	-	-	+++
		1	+++	-	-	-	-

## 5.5.2 Radioaktivně značené analogy somatostatinu

Na počátku vývoje radioaktivně značených peptidů byly analogy oktreotidu značené  $^{123}\text{I}$ . Následovaly analogy označené  $^{111}\text{In}$ , mezi které patří i komerčně dostupný přípravek Octreoscan<sup>®</sup>. Snahou mnoha vědeckých skupin je vyvinout ideální analog se širokým afinitním spektrem k SSTR, který by měl ideální farmakokinetický profil a jednoduchý postup značení vhodnými radionuklidy, například  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

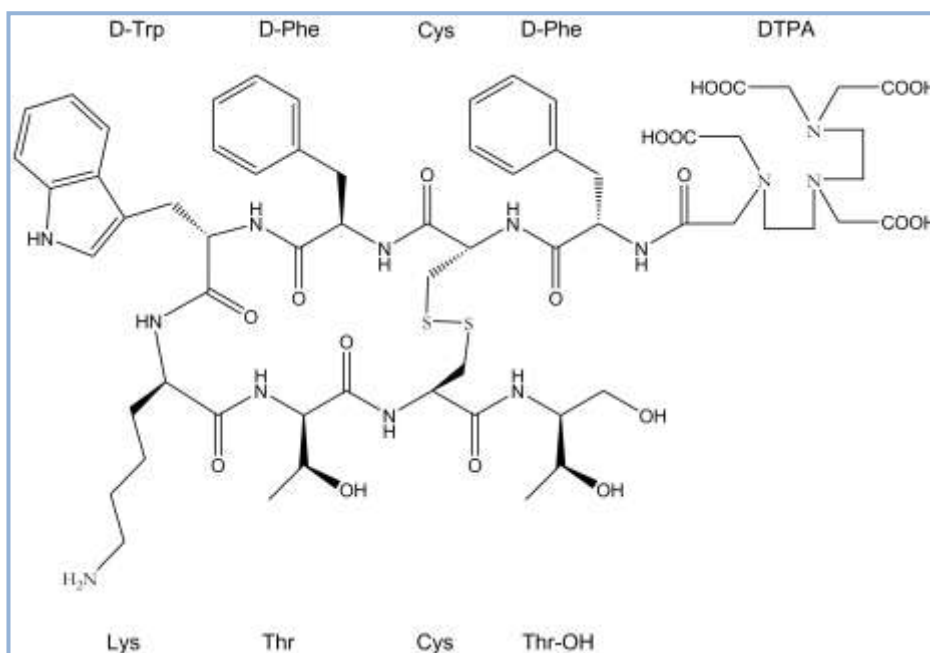
### 5.5.2.1 $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotid ( $^{111}\text{In}$ -pentetretid, Octreoscan<sup>®</sup>)

Zavedení syntetického somatostatinového analogu oktreotidu s navázaným chelátorem DTPA (obrázek 2) stabilně vázajícím indium-111 ( $^{111}\text{In}$ -pentetretid, Octreoscan<sup>®</sup>, obrázek 6) umožnilo detekci celé řady nádorů.

Toto radiofarmakum je považováno za zlatý standard vizualizace neuroendokrinních nádorů a nádorů, které ve své struktuře exprimují somatostatinové receptory SSTR2 a SSTR5, ke kterým má daná sloučenina největší afinitu. Tyto receptorové subtypy se ovšem v neuroendokrinních nádorech vyskytují nejčastěji.<sup>19</sup>

Jelikož se koncentrace receptorů a výskyt jednotlivých subtypů u různých nádorů může lišit, může se lišit i senzitivita diagnostického vyšetření. Příkladem může být diagnostické užití Octreoscanu u jiných než neuroendokrinních nádorů, kde byly

Obrázek 6 Schematické znázornění DTPA-oktreotidu.



somatostatinové receptory subtypu 2 také popsány (prsní nádory, malobuněčné nádory plic, lymfomy). Při těchto vyšetřeních ovšem nebylo dosaženo tak uspokojivých výsledků, což bývá zdůvodňováno nerovnoměrnou distribucí receptorů v těchto nádorových tkáních.<sup>21</sup>

### 5.5.2.2 Optimalizace vlastností somatostatinových analogů

Za účelem zvýšení citlivosti a umožnění detekce i dalších nádorů exprimujících jiné než zmíněné subtypy somatostatinových receptorů jsou prováděny variace v zavedených strukturách syntetických derivátů. Příkladem dnes již standardních peptidů vzniklých substitucí aminokyselin fenylalaninu za tyrozin v bioaktivním jádře oktreotidu může být DTPA(DOTA)-Tyr<sup>3</sup>-oktreotid a DTPA(DOTA)-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát s vystupňovanou afinitou k somatostatinovému receptovému subtypu 2. Mezi novějšími analogy se širším afinitním spektrem je třeba analog DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid (substituce fenylalaninu 1-naftylovou funkční skupinou), který má navíc také afinitu k subtypům 3 a 5.<sup>31</sup>

**Tabulka 5** Přehled zavedených analogů somatostatinu a jejich specifita k receptorům. Všechny peptidy jsou cyklické oktapeptidy s cyklem tvořeným disulfidickým můstkem mezi Cys<sup>2</sup> a Cys<sup>7</sup>.<sup>31, 60</sup>

Název	Sekvence aminokyselin	Vaznost
<b>Oktreotid</b>	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)	SSTR2, (SSTR3), SSTR5
<b>Tyr<sup>3</sup>-oktreotid</b>	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)	SSTR2, (SSTR3), SSTR5
<b>Vapreotid</b>	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH <sub>2</sub>	SSTR2, SSTR5
<b>Lanreotid</b>	2-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH <sub>2</sub>	SSTR2, SSTR5
<b>Tyr<sup>3</sup>-oktreotát</b>	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH	SSTR2, (SSTR3), SSTR5
<b>1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid</b>	D-Phe-Cys-1-Nal-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)	SSTR2, SSTR3, SSTR5

Jelikož je technecium-99m díky svým fyzikálním vlastnostem a snadné dostupnosti považováno za ideální diagnostický radionuklid, je snaha vyvíjet peptidy se schopností vázat tento gama zářič. Takovým peptidem je depreotid, komerčně vyráběný analog somatostatinu, jenž našel uplatnění v diagnostice maligních plicních nádorů.<sup>21</sup> Chelatační tetraaminová skupina připojená k analogu Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu dala vznik dalšímu derivátu s názvem demotát, který je rovněž schopný vázat <sup>99m</sup>Tc a jehož vlastnosti se jeví příznivě pro diagnostické využití somatostatin-receptorově pozitivních nádorů.<sup>48, 61</sup> Příklady diagnosticky použitelných somatostatinových analogů jsou uvedeny v tabulce 5.

## 5.6 Další peptidy studované v souvislosti s diagnostikou a terapií nádorů

V této kapitole jsou zmíněny základní charakteristiky nejdůležitějších peptidů a jejich význam pro konkrétní typ nádorů. Jsou zde uvedeny příklady jednotlivých peptidických analogů. Pro jejich uplatnění jako radioaktivně značených diagnosticky/terapeuticky působících sloučenin platí stejné podmínky jako pro hlavního zástupce této kategorie, somatostatinu. Tato kritéria byla zmíněna v příslušných kapitolách a podkapitolách týkajících se tohoto peptidu.

### 5.6.1 Bombesin-like peptidy

Do této skupiny peptidů patří gastrin-releasing peptid (GRP) a neuromedin-B (NMB). Je nazvána podle bombesinu (BN), který byl prvně izolován z ropuchy *Bombina bombina*. Jeho savčí protiklady jsou výše zmíněné peptidy. Vyvolávají široké spektrum biologických odpovědí v tkáních savců, převážně v CNS a GIT. Deset téměř identických aminokyselin v molekulách BN (14 AMK) a GRP (27 AMK) je zodpovědných za biologický regulační účinek.<sup>4, 62-64</sup>

#### 5.6.1.1 Receptory bombesinu

V současné době jsou známy čtyři BN receptory. Tři z nich jsou přítomné v savčí tkáni; NMB receptor ( $BB_1$ ), GRP receptor ( $BB_2$ ) a BN receptorový subtyp 3 (BNS 3 nebo  $BB_3$ ). Jde o receptory spřažené s G-proteinem. Kromě GRP receptorů nejsou zatím dostatečně charakterizovány.<sup>62</sup> Kromě fyziologického výskytu v tkáních byla zjištěna přítomnost GRP receptorů v primárních invazivních karcinomech prostaty, nádorech plic, prsu a gastrointestinálních stromatálních nádorech. GRP působí na GRP receptorech v nádorové tkáni, což vede k propagaci růstu těchto nádorů. Tento fakt zapříčinil vývoj bombesin/GRP antagonistů k hormonální terapii GRP receptorově pozitivních nádorů.<sup>63</sup>

#### 5.6.1.2 Bombesin/GRP analogy

Podobně jako řada ostatních peptidů je bombesin vysoce nestabilní v plasmě. Sekvence C-konce aminokyselinového řetězce byla popsána jako nezbytná pro vazbu na receptory a biologickou aktivitu bombesin-like peptidů. Kromě dříve zmíněných BN/GRP antagonistů je snaha vyvinout analogy, které by sloužily jako nosiče radionuklidů a daly se využít k diagnostice nebo terapii GRPR-pozitivních nádorů.  $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$  bombesinové



konjugáty byly modifikovány se snahou zvýšit hydrofilitu a tím převážít typ exkrece na stranu renální. Tyto změny ve struktuře vedly k sloučeninám typu [DTPA<sup>1</sup>, Lys<sup>3</sup>(<sup>99m</sup>Tc-Pm-DADT), Tyr<sup>4</sup>]BN (DADT-diaminodithiolový ligand) nebo <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3-L</sub>-GGG-BBN(7-14)NH<sub>2</sub>, které se projevují příznivými farmakodynamickými i farmakokinetickými vlastnostmi.<sup>65</sup> GRP antagonisté (<sup>99m</sup>Tc-demobesin 1-6) se taktéž projevují vysokou vazbou na GRP receptory. Nové ligandy označené BZH1, DTPA-γ-aminobutyric acid-(D-Tyr<sup>6</sup>, β-Ala<sup>11</sup>, Thi<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>) bombesin(6-14) a BZH2, DOTA-γ-aminobutyric acid-(D-Tyr<sup>6</sup>, β-Ala<sup>11</sup>, Thi<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>) bombesin(6-14), patří mezi analogy označované kvůli své specifitě k BB<sub>1-3</sub> jako pan-bombesinové.<sup>65</sup> <sup>99</sup>Tc-RP527, <sup>67/68</sup>Ga/<sup>177</sup>Lu-DOTA-PESIN, <sup>111</sup>In-Pro<sup>1</sup>, Tyr<sup>4</sup>-BN a řada dalších analogů značených <sup>64</sup>Cu nebo <sup>177</sup>Lu je diskutováno v souvislosti s diagnostikou a terapií GRPR-pozitivních malignit.<sup>62, 64, 66</sup>

## 5.6.2 Neurotensin

Přítomnost neurotensinu (NT) byla zjištěna v centrálním nervovém systému (ne v nervových buňkách), ale také v periférních tkáních, hlavně v gastrointestinálním traktu (ileu). Jedná se o peptid, který se skládá ze 13 aminokyselin.<sup>4, 24</sup>

### 5.6.2.1 Neurotensinové receptory

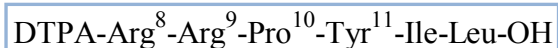
Byly naklonovány tři druhy NT receptorů (NTR). NTR1 a NTR2 patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. NTR1 vykazuje v porovnání s ostatními NTR větší afinitu k NT, a je tedy v popředí zájmu pro vývoj nových receptorově specifických radiofarmak. NTR1 se vyskytují v nejrůznějších typech nádorů, jako jsou astrocytomy, meningiomy, Ewingovy sarkomy (zvláštní typ zhoubného kostního nádoru, který se vyskytuje především u dětí a mladších osob). Obzvláště vysoká hustota těchto receptorů byla nalezena u karcinomů exokrinního pankreatu. Pro tyto nádory je typický extrémně rychlý růst a vysoká agresivita. Rozvoj nových metod umožňujících detekci popřípadě terapii těchto nádorů, je proto velice žádaný.<sup>24</sup>

### 5.6.2.2 Analogy neurotensinu

Bylo zjištěno, že k vazbě na NT receptor zcela postačuje C-koncová sekvence aminokyselin NT<sub>(8-13)</sub>. <sup>111</sup>In-DTPA-NT<sub>(8-13)</sub> analog byl zkoušen jako potencionální radioligand pro *in vivo* detekci NT receptorů. Rychlá enzymatická degradace znemožnila

však toto jeho využití. Vazby mezi aminokyselinami Arg<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>, Pro<sup>10</sup>-Tyr<sup>11</sup>, Tyr<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup> v dříve zmíněné sekvenci jsou snadno štěpeny plazmatickými a tkáňovými peptidásami.<sup>24</sup>

Obrázek 7 Vzorec DTPA-NT<sub>(8-13)</sub>.<sup>24</sup>



Následně tedy bylo cílem získat stabilní NT analogy. Byly syntetizovány analogy se zvýšenou stabilitou značené <sup>99m</sup>Tc a <sup>18</sup>F, ale také analogy s DTPA a DOTA chelatačními činidly, umožňující značení <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>68</sup>Ga a dalšími radionuklidy. Tyto DTPA- a DOTA-konjugované NT analogy, s prodlouženou stabilitou zachovanou receptorovou afinitou a rychlou receptory zprostředkovanou internalizací, jsou perspektivními kandidáty pro detekci a terapii exokrinních pankreatických nádorů.<sup>24</sup>

### 5.6.3 Cholecystokinin a gastrin

Cholecystokinin (CCK) a gastrin patří mezi regulační peptidy, které ovlivňují nejrůznější funkce v mozku, gastrointestinálním traktu, pankreatu a žlučníku. Mimo to působí jako fyziologické růstové faktory ve většině úseků gastrointestinálního traktu, ale také jako stimulační růstové faktory v různých nádorech. CCK vzniká z prekursoru procholecystokininu nesoucím na svém N-konci signální sekvenci. Jsou rozlišovány molekulární formy označované podle počtu aminokyselin CCK-8, CCK-33, CCK-39, CCK-58. Gastrin se fyziologicky vyskytuje ve třech formách: jako minigastrin (G14), tzv. malý gastrin (G17) a velký gastrin (G34). Neuroendokrinní nádory produkují nezralý gastrin Gly-G17 (glycin extended gastrin) s vyšší proliferativní schopností.<sup>4</sup>

#### 5.6.3.1 CCK receptory

Účinek cholecystokininu je zprostředkován dvěma typy receptorů spřaženými s G-proteinem. Tyto receptory se od sebe liší svou afinitou ke gastrinu. Zatímco receptor CCK-A je schopný vázat pouze CCK, receptor CCK-B váže jak CCK, tak gastrin. Označuje se tedy někdy jako CCK-B/gastrin. V nedávné době byl popsán receptor CCK-C.<sup>67, 68</sup>

### 5.6.3.1.1 Exprese CCK receptorů

V normální tkáni se receptory CCK-A vyskytují ve žlučovém měchýři, pankreatu a mozku, receptory CCK-B/gastrin pak ve sliznici gastrointestinálního traktu a v mozku. Z hlediska onkologie a nukleární medicíny je klinicky významný výskyt CCK-B/gastrin receptorů v některých nádorech. Velká hustota CCK-B/gastrin receptorů byla zjištěna v malobuněčných karcinomech plic (SCLC-small cell lung carcinoma), stromatálních nádorech ovaria (stromal ovarian cancer), u astrocytomů a hlavně v medulárních karcinomech štítné žlázy (MTC-medullary thyroid carcinoma). Příležitostně byly CCK-B/gastrin receptory nalezeny v neuroendokrinních gastroenteropankreatických nádorech, ale i v adenokarcinomech prsu a endometria.<sup>68</sup> CCK-A receptory se vyskytují v nádorech zřídka, výjimkou jsou gastroenteropankreatické nádory, meningiomy a některé neuroblastomy.<sup>68</sup>

### 5.6.3.2 CCK-B selektivní radiofarmaka

Expresa CCK-B/gastrin receptorů v lidských nádorových tkáních byla podstatou myšlenky jejich využití k detekci a léčbě těchto nádorů. Několik výzkumných skupin mělo v poslední době snahu vyvinout CCK-B-selektivní radiofarmaka vhodná pro CCK-B-receptorovou scintigrafii a radioterapii.

Pro vazbu na CCK-B/gastrin receptory se zdá být nutná přítomnost sekvence tetrapeptidu Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> na C-konci peptidického řetězce a dále přítomnost sulfatovaných tyrozinových zbytků nebo přítomnost vysoce anionické oligo(penta?) glutamátové sekvence v sousedství N-konce.<sup>69</sup> V sekvenci tetrapeptidu může být aminokyselina Met nahrazena za Leu nebo Nle. Přítomnost sulfonovaných tyrosinových zbytků je nezbytná k navázání na CCK-A receptory.<sup>68</sup>

Jedna skupina sloučenin byla odvozena od nesulfonovaných oktapeptidických analogů CCK. Kromě sloučenin, které byly značeny radioizotopy jódu, byly připraveny analogy s chelatačními činidly jako DTPA nebo DOTA schopnými vázat <sup>111</sup>In a jiné klinicky užitečné radioizotopy (DTPA/DOA-D-Asp-Tyr-Nle-Gly-**Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>**).<sup>68, 70</sup> Téměř současně byly připraveny radioaktivně značené analogy minigastrinu. Heptadekapeptid gastrin-I označený izotopem jódu byl prvním zkoušeným, následovaly minigastriny značené radioizotopy india (DTPA-D-Glu<sup>1</sup>-minigastrin, DTPA-D-Leu<sup>1</sup>-minigastrin).<sup>68, 71</sup>

Obrázek 8 Vzorec DTPA-D-Leu-minigastrinu.<sup>68</sup>



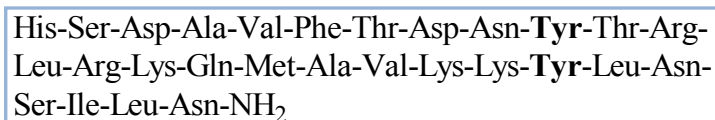
Použití ytriovaného analogu <sup>90</sup>Y-DTPA-D-Glu-minigastrinu, jehož příprava byla logickou návazností na úspěšné diagnostické uplatnění, bylo spojeno s rizikem radiotoxicity způsobené vysokou renální kumulací analogů odvozených od minigastrinu.<sup>72</sup>

Výzkum analogů pro značení <sup>99m</sup>Tc přinesl peptid s označením <sup>99m</sup>Tc-Demogastrin-2, který se váže na CCK-B receptory a vykazuje snížené renální vychytávání.<sup>73</sup> CCK/gastrin analogy stávají perspektivní novou skupinou receptorově specifických peptidů k diagnóze a terapii CCK-B/gastrin-pozitivních nádorů jako malobuněčných nádorů plic a medulárních karcinomů štítné žlázy.

#### 5.6.4 Vasoaktivní intestinální peptid

Vasoaktivní intestinální peptid (VIP) je neuroendokrinní mediátor, který se skládá z 28 aminokyselin. Tento peptid se podílí na regulaci různých biologických funkcí (relaxace dolního jícnového sfinkteru, žaludečního fundu, análního sfinkteru, ovlivnění lokální sekrece, motility a krevního průtoku střevní stěnou).<sup>4</sup> Stimuluje sekreci různých hormonů, lipolýzu, glykogenolýzu a má vliv na růst i proliferaci normálních a maligních buněk.<sup>4, 32, 74</sup>

Obrázek 9 Vasoaktivní intestinální peptid. Zvýrazněné aminokyseliny jsou vhodné pro značení radioizotopy jódu.<sup>32</sup>



##### 5.6.4.1 VIP receptory

Biologický účinek VIP je zprostředkován dvěma typy VIP-receptorů, které mají podobnou afinitu k VIP. Byly označeny jako VPAC1 a VPAC2. Fyziologicky se VIP-receptory vyskytují v plicní tkáni, gastrointestinálním traktu, v buňkách krve a ledvinách. Velká hustota VIP-receptorů se vyskytuje také u gastroenteropankreatických adenokarcinomů, neuroendokrinních nádorů, lymfomů.<sup>14</sup>

Bylo zjištěno, že za biologickou aktivitu VIP je zodpovědný N-konec peptidu, zatímco část C-konce je nezbytná pro navázání k receptoru. Následně tedy byly odvozeny od VIP fragmenty (VIP2-28 a VIP10-28) s pozměněným N-koncem, které se chovají jako silní antagonisté a jsou tedy vhodné k hormonální terapii.<sup>28</sup>

#### 5.6.4.2 VIPR-selektivní radiofarmaka

V peptidickém řetězci VIP se v poloze 10 a 22 vyskytují tyrozinové zbytky, které se dají využít ke značení VIP radioizotopy jódu. První diagnostické výsledky s <sup>123</sup>I-VIP u pacientů s kolorektálním, pankreatickým, žaludečním karcinomem a karcinoidními nádory byly velice slibné. Uvažovalo se o využití <sup>123</sup>I-VIP k detekci pankreatických adenokarcinomů. V některých následně prováděných studiích ovšem nebylo dosaženo zcela shodných výsledků v porovnání s prvními studiemi.<sup>28, 74, 75</sup> Ačkoliv je VIP jedním z mála peptidů, kterých lze využít bez jakýchkoliv modifikací, pro budoucí aplikaci je snaha vyvinout metabolicky stabilní analogy umožňující značení také dalšími radionuklidy, jelikož jodaci lze považovat kvůli své časové náročnosti, nutnosti HPLC čištění a získávání <sup>123</sup>I z cyklotronu za méně komfortní metodu. Takovým analogem, u kterého bylo ke značení použito <sup>99m</sup>Tc, je analog TP3654 se sekvencí aminokyselin GAGG na C-konci umožňující toto značení.<sup>76</sup>

#### 5.6.5 RGD peptidy, antagonisté $\alpha_v\beta_3$ integrinu

##### 5.6.5.1 Charakteristika a výskyt $\alpha_v\beta_3$ integrinu

Integriny jsou důležitou skupinou transmembranových molekul. Jedná se o adhesivní glykoproteiny, které se skládají z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky. Mezi nejdůležitější patří glykoproteiny IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) mající vliv na agregaci destiček a receptory vitronektinu  $\alpha_v\beta_3$ , které hrají zásadní roli při metastazování nádorů a při nádory indukované angiogenezi.  $\alpha_v\beta_3$  byly nalezeny v nově se tvořících endoteliálních buňkách rostoucích nádorů, ale i v mnoha nádorových buňkách různého původu (osteosarkomy, neuroblastomy, karcinomy plic, prsu, prostaty, močového měchýře, glioblastomy, invazivní melanomy).<sup>77, 78</sup> Nádory indukovaná angiogeneze může být blokována peptidickými antagonisty integrinu  $\alpha_v\beta_3$ , v jejichž řetězci se vyskytuje sekvence aminokyselin Arg-Gly-Asp (RGD sekvence) zodpovědná za vazbu na  $\alpha_v\beta_3$  integriny.

### 5.6.5.2 Radioaktivně značené RGD peptidy

Také k diagnostické neinvazivní determinaci  $\alpha_v\beta_3$  exprese jsou vyvíjeny radioaktivně značené peptidy, které vykazují vysokou afinitu a selektivitu k  $\alpha_v\beta_3$  *in vitro* a receptorově specifickou akumulaci v nádorech *in vivo*. Hlavní rozdíl mezi těmito analogy je v jejich farmakokinetických vlastnostech. Počáteční pokusy s jodovanými sloučeninami vykazovaly vysokou akumulaci v játrech a střevech. Ke změně tohoto stavu halogenovaných substancí bylo použito několik strategií, mezi které lze zahrnout konjugaci s cukernou složkou, hydrofilními aminokyselinami a polyetylenglykolem. Kromě halogenovaných sloučenin jsou zkoušeny analogy značené  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  a  $^{188}\text{Re}$  jak k diagnostickým, tak endoterapeutickým účelům. Struktura většiny z nich je založena na cyklickém pentapeptidu (-Arg-Gly-Asp-DPhe-Val-), ke kterému je přikonjugovaný chelatační systém (DTPA, DOTA, HYNIC). Další strukturou je RDG-4, undekapeptid s disulfidickými vazbami, jež ovšem v porovnání s dříve zmíněnými pentapeptidy jeví horší charakteristiku.

Kromě monomerních RGD peptidů jsou také zkoušeny multimerní sloučeniny (dimery, tetrametry) spojující stejné jednotky vázající  $\alpha_v\beta_3$  integriny, ale i kombinace s jednotkami, které tyto proteiny nejsou schopné vázat. Z hlediska farmakokinetiky bylo zjištěno, že dimerní sloučeniny mají oproti monomerním vyšší nádorový uptake a zvýrazněnou retenci v nádoru s převažující renální exkrecí. Podobných výsledků bylo dosaženo i s tetrametry. Kromě tumor-indukované angiogeneze se exprese  $\alpha_v\beta_3$  integrinu vyskytuje také u krvácejících ran, revmatoidní artritidy, psoriatických plaků a během restenózy.<sup>79</sup>

### 5.6.6 Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY) se skládá z 36 aminokyselin, ze kterých je pět tyrozinových zbytků (Y). Tento neobvykle velký počet vedl k vytvoření názvu neuropeptid Y, jehož sekvence aminokyselin se velice podobá pankreatickému polypeptidu (PP) a peptidu YY (PYY). Fyziologické funkce tohoto peptidu je zprostředkována Y receptory Y1, Y2, Y4, Y5 a Y6.<sup>76</sup>

Vysoký výskyt receptorů Y1 v nádorech prsu a Y1 a Y2 v ovariálních, prostatických, renálních a nadledvinkových nádorech představují možnost využití NPY analogů k diagnostice a terapii těchto nádorů.<sup>76</sup>

## 5.7 Nové strategie využití radioaktivně značených peptidů

Cílem nových strategií využívajících radioaktivně značených peptidických analogů je zvýšení efektivity scintigrafických a terapeutických metod. V případě terapeutických metod se jedná hlavně o zvýšení odpovědi nádorových buněk na terapii při současném potlačování nežádoucích účinků se snahou dosažení delšího a kvalitnějšího života pacientů. U scintigrafických metod je to pak zvýšení citlivosti zobrazovacích metod s co možná největším přiblížením vypovídacích možností realitě.

Tyto strategie jsou založeny na třech základních pilířích:

1. zavádění nových radioaktivních sloučenin a metod
2. zvýšení odpovědi cílových nádorových buněk
3. kombinace nejrůznějších přístupů především k terapii a ovlivnění nežádoucích účinků

### 5.7.1 Zavádění nových radioaktivních sloučenin a metod

Hlavním prostředkem zlepšení diagnostických a terapeutických možností radioaktivně značených radiofarmak je vývoj a aplikace nových inovativních vektorů ať již ze skupiny peptidů nebo aminokyselin a protilátek, zavádění nových protokolů značení radioaktivními izotopy a vylepšování přístupů samotné aplikace těchto radiofarmak. Důležitý je samozřejmě i výzkum genomiky, proteomiky, analýzy jednotlivých nádorů a posuzování potencionálních cílů (G-receptory, antigeny, VEGF - vaskulární endotelový růstový faktor- receptory, transportéry aminokyselin) pro jednotlivá radiofarmaka a jejich výhodnosti pro využití v diskutované problematice. Zlepšení vypovídací hodnoty výstupů dozimetrických měření přispívá ke standardizaci metod na straně jedné a možnosti individuálního přístupu na straně druhé. Tyto údaje mohou zvýšit bezpečnost i účinnost terapeuticky používaných peptidů a odhalit nebo upřesnit vztah dávka-účinek. Pochopení všech detailů mechanismů účinku jednotlivých radiofarmak může vést k dalšímu zvýšení efektivity a možností zkoumaných látek. Produkce radionuklidů s výhodnými vlastnostmi případně generátorů těchto radionuklidů je neméně důležitou složkou celého procesu, umožňující snadné značení radionuklidu s vhodnými vlastnostmi.

### 5.7.1 Zvýšení odpovědi cílových nádorových buněk

V současné době jsou zkoušeny metody genové terapie využívající transport genu pro SSTR2 pomocí vhodného vektoru s cílem zvýšit počet receptorů na nádorových buňkách. Rogers a kol. použili jako první rekombinantní adenovirový vektor k indukci exprese somatostatinových receptorů na lidských buňkách nemalobuněčného karcinomu plic rostoucích v myších jako xenograftech.<sup>80</sup> K lokalizaci nádorů byl použit <sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-oktreotid a terapeutická využitelnost této kombinované metody cílené terapie s genovou byla ověřena <sup>90</sup>Y-DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-oktreotidem.<sup>80</sup>

### 5.7.2 Kombinace přístupů a ovlivnění nežádoucích účinků

Kombinace nejrůznějších přístupů a metod při použití radioaktivně značených peptidů je další možností, jak zvýšit efektivitu scintigrafických a terapeutických metod a snížit nežádoucí účinky související s použitím specificky cílených nosičů radionuklidů. De Jong ve své prezentaci nazvané „Future prospects with somatostatin derivatives“ popisuje možnosti, jak docílit vytyčených cílů několika následujícími body (zvýrazněné níže), které byly doplněny ještě dalšími možnými přístupy. Některé z těchto bodů byly již diskutovány v průběhu předcházejících kapitol, jiné jsou rozebrány podkapitolách následujících.

- ✓ **Kombinace peptidů**
- ✓ **Kombinace radionuklidů**
- ✓ Výzkum peptidických antagonistů
- ✓ Použití buňku penetrujících peptidů (CPPs) a jaderně lokalizujících se peptidů (NLPs)
- ✓ Zvýšení specifické aktivity radioaktivně značených peptidů
- ✓ **Kombinace peptidů a sloučenin zprostředkovávající přeměnu spících genů**
- ✓ **Kombinace peptidů a antihypoxických látek**
- ✓ **Kombinace peptidů a ledviny chránících látek (amifostine, gelofusine)**
- ✓ **Kombinace peptidů a chemoterapeutik, inhibitorů angiogeneze, radiosensitizerů (5-fluorouracil; capecitabin)**



### 5.7.2.1 Kombinace peptidů

Výskyt receptorů v nádorech není většinou omezen na jeden receptorový subtyp, respektive výčet potenciálních cílů pro metody nukleární medicíny je u mnoha nádorů velice široký. Například GEP nádory exprimují kromě somatostatinových receptorů GLIP-1 (glukagon-like peptid 1) receptory a receptory VIP (vasoaktivní intestinální peptid), cholecystokyninu a bombesinu.<sup>23</sup> V prsních nádorech byl zase zjištěn současný výskyt receptorů somatostatinu, VIP, gastrin-releasing peptidu a NPY-Y1 (neuropeptid Y, subtyp Y1) receptorů.<sup>81</sup> Kombinace peptidických analogů odvozených od jednoho či více přirozených peptidů by mohla vést ke zvýšení akumulace radioaktivity nebo k optimalizaci jejího rozložení hlavně v nádorech s heterogenní strukturou. Kromě toho některé ze zmíněných peptidů mají potenciál inhibovat nádorový růst.<sup>15</sup> Využití této strategie léčby využívající současné aplikace více analogů je ovšem v současné době limitováno chudšími poznatky o ostatních peptidech a jejich receptorech, jelikož je výzkum soustředěn převážně na vývoj derivátů somatostatinu. Existují ale už i výjimky potvrzující tuto skutečnost. Radioaktivně značené analogy minigastrinu byly úspěšně použity pro diagnostiku cholecystokinin B receptorově pozitivních nádorů. Cyklický analog RGD sekvence c(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) s navázanou chelatační skupinou DTPA, který antagonizuje nádorovou angiogenezi navázáním na receptory  $\alpha_v\beta_3$ , je dalším peptidickým analogem, který může být použit ke scintigrafii nebo radionuklidové terapii nádorového onemocnění.<sup>82</sup>

### 5.7.2.2 Kombinace radionuklidů

Velice přínosnou metodou především pro zvýšení terapeutických možností se jeví kombinace radionuklidů ( $^{90}\text{Y}$  a  $^{177}\text{Lu}$ ).<sup>83</sup> Jak již bylo zmíněno, rozdílné fyzikální vlastnosti (energie záření, dosah v tkáních) skýtají možnost terapie nádorů různé velikosti případně s nestejněměrně exprimovanými receptory. Souhrnný článek<sup>83</sup> popisuje několik úspěšných pokusů využívající kombinace peptidů (oktreotidu a oktreotátu) značenými těmito peptidy.

### 5.7.2.3 Vývoj peptidických antagonistů

Hledání specifických peptidických analogů vedlo k produkci řady specifických agonisticky působících syntetických peptidů. Obecně jsou agonisté preferovanější pro použití u receptor pozitivních nádorů, protože se snadno internalizují do nádorových

buněk po jejich navázání, což umožňuje akumulaci radioaktivity v buňce.<sup>84</sup> Při pokusech se somatostatinovými antagonisty specifickými pro vazbu na SSTR3 (sst<sub>3</sub>-ODN-8) a SSTR2 (sst<sub>2</sub>-ANT) bylo dosaženo výraznější akumulace v nádorech s delší retencí radiofarmaka na těchto strukturách v porovnání s <sup>111</sup>In-DOTA-Nal<sup>3</sup>-oktreotidem (agonista pro SSTR3) respektive <sup>111</sup>In-DTPA-oktreotátem (agonista SSTR2).<sup>85</sup> Antagonisticky působící neinternalizující se radioligandy se váží na velké množství receptorů, zatímco silně se internalizující agonisté se váží pouze na omezený počet receptorů.<sup>85</sup> Proto také Ginj a kol. publikovali článek s názvem „Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumours“, kde popisují výhodnost použití peptidických antagonistů pro cílené zásahy nádorových receptor-pozitivních buněk.<sup>85</sup>

#### 5.7.2.4 Použití buňku penetrujících peptidů (CPPs) a jaderně lokalizujících se sekvencí (NLSs)

O těchto peptidických motivech bylo již stručně pojednáno v kapitole zabývající se radioaktivně značenými protilátkami. CPPs a NLSs vlastní potenciál vpravovat biomolekuly do buněk, respektive transportovat je do jádra. Především u peptidů značených radioizotopy s krátkým dosahem (Augerovy elektrony <sup>111</sup>In) by toto přiblížení velice zvýšilo efektivitu terapie.

##### 5.7.2.4.1 CPPs

CPPs jsou relativně krátké peptidické sekvence (do 30 aminokyselin s kationaktivní nebo amfifilní strukturou) vlastní unikátní schopnost penetrovat buněčnou membránou. Obecně se rozlišují tři typy CPPs:<sup>13</sup>

- přírodní CPPs (penetratin, Tat, VP22)
- syntetické nebo chimerické CPPs obsahující dvě nebo více těchto sekvencí (transportan, mastoparan)
- nové syntetické CPPs (MAP)

Mechanismus, jakým CPPs transportují biomolekuly do buňky, není ještě zcela objasněn. Podle současné hypotézy se nejdříve jedná o interakci kationaktivních skupin typických pro CPPs a negativně nabitých fosfolipidů.<sup>86, 87</sup> Destabilizace membrány tvorbou micel popřípadě mechanismus endocytózy je vlastním dějem zprostředkovávajícím tento transport.<sup>13</sup> Tyto dva potencionální mechanismy jsou oba

možné a vypadá to, že záleží na povaze CPP, buněčném typu a nábojích. S vlastní strukturou CPP souvisí také efektivita tohoto zprostředkovaného transportu.<sup>13</sup>

**Tabulka 6** Příklady CPPs, které byly studovány v souvislosti s penetrací do buněk.<sup>13</sup>

CPP	Sekvence aminokyselin
Penetratin	<sup>43</sup> RQIKIWFQNRRMKWKK <sup>58</sup>
Tat	<sup>48</sup> GRKKRRQRRRPPQ <sup>60</sup>
VP22	<sup>267</sup> DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVD <sup>300</sup>
Transportan	<sup>1</sup> GWTLNSAGYLLG <sup>12</sup> K <sup>27</sup> INLKALAALAKKIL <sup>40</sup>
PTD-4	YARAAARQARA
<i>ri</i> -PTD-4	ARAQRAAARAYG
MAP	KLALKLALKALKAALKLA
SN50	AAVALLPAVLLALLAPVQRKRQKLMP
Arg9	RRRRRRRRR

#### 5.7.2.4.2 NLSs

Molekuly menší než 40-45 kDa difundují pomocí nukleárních pórových komplexů, které mají limitní průměr 25-30 nm. Větší molekuly jsou závislé na energeticky závislém procesu zprostředkovaném NLSs. Tyto sekvence jsou krátké oligopeptidy (menší než 10 aminokyselin), které jsou rozpoznávány přenašečovými proteiny ze skupiny karyopherin/importin. Typické NLSs mají ve své struktuře blok 4 nebo více kationaktivních zbytků (lysin, arginin), který je ve struktuře zastoupen buď jen jednou, nebo s druhým basickým blokem spojeným 10-12 proměnných aminokyselin.<sup>88</sup>

Syntetické NLS peptidy byly použity pro transport řady substancí do jádra. NLS motiv sekvence SV40 (PKKKRKV) byl přikonjugován k řadě nejaderných biomolekul absolutně netypických pro výskyt v jádře (BSA, ferritin, IgG, IgM). Ginj. a kol. popsali analog somatostatinu Tyr<sup>3</sup>-okterotid konjugovaný s touto sekvencí.<sup>88</sup> Tento peptid byl pomocí DOTA označen <sup>111</sup>In a na rozdíl od parentní látky vykazoval šestinásobný uptake a retenci v SSTR-pozitivních AR42J pankreatických buňkách a lidských embryonálních ledvinných buňkách transfekovaných SSTR2A (HEK-SSTR2A). Nukleární uptake NLS konjugované substance byl 45x vyšší než sloučeniny nekonjugované s NLS sekvencemi.<sup>89</sup> Tyto výsledky podporují teorii, že by NLS peptidy mohly zajistit peptidickým analogům vyšší retenci radioaktivity v nádorových buňkách.

Využití této techniky se zdá velice perspektivní a předpokládá se její studium/využití také u ostatních receptorově specifických peptidů.

**Tabulka 7** Některé případné nebo potvrzené NLSs v receptorech v ligandech pro epidermální růstový faktor zmíněné v souhrnném článku<sup>13</sup>

NLS sekvence	Sekvence aminokyselin
PDGF A	<sup>196</sup> PRESGKKRKR <sup>207</sup>
PDGF B	<sup>237</sup> RVTIRTVRVRPPK <sup>255</sup> GKHRK
FGF 1	<sup>21</sup> NYKKPKL <sup>27</sup> <sup>113</sup> SKKHAEKNW <sup>128</sup> FVGLKKN
FGF 2	<sup>116</sup> RSRKYTSWY <sup>129</sup> VALKR
FGF 3	<sup>53</sup> RLRR <sup>56</sup> <sup>72</sup> PRRRK <sup>76</sup>
Interferon- $\alpha$	<sup>86</sup> NSNKKR <sup>92</sup> <sup>128</sup> KTGKRKRS <sup>135</sup>
IL-3 (myš)	<sup>68</sup> LRNKSFR <sup>75</sup> <sup>127</sup> FRKKLRF <sup>133</sup>
IL-21- $\alpha$	<sup>79</sup> KVLKKRRL <sup>86</sup>
IL-1	<sup>92</sup> KKKMEKRF <sup>99</sup>
IL-4	HRHKQLIRFLKRLER
IL-5	<sup>95</sup> KKYIDQQKKKCGEERRV <sup>112</sup>

PDGF - platelet-derived growth factor; FGF - fibroblast growth factor; IL - interleukin.

### 5.7.2.5 Zvýšení specifické aktivity radioaktivně značených peptidů

Problém nízké specifické aktivity u některých DOTA-peptidů limitující terapeutické použití například u ligandů DOTA-substance P a DOTA-bombesinu (pro nukleárně medicínské účely by se aplikované množství peptidu mělo pohybovat hluboko pod hladinou dávek, které způsobují farmakologický efekt) může být částečně vyřešen rozdělením dávky nebo jejím infúzním, intratumorálním nebo intraarteriálním podáním.<sup>27, 90</sup> Zavedení necyklických chelátorů a vyvinutí peptidů s větším počtem navázaných chelatačních činidel patří mezi další možné principy, které by měly zvýšit specifickou aktivitu diskutovaných radiofarmak a tím i jejich využitelnost pro potřeby nukleární medicíny.<sup>27</sup>

## 6 Nežádoucí účinky radiofarmak s cílenou distribucí

Radioaktivní záření může vést k následujícím biologickým procesům: smrt buňky, změněná komunikace mezi buňkami, zánětlivá reakce, kompenzační tkáňová hypertrofie.<sup>91</sup> Kromě těchto zmíněných účinků existují i dlouhodobé následky vzniklé působením volných radikálů, jako je například oxidativní poškození biomolekul (DNA, proteinů a lipidů).<sup>91</sup>

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy našly prozatím své pevné místo především v diagnostice neuroendokrinních nádorů (Octreoscan<sup>®</sup>). Peptidy značené terapeutickými radionuklidy procházejí v současné době řadou klinických studií, ve kterých jsou kromě pozitivních vlivů na progresi onemocnění sledovány nežádoucí účinky, které ve většině případů souvisejí právě s agresivním chováním emitovaného záření. Zvláště ytriované (<sup>90</sup>Y) syntetické somatostatinové analogy odstartovaly diskuzi o bezpečnosti těchto radioaktivních sloučenin.

V porovnání s vedlejšími účinky chemoterapie jsou nežádoucí projevy peptidické radioterapie méně časté, a proto lze tento léčebný postup označit za relativně bezpečný.<sup>38</sup> Akutní následky aplikace radioaktivně značeného peptidů (nauzea, zvracení, bolest v místě nádoru) mohou být kontrolovány symptomatickou terapií. Na ty, které se projevují až s časovou latencí a které jsou výsledkem absorpce radiofarmaka ve zdravé tkáni, je nutno dbát zřetel při samotném plánování terapie (volba dávky a typu radionuklidu, dozimetrická vyšetření s diagnostickými analogy atd.).<sup>38</sup>

### 6.1 Radiofarmaka s cílenou distribucí – přínos versus nežádoucí účinky

Kumulace radioaktivně značených peptidů v jiných než nádorových tkáních může být významným klinickým problémem nejen z hlediska zkreslení interpretace případných patologických nálezů při scintigrafickém vyšetření, ale hlavně z důvodu možných radiotoxických účinků. Následky léčby radioaktivně značenými peptidy přímo souvisí s velikostí dávky (aktivitou), agresivitou záření a farmakokinetickým profilem dané radioaktivně značené sloučeniny. Pečlivé vyhodnocení dozimetrických parametrů u kritických orgánů diagnosticky aplikovaných peptidů může předejít radiotoxickému působení samotné radionuklidové terapie. Výsledky biodistribučních studií studovaných radioaktivně značených peptidů ukázaly, že k nejvyšší retenci radioaktivity dochází ve

slezině, ledvinách, játrech, kostní dřeni a SSSTR-pozitivních nádorech.<sup>19</sup> Zatímco vliv absorbovaného záření na tkáň sleziny nebyl pozorován a jaterní toxicita, pokud se vyskytne, je většinou mírná a reverzibilní, kostní dřev a hlavně ledviny byly v souvislosti s terapeuticky užívanými peptidy označeny za kritické, dávku limitující tkáň.<sup>46, 92</sup>

### 6.1.1 Radionefrotoxicita

V posledních 15 letech byla řada radioaktivně značených monoklonálních protilátek, jejich fragmentů a nízkomolekulárních onkofilních peptidů použito k terapeutickým účelům při léčbě nádorů. Bylo zjištěno, že vysoká a trvalá lokalizace těchto sloučenin v ledvinách je spojena s rizikem radionefrotoxicity kompromitující terapeutickou efektivitu těchto látek.

Je všeobecně známo, že ledviny jsou hlavním místem katabolismu nízkomolekulárních proteinů. Kvůli své velikosti prochází tyto molekuly glomerulární bazální membránou. Za fyziologických podmínek jsou všechny peptidy a proteiny reabsorbovány v proximálním tubulu. Endocyticky transportované peptidy jsou štěpeny lysozomálními proteolytickými enzymy na rozkladné produkty, které se vracejí zpět do renálního tubulu nebo do systémové cirkulace. Chelatované aminokyseliny s navázaným radionuklidem nemohou vlivem své polarizace opustit lysozom, zůstávají ukotveny v buňkách proximálního tubulu a působí radiotoxicky na přilehlou ledvinnou tkáň.<sup>93</sup> Barone a spol. v roce 2005 publikovala závěry své práce, ze kterých plyne, že radiační nefrotoxicita je závislá na velikosti dávky a farmakologickém profilu radiofarmaka, individuálním objemu ledvin a případně frakcionalizaci dávky.<sup>94</sup> Současně bylo zjištěno, že závisí na samotném peptidickém analogu a živočišném druhu a pohlaví, na kterém je analog testován.<sup>95</sup>

V tomto kontextu nelze také opomenout samotný terapeutický radioizotop, respektive jeho fyzikální vlastnosti projevující se svým agresivním účinkem. Obecně lze připomenout dříve zmíněná fakta týkající se emitovaného záření jednotlivých radioizotopů, které se dají také popsat dosahem emitovaných elektronů nejpoužívanějších terapeutických izotopů (<sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y) v jednotkách odpovídající buněčným průměrům ( $\leq 1$ , 20, resp. 150).<sup>93</sup> Ve většině popsaných klinických případů využívajících k léčbě radioaktivně značené receptorově specifické peptidy byla ovšem radiotoxicita nepředvídatelná, k čemuž přispívá také fakt, že není zcela přesně objasněn mechanismus retence radioaktivně značených peptidů v ledvinách.<sup>35</sup> Z tohoto důvodu jsou studovány

mechanismy reabsorpce a hledány látky s potencionálním inhibičním vlivem na tento renální uptake.

### 6.1.2 Další toxické účinky radioaktivně značených peptidů

Hematologická toxicita provázející léčbu radiopeptidy projevující se snížením počtu krevních elementů je častá, ale dá se obecně označit za mírnou a přechodnou.<sup>38</sup> V průběhu léčby radiofarmaky bylo dále popsáno přechodné porušení spermatogeneze, zatímco vzhledem k fyziologickému výskytu somatostatinových receptorů pochopitelná porucha endokrinních funkcí adenohipofyzární osy ani diabetes mellitus nebyly vůbec pozorovány.<sup>19, 96, 97</sup>

## 6.2 Ledviny – limitní orgán radionuklidové terapie

Ledviny jsou důležitým eliminačním orgánem mnoha hydrofilních léčiv, toxinů a endogenních substancí. Řada vysokokapacitních transportních systémů v proximálním tubulu brání nadměrným ztrátám filtrovaných živin a elektrolytů nebo se naopak podílí na sekreci řady organických iontů.

Dodnes byla popsána řada transportérů pro organické anionty a kationty, které mají prvořadou funkci v sekreci aniontů a kationtů. ATP-dependentní primárně aktivní transportéry jako MDR1/P-glykoprotein a MRP (multidrug resistance-associated protein) jsou dalšími ledvinnými systémy působící naopak jako efluxní transportéry pro více hydrofobní molekuly a anionické konjugáty.<sup>98</sup> PEPT1 a PEPT2 jsou transportéry lokalizované v membráně kartáčovém lemu proximálního tubulu, kde slouží k absorpci látek charakteru di-peptidů a tripeptidů. Mezi substráty pro PET1 a PET2 patří například protinádová léčiva, inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu a betalaktamová antibiotika.<sup>98</sup> Tubulární reabsorpci větších molekul (peptidické struktury), které jsou filtrovány přes glomerulární membránu, zajišťuje endocytický proces.

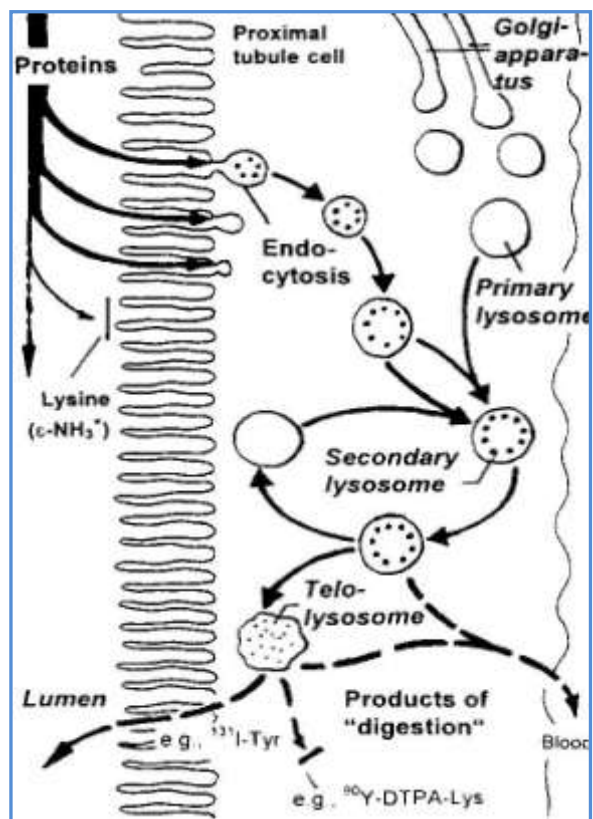
### 6.2.1 Tubulární reabsorpce peptidických radiofarmak

Radioaktivně značené fragmenty protilátek a peptidy mají nesporný význam v diagnostice nádorového onemocnění. Oproti rozměrnějším protilátkám typu IgG vykazují lepší, rychleji stanovitelný poměr specificky vázaného radiofarmaka a jeho distribuce v ostatních nenádorových tkáních. Vážný problém především pro terapeutickou aplikaci představuje ovšem renální uptake těchto peptidů a proteinů. Toto platí hlavně u

látek schopných být glomerulárně filrovány. Přesáhne-li velikost plasmatických proteinů 60 kDa, tyto látky nejsou schopné přejít přes neporušenou glomerulární bazální membránu. To znamená, že proteiny velikosti IgG, jejichž velikost se pohybuje okolo 150 kDa, nepřecházejí, pakliže nejsou rozštěpeny plazmatickými peptidázami, přes glomerulární membránu, zatímco látky charakteru oligopeptidů nebo menších proteinů jsou bez problému filtrovány do primární moči. V souvislosti s prostupem látek přes bazální membránu je dále třeba zmínit její elektronegativní náboj usnadňující prostup peptidů a proteinů s kationaktivní strukturou.

Za fyziologických podmínek se všechny filtrovatelné proteiny a peptidy z proximálního tubulu téměř kvantitativně reabsorbují. Již víc než deset let je jako mechanismus reabsorpce popisován endocytický proces. Z počátku byl tento mechanismus popisovaný jako „receptorově“ zprostředkovaný s tím, že nebyly přesně upřesněny receptory zodpovědné za tento transport. Vazba na luminální membránu proximálního tubulu byla popisována na základě elektrostatických interakcí (mezi negativně nabitou tubulární membránou a

pozitivně nabitými peptidy a proteiny) následovaných tvorbou primárních a sekundárních endozomů a lysozomální degradací proteinů a peptidů.<sup>99</sup> Tato teorie reabsorpce doznala v poslední době jednoho podstatného upřesnění. Výše zmíněný mechanismus byl doplněn názvy dvou receptorových proteinů megalinu a cubilinu, které jsou v proximálním tubulu hojně exprimovány a podílí na reabsorpci řady fyziologických i nefyziologických látek.<sup>100</sup> Současná hypotéza, že se tyto receptory podílí na reabsorpci radioaktivně značených peptidů a



fragmentů protilátek, byla potvrzena řadou studií jak *in vitro* na buněčných liniích, tak *in vivo* pokusech prováděných na myších se

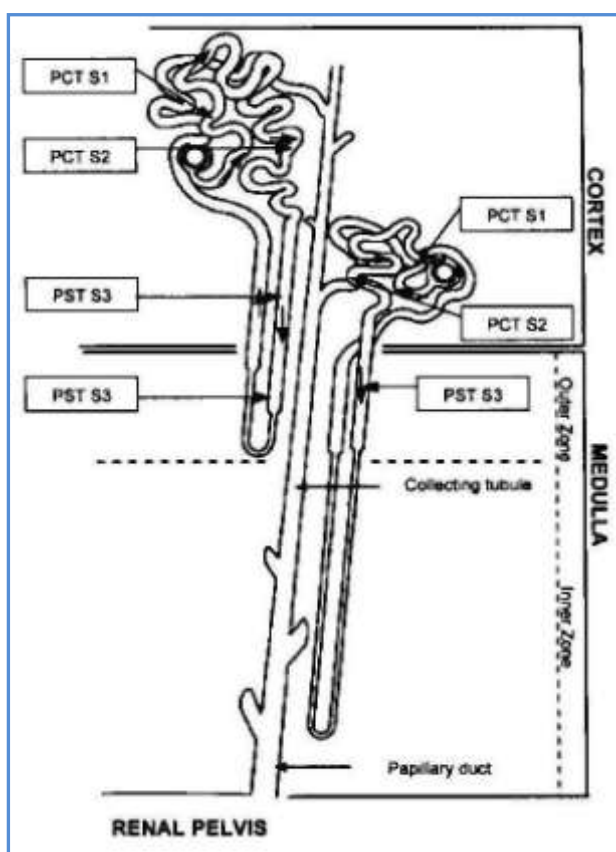
Obrázek 10 Schématické vykreslení reabsorpce a metabolizace proteinů v renálním proximálním tubulu.<sup>99</sup>



specifickými megalin-deficitními ledvinami.<sup>101-103</sup>

Rozkladné produkty (aminokyseliny, radioaktivně značené deriváty jako jodovaný tyrozin) jsou transportovány zpět do krve a v určité míře i do moči.<sup>104</sup> Problém nastává u radioaktivně značených rozkladných produktů, u kterých bylo ke značení použito polární chelatační skupiny. Tyto struktury nemohou opustit lyzozom a zůstávají ukotveny v lyzozomech resp. v buňkách proximálního tubulu. Radioaktivní záření intracelulárně lokalizovaných radionuklidů může svými ionizačními účinky poškodit funkci ledvin.

Testováním látek s potenciálem inhibovat vychytávání v ledvinných buňkách bylo zjištěno, že se na procesu akumulace podílí patrně více typů transportních mechanismů.<sup>105</sup> Podle výsledků práce Rollemana a kol. v článku<sup>106</sup> by se například na renální reabsorpci analogů somatostatinu mohly podílet somatostatinové receptory, které se v proximálním tubulu vyskytují, což ovšem bylo dříve odmítnuto.<sup>103</sup> Barone a kol zase ve svém článku popisujícím experimenty na OK buněčné linii zmiňuje proces fluid-phase endocytózy, která se podle těchto publikovaných výsledků podílí na reabsorpci radioaktivně



značených peptidů zhruba z jedné poloviny.<sup>101</sup>

Nejvyšší hodnoty radioaktivity při zkoumání lokalizace reabsorpce různých radioaktivně značených receptorově specifických peptidů v ledvinách potkana byly zjištěny v proximálním tubulu (S1 a S2 segment) v kůře ledviny, zatímco menší uptake byl popsán ve vnější dřeni (S3 segment proximálního tubulu). Nulové hodnoty radioaktivity byly zjištěny v kortikálním glomerulu, distálním tubulu, vnitřní kůře nebo ledvinné pánvičce.<sup>103</sup> Tato nehomogenní distribuce je v souladu s výsledky z lidských ledvin.<sup>107</sup>

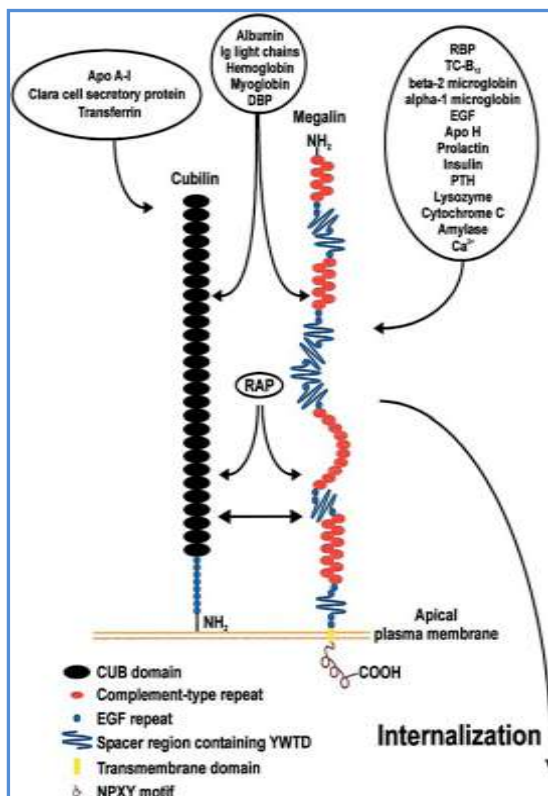
**Obrázek 11** Ilustrace nefronu v ledvinách. Lokalizace segmentů S1, S2, S3. PCT – proximální stočený kanálek.<sup>103</sup>

## 6.2.2 Megalin a cubilin

Jak již bylo zmíněno, megalinový receptor se zdá být zodpovědný za reabsorpci radioaktivně značených receptorově specifických peptidů a monoklonálních protilátek. Z tohoto důvodu následují základní fakta o těchto receptorových proteinech.

### 6.2.2.1 Megalin

Megalin je 600-kDa velký glykoprotein, který je na základě společných strukturních znaků řazen do skupiny LDL receptorů.<sup>108</sup> Tento receptor se skládá se z velké extracelulární domény, jediné transmembránové a krátké cytoplasmatické domény. Extracelulární doména je zodpovědná za navázání ligandů a jejich pozdější uvolnění. Krátká cytoplasmatická doména je zodpovědná za iniciaci endocytického procesu, který následuje po navázání ligandů.



Obrázek 12 Struktura megalinu a cubilinu a příklady jejich ligandů.<sup>112</sup>

### 6.2.2.2 Cubilin

Cubilin je periferní membránový protein (460-kDa) skládající se přibližně z 3600 aminokyselin. Je identický s receptorem tenkého střeva, který je nezbytný pro vstřebání komplexu vnitřní faktor-vitamin B<sub>12</sub>.<sup>109, 110</sup> Neobsahuje žádnou transmembránovou doménu, strukturně se nepochobá žádnému známému endocytickému receptoru a nevlastní žádné místo pro interakci s regulačními proteiny nebo jinými mediátory endocytózy.<sup>111</sup> Z tohoto důvodu se předpokládá, že endocytózu a intracelulární transport cubilinu zprostředkovává receptor megalin.<sup>112</sup>

### 6.2.2.3 Výskyt a fyziologický význam megalinu a cubilinu

Zatímco se receptor megalin vyskytuje v mnoha epiteliálních buňkách (často absorpčních epiteliích), je exprese cubilinového receptoru omezenější. Společně se tyto receptory vyskytují ve velké hustotě v apikální části proximálního renálního tubulu,

v epiteliálních buňkách žlučníku, v tenkém střevě a v cytotrofoblastu placenty. Megalinové receptory se dále vyskytují v glomerulárních podocytech, chorioideálním plexu, buňkách nadvarlete, štítné žlázy, labyrintu vnitřního ucha, v řasnatém tělísku oka, pneumocytech II. typu, v buňkách příštítných tělísek produkujících parathormon, v endometriu, vejcovodu a v embryonálních tkáních trofoektodermu a neuroektodermu. V proximálním renálním tubulu, kde je fyziologický význam megalinu a cubilinu nejpatrnější, je výskyt obou těchto receptorů do značné míry podobný. Mutace genů kódujících expresi megalinu, cubilinu a dalších proteinů podílejících se na endocytóze zprostředkované těmito receptory, popřípadě jejich deficit, může výrazně ovlivnit fyziologickou rovnováhu řady látek v organismu a způsobit tak onemocnění, jako jsou například Imerslund-Gräsbeck syndrom (IGS)/megaloblastická anemie-1 (MGA1), Dentova choroba a Loweho syndrom.<sup>113, 114</sup> Dalšími geneticky podmíněnými nemocemi souvisejícími s megalinem a cubilinem jsou Anderson-Fabryho choroba a cystinóza.<sup>113</sup>

Hlavní význam megalinu a cubilinu spočívá ve zpětné reabsorpci mnoha vitamínů, hormonů, aminokyselin a proteiny vázajících komponent z proximálního tubulu. Zvýšená glomerulární permeabilita umožňující filtraci proteinů větších než albumin nebo zvýšený intraglomerulární tlak mohou být příčinou nadměrných ztrát výše uvedených látek a proteinurie. Ta může být také způsobena poruchami orgánů produkujících do cirkulace velké množství proteinů při zachovalé glomerulární permeabilitě. Častým důvodem tohoto typu proteinurie jsou hemolytická onemocnění, popřípadě rhabdomyolýza projevující se vysokými hladinami hemoglobinu respektive myoglobinu v krevním řečišti a moči.<sup>115</sup> Zvýšené hladiny proteinů (albuminu, myoglobinu, hemoglobinu aj.) v tubulární tekutině a jejich resorpce megalin-cubilinovým endocytickým receptorovým systémem způsobují aktivaci epiteliálních buněk proximálního renálního tubulu, které vedou k produkci zánětlivých cytokininů (MCP1, RANTES, TNF $\alpha$ , IL-6 aj) vyvolávajících kaskádu dějů, které se ve výsledku projevují tubulárním poškozením, tubulointersticiálním zánětem s potencionální progresí ve fibrózu a eventuálně renální selhání.<sup>113</sup>

Tabulka 8 Ligandy megalinu a cubilinu.<sup>100</sup>

Megalín	Cubilín
Vitamin binding proteiny	
<b>Vitamin D binding protein</b>	<b>Vitamin D binding protein</b>
<b>Folate binding protein</b>	<b>Folate binding protein</b>
<b>Retinol binding protein</b>	
Jiné carrier proteiny	
<b>Albumin</b>	<b>Albumin</b>
<b>Těžký metallothionein</b>	
<b>Hemoglobin</b>	<b>Hemoglobin</b>
<b>Myoglobin</b>	<b>Myoglobin</b>
<b>Lactoferrin</b>	<b>Transferrin</b>
<b>Liver-type fatty acid binding protein</b>	
<b>Neutrophil gelatinase-associated protein</b>	
<b>Odorant binding protein</b>	
<b>Sex hormone binding globulin</b>	
Apolipoproteiny	
<b>Apolipoprotein B</b>	<b>Apolipoprotein A1</b>
<b>Apolipoprotein E</b>	<b>High-density lipoprotein</b>
<b>Apolipoprotein J/clusterin</b>	
<b>Apolipoprotein H</b>	
Hormony, prekursorů hormonů, signální proteiny	
<b>Angiotensin II</b>	
<b>Inzulin</b>	
<b>Epidermální růstový faktor</b>	
<b>Prolaktin</b>	
<b>Lysozym</b>	
<b>Thyroglobulin</b>	
Jiné	
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	
<b>Cytochrom C</b>	<b>Receptor-associated protein</b>
<b>Receptor-associated protein</b>	
Léčiva a toxiny	
<b>Aminoglykosidy</b>	
<b>Polymixin</b>	
<b>Aprotinin</b>	
<b>Trichosanthin</b>	
Enzymy a enzymové inhibitory	
<b>Inhibitor aktivátoru plasminogenu - PAI-1</b>	
<b>PAI-1-urokináza</b>	
<b>PAI-1-aktivátor tkáňového plasminogenu</b>	
<b>Prourokináza</b>	
<b>α-amyláza</b>	
<b>α<sub>1</sub>-mikroglobulin</b>	
<b>Lysozym</b>	
<b>Lipoproteinová lipáza</b>	
Receptory a transmembránové proteiny	
<b>Cubilin</b>	
<b>Cation independent manose-6-phosphate receptor</b>	
<b>Transcobalamin II-B12 receptor</b>	
Imunitní a stress-related proteiny	
<b>Advanced glycation end products</b>	
<b>β<sub>2</sub>-mikroglobulin</b>	
<b>Lehké řetězce imunoglobulinu</b>	<b>Lehké řetězce imunoglobulinu</b>
<b>Pancreatitis associated protein</b>	<b>Clara cell secretory protein</b>

### 6.2.3 Nové poznatky

Při testování nových peptidických analogů v preklinických studiích byl sledován vztah samotného analogu na renální uptake u různých zvířecích modelů (potkani rodu Wistar a myši C57Bl.<sup>95</sup> V obou těchto živočišných druzích byl nalezen podobný zvyšující se renální uptake u zkoušených analogů následujících peptidů: CCK (<sup>111</sup>In-DTPA-D-Asp<sup>1</sup>,Nle<sup>3</sup>,6-CCK-8) < Bombesin (<sup>111</sup>In-DTPA-Pro<sup>1</sup>,Tyr<sup>4</sup>-bombesin) < Neurotensin (<sup>111</sup>In-DTPA-G(Pip)<sup>6</sup>,G(Pam)<sup>8</sup>,tBuG<sup>12</sup>-neurotensin<sub>(6-13)</sub> ≈ Somatostatin (<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe-oktreotid) < MG0 (<sup>111</sup>In-DTPA-D-Glu-(Glu)<sup>5</sup>-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>).<sup>95</sup> Renální uptake <sup>111</sup>In-DTPA-oktreotidu nevykazoval žádnou závislost na pohlaví v pokusech prováděných na potkanech a množství radioaktivity v ledvinách se během času příliš nelišilo.<sup>95</sup> U myši však byl renální uptake výrazně vyšší u samic a radioaktivita rychle klesala u obou pohlaví.<sup>95</sup> Bylo tedy zjištěno, že renální uptake není závislý pouze na samotném peptidu, ale i na živočišném druhu a pohlaví, což je informace, kterou je nutno brát v potaz především při přenosu výsledků z *in vivo* preklinických studií do klinické praxe.

Testováním látek s potenciálem inhibovat vychytávání v ledvinných buňkách bylo zjištěno, že se na procesu akumulace podílí patrně více typů transportních mechanismů.<sup>105</sup> Především analogy odvozené od peptidu minigastrinu a možnosti inhibice jejich ledvinné retence poukazují na zapojení také některých dalších ledvinných transportérů např. transportérů pro organické anionty.<sup>95</sup>

## 6.3 Možnosti ovlivnění radionefrotoxicity

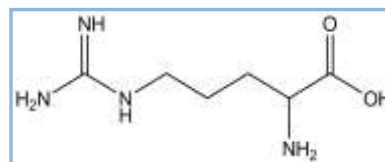
Radioaktivně značené peptidy a fragmenty protilátek, které jsou filtrovány v renálním glomerulu, mohou být reabsorbovány v proximálním tubulu, kde setrvávají jako zdroj radiace především pro vysoce radiosenzitivní glomerulus. Toto vnitřní ozařování představuje vážné omezení terapeutického použití diskutovaných radiofarmak. Toto omezení vytvořilo potřebu renální ochrany během peptidické radioterapie. Bylo prokázáno, že některé látky jsou schopné redukovat tubulární uptake těchto látek. V následujících kapitolách je uveden přehled testovaných látek, které byly zkoušeny za účelem inhibice renální reabsorpce radioaktivně značených receptorově specifických peptidů a fragmentů monoklonálních protilátek.

### 6.3.1 Pozitivně nabitě aminokyseliny

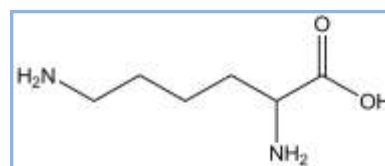
Již v sedmdesátých letech minulého století bylo prokázáno, že infuze pozitivně nabitých aminokyselin jako ornitinu, lysinu a argininu je schopna inhibovat tubulární resorpci nízkomolekulárních proteinů.<sup>116</sup> Mogensen a Solling popsali, že sloučeniny s pozitivně nabitou terminální skupinou okamžitě

inhibují renální tubulární reabsorpci proteinů.<sup>116, 117</sup> Tato inhibice byla potvrzena jak u fragmentů monoklonálních protilátek (<sup>99m</sup>Tc-Fab'), tak peptidů (<sup>111</sup>In-pentetreotid) v pokusech prováděných na potkanech i pacientech.<sup>104, 118</sup> V biodistribučních experimentech zkoumajících mechanismus a lokalizaci renální retence radioaktivních peptidů bylo dosaženo snížení renální reabsorpce na 60 % hodnot kontrolních potkanů.<sup>103</sup>

Obrázek 13 Struktura L-argininu.



Obrázek 14 Struktura L-lysinu.

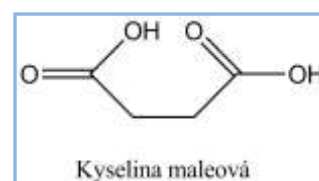


Barone a kol. zkoumali efekt podání různých infuzí aminokyselin na renální uptake <sup>86</sup>Y-DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-oktreotidu.<sup>119</sup> Po 4 hodinách současné infuze komerčně vyráběného koktejlu aminokyselin se snížil uptake radioaktivní sloučeniny o 21 %, což umožnilo zvětšení dávky radiofarmaka při zachování stejného rizika pro ledviny. Stejného efektu bylo dosaženo se samotnou aminokyselinou L-lysinem, přičemž kombinace aminokyselin L-lysinu a L-argininu byla efektivnější než aplikace komerčně dostupného koktejlu aminokyselin.<sup>119</sup> Závěry této studie byly shrnuty takto: relativně nízké nežádoucí účinky, žádný efekt na glomerulární filtraci, zvýšení hladiny plasmatické urey po koktejlu aminokyselin, hyperkalémie po podání samotného lysinu a asymptomatická hypofosfatémie.<sup>119</sup> Podání aminokyselin bylo dobře tolerováno, ačkoliv u pacientů často objevovala nauzea a zvracení.<sup>119</sup> Četnost těchto příznaků byla v přímé souvislosti se složením aminokyselinové infuze.<sup>119</sup>

### 6.3.2 Malát sodný

Inhibice renálního tubulárního reuptaku <sup>111</sup>In-DTPA-oktreotidu bylo dosaženo také pomocí malátu sodného.<sup>118</sup> Malát inhibuje membránovou recirkulaci při endocytóze a snižuje energetický metabolismus redukcí hladin koenzymu A, čímž inhibuje cyklus kyseliny citronové v tubulárních

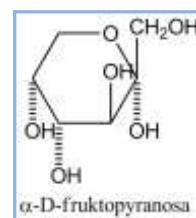
Obrázek 15 Kyselina maleová.



buňkách. Výsledné snížení zásob ATP nebo reakce maleyl-CoA s membránovými proteiny inhibuje řadu renálních transportních systémů včetně reabsorpce peptidů. Bylo zjištěno, že efekt malátu sodného je závislý na dávce a kombinace L-lysinu a malátu má aditivní efekt na snížení reuptaku radiofarmaka.<sup>118</sup> V experimentech prováděných na potkanech bylo dosaženo redukce až na 15 % hodnot kontrolních potkanů.<sup>103</sup> Ačkoliv je podání malátu efektivní v inhibici renální reabsorpce, jeho podání u člověka je kontroverzní kvůli toxickým účinkům na ledvinné buňky.<sup>118</sup>

### 6.3.3 Fruktóza

Jelikož je podání malátu kvůli toxikologickému profilu velice problematické, byla k inhibici reabsorpce zkoušena fruktóza (obrázek 16), látka inhibující ATP-dependentní pochody. Tato pro organismus netoxická látka byla zkoušena k ověření energetické závislosti reabsorpčních mechanismů radiopeptidů a protilátek. Její účinky ve srovnání s lysinem byly minimální.<sup>120</sup>



Obrázek 16 Struktura fruktózy.

### 6.3.4 Plazma expandér Gelofusin®

Želatinový plazma expandér Gelofusin® je další sloučenina, pomocí které bylo dosaženo snížení tubulární reabsorpce (konkrétně <sup>111</sup>In-oktreotidu) u myši a potkanů bez ovlivnění vychytávání této látky v receptor-pozitivních tkáních.<sup>121</sup> Plazmatické expandéry odvozené od škrobového nebo dextranového základu neměly ve stejné studii žádný efekt na renální uptake. Želatinový plazma expandér Gelofusin byl stejně účinný jako aminokyselina lysin.<sup>121</sup>

Účinek Gelofusinu zapadá pouze částečně do teorie megalinem zprostředkovaného reuptaku radioaktivně značených peptidů. Gelofusin se skládá ze sukcinylované želatiny a obsahuje především negativně nabitě molekuly. Kromě toho želatina, hlavní rozkladný produkt Gelofusinu, má peptidickou strukturu složenou hlavně z aminokyselin glycinu, prolinu a hydroxyprolinu, které jsou spíše neutrální než pozitivně nabitě. Mechanismus působení gelofusinu se vysvětluje opatrně dvěma možnými způsoby tak, aby nebyla zásadně vyvrácena teorie megalin/cubilinového receptoru. První uvažuje o reakci ostatních (pozitivně nabitých) aminokyselin, druhý výklad pracuje s možnou existencí megalinových domén odlišných od vazebných míst pro pozitivně nabitě

aminokyseliny.<sup>121</sup> Práce sumarizující jednotlivé možnosti redukce reabsorpce radioaktivně značených peptidů z roku 2007 už ale připouští i jiné mechanismy, které by se mohly na této činnosti podílet.<sup>105</sup>

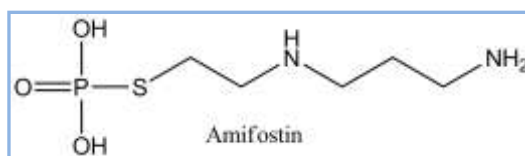
Protože je Gelofusin<sup>®</sup> rutinně používán jako substituent krevního objemu bez toxických účinků a jeho aplikace je tady bezpečná, je možné otestovat jeho funkci také jako inhibitoru reuptaku radioaktivně značených peptidů v klinické praxi. Kvůli jeho krátkému biologickému poločasu se uvažuje o bezprostřední aplikaci tohoto přípravku před samotným radiofarmakem.<sup>121</sup>

### 6.3.5 Polyglutamová kyselina

U polyglutamové kyseliny respektive jejích zbytků (pěti a více) byly pozorovány inhibiční vlastnosti ledvinné reabsorpce <sup>111</sup>In-DTPA-*D*-Glu<sup>1</sup>-minigastrinu, který byl připraven pro diagnostiku medulárního karcinomu štítné žlázy.<sup>122</sup> U potkanů bylo dosaženo až 90% snížení reabsorpce radiofarmaka při použití peptidických řetězců skládajících se z pěti a více *L*-glutamátových zbytků. Samotný nádorový uptake nebyl při této intervenci ovlivněn. Negativního efektu bylo dosaženo při použití poly-*D*-glutamových nebo polyasparagových aminokyselin a také kratších řetězců Glu<sub>x</sub> (x = 1–4). Samotný účinek pěti a více poly-*L*-glutamátových zbytků je možno vysvětlit kompeticí negativně nabitého peptidu (jeho aminokyselin) <sup>111</sup>In-DTPA-*D*-Glu<sup>1</sup>-minigastrin (DTPA-*D*Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) s negativně nabitými glutamátovými zbytky.<sup>122</sup> Pozitivně nabitě sloučeniny jsou tohoto peptidu naopak neúčinné.<sup>105</sup>

### 6.3.6 Amifostin

Amifostin je další látka, kterou lze použít k zmírnění radiačního poškození při peptidické radioterapii. Tato látka neredukuje vychytávání radiopeptidů v renálních tubulech, ale mírní toxický efekt radiace vychytáváním volných radikálů. Kombinací amifostinu a lysinu bylo dosaženo signifikantního snížení renálního poškození u potkanů medikovaných <sup>177</sup>Lu-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátem.<sup>123</sup> Amifostin je úspěšně používán k ochraně zdravé tkáně při radioterapiích a chemoterapiích. Je aplikován jako prolečivo, které se aktivuje na aktivní formu činností



Obrázek 17 Struktura amifostinu



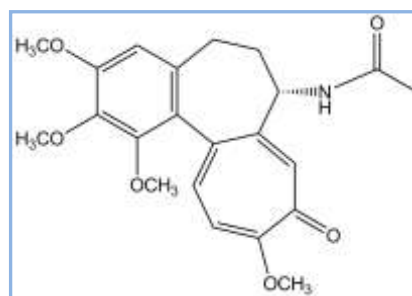
alkalických fosfatáz, jejichž aktivita je vyšší ve zdravé tkáni než v tkáni nádorové.<sup>124</sup> Cytoprotektivní mechanismus účinku aminofostinu není přesně popsán. Nejpravděpodobněji se jedná o vychytávání volných radikálů. Dále se uvažuje o účasti jednoho z metabolitů aminofostinu na ovlivnění DNA syntézy a opravy, genové exprese a průběhu buněčného cyklu.<sup>124</sup>

Aminofostin je dobře snášen při doporučeném dávkování a postupu.<sup>125</sup> Nausea a zvracení jsou častá v den aplikace. Přechodný pokles systolického tlaku je reverzibilní a snadno zvládnutelný.<sup>125</sup>

### 6.3.7 Kolchicin

Kolchicin byl testován za účelem ověření vlivu mikrotubulárně dependentní endocytózy na reabsorpci peptidů a proteinů a proximálním renálním tubulu.<sup>120</sup> Kolchicin je léčivo využívané při léčbě dny, revmatické horečky, Behçetova syndromu a cirhózy. Jeho účinek v proximálním renálním tubulu spočívá v bránění zpětnému začlenění recirkulujících membránových částí do buněčného povrchu poruchou funkce mikrotubulů.

Aplikací kolchicinu u potkanů 5 hodin před podáním radiofarmaka bylo dosaženo snížení uptake <sup>111</sup>In-DTPA-oktreotidu v renálních buňkách o 40 %, zatímco současná aplikace neměla na reabsorpci radiopeptidů žádný vliv.<sup>120</sup> Vyšší hladiny radioaktivity po podání kolchicinu byly pozorovány v kostní dřeni (možná limita podání kolchicinu) a játrech. Následky účinků kolchicinu byly popisovány jako reverzibilní po 24 hodinách.<sup>120</sup>



Obrázek 18 Struktura kolchicinu.

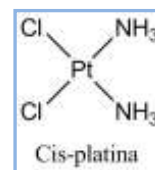
### 6.3.8 Další léčiva jako potenciální inhibitory

Pro léčiva zmíněná níže je typické, že byly zmiňovány v souvislosti se svým nefrotoxickým účinkem. Při výzkumu těchto vedlejších účinků (gentamycinu a polymyxinu B) byl také diskutován receptorově (megalinem) zprostředkovaný transport jako potenciální zprostředkovatel tohoto toxického efektu.<sup>100, 126</sup>

### 6.3.8.1 Cis-platina

Použití tohoto léčiva je omezené z důvodu vysokého rizika radionefrotoxicity. U potkanů byla pozorována polyurie se zvýšeným vylučováním proteinů.<sup>127</sup>

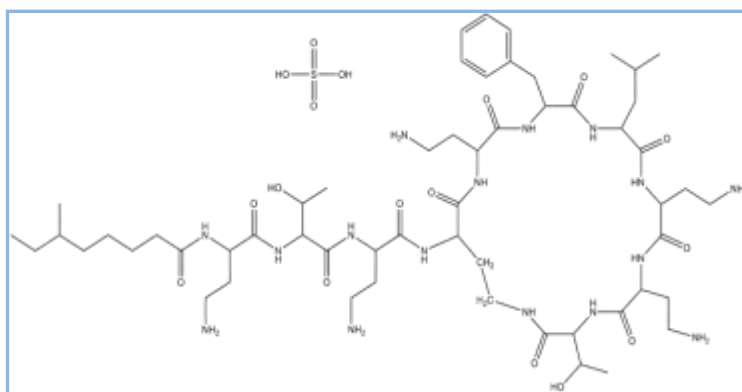
V porovnání s D-lysinem nebo malátem je snížení reuptaku nižší, pouze 30% oproti kontrolám.<sup>103</sup> S1 a S2 segment nefronu nebyly ovlivněny působením cis-platiny, zatímco bylo pozorováno poškození S3 segmentu proximálního renálního tubulu.<sup>103</sup>



Obrázek 19 Struktura cis-platiny.

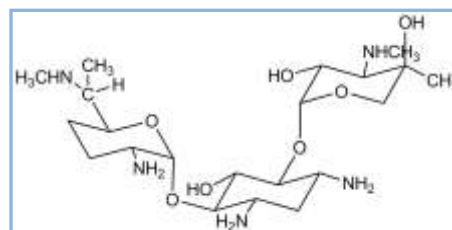
### 6.3.8.2 Gentamicin, polymyxin B

Gentamicin (obrázek 20) a polymyxin B (obrázek 21) jsou antibiotika určená pro léčbu gram-negativních infekcí. Obě léčiva jsou kromě svých antibakteriálních účinků známy svým nefrotoickým účinkem. Polymyxin B je kvůli těmto účinkům určen výhradně k zevní aplikaci. U gentamycinu a dalších aminoglykosidových antibiotik je to dále účinek ototoxický, na který je třeba při medikaci dbát zřetel. Bylo



Obrázek 21 Struktura polymyxinu B.

potvrzeno, že toxické účinky jsou způsobeny kumulací těchto léčiv v buňkách proximálního tubulu, respektive vnitřního ucha. Za tuto jejich kumulaci se zdá být zodpovědný receptor megalin.<sup>100, 126</sup> Doposud nebyla uveřejněna žádná studie testující vliv těchto léčiv na reuptake radioaktivních peptidů *in vivo*. V současné době existují pouze údaje z *in vitro* testování ovlivnění uptake radioaktivně značených peptidů na OK buněčné linii.<sup>101</sup> Z těchto údajů plyne, že polymyxin B je schopen částečně inhibovat tento uptake.<sup>101</sup> Jeho samotný nefrotoický potenciál nebyl v této práci diskutován a zůstává tedy otázkou, zdali je podobný přístup vhodný pro klinické snižování ledvinné reabsorpce radioaktivně značených peptidů. Podobné práce týkající se aminoglykosidového antibiotika gentamycinu nebyly zatím publikovány.



Obrázek 20 Gentamicin C1.

## 7 Metody využívané v experimentech

### 7.1 Radioaktivní značení bioaktivních molekul

Následující odstavce jsou věnovány metodám značení bioaktivních molekul radioizotopy, které byly používány při experimentální části dizertační práce.

#### 7.1.1 Charakteristika používaných radioizotopů

- <sup>111</sup>In Přeměňuje se elektronovým záchytem s poločasem asi 67,9 hodin (2,8 dne) za emise záření gama s nejdůležitější energií 172 keV (91 %) a 246 keV (94 %). Vedle záření gama emituje také Augerovy elektrony. Je produkováno v cyklotronu.
- <sup>90</sup>Y Jedná se o β- zářič s maximální energií elektronu 2,27 MeV ( $T_{1/2} = 64$  h). Zdrojem <sup>90</sup>Y je generátor nebo reaktor.
- <sup>177</sup>Lu Emituje β- záření s maximální energií 0,5 MeV a gama záření o energii 103 keV. Poločas rozpadu je 6,71 dne. Získává se z reaktoru.
- <sup>99m</sup>Tc Rozpadá se převážně izomerickou přeměnou s poločasem 6,02 hodin. Střední energie gama záření, důležitá pro scintigrafickou diagnostiku, je 140,5 keV (89 %).
- <sup>125</sup>I Tento izotop má dlouhý fyzikální poločas (60 dní), nízkou energii fotonů (27–35 keV). Je používán k in vitro pokusům, k zobrazování in vivo se nehodí. Je získáván z jaderného reaktoru.

#### 7.1.2 Radioaktivní značení <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y

K radioaktivnímu značení bioaktivních molekul (peptidů, monoklonálních protilátek) kovovými radionuklidy (<sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y atd.) se často využívají bifunkční chelátory. Jedná se o látky, které ve své struktuře obsahují část, která je schopna chelatovat kovy (např. radionuklidy), a část, pomocí níž se chelátor váže na biologicky aktivní molekulu (reakce aktivovaných karboxylových skupin chelátoru s volnými aminoskupinami biomolekuly za vzniku pevné amidové vazby apod.).

Chelátory musí splňovat některá důležitá kritéria. Musí tvořit termodynamicky a kineticky stabilní komplexy s radionuklidem, aby se minimalizovala kompetice s přirozenými chelátory např. transferin, respektive disociace radionuklidu z komplexu v krevním řečišti. Komplexace musí probíhat za vhodných podmínek (pH, čas, teplota) s vysokým výtěžkem a vzniklé komplexy musí vykazovat vysokou specifickou aktivitu. Výběr vhodného chelátoru velmi závisí na velikosti a koordinační geometrii kovového iontu. Lanthanoidy a ytrium patří mezi velké ionty, které k vyplnění koordinační sféry a tvorbě stabilních komplexů s makrocyclickými chelátory, jako je DOTA a její deriváty,

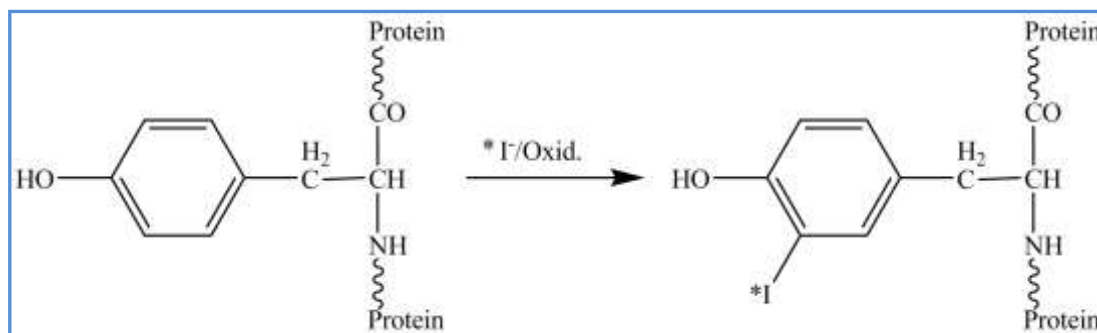
potřebují osm až devět donorových atomů. Příklady bifunkčních chelátorů zobrazuje obrázek 3.

### 7.1.3 Radioaktivní značení $^{99m}\text{Tc}$

Technecium-99m se získává ve formě technecistanu z  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  generátoru elucí fyziologickým roztokem. V této formě (oxidační stupeň 7) je nejstabilnější. K tomu aby zreagoval například s komplexotvornými činidly, musí být použito redukčního činidla, redukující eluovaný technecistan na technecium v oxidačních stupních +5, +4, +3. V přítomnosti vhodných ligandů s vícedonorovými skupinami vytváří termodynamicky stabilní sloučeniny. Nejpoužívanějším redukčním činidlem při značení  $^{99m}\text{Tc}$  jsou cínaté ionty sloučeniny  $\text{SnCl}_2$ .

### 7.1.4 Radioaktivní značení $^{123/125/131}\text{I}$

Pro přímé značení jodací se využívají elektrofilní metody, kdy působením oxidačního činidla vzniká z jodidového aniontu kladně nabitý ion  $\text{I}^+$ , který je elektrofilní substitucí zaveden do značené sloučeniny (obrázek 22). Oxidační činidlo by mělo být voleno tak, aby bylo kompatibilní s vodným prostředím, nedenaturovalo protein a umožňovalo snadné čištění radioaktivně značených proteinů. Elektrofilní reakce může



Obrázek 22 Schéma iodace metodou elektrofilní substituce.

probíhat na aminokyselinách tyrozinu, fenylalaninu, histidinu, tryptofanu a také cysteinu. Různými reakčními podmínkami (např. změna pH) je možné ovlivnit, do jaké míry bude určitá aminokyselina reagovat s radioaktivním jódem. Např. za běžných reakčních podmínek ( $\text{pH} = 7,4$ , chloramin-T) je vysoké procento radioaktivního jódu přítomno na fenolické části tyrosinu. Jako oxidační činidla se pro značení peptidů používají: jód monochlorid ( $\text{ICl}$ ), Chloramin-T (N-chlortoluensulfonamid sodný), Iodogen<sup>®</sup> (1,3,4,6-

tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenyglykouryl), oxidativní enzymy. Při těchto reakcích je jodace směřována zejména na aminokyselinu tyrozin a v menší míře pak histidin a tryptofan.

Vedle přímé jodace proteinů, jež je omezena na přítomnost aminokyselin, které tuto jodaci umožňují, existují také metody nepřímého značení spočívající v konjugaci biomolekul s molekulou, jež byla značena radioaktivním jódem dříve bez přítomnosti peptidu (Bolton-Hunterovo činidlo, Woodovo činidlo, mono- nebo di-jodo derivát methyl-p-4-hydroxybenzimidátu). Tyto molekuly mohou reagovat s funkčními skupinami aminokyselin za tvorby kovalentní vazby. Nejběžnější funkční skupinou využívanou pro připojení radiojodovaných molekul k proteinu je aminoskupina (lysinu).

## 7.2 Kontrola radiochemické čistoty radiofarmak chromatografickými metodami

Chromatografie představuje širokou škálu metod identifikace sloučenin a dělení směsí pro účely analytické nebo preparační, jejichž základním principem je rozdělování jednotlivých sloučenin mezi dvě fáze, které se vzájemně pohybují. Jedna z fází nemění svou polohu vzhledem k zařízení, ve kterém proces probíhá (nepohyblivá neboli stacionární fáze), druhá z fází musí svou polohu vzhledem k zařízení měnit (pohyblivá neboli mobilní fáze).<sup>128</sup>

### 7.2.1 Chromatografie papírová

Papírová chromatografie byla po určitou dobu v praxi nejpoužívanější metodou plošné chromatografie. Výhodou této metody je její jednoduchost a ekonomická nenáročnost. Základním separačním mechanismem je v případě papírové chromatografie rozdělovací rovnováha mezi vodou či jiným rozpouštědlem zakotveným v papíru a použitou mobilní fází. U látek s velkým počtem polárních skupin se často uplatňuje jejich silná interakce přímo s celulózą, v takových případech převládá adsorpční mechanismus dělení. Pohyblivost látky na chromatogramu lze vyjádřit hodnotou  $R_f$ , která se určuje jako poměr vzdálenosti, již urazí skvrna stanovované látky ku vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla.<sup>128</sup>

Metodu papírové chromatografie lze v nukleární medicíně například využít u kontroly radiochemické čistoty DTPA komplexu značeného  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA). Tento radioaktivně značený komplex používaný k dynamické scintigrafii ledvin (např. u

podezření na stenózu renální arterie) může být znečištěn nezredukovaným techneciem ve formě technecistanu  $\text{TcO}_4^-$  nebo zredukovaným techneciem ve formě koloidu ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -koloid). Naneseme-li vzorek na chromatografický papír a necháme-li vyvíjet fyziologickým roztokem (0,9% NaCl), zjistíme při detekci na radiochromatogramu následující rozdělení s hodnotami  $R_f$ :  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -koloid  $R_f = 0$ ;  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$   $R_f \sim 0,7$  a  $R_f$  komplexu  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA je v tomto systému rovno 1. Současně platný lékopis udává požadavek na čistotu tohoto přípravku 95 %. Pro účely ověření radiochemické čistoty jsou v současné době preferovány stripy ITLC-SG mající jisté přednosti před obyčejnou papírovou chromatografií (viz dále).

### 7.2.2 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Při chromatografii na tenké vrstvě, zkráceně označované TLC (z anglického Thin-Layer Chromatography), je rozdělovací proces založen na adsorpci nebo na extrakci. Na podložce (destička ze skla nebo z plastu nebo kovové fólie) je buď volně nasypaná, nebo pomocí vhodného pojiva (sádra, škrob, želatina, polyvinylalkohol aj) upevněná vrstva zrnitého adsorbentu (silikagel, oxid hlinitý, celuloza aj.) stejnoměrné tloušťky. Při adsorpční chromatografii je adsorbent stacionární fází. Při rozdělovací chromatografii je na povrch adsorbována vhodná kapalina (nejčastěji voda), kterou označujeme jako zakotvenou fázi a adsorbent v tomto případě nazývá nosičem zakotvené fáze.<sup>129</sup>

Nanesená látka se adsorbuje na stacionární fázi či se absorbuje do zakotvené fáze. Chromatografická látka nanesená na vrstvu je vymývána a unášena rozpouštědlem (tzv. eluce látky). V místě, kde je povrch adsorbentu obsazen určitou sloučeninou v menší míře či koncentrace určité sloučeniny v zakotvené fázi je nižší, než odpovídá rovnováze s její koncentrací v eluentu, probíhá adsorpce či extakce této sloučeniny z eluentu. To má za následek, že postup sloučeniny chromatografickou vrstvou je pomalejší než postup eluentu. Chromatografovaná látka tedy neustále přechází z jedné fáze do druhé. Poměr mezi rychlostí postupu chromatografované sloučeniny a eluentu závisí na vlastnostech chromatografické vrstvy, použitého eluentu a chromatografované sloučeniny. Lze tedy takto oddělovat jednotlivé složky směsi.

### 7.2.3 Instantní tenkovrstvá chromatografie (ITLC-SG)

Instantní tenkovrstvá chromatografie na silikagelem potažených skleněných mikrovláknech (ITLC-SG) představuje rychlou a vhodnou alternativu k tradiční TLC na

silikagelem potažených skleněných deskách. Výhodou jsou (díky velké porozitě vrstvy) především velmi krátké vyvíjecí časy (obvykle do 20 minut) a příprava chromatografických stripů, které lze snadno nařezat. ITLC-SG se rutinně využívá v nukleární medicíně k rychlému určení radiochemické čistoty připravených radiofarmak a lze ji také využít k dělení lipidů a dalších nepolárních sloučenin.

### 7.2.3.1 Provedení plošné chromatografie (papírové, TLC, ITLC-SG)

Před použitím nastříháme chromatografický strip na proužky o minimální délce 10 cm a šířky podle počtu nanášených vzorků. Před zahájením vyvíjení chromatogramu je třeba naplnit chromatografickou komoru (vyšší skleněná nádoba s víkem a stojánkem pro uchycení papíru) mobilní fází a přibližně 15 až 20 minut nechat ustavit v komoře rovnováhu par mobilní fáze. Volba složení mobilní fáze ovlivňuje pohyblivost chromatografovaných látek podle pravidla podobné rozpouští podobné. Proto pro polární látky se používají směsi polárních organických rozpouštědel (alkoholy) s vodou a přídavkem kyseliny či báze, nepolární látky se pak chromatografují ve směsích nepolárních rozpouštědel (v takovém případě je třeba atmosféru komory sytit vodními parami z misticčky s vodou).

Chromatografii na papíře, TLC, ITLC-SG provádíme nejčastěji ve vzestupném provedení, kdy je vhodný strip zavěšen v chromatografické komoře a spodním okrajem je namočen do mobilní fáze. Vzorek se nanáší na vyznačený start, který by měl být alespoň 1 cm nad hladinou mobilní fáze, rozestupy mezi jednotlivými nanášenými vzorky by měly být alespoň 0,5 až 1 cm, od okraje papíru pak minimálně 1 cm. Vzorek se nanáší mikropipetou či injekční stříkačkou tak, aby skvrna vznikající na startu nebyla příliš rozměrná (raději postupné nanášení po oschnutí předchozí dávky). Při přípravě a nanášení vzorku je třeba brát v úvahu, že příliš velké množství analyzované látky ve vzorku zapříčiňuje tvorbu rozvleklých skvrn. Detekce se při analýze radiochemické čistoty provádí na přístrojích schopných proměřit radioaktivitu v celé délce stripu s výsledným zobrazením závislosti aktivity na  $R_f$ .

### 7.2.4 Kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC („high performance liquid chromatography“ - vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo „high pressure liquid chromatography“ - vysokotlaká kapalinová chromatografie) lze použít ověření čistoty připravovaných radiofarmak, případně

k separaci cílených radioaktivně značených látek od nezreagovaných reakčních substancí. Těchto cílů lze dosáhnout na základě různých druhů fyzikálních a chemických interakcí analyzovaných látek a náplní chromatografické kolony. Dnes je využívána převážně metoda označovaná jako HPLC v reverzním uspořádání (RP-HPLC), při které je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní.

HPLC je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie, která se používá k separaci součástí směsi s využitím různých druhů chemických interakcí mezi analyzovanou látkou (analytem) a náplní chromatografické kolony. Vysoké účinnosti separačního procesu je dosahováno použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. HPLC kolony jsou tvořeny nerezovými trubicemi naplněnými stacionární fází. Tu mohou tvořit nepolární uhlovodíky ( $C_8$  - oktan,  $C_{18}$  - oktadekan), nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. -CN,  $-NH_2$ , apod.) zakotvené na mikročásticích silikagelového nosiče (3-10 $\mu$ m). Vysoká hustota a homogenita stacionární fáze je důsledkem vysokého hydrodynamického odporu, k jehož překonání a tedy dosažení dostatečného a konstantního průtoku mobilní fáze je nutno zabezpečit dostatečný přetlak několika desítek MPa. Mobilní fázi při RP-HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril, jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Při chromatografickém procesu vstupuje mobilní fáze do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu (kvalitu separace). Gradientová eluce na rozdíl od izokratické eluce zajišťuje plynulé přimíchávání rostoucího množství druhé mobilní fáze s vyšším elučním účinkem. U RP-HPLC se nejčastěji používá voda (pufr) ve směsi s metanolem nebo acetonitrilem. Pro detekci radioaktivně značených látek se využívají radiometrické detektory.<sup>130, 131</sup>

#### 7.2.4.1 Provedení HPLC

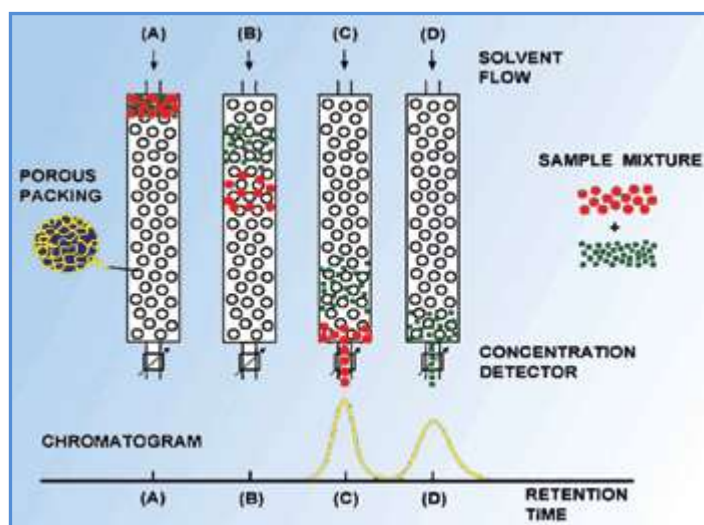
Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části - zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor. Při HPLC analýze protéká chromatografickým systémem mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlaké čerpadlo na kolonu, z ní do detektoru a dále pak do odpadu (jímače frakcí). Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dávkovače a je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky



detekovány. Signál z detektoru je poté zaznamenáván pomocí počítače. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, je výsledkem HPLC analýzy chromatogram, kde každé složce směsi odpovídá jeden pík.

### 7.3 Gelově permeační chromatografie

K separaci látek ze směsí lze v určitých případech využít metodu gelové filtrace - gelově permeační chromatografie (size exclusion chromatography, SEC). Jedná se o jednoduchou metodu, která je založena na principu „neionogenního molekulového síta“,



Obrázek 23 Schéma průběhu gelově permeační chromatografie.

při kterém jsou látky děleny převážně na základě velikosti a tvaru molekuly a při kterém separace téměř nezávisí na fyzikálně-chemických vlastnostech dělených látek.

Pohyb roztoku při prostupu chromatografickou kolonou je závislý na toku mobilní fáze a Brownovu, který umožňuje difúzi rozpuštěných látek do i vně stacionární fáze. Tu tvoří gel umístěný ve svislé koloně. Uvnitř gelu jsou póry, které vytváří molekulové síto. Dělení látek gelovou filtrací závisí na rozdílné schopnosti různých molekul vzorku vstupovat do pórů stacionární fáze. Rozměrnější molekuly nejsou v těchto pórech zadržovány a putují chromatografickou kolonou mnohem rychleji. Menší molekuly naopak vstupují do pórů stacionární fáze, čímž se jejich doba setrvání na koloně prodlužuje. Z těchto údajů vyplývá, že se látky rozdělují podle zmenšujících se rozměrů molekul.<sup>132, 133</sup>

Látky lze charakterizovat pomocí rozdělovacího koeficientu  $K_d$ . Malé molekuly mají  $K_d$  blízké 1 (prostupují všechny póry), zatímco velké molekuly mají  $K_d$  blízké 0.<sup>133</sup>

$$K_d = \frac{(V_e - V_0)}{V_s}$$

$V_e$  - eluční objem (objem eluátu, měřený od nanesení zóny separované molekuly až k její eluci v maximální koncentraci)

$V_0$  - vnější objem sloupce (objem mobilní fáze = objem rozpouštědla mezi částicemi nabobtnalého gelu, nazývaný také jako eluční, zádržný nebo limitní objem)

$V_s$  - objem kapaliny v pórech gelu resp. objem stacionární fáze (objem nabobtnalého gelu)

V praxi při gelové chromatografii se  $K_d$  určuje těžko, protože objem kapaliny v pórech gelu ( $V_s$ ) a objem gelové matrice ( $V_x$ ) lze velmi těžko odměřit.

V současné době lze k dělení látek použít řadu typů gelu, při jehož výběru je nutno přihlížet k velikosti separovaných částic a požadované separační účinnosti. Jako standard je pro gelovou filtraci používán gel Sephadex nebo další materiály jako Sepharose, Sephacryl, Bio-Gel, Bio-Beads, Spheron, Ultrogel, Styragel, Merckogel OR-PVA, Separon, Bio-Glass, Controlled Pore Glass, Porasil, Spherosil. Sephadex je nejpoužívanější gel, vyrábí se z dextranu, který je zesíťovaný epichlorhydrinem. Změnou poměru dextran:epichlorhydrin lze ovlivnit zesíťování a tím velikost pórů. Různé typy jsou označeny písmenem G a číslem, které značí desetinásobek objemu vody, který nasaje 1 g gelu ve formě prášku při bobtnání. Dále se označují podle velikosti částic na Superfine

**Obrázek 24** Užitečné vlastnosti Sephadexu.

Sephadex type and grade	Dry bead diameter $\mu\text{m}$	Fractionation range (molecular weight)		Bed volume ml/g dry Sephadex
		Peptides and globular proteins	Dextrans	
G-10	40—120	— 700	— 700	2—3
G-15	40—120	— 1 500	— 1 500	2.5—3.5
G-25	Coarse	100—300	100— 5 000	4—6
	Medium	50—150		
	Fine	20— 80		
	Superfine	10— 40		
G-50	Coarse	100—300	500— 10 000	9—11
	Medium	50—150		
	Fine	20— 80		
	Superfine	10— 40		
G-75	40—120	3 000— 80 000	1 000— 50 000	12—15
	Superfine	10— 40	3 000— 70 000	
G-100	40—120	4 000—150 000	1 000—100 000	15—20
	Superfine	10— 40	4 000—100 000	
G-150	40—120	5 000—300 000	1 000—150 000	20—30
	Superfine	10— 40	5 000—150 000	
G-200	40—120	5 000—600 000	1 000—200 000	30—40
	Superfine	10— 40	5 000—250 000	

(nejmenší částice), Fine, Medium, Coarse (největší částice). Superfine kvalita slouží k dosažení vysokého rozlišení. Nižší kvality výtěžku gelové filtrace lze dosáhnout gely s označením Fine, Coarse, Medium. Důležitou vlastností gelu je frakcionační rozsah gelu. Je to rozsah relativních molekulových hmotností  $M_r$ , v kterém se látky od sebe oddělují. Pro proteiny se rozsah uvádí v daltonech. Mimo tento rozsah nelze daným gelem látky rozdělit.<sup>132, 133</sup>

### 7.3.1 Využití gelové chromatografie

- Skupinová separace - analýza makromolekulárních látek např. v biochemii nebo v biotechnologii, odsolování bílkovin, odsolování polysacharidů, odstranění extrakčního činidla (např. fenolu z preparátu nukleových kyselin), oddělení koenzymu, oddělení inhibitoru od enzymu, ukončení reakce mezi nízkomolekulární látkou a polymerem.
- Frakcionace - slouží k purifikaci biopolymerů. Používá se například při purifikaci IgG a IgM ze séra.
- Stanovení  $M_r$  - porovnáním s různými standardy zjistíme  $M_r$ . Nejlepší uplatnění má u bílkovin.
- Stanovení  $M_r$  polymerních látek a kvantitativní zastoupení - na otestované koloně s vhodným gelem.
- Analýza vazby ligandů na biopolymer - vzniklý komplex má větší  $M_r$  než původní složky. Např. na zjištění protilátek v séru diabetiků (komplex inzulinu a protilátky se oddělí nejdříve a jeho množství lze stanovit).<sup>133</sup>

## 8 Úvod do experimentální části, cíle dizertační práce

Ze stručného přehledu předcházejícího vlastního popisu experimentů vyplývá, že použití řady radiofarmak může být limitováno radiotoxickým účinkem na ledvinnou tkáň. Jak již také bylo zmíněno, mnoho vědeckých skupin se zaměřilo na výzkum mechanismů vedoucích k těmto nežádoucím efektům ve snaze tyto mechanismy popsat a minimalizovat jejich působení. I když je riziko nefrotoxického působení spojeno i s používáním řady ostatních léčiv byla tato práce zaměřena pouze na jednu skupinu léčiv s nefrotoxicky se manifestujícími nežádoucími účinky. Objektem zájmu této dizertační práce byly radioaktivně značené peptidy a monoklonální protilátky. Tato práce tvoří součást širšího studia biologického chování uvedených receptorově specifických radiofarmak, které je systematicky prováděno na katedře farmakologie a toxikologie.

Prvotním cílem této práce bylo navrhnout vhodný *in vitro* model ke studiu mechanismů vychytávání zmíněných radiofarmak v ledvinách. Pro tyto účely bylo navrženo použití buněčné linie OK (Opossum Kidney) odvozené z buněk proximálního renálního tubulu. Literární rešerší bylo zjištěno, že právě tato buněčná linie byla již v minulosti použita ke studiu receptorově zprostředkované endocytózy s cílem simulovat procesy probíhající v proximálním renálním tubulu. Konkrétně v devadesátých letech 20. století byla pomocí této linie zkoumána reabsorpce albuminu v renálních buňkách. V té době Michael Gekle a Stefan Silbernagel standardizovali podmínky jejího využití při studiu reabsorpce albuminu a získané výsledky publikovali v několika odborných pracích<sup>134-137</sup>. Že tuto buněčnou linii a metodu lze využít i pro studium renálních pochodů radioaktivně značených specificky se vázajících radiofarmak a tedy také to, že se náš výzkum ubírá správným směrem, potvrdily závěry Barone a kol. z vědecké skupiny de Jong, kteří tuto linii využili právě ke studiu radioaktivně značených peptidů<sup>101</sup>. Všechny tyto zmíněné práce posloužily k vytvoření metodiky a standardizaci metody.

Ke standardizaci metody v našich podmínkách byl v počáteční fázi použit fluorescenčně značený albumin. Vedle albuminu byly dále testovány radioaktivně značené peptidy a monoklonální protilátky. U těchto sloučenin byly současně studovány metody radioaktivního značení, posuzován vliv jednotlivých radionuklidů na uptake v renální OK buněčné linii, porovnán reabsorpční potenciál jednotlivých sloučenin a provedeny prvotní studie cílené k inhibici transportu radioaktivně značených peptidů do OK buněčné linie.

### **Souhrnně lze cíle dizertační práce definovat následovně:**

1. Zvládnout techniku přípravy radioaktivně značených radiofarmak s cílenou distribucí včetně jejich následné analýzy.
2. Na základě literární rešerše navrhnout vhodný model testování *in vitro* renálního reuptaku radiofarmak.
3. Standardizovat navrženou metodu v podmínkách pracoviště.
4. Zvolenou metodu použít k experimentální charakteristice reuptaku radiofarmak zkoumaných na pracovišti.
5. Navrhnout a pomocí zmíněné metody experimentálně ověřit možnost snížení internalizace studovaných látek látkami s inhibičním potenciálem na ledvinný reuptake.
6. Zhodnotit přínos metody pro studovanou problematiku.
7. Získané výsledky porovnat z hlediska mezilátkového srovnání.

## 8.1 Charakteristika OK buněčná linie

Buněčná linie s označením OK je linie odvozená z ledvinné tkáně pocházející z americké vačice (American Opossum – *Didelphys Virginiana*). Označení OK pochází z počátečních písmen anglických výrazů Opossum, Kidney. Buněčná linie byla získána z Evropské kolekce buněčných kultur (ECACC), kód 91021202, pasáž 41. Postupy pasážování a experimentů byly prováděny podle návodu (ECACC), případně byly drobně modifikovány podle publikací uvedených v předchozí části.<sup>134-137</sup> Vlastnosti OK buněčné linie byly porovnávány s charakteristikami a parametry kultivace popsanych v publikacích<sup>138, 139</sup>.

**Tabulka 9 Specifikace buněčné linie OK - originální popis ECACC (2008).**

<b>ECACC No.</b>	<b>91021202</b>
<b>Cell Line Name</b>	OK
<b>Keywords</b>	American Opossum, kidney
<b>Cell Line Description</b>	Derived from proximal tubule of a kidney taken from an adult female opossum. Cells retain proximal tubule function.
<b>Species</b>	Opossum
<b>Tissue</b>	kidney
<b>Passage Number</b>	43
<b>Sub Culture Routine</b>	Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:2 to 1:4 i.e. seeding at 2-4x10,000 cells/cm <sub>2</sub> using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO <sub>2</sub> ; 37 °C.
<b>Culture Medium</b>	EMEM (EBSS) + 2mM Glutamine + 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 10% Foetal Bovine Serum (FBS).
<b>Karyotype</b>	Not specified
<b>Receptors</b>	Insulin, serotonin, alpha 2-adrenergic parathy. Hormone
<b>Depositor</b>	Obtained from ATCC
<b>Originator</b>	No
<b>Country</b>	USA
<b>References</b>	Endocrinology 1988;122:2981-2989; Am J Physiol 1988;254:E601; Biochem Biophys Res Comm 1988;152:1416-1420; Biochem Biophys Res Comm 1988;155:74-82; J Pharmacol 1988;244:571-578; In Vitro 1978;14:29-246; Avian Dis 1992;36:256
<b>Additional Literature Report</b>	Not specified
<b>Additional Bibliography</b>	Not specified
<b>Research Council Deposit</b>	No
<b>Release Conditions</b>	No
<b>DNA Available from Stock</b>	No

## 8.2 Charakteristika zkoumaných (radio)farmak

### 8.2.1 Albumin

Albumin je nejvýznamnější plazmatický protein podílející se na udržování onkotického tlaku a transportu hydrofobních molekul. Jedná se o protein elipsoidního tvaru, tvořený jediným polypeptidickým řetězcem o 585 aminokyselinách, který je stabilizovaný 17 disulfidickými můstky.<sup>140</sup> Ačkoliv se jedná o velký anionický protein, není kompletně zadržován glomerulární bariérou a z proximálního tubulu je reabsorbován mechanismem receptorově zprostředkované endocytózy (megalin a cubilin). Koncentrace albuminu v lidském séru je 45 g/l ( $652 \times 10^{-6}$  mol/l) a molekulová hmotnost albuminu je 69 kDa. Koncentrace albuminu v proximální tubulární tekutině je v rozmezí 3-33 mg/l.<sup>137</sup>

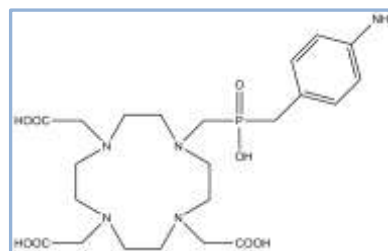
### 8.2.2 Protilátky

#### 8.2.2.1 Protilátka AntiCD66

Anti-CD66 protilátka (antigranulocyt, nespecifická protilátka proti antigenu 95, BW 250/183) je dobře charakterizovaná protilátka s ohledem k biokinetickým datům a klinické aplikaci v scintigrafii kostní dřeně a lokalizaci infekcí. Antigen CD66 je exprimován ve vysoké hustotě ( $2 \times 10^5$ /buňku) na normálních myelopoetických buňkách již od stádia promyelocytů. Je využívána jako diagnostikum schopné reagovat s více než 90 % granulocytů periferní krve a s granulocyty, případně též myelocyty, kostní dřeně.

##### 8.2.2.1.1 Protilátka antiCD a,b,c,e (NHCSNH-B2M3-DTPA/izomer A)<sub>4-5</sub> (Azacycles s.r.o.)

Tato protilátka je modifikována chelátorem, který umožňuje stabilní označení protilátky radionuklidy  $^{111}\text{In}$  nebo  $^{90}\text{Y}$ . Tento ligand (obrázek 25) je navázán na protilátku přes reaktivní isothiokyanátovou skupinu.



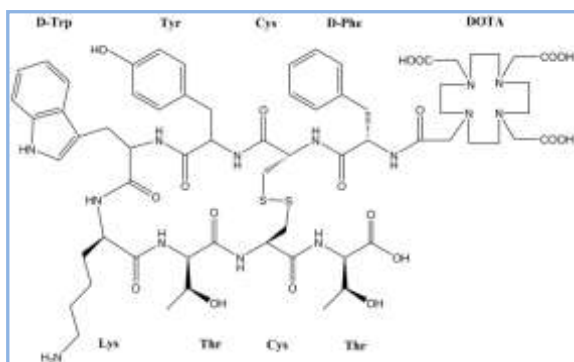
Obrázek 25 Ligand protilátky.

##### 8.2.2.1.2 Scintimun<sup>®</sup> Granulocyte

Scintimun<sup>®</sup> Granulocyte je klinicky používaný diagnostický přípravek - kit pro značení myší monoklonální protilátky BW 250/183 (MAb) techneciem ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) - k intravenózní injekční aplikaci určený imunoscintigrafii zánětů a kostní dřeně, obzvláště tam, kde je podezření na metastázy.

## 8.2.3 Peptidy

### 8.2.3.1 DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát (DOTA –TATE)



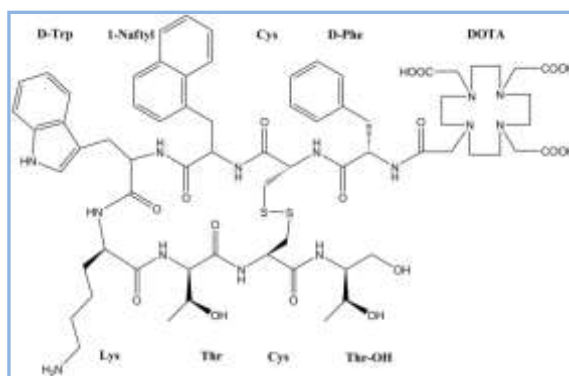
Obrázek 26 Struktura DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu.

radioaktivně značené analogy<sup>60</sup>. Aminokyselina tyrozin umožňuje jodaci tohoto peptidu, chelatační skupina DOTA vazbu izotopů <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In dalších.

DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát (obrázek26) je syntetický analog somatostatinu s afinitou k somatostatinovým receptorům, především k subtypu 2 (IC<sub>50</sub> 1,5 ± 0,4 nM), které se často vyskytují v neuroendokrinních nádorech a jsou podstatou specifické vazby pro diagnosticky nebo terapeuticky

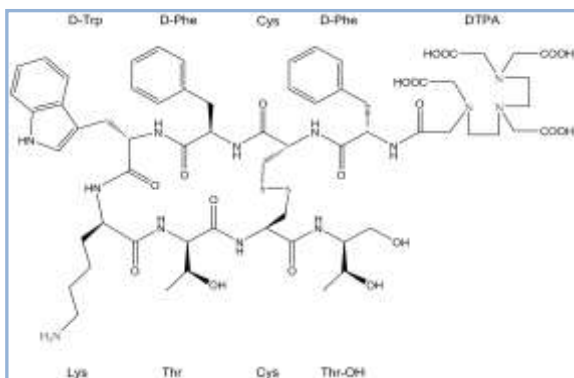
### 8.2.3.2 DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid (DOTA-NOC)

DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid (obrázek 27) je relativně nový syntetický analog somatostatinu s afinitou k somatostatinovým receptorovým subtypům 2, 3, 5 (IC<sub>50</sub> 2,9 ± 0,1 nM, 8 ± 2 nM, respektive 10,4 ± 1,6 nM), které se často vyskytují v neuroendokrinních nádorech a jsou podstatou specifické vazby pro diagnosticky nebo terapeuticky radioaktivně značené analogy. Chelatační skupina DOTA umožňuje navázání izotopů <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In a dalších.



Obrázek 27 Struktura DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu.

### 8.2.3.3 DTPA-oktreotid



Obrázek 28 Struktura DTPA-oktreotidu.

Tento derivát somatostatinu (obrázek 28) je klinicky používaným radiofarmakem využívaným k detekci neuroendokrinních nádorů a metastáz exprimujících somatostatinové receptory. Je distribuován pod obchodním názvem Octreoscan<sup>®</sup>.



## 9 Materiály a přístroje

### 9.1 Materiály a chemikálie k radioaktivnímu značení a analýze

#### Zkoumané substance

FITC-albumin bovine (Sigma-Aldrich, ČR)

*AntiCD66 a,b,c,e-(p-NHCSNH-PhCH<sub>2</sub>PO(OH)CH<sub>2</sub>-DO3A)<sub>2,3</sub>* (Azacycles s.r.o., ČR)

DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát (piCHEM, Rakousko)

DOTA-Nal<sup>3</sup>-oktreotid (piCHEM, Rakousko)

DTPA-oktreotid – Octreoscan<sup>®</sup> (Mallinckrod Medical B.V., Nizozemsko)

Scintimun (CIS bio international, Francie)

#### Radioizotopy použité k radioaktivnímu značení

<sup>111</sup>In-InCl<sub>3</sub> (GE Healthcare, Velká Británie)

<sup>177</sup>Lu-LuCl<sub>3</sub> (PerkinElmer, USA)

<sup>90</sup>Y-YCl<sub>3</sub> (PerkinElmer, USA)

<sup>125</sup>I-NaI (MP Biomedicals, USA)

<sup>99m</sup>Tc-generátor (GE Healthcare, UK)

#### Chemikálie použité k radioaktivnímu značení a analýze radiofarmak

Acetonitril, metanol, 2-propanol, kyselina gentisová, chloramin T, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný a DOTA byly získány od Sigma-Aldrich, ČR. Etanol, octan amonný byly výrobky firmy Penta, octan sodný, trifluoroctová kyselina firmy Merck, kyselina chlorovodíková, amoniak, chlorid sodný a kyselina octová byly výrobky firmy Lachema. Další použité chemikálie: 0,9% chlorid sodný (Braun), EDTA (MP Biomedicals).

#### Kolony

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

#### Předklony

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

Stripy pro instantní tenkovrstvou chromatografii na skleněných mikrovláknách byly výrobky firmy GelmanSciences.

## 9.2 Materiály pro biologické experimenty

Minimal essential medium (MEM), fetální hovězí sérum (FCS), L-glutamin, neesenciální aminokyseliny (NEAA), trypsin, 3-(morfolino)-propansulfonová kyselina (MOPS), *N*-(2-hydroxyethyl)-piperazin-*N'*-(2-ethansulfonová kyselina) (HEPES), Triton X-100 byly získány z firmy Sigma-Aldrich, ČR. Octreotide (Sandostatin®) je komerčně dostupný produkt firmy Novartis, Švýcarsko. Chemikálie pro BCA stanovení proteinů - (BCA kit) byly výrobkem firmy Pierce, USA. Chemikálie pro testy cytotoxicity (založený na MTT) byl produktem firmy Sigma-Aldrich. Veškerý kultivační plast byl vyroben firmou TPP, Švýcarsko a dodán firmou Biotech, ČR.

## 9.3 Přístrojové vybavení

Agilent HPLC system 1100 Series (Agilent Technologies, USA)

Analytické váhy (Boeco, Německo)

Automatický gammacounter 1480 Wizard™ 3" (Wallac, Finsko)

CO<sub>2</sub> inkubátor Air Jacket (Sheldon Manufacturing Inc., USA)

Centrifuga MPW-300 (Mechanika Precyzyjna, Polsko)

Dry bath incubator (Major Science, Taiwan)

Laminární box Topsafe 1.8 (Bio Air Instruments, Itálie)

Minicentrifuga Z 100 M (Hermle, Německo)

pH metr Orion 350 (Thermo Scientific, USA)

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

Microplate reader Tecan (Tecan Group, Švýcarsko)

Thermo Savant SPD Speed Vac concentrator (GMI, USA)

TLC-analyzátor (Raytest, Německo)

Třepačka BioVortex V1 (Biosan, Lotyšsko)

Univerzální scintilační sonda s radiometrem SSU-70-2 (Polon, Polsko)

Vakuové čerpadlo Vacc-space-20 (Chromservis, Česká republika)

## 10 Metodika, postup práce

### 10.1 OK buněčná linie

#### 10.1.1 Optimalizace experimentálních podmínek

Optimalizace experimentálních podmínek pro provádění experimentů byla provedena prvotními experimenty s FITC-albuminem jako internalizačním substrátem. Tyto experimenty byly navrženy na základě publikovaných informací.

##### 10.1.1.1 Standardizace podmínek z hlediska přípravy buněk

Na 12jamkové plata byla nasazena OK buněčné linie (pasáž číslo 57) v hustotě 20 tis/cm<sup>2</sup>. V následujících dnech bylo vždy jedno plato použito na experiment, kdy byla sledována internalizace FITC-albuminu (50 µg/ml) po dvouhodinové inkubaci. Následně byly buňky opláchnuty (6x) PBS (0-4 °C) a zlyzovány (1% SDS). K měření fluorescence byl použit plate-reader Tecan. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty fluorescence slepých vzorků. Ty byly získány přidáním internalizačního roztoku na konci dvouhodinové inkubace k do té doby nepoužitým buňkám a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami.

##### 10.1.1.2 Stanovení optimálního postupu ukončení experimentu

Na 24jamkovém platu byly dvě hodiny inkubovány buňky (P+60, den po konfluenci) s 50 µg/ml FITC albuminu. Experiment byl ukončen odsátím inkubačního média a následným omytím PBS (0-4 °C) a lyzací buněk (1% SDS). K měření fluorescence byl použit plate-reader Tecan. Výsledky měření byly zpracovány do grafu znázorňujícího závislost internalizované fluorescence na počtu omytí.

## 10.2 Albumin

Ke standardizaci metodiky provádění experimentů na OK buněčné linii byly použity dva druhy značeného albuminu. Fluorescenčně značený FITC-albumin a albumin značený na pracovišti <sup>99m</sup>Tc.

## 10.2.1 FITC-albumin

Tento albumin byl výrobcem označen nevlastním fluoroforem derivátem fluoresceinu fluorescein-5-izothiokyanátem (FITC). Absorbční maximum této molekuly je ve vodě 494 nm a emisní maximum of 521 nm.

### 10.2.1.1 Závislost internalizace na koncentraci FITC-albuminu

Z údajů v literatuře byly odvozeny koncentrace FITC-albuminu (20 µg/ml; 40 µg/ml; 80 µg/ml; 160 µg/ml; 320 µg/ml; 640 µg/ml) a sledována závislost internalizace na vzrůstající koncentraci FITC-albuminu. Koncentrace FITC-albuminu ve zkoušených roztocích byla přeměřena BCA metodou s albuminem jako standardem (16,3 µg/ml; 34,7 µg/ml; 62,3 µg/ml; 161,4 µg/ml; 303,9 µg/ml; 593,9 µg/ml). Monovrstva OK buněčné linie nasazená na 24jamkové destičce byla s danými koncentracemi FITC-albuminu inkubována po dobu 2 hodin při 37 °C. Po této době byla monovrstva omyta (6x) PBS (0-4 °C) a dezintegrována roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). K měření fluorescence byl použit plate-reader Tecan. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty fluorescence slepých vzorků získané přidáním internalizačního roztoku (dané koncentrace) na konci dvouhodinové inkubace k do té doby nepoužitým buňkám a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného albuminu bylo vztaženo k množství buněčného proteinu (BCA, albumin jako standard)

### 10.2.1.2 Závislost internalizace FITC-albuminu na čase

Experimenty byly provedeny jak na 24jamkových platech, tak na Petriho miskách (22 cm<sup>2</sup>). OK buněčná linie byla inkubována s 50 µg/ml FITC-albuminu po dobu stanovených časových intervalů při teplotě 4 °C a 37 °C. Poté byla monovrstva omyta (6x) PBS a dezintegrována roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). K měření fluorescence byl použit plate-reader Tecan. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty fluorescence slepých vzorků získané přidáním internalizačního roztoku a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného albuminu bylo vztaženo k množství buněčného proteinu (BCA, albumin jako standard).

### 10.2.1.3 Vliv nadbytku albuminu na internalizaci FITC-albuminu

Experimenty byly provedeny jak na 24jamkových platech, tak na Petriho miskách (22 cm<sup>2</sup>). OK buněčná linie byla inkubována s 50 µg/ml FITC-albuminu s přidavkem vzrůstajícího množství neznačeného albuminu (0 mg/ml; 0,5 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 50 mg/ml) po dobu dvou hodin při teplotě 37 °C. Poté byla monovrstva omyta (6x) PBS (0-4 °C) a dezintegrována roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). K měření fluorescence byl použit plate-reader Tecan. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty fluorescence slepých vzorků získané přidáním internalizačních roztoků na konci dvouhodinové inkubace k do té doby nepoužitým buňkám a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného albuminu bylo vztaženo k množství buněčného proteinu (BCA, albumin jako standard).

### 10.2.1.4 Porovnání internalizace FITC-albuminu a FITC-dextranu

Experimenty byly provedeny jak na 24jamkových platech. OK buněčná linie byla inkubována se 100 µg/ml FITC-albuminu a 100 µg/ml FITC-dextranu. Po 2 hodinách inkubace byly jamky důkladně omyty (6x) PBS (0-4 °C) a buňky dezintegrovány roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). K měření fluorescence byl použit plate-reader Tecan. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty fluorescence slepých vzorků získané přidáním internalizačních roztoků a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného albuminu bylo vztaženo k množství buněčného proteinu (BCA, albumin jako standard).

## 10.2.2 <sup>99m</sup>Tc-albumin

### 10.2.2.1 Příprava <sup>99m</sup>Tc-albuminu

#### **Postup radioaktivního značení <sup>99m</sup>Tc-albuminu**

Do reakční nádoby bylo postupně přidáno:

- ❖ 200 µl roztoku albuminu (250 mg/ml H<sub>2</sub>O)
- ❖ 100 µl roztoku 2 mg/ml SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O \*
- ❖ 200 µl čerstvě eluovaného roztoku <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>

Roztok byl míchán po dobu jedné minuty. Poté bylo pH upraveno na přibližnou hodnotu pH = 6 roztokem 1 M NaOH.

\*Příprava roztoku 2 mg/ml SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 500 mg SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno v 25 ml koncentrované HCl. V den potřeby byl tento roztok naředěn superčistou H<sub>2</sub>O (přečištěnou v dusíkové atmosféře) v poměru 1:10.

### **Přečištění radioaktivně značeného <sup>99m</sup>Tc-albuminu**

Přečištění značeného <sup>99m</sup>Tc-albuminu bylo prováděno metodou gelově permeační chromatografie. Kolona (28 x 1 cm) byla naplněna Sephadexem G-50 naloženým v deionizované H<sub>2</sub>O. Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,9% (m/v) NaCl. První 3 ml byly odebírány do odměrného válce a následně byly sbírány po kapkách frakce odpovídající cca 1 ml. Z každé frakce byly odebrány 2 µl a z jejich změřené aktivity byl zpracován eluční profil. Frakce obsahující vysokomolekulární formu byly spojeny a řádně promíchány. Roztok přečištěného značeného albuminu byl poté používán k dalším experimentům. Koncentrace albuminu v používaných roztocích byla ověřena BCA metodou s albuminem jako standardem.

#### **10.2.2.2 Závislost internalizace <sup>99m</sup>Tc-albuminu na čase**

Experimenty byly provedeny jak na 24jamkových platech, tak na Petriho miskách (22 cm<sup>2</sup>). OK buněčná linie byla inkubována s 50 µg/ml <sup>99m</sup>Tc-albuminu po dobu stanovených časových intervalů při teplotě 4 °C a 37 °C. Poté byla monovrstva omyta (6x) PBS a dezintegrována roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). Aktivita gama záření vzorků byla měřena pomocí automatického měřiče aktivity Wizard. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty radioaktivity slepých vzorků získané přidáním internalizačního roztoku na konci tříhodinové inkubace k do té doby nepoužitým buňkám a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného albuminu bylo vztaženo k množství buněčného proteinu (BCA, albumin jako standard).

#### **10.2.2.3 Vliv nadbytku albuminu na internalizaci <sup>99m</sup>Tc-albuminu**

Experimenty byly provedeny na 24jamkových platech. OK buněčná linie byla inkubována s 50 µg/ml FITC-albuminu s přidavkem vzrůstajícího množství neznačeného albuminu (0 mg/ml; 0,5 mg/ml; 5 mg/ml; 50 mg/ml) po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Poté byla monovrstva omyta (6x) PBS (0-4 °C) a dezintegrována roztokem 0,1% (v/v)

Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). Aktivita gama záření vzorků byla měřena pomocí automatického měřiče aktivity Wizard. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty radioaktivity slepých vzorků získaných přidáním internalizačních roztoků na konci dvouhodinové inkubace k do té doby nepoužitým buňkám a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného albuminu bylo vztaženo k množství buněčného proteinu (BCA, albumin jako standard).

## 10.3 Peptidy

Největší důraz byl kladen a nejvyšší počet pokusů byl proveden s radioaktivně značenými peptidy. Kromě zvládnutí technik radioaktivního značení a tedy přípravy těchto radiofarmak byla zkoumána internalizace na OK buněčné linii, sledován vliv radionuklidu (techniky značení) na internalizaci, porovnávána buněčná internalizace s výsledky biodistribučních studií, ale i zkoumány možnosti ovlivnění internalizace pomocí navržených substancí. Nejvíce pokusů bylo provedeno s analogem somatostatinu DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát . Kromě tohoto peptidu byla posuzována řada dalších peptidů především DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid, DTPA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotid.

### 10.3.1 DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát

#### 10.3.1.1 Příprava radioaktivně značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu

##### **Postup radioaktivního značení (<sup>125</sup>I)**

Ke značení peptidu byla použita metoda elektrofilní substituce s chloraminem T jako oxidačním činidlem.

Do Eppendorfovy zkumavky z polypropylenu o objemu 1,5 ml bylo napipetováno:

- ❖ 50 µl 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,4)
- ❖ 3 µl roztoku DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu ve vodě (1 mg/ml)
- ❖ 2 µl roztoku <sup>125</sup>I-NaI v 0,01 M NaOH 5 mCi/50µl
- ❖ 1,5 µl roztoku chloraminu T (1 mg/ml 0,05 M fosfátového pufru pH 7,4).

Směs byla míchána cca 45 – 60 s, poté bylo přidáno 40 µl metanolu a reakce byla ukončena nástřikem na HPLC kolonu.

### **Přečištění radioaktivně značeného $^{125}\text{I}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu**

Separace značeného peptidu byla prováděna za podmínek gradientové eluce na koloně Merx (10 cm). Průtoková rychlost byla 1 ml/min. Jako detektor byl použit radiometr. Mobilní fáze A byla tvořena 0,1 M NaCl, mobilní fáze B tvořil metanol. Eluční sekvence byly 0-5 min 0% B, 10-15 min 0-60% B, 15-20 min 60% B, 20-25 min 60-100% B a 25-30 min 100% B. Během analýzy byly odebírány frakce po 1 minutě, které byly následně přeměřeny na měřiči aktivity Wizard. Frakce odebírané po 20. minutě, v čase eluce značeného peptidu (hlavní pík aktivity), byly spojeny a zakoncentrovány odpařením. Zbytek po odpaření byl naředěn na přibližnou koncentraci peptidu 1 µg/ml. Čistota tohoto produktu byla ověřena využitím HPLC za stejných podmínek jako při separaci značeného peptidu.

### **Postup radioaktivního značení ( $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{177}\text{Lu}$ )**

Do Ependorfovy zkumavky z polypropylenu o objemu 1,5 ml bylo napipetováno:

- ❖ 200 µl 0,4 M acetátového pufru (pH 5,0) s 0,24 M gentisovou kyselinou
- ❖ 10 µl DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu (1 mg/1 ml H<sub>2</sub>O)
- ❖ 50 µl  $^{111}\text{InCl}_3$  v 0,04 M HCl (10 mCi/ml)/ 0,8 µl  $^{177}\text{LuCl}_3$  v 0,05 M HCl (5mCi/4µl)/ 2 µl  $^{90}\text{YCl}_3$  v 0,05 HCl (10 mCi/20 µl)

Roztok byl pečlivě protřepán a inkubován 90-95 °C po dobu 25 min.

### **Kontrola radiochemické čistoty $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu**

#### **ITLC-SG analýza**

Ke stanovení radiochemické čistoty peptidů značených  $^{111}\text{In}$  nebo  $^{177}\text{Lu}$  byla používána metoda ITLC-SG. Jako mobilní fáze byla použita směs 10% octanu amonného a metanolu v poměru 1 : 1. Detekce ITLC-SG stripů byla provedena na TLC-analyzátoru. Po zjištění radiochemické čistoty byl roztok peptidu naředěn fyziologickým roztokem na finální koncentraci 1 µg/ml.

#### **HPLC analýza**

HPLC analýza peptidů značených kovovými radionuklidy byla prováděna na koloně LichroCart 125-4, Lichrospher 100, RP-18e, 5 µm s využitím gradientové eluce. Jako



mobilní fáze A byla používána 0,1 % trifluoroctová kyselina a jako mobilní fáze B acetonitril. Časový průběh gradientu: 0-10 min 0% B, 10-20 min 0-60% B, 20-30 min 60% B, 30-35 min 60-100% B, 35-40 min 100% B a 40-45 min 100-0% B. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,5 ml/min a teplota na 25 °C. Nastříkováno bylo 10-100 μl vzorku (v závislosti na aktivitě), které byly připraveny smísením 2 μl radioaktivně značeného peptidu a 100 μl mobilní fáze A společně s 10 μl  $1 \times 10^{-3}$  M DTPA.

### 10.3.1.2 Internalizace $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{125}\text{I}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu do OK buněčné linie

Experimenty byly provedeny na Petriho miskách (22 cm<sup>2</sup>). OK buněčná linie byla inkubována v Krebs-Ringerově roztoku se značeným peptidem (1 nM) po dobu stanovených časových intervalů v inkubátoru při teplotě 37 °C v 95% atmosféře CO<sub>2</sub>. Poté byla monovrstva omyta (6x) PBS a dezintegrována roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). Aktivita radioaktivního záření vzorků byla měřena pomocí automatického měřiče aktivity Wizard. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty radioaktivity slepých vzorků získané přidáním internalizačního roztoku k do té doby nepoužitým Petriho miskám na konci nejdelšího inkubačního času a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného peptidu bylo vyjádřeno jako % přidávané dávky vztažené k množství buněčného proteinu (BCA, albumin jako standard).

### 10.3.1.3 Inhibice buněčné internalizace radioaktivně značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu

Při pokusech prováděných obdobnou metodikou popsanou v kapitole 10.3.2.2 byl sledován efekt nadbytku (desetinásobku, stonásobku, tisícinásobku) neznačeného sandostatínu (analog přirozeného somatostatínu) na internalizaci radioaktivně značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu (1nM) po dvouhodinové inkubaci při 37 °C v 95% atmosféře CO<sub>2</sub>.

Ve snaze snížit buněčnou internalizaci radioaktivně značených peptidů bylo zkoušeno několik látek vesměs z kategorie substrátů receptorového endocytického systému megalinu a cubilinu. Tyto substance byly přidány do inkubačního roztoku v koncentracích L<sub>1</sub> lysin (1 g/l), L<sub>2</sub> lysin (5 g/l), L<sub>3</sub> lysin (10 g/l), M<sub>1</sub> malát sodný (0,4 g/l), M<sub>2</sub> malát (4 g/l) sodný, G<sub>1</sub> gentamicin (10 mg/l), G<sub>2</sub> gentamicin (100 mg/l), G<sub>3</sub>

gentamicin (500 mg/l), G<sub>4</sub> gentamicin (1000 mg/l), C cytochrom C (0,5 mM), P<sub>1</sub> polymyxin B (0,1 mM=148 mg/l), P<sub>2</sub> polymyxin B (1 mM=1,48 g/l). Po dvouhodinové inkubaci byl sledován vliv těchto látek pomocí proměření internalizované buněčné radioaktivity.

Jelikož řada těchto potencionálních inhibitorů může vykazovat cytotoxický účinek a tím ovlivňovat různé buněčné procesy, tedy i transportní mechanismy, byl u většiny látek přezkoušen jejich cytotoxický účinek. Principem tzv. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) cytotoxického testu bylo spektrofotometrické měření zabarvení formazanu vznikající činností mitochondriálních dehydrogenáz z MTT.

Téměř konfluentní buňky byly inkubovány na 96-jamkové destičce po dobu tří hodin s daným inhibitorem v Krebs-Ringerově roztoku (100 µl). Po této době bylo do všech testovaných jamek přidáno 10 µl MTT (5 mg/ml) a roztoky inkubovány s tímto činidlem po dobu 4 hodin. Na závěr bylo přidáno 100 µl 10% (v/v) dodecyl sulfátu sodného (SDS) v HCl k rozpuštění purpurového formazanu. Absorbance zabarvených roztoků byla měřena na plate-readru Tecan při vlnové délce 590 nm a vyjádřena v procentech ku viabilitě slepých vzorků.

### 10.3.2 DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid (DOTA-NOC)

#### 10.3.2.1 Příprava radioaktivně značeného DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu

##### Postup radioaktivního značení <sup>90</sup>Y/<sup>111</sup>In/<sup>177</sup>Lu

Do Eendorfovy zkumavky z polypropylenu o objemu 1,5 ml bylo napipetováno:

- ❖ 200 µl 0,4 M acetátového pufru (pH 5,0) s 0,24 M gentisovou kyselinou
- ❖ 10 µl DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid (1 mg/ 1 ml H<sub>2</sub>O)
- ❖ 50 µl <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> v 0,04 M HCl (10 mCi/ml)/ 0,8 µl <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> v 0,05 M HCl (5 mCi/4µl)/ 2 µl <sup>90</sup>YCl<sub>3</sub> v 0,05 HCl (10 mCi/ 20µl)

Roztok byl pečlivě protřepán a inkubován 90-95 °C po dobu 25 min.

##### Kontrola radiochemické čistoty <sup>90</sup>Y/<sup>111</sup>In/<sup>177</sup>Lu-DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu

Kontrola radiochemické čistoty byla u tohoto peptidu značeného kovovými radionuklidy prováděna obdobně jako u DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu.

### 10.3.2.2 Internalizace $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu do OK buněčné linie

Experimenty byly provedeny na Petriho miskách (22 cm<sup>2</sup>). OK buněčná linie byla inkubována v Krebs-Ringerově roztoku se značeným peptidem (1 nM) po dobu stanovených časových intervalů v inkubátoru při teplotě 37 °C v 95% atmosféra CO<sub>2</sub>. Poté byla monovrstva omyta (6x) PBS a dezintegrována roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). Aktivita gama záření vzorků byla měřena pomocí automatického měřiče aktivity Wizard. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty radioaktivity slepých vzorků, získaných přidáním internalizačního roztoku k do té doby nepoužitým Petriho miskám na konci nejdelšího inkubačního času a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného peptidu bylo vyjádřeno jako % přidávané dávky vztažené k množství buněčného proteinu (BCA, albumin jako standard).

### 10.3.2.3 Inhibice buněčné internalizace DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu

Při pokusech prováděných obdobnou metodikou popsanou v kapitole 10.3.1.2 byl sledován efekt nadbytku (desetinásobku, stonásobku, tisícinásobku) neznačeného sandostatínu (analog přirozeného somatostatínu) na internalizaci radioaktivně značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu (1 nM) po dvouhodinové inkubaci při 37 °C v 95% atmosféra CO<sub>2</sub>.

### 10.3.3 Porovnání internalizace zkoumaných peptidů radioaktivně značených $^{111}\text{In}$

Podobným způsobem jako u peptidů DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu a DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu zmíněných v kapitolách 10.3.1.2 10.3.2.2 byla stanovena závislost buněčné internalizace na čase pro DTPA-oktreotid, který byl získán z pracoviště Nukleární medicíny FN HK.

### 10.3.4 *In vivo* biodistribuce radioaktivně značených peptidů do ledvin potkanů

Biodistribuční a eliminační studie byly prováděny pracovníky oddělení radiofarmak katedry farmakologie a toxikologie Faf UK na potkaních samcích (kmen Wistar), jejichž hmotnost byla v rozmezí 190 – 240 g. Při biodistribučních experimentech potkaní samci neměli přístup k potravě. Před aplikací radioaktivně značené látky byli

potkani uvedeni do etherové anestezie a po té jim byla intravenózně podána značená látka (0,2 ml;  $c'_{\text{pept}} = 1 \mu\text{g/ml}$ ). V průběhu experimentů byla zvířata umístěna jednotlivě do metabolických klecí, které umožňují oddělený sběr moči a stolice.

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

## 10.4 Protilátky

K posouzení internalizačních parametrů monoklonálních protilátek byly použity dva druhy značené protilátky BW 250/183. První typ protilátky je komerčně využívaný přípravek určený ke značení  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Druhá protilátka byla dodána firmou Azacycles s.r.o., která je navrhovatelem příslušných konjugátů protilátky s chelátory.

### 10.4.1 $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AntiCD66

#### 10.4.1.1 Příprava $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ -AntiCD66 $a,b,c,e$ -( $p$ -NHCSNH- $\text{PhCH}_2\text{PO}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-DO3A}$ ) $_{2,3}$ protilátky

##### **Postup radioaktivního značení ( $^{111}\text{In}$ )**

Do Ependorfovy zkumavky z polypropylenu o objemu 1,5 ml bylo napipetováno:

- ❖ 125  $\mu\text{l}$  0,5 M acetátového pufru (pH = 6,5)
- ❖ 100  $\mu\text{l}$  *antiCD66 a,b,c,e*-( $p$ -NHCSNH- $\text{PhCH}_2\text{PO}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-DO3A}$ ) $_{2,3}$  (3 mg/ml)
- ❖ 50  $\mu\text{l}$  roztoku  $^{111}\text{In-InCl}_3$  v 0,04 M HCl.

Směs byla inkubována po dobu 60 minut na 35 °C.

##### **Postup radioaktivního značení ( $^{90}\text{Y}$ )**

Do Ependorfovy zkumavky z polypropylenu o objemu 1,5 ml bylo napipetováno:

- ❖ 100  $\mu\text{l}$  0,5 M acetátového pufru (pH = 6,5)
- ❖ 100  $\mu\text{l}$  *antiCD66 a,b,c,e*-( $p$ -NHCSNH- $\text{PhCH}_2\text{PO}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-DO3A}$ ) $_{2,3}$  (3 mg/ml)
- ❖ 1  $\mu\text{l}$  roztoku  $^{90}\text{Y-YCl}_3$  v 0,05 M HCl

Směs byla inkubována po dobu 60 minut na 35 °C.

### **Přečištění radioaktivně značené ( $^{111}\text{In}$ , $^{90}\text{Y}$ ) protilátky**

Ke značené protilátce bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku  $10^{-3}\text{M}$  EDTA. Směs byla nanášena na kolonu (28 x 1cm) naplněnou Sephadexem G-50 předem naloženém v superčisté  $\text{H}_2\text{O}$ . Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,9% (m/v) NaCl. Prvních 6 ml bylo odebíráno do odměrného válce a následně byly sbírány frakce po cca 1ml. Z každé frakce byly odebrány 2  $\mu\text{l}$  a z jejich změřené aktivity byl zpracován eluční profil. Frakce obsahující vysokomolekulární formu (frakce č. 9-11) byly spojeny a řádně promíchány. Roztok přečištěné značené protilátky byl poté používán k dalším experimentům.

#### **10.4.1.2 Příprava $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AntiCD66 (Scintimum®)**

### **Postup radioaktivního značení $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -albuminu**

Obsah lahvičky 2 (propantetrafosfonát sodný dihydrát 2,7 mg, chlorid cínatý dihydrát 0,12 mg, chlorid sodný 0,2 mg) byl rozpuštěn v 5 ml fyziologickém roztoku. Po úplném rozpuštění obsahu lahvičky 2 byl 1 ml tohoto roztoku přidán do lahvičky 1 (monoklonální protilátka 1,0 mg, bezvodý fosforečnan sodný 2,0 mg, sorbitol 2,0 mg). Po 1 minutě byly přidány 2 ml technecistanu ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) sodného získaného z  $^{99}\text{Tc}$ -generátoru. S roztokem během přípravy nebylo třepáno.

### **Stanovení radiochemické čistoty**

Kontrola kvality značení (radiochemická čistota) byla zkoušena podle příbalového informačního letáku (SPC) pomocí metody tenkovrstvé chromatografie (ITLC-SG). ITLC stripy (Gelman SG) s naneseným vzorkem byly vyvíjeny směsí metanol a voda v poměru 8:2.

#### **10.4.1.3 Internalizace $^{90}\text{Y}/^{99\text{m}}\text{Tc}/^{111}\text{In}$ -AntiCD66**

Experimenty byly provedeny na Petriho miskách (22  $\text{cm}^2$ ). OK buněčná linie byla inkubována v Krebs-Ringerově roztoku se radioaktivně značenou protilátkou 0,5  $\mu\text{g/ml}$  po dobu stanovených časových intervalů v inkubátoru při teplotě 37 °C v 95% atmosféře  $\text{CO}_2$ . Poté byla monovrstva omyta (6x) PBS (0-4 °C) a dezintegrována roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4). Aktivita gama

záření vzorků byla měřena pomocí automatického měřiče aktivity Wizard. Od naměřených hodnot byly odečteny hodnoty radioaktivity slepých vzorků získané přidáním internalizačního roztoku k do té doby nepoužitým Petriho miskám na konci nejdelšího inkubačního času a okamžitým odsátím a omytím společně s ostatními jamkami. Výsledné množství internalizovaného peptidu bylo vyjádřeno jako % přidané dávky vztažené k množství buněčného proteinu Petriho misek (BCA, albumin jako standard).

Ve snaze ovlivnit buněčnou internalizaci radioaktivně značených peptidů byly zkoušeny dvě látky z kategorie potenciálních inhibitorů receptorového endocytického systému receptorových proteinů megalinu a cubilinu. Tyto substance byly přidány do inkubačního roztoku v koncentracích L<sub>1</sub> lysin (1 g/l), L<sub>3</sub> lysin (10 g/l), G<sub>1</sub> gentamicin (10 mg/l), G<sub>2</sub> gentamicin (100 mg/l), G<sub>3</sub> gentamicin (500 mg/l) a G<sub>4</sub> gentamicin (1000 mg/l). Po dvouhodinové inkubaci byl sledován vliv těchto látek pomocí proměření internalizované buněčné radioaktivity.

# 11 Výsledky

Tato kapitola obsahující výsledky je členěna podle studovaných látek, jejichž hlavní charakteristiky byly popsány v podkapitole 9.2. Výsledky zahrnují jak vyhodnocení radioaktivního značení (v případě, že jde o radioaktivně značené substance), tak stěžejní výsledky dosažené *in vitro* na buněčné linii, případně jejich porovnání s *in vivo* výsledky získanými pokusy na potkanech. Pro snadnou orientaci je členění této kapitoly přizpůsobeno předchozí kapitole (10.) a jejím podkapitolám popisujících metodiku a postup práce.

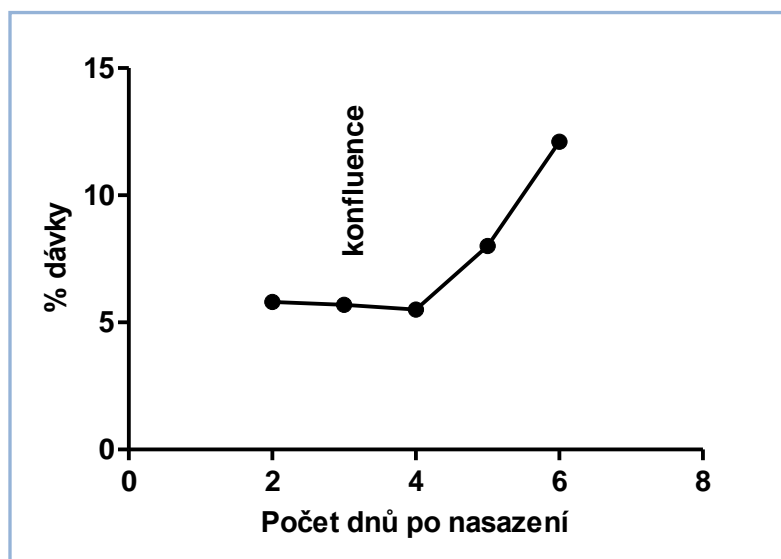
## 11.1 OK buněčná linie

### 11.1.1 Optimalizace experimentálních podmínek

Z důvodu standardizace metody byly provedeny počáteční experimenty, které měly za cíl ověřit publikovaná data týkající se internalizačních pokusů na OK buněčné linii. Na základě získaných výsledků byly navrženy obecné postupy kultivace OK buněk a pokusů na nich prováděných. Příkladem těchto pokusů byly pokusy studující podmínky kultivace OK buněčné linie (10.1.1). Za standardizační lze obecně považovat také výsledky dalších pokusů provedených s albuminem, které jsou uvedeny v následující kapitole (11.2).

#### 11.1.1.1 Standardizace podmínek z hlediska přípravy buněk

**Obrázek 29 Stanovení optimálního stavu buněk – závislost internalizace FITC-albuminu na počtu na dní od nasazení.**

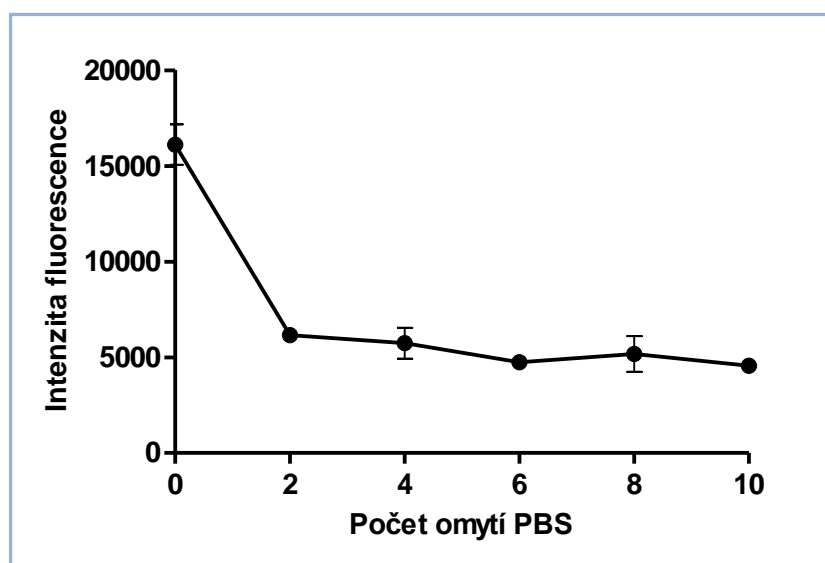


Pro stanovení optimálního načasování experimentu po nasazení buněk na plata/Petriho misky byl měřen uptake FITC-albuminu v závislosti na čase od nasazení. Přibližná hustota nasazovaných buněk byla 20 tis/cm<sup>2</sup>. U subkonfluentních buněk (do 4. dne po nasazení) se uptake FITC-albuminu vyjádřený jako % dávky přidané k buňkám jevil jako konstantní. U konfluentních buněk (od 4. dne od nasazení) došlo ke zvýšení uptake na víc jak dvojnásobek. Morfologie buněk po 6. dni od nasazení se již vyznačovala přerůstáním buněk přes sebe a proto byl stanoven limit pro provádění pokusů na 2 dny po pozorované konfluenci nasazených buněk. Modelový pokus vystihuje obrázek 29.

### 11.1.1.2 Stanovení optimálního postupu ukončení experimentu

Ukončení internalizace zkoumaných látek bylo modelováno na příkladu uptake FITC-albuminu. Byla sledována závislost intenzity fluorescence na počtu omytí buněk (obrázek 30). Také tento pokus měl ověřit metodiku popsanou v literatuře. Na základě tohoto pokusu byl stanoven počet šesti omytí PBS (0-4 °C) jako optimální pro ukončení prováděných experimentů. Po zlyzování a změření intenzity fluorescence odpovídající internalizovanému množství albuminu byla přeměřena koncentrace proteinů. Bylo zjištěno, že každé omytí buněčné monovrstvy je spojeno s částečným odlučováním buněk a tedy snížením koncentrace buněčných proteinů (výsledky neuvedeny) a je tedy nutné užít jemné techniky a identických pomínek pro všechny testovací jamky (misky).

Obrázek 30 Optimální ukončení experimentů – závislost intenzity fluorescence FITC-albuminu na počtu omytí.





### **Pasážování OK buněčné linie**

Renální OK buněčná linie byla kultivována v plastových kultivačních 75 cm<sup>2</sup> lahvích v médiu MEM doplněném 2 mM L-glutaminu, 1% NEAA a 10% FCS v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře při 37 °C. Z 90% konfluentní monovrstva byla dvakrát týdně pasážována v poměru 1:6 s použitím roztoku trypsinu.

### **Experimenty na OK buněčné linii**

Experimenty byly prováděny v případě albuminu na 24jamkových kultivačních platech, nebo Petriho miskách (cca 22 cm<sup>2</sup>), a to v případě albuminu a ostatních zkoumaných látek. Buňky (pasáž číslo 55-75) byly nasazovány v počtu 10-20 tis/cm<sup>2</sup>. Pokusy byly prováděny den až dva po pozorované konfluenci buněčné monovrstvy. Do dosažení tohoto stavu bylo buňkám každý druhý den měněno kultivační médium. Před experimentem byly buňky (2x) omyty roztokem PBS a inkubovány po stanovenou dobu s inkubačním médiem. V případě časových závislostí byla inkubace prováděna od nejdelších časových intervalů k nejkratším tak, aby následné omývání PBS (0-4 °C) (6x) bylo prováděno u všech jamek/ Petriho misek najednou. Všechny plata i Petriho misky byly umístěny na dostatečně velké manipulaci umožňující ploše tak, aby byly vystaveny stejným podmínkám omývání. Buněčné monovrstvy byly následně dezintegrovány roztokem 0,1% (v/v) Tritonu X-100 v hypotonickém MOPS pufru (10 mM, pH = 7,4), byly stanovena koncentrace proteinů všech vzorků BCA metodou a změřena intenzita fluorescence/ radioaktivity.

## 11.2 Albumin

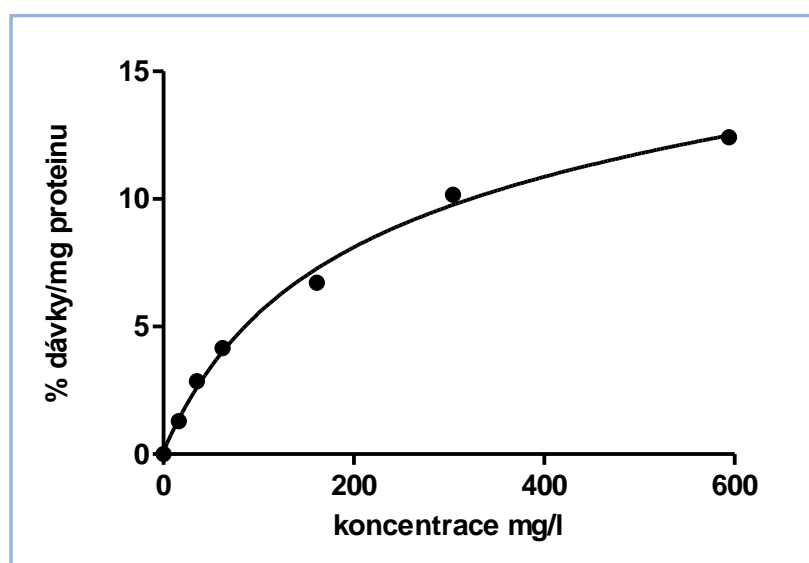
Ke standardizaci metodiky provádění experimentů na OK buněčné linii byly použity dva druhy značeného albuminu - jak fluorescenčně, tak radioaktivně značený. Pokusy s druhým jmenovaným typem albuminu simulovaly metodiku pro provádění pokusů s radioaktivně značenými látkami - radioaktivně značenými peptidy a protilátkami, jimž předcházelo radioaktivní značení a analýza radiochemické čistoty.

### 11.2.1 FITC-albumin

#### 11.2.1.1 Závislost internalizace na koncentraci FITC-albuminu

Na základě výsledků pokusů zkoumající závislost vlivu stoupající koncentrace na internalizaci FITC-albuminu lze kinetiku uptake označit jako saturační typ kinetiky. Saturabilnost transportních mechanismů v iniciační fázi internalizace lze dokumentovat (obrázek 31) především při vyšších testovaných koncentracích FITC-albuminu.

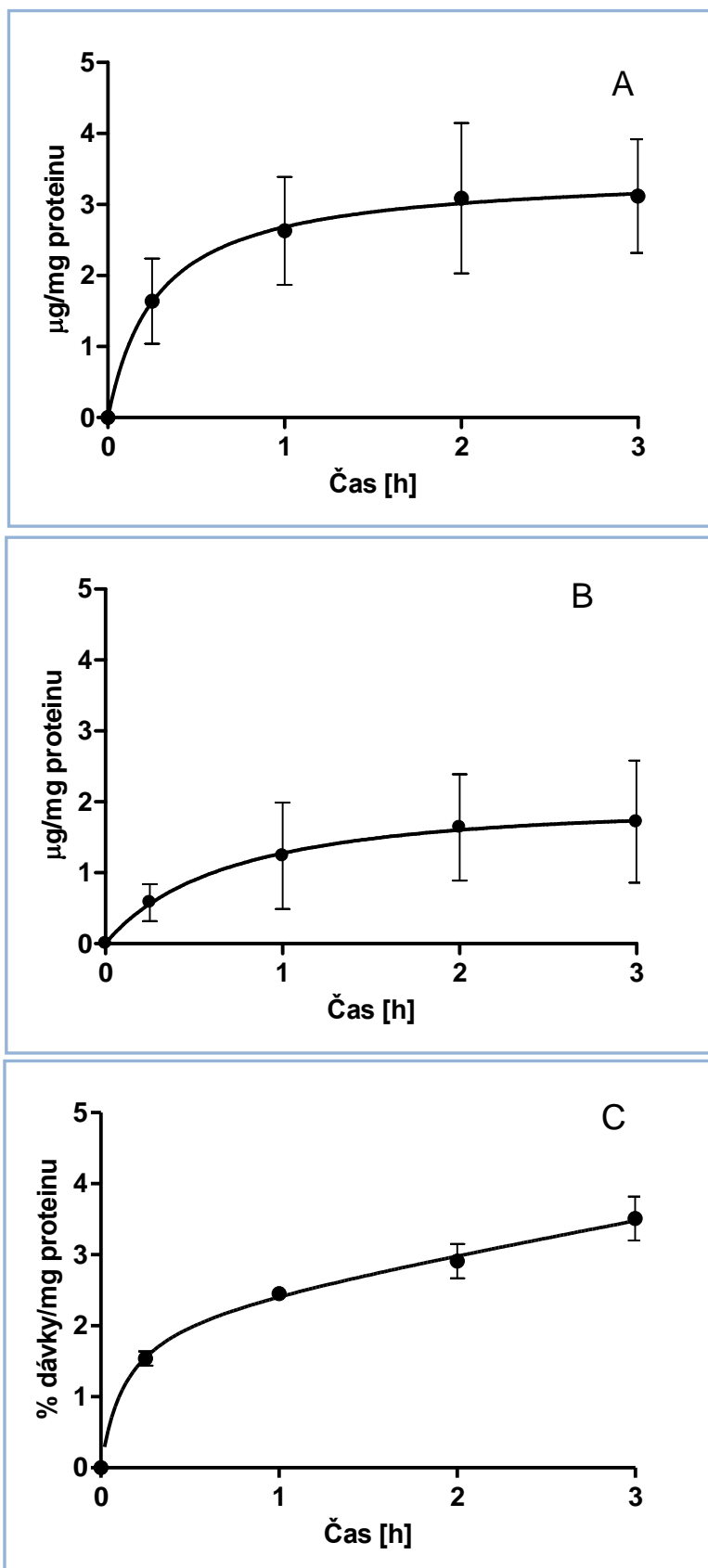
Obrázek 31 Závislost internalizace FITC-albuminu na zvyšující se koncentraci FITC-albuminu.



#### 11.2.1.2 Závislost internalizace FITC-albuminu na čase

Saturační typ kinetiky lze vyčíst i ze závislosti uptake FITC-albuminu na čase. Velikost fluorescence roste lineárně po dobu prvních 30 minut, pak zpomaluje a dosahuje maxima po 1 hodině inkubace (obrázek 32). Zbývající čas, kdy se fluorescence odpovídající množství internalizovaného albuminu nezvyšuje, lze označit jako stav plateau. Míra internalizace probíhajících procesů je snížena při provedení pokusu za snížené teploty.

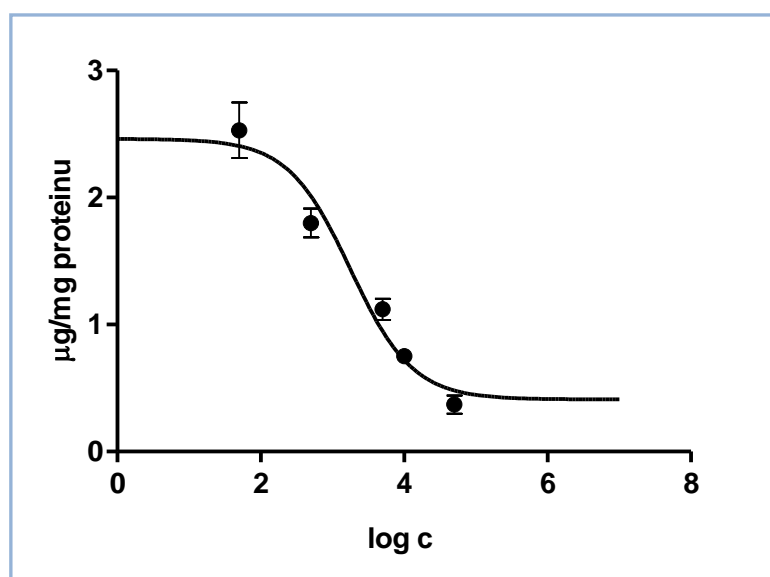
Obrázek 32 Závislost internalizace FITC-albuminu na čase: A – Internalizace při teplotě 37 °C vyjádřená v  $\mu\text{g}/\text{mg}$  buněčného proteinu ( $n=5$ ); B – Internalizace při teplotě 0-4°C vyjádřená  $\mu\text{g}/\text{mg}$  buněčného proteinu ( $n=3$ ); C Internalizace při teplotě 37 °C prováděná na Petriho miskách vyjádřená v % celkové dávky/mg buněčného proteinu ( $n=2$ ).



### 11.2.1.3 Vliv nadbytku albuminu na internalizaci FITC-albuminu

K ověření specifity internalizace byl vyzkoušen vliv 4 koncentrací neznačeného albuminu přidaného k fixní koncentraci FITC-albuminu (50  $\mu\text{g/ml}$ ). Obrázek 33 graficky vyjadřuje schopnost kompetice neznačeného albuminu a FITC-albuminu o vazebná místa a transportní mechanismy.  $\text{IC}_{50}$ , tedy koncentrace kompetitivního agonisty pro tento

Obrázek 33 Vliv nadbytku albuminu na internalizaci FITC-albuminu (n=2).

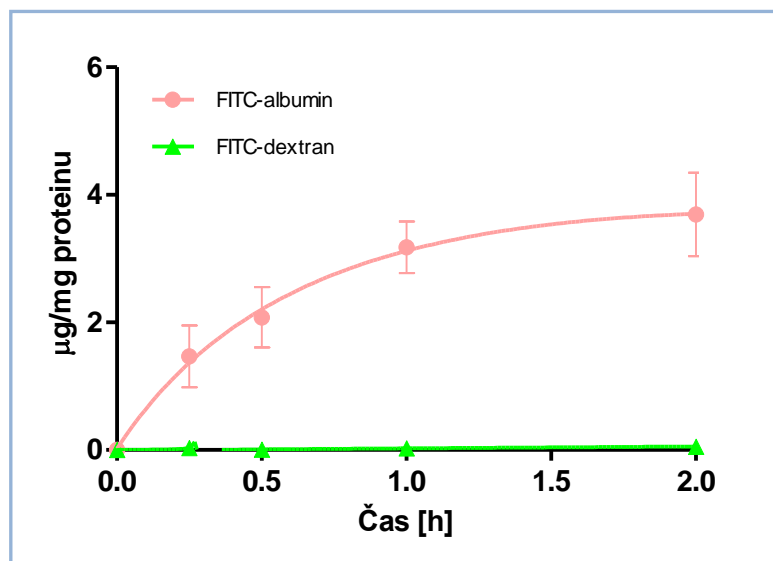


pokus byla zjištěna pomocí statistického vyhodnocení programu GraphPad Prism 1782  $\mu\text{g/ml}$ . Při zkoumané koncentraci FITC-albuminu byla inhibice nekompletní. Jelikož je ovšem v literatuře považován tisícnásobek dávky za marker nespecifické vazby, lze považovat výsledek dosažený v tomto případě za internalizaci nespecifickou.

### 11.2.1.4 Porovnání internalizace FITC-albuminu a FITC-dextranu

Obrázek 34 zobrazuje porovnání internalizace FITC-albuminu a FITC-dextranu. Při stejné počáteční koncentraci při sledování závislosti internalizovaného množství obou zkoumaných látek na čase bylo dosaženo podstatně rozdílných výsledků pro tyto dvě látky. Z těchto výsledků lze usuzovat na jejich odlišný mechanismus transportu do nitra buněk. Zatímco FITC-albumin je substrátem receptorově zprostředkovaného endocytického transportu (megalin a cubilin), FITC-dextran je považován za substrát druhého typu endocytózy označovaný jako „fluid-phase endocytosis“.

Obrázek 34 Porovnání internalizace FITC-albuminu a FITC-dextranu (n=2).



## 11.2.2 $^{99m}\text{Tc}$ -albumin

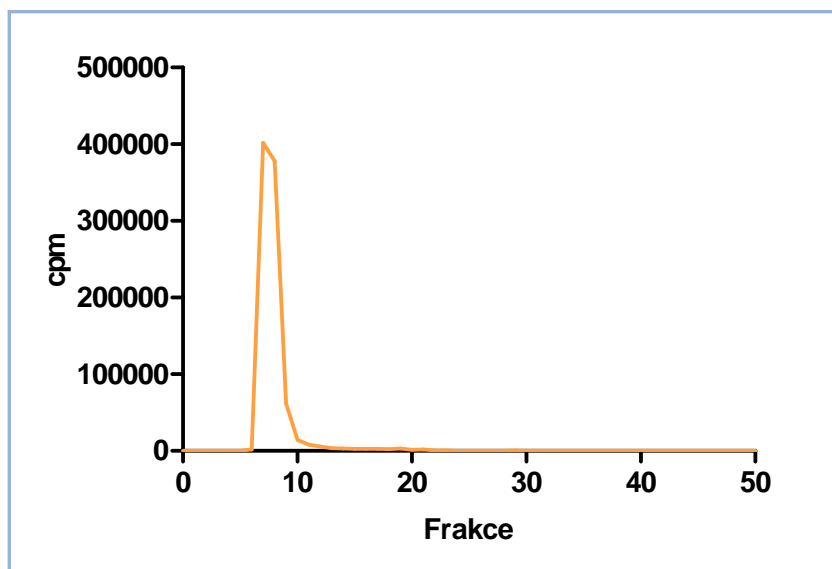
Jako doplněk standardizačních pokusů bylo provedeno několik experimentů s albuminem značeným  $^{99m}\text{Tc}$ . Samotným pokusům předcházelo radioaktivní značení albuminu tímto diagnostickým radioizotopem.

### 11.2.2.1 Příprava $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu

Příprava  $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu byla odvozena z literatury. Značení probíhalo v kyselém prostředí, kdy došlo k dočasnému přeuspořádání struktury albuminu, navázání zredukované formy  $^{99m}\text{Tc}$  (oxidační stupeň +4) a následné restrukturalizaci albuminové struktury zvýšením pH reakční soustavy.

Albumin byl přečištěn metodou gelově permeační chromatografie (obrázek 35). Frakce obsahující vysokomolekulární formu  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin byly spojeny a řádně promíchány. Volný neredukovaný technecistan nebyl v žádném připravovaném vzorku detekován (žádný analyzovaný pík v oblasti kolem 35-40. frakce odpovídající 35-40 ml), což potvrzuje spolehlivost metody přípravy  $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu popsané v literatuře.

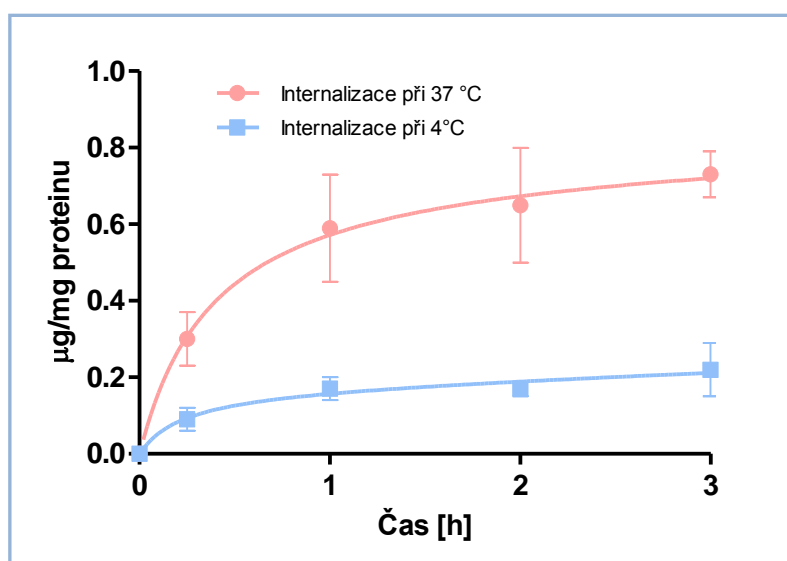
Obrázek 35 Eluční profil  $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu při přečištění gelově permeační chromatografií.



### 11.2.2.2 Závislost internalizace $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu na čase

U albuminu značeného techneciem-99m byla sledována závislost internalizace na čase jako u fluorescenčně značeného albuminu (FITC-albuminu). V případě této radioaktivní sloučeniny bylo dosaženo podobných závislostí jak v experimentech prováděných při 37 °C, tak při 4 °C. Pokles hodnot internalizovaného množství  $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu v daných časových intervalech oproti FITC-albuminu lze vysvětlit vlivem podmínek přípravy, kde hlavně široké rozmezí využívaného pH pro značení albuminu  $^{99m}\text{Tc}$  mohlo pozměnit strukturu albuminu a tím i negativně ovlivnit vazebnou afinitu k vazebným receptorovým strukturám.

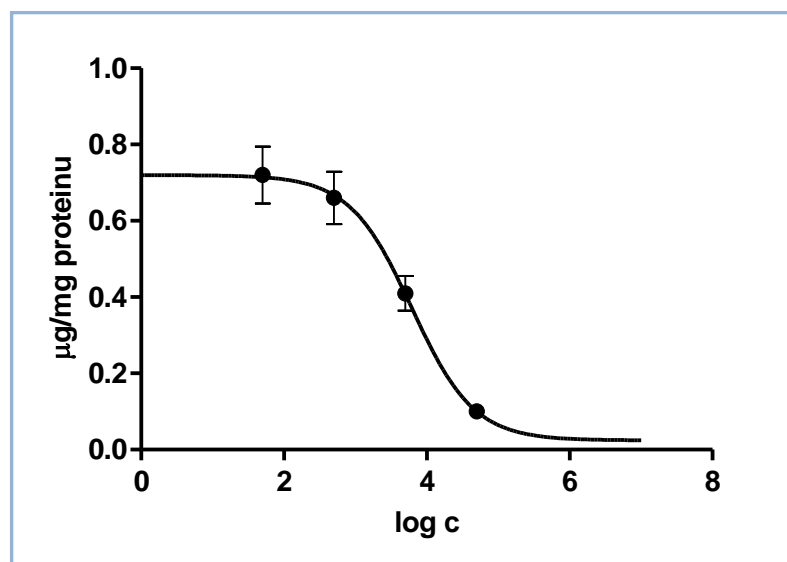
Obrázek 36 Závislost internalizace  $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu na čase (měřeno při 4 °C a 37 °C) (n=3).



### 11.2.2.3 Vliv nadbytku albuminu na internalizaci $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu

Podobně jako u FITC-albuminu má na internalizaci  $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu do OK buněk vliv nadbytek neznačeného albuminu (obrázek 37). Inhibiční konstanta  $\text{IC}_{50}$  pro výše zmíněné podmínky experimentu byla stanovena na 6150  $\mu\text{g/ml}$ .

Obrázek 37 Vliv nadbytku albuminu na internalizaci  $^{99m}\text{Tc}$ -albuminu (n=2).



## 11.3 Peptidy

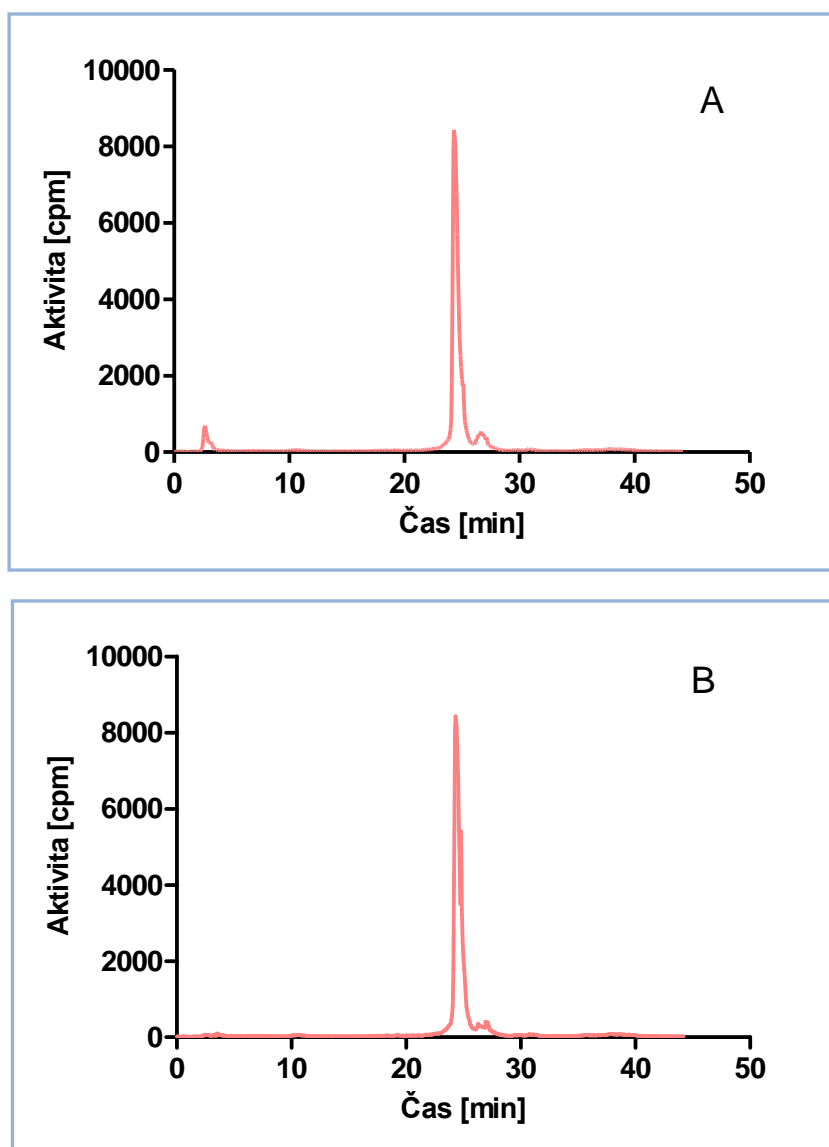
Všechny připravené radioaktivně značené peptidy byly připraveny s vysokou radiochemickou čistotou, která byla ve všech případech vyšší než 98 %. K ověření radiochemické čistoty byla použita metoda HPLC analýzy, pro její rychlé stanovení u peptidů značených kovovými radionuklidy ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) byla použita ITLC-SG analýza. U všech peptidů značených zvolenými radionuklidy byla sledována závislost internalizace daného peptidu na čase. Standardizační pokusy obdobné těm s albuminem byly provedeny s analogem somatostatinu DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátem. Tento peptid byl zvolen pro své standardní vlastnosti i jako substrát, jehož internalizace měla být inhibována pomocí navržených látek.

## 11.3.1 DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktretát (DOTA-TATE)

### 11.3.1.1 Příprava radioaktivně značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktretátu

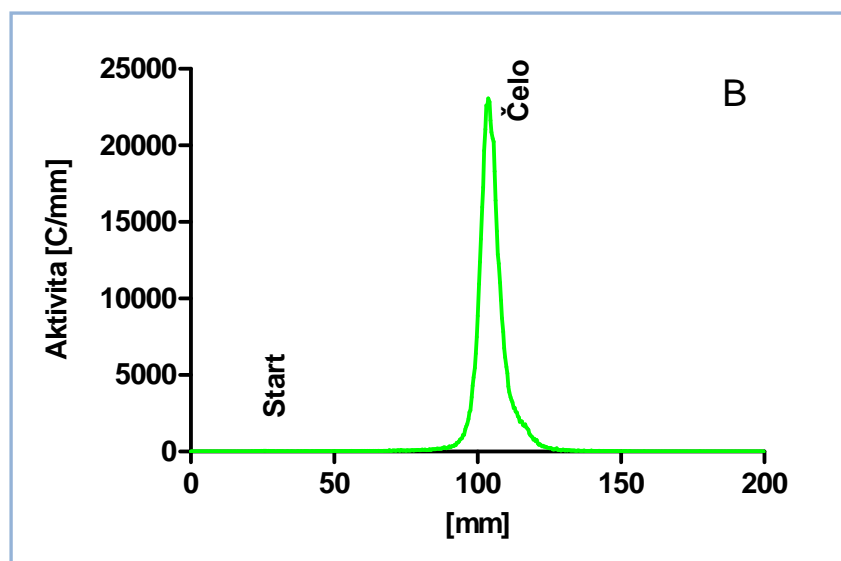
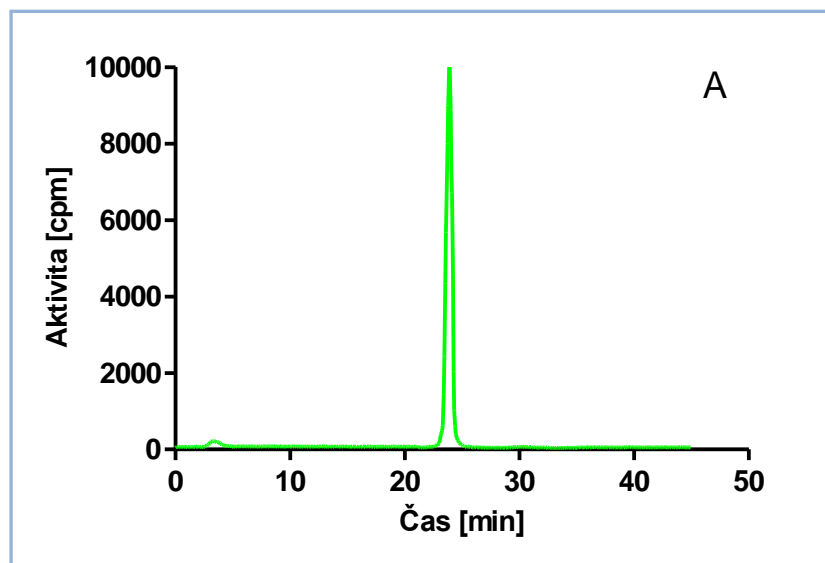
DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktretát, ať už značený kovovými radionuklidy (<sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu) nebo jódem (<sup>125</sup>I), byl připraven s vysokou radiochemickou čistotou, která byla stanovována pomocí metod HPLC nebo pomocí časově a pracně méně náročné metody ITLC-SG (obrázky 38-41). K biologickým pokusům byly použity pouze peptidy, které splňovaly kritérium radiochemické čistoty  $\geq 98\%$ . Stabilita a metodika značení DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktretátu byla stanovena ve spolupráci s Katedrou biofyziky a fyzikální chemie FaF UK. Stabilitními testy bylo dokázáno, že tyto peptidy jsou dostatečně stabilní pro provádění zamýšlených *in-vitro* a *in vivo* experimentů<sup>141</sup>.

Obrázek 38 HPLC profil <sup>125</sup>I-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktretátu ihned po přípravě (A) a po přečištění (B).

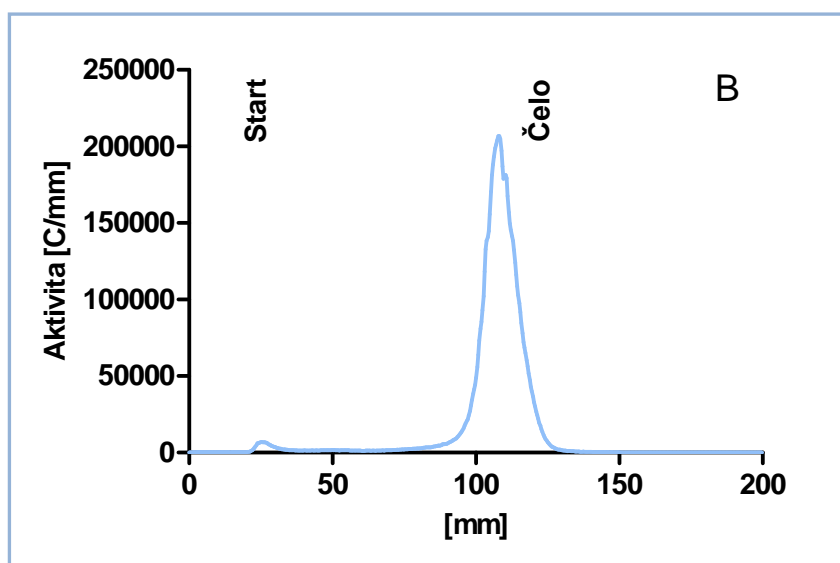
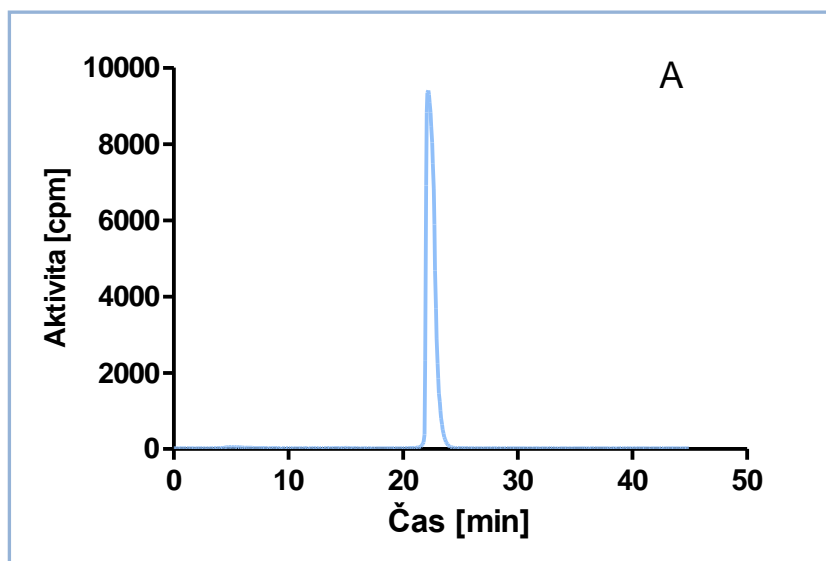




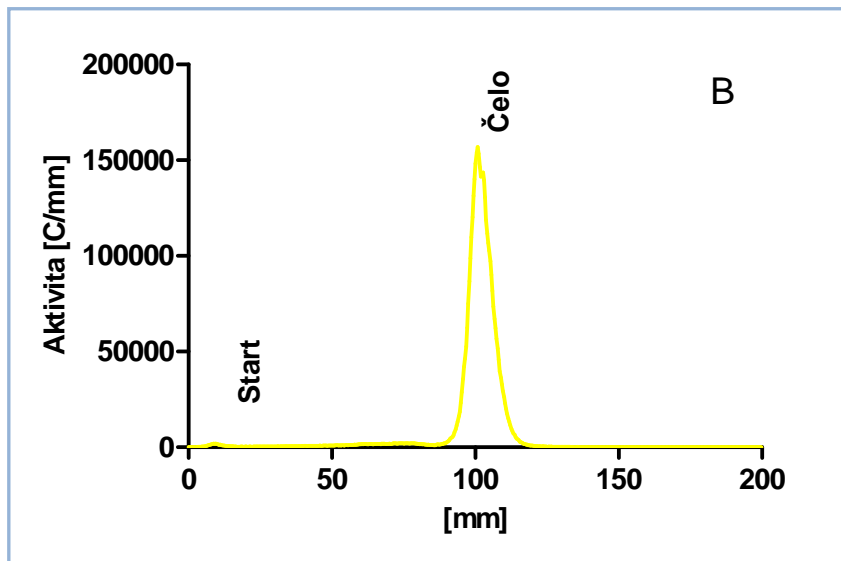
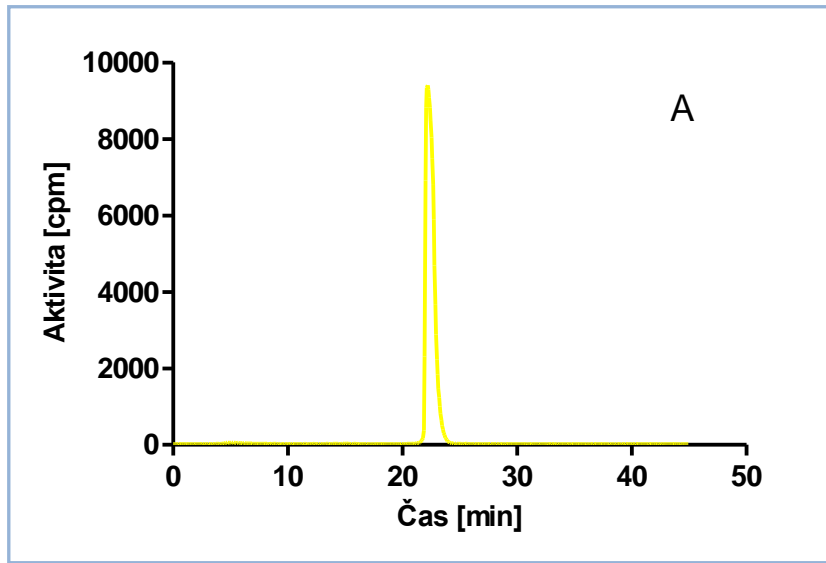
Obrázek 39 Příklad HPLC (A) a ITLC-SG (B) profilů analýzy  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu.



Obrázek 40 Příklad HPLC (A) a ITLC-SG (B) profilů analýzy  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu.



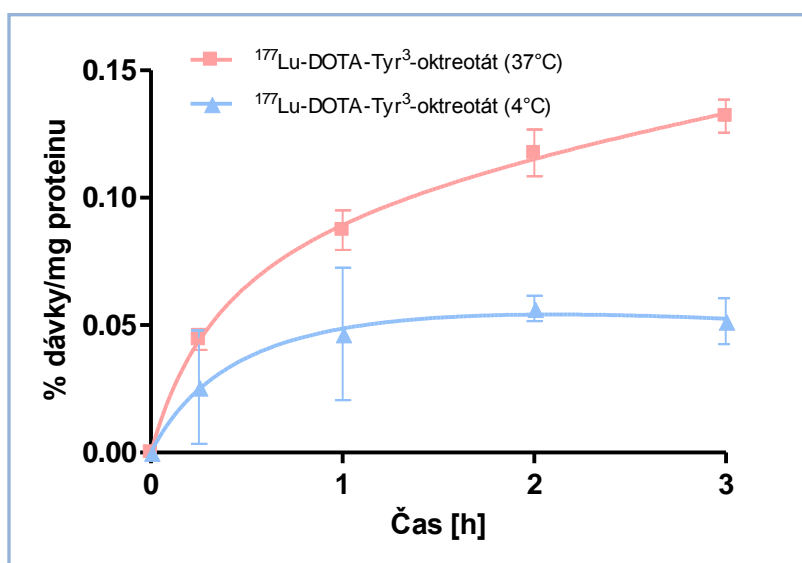
Obrázek 41 Příklad HPLC (A) a ITLC-SG (B) profilů analýzy  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu.



### 11.3.1.2 Internalizace $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{125}\text{I}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu do OK buněčné linie

Ze studia buněčné internalizace DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu do OK buněčné linie bylo zjištěno, že podobně jako u albuminu je internalizace tohoto peptidu závislá na několika fyzikálních faktorech. Snížená teplota (4 °C) snižuje aktivitu transportních mechanismů tak, že množství internalizované po dvouhodinové inkubaci je zhruba poloviční oproti inkubaci probíhající při 37 °C (obrázek 42).

Obrázek 42 Příklad závislosti internalizace značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu (1nM) na teplotě (n=2).

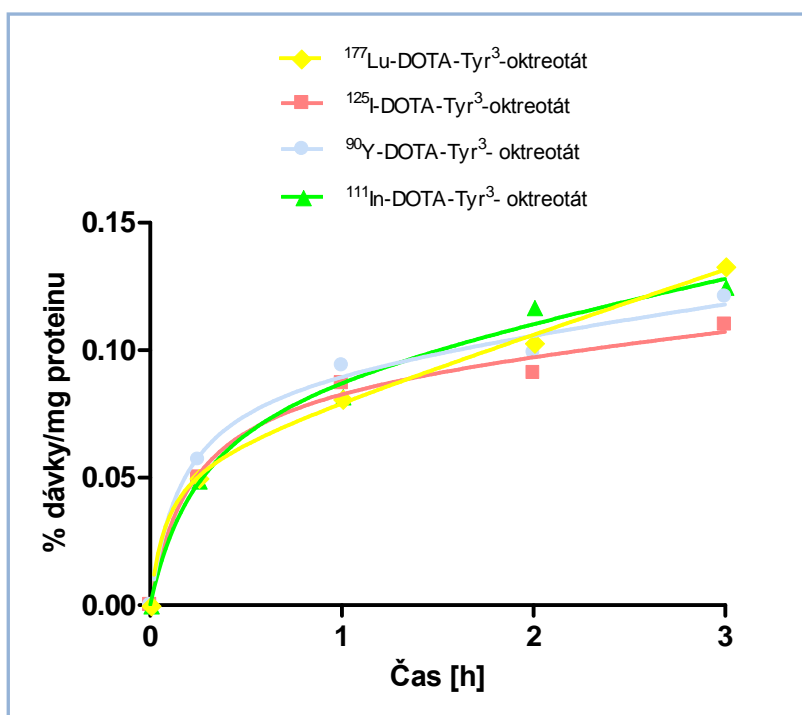


Pokusy studující závislost internalizace značených peptidů na době inkubace prokázaly saturabilnost transportních mechanismů, kdy po 1 h inkubace dochází k oploštění zprvu strmě stoupající křivky grafického znázornění (obrázek 43) těchto výsledků (tabulka 10).

Tabulka 10 Závislost internalizace značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu (1nM) na čase. Výsledky vyjádřeny jako % z celkové dávky vztažené na mg buněčného proteinu. N = 2 ( $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát), n = 3 ( $^{125}\text{I}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát), n = 5 ( $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát).

čas [h]	$^{125}\text{I}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát		$^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát		$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát		$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,25	0,050	0,004	0,049	0,026	0,057	0,023	0,05	0,017
1	0,087	0,008	0,082	0,027	0,094	0,012	0,081	0,026
2	0,091	0,012	0,117	0,037	0,099	0,006	0,103	0,040
3	0,110	0,004	0,125	0,028	0,121	0,016	0,133	0,053

Obrázek 43 Závislost internalizace značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu (1nM) na čase.

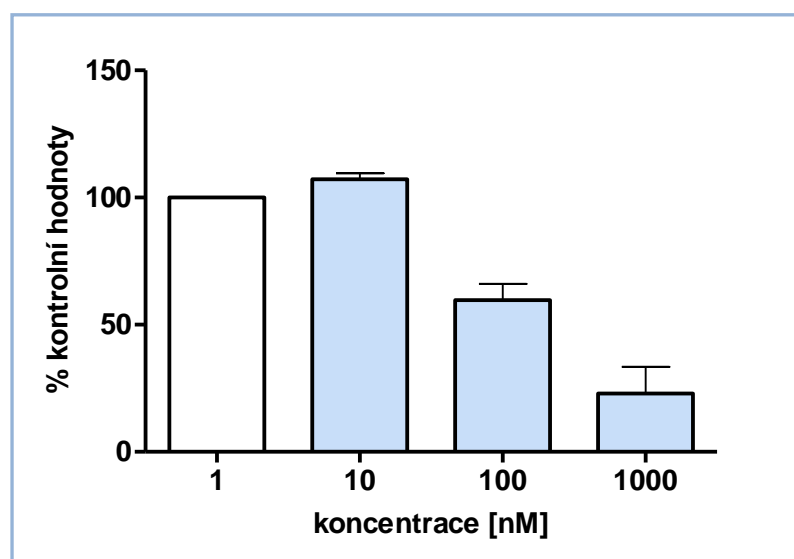


Ze stejného grafu také vyplývá, že technika značení ani žádný konkrétní radionuklid neovlivňuje transportní proces takovým způsobem, že by se internalizace peptidu značeného různými radionuklidy výrazně odlišovaly.

### 11.3.1.3 Inhibice buněčné internalizace radioaktivně značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu

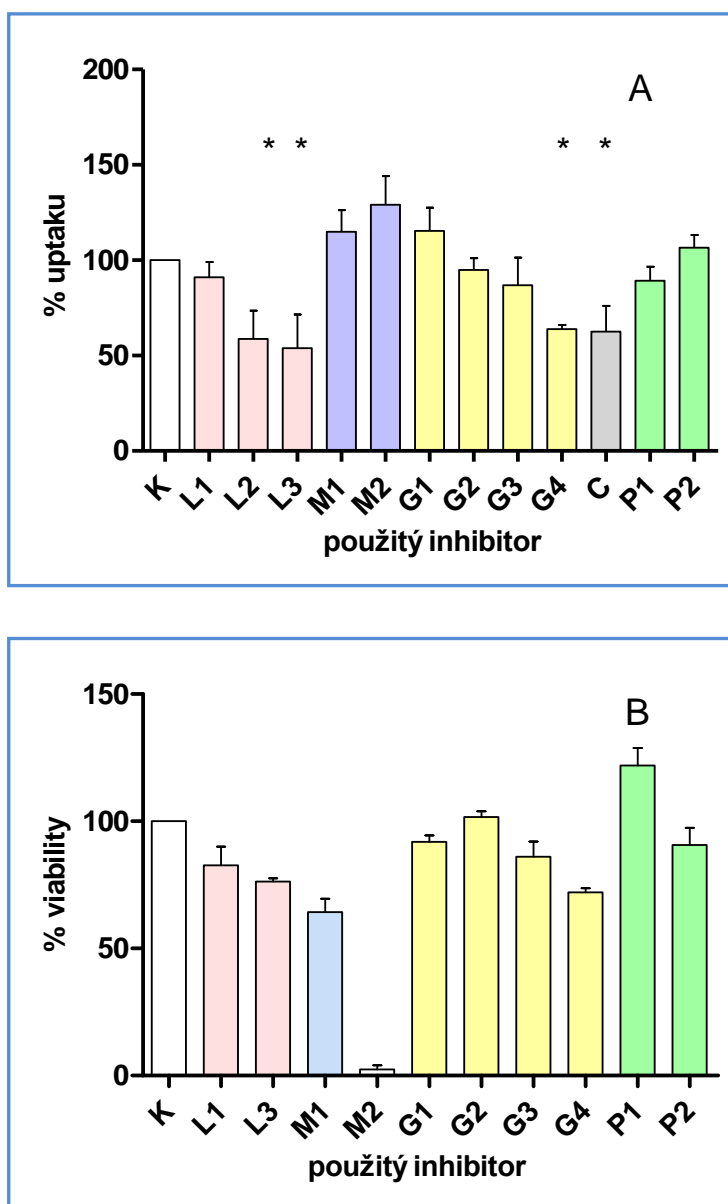
Efekt nadbytku neznačeného sandostatinu (analog přirozeného somatostatinu) na

Obrázek 44 Vliv nadbytku sandostatinu na internalizaci <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu (n=3).



internalizaci radioaktivně značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu je znázorněn na obrázku 44. Tento graf demonstruje skutečnost, že neznačený tetradekapeptid významně ovlivňuje internalizaci <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu do OK buněk (patrně kompeticí o transportní mechanismy) projevující se při tisícinásobném násobku neznačeného somatostatinu (Sandostatin<sup>®</sup>) snížením míry internalizace po dvouhodinové inkubaci na 22,9 ± 10,5 %.

**Obrázek 45 A - Závislost uptake 1nM <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-okterotidu na použitém inhibitoru; B - cytotoxicita použitého inhibitoru.**



K kontrola , L1 L-lysin (1g/l), L2 L-lysin (5g/l), L3 L-lysin (10g/l), M1 malát sodný (0,4 g/l), M2 malát (4g/l) sodný, G1 gentamicin (10mg/l), G2 gentamicin (100mg/l), G3 gentamicin (500mg/l), G4 gentamicin (1000mg/l), C cytochrom C (0,5mM , P1 polymyxin B (0,1mM=148mg/l) , P2 polymyxin B (1mM=1,48g/l). A/ n = 3 \* (p< 0,05) (Graph Pad Software, nepárový Studentův t-test). B/ n = 2

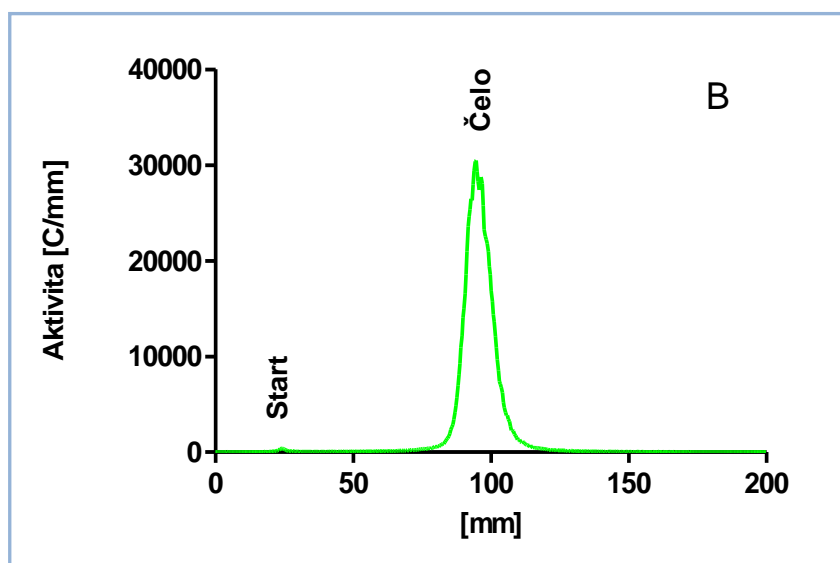
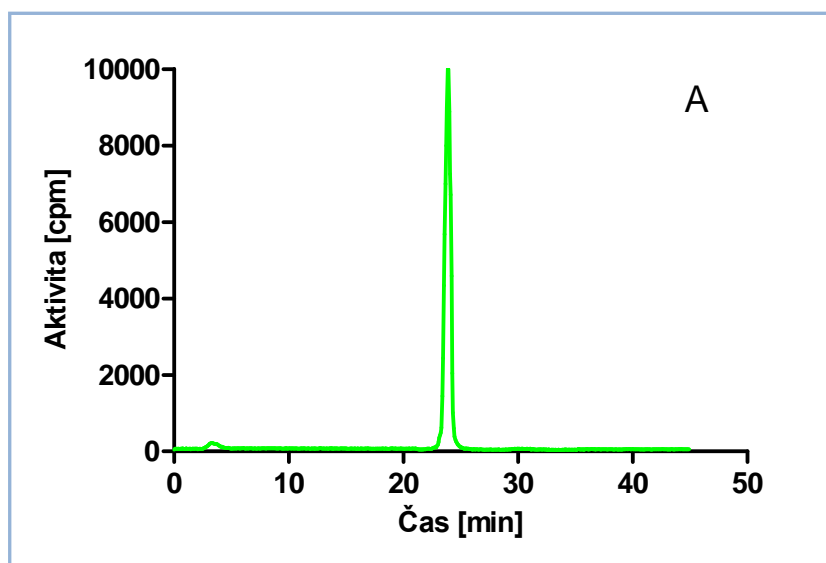
Ve snaze potlačit buněčnou internalizaci radioaktivně značených peptidů bylo testováno několik látek vesměs z kategorie substrátů receptorového endocytického systému receptorových proteinů megalinu a cubilinu. Efekt těchto látek na buněčný uptake peptidů, jmenovitě  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu, vystihuje obrázek 45 A. Jelikož řada těchto potencionálních inhibitorů může vykazovat cytotoxický účinek a tím ovlivňovat různé buněčné procesy, tedy i transportní mechanismy, byl současně u většiny látek přezkoušen cytotoxický účinek. Výsledky těchto pokusů jsou znázorněny grafem (obrázek 45 B). Vyrůstající koncentrace lysinu a gentamicinu stejně tak jako cytochrom C způsobily inhibici uptake 1 nM  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-okterotidu. Testy cytotoxicity ukázaly, že daný inhibiční efekt nemusí být způsoben kompeticí o vazebná místa transportních mechanismů, ale že tento efekt může být následkem cytoxického působení použitých sloučenin. Další zkoušené látky (polymixin B, malát sodný) měly na transport při stanovených koncentracích minimální inhibiční vliv, při vysoké cytotoxickými testy postihnutelné toxicitě (malát sodný).

### 11.3.2 DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid (DOTA-NOC)

#### 11.3.2.1 Příprava DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu

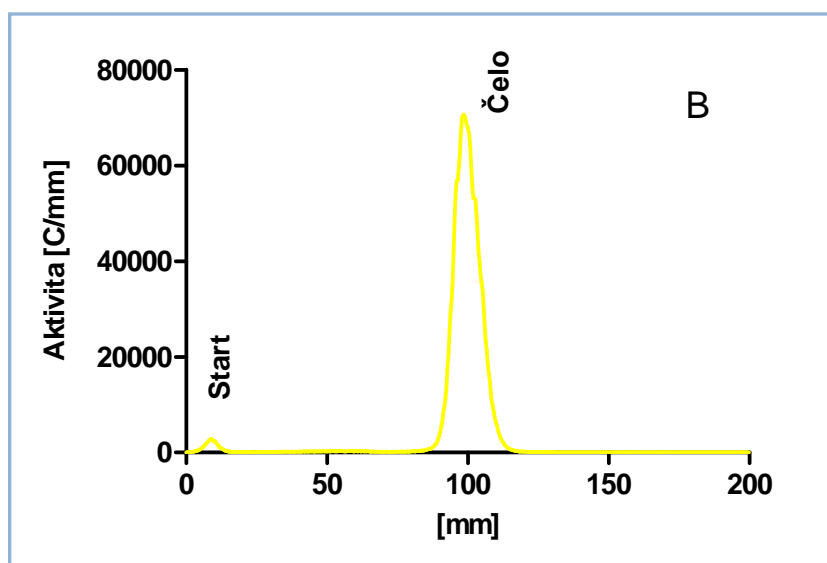
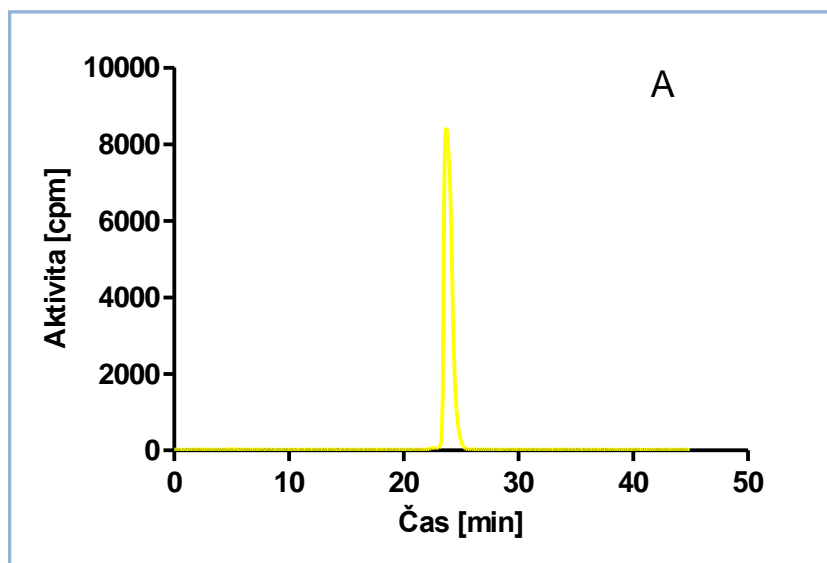
Pro přípravu (radioaktivní značení) DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu platily prakticky všechny podmínky, které byly zmíněny v kapitole 11.3.1.1 týkající se přípravy značeného DOTA-Tyr<sup>3</sup>-okterotátu. Peptidy byly připraveny s vysokou radiochemickou čistotou, která byla stanovována pomocí metod HPLC nebo pomocí časově a pracně méně náročné metody ITLC-SG (obrázky 46-48). K biologickým pokusům byly použity pouze peptidy, které splňovaly kritérium radiochemické čistoty  $\geq 98\%$ . Stabilita a metodika značení DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu byla stanovena ve spolupráci s Katedrou biofyziky a fyzikální chemie FaF UK. Stabilitními testy bylo dokázáno, že tyto peptidy jsou dostatečně stabilní pro provádění zamýšlených *in vitro* a *in vivo* experimentů<sup>141</sup>.

Obrázek 46 Příklad HPLC (A) a ITLC-SG (B) profilů analýzy  $^{111}\text{In}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu.

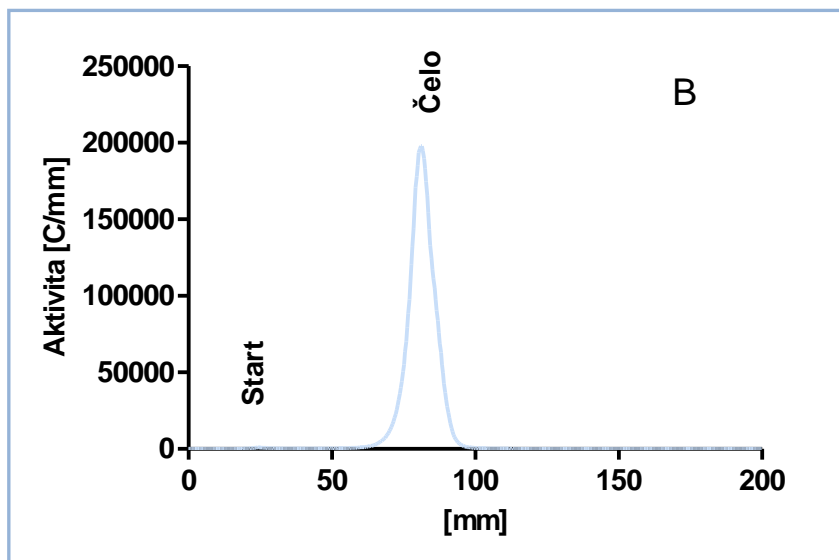
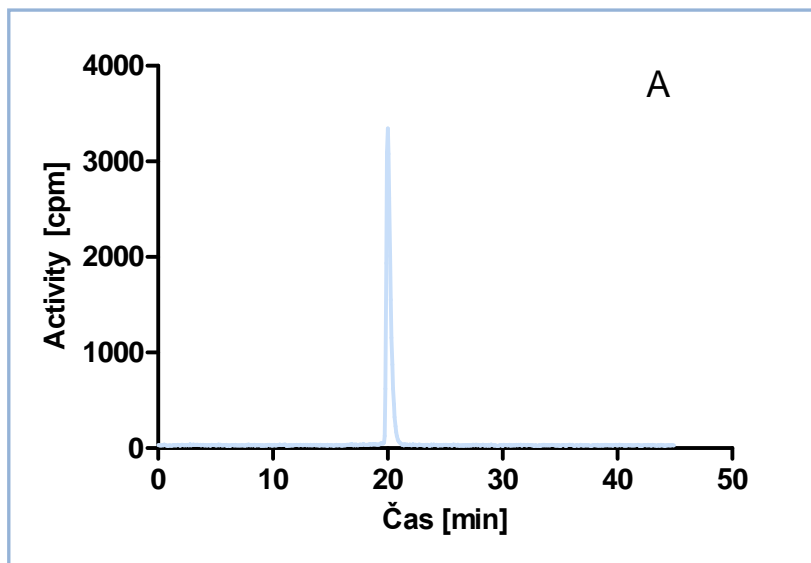




Obrázek 47 Příklad HPLC (A) a ITLC-SG (B) profilů analýzy  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu.



Obrázek 48 Příklad HPLC (A) a ITLC-SG (B) profilů analýzy  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-1- $\text{Na}^3$ -oktreotidu.



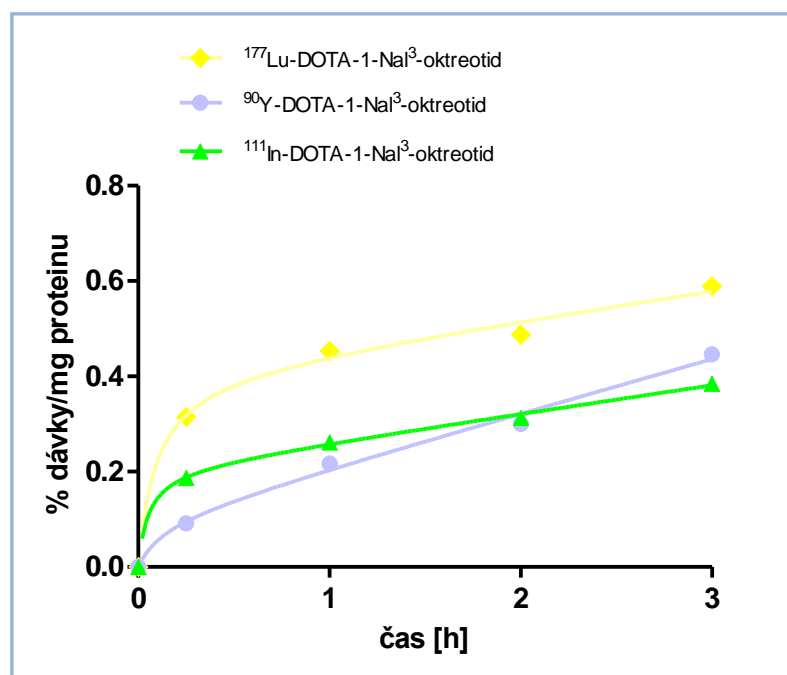
### 11.3.2.2 Internalizace $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu do OK buněčné linie

Kinetika internalizace DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu vykazovala podobné charakteristiky (saturabilita, závislost na teplotě) jako peptid diskutovaný v minulé kapitole (11.3.1.2). Na obrázku 49 je uvedena závislost internalizace DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu značeného kovovými radionuklidy na čase, v tabulce 11 pak hodnoty doplněné o směrodatné odchylky. Oproti DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu je míra internalizace tohoto peptidu trojnásobná a dosahuje hodnot okolo 0,4 % dávky/mg buněčného proteinu.

**Tabulka 11** Hodnoty internalizace DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu; n = 2 ( $^{90}\text{Y}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid), n = 5 ( $^{111}\text{In}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid). Výsledky vyjádřeny jako % z celkové dávky vztažené na mg buněčného proteinu.

čas [h]	$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát		$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát		$^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát	
	%	SD	%	SD	%	SD
0	0	0	0	0	0	0
0,25	0,315	0,150	0,092	0,038	0,187	0,071
1	0,454	0,214	0,217	0,064	0,262	0,081
2	0,488	0,289	0,300	0,068	0,313	0,107
3	0,590	0,398	0,446	0,032	0,385	0,084

**Obrázek 49** Závislost internalizace značeného DOTA-1-Nal-oktreotidu (1nM) na čase.

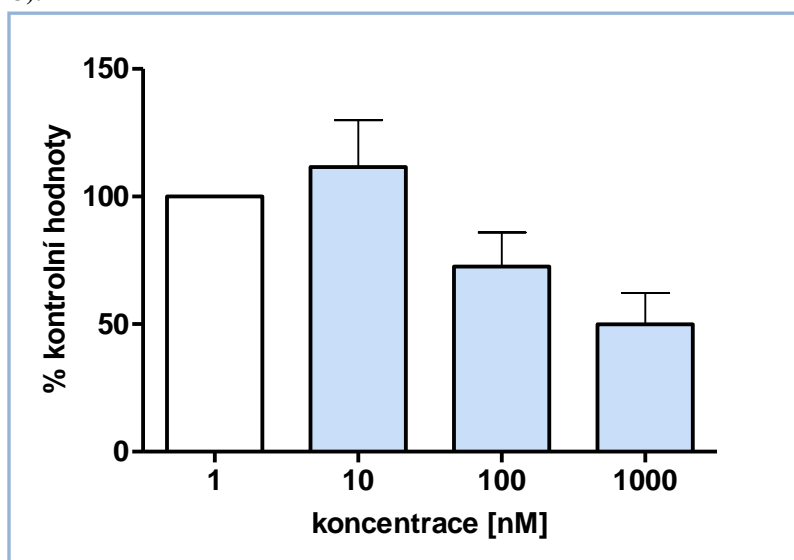


### 11.3.2.3 Inhibice buněčné internalizace DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu

Efekt nadbytku neznačeného sandostatínu (analog přirozeného somatostatínu) na internalizaci radioaktivně značeného DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu je znázorněn na obrázku 44. Podobně jako v případě DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu demonstruje tento graf skutečnost, že neznačený tetradekapeptid významně ovlivňuje internalizaci DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu (v tomto případě značeného <sup>111</sup>In) do OK buněk (patrně kompeticí o transportní mechanismy) projevující se při tisícinásobném násobku sandostatínu snížením míry internalizace po dvouhodinové inkubaci na 49,91 ± 12,3 %.

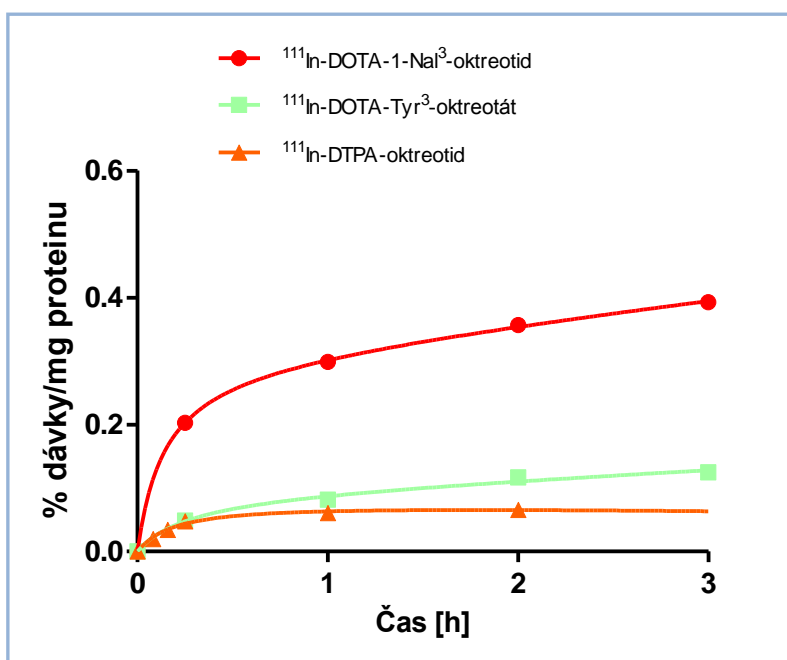
### 11.3.3 Porovnání internalizace zkoumaných peptidů radioaktivně značených <sup>111</sup>In

Obrázek 50 Vliv vzrůstající koncentrace sandostatínu na internalizaci <sup>111</sup>In-DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu (n=3).



Míra kumulace předchozích dvou zmíněných peptidů (DOTA-TATE, DOTA-NOC) byla porovnána pomocí časové závislosti s dalším peptidem DTPA-oktreotidem, který je v současné době rutinně používán k diagnostickým zobrazením SSTR2 pozitivních malignit. Obrázek 51 znázorňuje, že internalizace tohoto peptidu je téměř identická s <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotidem, zatímco další peptid (<sup>111</sup>In-DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid) je kumulován v buňkách až v trojnásobném množství (<sup>111</sup>In-DTPA-oktreotid byl značen ve spolupráci s pracovištěm Nukleární medicíny FN Hradec Králové).

Obrázek 51 Porovnání internalizace  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu,  $^{111}\text{In}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-okterotidu a  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotidu.



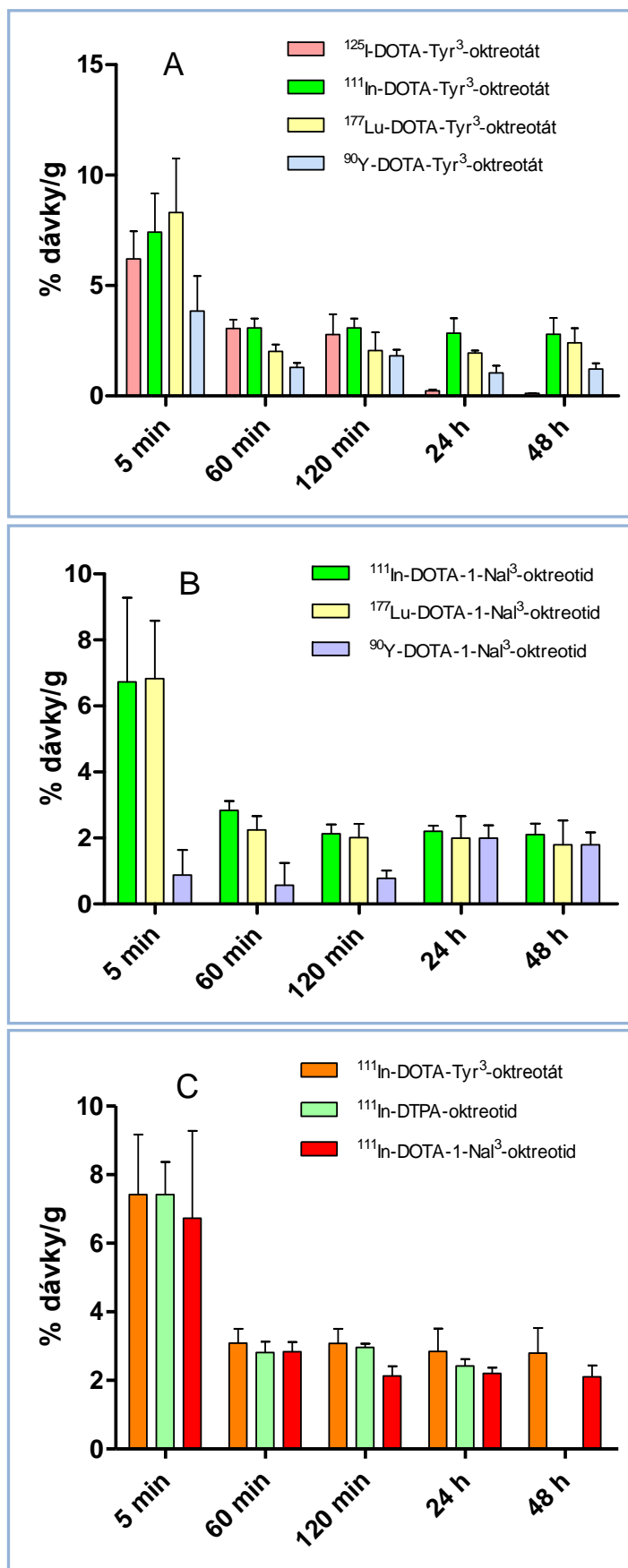
### 11.3.4 In vivo biodistribuce radioaktivně značených peptidů do ledvin potkanů

Se všemi radioaktivně značenými peptidy, které byly diskutovány v předcházejících kapitolách, byly provedeny in vivo biodistribuční pokusy na potkanech. Jejich cílem bylo získat farmakokinetický profil distribuce daných sloučenin po injekčním podání. Kromě sledování hladin radioaktivity, která odpovídala koncentraci daného peptidu v jednotlivých orgánech a tkáních, byla stanovena míra exkrece těchto peptidů jednotlivými exkrečními cestami. Všechny radioaktivně značené peptidy vykazovaly rychlou krevní clearance. Tyto pokusy byly provedeny laborantkami oddělení radiofarmak katedry farmakologie a toxikologie.

Po intravenózní aplikaci potkanům docházelo k vychytávání a kumulaci aktivity především ve tkáních vyznačujících se vysokou expresí somatostatinových receptorů (pankreatu a nadledvinkách) a ledvinách, hlavním exkrečním orgánem těchto látek.

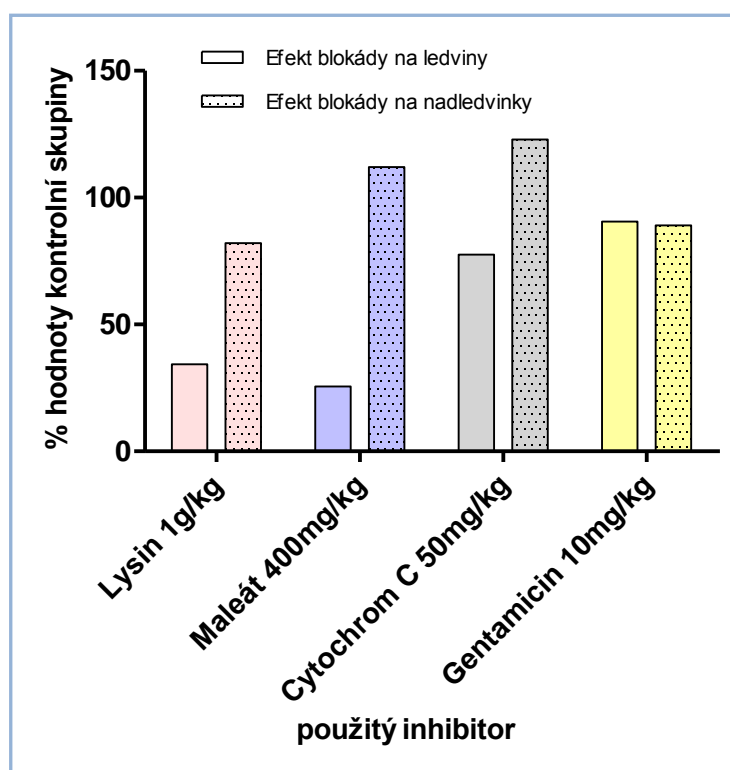
Obrázek 52 znázorňuje kumulační profily radioaktivně značených peptidů v ledvinách. Tyto utříděné grafy jsou zde uvedeny jako *in vivo* analogie obrázkům 43, 49 a 51 popisujícím internalizační pokusy na OK buňkách.

Obrázek 52 In vivo biodistribuce radioaktivně značených peptidů do ledvin potkanů. A  $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{125}\text{I}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát, B  $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{125}\text{I}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid, C porovnání biodistribuce  $^{111}\text{In}$ -peptidů v ledvinách.



Také v *in vivo* experimentech byl zkoumán efekt potencionálních inhibitorů na reuptake radioaktivně značených peptidů ( $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát). Zatímco použité koncentrace lysinu, maleátu a cytochromu C snižovaly více či méně výrazně akumulaci radioaktivity v ledvinách při neovlivnění specifické vazby k somatostatinovým receptorům, podobný vliv gentamycinu nebyl těmito experimenty prokázán (obrázek 53).

**Obrázek 53** Výsledek působení vybraných substancí na *in vivo* biodistribuci  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu v potkanech. Efekt dané koncentrace inhibitoru na množství radioaktivity kumulované po 24 hodinách od aplikace v ledvinách v konfrontaci s orgánem s vysokou expresí somatostatinových receptorů představující specifickou vazbu.



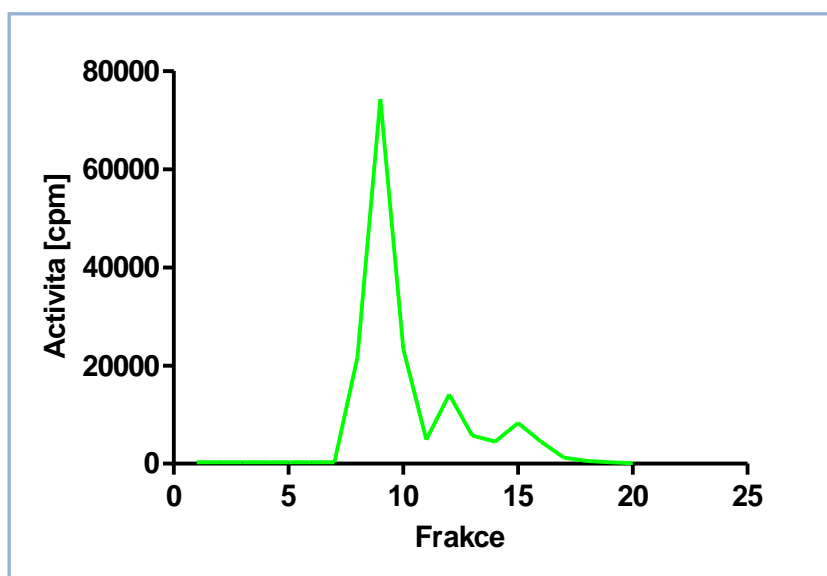
## 11.4 Protilátky

### 11.4.1 $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AntiCD66

#### 11.4.1.1 Příprava $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ -AntiCD66 *a,b,c,e*-(*p*-NHCSNH-*PhCH*<sub>2</sub>PO(OH)CH<sub>2</sub>-DO3A)<sub>2,3</sub> protilátky

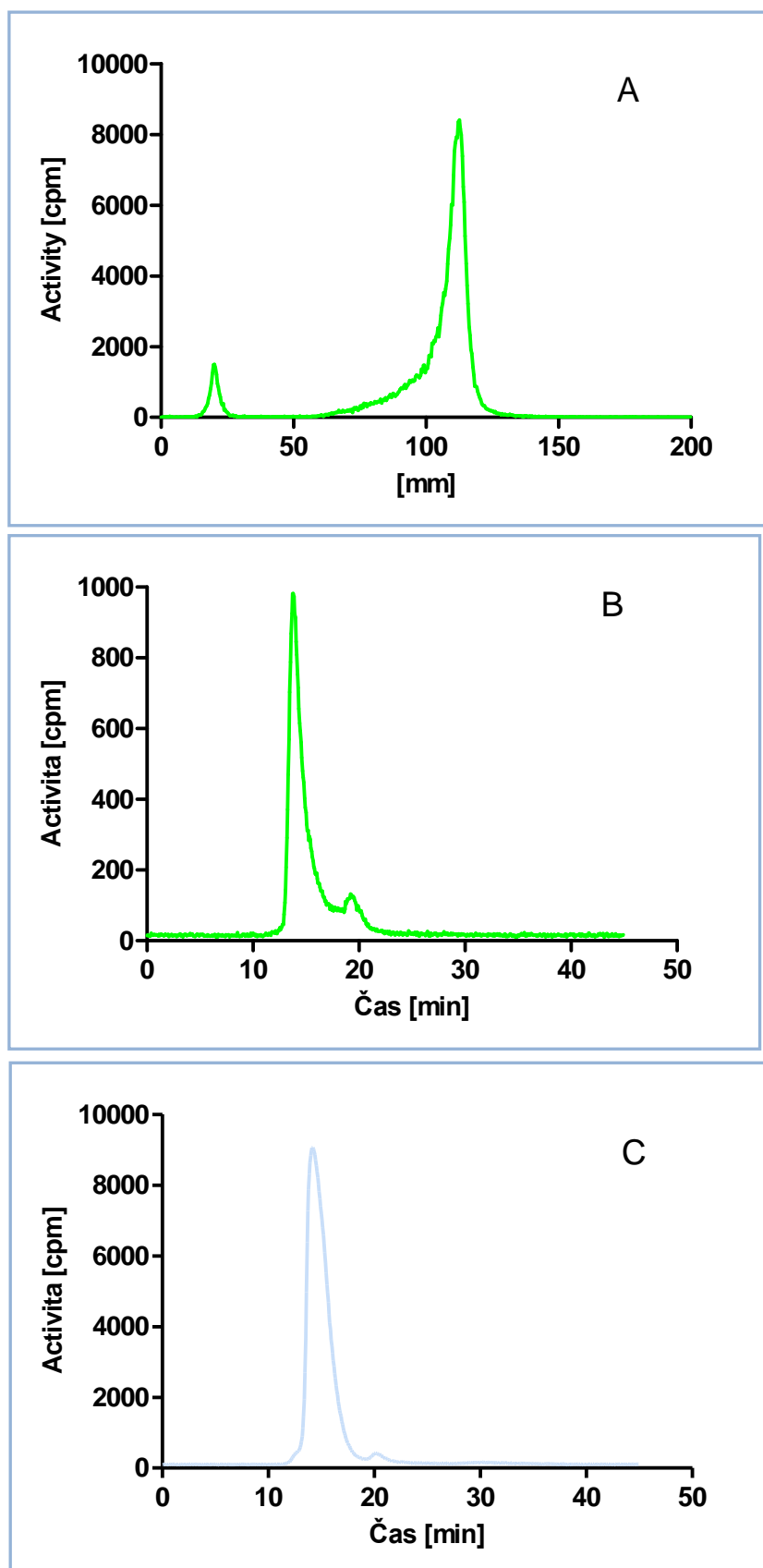
Radioaktivní značení této protilátky kovovými radionuklidy ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ) vyžadovalo kromě postupů samotné přípravy přečištění primárního produktu metodou gelově permeační chromatografie s využitím Sephadexu G50 (obrázek 54). Radiochemická čistota přečištěné protilátky (frakce hlavního píku) byla stanovována pomocí metody ITLC-SG (obrázek 55 A), nebo metody HPLC (obrázek 55 B, C). K biologickým pokusům byly použity pouze protilátky, které splňovaly kritérium radiochemické čistoty  $\geq 95\%$ . Stabilitní profil této protilátky byl stanoven ve spolupráci s pracovníky katedry biofyziky a fyzikální chemie FaF UK. Stabilitními testy bylo dokázáno, že protilátky jsou dostatečně stabilní pro provádění zamýšlených *in-vitro* a *in vivo* experimentů. Porovnání stabilitního profilu protilátek značené  $^{111}\text{In}$  a  $^{90}\text{Y}$  vycházelo ve prospěch protilátky značené radioaktivním indiem<sup>141</sup>.

Obrázek 54 Příklad frakcionalizačního profilu  $^{111}\text{In}$ -AntiCD66 po gelové filtraci na Sephadexu G50.





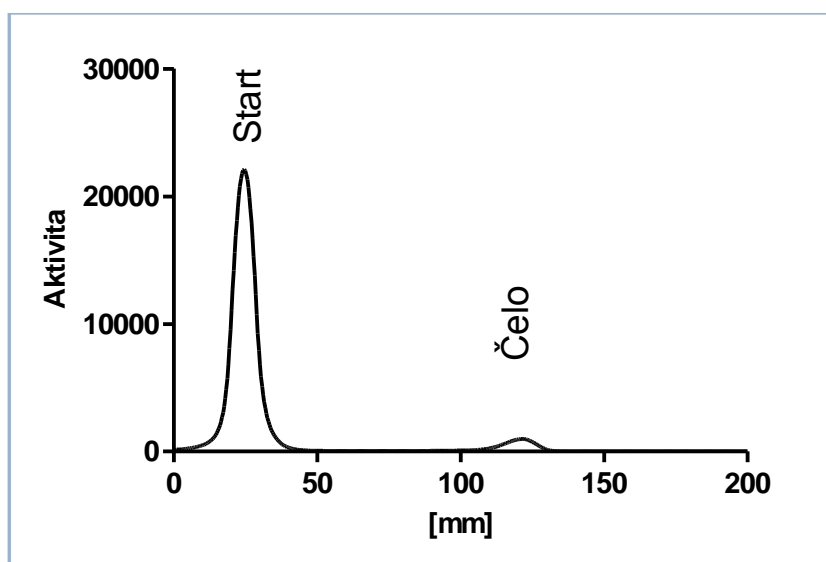
Obrázek 55 A Příklad ITLC-SG profilu radioaktivně značené protilátky ( $^{111}\text{In}$ -AntiCD66); B Příklad HPLC profilu radioaktivně značené protilátky ( $^{111}\text{In}$ -AntiCD66); C Příklad HPLC profilu radioaktivně značené protilátky ( $^{90}\text{Y}$ -AntiCD66).



### 11.4.1.2 Příprava $^{99m}\text{Tc}$ -AntiCD66 (Scintimum®)

Radioaktivní značení bylo provedeno podle SPC daného hromadně vyráběného léčiva a následná radiochemická čistota produktu byla ověřena pomocí metody ITLC-SG analýzy s metanolem a destilovanou vodou (8:2) jako elučním činidlem. V tomto systému zůstávala radioaktivně značená protilátka na startu chromatogramu a nenávaný radionuklid ve formě technecistanu putoval s čelem mobilní fáze. Radiochemická čistota překračovala ve všech případech hranici  $\geq 95\%$ . Příklad radiochemické čistoty je uveden na obrázku 56.

Obrázek 56 ITLC-SG profil  $^{99m}\text{Tc}$ -AntiCD66 (Scintimum®).

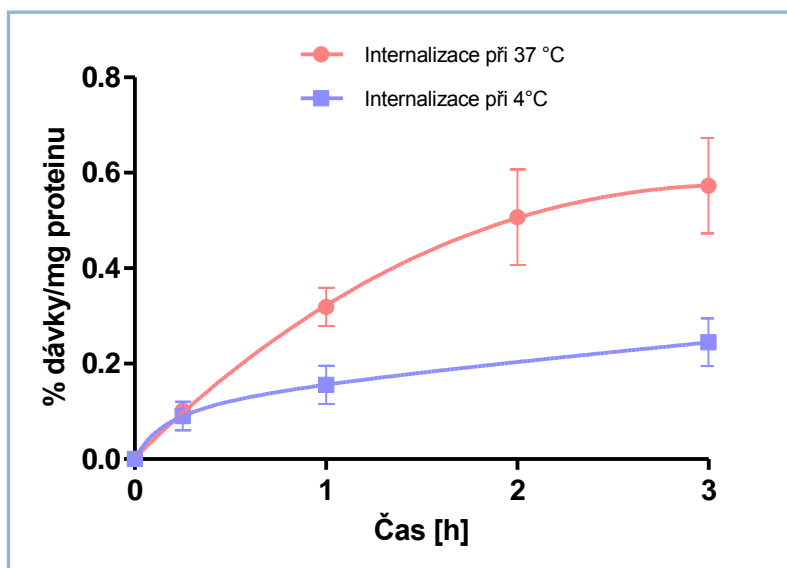


### 11.4.1.3 Internalizace $^{90}\text{Y}/^{99m}\text{Tc}/^{111}\text{In}$ -AntiCD66

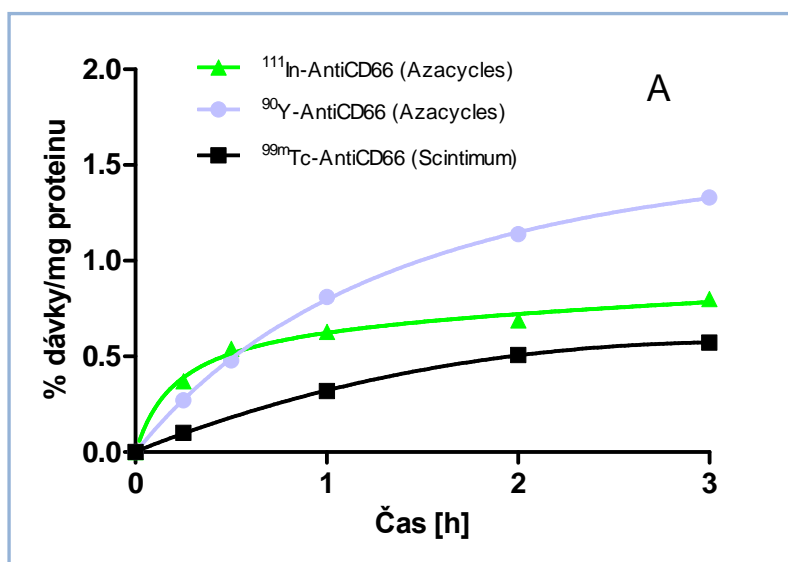
*In vitro* model OK buněčné linie byl použit také pro zástupce ze skupiny radioaktivně značených protilátek, jejichž hlavní nežádoucí účinek je totožný právě s peptidy. Koncentrace protilátky v roztoku odpovídala nejnižší aktivitě, kterou bylo možné spolehlivě detekovat v buňkách. Z hlediska kinetiky závislosti internalizace na čase odpovídají získané výsledky obdobným pokusům s peptidy.

Internalizace protilátky radioaktivně značené AntiCD66 protilátky se vyznačovala saturačním typem kinetiky projevujícím se závislostí na čase a teplotě, jak je patrné z obrázků 57 a 58 a tabulky 12.

Obrázek 57 Příklad závislosti internalizace  $^{99m}\text{Tc}$ -AntiCD66 na teplotě.



Obrázek 5857 Grafické znázornění závislosti internalizace  $^{90}\text{Y}/^{111}\text{In}/^{99m}\text{Tc}$ -antiCD66 na čase.

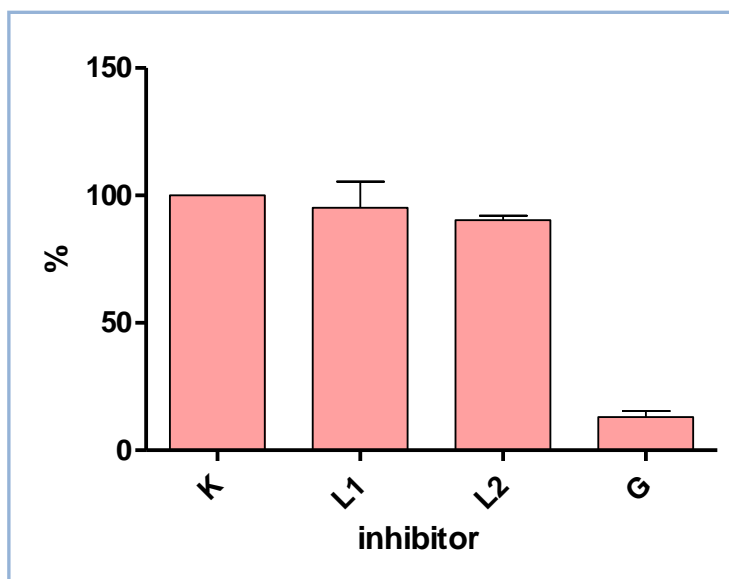


Tabulka 12 Hodnoty internalizace  $^{111}\text{In}$ -AntiCD66 (Azacycles) n=3,  $^{90}\text{Y}$ -AntiCD66 (Azacycles) n=3,  $^{99m}\text{Tc}$ -AntiCD66 (Scintimum) n=3. Hodnoty jsou vyjádřeny jako % z celkové dávky vztážené na mg buněčného proteinu.

čas [h]	$^{111}\text{In}$ -AntiCD66 (Azacycles)		$^{90}\text{Y}$ -AntiCD66 (Azacycles)		$^{99m}\text{Tc}$ -AntiCD66 (Scintimum)	
	%	SD	%	SD	%	SD
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	0,00
0,25	0,37	0,12	0,27	0,11	0,1015	0,01
1,00	0,63	0,18	0,81	0,22	0,3191	0,14
2,00	0,69	0,15	1,14	0,44	0,5068	0,13
3,00	0,80	0,11	1,33	0,48	0,5733	0,20

Při prvních pokusech s inhibicí internalizačního transportu (obrázek 59) pomocí dvou látek vybraných na základě pokusů s peptidy bylo dosaženo výrazné inhibice gentamycinem již nejnižší použitou koncentrací. Vyšší koncentrace se projevovaly výrazným účinkem na hranici měřitelnosti pomocí dostupných přístrojů. U L-lysinu byla odezva naopak minimální.

Obrázek 59 Blokáda internalizace  $^{111}\text{In-antiCD66 } a,b,c,e-(p\text{-NHCSNH-PhCH}_2\text{PO(OH)CH}_2\text{-DO3A})_{2,3}$



K-kontrola, L1 L-lysin (1g/l), L2 L-lysin (10g/l) G gentamicin (10mg/l)

## 12 Diskuze

Specificky působící farmaka jsou dnes jednou z možných alternativ léčby nádorového onemocnění. Radioaktivní značení těchto látek umožňuje vysoce selektivní diagnostiku anebo je další možností terapie disponovaných malignit. K nejvýznamnějším zástupcům radiofarmak s cílenou distribucí patří radioaktivně značené receptorově specifické peptidy a antigenově specifické protilátky. Hlavní předností využití těchto radiofarmak před ostatními zobrazovacími a léčebnými technikami spočívá v možnosti diagnostikovat a léčit i velmi malé dislokované metastatické nádory.

Výzkum specificky působících radiofarmak je zaměřen jak na vývoj nových analogů s lepšími vlastnostmi (vyšší afinitou k receptorům, vyšší *in vivo* stabilitou, lepšími parametry pro značení), tak na zmírnění nežádoucích účinků souvisejících s aplikací těchto látek. Ty jsou následkem především kumulování radioaktivity v jiných než nádorových tkáních a následného působení agresivního záření na zdravou tkáň. U radioaktivně značených peptidů a fragmentů monoklonálních protilátek jsou limitním orgánem ledviny, hlavní exkretční orgán těchto látek. Riziko pozdního nefrotoxického účinku limituje dávku podávaného radiofarmaka, která je nutná k efektivní radioterapii nádorového onemocnění.

Cílem výzkumného týmu oddělení radiofarmak katedry farmakologie a toxikologie a spolupracujících pracovišť Faf UK je získání nových poznatků týkajících se diskutovaných radiofarmak a kompletace co možná nejširší charakteristiky těchto látek. Možnosti tohoto týmu zahrnují jak výzkum metod radioaktivního značení včetně určení stabilitních charakteristik, tak biologického chování těchto látek. Pochopitelnou snahou pracoviště je zavádět nové inovativní metody a postupy rozšiřující možnosti komplexní charakteristiky studovaných sloučenin.

Z důvodů vyplývajících z předchozích dvou odstavců bylo vytyčeno téma této práce, které v sobě zahrnovalo navržení metodiky predikce renální akumulace radioaktivity a v důsledku toho nefrotoxického působení studovaných radiofarmak pomocí vhodného *in vitro* modelu a tedy získání dalších výstupů charakterizujících studované sloučeniny.

Prvním postupným cílem práce byla příprava vybraných radioaktivně značených látek (albumin, deriváty somatostatinu a protilátky) a kontrola jejich radiochemické

čistoty. Pro radioaktivní značení byly příslušné metodiky převzaty buď z literatury, nebo bylo využito zkušeností a rad specialistů na tuto problematiku z výzkumného týmu fakulty (Doc. Ing. Alice Lázníčková, CSc.). Výsledky prokázaly, že všechny studované látky byly připraveny s radiochemickou čistotou dostatečnou pro biologické experimenty.

Pro standardizaci metody studia internalizace studovaných radioaktivních látek na OK buněčných liniích byl použit albumin, který je dle literárních údajů intenzivně transportován v ledvinách pomocí receptorového systému megalin/cubilin.<sup>142, 143</sup> Albumin použitý v těchto studiích byl značen jednak fluorescenčně (FITC-albumin), jednak radioaktivně označen <sup>99m</sup>Tc. Standardizační experimenty s fluorescenčně značeným FITC-albuminem byly koncipovány tak, aby získané výsledky mohly být porovnány s již publikovanými daty. Výsledky uvedené v této dizertační práci týkající se FITC-albuminu jsou ve shodě s parametry vystihujícími rozsah a míru internalizace, které byly dosaženy ostatními vědeckými skupinami.<sup>101</sup> Saturační typ kinetiky, závislost internalizace na čase, teplotě a koncentraci zkoumané látky jsou základními charakteristikami, které lze považovat za výstupy standardizačních pokusů. Pro porovnání byly obdobné experimenty provedeny i s albuminem značeným <sup>99m</sup>Tc. I když charakter časového průběhu závislosti míry internalizace při různých teplotách byl u <sup>99m</sup>Tc-albuminu obdobný jako u FITC-albuminu, bylo výsledné procento internalizované aktivity <sup>99m</sup>Tc-albuminu významně (3x až 4x) nižší při porovnání s FITC-albuminem. Vysvětlení těchto rozdílů lze nejspíše hledat ve vlivu způsobu a postupu značení albuminu na jeho strukturu – zvolený přístup bude pravděpodobně ovlivňovat afinitu značeného albuminu k příslušnému transportnímu receptorovému systému nebo dalším krokům podílejících se na internalizaci albuminu v OK buňkách.

Navržená metodika pokusů využívající OK buněčnou linii byla použita k získání podobných internalizačních závislostí také pro hlavní kategorii látek – radioaktivně značené peptidy (deriváty somatostatinu). Ty byly podle svého charakteru radioaktivně značeny kovovými radionuklidy (<sup>111</sup>In, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu) nebo <sup>125</sup>I a výsledná radiochemická čistota (RČ>98 %) byla ověřena metodami HPLC a/nebo ITLC-SG. Dostatečně dlouhá stabilita k provádění biologických jak *in vitro*, tak *in vivo* experimentů studovaných radioaktivně značených peptidů byla prokázána ve spolupráci s katedrou biofyziky a fyzikálních věd Faf UK. Závěry *in vitro* pokusů provedených na OK buněčné linii s radioaktivně značenými peptidy lze shrnout následovně. Pokusy studující závislost

internalizace značených jednotlivých peptidů na době inkubace prokázaly saturabilnost transportních mechanismů, kdy po 1 hodině inkubace dochází k oploštění zprvu strmě stoupající křivky grafického znázornění této závislosti. Způsob značení ani žádný konkrétní radionuklid neovlivnily transportní procesy u žádného zmíněného peptidu takovým způsobem, aby internalizace jednotlivých peptidů značených různými radioizotopy vykazovaly výrazné odlišnosti. Získané výsledky jsou ve shodě s jedinou publikovanou prací využívající OK buněčnou linii jako *in vitro* model pro studium internalizačních charakteristik radioaktivně značených peptidů a albuminu.<sup>101</sup> V citované práci bylo kromě potvrzení vlivu transportního endocytického receptorového mechanismu megalinu/cubulinu v OK buněčné linii připuštěn také vliv dalšího možného transportního mechanismu podílejícího se na reuptaku radioaktivně značených peptidů.

Největší pozornost naší práce v souvislosti s radioaktivně značenými receptorově specifickými peptidy byla věnována dvěma peptidům. Studovanými a porovnávanými peptidy byly standardně používaný DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát a relativně nový somatostatinový analog DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid, který se kromě afinity k SSTR2 subtypu somatostatinových receptorů váže i na subtypy SSTR3 a SSTR5, čímž se stává perspektivním z hlediska svého potenciálního využití pro diagnostiku a terapii širšího spektra nádorů. Komplexní farmakokinetické srovnání těchto peptidů bylo provedeno za použití dvou *in vitro* metod na buněčných liniích a *in vivo* biodistribučních pokusů na potkanech. V *in vivo* studii, která měla sloužit jako porovnávací model pro *in vitro* metody, bylo dosaženo vysokých peptidických koncentrací a retence radioaktivity v tkáních bohatých na somatostatinové receptory (pankreas, nadledvinky) a také ledvinách krátce po jejich aplikaci.<sup>144</sup> V orgánech s vysokou hustotou SSTR sloužících jako indikátory endogenní afinity k SSTR byla zjištěna dvojnásobná koncentrace peptidu <sup>111</sup>In-DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotidu oproti <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátu. Na druhou stranu nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v *in vitro* internalizaci radioaktivity do buněk exprimujících somatostatinové receptory SSTR2. Zvýšená kumulace v SSTR bohatých orgánech je snadno vysvětlitelná a zcela ve shodě s dříve publikovanými daty, která poukazovala na zvýšenou afinitu prvně jmenovaného peptidu k SSTR3 a SSTR5, kterou jsou přítomny v *in vivo* modelu, ale nejsou exprimovány v buněčné linii AR42J peptidu. Z hlediska experimentů prováděných na OK buněčné linii majících za cíl predikovat potenciální riziko radionefrotoxicity těchto peptidů při terapeutickém použití oba peptidy vykazovaly podobnou kinetiku uptaku srovnávaných peptidů, současně však byla

zjištěna vyšší (trojnásobná) míra internalizace  $^{111}\text{In-DOTA-1-Nal}^3$ -oktreotidu oproti  $^{111}\text{In-DOTA-Tyr}^3$ -oktreotidu v OK buněčné linii. Biodistribuční experimenty prováděné na potkanech však překvapivě ukázaly právě opačné výsledky – míra zadržky radioaktivity v ledvinách byla u  $^{111}\text{In-DOTA-1-Nal}^3$ -oktreotidu významně nižší při porovnání s  $^{111}\text{In-DOTA-Tyr}^3$ -oktreotidem. Vysvětlení pro tyto výsledky není zcela jasné. Je možné spekulovat o mezidruhových rozdílech v ledvinném transportu, rozdílech mezi transportními mechanismy mezi izolovanými buňkami a neporušenými orgány, odlišném vlivu lipofility na transport přes biologické membrány v nedotčených orgánech a v buněčných kulturách nebo přítomnosti také jiných transportních mechanismů v intaktních orgánech.

Pokud jsou srovnávány hodnoty internalizovaného podílu v OK buňkách pro značený albumin a pro deriváty somatostatinu, lze konstatovat, že za rovnovážného stavu je podíl příslušné látky v buňkách vztažený k její celkové koncentraci v systému významně nižší u studovaných peptidů při porovnání s albuminem. Zatímco tento podíl u albuminu dosahuje za daných experimentálních podmínek řádově jednotek procent, u analogů somatostatinu je tato hodnota pouze v řádu desetin procenta z celkové aktivity v systému.

Jedním z cílů této práce, který by mohl mít přímý dopad na terapeutické použití studovaných peptidů, byla snaha o nalezení možnosti snížit internalizaci těchto peptidů v ledvinných buňkách pomocí inhibitorů receptorového endocytického systému, příp. i dalšími mechanismy. V literatuře je dostatečně dokumentován vliv kladně nabitých aminokyselin, především lysinu a argininu, na snížení zadržky somatostatinových analogů v ledvinách.<sup>116-119</sup> Tento efekt byl potvrzen i v této práci, kdy zvyšující se koncentrace lysinu způsobila koncentračně závislé snížení endocytózy  $^{111}\text{In-DOTA-Tyr}^3$ -oktreotidu. Mechanismus tohoto působení je patrně způsoben kompeticí lysinu a studovaného peptidu při vazbě na negativně nabitě struktury membrány OK buněk, která jsou součástí reabsorpčního systému. Další látkou, u které byl sledován její vliv na míru reabsorpce  $^{111}\text{In-DOTA-Tyr}^3$ -oktreotidu, byl malát. Tato látka inhibuje řadu renálních transportních systémů inhibicí cyklu kyseliny citronové v tubulárních buňkách a redukcí nabídky ATP.<sup>118</sup> V našich experimentech se však vliv malátu na internalizaci  $^{111}\text{In-DOTA-Tyr}^3$ -oktreotidu do OK buněk v použitých koncentracích významně neprojevil, vyšší koncentrace malátu by pravděpodobně působily již cytotoxicky. V této dizertační práci



byl stanoven také vliv gentamicinu na internalizaci studovaného peptidu. Z literatury je totiž známo, že megalin hraje důležitou roli při vazbě a endocytóze aminoglykozidů v proximálních tubulárních buňkách ledvin.<sup>100, 118, 126</sup> Tento poznatek nás vedl k myšlence využít gentamicinu jako kompetitoru pro reabsorpci <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotidu v OK buňkách. Výsledky ukázaly, že významného rozdílu (snížení menší než 40 %) oproti kontrolám bylo dosaženo až po přidání nejvyšší koncentrace gentamicinu (1 g/l). Omezený vliv gentamicinu na internalizaci <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotidu v OK buňkách může být způsoben např. tím, že gentamicin se váže na jiná vazebná místa megalinu než studovaný peptid, a proto ke kompetici při jejich endocytóze dochází jen omezeně. Zanedbatelný vliv na transport <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotidu do OK buněk mělo i další polybazické antibiotikum polymixin B. Určité snížení (menší než 40 %) zadržky studovaného peptidu v OK buňkách bylo dosaženo i po přidání cytochromu C, který také interaguje s receptory megalinu a snižuje např. renální akumulaci aminoglykozidů.

Souběžně s pokusy *in vitro* na OK buňkách byly na pracovišti oddělení radiofarmak prováděny obdobné experimenty také v podmínkách *in vivo* na potkanech. Výsledky ukázaly, že po intravenózním podání lysinu v dávce 1 g/kg 15 minut před aplikací peptidu došlo ke snížení zadržky <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotidu v ledvinách na přibližně 40 % hodnoty stanovené u kontrolní skupiny zvířat. Určitého rozdílu oproti *in vitro* experimentům bylo však dosaženo po podání malátu potkanům, který v dávce 400 mg/kg snižoval podíl radioaktivity v ledvinách na jednu čtvrtinu kontrolní hodnoty. Naopak v souladu se závěry pokusů *in vitro* gentamycin v dávce 10 mg/kg a cytochrom C v dávce 50 mg/kg snižovaly internalizaci studovaného peptidu v ledvinách potkanů pouze nevýznamně (snížení menší než 20 %).

Součástí této práce bylo i studium internalizace radioaktivně značených protilátek (<sup>111</sup>In/<sup>90</sup>Y/<sup>99m</sup>Tc-AntiCD66). Z výsledků pokusů prováděných *in vitro* na OK buněčné linii bylo zjištěno, že podobně jako ostatní studované sloučeniny i radioaktivně značené protilátky jsou internalizovány do nitra buněk. Za daných koncentrací radioaktivně značených protilátek dochází k jejich akumulaci v OK buněčné linii podobnou kinetikou jako u zkoumaných peptidů a albuminu, a to do výše jednotek procent celkové dávky. Z hlediska významu těchto hodnot je třeba zmínit výsledky srovnávacích *in vivo* studií provedených na potkanech (výsledky nebyly v této práci uvedeny), které dokládají minoritní podíl renální exkrece na vylučování (proti)látek této velikosti a typu. I když

samotné protilátky nemohou být díky své velké molekulové hmotnosti v ledvinách filtrovány, jejich fragmenty s molekulovou hmotností nižší než limit pro glomerulární filtraci mohou procházet do primární moči a následně být internalizovány obdobným systémem jako značené peptidy. Studium internalizace těchto protilátek v OK buňkách může být tedy modelovým pokusem poskytujícím pilotní výsledky pro odhad endocytózy fragmentů studovaných protilátek. Tyto protilátky se totiž mohou v organizmu štěpit na různé fragmenty a navíc struktura těchto fragmentů většinou není známa. Případný vyšší podíl radioaktivity kumulovaný v ledvinách po podání radioaktivně značených protilátek cílených pro terapeutické účely by tak mohl působit stejná omezení a rizika jako radioaktivně značené receptorově specifické peptidy – a to riziko radionefrotoxicity.

Při hodnocení využitelnosti navržené *in vitro* metody pro praxi je nutné zmínit kromě dosažených výsledků také možná negativa, z nichž některá se částečně projevila při konfrontaci s *in vivo* experimenty. Mezi ně lze zahrnout obecný problém *in vitro* metod tkvící v pochopitelné absenci celkové kaskády mechanismů, které jsou součástí živých organismů a jež mohou hrát výraznou roli při studiu exkrečních charakteristik studovaných látek. Odlišný původ použité standardizované OK (Opossum Kidney) buněčné linie může být původcem jistého zkreslení dosažených výsledků a námětem pro hledání jiné linie renálních buněk. Menším problémem může být také poměrně nízká míra internalizace, která pro spolehlivou detekci výsledků vyžaduje použití studovaných látek s vysokou specifickou aktivitou. Společně s tímto opatřením bylo ke zvýšení spolehlivosti detekce využito i zvětšení povrchu testovacích jamek a tím i zvětšení počtu buněk schopných internalizovat zkoumané substance.

## 13 Závěr

Navržený model využívající renální OK buněčnou linii ke studiu transportních mechanismů radioaktivně značených specificky působících látek rozšiřuje možnost experimentálního posuzování radionefrotoxicity těchto látek.

Tato *in vitro* metoda byla standardizována a využita pro studium transportních závislostí zástupců radioaktivně značených peptidů, protilátek a značeného albuminu. U všech studovaných radioaktivně značených látek byla zvládnuta technika radioaktivního značení a následné analýzy. Výsledky *in vitro* buněčných studií byly porovnány s výsledky *in vivo* experimentů prováděných na potkanech a následně publikovány. Získané výsledky společně se zmíněnými klady a zápory této *in vitro* metodiky mohou posloužit jako relevantní podklady případných inovativních přístupů *in vitro* predikce nefrotoxickeho posuzování radioaktivně značených receptorově specifických radiofarmak.

Závěrem lze konstatovat, že dosažené výsledky se staly inspirací pro další směřování práce v oblasti studia radioaktivně značených sloučenin na pracovišti radiofarmak katedry farmakologie a toxikologie FaF UK.

## 14 Souhrn

Renální akumulace radioaktivně značených specificky působících látek může být klinickým problémem při diagnostice, ale především při léčbě disponovaných malignit kvůli potencionální radionefrotoxicitě těchto látek.

Jedním z cílů této práce bylo navrzení vhodného *in vitro* modelu, který by umožňoval posuzování kumulačních charakteristik jednotlivých látek v ledvinách a hledání možných opatření vedoucích ke snížení míry zpětné reabsorpce buňkami renálního tubulu. Navržený model využívající renální OK buněčnou linii ke studiu transportních mechanismů radioaktivně značených specificky působících látek poskytuje další možnost posuzování radionefrotoxicity těchto látek.

Diskutovaná *in vitro* metoda byla standardizována a využita při studiu transportních závislostí zástupců radioaktivně značených analogů somatostatinu ( $^{111}\text{In}/^{125}\text{I}/^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát,  $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid), protilátek ( $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AntiCD66) a značeného albuminu (FITC-albumin,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -albumin). U všech studovaných radioaktivně značených látek byla zvládnuta technika radioaktivního značení a následné radiochemické analýzy pomocí metod HPLC a/nebo ITLC-SG. U studovaných specificky působících látek (radioaktivně značené peptidy a protilátky) nebyl prokázán podstatný vliv radioaktivního značení na buněčnou internalizaci. Menšího rozdílu v buněčné internalizaci bylo dosaženo při srovnání FITC-albuminu a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -albuminu, což lze považovat za důsledek ovlivnění struktury albuminu při jeho značení  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Výsledky *in vitro* buněčných studií byly porovnány s výsledky *in vivo* experimentů prováděných na potkanech. Mezidruhové rozdíly v ledvinném transportu, rozdíly mezi transportními mechanismy mezi izolovanými buňkami a neporušenými orgány, odlišný vliv lipofility na transport přes biologické membrány v nedotčených orgánech a v buněčných kulturách nebo přítomnost také jiných transportních mechanismů v intaktních orgánech mohou být příčinou ne vždy shodných *in vitro* a *in vivo* výsledků. Součástí této práce bylo i pilotní studium internalizace radioaktivně značených protilátek ( $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AntiCD66) do OK buněčné linie. I když studované protilátky nemohou být v intaktní formě vylučovány ledvinami, sloužily v této práci jako model pro odhad chování radioaktivně značených štěpů protilátek z hlediska jejich afinity k transportním systémům zodpovědným za internalizaci v ledvinách.

## 15 Summary

Renal accumulation of radiolabelled receptor specific substances can represent clinical problems for diagnosis and therapy of some typical malignancies due to radionephrotoxicity of these substances.

The aim of this work was to design a suitable *in vitro* model for evaluating cumulative disposals of studied radiopharmaceuticals in the kidney and for finding possible mechanisms reducing the reabsorption of these substances by renal tubular cells. The suggested model designed for this purpose provides another opportunity for evaluation of their radionephrotoxic potential.

The aforementioned *in vitro* method was standardised and used for the study of transport mechanism of some representatives of radiolabelled somatostatin analogues ( $^{111}\text{In}/^{125}\text{I}/^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate,  $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-octreotide), antibodies ( $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AntiCD66) and albumin (FITC-albumin,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -albumin). All studied radioactive substances were radiolabelled with good practice and analyzed using HPLC and/or ITLC-SG methods. The radiolabelling technique of all studied specifically acting substances (radiolabelled peptides and antibodies) and also any concrete radionuclide showed no significant influence over the internalization into the renal OK cells. The difference of the internalized amount of FITC-albumin and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -albumin can be predicated to the alternation in the structure by radiolabelling with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

The *in vitro* results were compared with the obtained *in vivo* results. Interspecies differences in the kidney transport of the peptides under study, the differences of transport mechanisms between isolated cells and the organ with intact architecture, the effect of the different lipophilicity of the agents on their transport across biological membranes in the whole kidney, the presence of other transport/ co-transport systems in the intact organ can cause discrepancies in these two sets of results. This work brought also pilot results of internalization of radiolabelled antibodies ( $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AntiCD66) into the OK cells. Whenever studied antibodies could not be excreted by the kidney, they were used to determine the fate of antibody fragments in terms of their affinity to the transport systems that are responsible for internalization in the kidney.

## 16 Seznam zkratk uvedených v textu

ADCC	účinek zprostředkovaný cytotoxickými buňkami (antibody dependent cellular cytotoxicity)
AMK	aminokyselina
Anti-CD66	nespecifická protilátka proti antigen CD
APUDomy	typ nádoru (amine precursors uptake and decarboxylation)
ATP	adenosin trifosfát
Aug. e	Augerovy elektrony
BB <sub>1-3</sub>	receptory pro GRP, neuromedin B, subtyp 3
BCA	metoda stanovení proteinů využívající bicinchoninovou kyselinu (bicinchoninic acid)
BN	bombesin
BNS	subtyp bombesinového receptoru
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CCK	cholecystokinin
CCK-A	subtyp cholecystokininového receptoru
CCK-B	subtyp cholecystokininového receptoru
CDR	oblasti určující komplementaritu (complementarity determining regions)
CEA	karcinoembryonální antigen
CPPs	buňkou-penetrující peptidy (cell-penetrating peptides)
CT	počítačová tomografie (computer tomography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan- N,N',N'',N'''- tetraoctová kyselina
DOTA-TATE	DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát
DOTA-NOC	DOTA-1-Nal <sup>3</sup> -oktreotid
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
ECACC	Evropská kolekce buněčných kultur
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
E <sub>max</sub>	maximální energie záření
E <sub>p</sub>	průměrná energie záření
F(ab') <sub>2</sub> , Fab'	fragmenty monoklonálních protilátek
Faf UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
FCS	fetální serum (foetal calf serum)
FDA	americký úřad pro léky a potraviny (food and drug administration)
FGF (1-3)	fibroblastový růstový faktor
FITC	nevlastní fluorofor, derivát fluoresceinu
FN HK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
GEP	gastroenteropankreatický
GIT	gastrointestinální trakt
GRP	gastrin releasing peptid
HAMA	lidské protilátky proti myším protilátkám (Human Anti-Mouse Antibodies)
HIV1-TAT	bílkovina secernovaná buňkami infikovanými HIV
HPLC	vysokoučinná/vysokotlaká kapalinová chromatografie
HYNIC	hydrazinonikotinamid
CH	konstantní úseky těžkého řetězce struktury protilátky
Ig	imunoglobulin
IGS	Imerslund-Gräsbeck syndrom
IL	interleukin
ITLC-SG	instantní tenkovrstvá chromatografie na silikagelem potažených skleněných

	mikrovláknech
LDL	light density lipoprotein
MAP-kinázy	mitogen aktivační proteinkináza
MCP1	chemotaktický protein pro monocyty Monocyte chemoattractant protein
MDR	transportní protein (multi-drug resistance)
MEM	kultivační medium (Minimal essential medium)
MGA1	megaloblastická anemie 1
MRP	multi-drug resistance protein
MTC	medulární nádor štítné žlázy (medullary thyroid carcinoma)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid
Nal	naftyl
NEAA	neesenciální aminokyseliny (Non-essential Amino Acid Solution)
NK	neurokinin
NLSs	jaderně lokalizujícími se peptidy (nuclear localizing peptides)
NMB	neuromedin-B
NPY	neuropeptid Y
NSCLC	nemalobuněčný nádor plic (non small cell lung cancer)
NTR	neurotensinové receptory
OK	označení buněčné linie (Opposum kidney)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)
PDGF	destičkový růstový faktor
PEPT1,2	ledvinné transportéry oligopeptidů
PP	polypeptid
PRRT	radionuklidová terapie (peptide receptor radionuclide therapy)
PTD	transdukční domény (protein transduction domain – PTD)
PYY	peptid YY
RANTES	chemotaktický cytokinin
RDG	jednopísmenné označení sekvence aminokyselin Arg-Gly-Asp
RP-HPLC	HPLC v reverzním uspořádání
S1-3	segmenty proximálního tubulu
SCLC	malobuněčný nádor plic (small cell lung cancer)
SDS	dodecyl sulfát sodný
SEC	gelově permeační chromatografie (size exclusion chromatography)
SRI	scintigrafické zobrazování peptidických receptorů (scintigraphy receptor paging)
SST-14, SST	somatostatin
SST-28	prosomatostatin
SSTR	somatostatinové receptory
STAT 5	aktivátory transkripce (signal transducer and activator of transcription)
TAT	peptid získaný z HIV1-TAT proteinu
TETA	1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan- N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography)
TNF $\alpha$	tumor nekrotický faktor alfa (TNF alfa)
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VH	variabilní úseky těžkého řetězce struktury protilátky
VIP	vasoaktivní intestinální peptid
VL	variabilní úseky lehkého řetězce struktury protilátky
VPAC1	subtyp receptorů vasoaktivního intestinálního peptidu
VPAC2	subtyp receptorů vasoaktivního intestinálního peptidu

## 17 Seznam použité literatury

1. <http://www.linkos.cz/> (staženo 2008).
2. <http://www.csnm.cz> (staženo 2008).
3. Ballinger J.R., Decristoforo C., Farstad B., Mccoubrey B., Ryder H., *The Radiopharmacy -A Technologist's Guide*, European Association of Nuclear Medicine, Vienna, 2008.
4. Louthan O., *Neuroendokrinní nádory, klinické pohledy*, Grada Publishing, a.s., vydání. 1., 2006.
5. Mysliveček M., Koranda P., Hušák V., *Nukleární medicína v diagnostice a nádorů a zánětů*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, vydání. 1, 2002.
6. Adam Z., Pour L., Vorlíček J., Hájek R., Koptíková J., Šmardová J.: Cílená léčba v onkologii. *Remedia*, 4-5, 2005, 392-404.
7. Cwiertka K., Trojanec R., Špačková K., Hajdúch M.: Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klinická farmakologie a farmakologie*, 18, 2004, 165–170.
8. Goldenberg D.M.: Radiolabelled monoclonal antibodies in the treatment of metastatic cancer. *Curr Oncol*, 14, 2007, 39-42.
9. Gopal, B Saha: *Fundamentals of Nuclear Pharmacy – 4th Ed. S.*, 1998., *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer, vydání. 4., 1998.
10. Adams G.P., Weiner L.M.: Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23, 2005, 1147-1157.
11. Klener P. Kostelka B., Šafanda M.: *Onkologie a hematologie*, Media Tribune CZ s.r.o., Český Těšín, 2008.
12. Jain M., Venkatraman G., Batra S.K.: Cell-penetrating peptides and antibodies: a new direction for optimizing radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34, 2007, 973-977.
13. Costantini D.L., Hu M., Reilly R.M.: Update: Peptide motifs for insertion of radiolabeled biomolecules into cells and routing to the nucleus for cancer imaging or radiotherapeutic applications. *Cancer Biother Radiopharm*, 23, 2008, 3-24.
14. Behr T.M., Behe M., Becker W.: Diagnostic applications of radiolabeled peptides in nuclear endocrinology. *Q J Nucl Med*, 43, 1999, 268-280.
15. Reubi J.C.: Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev*, 24, 2003, 389-427.
16. Breeman W.A., De Jong M., Kwekkeboom D.J., Valkema R., Bakker W.H., Kooij P.P., Visser T.J., Krenning E.P.: Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med*, 28, 2001, 1421-1429.
17. Patel Y.C., Greenwood M.T., Panetta R., Demchyshyn L., Niznik H., Srikant C.B.: The somatostatin receptor family. *Life Sci*, 57, 1995, 1249-1265.
18. Scherubl H., Hescheler J., Riecken E.O.: Molecular mechanisms of somatostatin's inhibition of hormone release: participation of voltage-gated calcium channels and G-proteins. *Horm Metab Res Suppl*, 27, 1993, 1-4.
19. Kaltsas G.A., Papadogias D., Makras P., Grossman A.B.: Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues. *Endocr Relat Cancer*, 12, 2005, 683-699.
20. Caplin M.E., Buscombe J.R., Hilson A.J., Jones A.L., Watkinson A.F., Burroughs A.K.: Carcinoid tumour. *Lancet*, 352, 1998, 799-805.
21. Weiner R.E., Thakur M.L.: Radiolabeled peptides in oncology: role in diagnosis and treatment. *BioDrugs*, 19, 2005, 145-163.



22. Reubi J.C.: Somatostatin and other peptide receptors as tools for tumor diagnosis and treatment. *Neuroendocrinology*, 80 Suppl 1, 2004, 51-56.
23. Reubi J.C., Waser B.: Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30, 2003, 781-793.
24. De Visser M., Janssen P.J., Srinivasan A., Reubi J.C., Waser B., Erion J.L., Schmidt M.A., Krenning E.P., De Jong M.: Stabilised <sup>111</sup>In-labelled DTPA- and DOTA-conjugated neurotensin analogues for imaging and therapy of exocrine pancreatic cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30, 2003, 1134-1139.
25. Koikov L.N., Ebetino F.H., Solinsky M.G., Cross-Doersen D., Knittel J.J.: Sub-nanomolar hMC1R agonists by end-capping of the melanocortin tetrapeptide His-D-Phe-Arg-Trp-NH(2). *Bioorg Med Chem Lett*, 13, 2003, 2647-2650.
26. Reubi J.C., Waser B., Schaer J.C., Laissue J.A.: Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 28, 2001, 836-846.
27. Breeman W.A., Kwekkeboom D.J., De Blois E., De Jong M., Visser T.J., Krenning E.P.: Radiolabelled regulatory peptides for imaging and therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 7, 2007, 345-357.
28. Blok D., Feitsma R.I., Vermeij P., Pauwels E.J.: Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Eur J Nucl Med*, 26, 1999, 1511-1519.
29. Gotthardt M., Boermann O.C., Behr T.M., Behe M.P., Oyen W.J.: Development and clinical application of peptide-based radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des*, 10, 2004, 2951-2963.
30. Hejna M., Schmidinger M., Raderer M.: The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing? *Ann Oncol*, 13, 2002, 653-668.
31. Wild D., Schmitt J.S., Ginj M., Macke H.R., Bernard B.F., Krenning E., De Jong M., Wenger S., Reubi J.C.: DOTA-NOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30, 2003, 1338-1347.
32. Weiner R.E., Thakur M.L.: Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. *Appl Radiat Isot*, 57, 2002, 749-763.
33. Blower P.: Towards molecular imaging and treatment of disease with radionuclides: the role of inorganic chemistry. *Dalton Trans*, 2006, 1705-1711.
34. Lister-James J., Moyer B.R., Dean R.T.: Pharmacokinetic considerations in the development of peptide-based imaging agents. *Q J Nucl Med*, 41, 1997, 111-118.
35. Cremonesi M., Ferrari M., Bodei L., Tosi G., Paganelli G.: Systemic and locoregional dosimetry in receptor radionuclide therapy with peptides. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 50, 2006, 288-295.
36. Teunissen J.J., Kwekkeboom D.J., De Jong M., Esser J.P., Valkema R., Krenning E.P.: Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Peptide receptor radionuclide therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 19, 2005, 595-616.
37. Capello A., Krenning E.P., Breeman W.A., Bernard B.F., De Jong M.: Peptide receptor radionuclide therapy in vitro using [<sup>111</sup>In-DTPA<sup>0</sup>]octreotide. *J Nucl Med*, 44, 2003, 98-104.
38. Forrer F., Valkema R., Kwekkeboom D.J., De Jong M., Krenning E.P.: Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 21, 2007, 111-129.

39. Anderson C.J., Dehdashti F., Cutler P.D., Schwarz S.W., Laforest R., Bass L.A., Lewis J.S., Mccarthy D.W.: <sup>64</sup>Cu-TETA-octreotide as a PET imaging agent for patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med*, 42, 2001, 213-221.
40. De Jong M., Bakker W.H., Krenning E.P., Breeman W.A., Van Der Pluijm M.E., Bernard B.F., Visser T.J., Jermann E., Behe M., Powell P., Macke H.R.: Yttrium-90 and indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of [DOTA<sup>0</sup>,d-Phe<sup>1</sup>,Tyr<sup>3</sup>]octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med*, 24, 1997, 368-371.
41. Krenning E.P., De Jong M., Kooij P.P., Breeman W.A., Bakker W.H., De Herder W.W., Van Eijck C.H., Kwekkeboom D.J., Jamar F., Pauwels S., Valkema R.: Radiolabelled somatostatin analogue(s) for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy. *Ann Oncol*, 10 Suppl 2, 1999, S23-29.
42. Kwekkeboom D.J., Bakker W.H., Kooij P.P., Konijnenberg M.W., Srinivasan A., Erion J.L., Schmidt M.A., Bugaj J.L., De Jong M., Krenning E.P.: [<sup>177</sup>Lu-DOT<sup>0</sup>Tyr<sup>3</sup>]octreotate: comparison with [<sup>111</sup>In-DTPA<sup>0</sup>]octreotide in patients. *Eur J Nucl Med*, 28, 2001, 1319-1325.
43. Cyr J.E., Pearson D.A., Wilson D.M., Nelson C.A., Guaraldi M., Azure M.T., Lister-James J., Dinkelborg L.M., Dean R.T.: Somatostatin receptor-binding peptides suitable for tumor radiotherapy with Re-188 or Re-186. Chemistry and initial biological studies. *J Med Chem*, 50, 2007, 1354-1364.
44. Deutsch E., Libson K., Vanderheyden J.L., Ketring A.R., Maxon H.R.: The chemistry of rhenium and technetium as related to the use of isotopes of these elements in therapeutic and diagnostic nuclear medicine. *Int J Rad Appl Instrum B*, 13, 1986, 465-477.
45. Cremonesi M., Ferrari M., Zoboli S., Chinol M., Stabin M.G., Orsi F., Maecke H.R., Jermann E., Robertson C., Fiorenza M., Tosi G., Paganelli G.: Biokinetics and dosimetry in patients administered with (111)In-DOTA-Tyr(3)-octreotide: implications for internal radiotherapy with (90)Y-DOTATOC. *Eur J Nucl Med*, 26, 1999, 877-886.
46. Pauwels S., Barone R., Walrand S., Borson-Chazot F., Valkema R., Kvols L.K., Krenning E.P., Jamar F.: Practical dosimetry of peptide receptor radionuclide therapy with (90)Y-labeled somatostatin analogs. *J Nucl Med*, 46 Suppl 1, 2005, 92S-98S.
47. Virgolini I., Traub T., Novotny C., Leimer M., Fuger B., Li S.R., Patri P., Pangerl T., Angelberger P., Raderer M., Burggasser G., Andrae F., Kurtaran A., Dudczak R.: Experience with indium-111 and yttrium-90-labeled somatostatin analogs. *Curr Pharm Des*, 8, 2002, 1781-1807.
48. Decristoforo C., Maina T., Nock B., Gabriel M., Cordopatis P., Moncayo R.: <sup>99m</sup>Tc-Demotate 1: first data in tumour patients-results of a pilot/phase I study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30, 2003, 1211-1219.
49. Decristoforo C., Mather S.J., Cholewinski W., Donnemiller E., Riccabona G., Moncayo R.: <sup>99m</sup>Tc-EDDA/HYNIC-TOC: a new <sup>99m</sup>Tc-labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumours; first clinical results and intra-patient comparison with <sup>111</sup>In-labelled octreotide derivatives. *Eur J Nucl Med*, 27, 2000, 1318-1325.
50. Decristoforo C., Melendez-Alafort L., Sosabowski J.K., Mather S.J.: <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-[Tyr<sup>3</sup>]-octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: preclinical evaluation and comparison with <sup>111</sup>In-octreotide. *J Nucl Med*, 41, 2000, 1114-1119.

51. Maina T., Nock B., Nikolopoulou A., Sotiriou P., Loudos G., Maintas D., Cordopatis P., Chiotellis E.: [<sup>99m</sup>Tc]Demotate, a new <sup>99m</sup>Tc-based [Tyr<sup>3</sup>]octreotate analogue for the detection of somatostatin receptor-positive tumours: synthesis and preclinical results. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29, 2002, 742-753.
52. Maina T., Nock B.A., Cordopatis P., Bernard B.F., Breeman W.A., Van Gameren A., Van Den Berg R., Reubi J.C., Krenning E.P., De Jong M.: [(99m)Tc]Demotate 2 in the detection of sst(2)-positive tumours: a preclinical comparison with [(111)In]DOTA-tate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33, 2006, 831-840.
53. Cremonesi M., Ferrari M., Bodei L., Tosi G., Paganelli G.: Dosimetry in Peptide radionuclide receptor therapy: a review. *J Nucl Med*, 47, 2006, 1467-1475.
54. De Jong M., Breeman W.A., Bernard B.F., Bakker W.H., Schaar M., Van Gameren A., Bugaj J.E., Erion J., Schmidt M., Srinivasan A., Krenning E.P.: [<sup>177</sup>Lu-DOTA(0),Tyr<sup>3</sup>] octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy. *Int J Cancer*, 92, 2001, 628-633.
55. Lewis J.S., Wang M., Laforest R., Wang F., Erion J.L., Bugaj J.E., Srinivasan A., Anderson C.J.: Toxicity and dosimetry of (177)Lu-DOTA-Y3-octreotate in a rat model. *Int J Cancer*, 94, 2001, 873-877.
56. Bugaj J.E., Erion J.L., Johnson M.A., Schmidt M.A., Srinivasan A.: Radiotherapeutic efficacy of (153)Sm-CMDTPA-Tyr(3)-octreotate in tumor-bearing rats. *Nucl Med Biol*, 28, 2001, 327-334.
57. Lewis J.S., Lewis M.R., Cutler P.D., Srinivasan A., Schmidt M.A., Schwarz S.W., Morris M.M., Miller J.P., Anderson C.J.: Radiotherapy and dosimetry of <sup>64</sup>Cu-TETA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate in a somatostatin receptor-positive, tumor-bearing rat model. *Clin Cancer Res*, 5, 1999, 3608-3616.
58. Lewis J.S., Srinivasan A., Schmidt M.A., Anderson C.J.: In vitro and in vivo evaluation of <sup>64</sup>Cu-TETA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate. A new somatostatin analog with improved target tissue uptake. *Nucl Med Biol*, 26, 1999, 267-273.
59. Lamberts S.W., De Herder W.W., Hofland L.J.: Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab*, 13, 2002, 451-457.
60. Reubi J.C., Schar J.C., Waser B., Wenger S., Heppeler A., Schmitt J.S., Macke H.R.: Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med*, 27, 2000, 273-282.
61. Kopecky M., Trejtnar F., Laznickek M., Laznickova A., Semecky V., Maina T., Nock B.: <sup>99m</sup>Tc-demotate 1: biodistribution and elimination characteristics in rats. *Nucl Med Commun*, 26, 2005, 549-554.
62. De Visser M., Bernard H.F., Erion J.L., Schmidt M.A., Srinivasan A., Waser B., Reubi J.C., Krenning E.P., De Jong M.: Novel <sup>111</sup>In-labelled bombesin analogues for molecular imaging of prostate tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34, 2007, 1228-1238.
63. Nock B., Nikolopoulou A., Chiotellis E., Loudos G., Maintas D., Reubi J.C., Maina T.: [99mTc]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30, 2003, 247-258.
64. Zhang H., Schuhmacher J., Waser B., Wild D., Eisenhut M., Reubi J.C., Maecke H.R.: DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34, 2007, 1198-1208.

65. Smith C.J., Volkert W.A., Hoffman T.J.: Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes. *Nucl Med Biol*, 32, 2005, 733-740.
66. Nock B.A., Nikolopoulou A., Galanis A., Cordopatis P., Waser B., Reubi J.C., Maina T.: Potent bombesin-like peptides for GRP-receptor targeting of tumors with <sup>99m</sup>Tc: a preclinical study. *J Med Chem*, 48, 2005, 100-110.
67. Kwekkeboom D.J., Bakker W.H., Kooij P.P., Erion J., Srinivasan A., De Jong M., Reubi J.C., Krenning E.P.: Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med*, 27, 2000, 1312-1317.
68. Reubi J.C.: CCK receptors in human neuroendocrine tumors: clinical implications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 234, 2001, 101-104.
69. Behr T.M., Behe M., Angerstein C., Gratz S., Mach R., Hagemann L., Jenner N., Stiehler M., Frank-Raue K., Raue F., Becker W.: Cholecystokinin-B/gastrin receptor binding peptides: preclinical development and evaluation of their diagnostic and therapeutic potential. *Clin Cancer Res*, 5, 1999, 3124s-3138s.
70. Reubi J.C., Waser B., Schaer J.C., Laederach U., Erion J., Srinivasan A., Schmidt M.A., Bugaj J.E.: Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues in vitro and in vivo. *Eur J Nucl Med*, 25, 1998, 481-490.
71. Behr T.M., Jenner N., Radetzky S., Behe M., Gratz S., Yucekent S., Raue F., Becker W.: Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med*, 25, 1998, 424-430.
72. Reubi J.C.: Targeting CCK receptors in human cancers. *Curr Top Med Chem*, 7, 2007, 1239-1242.
73. Nock B.A., Maina T., Behe M., Nikolopoulou A., Gotthardt M., Schmitt J.S., Behr T.M., Macke H.R.: CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with (<sup>99m</sup>Tc)-labeled minigastrin analogs. *J Nucl Med*, 46, 2005, 1727-1736.
74. Hassenius C., Bader M., Meinhold H., Bohmig M., Faiss S., Reubi J.C., Wiedenmann B.: Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with pancreatic adenocarcinomas or neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med*, 27, 2000, 1684-1693.
75. Eisenhut M., Haberkorn U.: [<sup>123</sup>I]VIP receptor scintigraphy in patients with pancreatic adenocarcinomas. *Eur J Nucl Med*, 27, 2000, 1589-1590.
76. Khan I.U., Beck-Sickinger A.G.: Targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones as radiopharmaceuticals. *Anticancer Agents Med Chem*, 8, 2008, 186-199.
77. Haubner R., Wester H.J., Reuning U., Senekowitsch-Schmidtke R., Diefenbach B., Kessler H., Stocklin G., Schwaiger M.: Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med*, 40, 1999, 1061-1071.
78. Janssen M.L., Oyen W.J., Dijkgraaf I., Massuger L.F., Frielink C., Edwards D.S., Rajopadhye M., Boonstra H., Corstens F.H., Boerman O.C.: Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model. *Cancer Res*, 62, 2002, 6146-6151.
79. Haubner R.: Alphavbeta3-integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33 Suppl 1, 2006, 54-63.
80. Rogers B.E., Zinn K.R., Lin C.Y., Chaudhuri T.R., Buchsbaum D.J.: Targeted radiotherapy with [(90)Y]-SMT 487 in mice bearing human nonsmall cell lung

- tumor xenografts induced to express human somatostatin receptor subtype 2 with an adenoviral vector. *Cancer*, 94, 2002, 1298-1305.
81. Reubi C., Gugger M., Waser B.: Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29, 2002, 855-862.
  82. Van Hagen P.M., Breeman W.A., Bernard H.F., Schaar M., Mooij C.M., Srinivasan A., Schmidt M.A., Krenning E.P., De Jong M.: Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumour imaging and radionuclide therapy. *Int J Cancer*, 90, 2000, 186-198.
  83. De Jong M., Kwekkeboom D., Valkema R., Krenning E.P.: Radiolabelled peptides for tumour therapy: current status and future directions. Plenary lecture at the EANM 2002. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30, 2003, 463-469.
  84. Okarvi S.M.: Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: Potential tools against cancer. *Cancer Treat Rev*, 34, 2008, 13-26.
  85. Ginj M., Zhang H., Waser B., Cescato R., Wild D., Wang X., Erchegyi J., Rivier J., Macke H.R., Reubi J.C.: Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2006, 16436-16441.
  86. Jones S.W., Christison R., Bundell K., Voyce C.J., Brockbank S.M., Newham P., Lindsay M.A.: Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br J Pharmacol*, 145, 2005, 1093-1102.
  87. Tunnemann G., Martin R.M., Haupt S., Patsch C., Edenhofer F., Cardoso M.C.: Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *Faseb J*, 20, 2006, 1775-1784.
  88. Stewart M.: Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 2007, 195-208.
  89. Ginj M., Hinni K., Tschumi S., Schulz S., Maecke H.R.: Trifunctional somatostatin-based derivatives designed for targeted radiotherapy using auger electron emitters. *J Nucl Med*, 46, 2005, 2097-2103.
  90. Schumacher T., Hofer S., Eichhorn K., Wasner M., Zimmerer S., Freitag P., Probst A., Gratzl O., Reubi J.C., Maecke R., Mueller-Brand J., Merlo A.: Local injection of the <sup>90</sup>Y-labelled peptidic vector DOTATOC to control gliomas of WHO grades II and III: an extended pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29, 2002, 486-493.
  91. Moncayo R.: Cubilin and megalin in radiation-induced renal injury with labelled somatostatin analogues: are we just dealing with the kidney? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 32, 2005, 1131-1135.
  92. Bodei L., Cremonesi M., Zoboli S., Grana C., Bartolomei M., Rocca P., Caracciolo M., Macke H.R., Chinol M., Paganelli G.: Receptor-mediated radionuclide therapy with <sup>90</sup>Y-DOTATOC in association with amino acid infusion: a phase I study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30, 2003, 207-216.
  93. Lambert B., Cybulla M., Weiner S.M., Van De Wiele C., Ham H., Dierckx R.A., Otte A.: Renal toxicity after radionuclide therapy. *Radiat Res*, 161, 2004, 607-611.
  94. Barone R., Borson-Chazot F., Valkema R., Walrand S., Chauvin F., Gogou L., Kvols L.K., Krenning E.P., Jamar F., Pauwels S.: Patient-specific dosimetry in predicting renal toxicity with (90)Y-DOTATOC: relevance of kidney volume and dose rate in finding a dose-effect relationship. *J Nucl Med*, 46 Suppl 1, 2005, 99S-106S.

95. Melis M., Krenning E.P., Bernard B.F., De Visser M., Rolleman E., De Jong M.: Renal uptake and retention of radiolabeled somatostatin, bombesin, neurotensin, minigastrin and CCK analogues: species and gender differences. *Nucl Med Biol*, 34, 2007, 633-641.
96. Bodei L., Cremonesi M., Grana C., Rocca P., Bartolomei M., Chinol M., Paganelli G.: Receptor radionuclide therapy with  $^{90}\text{Y}$ -[DOTA]0-Tyr<sup>3</sup>-octreotide ( $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC) in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31, 2004, 1038-1046.
97. De Jong M., Valkema R., Jamar F., Kvols L.K., Kwekkeboom D.J., Breeman W.A., Bakker W.H., Smith C., Pauwels S., Krenning E.P.: Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Semin Nucl Med*, 32, 2002, 133-140.
98. Launay-Vacher V., Izzedine H., Karie S., Hulot J.S., Baumelou A., Deray G.: Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol*, 103, 2006, p97-106.
99. Behr T.M., Becker W.S., Sharkey R.M., Juweid M.E., Dunn R.M., Bair H.J., Wolf F.G., Goldenberg D.M.: Reduction of renal uptake of monoclonal antibody fragments by amino acid infusion. *J Nucl Med*, 37, 1996, 829-833.
100. Birn H., Christensen E.I.: Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int*, 69, 2006, 440-449.
101. Barone R., Van Der Smissen P., Devuyst O., Beaujean V., Pauwels S., Courtoy P.J., Jamar F.: Endocytosis of the somatostatin analogue, octreotide, by the proximal tubule-derived opossum kidney (OK) cell line. *Kidney Int*, 67, 2005, 969-976.
102. De Jong M., Barone R., Krenning E., Bernard B., Melis M., Visser T., Gekle M., Willnow T.E., Walrand S., Jamar F., Pauwels S.: Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of (111)In-DTPA-octreotide. *J Nucl Med*, 46, 2005, 1696-1700.
103. Melis M., Krenning E.P., Bernard B.F., Barone R., Visser T.J., De Jong M.: Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 32, 2005, 1136-1143.
104. Behr T.M., Goldenberg D.M., Becker W.: Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur J Nucl Med*, 25, 1998, 201-212.
105. Gotthardt M., Van Eerd-Vismale J., Oyen W.J., De Jong M., Zhang H., Rolleman E., Maecke H.R., Behe M., Boerman O.: Indication for different mechanisms of kidney uptake of radiolabeled peptides. *J Nucl Med*, 48, 2007, 596-601.
106. Rolleman E.J., Kooij P.P., De Herder W.W., Valkema R., Krenning E.P., De Jong M.: Somatostatin receptor subtype 2-mediated uptake of radiolabelled somatostatin analogues in the human kidney. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34, 2007, 1854-1860.
107. De Jong M., Valkema R., Van Gameren A., Van Boven H., Bex A., Van De Weyer E.P., Burggraaf J.D., Korner M., Reubi J.C., Krenning E.P.: Inhomogeneous localization of radioactivity in the human kidney after injection of [(111)In-DTPA]octreotide. *J Nucl Med*, 45, 2004, 1168-1171.
108. Raychowdhury R., Niles J.L., McCluskey R.T., Smith J.A.: Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science*, 244, 1989, 1163-1165.
109. Verroust P.J., Birn H., Nielsen R., Kozyraki R., Christensen E.I.: The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. *Kidney Int*, 62, 2002, 745-756.

110. Verroust P.J., Christensen E.I.: Megalin and cubilin--the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol Dial Transplant*, 17, 2002, 1867-1871.
111. Christensen E.I., Verroust P.J.: Megalin and cubilin, role in proximal tubule function and during development. *Pediatr Nephrol*, 17, 2002, 993-999.
112. Christensen E.I., Birn H.: Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, 2001, F562-573.
113. Christensen E.I., Gburek J.: Protein reabsorption in renal proximal tubule-function and dysfunction in kidney pathophysiology. *Pediatr Nephrol*, 19, 2004, 714-721.
114. Barth J.L., Argraves W.S.: Cubilin and megalin: partners in lipoprotein and vitamin metabolism. *Trends Cardiovasc Med*, 11, 2001, 26-31.
115. Gburek J., Verroust P.J., Willnow T.E., Fyfe J.C., Nowacki W., Jacobsen C., Moestrup S.K., Christensen E.I.: Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin. *J Am Soc Nephrol*, 13, 2002, 423-430.
116. Mogensen C.E., Solling: Studies on renal tubular protein reabsorption: partial and near complete inhibition by certain amino acids. *Scand J Clin Lab Invest*, 37, 1977, 477-486.
117. Solling K., Mogensen C.E.: Studies on the mechanism of renal tubular protein reabsorption. *Proc Eur Dial Transplant Assoc*, 14, 1977, 543-549.
118. De Jong M., Rolleman E.J., Bernard B.F., Visser T.J., Bakker W.H., Breeman W.A., Krenning E.P.: Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo. *J Nucl Med*, 37, 1996, 1388-1392.
119. Barone R., Pauwels S., De Camps J., Krenning E.P., Kvols L.K., Smith M.C., Bouterfa H., Devuyt O., Jamar F.: Metabolic effects of amino acid solutions infused for renal protection during therapy with radiolabelled somatostatin analogues. *Nephrol Dial Transplant*, 19, 2004, 2275-2281.
120. Rolleman E.J., Krenning E.P., Van Gameren A., Bernard B.F., De Jong M.: Uptake of [<sup>111</sup>In-DTPA<sup>0</sup>]octreotide in the rat kidney is inhibited by colchicine and not by fructose. *J Nucl Med*, 45, 2004, 709-713.
121. Van Eerd J.E., Vegt E., Wetzels J.F., Russel F.G., Masereeuw R., Corstens F.H., Oyen W.J., Boerman O.C.: Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of <sup>111</sup>In-octreotide in mice and rats. *J Nucl Med*, 47, 2006, 528-533.
122. Behe M., Kluge G., Becker W., Gotthardt M., Behr T.M.: Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys. *J Nucl Med*, 46, 2005, 1012-1015.
123. Rolleman E.J., Forrer F., Bernard B., Bijster M., Vermeij M., Valkema R., Krenning E.P., De Jong M.: Amifostine protects rat kidneys during peptide receptor radionuclide therapy with [<sup>177</sup>Lu-DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]octreotate. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34, 2007, 763-771.
124. Andreassen C.N., Grau C., Lindegaard J.C.: Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*, 13, 2003, 62-72.
125. Culy C.R., Spencer C.M.: Amifostine: an update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential therapeutic application in myelodysplastic syndrome. *Drugs*, 61, 2001, 641-684.
126. Moestrup S.K., Cui S., Vorum H., Bregengard C., Bjorn S.E., Norris K., Gliemann J., Christensen E.I.: Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest*, 96, 1995, 1404-1413.

127. Takano M., Nakanishi N., Kitahara Y., Sasaki Y., Murakami T., Nagai J.: Cisplatin-induced inhibition of receptor-mediated endocytosis of protein in the kidney. *Kidney Int*, 62, 2002, 1707-1717.
128. <http://www.techcorp.cz/> (staženo 2008).
129. <http://www.krackeler.com/products/1375-supplies/23123-gelman-itlc-media.Htm>, (staženo 2008).
130. [http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc) (staženo 2008).
131. Skoog D. A., West D.M., Holler F. J., *Fundamentals of analytical chemistry*, Saunders college publishing, Orlando, 1996.
132. *Gel filtration theory and practice*, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 1979.
133. [http://cs.wikipedia.org/wiki/gelová\\_chromatografie](http://cs.wikipedia.org/wiki/gelová_chromatografie), (staženo 2008).
134. Gekle M., Mildenerger S., Freudinger R., Schwerdt G., Silbernagl S.: Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *Am J Physiol*, 272, 1997, F668-677.
135. Gekle M., Mildenerger S., Freudinger R., Silbernagl S.: Kinetics of receptor-mediated endocytosis of albumin in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells): influence of Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Pflugers Arch*, 430, 1995, 374-380.
136. Gekle M., Mildenerger S., Freudinger R., Silbernagl S.: Endosomal alkalization reduces Jmax and Km of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells. *Am J Physiol*, 268, 1995, F899-906.
137. Gekle M., Mildenerger S., Freudinger R., Silbernagl S.: Functional characterization of albumin binding to the apical membrane of OK cells. *Am J Physiol*, 271, 1996, F286-291.
138. Courjault F., Gerin B., Leroy D., Chevalier J., Toutain H.: Morphological and biochemical characterization of the opossum kidney cell line and primary cultures of rabbit proximal tubule cells in serum-free defined medium. *Cell Biol Int Rep*, 15, 1991, 1225-1234.
139. Koyama H., Goodpasture C., Miller M.M., Teplitz R.L., Riggs A.D.: Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro*, 14, 1978, 239-246.
140. <http://cs.wikipedia.org/wiki/albumin>, (staženo 2008).
141. Petrik M. (2008) Příprava a analýza radioaktivně značených biologicky aktivních látek. Hradec Králové, Karlova univerzita v Praze.
142. Gekle M.: Renal Tubule Albumin Transport. *Annu Rev Physiol*, 2004.
143. Christensen E.I., Nielsen R.: Role of megalin and cubilin in renal physiology and pathophysiology. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 158, 2007, 1-22.
144. Cihlo J., Melicharova L., Petrik M., Laznickova A., Laznicek M.: Comparison of <sup>111</sup>In-DOTA-NOC and <sup>111</sup>In-DOTA-TATE distribution in the target and dose-limiting tissues: conflicting results in vitro and in vivo. *Anticancer Res*, 28, 2008, 2189-2195.



## 18 Přílohy

### 18.1 Články a monografie

1. Laznicek M., Laznickova A, Trejtnar F., Melicharova L., Cihlo J., Petrik M.: Preclinical comparison of DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate labelled with different radionuclides, Technical Reports Series No.458, IAEA, 2007, 73-86.
2. Cihlo J., Melicharova L., Petrik M., Laznickova A., Laznicek M.: Comparison of <sup>111</sup>In-DOTA-NOC and <sup>111</sup>In-DOTA-TATE distribution in the target and dose-limiting tissues: conflicting results in vitro and in vivo. *Anticancer Res*, 28(4B), 2008, 2189-2195.
3. Cihlo, J., Laznicek M.: Radiolabelled peptides in the diagnosis and therapy of tumours. *Ceska Slov Farm.*, 57, 2008, 70-77.
4. Barta P., Cihlo J., Laznickova A., Laznicek M: Determination of transport kinetics of somatostatin receptor-specific peptide to opossum kidney cells. *Prague Medical Report*, 109 (Suppl), 2008, 6-8.
5. Cihlo J., Petrik M., Barta P., Laznickova A. Laznicek M.: Receptor- mediated endocytosis of monoclonal antibody AntiCD66 radiolabelled with <sup>111</sup>In and <sup>90</sup>Y in opossum kidney cell line (přijato k publikaci *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae*, podzim 2008)

### 18.2 Výstupy z konferencí

1. Cihlo J., Laznicek M.: Uptake studies of radiolabelled receptor specific peptides and FITC-albumin into the renal cells. *Journal of Science & Technology*, 1(2), 2005, 171.
2. Cihlo J., Petrik M., Laznicek M.: Comparison of the kidney uptake of two somatostatin analogue labeled with In-111. *World Journal of Nuclear Medicine*, 5 (1 Suppl), 2006, 3048.
3. Cihlo J., Laznicek M.: Comparison of <sup>111</sup>In and <sup>177</sup>Lu-DOTA-Tyr(3)-octreotate uptake in the renal cells, *Farmakológia (zborník prác)*, 2006, 89.
4. Laznicek M., Laznickova A, Cihlo J.: The assess of capability of some compounds to reduce the renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33 (Suppl 2), 2006, S65-S416.

### 18.3 Konference navštívené během studia

1. The 1<sup>st</sup> International Mediterranean Pharmacy Congress, Mersin, Turkey (2004)
2. 9th Congress of World Federation of Nuclear Medicine & Biology, Seoul, Korea (2006)
3. 56. Farmakologické dni v Bratislavě (2006)

### 18.4 Scany vybraných článků

Pod titulky obrázků 60 a 61 jsou prezentovány vybrané články, první z impaktovaného časopisu *Anticancer Research* a druhý z českého periodika *Česká a slovenská farmacie*.

Obrázek 60 Cihlo J., Melicharova, L., Petrik, M., Laznickova, A., Laznicek, M.: Comparison of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE distribution in the target and dose-limiting tissues: conflicting results in vitro and in vivo. *Anticancer Res*, 28(4B), 2008, 2189-2195.

ANTICANCER RESEARCH 28: 2189-2196 (2008)

## Comparison of $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC and $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE Distribution in the Target and Dose-limiting Tissues: Conflicting Results *In Vitro* and *In Vivo*

JAN CIHLO<sup>1</sup>, LUDMILA MELICHAROVÁ<sup>1</sup>, MILOS PETRIK<sup>2</sup>, ALICE LAZNICKOVA<sup>2</sup> and MILAN LAZNICEK<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Pharmacology and Toxicology, and <sup>2</sup>Biophysics and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic

**Abstract.** *Background:* In this study, some important biological characteristics of two radiolabelled somatostatin analogues  $^{111}\text{In}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-octreotide (DOTA-NOC) and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate (DOTA-TATE) were compared. *Materials and Methods:* Rats were used for in vivo biodistribution experiments and in vitro cell models (OK and AR42J cell lines) were used for simulating the internalization in the kidney and in subtype 2 somatostatin receptor (SSTR2)-positive tissues, respectively. *Results:* Significantly higher radioactivity concentrations in rat organs with high density of somatostatin receptors after  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC administration in comparison with  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE were observed. The predominant urine excretion was associated with accumulation of the radioactivity in the kidney, where higher retention of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE compared to  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC was detected. In the OK cell line the opposite results were found. No significant differences in the in vitro internalization and externalization of radioactivity to AR42J cell line were found for either peptide suggesting their same affinity for SSTR2. *Conclusion:* Preclinical experiments indicated that  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC is a very promising peptide for somatostatin receptor-positive tumour visualization. The conflict between the in vitro and in vivo kidney handling showed that the transfer of results from in vitro to in vivo conditions and their interpretation should be performed very carefully because both types of experiments can be affected by different factors, making their simple comparison difficult.

Radiolabelled somatostatin (SST) analogues have great potential for visualization and treatment of somatostatin receptor (SSTR)-positive tumours and their metastases that are predominantly of neuroendocrine origin.

A sufficiently long biological half-life, the possibility of labelling with various radionuclides and, in particular, the ability of SSTR-positive tumour cells to specifically bind and internalize radiolabelled SST analogues are among the crucial conditions for in vivo targeting of tumour cells with a high density of SSTR. Whereas some SST analogues labelled with gamma emitters such as indium-111-( $^{111}\text{In}$ ) pentetreotide ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide, Octreoscan®) or technetium-99m( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )-depreotide (NeoTect™) are commercially available and clinically successfully used for visualisation of different types of tumours and their metastases, therapeutic application of SST analogues labelled with  $\beta$ -emitting particles (lutetium-177, yttrium-90) is accompanied by occurrence of delayed radiation-induced toxicity to kidney, bone marrow and liver (1, 2). The kidney is considered to be the dose-limiting organ for treatment of SSTR-positive diseases (3). According to published studies, nephrotoxicity can be caused by proximal tubular cell reuptake by nonspecific endocytic megalin receptor after glomerular ultrafiltration and long-term retention of radioactivity in the kidney (4-6). However, compounds that are able to reduce renal uptake such as the amino acids lysine and arginine, polyglutamic acid (5 or more polyglutamic acids residues), or gelofusine (gelatine plasma expander) do not exclude the assistance of other transport systems participating in the reuptake in the kidney (6-10).

Because of the unequal distribution of SSTR subtypes (SSTR1-5) in SSTR-positive malignancies (SSTR2 and SSTR5 are the most frequent in neuroendocrine tumour cells) and the varying affinity of SST analogues for these receptor subtypes, variations in the structures of well-tried analogues (octreotide, lanreotide, octreotate) are made to increase the binding affinity for all of the five known receptor subtypes (11-13). In 2003, Reubi *et al.* reported 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-*N,N,N'*,

*Correspondence to:* Professor Milan Laznicek, Ph.D., Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Heyrovskeho 1203, CZ-500 05 Hradec Kralove, Czech Republic. Tel: +420495067450, Fax: +420495067170, e-mail: laznicek@faf.cuni.cz

*Key Words:* Somatostatin analogues,  $^{111}\text{In}$ -DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-octreotide,  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate, tumour targeting, renal handling, biodistribution, AR42J cells, OK cells.

0250-7005/2008 \$2.00+ .40

2189

$N^{\text{tr}}$ , tetraacetic acid (DOTA)-1-Nal<sup>3</sup>-octreotide (DOTA-NOC) to be a high affinity ligand of SSTR subtypes 2, 3 and 5 ( $IC_{50}$  2.9±0.1 nM, 8±2 nM, 10.4±1.6 nM, respectively) (14). Because there is a possibility that changes in the structure can affect not only the specific binding to SSTRs but also the tissue distribution in the body, here we determined SSTR2 internalization as well as biodistribution characteristics (focused predominantly on the kidney) of the relatively new SST analogue <sup>111</sup>In-labelled DOTA-NOC. The results were compared with those of the well established <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate (DOTA-TATE). It is known that this SST analogue has excellent affinity to SSTR2 ( $IC_{50}$  of DOTA-Tyr<sup>3</sup>-octreotate is 1.5±0.4 nM), but low or no affinity to other SSTRs (11).

The aim of this work was to compare the biological characteristics of the two somatostatin analogues DOTA-TATE and DOTA-NOC with the view to assess the merits of the latter peptide for tumour visualization and therapy. For biodistribution experiments, male Wistar rats were used. The organs bearing a high density of SSTRs (namely the pancreas and adrenals) served as an endogenous marker of the agent's affinity to SSTRs *in vivo*. For comparison of the SSTR internalization/externalization characteristics, a rat pancreatic tumour cell line, AR42J, that is known to express SSTR2 was used. To predict the potential risk of investigated peptides in the kidney, an uptake experiment in the opossum kidney (OK) cell line was carried out, in an established model for studying renal tubular transport (4, 15-18).

## Materials and Methods

**Reagents.** RPMI-1640 medium, minimum essential medium (MEM), fetal calf serum (FCS), L-glutamine, nonessential amino acids (NEAA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)/trypsin, 3-(morpholino)-propanesulphonic acid (MOPS), *N*-(2-hydroxyethyl)-piperazine-*N'*-(2-ethanesulphonic acid) (HEPES), Triton<sup>®</sup>-X-100 and chemicals used for radiolabelling, high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis and instant thin-layer chromatography on silica gel (ITLC-SG) were obtained from Sigma-Aldrich, Czech Republic. Peptides DOTA-TATE and DOTA-NOC were purchased from pICHEM, Gratz, Austria; OK and AR42J cell lines from ECACC, Salisbury, UK; and Indium [<sup>111</sup>In] Chloride Solution was purchased from GE Healthcare, Amersham, UK. Octreotide (Sandostat<sup>®</sup>) was a commercial product of Novartis, Basel, Switzerland. ITLC-SG was performed on commercial SG impregnated glass fibre sheets (Gelman Sciences, Michigan, USA). Bicinchoninic acid assay (BCA) kit was from (Pierce, Rockford, USA).

Ringer solution was composed of (mM): NaCl 122.5, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.2, MgCl<sub>2</sub> 0.8, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, glucose 5 and HEPES 10 (titrated to pH 7.4 by NaOH at 37°C). Phosphate-buffered saline (PBS) was composed of (mM): NaCl 137, KCl 2.7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01 (titrated to pH 7.4). Acid wash buffer was composed of 50 mM glycine buffer pH 2.8, and 0.1 M NaCl.

**Radiolabelling and radiochemical purity analysis.** Two hundred microlitres of 0.4 M acetate buffer (pH 5) with 0.24 M gentisic acid, 10 µg DOTA-TATE or DOTA-NOC in 10 µl of H<sub>2</sub>O and 0.5 mCi

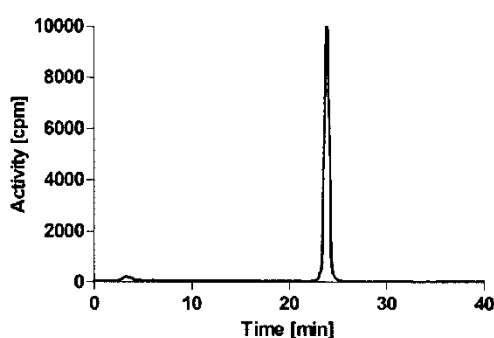
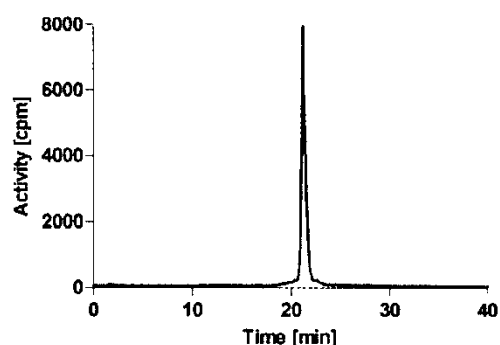
<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl were sequentially added to a vial. The solution was mixed well and then incubated at 90-95°C for 25 min. For determination of radiochemical purity, RP-HPLC analysis (HPLC System Agilent 1100 Series with gamma radiation and UV detector) (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) was conducted on a Waters RP18 Symmetry Shield column (Waters Corp., Milford, MA, USA) with gradient elution with 0.1% trifluoroacetic acid and 3% acetonitrile as mobile phase A. Mobile phase B contained 90% acetonitrile in water. The elution sequence was 0-5 min of 0% B, 5-25 min of 0-30% B, 25-30 min of 30% B, 30-33 min of 30-100% B, 33-38 min of 100% B and 38-40 min of 100-0% B. Samples for HPLC analysis were prepared by dissolving of 2 µl of radiolabelled peptide solution in 100 µl of mobile phase A together with 10 µl of 1×10<sup>-3</sup> M DTPA. ITLC-SG analysis was used for eliminating the possibility of radioactive particulate contamination and was performed on silica gel impregnated glass fibre sheets with 10% ammonium acetate and methanol 1:1 as the eluent. Detection of ITLC-SG strips was carried out by TLC-analyzer (Raytest, Straubenhardt, Germany).

**Distribution studies in rats.** Male Wistar rats weighing 200-250 g were used for biodistribution experiments. The animals were fasted overnight before the experiment (to empty the bowels) but had free access to water. The radiopharmaceutical was administered to rats intravenously in a volume of 0.2 ml (0.8 µg of the peptide per kg of body weight). For determination of receptor-mediated binding in the organs and tissues of rats, together with control samples, two groups of animals were pretreated by intravenous injection of 100 µg octreotide (Sandostat<sup>®</sup>) per kg 15 min before <sup>111</sup>In-DOTA-TATE or <sup>111</sup>In-DOTA-NOC were administered. During the course of experiments, the animals were placed singly in cages. At selected times (5 min, 1 h, 2 h, 24 h and 48 h) after dosing, the carotid artery was exposed under ether anaesthesia and a blood sample was collected in glass tubes containing dry heparin. After exsanguination, the tissues and organs of interest were removed and weighed, and their radioactivity was measured. In the first pretreated group of animals, the distribution of radioactivity after 2 h of dosing was determined. The second group was used for elimination studies and for the determination of radioactivity distribution at 48 h after administration of the radiopharmaceuticals.

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

**Internalization/externalization experiments in AR42J cells.** AR42J cells were grown in RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% FCS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Subculturing was performed employing a (EDTA)/trypsin solution. Experiments were performed at passages 20-32.

For internalization studies, the cells were treated with (EDTA)/trypsin solution and concentrated to 1×10<sup>6</sup> cells per ml of internalization medium (RPMI 1640 supplemented with 2 mM L glutamine and 1% FCS) per microcentrifuge tube. Incubation was started by the addition of 1 µg of radiolabelled peptide per tube (0.66 nM). Cells were incubated at 37°C in triplicates for both peptides for the indicated time periods. Cellular uptake was stopped by removal of the internalization medium and washing of the cells with ice-cold PBS (2x). Thereafter, the cells were incubated twice at ambient temperature in acid wash buffer for 5 min. The supernatant was removed and cells were lysed by treatment of 1 M NaOH and cell radioactivity collected (internalized radioligand fraction).

Figure 1. HPLC radioactivity profile of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC.Figure 2. HPLC radioactivity profile of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE.

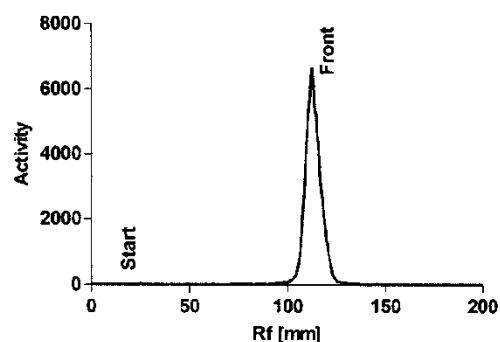
For externalization studies AR42J cells ( $1 \times 10^6$ ) were incubated with 1 ng of radiolabelled peptide for 120 min. The medium was then removed and the cells were washed with ice-cold PBS. Thereafter the cells were incubated twice at ambient temperature in acid wash buffer for 5 min. Cells were then incubated again at 37°C with fresh externalization medium (RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine and 1% FCS). At indicated time points the external medium was removed for quantification of radioactivity and replaced with fresh externalization medium.

**Uptake experiments in OK cells.** Renal OK cells were grown in plastic 75 cm<sup>2</sup> culture flasks in MEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 1% NEAA and 10% FCS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Confluent monolayers were split 1:6 twice a week using (EDTA)/trypsin solution. For experiments, OK cells (passage number 55 62) were grown to confluency on plastic Petri dishes (6 cm diameter). Confluent monolayers were washed (2x) first with PBS and incubated simultaneously for indicated intervals (0, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 3 h) with the same concentration (1 nM) of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC in Ringer solution (37°C). At the end of the incubation, the uptake buffer was discarded and the dishes with cell monolayers were rapidly rinsed with ice-cold PBS (6x). The cells were disintegrated by Triton® X-100 (0.1% v/v) in 10 mM MOPS. To elicit the measuring error caused by nonspecific sorption to the cells and Petri dishes, the radioactivity uptake at time 0 was used as a blank value where the internalization medium was discarded immediately after addition. The intracellular radioactivity was normalized to the cell protein content by the BCA method.

**Measurement of  $^{111}\text{In}$  activity.**  $^{111}\text{In}$  activity was measured by a gamma spectrometer 1480 Wizard™ 3<sup>r</sup> (Wallac, Finland). Radioactivity of all measured samples was compared with those of standard samples.

## Results

**Radiochemical purity of the peptides under study.** The HPLC analysis of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE showed single peaks with elution times of 23.8 min and 21.2

Figure 3. An example of ITLC-SG radioactivity profile ( $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE).

min, respectively (Figures 1 and 2). Radiochemical purity was over 98% in all cases.

In the ITLC-SG analysis, respectively in the system that was used for this purpose, labelled peptide moved with the solvent and the unbound radiometal remained at the start of the chromatograph (Figure 3). Radiochemical purity determined by this method was greater than 98%, identical to the results measured by HPLC.

**Distribution studies in rats.** The distribution (% administered dose per g of organ or tissue) of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC in blood and selected organs of rats at intervals from 5 min to 48 h is summarized in Tables I and II. Each value represents the mean ± standard deviations of a minimum of four animals.

Both agents exhibited rapid radioactivity clearance from the blood and most organs and tissues (spleen, testes, brain, thyroid, lung, femur, skin, abdominal fat, muscle). The long-

Table I. Distribution of <sup>111</sup>In-DOTA-NOC in selected organs and tissues of rats. Data are expressed as mean±SD.

<sup>111</sup> In-DOTA-NOC (% administered dose/g organ or tissue)							
Organ	5 min	1 h	2 h	2 h	24 h	48 h	48 h
				Pretreated			Pretreated
Blood	1.15±0.16	0.28±0.05	0.06±0.01	0.05±0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01
Plasma	2.09±0.36	0.51±0.09	0.11±0.02	0.09±0.03	≤0.01	≤0.01	≤0.01
Pancreas	<b>6.17±1.37</b>	<b>12.02±2.50</b>	<b>9.02±3.49</b>	<b>1.33±0.23</b>	<b>6.01±1.25</b>	<b>4.38±0.60</b>	<b>1.11±0.23</b>
Liver	0.59±0.15	0.38±0.06	0.23±0.05	0.19±0.06	0.25±0.02	0.17±0.03	0.19±0.04
Adrenals	<b>12.52±0.91</b>	<b>32.01±12.89</b>	<b>22.49±2.96</b>	<b>2.60±0.39</b>	<b>18.51±5.68</b>	<b>14.44±2.72</b>	<b>5.24±2.28</b>
Lung	1.04±0.21	0.34±0.02	0.12±0.02	0.08±0.02	0.07±0.03	0.04±0.02	0.02±0.01
Kidneys	<b>6.73±2.56</b>	<b>2.84±0.28</b>	<b>2.13±2.29</b>	<b>1.84±0.60</b>	<b>2.21±0.16</b>	<b>2.10±0.34</b>	<b>2.30±0.46</b>
Heart	0.62±0.13	0.17±0.03	0.04±0.01	0.03±0.01	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01
Spleen	0.59±0.20	0.23±0.08	0.17±0.16	0.07±0.03	0.24±0.18	0.09±0.04	0.07±0.01
Stomach	1.05±0.21	1.08±0.14	1.47±1.01	0.28±0.20	0.89±0.05	0.47±0.22	0.20±0.05
Intestine	0.51±0.20	0.50±0.26	0.75±0.67	0.25±0.22	0.25±0.03	0.17±0.01	0.06±0.02
Colon	0.35±0.30	0.29±0.08	0.25±0.09	0.07±0.02	0.88±0.24	0.40±0.11	0.22±0.07
Testes	0.13±0.03	0.09±0.01	0.03±0.00	0.02±0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01
Skin	0.49±0.06	0.19±0.03	0.07±0.02	0.05±0.02	0.04±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
Muscle	0.25±0.09	0.06±0.01	0.02±0.00	0.01±0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01
Thyroid	1.08±0.27	0.44±0.09	0.20±0.05	0.07±0.03	0.07±0.01	0.05±0.00	0.03±0.01
Brain	0.05±0.01	0.02±0.00	≤0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01
Body fat	0.41±0.18	0.08±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	≤0.01	0.01±0.01
Femur	0.44±0.12	0.43±0.10	0.23±0.04	0.29±0.39	0.33±0.03	0.20±0.02	0.09±0.03

Table II. Distribution of <sup>111</sup>In-DOTA-TATE in selected organs and tissues of rats. Data are expressed as mean±SD.

<sup>111</sup> In-DOTA-TATE (% administered dose/g organ or tissue)							
Organ	5 min	1 h	2 h	2 h	24 h	48 h	48 h
				Pretreated			Pretreated
Blood	0.98±0.19	0.15±0.01	0.04±0.01	0.04±0.02	≤0.01	≤0.01	0.04±0.002
Plasma	1.86±0.27	0.27±0.03	0.08±0.01	0.07±0.03	≤0.01	≤0.01	0.07±0.03
Pancreas	<b>4.90±0.88</b>	<b>7.82±0.84</b>	<b>7.63±0.98</b>	<b>1.64±0.19</b>	<b>2.97±0.25</b>	<b>3.05±0.34</b>	<b>1.64±0.19</b>
Liver	0.26±0.04	0.11±0.02	0.09±0.01	0.07±0.01	0.05±0.00	0.07±0.01	0.07±0.01
Adrenals	<b>6.74±4.62</b>	<b>17.64±3.22</b>	<b>16.94±1.66</b>	<b>1.80±0.41</b>	<b>10.44±2.60</b>	<b>9.39±2.27</b>	<b>1.80±0.41</b>
Lung	0.67±0.12	0.14±0.01	0.07±0.01	0.05±0.01	0.03±0.00	0.02±0.01	0.05±0.01
Kidneys	<b>7.42±1.75</b>	<b>3.08±0.42</b>	<b>3.08±0.42</b>	<b>3.03±0.73</b>	<b>2.84±0.67</b>	<b>2.80±0.73</b>	<b>3.03±0.73</b>
Heart	0.31±0.21	0.07±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	≤0.01	≤0.01	0.02±0.01
Spleen	0.26±0.05	0.07±0.01	0.12±0.07	0.04±0.01	0.04±0.02	0.08±0.05	0.04±0.01
Stomach	1.07±0.18	0.65±0.40	1.67±1.46	0.18±0.04	0.59±0.08	0.39±0.06	0.18±0.04
Intestine	0.42±0.06	0.30±0.06	1.03±1.09	0.11±0.03	0.17±0.02	0.13±0.02	0.11±0.03
Colon	0.17±0.12	0.17±0.11	0.23±0.03	0.06±0.01	0.74±0.14	0.34±0.25	0.06±0.01
Testes	0.12±0.01	0.06±0.00	0.02±0.01	0.02±0.01	≤0.01	≤0.01	0.02±0.01
Skin	0.38±0.08	0.08±0.05	0.04±0.01	0.03±0.01	0.02±0.00	≤0.01	0.03±0.01
Muscle	0.16±0.10	0.03±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	≤0.01	≤0.01	0.0±0.003
Thyroid	0.88±0.15	0.26±0.11	0.10±0.00	0.05±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01
Brain	0.04±0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01	≤0.01
Body fat	0.14±0.13	0.06±0.02	0.01±0.00	0.02±0.01	≤0.01	≤0.01	0.02±0.01
Femur	0.26±0.03	0.20±0.03	0.17±0.03	0.07±0.01	≤0.01	0.12±0.01	0.07±0.01

term retention and high radioactivity concentrations for both compounds under study were found in the kidneys, and in organs with a high density of SSTRs, such as the pancreas and

adrenals, as well as in stomach and intestine. The distribution of <sup>111</sup>In-DOTA-NOC in crucial organs was (nearly two-fold) higher in comparison with that of <sup>111</sup>In-DOTA-TATE. In order

Table III. Cumulative excretion of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE in rats without pretreatment with octreotide.

	2 h		24 h		48 h	
	Urine	Faeces	Urine	Faeces	Urine	Faeces
$^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC	32.9±19.4	50.8±17.7	11.3±4.8	67.3±19.8	16.1±3.7	
$^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE	60.5±12.3	67.5±13.1	8.1±6.4	69.6±13.1	13.2±7.7	

Data are expressed as a percentage of the administered dose (mean±SD).

Table IV. Cumulative excretion of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE in rats which were pretreated with octreotide.

	2 h		24 h		48 h	
	Urine	Faeces	Urine	Faeces	Urine	Faeces
$^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC	55.9±24.5	67.8±29.5	5.1±0.3	81.2±35.4	9.2±4.5	
$^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE	58.6±22.4	75.8±6.0	4.9±1.8	77.5±6.4	8.3±3.4	

Data are expressed as a percentage of the administered dose (mean±SD).

to partially block somatostatin receptor-mediated distribution, octreotide (unlabelled somatostatin analogue) was injected intravenously 15 min before  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE and  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC administration. Activity in the organs with a high density of somatostatin receptors (pancreas and adrenals) was significantly reduced by this pretreatment with unlabelled octreotide (Tables I and II). Significant decreases in radioactivity in the gastrointestinal tract (stomach and bowels) after receptor blockade were also determined both 2 h and 48 h after dosing (Tables I and II).

Cumulative urinary/faecal excretion of both agents is summarized in Table III (control group) and Table IV (pretreated group). Both investigated peptides were excreted predominantly in the urine; excretion of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC in control animals was delayed compared to  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE. The receptor blockade with octreotide reduced the fraction of radioactivity excreted in the faeces, intensifying the urinary excretion. The highest activity of both studied radiolabelled peptides in the kidneys was found shortly after their administration. Kidney retention of  $^{111}\text{In}$  DOTA TATE was higher than that of  $^{111}\text{In}$  DOTA NOC at all indicated time intervals.

**Internalization/externalization experiments in AR42J cells.** The results from internalization studies of the SSTR2 positive AR42J cell line are expressed in Figure 4 and show that both investigated peptides were internalized at nearly the same range. Presented values are expressed as specific internalization (% administered dose to 1 million cells at 0.66 nM concentration). The values from externalization experiments were similar for both peptides under study and

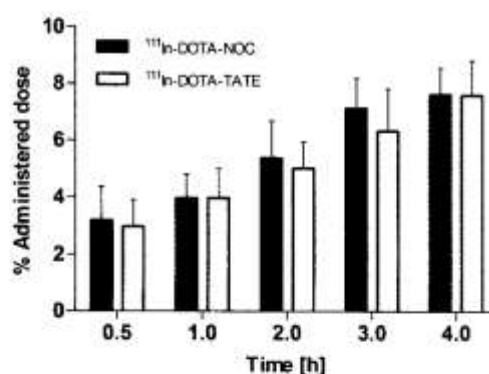


Figure 4. Internalization in the AR42J cell line. Data expressed as mean±SD.

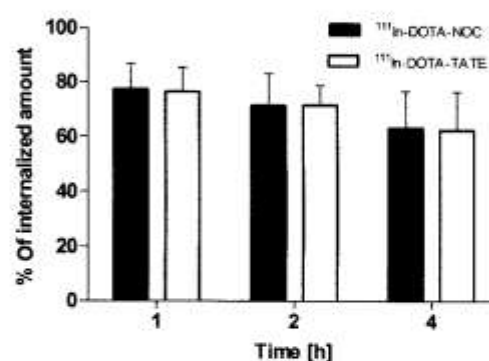


Figure 5. Externalization in the AR42J cell line. Data expressed as mean±SD.

are expressed in Figure 5. All values are results of three independent experiments with triplicates in each experiment.

**Uptake experiments in OK cells.** Results obtained from uptake experiments in the renal OK cell line are expressed in Figure 6. Uptake of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-NOC showed similar kinetics to that of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-TATE (maximum of uptake between 2 and 3 h of incubation) but was three-fold more effective. All values are the results of three independent experiments with triplicates in each experiment.

## Discussion

Many of radiolabelled SST analogues have been developed for identification, localization and treatment of neuroendocrine tumours and metastases. The present work

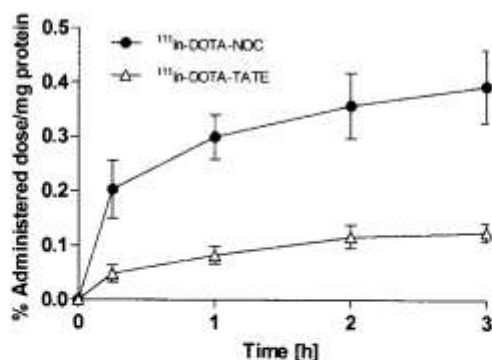


Figure 6. Internalization in the OK cell line. Data expressed as mean $\pm$ SD.

focused on the analysis of some new characteristics of the SST analogue  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  that should possess better properties for targeting SSTR-positive tumours compared to others, especially through its larger binding spectrum to discrete SSTRs (14). Biological properties of  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  were compared with those of the well-established peptide  $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$ . Because there is the explicit tendency to obtain preclinical results using various *in vitro* techniques recently, we provided internalization experiments in two different cell lines (SSTR2-positive AR42J cell line and kidney megalin/cubilin-positive OK cell line) with the view to comparing the conclusions of these experiments with results obtained in rat biodistribution studies.

In rats, both studied peptides were quickly cleared from the blood and most organs and tissues. Nevertheless, long-term retention of radioactivity in SSTR-rich organs (the pancreas, adrenals, and some others) and also in the kidneys was detected. Our results showed that octreotide premedication significantly reduced the radioactivity uptake in SSTR-positive tissues and also in the gastrointestinal tract (GIT). This finding is different from that in the kidney, where no significant effect of somatostatin receptor blockade on renal uptake of radioactivity was found. The blockade reduced both radioactivity accumulation in the GIT and the fraction of radioactivity excreted in faeces. On the contrary, the fraction of urinary excreted radioactivity was higher in the pretreated group. In interspecies comparison, it has been confirmed that the gastric mucosa of rats contains primarily SSTR2 while in human intestine SSTR1 mainly is expressed (19). This means that the situation in man is different and receptor-mediated uptake of the agents under study in the GIT of man is negligible or slight.

On interdrug comparison, significantly higher (nearly two-fold) radioactivity concentrations in rat organs with a high density of somatostatin receptors (namely the adrenals and

pancreas) after  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  in comparison with  $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$  were determined. These organs could serve as endogenous indicators of *in vivo* affinity of the agents to SSTRs. On the other hand, no significant differences in the *in vitro* internalization and externalization of radioactivity in the AR42J cell line were found for either peptide under study, in agreement with the similar affinity of both compounds for SSTR2 (AR42J cell line exhibits only SSTR2). This difference between *in vivo* and *in vitro* results can be attributed to the formerly reported enhanced affinity profile of  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  to SSTR subtypes in comparison with  $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$  and partial binding of the former agent to SSTR3 and -5 in rat SSTR-rich organs.

Slower blood radioactivity-time decrease for  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  in comparison with  $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$  and also a slower elimination rate of radioactivity to urine could be explained by higher plasma protein binding of the former peptide due to its higher lipophilicity. The slower elimination rate of  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  from the central compartment also resulted in its higher radioactivity concentrations in other non SSTR positive organs and tissues with the exception of the kidneys. Considering the fact that the compounds under study are eliminated in the kidney predominantly by the mechanism of glomerular filtration, higher plasma binding also results in a slower renal elimination rate (given as a product of glomerular filtration rate and free peptide fraction in plasma).

In *in vivo* experiments, systematically lower (statistically significant only in the interval of 24 hours) radioactivity concentrations in the kidney after  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  in comparison with  $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$  were determined. Long term renal accumulation of radioactivity is a consequence of the peptide internalization by receptor-mediated endocytosis where the transmembrane scavenger-receptor system megalin/cubilin should participate in reabsorption of these radiolabelled peptides (4-6). To distinguish the potential risk of radionephrotoxicity after therapeutical use of the investigated radiolabelled peptides, the proximal tubule-derived OK cell line was also employed. However the results of these experiments surprisingly showed the tendency of  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  to internalize to a significantly higher extent than  $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$  in the OK cells (the uptake of  $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$  was three times higher than that of  $^{111}\text{In-DOTA-TATE}$ ).

These *in vitro* results lead to the opposite conclusions when compared to *in vivo* kidney radioactivity uptake studies. The reason for this is not quite clear yet. One can speculate about interspecies differences in the kidney transport of the peptides under study, the differences of transport mechanisms between isolated cells and the organ with intact architecture, the effect of the different lipophilicity of the agents to their transport across biological membranes in the whole kidney, the presence of other

transport/cotransport systems in the intact organ, amongst others. Nevertheless, this study showed that a transfer of results from *in vitro* to *in vivo* conditions and interpretation of the results between different species is not simple and should be performed very carefully.

### Acknowledgements

This grant was supported by grant No. 305/07/0535 of the Grant Agency of the Czech Republic. Authors wish to thank Mrs. J. Hoderova and Mrs. E. Teichmanova for their excellent technical assistance.

### References

- Weiner RE and Thakur ML: Radiolabeled peptides in oncology: role in diagnosis and treatment. *BioDrugs* 19: 145-163, 2005.
- Forrer F, Valkema R, Kwekkeboom DJ, De Jong M and Krenning EP: Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21: 111-129, 2007.
- Forrer F, Rolleman E, Hijster M, Melis M, Bernard B, Krenning EP and de Jong M: From outside to inside? Dose dependent renal tubular damage after high dose peptide receptor radionuclide therapy in rats measured with *in vivo*  $^{99m}\text{Tc}$ -DMSA-SPECT and molecular imaging. *Cancer Biother Radiopharm* 22: 40-49, 2007.
- Barone R, Van Der Smissen P, Devuyt O, Beaujean V, Pauwels S, Courtoy PJ and Jamar F: Endocytosis of the somatostatin analogue, octreotide, by the proximal tubule-derived opossum kidney (OK) cell line. *Kidney Int* 67: 969-976, 2005.
- De Jong M, Barone R, Krenning E, Bernard B, Melis M, Visser T, Gekle M, Willnow TE, Walrand S, Jamar F and Pauwels S: Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide. *J Nucl Med* 46: 1696-1700, 2005.
- Melis M, Krenning EP, Bernard BF, Barone R, Visser TJ and De Jong M: Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32: 1136-1143, 2005.
- Rolleman EJ, Valkema R, De Jong M, Kooij PP and Krenning EP: Safe and effective inhibition of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30: 9-15, 2003.
- Behe M, Kluge G, Becker W, Gotthardt M and Behr TM: Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys. *J Nucl Med* 46: 1012-1015, 2005.
- Van Eerd JE, Vegt E, Wetzels JF, Russel FG, Mascereeuw R, Corstens FH, Oyen J and Boerman OC: Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of  $^{111}\text{In}$ -octreotide in mice and rats. *J Nucl Med* 47: 528-533, 2006.
- Gotthardt M, Van Eerd-Vismale J, Oyen WJ, De Jong M, Zhang H, Rolleman E, Maecke HR, Behe M and Boerman O: Indication for different mechanisms of kidney uptake of radiolabeled peptides. *J Nucl Med* 48: 596-601, 2007.
- Reubi JC, Schar JC, Waser B, Wenger S, Heppeler A, Schmitt JS and Maecke HR: Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 27: 273-282, 2000.
- Reubi JC, Waser B, Schar JC and Laissue JA: Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med* 28: 836-846, 2001.
- Ginj M, Schmitt JS, Chen J, Waser B, Reubi JC, De Jong M, Schulz S and Maecke HR: Design, synthesis, and biological evaluation of somatostatin-based radiopeptides. *Chem Biol* 13: 1081-1090, 2006.
- Wild D, Schmitt JS, Ginj M, Maecke HR, Bernard BF, Krenning E, De Jong M, Wenger S and Reubi JC: DOTA-NOC, a high affinity ligand of somatostatin receptor subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30: 1338-1347, 2003.
- Brunskill NJ, Nahoeki S and Walls J: Characteristics of albumin binding to opossum kidney cells and identification of potential receptors. *Pflügers Arch* 433: 497-504, 1997.
- Gekle M, Mildnerberger S, Freudingner R, Schwerdt G and Silbernagl S: Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *Am J Physiol* 272: 668-677, 1997.
- Gekle M, Mildnerberger S, Freudingner R and Silbernagl S: Kinetics of receptor-mediated endocytosis of albumin in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells): influence of  $\text{Ca}^{2+}$  and cAMP. *Pflügers Arch* 430: 374-380, 1995.
- Gekle M, Mildnerberger S, Freudingner R and Silbernagl S: Endosomal alkalization reduces  $J_{\text{max}}$  and  $K_m$  of albumin receptor mediated endocytosis in OK cells. *Am J Physiol* 268: 899-906, 1995.
- Robben J, Reubi JC, Pollak Y and Voorhout G: Biodistribution of [ $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe $^1$ ] octreotide in dogs: uptake in the stomach and intestines but not in the spleen points towards interspecies differences. *Nucl Med Biol* 30: 225-232, 2003.

Received February 14, 2008

Revised April 22, 2008

Accepted May 8, 2008



## Radioaktivně značené peptidy v diagnostice a terapii nádorů

CIHLO J., LAZNÍČEK M.

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie

Došlo: 10. ledna 2007 / Přijato: 31. ledna 2008

### SOUHRN

#### Radioaktivně značené peptidy v diagnostice a terapii nádorů

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy se v posledních dvaceti letech profilovaly jako významná léčiva výrazně rozšiřující diagnostické a terapeutické možnosti převážně neuroendokrinních nádorů. Zásadním cílem této přehledné práce je co nejprůhledněji informovat českou vědeckou veřejnost o významu a limitech použití této cenné skupiny radiofarmak v klinické praxi.

**Klíčová slova:** radiofarmaka – diagnostika – terapie – nádory – receptorově specifické peptidy

*Ces. slov. Farm.*, 2008; 57, 70–77

### SUMMARY

#### Radiolabelled peptides in the diagnosis and therapy of tumours

In the last two decades, radiolabelled receptor-specific peptides have profiled themselves as excellent tools that have expressively increased the diagnostic and therapeutical possibilities of tumours predominantly of neuroendocrine origin. The aim of this review paper is to transparently inform the Czech scientific fraternity about the significance and limitations of the use of this group of radiopharmaceuticals in clinical practice.

**Key words:** radiopharmaceuticals – diagnosis – therapy – cancers – receptor-specific peptides

*Ces. slov. Farm.*, 2008; 57, 70–77

*MJ*

Radioaktivně značené peptidy tvoří významnou skupinu léčiv, které umožňují pomocí vysoce citlivých neinvazivních metod identifikaci, lokalizaci a terapii určitého typu nádorů. Podstatou jejich diagnosticko-terapeutického využití v nukleární medicíně je výskyt receptorů v nádorových tkáních schopných tyto látky specificky vázat<sup>1)</sup>. Mezi nejčastěji používané radioaktivně značené receptorově specifické peptidy patří analogy odvozené od fyziologického hormonu somatostatinu<sup>2-4)</sup>. Spolu s dalšími přirozeně se vyskytujícími peptidy (tab. 1) patří somatostatin do skupiny regulačních peptidů projevujících se v organismu širokou škálou farmakologických účinků. Zatímco fyziologické působení somatostatinu je spíše inhibičního charakteru a zahrnuje například útlum sekrece růstového hormonu, insulinu, glukagonu, gastrinu, cholecystokininu a dal-

ších hormonů, ostatní peptidy této skupiny naopak často sekreci bioaktivních látek stimulují, a vyvolávají tak odpovídající farmakologický efekt<sup>5-11)</sup>. Toto rozsáhlé fyziologické působení je na cílových orgánech zprostředkováno stejnými membránovými receptory, které se ve velké hustotě vyskytují také v nádorových tkáních. Například výskyt somatostatinových receptorů je typický pro neuroendokrinní typ nádorů, receptory pro bombesin (gastrin releasing peptid) lze identifikovat u prsních nádorů a nádorů prostaty, receptory cholecystokininu v medulárních karcinomech štítné žlázy a receptory neurotensinu v exokrinních nádorech pankreatu<sup>1-12)</sup>. Specifické vychytávání radioaktivity na těchto receptorech je základním předpokladem využití radioaktivně značených peptidů v diagnostice a terapii tohoto typu nádorů.

**Adresa pro korespondenci:**  
prof. PharmDr. Ing. Milan Laznicek, CSc.,  
Katedra farmakologie a toxikologie FaF UK  
Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05;  
e-mail: milan.laznicek@faf.cuni.cz

Tab. 1. Příklady fyziologických peptidů studovaných z hlediska potenciálního využití v diagnostice a terapii nádorů<sup>1,4,6)</sup>

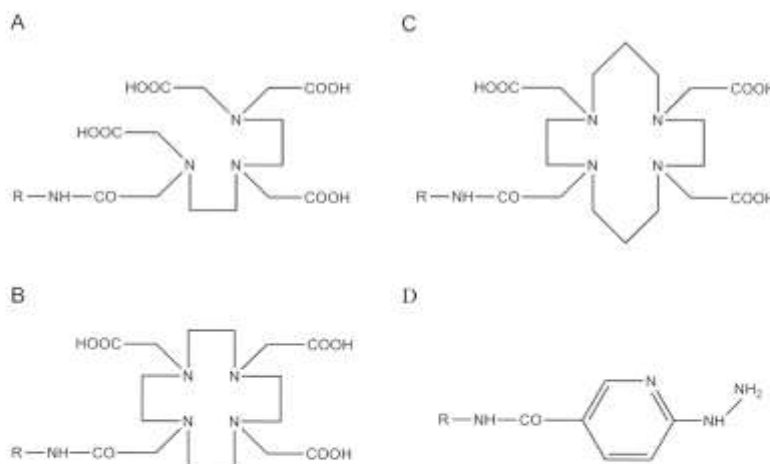
Peptid (počet AMK v řetězci)	receptory	příklady patologického výskytu receptorů
somatostatin, SSM (14, 28)	SSTR 1-5	SSTR1 – karcinomy a sarkomy prostaty; SSTR2 – neuroblastomy, meningiomy, meduloblastomy, prsní karcinomy, lymfomy, karcinomy renálních buněk, paragangliomy; SCLC, karcinomy jater; SSTR2 a 3 – neaktivní adenomy hypofýzy; SSTR2 a 5 – růstový hormon produkující adenomy hypofýzy; SSTR 2 a/nebo 1 gastroenteropankreatické nádory, feochromocytomy
vazoaktivní intestinální peptid (28)	VIP	adenokarcinomy, plicní (SCLC i NSCLC), pankreatické, ovariální, prostatické nádory, nádory močového měchýře
bombesin (40)	GRP-bombesin	plicní nádory, nádory prostaty a prsu, gastroenteropankreatické nádory, glioblastomy
neurotensin (13)	NTR 1, 2, 3	karcinomy exokrinního pankreatu, Ewingovy sarkomy
cholecystokinin (variabilní)	CCK A, B	CCK A – zřídka, CCK B – medulární karcinomy štítné žlázy, malobuněčný karcinom plic (SCLC), strumatózní nádory ovaria, astrocytomy
gastrin (34, 17, 14)	CCK B	
RGD-sequence (Arg-Gly-Asp)	GPIIb/IIIa	nádory různého původu – obecně nádory indukovaná angiogeneze
substance P (11)	NK1	mozkové nádory, medulární karcinomy štítné žlázy, prsní nádory
α-melanocyty stimulující hormon (13)	melanokortin 1-5	melanomy

AMK – aminokyselina, CCK – cholecystokinin, GRP – gastrin releasing peptid, NK – neurokinin, NSCLC (non small cell lung cancer) nemalobuněčný nádor plic, NTR – neurotensinové receptory, RDG – jednopísmenné označení aminokyseliny Arg-Gly-Asp, SCLC (small cell lung cancer) – malobuněčný nádor plic, SSTR – somatostatinné receptory, VIP – vazoaktivní intestinální peptid

#### Vývoj radioaktivně značených receptorově specifických radiofarmak

Jako specifické nosiče radioaktivity se využívají převážně syntetické analogy fyziologických peptidů. Za jejich prototypy lze bezesporu označit analogy odvozené od endogenního hormonu somatostatinu. Tohoto cyklic-

kého peptidu, který se skládá ze 14, respektive 28 aminokyselin (polypeptid z 28 aminokyselin se 14 aminokyselinovým somatostatinem na C-konci), nelze pro účely (molekulární) medicíny použít<sup>8,9)</sup>. Podobně jako u většiny ostatních fyziologických peptidů je limitem jeho použití krátký biologický poločas zapříčiněný rychlým štěpením struktury nativního peptidu sérovými endo- a exopepti-



Obr. 1. Bifunkční chelotační činidla  
 A – DTPA – diethylentriaminpentaocetová kyselina; B – DOTA – 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-*N,N,N',N''*-tetraocetová kyselina; C – TETA – 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-*N,N,N',N''*-tetraocetová kyselina; D – HYNIC – hydrazinonikotinamid

Tab. 2. Přehled radionuklidů využívaných ke značení peptidů

Radionuklid	typ záření	energie záření	dosah v tkáních průměrný (maxim.) /mm/	$T_{1/2}$	příklad diagnostického/ terapeutického peptidu	lit. odkaz
$^{125}\text{I}$	$\gamma$	$E_{\gamma}$ : 159 keV		13,2 h	$^{125}\text{I}$ -Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{125}\text{I}$ -VIP	<sup>19)</sup>
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	$\gamma$	$E_{\gamma}$ : 140 keV		6,0 h	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotid $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-Tyr <sup>3</sup> - oktreotid $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demotát 1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demotát 2	<sup>18,20)</sup>
$^{111}\text{In}$	Aug. $e$ $\gamma$	$E$ : 0,5–25 keV  $E_{\gamma}$ : 173 (87 %); 247 (94 %) keV	0,01	2,8 dne	$^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotid $^{111}\text{In}$ -DTPA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{111}\text{In}$ -DOTA-lanreotid $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát $^{111}\text{In}$ -růstový hormon	<sup>14,25)</sup>
$^{90}\text{Y}$	$\beta$	$E_{\text{max}}\beta$ : 2280 keV $E_{\beta}$ : 935 keV	4,1 (11,3)	64,8 h	$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát $^{90}\text{Y}$ -DOTA-1-Nal <sup>3</sup> -oktreotid	<sup>16,21)</sup>
$^{90}\text{Y}$	$\beta^+$ $\gamma$	$E_{\text{max}}\beta^+$ : 1220 (13 %); 1550 (6 %); 2000 (4 %) keV $E_{\beta}$ : 660 keV $E_{\gamma}$ : 443 (17 %), 628 (33 %), 1080 (83 %), 1150 (31 %), 1920 (21 %) keV		14,7 h	$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotid $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát	<sup>22)</sup>
$^{177}\text{Lu}$	$\beta$ $\gamma$	$E_{\text{max}}\beta$ : 497 keV $E_{\beta}$ : 149 keV $E_{\gamma}$ : 113(6%); 208 (11 %) keV	0,5 (2)	6,73 dne	$^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát	<sup>23,24)</sup>
$^{153}\text{Sm}$	$\beta$ $\gamma$	$E_{\text{max}}\beta$ : 810 keV $E_{\beta}$ : 235 keV $E_{\gamma}$ : 103 keV	0,6 (3,1)	1,95 dne	$^{153}\text{Sm}$ -CMDTPA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát	<sup>26)</sup>
$^{188}\text{Re}$	$\beta$ $\gamma$	$E_{\text{max}}\beta$ : 1960 (20 %); 2120 (78 %) keV $E_{\beta}$ : 765 keV $E_{\gamma}$ : 155 (10 %) keV	3,8 (11)	16,9 h	$^{188}\text{Re}$ -P2045	<sup>28)</sup>
$^{64}\text{Cu}$	$\beta$ $\beta^+$	$E_{\text{max}}\beta$ : 570 keV $E_{\text{max}}\beta^+$ : 653 keV $E_{\beta}$ : 278 keV	0,4	12,8 h	$^{64}\text{Cu}$ -TETA-Tyr <sup>3</sup> -oktreotát $^{64}\text{Cu}$ -TETA-oktreotid	<sup>25, 30, 31)</sup>

Aug.  $e$  – Augerovy elektrony,  $E_{\text{max}}$  – maximální energie záření,  $E_{\beta}$  – průměrná energie záření, CMDTPA – penta/tri-*tert*-butylkarboxymethyl DTPA; DTPA – diethyletriaminpentaoctová kyselina, DOTA – 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina, HYNIC – hydrazinonikotinamid; TETA – 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina

dasami. Obměnami v sekvenci aminokyselin přirozených peptidů (zkrácení peptidického řetězce, jeho amidace, acetylace, zavedení atypických D-aminokyselin, aminoalkoholů, neobvyklých aminokyselin nebo postranních řetězců) bylo dosaženo prodloužení biologického poločasu. Tyto stabilní peptidické struktury umožňují použití, ať už ve formě radioaktivně značených sloučenin (k diagnostice a terapii nádorů), nebo ve formě neznačených peptidů, například k inhibici symptomů souvisejících se zvýšenou hormonální sekrecí (analogy somatostatinu u adenomu hypofýzy produkujícího růstový hormon) <sup>17–19)</sup>. Příkladem stabilních peptidických derivátů s dostatečně dlouhým biologickým poločasem,

které jsou používány/testovány v souvislosti s nádory, mohou být analogy somatostatinu (oktreotid, lanreotid, vapreotid, oktreotát, 1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid). U oktreotidu bylo například dosaženo prodloužení biologického poločasu až na 90 minut oproti původní 1 až 3 minutám nativního somatostatinu, a to při zachování většiny jeho biologických funkcí <sup>16, 17)</sup>.

Zatímco afinita přirozeně se vyskytujících peptidů je ke všem receptorovým subtypům přibližně stejná, tedy vysoká, může se afinita syntetických analogů k jednotlivým receptorům značně lišit. Obměna peptidického řetězce podléhající se na vzniku stabilních analogů není jediným parametrem, který ovlivňuje afinitu peptidic-

kých sloučenin k receptorům. Připojení chelatační části (DTPA – diethylenetriaminpentaoctová kyselina, DOTA – 1,4,7,10-tetraazaacykloodekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina, HYNIC – hydrazinonikotinamid; TETA – 1,4,8,11-tetraazaacyklotetradekan-N,N',N'',N'''-tetraoctová kyselina) (obr. 1) k těmto stabilním strukturám, které umožňují radionuklidové značení a nakonec i chemické vlastnosti zvoleného radionuklidu (tab. 2), mohou mít podstatný vliv na výslednou receptorovou afinitu diagnostického nebo terapeutického radioaktivně značeného peptidu<sup>32</sup>. Dalšími důležitými parametry, které se mohou významně spolupodílet na výsledném nukleárně medicínském potenciálu diskutovaných peptidů, jsou molekulová hmotnost a lipofilita peptidů, vazebnost na plasmatické proteiny a v neposlední řadě také náboj radioligandu<sup>9,33</sup>. Tyto parametry ovlivňující farmakokinetický profil peptidů mají významný vliv na biodistribuci a clearance, a významně tak předurčují typ exkrece nebo případnou míru kumulace radioaktivně značených receptorově specifických peptidů.

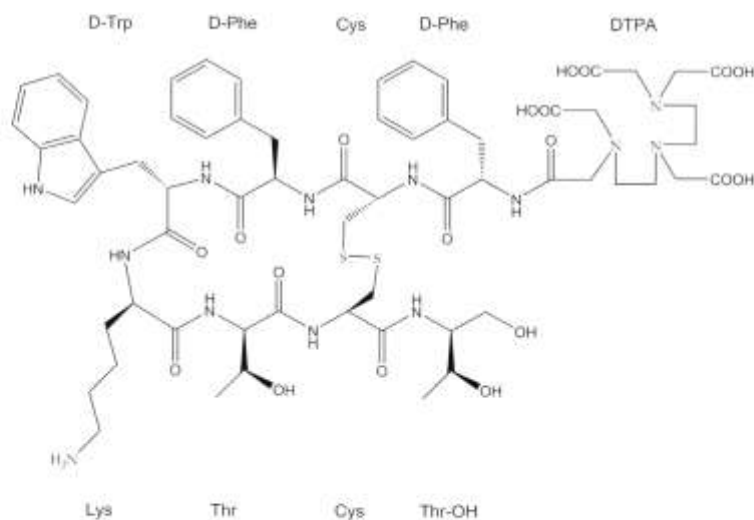
#### Diagnostické uplatnění radioaktivně značených peptidů (analogů somatostatinu)

Výzkumu receptorově specifických peptidů je věnována velká pozornost především v souvislosti s neuroendokrinními nádory. Právě v tomto typu nádorů byla nalezena velká hustota peptidických receptorů, z nichž exprese somatostatinových patří k nejčetnějším. Neuroendokrinní nádory představují heterogenní skupinu nádorů difuzního endokrinního systému, které se mohou lišit velikostí, histologií, biologickým a klinickým chováním<sup>34</sup>. Většinou jde o benigní metastazující nádory s pouze výjimečným přechodem do malignity. V současné době jsou rozlišovány dvě hlavní kategorie neuroendokrinních nádorů: gastroenteropankreatické (GEP) (gastrinom, insulinom, glukagon, VIPom) a karcinoidní

nádory<sup>34</sup>. Jejich počáteční diagnóza může být založena na klinických symptomech (flush syndrom, průjem) způsobených nadprodukcí hormonů<sup>6,35</sup>. Typickým znakem neuroendokrinních nádorů je výskyt somatostatinových receptorů, kterých bylo dodnes popsáno 5 subtypů (SSTR1 – SSTR5). Jde často o malé, pomalu rostoucí nádory, což znesnadňuje jejich detekci jinými, pro tyto účely méně citlivými metodami (CT, magnetická rezonance, ultrazvuk)<sup>6,36</sup>. Zavedení syntetického somatostatinového analogu oktreotidu s navázaným chelátorem DTPA (obr. 2) stabilně vázajícím indium-111 (<sup>111</sup>In-pentetreotid, Octreoscan) umožnilo detekci právě tohoto typu nádorů. Afinita této sloučeniny je omezena převážně na somatostatinové receptorové subtypy 2 a 5, které se právě v neuroendokrinních nádorech vyskytují nejčastěji<sup>34</sup>.

Jelikož se koncentrace receptorů a výskyt jednotlivých subtypů u různých nádorů může lišit, může se lišit i senzitivita diagnostického vyšetření. Příkladem může být diagnostické užití Octreoscanu u jiných než neuroendokrinních nádorů, kde byly somatostatinové receptory subtypu 2 také popsány (prsni nádory, malobuněčné nádory plic, lymfomy). Při těchto vyšetřeních ovšem nebylo dosaženo tak uspokojivých výsledků, což bývá zdůvodňováno nerovnoměrnou distribucí receptorů v těchto nádorových tkáních<sup>31</sup>.

Za účelem zvýšení citlivosti a umožnění detekce také ostatních nádorů exprimujících jiné než zmíněné subtypy somatostatinových receptorů jsou prováděny variace v zavedených strukturách syntetických derivátů. Příkladem dnes již standardních peptidů vzniklých substitucí aminokyselin fenylalaninu za tyrozin v bioaktivním jádře oktreotidu může být DTPA(DOTA)-Tyr<sup>3</sup>-oktreotid a DTPA(DOTA)-Tyr<sup>3</sup>-oktreotát s vystupňovanou afinitou k somatostatinovému receptorovému subtypu 2. Mezi novějšími analogy se širším afinitním spektrem je třeba analog DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-oktreotid (substituce fenylalaninu



Obr. 2. Schematické znázornění DTPA-oktreotidu

l-naftylovou funkční skupinou), který má navíc také afinitu k subtypům 3 a 5<sup>17)</sup>.

Jelikož je technecium-99m díky svým fyzikálním vlastnostem a snadné dostupnosti považováno za ideální diagnostický radionuklid, je snaha vyvíjet peptidy se schopností vázat tento gama zářič. Takovým peptidem je depreotid, komerčně vyráběný analog somatostatinu, jež našel uplatnění v diagnostice maligních plicních nádorů<sup>8)</sup>. Chelatační tetraaminová skupina připojená k analogu Tyr<sup>1</sup>-oktreotátu dala vznik dalšímu derivátu s názvem demotát, který je rovněž schopný vázat<sup>99m</sup>Tc a jehož vlastnosti se jeví příznivě pro diagnostické využití somatostatín-receptorové pozitivních nádorů<sup>19,20)</sup>.

#### **Terapeutické uplatnění radioaktivně značených peptidů (analogů somatostatinu)**

Úspěšné použití receptorově specifických peptidů značených gama zářiči k vizualizaci nádorů a metastáz otevřelo fascinující možnost využít tyto peptidy značené terapeutickými radionuklidy k léčbě nádorů, a ovlivnit tak stav a progresi onemocnění. Základním faktorem tohoto způsobu terapie je cílená distribuce efektivní radiační dávky k nádorovým buňkám, respektive k jejich jaderné DNA. Tato forma terapie je především vhodná pro maligní, roztroušené nebo příliš malé nádory nevhodné pro odstranění klasickými chirurgickými postupy nebo pro využití externích ozařovacích technik. Výběr radiofarmaka/radionuklidu je kritickou částí plánování terapie, při které by měl být dbán zřetel na individuální vlastnosti nádorů (velikost a lokalizace) se zvláštním ohledem také na přilehající tkáň<sup>24,27)</sup>. Počáteční pokusy s vysokými dávkami Octreoscanu vystřídaly analogy značené<sup>177</sup>Lu a<sup>90</sup>Y, při kterých byla nejednou pozorována stabilizace onemocnění či úplná remise nádorů<sup>12,34,38)</sup>. Možnost využití Octreoscanu k terapii nádorů je dána spektrem emitovaného záření jeho radioizotopu (<sup>111</sup>In), který je kromě zdroje gama záření také emitorem Augerových elektronů s prokázaným antiproliferativním účinkem<sup>39)</sup>. Radiotoxicita přípravků značených<sup>111</sup>In je však omezena krátkým dosahem těchto emitovaných částic<sup>40)</sup>. Jejich terapeutický efekt je přímo podmíněn těsnou lokalizací u DNA rakovinných buněk, respektive procesu internalizace (receptorově zprostředkovanému endocytickému transportu), který je za tuto lokalizaci zodpovědný<sup>40)</sup>. Naopak účinek radiopeptidů značených radionuklidy emitující beta částice s dostatečnou energií a dosahem není bezprostředně spojen s těsnou penetrací do nádorových struktur. Jejich značení si vyžádalo zavedení chelatačních činidel (DOTA, TETA) stabilně vázajících hlavní terapeuticky využívané beta zářiče<sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, ale i jejich případné alternativy<sup>153</sup>Sm, <sup>64</sup>Cu<sup>15,41-43)</sup>. Radiobiologické vlastnosti terapeutických izotopů naznačily, že každý radionuklid vlastní specifický potenciál pro terapii určitého typu nádorů. Částice<sup>90</sup>Y mají v porovnání s<sup>177</sup>Lu vyšší energii a vyšší maximální dosah v tkáních a jsou tedy vhodné pro větší nádory i s heterogenní distribucí receptorů. Naopak menší nádory nejsou schopné vzhledem ke své velikosti absorbovat celou emitovanou energii<sup>90</sup>Y, která pak může toxicky působit na zdravou tkáň. Pro tyto menší nádory

a metastázy se jeví příhodněji využití radioizotopu<sup>177</sup>Lu s nižší energií a nižším tkáňovým dosahem, což bylo dokázáno ve výsledcích preklinických studií, ve kterých byly testovány peptidy<sup>90</sup>Y-DOTA-oktreotid a<sup>177</sup>Lu-DOTA-oktreotid<sup>39,44)</sup>.<sup>188</sup>Re je radioizotopem emitujícím cytotoxické beta záření s energií a dosahem porovnatelným s<sup>90</sup>Y ovšem s mnohem kratším fyzikálním poločasem<sup>8,29)</sup>. Tento radionuklid má podobné dispoziční ke značení jako<sup>99m</sup>Tc<sup>45)</sup>. Z tohoto důvodu je snaha převést diagnostické peptidické analogy (<sup>99m</sup>Tc-depreotid) s chelatační částí vazající<sup>99m</sup>Tc také na terapeuticky využitelné peptidy radioaktivně značené<sup>188</sup>Re<sup>29)</sup>.

Většina zmíněných radioizotopů emitujících terapeuticky prospěšné beta záření je také zdrojem gama záření (<sup>177</sup>Lu,<sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm), případně zdrojem pozitronů (<sup>64</sup>Cu). Tohoto paralelního záření lze za pomoci scintigraficko-dozimetrického vyšetření využít k přibližné kvantifikaci retence absorbované dávky v cílových a limitních orgánech, a tudíž k vyhodnocení prospěšnosti/nevhodnosti zvolené strategie léčby. U analogů značených ytriem-90 (<sup>90</sup>Y je pouze čistý beta zářič) je k simulaci terapie možno využít peptidy značené<sup>111</sup>In nebo k radioaktivnímu značení daného peptidu použít izotop<sup>90</sup>Y, který je zdrojem pozitronového záření. Tento posledně jmenovaný přístup může být výhodný z hlediska odfiltrování zkraslení vazebné receptorové afinity způsobené rozdílnou chemickou povahou<sup>90</sup>Y/<sup>111</sup>In. Nevýhodou je omezená dostupnost<sup>90</sup>Y a poměrně krátký fyzikální poločas limitující získání pozdějších dat<sup>37,46,47)</sup>.<sup>90</sup>Y-DOTA-oktreotid, <sup>90</sup>Y-DOTA-lanreotid, <sup>177</sup>Lu/<sup>90</sup>Y/<sup>153</sup>Sm-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotid nebo peptid značený<sup>188</sup>Re, prozatím pojmenovaný P2045, jsou příklady radioaktivně značených peptidů, které jsou klinicky testovány v souvislosti s využitím v terapii neuroendokrinních nádorů.

#### **Nežádoucí účinky související s použitím radioaktivně značených peptidů a možnost jejich ovlivnění**

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy našly prozatím své pevné místo především v diagnostice neuroendokrinních nádorů (Octreoscan). Peptidy značené terapeutickými radionuklidy procházejí v současné době řadou klinických studií, ve kterých jsou kromě pozitivních vlivů na progresi onemocnění sledovány nežádoucí účinky, které ve většině případů souvisejí právě s agresivním chováním emitovaného záření.

V porovnání s vedlejšími účinky chemoterapie jsou nežádoucí projevy peptidické radioterapie méně časté, a proto lze tento léčebný postup označit za relativně bezpečný<sup>38,48)</sup>. Akutní následky aplikace radiopeptidu (nauzea, zvracení, bolest v místě nádoru) mohou být kontrolovány symptomatickou terapií, na ty, které se projevují až s časovou latencí a které jsou výsledkem absorpce radiofarmaka ve zdravé tkáni, je nutno dbát zřetel při samotném plánování terapie (volba dávky a typu radionuklidu, dozimetrická vyšetření s diagnostickými analogy atd.)<sup>39)</sup>.

Kumulace radioaktivně značených peptidů v jiných než nádorových tkáních může být významným klinickým problémem nejen z hlediska zkraslení interpretace případných patologických nálezů při scintigrafickém

vyšetření, ale hlavně z důvodu možných radiotoxických účinků. Následky léčby radioaktivně značenými peptidy přímo souvisí s velikostí dávky (aktivitou), agresivitou záření a farmakokinetickým profilem dané radioaktivně značené sloučeniny. Pečlivé vyhodnocení dozimetrických parametrů u kritických orgánů diagnosticky aplikovaných peptidů může předejít radiotoxickému působení samotné radionuklidové terapie. Výsledky biodistribučních studií studovaných radioaktivně značených peptidů ukázaly, že k nejvyšší retenci radioaktivity dochází ve slezině, ledvinách, játrech, kostní dřeni a SSTR-positivních nádorech<sup>31</sup>. Zatímco vliv absorbovaného záření na tkáň sleziny nebyl pozorován a játemi toxicita, pokud se vyskytne, je většinou mírná a reverzibilní, kostní dřev a hlavně ledviny byly v souvislosti s terapeuticky užívanými peptidy označeny za kritické, dávku limitující tkáň<sup>47, 49</sup>. V ledvinách, hlavním exkretčním orgánu radioaktivně značených peptidů, dochází k částečné reabsorpci primárně zfiltrovaných radiopeptidů a vlivem jejich polárního charakteru také ke kumulování, které je spojené s radiotoxickými účinky na ledvinovou tkáň. Barone a spol. v roce 2005 publikovala závěry své práce, ze kterých plyne, že radiální nefrotoxita je závislá na velikosti dávky a farmakologickém profilu radiofarmaka, individuálním objemu ledvin a případně frakcionalizaci dávky<sup>50</sup>. Ve většině popsaných klinických případů využívajících k léčbě radioaktivně značené receptorové specifické peptidy byla ovšem radiotoxicita nepředvídatelná, k čemuž přispívá také fakt, že není zcela přesně objasněn mechanismus retence radioaktivně značených peptidů v ledvinách<sup>31</sup>. Z tohoto důvodu jsou studovány mechanismy reabsorpce a hledány látky s potenciálním inhibičním vlivem na tento renální uptake.

Mnoho vědeckých prací dokládá, že ledvinné vychytávání analogů somatostatinu může být sníženo současným podáním pozitivně nabitých aminokyselin lysinu (Lys) a argininu (Arg) nebo želatinového plazma expandéru gelofusinu<sup>51-53</sup>.

Snížení renálního vychytávání <sup>111</sup>In-D-Glu<sub>1</sub>-minigastrinu bylo dosaženo polyglutamovou kyselinou (5 a více glutamátových zbytků), zatímco efekt podání aminokyselin byl u této látky minimální<sup>54</sup>.

Testováním látek s potenciálem inhibovat vychytávání v ledvinných buňkách bylo zjištěno, že se na procesu akumulace podílí patrně více typů transportních mechanismů<sup>55</sup>. Za hlavní mechanismus vychytávání látek podobných oktreotidu je považován mechanismus endocytózy pomocí multiligandového megalinového receptoru, který je v proximálním tubulu hojně exprimován. Tato hypotéza byla potvrzena řadou studií jak *in vitro* na buňkách liniích, tak *in vivo* pokusech prováděných na myších se specifickými megalin-deficitními ledvinami<sup>56-58</sup>. Megalin se v proximálním renálním tubulu společně s dalším glykoproteinem cubilinem podílí na udržování homeostázy organismu kontrolou reabsorpce řady fyziologických i syntetických látek (hormony, vitaminy vázající proteiny, enzymy, léčiva atd.)<sup>59-62</sup>. Tyto látky mají nezřídka charakter kationaktivních sloučenin nebo charakter peptidů a proteinů bohatých na pozitivně nabitě aminokyseliny. Tento fakt může vysvětlovat inhibiční schopnosti Arg a Lys na reabsorpci derivátů somatostati-

nu vlivem saturace o vazebná místa megalinového receptoru. Teorie inhibičního efektu pozitivně nabitých aminokyselin může být potvrzena i redukčními projevy plazma expandéru gelofusinu majícího ve své struktuře pozitivně nabitě skupiny. Na druhou stranu mechanismus inhibice pomocí aniontových sloučenin, což je příkladem polyglutamátu u derivátu minigastrinu, naznačuje, že vychytávání radiopeptidů v ledvinách je velice komplexní děj a může být ovlivněn řadou vlastností radiopeptidů i potenciálních inhibitorů (velikost, struktura a náboj)<sup>59</sup>. Dalším perspektivním postupem při snižování radiotoxického působení diskutovaných peptidů na ledvinovou tkáň je použití amifostinu<sup>63</sup>. Tato látka neredukuje vychytávání radiopeptidů v renálních tubulech, ale mírní toxický efekt radiace vychytáváním volných radikálů. Kombinací amifostinu a lysinu bylo dosaženo signifikantního snížení renálního poškození u potkanů medikovaných<sup>177</sup>Lu-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-oktreotátem<sup>64</sup>.

Hematologická toxicita provázející léčbu radiopeptidy projevující se snížením počtu krevních elementů je častá, ale dá se obecně označit za mírnou a přechodnou<sup>39</sup>. V průběhu léčby radiofarmaky bylo dále popsáno přechodné porušení spermatogeneze, zatímco vzhledem k fyziologickému výskytu somatostatinných receptorů pochopitelná porucha endokrinních funkcí adenohipofyzární osy ani diabetes mellitus nebyly vůbec pozorovány<sup>34, 64, 65</sup>.

#### Nové strategie využití radioaktivně značených peptidů

Zvýšení efektivity scintigrafických a terapeutických metod využívajících radioaktivně značených somatostatinných analogů je možné dosáhnout kromě vývoje nových stabilních analogů s vyšší afinitou k receptorům aplikací dvou či více radioaktivně značených peptidů nebo jejich analogů. Výskyt receptorů v nádorech není totiž většinou omezen na jeden receptorový subtyp, respektive výčet potenciálních cílů pro metody nukleární medicíny je u mnoha nádorů velice široký. Například GEP nádory exprimují kromě somatostatinných receptorů GLIP-1 (glukagon-like peptid 1) receptory a receptory VIP (vazoaktivní intestinální peptid), cholecystokyninu a bombesinu<sup>66</sup>. V prsních nádorech byl zase zjištěn současný výskyt receptorů somatostatinu, VIP, gastrin-releasing peptidu a NPY-Y1 (neuropeptid Y, subtyp Y1) receptorů<sup>67</sup>. Kombinace peptidických analogů odvozených od jednoho či více přirozených peptidů by mohla vést ke zvýšení akumulace radioaktivity nebo k optimalizaci jejího rozložení hlavně v nádorech s heterogenní strukturou. Kromě toho některé ze zmíněných peptidů mají potenciál inhibovat nádorový růst<sup>11</sup>. Využití této strategie léčby využívající současné aplikace více analogů je ovšem v současné době limitováno chudšími poznatky o ostatních peptidech a jejich receptorech, jelikož je výzkum soustředěn převážně na vývoj derivátů somatostatinu. Existují ale už i výjimky potvrzující tuto skutečnost. Radioaktivně značené analogy minigastrinu byly úspěšně použity pro diagnostiku cholecystokinin B receptorově pozitivních nádorů. Cyklický analog RGD sekvence c(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) s návaza-

nou chelatační skupinou DTPA, který antagonizuje nádorovou angiogenezi navázáním na receptory a, b<sub>1</sub>, je dalším peptidickým analogem, který může být použit ke scintigrafii nebo radionuklidové terapii nádorového onemocnění<sup>68</sup>.

Problém nízké specifické aktivity u některých DOTA-peptidů limitující terapeutické použití například u ligandů DOTA-substance P a DOTA-bombesinu (pro nukleární medicínské účely by se aplikované množství peptidů mělo pohybovat hluboko pod hladinou dávek, které způsobují farmakologický efekt) může být částečně vyřešen rozdělením dávky nebo jejím infuzním, intratumorálním nebo intraarteriálním podáním<sup>9,69</sup>. Zavedení necyklických chelátorů a vyvinutí peptidů s větším počtem navázaných chelatačních činidel patří mezi další možné principy, které by měly zvýšit specifickou aktivitu diskutovaných radiofarmak, a tím i jejich využitelnost pro potřeby nukleární medicíny<sup>70</sup>.

## ZÁVĚR

Radioaktivně značené receptorově specifické peptidy našly své uplatnění v diagnostice neuroendokrinních nádorů (Octreoscan). Také jejich další využití v terapii tohoto typu nádorů se jeví velice perspektivně.

I když byla výzkumu těchto látek věnována pozornost mnoha vědeckých skupin, je zde ještě velký prostor především pro vývoj nových radioaktivně značených peptidických analogů s vysokou afinitou ke specifickým nádorovým receptorům. Optimalizace postupů využití těchto peptidů v nukleární medicíně a ostatních zainteresovaných lékařských disciplínách je jedním ze základních předpokladů vedoucích ke zlepšení diagnostických a terapeutických možností léčby nádorového onemocnění neuroendokrinního původu.

Tato práce byla podpořena grantem č. 305/07/0535 Grantové agentury České republiky.

## LITERATURA

- Reubi, J. C.: *Endocr. Rev.*, 2003; 24, 389–427.
- de Herder, W. W., Lamberts, S. W.: *Curr. Opin. Oncol.*, 2002; 14, 53–57.
- Lamberts, S. W., de Herder, W. W., Hofland, L. J.: *Trends Endocrinol. Metab.*, 2002; 13, 451–457.
- Behr, T. M., Behe, M., Becker, W.: *Q. J. Nucl. Med.*, 1999; 43, 268–280.
- de Visser, M., Janssen, P. J., Srinivasan, A. et al.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003; 30, 1134–1139.
- Koikov, L. N., Ebetino, F. H., Solinsky, M. G. et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003; 13, 2647–2650.
- Reubi, J. C., Waser, B., Schaer, J. C., Laissue, J. A.: *Eur. J. Nucl. Med.*, 2001; 28, 836–846.
- Weiner, R. E., Thakur, M. L.: *BioDrugs*, 2005; 19, 145–163.
- Breeman, W. A., Kwekkeboom, D. J., de Blois, E. et al.: *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2007; 7, 345–357.
- Patel, Y. C., Greenwood, M. T., Panetta, R. et al.: *Life Sci.*, 1995; 57, 1249–1265.
- Scherubl, H., Hescheler, J., Riecken, E. O.: *Horm. Metab. Res. Suppl.*, 1993; 27, 1–4.
- Reubi, J. C.: *Neuroendocrinology*, 2004; 80 (Suppl. 1), 51–56.
- Blok, D., Feitsma, R. I., Vermeij, P., Pauwels, E. J.: *Eur. J. Nucl. Med.*, 1999; 26, 1511–1519.
- Hejna, M., Schmidinger, M., Raderer, M.: *Ann. Oncol.*, 2002; 13, 653–668.
- Gotthardt, M., Boermann, O. C., Bähr, T. M. et al.: *Curr. Pharm. Des.*, 2004; 10, 2951–2963.
- Breeman, W. A., de Jong, M., Kwekkeboom, D. J. et al.: *Eur. J. Nucl. Med.*, 2001; 28, 1421–1429.
- Wild, D., Schmitt, J. S., Ginj, M. et al.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003; 30, 1338–1347.
- Virgolini, I., Traub, T., Novotny, C. et al.: *Curr. Pharm. Des.*, 2002; 8, 1781–1807.
- Decristoforo, C., Maina, T., Nock, B. et al.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003; 30, 1211–1219.
- Kopecky, M., Trejtnar, F., Laznicko, M. et al.: *Nucl. Med. Commun.*, 2005; 26, 549–554.
- Maina, T., Nock, B., Nikolopoulou, A. et al.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002; 29, 742–753.
- Maina, T., Nock, B. A., Cordopatis, P. et al.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2006; 33, 831–840.
- Decristoforo, C., Mather, S. J., Cholewinski, W. et al.: *Eur. J. Nucl. Med.*, 2000; 27, 1318–1325.
- Decristoforo, C., Melendez-Alafort, L., Sosabowski, J. K., Mather, S. J.: *J. Nucl. Med.*, 2000; 41, 1114–1119.
- Cremonesi, M., Ferrari, M., Bodei, L. et al.: *J. Nucl. Med.*, 2006; 47, 1467–1475.
- de Jong, M., Breeman, W. A., Bernard, B. F. et al.: *Int. J. Cancer*, 2001; 92, 628–633.
- Lewis, J. S., Wang, M., Laforest, R. et al.: *Int. J. Cancer*, 2001; 94, 873–877.
- Bugaj, J. E., Erion, J. L., Johnson, M. A. et al.: *Nucl. Med. Biol.*, 2001; 28, 327–334.
- Cyr, J. E., Pearson, D. A., Wilson, D. M. et al.: *J. Med. Chem.*, 2007; 50, 1354–1364.
- Lewis, J. S., Lewis, M. R., Cutler, P. D. et al.: *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5, 3608–3616.
- Lewis, J. S., Srinivasan, A., Schmidt, M. A., Anderson, C. J.: *Nucl. Med. Biol.*, 1999; 26, 267–273.
- Blower, P.: *Dalton Trans*, 2006; 1705–1711.
- Lister-James, J., Moyer, B. R., Dean, R. T.: *Q. J. Nucl. Med.*, 1997; 41, 111–118.
- Kaltsas, G. A., Papadogias, D., Makras, P., Grossman, A. B.: *Endocr. Relat. Cancer*, 2005; 12, 683–699.
- Caplin, M. E., Buscombe, J. R., Hilson, A. J. et al.: *Lancet*, 1998; 352, 799–805.
- Gibril, F., Reynolds, J. C., Doppman, J. L. et al.: *Ann. Intern. Med.*, 1996; 125, 26–34.
- Cremonesi, M., Ferrari, M., Bodei, L. et al.: *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2006; 50, 288–295.
- Forrer, F., Valkema, R., Kwekkeboom, D. J. et al.: *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007; 21, 111–129.
- Teunissen, J. J., Kwekkeboom, D. J., de Jong, M. et al.: *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2005; 19, 595–616.
- Capello, A., Krenning, E. P., Breeman, W. A. et al.: *J. Nucl. Med.*, 2003; 44, 98–104.
- de Jong, M., Bakker, W. H., Krenning, E. P. et al.: *Eur. J. Nucl. Med.*, 1997; 24, 368–371.

42. **Krenning, E. P., de Jong, M., Kooij, P. P. et al.:** *Ann. Oncol.*, 1999; 10 (Suppl. 2), S23-S29.
43. **Anderson, C. J., Dehdashti, F., Cutler, P. D. et al.:** *J. Nucl. Med.*, 2001; 42, 213-221.
44. **Kwekkeboom, D. J., Bakker, W. H., Kooij, P. P. et al.:** *Eur. J. Nucl. Med.*, 2001; 28, 1319-1325.
45. **Deutsch, E., Libson, K., Vanderheyden, J. L. et al.:** *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B*, 1986; 13, 465-477.
46. **Cremonesi, M., Ferrari, M., Zoboli, S. et al.:** *Eur. J. Nucl. Med.*, 1999; 26, 877-886.
47. **Pauwels, S., Barone, R., Walrand, S. et al.:** *J. Nucl. Med.*, 2005; 46 (Suppl. 1), 92S-98S.
48. **Engstrom, P. F., Lavin, P. T., Moertel, C. G. et al.:** *J. Clin. Oncol.*, 1984; 2, 1255-1259.
49. **Bodei, L., Cremonesi, M., Zoboli, S. et al.:** *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003; 30, 207-216.
50. **Barone, R., Borson-Chazot, F., Valkema, R. et al.:** *J. Nucl. Med.*, 2005; 46 (Suppl. 1), 99S-106S.
51. **Rolleman, E. J., Valkema, R., de Jong, M. et al.:** *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003; 30, 9-15.
52. **van Eerd, J. E., Vegt, E., Wetzels, J. F. et al.:** *J. Nucl. Med.*, 2006; 47, 528-533.
53. **Vegt, E., Wetzels, J. F., Russel, F. G. et al.:** *J. Nucl. Med.*, 2006; 47, 432-436.
54. **Behr, M., Kluge, G., Becker, W. et al.:** *J. Nucl. Med.*, 2005; 46, 1012-1015.
55. **Gotthardt, M., van Eerd-Vismale, J., Oyen, W. J. et al.:** *J. Nucl. Med.*, 2007; 48, 596-601.
56. **Barone, R., Van Der Smissen, P., Devuyt, O. et al.:** *Kidney Int.*, 2005; 67, 969-976.
57. **de Jong, M., Barone, R., Krenning, E. et al.:** *J. Nucl. Med.*, 2005; 46, 1696-1700.
58. **Melis, M., Krenning, E. P., Bernard, B. F. et al.:** *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2005; 32, 1136-1143.
59. **Christensen, E. I., Nielsen, R.:** *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2007; 158, 1-22.
60. **Christensen, E. I., Verroust, P. J.:** *Pediatr. Nephrol.*, 2002; 17, 993-999.
61. **Verroust, P. J., Christensen, E. I.:** *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002; 17, 1867-1871.
62. **Moestrup, S. K., Cui, S., Vorum, H. et al.:** *J. Clin. Invest.*, 1995; 96, 1404-1413.
63. **Rolleman, E. J., Forrer, F., Bernard, B. et al.:** *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2007; 34, 763-771.
64. **Bodei, L., Cremonesi, M., Grana, C. et al.:** *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2004; 31, 1038-1046.
65. **de Jong, M., Valkema, R., Jamar, F. et al.:** *Semin. Nucl. Med.*, 2002; 32, 133-140.
66. **Reubi, J. C., Waser, B.:** *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2003; 30, 781-793.
67. **Reubi, C., Gugger, M., Waser, B.:** *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002; 29, 855-862.
68. **van Hagen, P. M., Breeman, W. A., Bernard, H. F. et al.:** *Int. J. Cancer*, 2000; 90, 186-198.
69. **Schumacher, T., Hofer, S., Eichhorn, K. et al.:** *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2002; 29, 486-493.