

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Radioaktivně značené receptorově-specifické peptidy pro diagnostiku a terapii nádorů

Bc. Barbora Parýzková

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 14. 5. 2018

.....
Barbora Parýzková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce, Mgr. Pavlu Bártovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, ochotu, vstřícný přístup a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Poděkování za pomoc při vypracování této diplomové práce rovněž patří Doc. Ing. Alici Lázníčkové, Csc.

V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat mé rodině, která mě během celého průběhu studia nesmírně podporovala.

Obsah

1	Použité zkratky	7
2	Abstrakt	10
3	Úvod	12
4	Zadání – cíl práce	13
5	Radiofarmaka	14
5.1	Obecná charakteristika radiofarmak	14
5.2	Požadavky na radiofarmaka	15
5.3	Rozdělení radiofarmak	15
5.3.1	Hromadně vyráběná radiofarmaka.....	15
5.3.2	Individuálně vyráběná radiofarmaka	16
5.4	Kontrola radiofarmak	17
5.5	Použití radiofarmak	17
6	Radionuklidy	19
6.1	Obecná charakteristika radionuklidů.....	19
6.2	Příprava radionuklidů.....	20
6.2.1	Výroba radionuklidů v jaderném reaktoru.....	21
6.2.2	Výroba radionuklidů v cyklotronu.....	21
6.2.3	Radionuklidy připravené z generátorů.....	22
6.3	Přehled nejčastěji používaných radionuklidů.....	23
6.3.1	Technecium (^{99m}Tc).....	23
6.3.2	Indium (^{111}In).....	24
6.3.3	Gallium (^{66}Ga , ^{67}Ga , Ga^{68}).....	24
6.3.4	Měď (^{64}Cu).....	25
6.3.5	Fluor (^{18}F)	25
6.3.6	Yttrium (^{86}Y , ^{90}Y).....	25
6.3.7	Lutecium (^{177}Lu).....	26
6.3.8	Promethium (^{149}Pm).....	26
6.3.9	Rhenium (^{186}Re , ^{188}Re)	26
6.3.10	Rhodium (^{105}Rh)	27
7	Peptidy.....	28
7.1	Definice peptidů	28
7.2	Historie používání radioaktivně značených peptidů a protilátek	29

7.3	Význam peptidů a jejich receptorů u nádorových onemocnění	31
7.4	Podmínky pro terapii receptorově specifickými radioaktivně značenými peptidy.....	33
7.5	Struktura peptidového receptorově specifického radiofarmaka.....	34
7.6	Metody radioaktivního značení.....	35
7.7	Chelatační činidla.....	37
7.7.1	Diethylentriaminpentaoctová kyselina	37
7.7.2	Tetraazacyklododekantetraoctová kyselina	38
7.7.3	Tetraazacyklotetradekantetraoctová kyselina	39
7.7.4	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina	40
7.7.5	6-hydrazinonikotinová kyselina.....	40
7.7.6	4,11-bis(karboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyklo [6, 6, 2] hexadekan... 41	
7.7.7	3,6,9,15-tetraazabicyklo [9. 3. 1.] pentadeka-1(15),11,13-trien-3,6,9-trioctová kyselina.....	41
7.8	Somatostatin.....	43
7.8.1	Charakteristika	43
7.8.2	Role somatostatinu při nádorovém bujení	44
7.8.3	Somatostatinové receptory.....	45
7.8.4	Analogy somatostatinu	46
7.8.5	Radionefrotoxicita analogů somatostatinu.....	51
7.9	Cholecystokinin (CCK) a gastrin	54
7.9.1	Charakteristika	54
7.9.2	Cholecystokininové receptory	56
7.9.3	Význam cholecystokininu a gastrinu při nádorovém bujení	57
7.9.4	Cholecystokininové a gastrinové analogy	58
7.9.5	Nefrotoxicita analogů cholecystokininu a gastrinu	62
7.10	Bombesin/Gastrin uvolňující peptid (GRP).....	64
7.10.1	Charakteristika	64
7.10.2	Receptory gastrin uvolňujícího peptidu.....	65
7.10.3	Analogy bombesinu	66
7.11	Vasoaktivní intestinální peptid (VIP).....	69
7.11.1	Charakteristika	69
7.11.2	VIP receptory.....	70
7.11.3	Analogy vasoaktivního intestinálního peptidu	70

7.12	α -melanocyty stimulující hormon	73
7.13	Neuropeptid Y	75
7.14	Neurotensin	77
7.15	Substance P	79
7.16	Některé další peptidy.....	81
8	Závěr.....	83
9	Použitá literatura.....	84

1 Použité zkratky

ANP	atriální natriuretický peptid
BB ₁	podtyp receptoru neuromedin B
BB ₂	podtyp receptoru GRP
BBS	bombesin
BFCA	bifunkční chelatační činidlo
CB-TE2A	4, 11-bis(karboxymethyl)-1, 4, 8, 11-tetraazabicyklo[6, 6, 2]hexadekan
CCK	cholecystokinin
CCK1R	cholecystokininový receptor typu 1
CCK2R	cholecystokininový receptor typu 2
CPT	kamptotecin
DOTA	1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan-1, 4, 7, 10-tetraoctová kyselina
DOTAGA	1-(1-karboxy-3-karboxypropyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan-4, 7, 10-trioctová kyselina
DOTA-NOC	[DOTA]-[1-Nal ³]-octreotid
DOTA-TOC	[DOTA]-[Tyr ³]-octreotid
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
EDDA	ethylendiamin-N-N'-dioctová kyselina
ET _A	endotelinový receptor typu A
ET _B	endotelinový receptor typu B
GBM	multiformní glioblastom
GLP-1	glucagon-like peptid-1

GRP	gastrin uvolňující peptid
GRPR	receptor pro peptid uvolňující gastrin
HYNIC	6-hydrazinonikotinová kyselina
LHRH	hormon uvolňující gonadotropin
MC1R	receptor melanokortin 1
MG	minigastrin
NK	neurokinin
NK ₁	neurokininový receptor typu 1
NK ₂	neurokininový receptor typu 2
NK ₃	neurokininový receptor typu 3
NOTA	1, 4, 7-triazacyklononan-1, 4, 7-trioctová kyselina
NPY	neuropeptid Y
NPY	neuropeptid Y
NT	neurotensin
NTS1	neurotensinový receptor typu 1
NTS2	neurotensinový receptor typu 2
NTS3	neurotensinový receptor typu 3
PCTA	3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9. 3. 1.]pentadeka-1 (15), 11, 13-trien-3, 6, 9-trioctová kyselina
PEG	polyethylenglykol
PET	pozitronová emisní tomografie
POMC	proopiomelanokortin
PP	pankreatický polypeptid

PPY	peptid YY
RAP	protein asociovaný s receptory
RC-160	vaprteotid
SP	substance P
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
SST	somatostatin
TETA	1, 4, 8, 11-tetraazacyklotetradekan-1, 4, 8, 11-tetraoctová kyselina
VIP	vasoaktivní intestinální peptid
VPAC	vysoce afinitní receptor pro VIP
α -MSH	α -melanocyty stimulující hormon

2 Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Bc. Barbora Parýzková

Školitel: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Název diplomové práce: Radioaktivně značené receptorově-specifické peptidy pro diagnostiku a terapii nádorů.

Předkládaná rešeršní diplomová práce se zabývá receptorově-specifickými radioaktivně značenými peptidy a jejich využitím v diagnostice a terapii nádorových onemocnění. Kromě obecných poznatků týkajících se radiofarmak, je práce zaměřená i na popis jednotlivých diagnostických a terapeutických radionuklidů a dále i na některá používaná chelatační činidla.

Největší pozornost je věnována peptidům somatostatinu a cholecystokininu a jejich využití v nukleární medicíně, jak pro zobrazování, tak pro léčbu některých malignit. Dalšími zmiňovanými peptidy jsou například bombesin, vasoaktivní intestinální peptid nebo α -melanocyty stimulující hormon.

Klíčová slova: receptorově-specifické peptidy, radioaktivní značení, diagnostické a terapeutické radionuklidy, radioterapie, radiodiagnostika, octreotid.

Abstract

Charles University

Fakulty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Bc. Barbora Parýzková

Supervisor: Mgr. Pavel Bárta, Ph.D.

Title of diploma thesis: Radiolabelled receptor-specific peptides for cancer diagnosis and therapy.

The presented diploma thesis is based on literature review and it deals with receptor-specific radioactive labeled peptides and their usage in the cancer diagnostic and treatment. It focuses on general knowledge about radiopharmaceuticals, further on the descriptions of either diagnostic or therapeutic radionuclides as well as on currently used chelating agents.

The particular attention is paid to peptides like somatostatin and cholecystokinin and their usability in Nuclear Medicine for the imaging and treatment of certain malignancies. The other stated peptides in this diploma thesis are bombesin, vasoactive intestinal peptide and alpha melanocyte stimulating hormone.

Keywords: receptor-specific peptides, radiolabelling, radionuclides for diagnosis and therapy, radiotherapy, radiodiagnostics, octreotide.

3 Úvod

V současné době se v nukleární medicíně významně uplatňují radioaktivně značené receptorově-specifické peptidy, a to jak pro diagnostické, tak terapeutické účely. Na základě poznatků o výskytu receptorů pro dané peptidy na normálních, ale i nádorových buňkách se začaly radioaktivně značené peptidy používat jako vhodná činidla pro cílení na nejrůznější typy nádorů. Výhodou použití peptidů jako součásti radiofarmak je zejména jejich malá velikost, relativně snadná příprava a nízká imunogenicita.

Prvním peptidem, který byl popsán v souvislosti s jeho možným použitím v nukleární medicíně, byl somatostatin. Jeho receptory byly nalezeny ve vysoké hustotě zejména u neuroendokrinních nádorů. Současně byl vyvinut první komerčně dostupný analog somatostatinu, a to OctreoScan, značený radionuklidem ^{111}In . V současné době se vyvíjejí další somatostatinové analogy, jelikož somatostatinové receptory byly identifikovány na širokém spektru nádorových buněk.

Dalším peptidem, kterému je věnována vyšší pozornost je cholecystokinin. Cholecystokininové receptory byly identifikovány ve vysoké hustotě na různých typech nádorů, avšak používané radioaktivně značené analogy cholecystokininu jsou zaměřené především na diagnostiku a léčbu medulárních karcinomů štítné žlázy.

Pro využití v nukleární medicíně bylo zkoumáno mnoho dalších peptidových hormonů. Jedná se například o peptid bombesin, jehož radioaktivně značené analogy našly využití zejména pro léčbu a diagnostiku karcinomů prostaty u mužů a prsu u žen. Mezi další popsané peptidy patří vasoaktivní intestinální peptid, α -melanocyty stimulující hormon, neurotensin, neuropeptid Y nebo substance P a mnoho dalších. Nejpoužívanějšími ale stále zůstávají somatostatin a jeho analogy.

4 Zadání – cíl práce

Cílem práce bylo vypracovat literární přehled týkající se problematiky receptorově-specifických peptidů z hlediska vztahu mezi jejich strukturou a afinitou k příslušnému typu receptoru pro účely jejich využití v nukleární medicíně. Dalším cílem práce bylo zaměřením se na možnosti jejich radioaktivního značení, a to jak diagnostickými, tak terapeutickými radionuklidy a na chemické modifikace pro vazbu kovových radionuklidů.

Poznatky potřebné pro zpracování přehledu dané problematiky byly čerpány z knižních a časopiseckých zdrojů.

5 Radiofarmaka

5.1 Obecná charakteristika radiofarmak

Radiofarmaka jsou zvláštní kategorií léčivých přípravků, které ve své molekule obsahují většinou alespoň jeden radionuklid. Účinnou látkou je tedy obsažený radionuklid, který je zdrojem ionizujícího záření, který se v malých dávkách aplikuje do těla nemocného. Podle radiačních vlastností slouží buď k diagnostickým, nebo terapeutickým účelům, ale také nám může poskytovat informace o kinetice, orgánové distribuci, metabolismu a vylučování aplikovaných sloučenin. [22], [25]

S ohledem na obsažený radionuklid je nutné splňovat při jejich výrobě, manipulaci a používání zvláštní požadavky, které nemusí být dodržovány u ostatních léčivých přípravků bez obsahu radioaktivního nuklidu. Také je nezbytné si uvědomit, že obsah účinné látky, tedy radioaktivního izotopu, není v přípravku konstantní, ale v důsledku radioaktivní přeměny se exponenciálně s časem snižuje. [22]

Terapeutická radiofarmaka, na rozdíl od klasických chemoterapeutik, působí na maligní buňky s vysokou specifíčností, protože radionuklid je vázán na vhodný nosič, který směřuje záření do cílových orgánů, tkání a buněk. Používají se polymery, jako jsou protilátky, sérové proteiny, peptidy, polysacharidy nebo syntetické kopolymery, a to z důvodu jejich hromadění v nádorové tkáni. Preferovány jsou především látky na bázi radioaktivně značených protilátek nebo peptidů, protože jsou selektivně vázány na specifické proteiny buněčného povrchu. [20], [22]

Radiofarmaka se vyrábějí buď hromadně, kdy obsahují radionuklid s delším poločasem přeměny (dny, týdny), nebo individuálně, kdy obsahují radionuklid, který má poločas přeměny krátký (hodiny, minuty, sekundy). Vzhledem ke krátké době použitelnosti se individuálně připravovaná radiofarmaka vyrábějí přímo v nemocnicích před podáním pacientovi. [22], [25]

Radiofarmaka jsou připravována v nejrůznějších aplikačních formách. V nukleární medicíně jsou nejpoužívanější přípravky parenterální (pravé roztoky, koloidní disperze a suspenze). Dalším typem jsou perorální radiofarmaka, a to ve formě roztoků nebo tuhých látek, inhalační přípravky, jako jsou radioaktivní plyny a dispergované značené koloidní roztoky a místně se používají i topické přípravky. [25]

5.2 Požadavky na radiofarmaka

Základní požadavky na použité radionuklidy se liší v závislosti na tom, zda budou používány pro diagnostické nebo terapeutické účely.

Diagnosticky používané radionuklidy by měly emitovat čisté gama záření v rozmezí 100-300 keV a nebo je možné pro diagnostické zobrazení použít také pozitronové zářiče (β^+). Jejich poločas přeměny by měl být přiměřený době, která je potřebná pro klinické vyšetření, ale použitý radionuklid by se měl rozpadnout co nejdříve po dokončeném zobrazování. Vzniklý dceřiný nuklid by měl být stabilní.

Terapeuticky používané radionuklidy musí být elektronové (β^-) zářiče, jelikož β^- záření způsobuje destrukci zasažených buněk, ale lze použít i některé zářiče α . Jejich poločas přeměny by neměl být příliš dlouhý, ale na druhou stranu ani příliš krátký, proto aby se jejich aplikace nemusela po určité době opakovat. [25], [49]

5.3 Rozdělení radiofarmak

Jak bylo uvedeno výše, rozeznáváme dva základní typy radiofarmak a to: radiofarmaka vyráběná hromadně a radiofarmaka vyráběná individuálně.

5.3.1 Hromadně vyráběná radiofarmaka

Hromadně vyráběná radiofarmaka obsahují radionuklid, jehož poločas přeměny je delší, než je doba potřebná pro převedení radionuklidu do dané lékové formy, a zároveň je delší, než je doba doručení přípravku k odběrateli. Takto vyráběná radiofarmaka mají řadu výhod, a to zejména nižší výrobní náklady, možnost automatizace procesu výroby a jednodušnost vyrobeného produktu. [25]

Při jejich výrobě je nutné dodržovat pravidla správné výrobní praxe, jelikož jejich příprava přináší možná rizika, která vyplývají z obsahu radioaktivních nuklidů. Vzhledem k jejich krátkému poločasu přeměny se většinou vyrábějí v malých šaržích, jelikož se jejich složení s časem mění. Při výrobě musejí být dodržovány všechny požadavky na radiační bezpečnost, které nám stanovují pravidla ochrany před ionizujícím zářením a to nejen pro zúčastněné pracovníky, ale i pro obyvatelstvo. [22]

Uplatňuje se zde tzv. uzavřený systém výroby, kdy radioaktivní materiály jsou zpracovávány za sníženého tlaku vzduchu pro zabránění jejich možné kontaminace.

Naopak s neradioaktivními materiály se pracuje v přetlaku vůči okolnímu prostředí. Zároveň se na jednom pracovním místě nesmí současně pracovat s různými radioaktivními výrobky, jelikož by mohlo dojít ke křížové kontaminaci nebo k jejich záměně. [22], [25]

Hromadně vyráběná radiofarmaka jsou často značena radioaktivním jódem (^{131}I , ^{123}I případně ^{125}I) nebo ^{111}In , ale i některými dalšími radionuklidy. [25]

5.3.2 Individuálně vyráběná radiofarmaka

Individuálně vyráběná radiofarmaka se připravují přímo na odděleních nukleární medicíny, konkrétně na pracovištích radiofarmacie. Stejně jako u hromadně vyráběných radiofarmak i zde musí být dodržovány vysoké požadavky na radiační hygienu.

Důležité je také prostorové uspořádání pracoviště tak, aby byl proces přípravy, kontroly a manipulace s radiofarmaky co nejjednodušší a zároveň bezpečný. Správné uspořádání jednotlivých místností je důležité zejména pro ochranu pracovníků před radioaktivním zářením, ale také pro ochranu přípravku před kontaminací, a to jak pracovníkem, tak vnějším prostředím. [22]

Postup přípravy radiofarmak zahrnuje příjem radioaktivních látek, samotnou přípravu radiofarmak, jejich následnou kontrolu, rozdělování radiofarmak pro jednotlivá podání vyšetřovaným, uchovávání a skladování radiofarmak a následně likvidaci radioaktivního odpadu.

Pro usnadnění přípravy byly vyvinuty tzv. kity pro přípravu radiofarmak. Na pracoviště nukleární medicíny je dodán kit, který obsahuje všechny potřebné neradioaktivní složky v lyofilizované formě. Po přidání roztoku radionuklidu vznikne přípravek požadovaného složení a kvality vhodný pro bezprostřední aplikaci pacientovi. Výhodami jsou velmi rychlá a jednoduchá příprava radiofarmaka, standardnost a reprodukovatelnost složení přípravků, výrobce zodpovídá za jakostní parametry a neaktivní kity mohou být skladovány několik měsíců až let na rozdíl od hotových radiofarmak. [25]

5.4 Kontrola radiofarmak

Kontrola připraveného radiofarmaka je důležitá proto, aby se pacientům zajistila bezpečnost podávaného léku. Protože radiofarmaka obsahují radioaktivní prvek, jsou na ně kladeny vyšší požadavky než na ostatní léčiva. [25]

Používají se kontrolní metody platné pro všechny injekční přípravky, jako je průzračnost, acidita, sterilita a apyrogenita. Navíc se uplatňují metody hodnotící vlastnosti radioaktivních látek. Bez provedení kontrolních testů nelze přípravek registrovat ani používat. [22]

Obecně lze zkoušky na kvalitu radiofarmak rozdělit do tří skupin:

1. nukleární metody,
2. chemické a fyzikálně chemické metody,
3. biologické zkoušky.

Mezi nukleární metody patří: stanovení radioaktivity, stanovení radionuklidové čistoty a radiochemické čistoty. Jejich cílem je stanovit charakteristiky přítomného radionuklidu.

Mezi chemické a fyzikálně chemické metody patří: stanovení chemické čistoty, posouzení čirosti, stanovení pH, izotonicity a případně stanovení velikosti částic. Tento typ kontroly se provádí stejnými metodami jako kontrola léčiv neradioaktivních, ale ve zjednodušeném provedení z důvodu velmi malého množství přítomné radioaktivní látky.

Mezi biologické zkoušky řadíme: zkoušku na sterilitu a na přítomnost pyrogenních látek. Výjimečně se posuzuje biologická distribuce radiofarmaka u laboratorního zvířete. [25]

5.5 Použití radiofarmak

Sloučeniny značené radioaktivním prvkem se mohou používat jak pro diagnostické, tak pro terapeutické účely. Kromě jejich použití v oblasti nukleární medicíny nacházejí uplatnění také ve výzkumu a vývoji léčiv, v oblasti jejich farmakokinetiky a v analytických kontrolních metodách. [22] Radiofarmaka jsou přednostně využívána jako diagnostika, na rozdíl od neradioaktivních léčiv, která jsou používána zejména pro terapeutické účely. [25]

Vlastnosti použitého radionuklidu (typ emitovaného záření, jeho energie a poločas přeměny) i celé značené sloučeniny rozhodují o vhodném použití radiofarmak. Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje způsob výroby a přípravu lékové formy je poločas přeměny, ten nám totiž určuje dobu použitelnosti radiofarmaka.

Radiofarmaka s dlouhým poločasem přeměny jsou používána pro diagnostiku nebo terapii převážně scintigrafickým zobrazováním. Radiofarmaka obsahující nuklidy s velmi krátkým poločasem přeměny získané z cyklotronu, jsou využívána pro pozitronovou emisní tomografii (PET). Pro jednofotonovou emisní výpočetní tomografii (SPECT) se využívají radionuklidy s ultra krátkým poločasem přeměny, které se získávají z generátorů přímo na odděleních nukleární medicíny. [22]

6 Radionuklidy

6.1 Obecná charakteristika radionuklidů

Radioaktivní nuklidy jsou nezbytnou součástí všech radiofarmak. Je pro ně charakteristický samovolný rozpad na jiné nuklidy, přičemž dochází k emisi nabitých částic nebo elektromagnetického záření. Pro každý radionuklid je typický poločas přeměny, druh a energie uvolněného záření. Zároveň je třeba z hlediska jejich využití pro přípravu radiofarmak zvážit i jeho stabilitu, imunogenicitu a samozřejmě cenu a dostupnost. [20], [22], [49]

Jak již bylo řečeno, kritickým faktorem je poločas přeměny radionuklidu. Je důležité, aby např. pro diagnostické zobrazování nádorů byl poločas rozpadu dostatečně dlouhý, aby mohla proběhnout syntéza značené sloučeniny, aby také mohlo dojít k dostatečné akumulaci v cílové tkáni, a zároveň aby mohl být vyloučen necílovými orgány. Poločas rozpadu nejběžněji používaných radionuklidů pro výrobu radiofarmak se pohybuje od několika minut (např. ^{64}Cu) až po několik dní (např. ^{177}Lu). [20]

Radionuklidy jsou používány ke značení molekul, jako jsou např. peptidové hormony. Rozlišujeme radionuklidy pro diagnostické a terapeutické použití. Diagnosticky využívané radionuklidy musí emitovat paprsky gama o dostatečné energii, aby mohly proniknout z těla vyšetřovaného a dále být detegovány, a musejí mít poločas rozpadu dostatečně krátký k tomu, aby se rozpadly co nejdříve po provedeném vyšetření. Příkladem těchto radionuklidů jsou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nebo ^{18}F . Pomocí těchto radionuklidů jsme schopni vysoce specificky vizualizovat nádorové léze pomocí SPECT nebo PET kamery. [34], [49]

Radionuklidy pro terapeutické použití vyzařují záření beta, které je schopné po akumulaci v daném orgánu indukovat apoptózu nádorových buněk a následně jejich smrt. Atraktivní radionuklidy pro terapeutické využití jsou např. ^{177}Lu nebo ^{90}Y . Terapeutické radionuklidy jsou velmi účinné, protože uvolňují cytotoxické ionizující záření přímo do lokalizovaného místa. Stejně jako u diagnostických radionuklidů je nutné při výběru vhodného terapeutického radionuklidu vzít v úvahu základní požadavky jako je poločas přeměny, emisní charakteristiky, dostupnost a další vlastnosti. [14], [34], [49]

Přehled nejčastěji používaných radionuklidů v nukleární medicíně společně s jejich poločasy rozpadu, typem emitovaného záření a použitím je uveden níže viz. tabulka č. 1.

Radioisotope	$t_{1/2}$ [h]	Radiation Type	Use
^{18}F	1.83	β^+ EC	PET isotope
^{64}Cu	12.7	β^+ β^-	PET isotope
^{68}Ga	1.1	β^+ EC	PET isotope
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.0	IT	γ -emitter
^{111}In	67.9	EC	γ -emitter
^{123}I	13.2	EC	γ -emitter
^{90}Y	64.1	β^-	PET isotope
^{86}Y	14.7	β^+	PET isotope
^{177}Lu	161.0	β^- EC	PET isotope

Type (β^+ : positron emission, β^- : beta emission, IT: isomeric transmission, EC: electron capture) and their potential in radiopharmaceutical applications.

Tabulka č. 1: Souhrn nejčastěji používaných radionuklidů v nukleární medicíně s jejich poločasy rozpadu, typy záření a použitím. [49]

6.2 Příprava radionuklidů

Pro výrobu radiofarmak se používají radionuklidy, které jsou připravovány uměle. V průběhu různých jaderných reakcí dochází ke změně stavby atomového jádra, kdy vzniká jádro jiné, které je radioaktivní. To se děje ve speciálních zařízeních, a to v cyklotronu nebo v jaderném reaktoru, kdy se jedná o primární zdroje radionuklidů.

Sekundárním zdrojem radionuklidů je tzv. radionuklidový generátor, kde dochází samovolnou radioaktivní přeměnou mateřského prvku, který byl získán z cyklotronu nebo jaderného reaktoru, ke vzniku prvku dceřiného, který je použit pro přípravu radiofarmaka. [22], [25]

6.2.1 Výroba radionuklidů v jaderném reaktoru

Hlavní využití jaderných reaktorů spočívá primárně ve výrobě energie, ale můžeme je použít i pro výrobu řady radionuklidů. V jaderném reaktoru dochází k řízené řetězové štěpné reakci, kde se jako štěpný materiál používá nejčastěji obohacený ^{235}U . Radionuklidy se vyrábějí aktivací neradioaktivních látek proudem neutronů, nebo se separují ze štěpných produktů uranu.

Výhodou tohoto způsobu přípravy radionuklidů je velký výtěžek reakce. Naopak nevýhodou představuje to, že vzniklý radionuklid je chemicky shodný s ozařovaným prvkem a nedá se od něho oddělit, je zředěný stabilními atomy terčového prvku, a proto je jeho měrná aktivita nízká. Někdy můžeme radionuklid získat v beznosičové formě, a to pokud se jádro vzniklé v jaderném reaktoru samovolně přemění na další radionuklid.

Významné jsou pouze ty radionuklidy, jejichž výtěžek je poměrně vysoký, a ty které mají dlouhý poločas přeměny. Pro využití v nukleární medicíně to jsou zejména ^{99}Mo , který se dále využívá hlavně jako zdroj technecia ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), ^{131}I a některé další radionuklidy, jako např. ^{133}Xe . [22], [25]

6.2.2 Výroba radionuklidů v cyklotronu

V cyklotronu, na rozdíl od jaderného reaktoru vznikají radionuklidy s vysokou měrnou aktivitou. Toto zařízení pracuje na principu urychlování nabitých částic (protonů, deutronů, alfa částic) v magnetickém poli na vysokou energii. Takto urychlené částice poté dopadají na vhodný terč a vyvolávají na něm různé jaderné reakce, nejčastěji reakce typu (n, γ) . Následně se terč rozpustí ve vhodném rozpouštědle a vzniklé radionuklidy je možno oddělit kapalinovou extrakcí, srážením, iontovou výměnou nebo gelovou chromatografií. Takto vyrobené radionuklidy jsou nejčastěji zářiče β^+ . [22]

Pro běžnou produkci radioizotopů byl vyvinut malý kompaktní lékařský cyklotron. Jeho využití spočívá zejména v přípravě radioizotopů pro pozitronovou emisní tomografii, jako jsou ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N a ^{15}O . Výhodou těchto zařízení je schopnost produkovat velké množství radioizotopů v relativně krátkém čase přímo na pracovištích nukleární medicíny. To je důležité zejména s ohledem na velmi krátký poločas takto připravených radionuklidů, např. poločas přeměny ^{11}C je 20 min, 10 min pro ^{13}N a pouze 2 min pro ^{15}O . [26]

Radionuklidy, které se využívají pro přípravu hromadně vyráběných radiofarmak, se vyrábějí ve velkých produkčních cyklotronech. [22]

6.2.3 Radionuklidy připravené z generátorů

Generátor radionuklidů je zařízení, které obsahuje na vhodný nosič vázaný mateřský radionuklid, ze kterého následně vzniká radioaktivní přeměnou radionuklid dceřiný. Ten je možné od mateřského radionuklidu oddělit elucí vhodným elučním činidlem na základě jejich odlišných chemických vlastností. Tímto způsobem získáme z generátoru požadovaný radionuklid v čisté formě. Takto připravený radionuklid se následně může využít k přímému použití nebo je možné ho připojit na vhodný nosič.

Výhodou radionuklidových generátorů je to, že dceřiný radionuklid můžeme takto připravovat opakovaně, a to po dobu, která závisí na poločasu přeměny radionuklidu mateřského. Získané radionuklidy mají krátký poločas, takže pro vyšetřovaného nepředstavují riziko ve smyslu vysoké radiační zátěže. Aby byla vyšetřovanému zajištěna bezpečnost podávaného přípravku, musí být radionuklidový generátor sterilní a bez obsahu pyrogenních látek. Proto se vždy po přípravě daného radionuklidu sterilizuje autoklávováním.

Radionuklidové generátory jsou snadno přenosné, takže produkce krátkodobých dceřiných radionuklidů může probíhat přímo na daném pracovišti bezprostředně před jejich podáním vyšetřovanému. [22], [25]

Rozlišujeme několik typů generátorů, a to generátory chromatografické, extrakční a sublimační. Nejpoužívanějším typem generátoru je typ chromatografický, a to hlavně díky jeho malým rozměrům a nenáročnosti na obsluhu. [22]

Jelikož je v dnešní době většina používaných radiofarmak značená ^{99m}Tc , je nejčastěji používaný generátor ^{99}Mo - ^{99m}Tc . Hlavní část toho typu generátoru představuje kolona naplněná oxidem hlinitým, na který je adsorbovaný mateřský radionuklid ^{99}Mo . Na kolonu je přiváděno eluční činidlo což je izotonický roztok chloridu sodného. Molybden, který je přítomný na koloně ve formě molybdenanu amonného se přeměňuje na technecium (^{99m}Tc) ve formě technecistanu amonného. Následnou elucí se slabě vázané technecium z kolony vymyje a naopak silně vázaný molybden na koloně zůstává a může být opětovně přeměněn na další technecium. Získaný eluát se může přímo podat vyšetřované osobě nebo se může použít pro přípravu

nejrůznějších radiofarmak. Použitelnost tohoto typu generátoru jsou přibližně dva týdny.

Kromě ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátoru, díky kterému získáváme radionuklidy s krátkým poločasem přeměny, rozlišujeme ještě další generátorové systémy. Jsou to generátory pro radionuklidy s velmi krátkým poločasem přeměny, a to generátor ^{81}Rb - $^{81\text{m}}\text{Kr}$ nebo generátory pro radionuklidy emitující pozitrony, jako je ^{68}Ge - ^{68}Ga generátor. Další možné typy jsou např. ^{113}Sn - $^{113\text{m}}\text{In}$ generátor, ^{87}Y - $^{87\text{m}}\text{Sr}$ generátor nebo generátor ^{90}Sr - ^{90}Y . [22], [25]

6.3 Přehled nejčastěji používaných radionuklidů

6.3.1 Technecium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)

V současné době se více než 85 % diagnostických vyšetření v onkologii provádí za využití $^{99\text{m}}\text{Tc}$ značených radiofarmak. Potenciál tohoto radioizotopu popisují četné preklinické i klinické studie. [49]

Důvodem pro jeho časté použití jsou zejména jeho téměř ideální fyzikální vlastnosti a výhodné jaderné charakteristiky. [25] $^{99\text{m}}\text{Tc}$ je relativně snadno syntetizováno prostřednictvím komerčně dostupného ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátoru. Výhodné je zejména to, že náklady na tento způsob výroby jsou poměrně nízké.

Další pozitivní vlastností tohoto radioizotopu je jeho poločas rozpadu, a to 6 hodin. Tato doba je dostatečně dlouhá pro syntézu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -značených radiofarmak i pro provedení vlastního vyšetření, a naopak dost krátká na to aby pro vyšetřovaného nepředstavovala velkou radiační zátěž. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ emituje pouze záření γ a jeho energie je 140 keV, což je energie dostatečná pro průchod tělem pacienta a následnou detekci zakončenou zobrazením vyšetřovaných orgánů. [20], [49]

Existuje několik způsobů jak radioaktivně značit peptidy prostřednictvím $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Přímé značení je relativně snadné, a provádí se redukcí kovu. To je ale možné pouze pod podmínkou, že jsou v peptidové sekvenci přítomné disulfidové můstky. Tato metoda má ale několik nevýhod, a to zejména vznik nestabilních komplexů a navíc může být vazebná afinita peptidu ovlivněna chemicky modifikovanými peptidovými strukturami.

Alternativně může být ^{99m}Tc zavedeno pomocí bifunkčních chelatačních látek, jako je např. diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA). Poté vzniká stabilní a specifická vazba radioizotopu, která umožňuje dále zkoumat vlastnosti daného peptidu.

Komplexy s chelatačními činidly jsou ale v poměrně velkém množství vychytávány v játrech a také ve střevě, proto byly vyvinuty nové druhy chelatačních látek na bázi organokovových sloučenin. [49]

6.3.2 Indium (^{111}In)

^{111}In je získáváno z cyklotronu, takže je relativně snadno dostupné a jeho poločas rozpadu je 67,9 hodin. Díky dlouhému poločasu rozpadu se často používá pro snímkování v intervalu několika dnů. Jedná se o ideální radionuklid pro značení imunoglobulinů. Radionuklid se rozpadá elektronovým záchytem s emisí dvou fotonů gama o energii 173 a 247 keV.

Jak již bylo uvedeno výše, byl prvním schváleným radioterapeutickým přípravkem pro klinické použití analog somatostatinu OctreoScan značený právě ^{111}In . Jedná se o diagnostický přípravek využívaný pro identifikaci neuroendokrinních nádorů. Nicméně, i když má ^{111}In delší poločas rozpadu, je pro zobrazování neuroendokrinních nádorů využíván radionuklid ^{99m}Tc . [14], [20]

6.3.3 Gallium (^{66}Ga , ^{67}Ga , Ga^{68})

Radioizotopy gallia mohou být díky svým vlastnostem využívány jak pro SPECT, tak i pro PET zobrazování a jsou stále předmětem významného zájmu.

^{66}Ga je radionuklid s ideálními fyzikálními vlastnostmi pro pozitronovou emisní tomografii. Jeho poločas rozpadu je 9,5 hodiny a je získáván z cyklotronu. Jedinou nevýhodou je to, že díky jeho kratšímu poločasu rozpadu je nutné mít pro jeho produkci cyklotron přímo na oddělení nukleární medicíny, aby mohla být jím značená radiofarmaka připravována přímo na oddělení před podáním vyšetřovanému.

Radionuklid ^{67}Ga je také produkován cyklotronem a díky jeho fyzikálním vlastnostem je vhodný pro diagnostické zobrazování. Jeho poločas rozpadu je 3,3 dní a emituje mnoho fotonů γ s energií od 91 do 388 keV.

^{68}Ga je radionuklid snadno dostupný pomocí ^{68}Ge - ^{68}Ga generátoru. Má velmi krátký poločas rozpadu, a to 1,13 hodiny. Tento radionuklid se díky svým vlastnostem používá zejména pro pozitronovou emisní tomografii. [14]

6.3.4 Měď (^{64}Cu)

Radioizotop ^{64}Cu je relativně snadno dostupný z cyklotronu nebo generátorového systému. [20] Jeho poločas rozpadu je 12,7 hodin a během rozpadu emituje jak záření β^+ o energii 0,651 MeV, tak záření β^- o energii 0,578 MeV. Díky jeho výhodným fyzikálním a radiochemickým vlastnostem je vhodný jak pro použití při pozitronové emisní tomografii tak i pro radioterapii. [14], [49]

Kromě izotopu ^{64}Cu , se vyskytují i další reaktivní izotopy mědi jako jsou např. ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu a ^{67}Cu . Jejich poločasy rozpadu se pohybují v rozmezí od 9,8 minut až po 61,9 hodin. [20]

6.3.5 Fluor (^{18}F)

Radioizotop nekovového prvku fluoru (^{18}F) je používán pro diagnostické účely a to zejména díky jeho výhodným fyzikálním a radiochemickým vlastnostem. Jeho poločas přeměny je 1,83 hodiny. Konkrétně je tento radioizotop používán pro pozitronovou emisní tomografii.

Jelikož se jedná o krátkodobý radioizotop, musí být jeho syntéza rychlá. Nicméně, je ale jeho syntéza poměrně časově náročná a zahrnuje několik kroků. Navzdory tomuto omezení bylo připraveno několik užitečných peptidů značených ^{18}F a to zejména analogů somatostatinu. [49]

6.3.6 Yttrium (^{86}Y , ^{90}Y)

^{86}Y je snadno dostupný radionuklid získávaný z cyklotronu. Má středně dlouhý poločas rozpadu, a to 14,7 hodiny a emituje záření β^+ . Jedná se o radionuklid používaný pro zobrazování pomocí pozitronové emisní tomografie. [14], [20]

Radioizotop ^{90}Y je možné získat z vhodného generátorového systému. Jedná se o čistý β^- zářič s poločasem rozpadu 64,1 hodiny. Je to pravděpodobně nejpoužívanější radionuklid pro cílenou radioterapii používaný v klinických studiích. Byl použit pro léčbu různých typů nádorů včetně non-Hodgkinského lymfomu, nádoru mozku, jater, tlustého střeva, prsu, vaječníku nebo prostaty. Může být používán také pro zobrazování solidních tumorů. [20], [49]

6.3.7 Lutecium (^{177}Lu)

Nejčastěji používaným izotopem lutecia je právě izotop ^{177}Lu . Jeho poločas rozpadu je 160,8 hodin. Kromě toho, že emituje částice β^- s energií 479 keV, tak navíc vysílá i paprsky γ jejichž energie je 113 a 208 keV. Díky jeho fyzikálním a chemickým vlastnostem se jedná o ideální terapeutický radionuklid. Výhodný je jeho dlouhý poločas rozpadu, který poskytuje dostatečně dlouhou dobu na přípravu a aplikaci radiofarmaka.

Radioizotopem ^{177}Lu jsou například značeny analogy neurotensinu, které jsou používané při terapii nádorů pankreatu, vůči nimž vykazují specifickou aktivitu. [20], [31], [49]

6.3.8 Promethium (^{149}Pm)

Promethium (^{149}Pm) řadíme do skupiny radiolanthanoidů. Jeho poločas přeměny je 53 hodin, emituje záření β^- o energii 1,07 MeV a také paprsky γ s energií 286 keV. Vysoká specifická aktivita tohoto radionuklidu je vhodná pro cílení na specifické receptory, které v omezeném množství nalézáme na mnoha nádorových buňkách.

Jediná nevýhoda radionuklidu ^{149}Pm spočívá v jeho vysokých nákladech na pořízení, což omezuje jeho dostupnost pro klinické využití. [20]

6.3.9 Rhenium (^{186}Re , ^{188}Re)

Radioizotop ^{188}Re je produkován ve vhodném generátorovém systému. Jeho poločas rozpadu je 16,94 hodin, emituje záření β^- o energii 2,12 MeV a energie vyzářeného paprsku γ je 155 keV. Pro jeho atraktivní fyzikální vlastnosti a širokou dostupnost je v nukleární medicíně využíván pro terapeutické účely.

Dalším izotopem rhenia vhodným pro terapeutické účely je ^{186}Re . Je produkován v jaderném reaktoru a jeho poločas rozpadu je 3,7 dne. Při jeho rozpadu dochází k emisi β^- , kdy hodnota maximální energie je 1,07 MeV a energie emitovaného γ fotonu je 137 keV. I přes jeho výhodné fyzikální charakteristiky se izotop ^{186}Re pro terapeutické aplikace příliš nevyužívá kvůli jeho nízké specifitě. [14]

6.3.10 Rhodium (^{105}Rh)

Zájem o radionuklid ^{105}Rh pro terapeutické využití vzrůstá až v posledních několika letech. Radionuklid je produkován v jaderném reaktoru a jeho poločas rozpadu je 36 hodin. Emituje dvě β^- částice, a to o střední (0,56 MeV) a nízké (0,25 MeV) energii.

[14]

7 Peptidy

7.1 Definice peptidů

Peptidy jsou relativně malé molekuly skládající se z různého počtu aminokyselin, které jsou navzájem spojené peptidovými vazbami. Počet aminokyselin v jednom peptidu může být velmi variabilní. Od proteinů se liší tím, že většina z nich nemá dobře definovanou terciální strukturu. Peptidy se vyskytují jak ve své přirozené fyziologické podobě, tak mohou být vyrobeny synteticky jako nové molekuly. V současné době je počet synteticky připravených peptidů velmi vysoký.

Jelikož se obvykle jedná o hydrofilní molekuly, vyznačují se vynikající permeabilitou, což jim umožňuje snadný a rychlý přístup do místa nádoru. Jedinou výjimku představuje hematoencefalická bariéra, kterou pokud je neporušená, peptidy nemohou pronikat. Toto je důležité zejména proto, aby se radioaktivně značené peptidy nedostávaly do mozku, který exprimuje receptory pro většinu peptidových hormonů a mohlo by docházet k vedlejším účinkům na centrální nervový systém. Jak ale bylo prokázáno u gliomů mozku, pokud je hematoencefalická bariéra narušená mohou jí peptidy proniknout a navázat se na specifický receptor.

Mezi fyziologicky se vyskytující peptidy patří podskupina tzv. regulačních peptidů. Skupina regulačních peptidů zahrnuje např. neuropeptidy vyskytující se v mozku, střevní peptidové hormony nebo peptidy přítomné v endokrinním systému. Regulační peptidy tedy představují širokou skupinu rozdílných molekul, které v lidském těle působí na různé cíle a to již ve velmi nízkých koncentracích. Peptidy jsou cíleny zejména na mozek a gastrointestinální trakt, ale také na endokrinní systém, ledviny, plíce, imunitní a vaskulární systém a periferní nervový systém. Na základě těchto poznatků je možné usoudit, že regulační peptidy řídí a modulují funkci téměř všech důležitých orgánů a metabolických procesů.

Účinek těchto peptidů je zprostředkován prostřednictvím specifických receptorů, které se vyskytují na membráně buněk. Většina těchto specifických receptorů patří do skupiny receptorů spřažených s G proteinem.

Vylučování peptidů z těla se obvykle děje prostřednictvím renální nebo hepatobiliární exkrece. Způsob vylučování závisí na typu peptidu a zároveň na provedených strukturálních modifikacích.

Regulatorní peptidy hrají důležité role jak za normálních fyziologických podmínek, tak i v patologických procesech. Mohou se podílet např. na vzniku a rozvoji zánětu, ale uplatňují se i při vývoji a progresi nádorového bujení. [39]

7.2 Historie používání radioaktivně značených peptidů a protilátek

Poté co byla prokázána exprese receptorů různých regulačních peptidů na lidských nádorech, byla zahájena aplikace těchto peptidů jako diagnostických nebo terapeutických radiofarmak. [49]

Syntéza peptidů byla poprvé popsána před více než 40 lety, a to nositelem Nobelovy ceny Brucem Merrifieldem. Využití radioaktivně značených peptidů pro diagnostiku a terapii nádorů se stalo populární až zhruba před deseti lety, kdy se jako alternativa k radioaktivně značeným protilátkám objevil analog somatostatinu, konkrétně ^{123}I -[7]-octreotid, což byl historicky první klinicky testovaný radioaktivně značený peptidový hormon. [20], [49]

Somatostatin byl poprvé izolován z hypotalamu ovcí v 70. letech. První schválený a komerčně dostupný přípravek pro zobrazování nádorů byl [^{111}In -DTPA]-octreotid (OctreoScan) registrovaný v roce 1994 a využíval se zejména u neuroendokrinních nádorů. Tento analog somatostatinu nahradil dříve používaný ^{123}I -Tyr³-octreotid, který byl poprvé popsán Krenningem a spolupracovníky. [^{111}In -DTPA]-octreotid má oproti dříve používanému ^{123}I -Tyr³-octreotidu řadu výhod, a to zejména delší biologický poločas a nižší akumulaci v játrech, gastrointestinálním traktu a žlučníku. [49]

Jako jeden z prvních gastrointestinálních hormonů byl původně z prasečího dvanáctníku izolován cholecystokinin. Jeho sekvenováním se ukázalo, že je příbuzný jinému gastrointestinálnímu hormonu, a to gastrinu. [8]

Gastrin poprvé identifikoval v roce 1905 John Sydney Edkins, jako stimulant sekrece žaludeční kyseliny. Dalších šedesát let trvalo, než byl Gregorym a Tracym charakterizován a izolován amidovaný gastrin (G-17 a G-37). [9]

Peptidový hormon bombesin (BBS) byl poprvé izolován z žabí kůže v roce 1971. V roce 1979 byl objeven jeho protějšek gastrin uvolňující peptid (GRP), který byl izolován z žaludku prasat. V posledních letech bylo vyvinuto několik analogů bombesinu. Tyto analogy byly značeny různými radioizotopy, jako např. ^{111}In , ^{105}Rh nebo $^{99\text{m}}\text{Tc}$. [49]

Vasoaktivní intestinální peptid (VIP) byl poprvé izolován z tenkého střeva v roce 1970. V 80. letech byla prokázána nadměrná exprese VIP receptorů u několika lidských nádorů. V roce 1994 Virgolini a spolupracovníci použili poprvé ^{123}I -VIP *in vivo*. O dva roky později Pearce a kolektiv syntetizovali metabolicky stabilnější VIP analogy.

Neuropeptid Y (NPY) byl izolován poprvé v roce 1982 z prasečího mozku. Může být využit jak pro diagnostiku, tak léčbu nádorů prsu a neuroblastomů. [49]

Ve vývoji radiofarmak pro pozitronovou emisní tomografii, má významnou roli radioaktivní izotop fluoru (^{18}F), který poprvé izoloval Snell. Během posledních let významně narostlo jeho klinické využití, zejména užití ^{18}F -deoxyglukosy v onkologii. Je to hlavně díky jeho vhodným fyzikálním a jaderným vlastnostem. [26]

V uplynulých letech bylo v preklinických a klinických studiích vyvinuto a zkoumáno mnoho peptidů, z nichž některé mají antiproliferační a antiapoptické účinky a v budoucnu se mohou stát slibnými nástroji v diagnostice i terapii lidských nádorů. Některé peptidové hormony vhodné pro diagnostické a terapeutické účely společně s jejich rokem objevení a popisem využití jsou uvedeny níže viz. tabulka č. 2. [20]

Před více než 25 lety bylo zavedeno do praxe použití monoklonálních protilátek, jako specifických nástrojů pro cílení nádorových buněk. Během následujícího desetiletí, se ale objevily jisté pochybnosti o tom, zda jsou opravdu schopné plnit očekávané funkce. Nicméně některé jejich problémy se podařilo vyřešit a přinejmenším v některých oblastech jako je např. léčba hematologických malignit jsou značené monoklonální protilátky nebo jejich fragmenty využívány. [5]

Používání monoklonálních protilátek bylo omezeno zejména kvůli jejich pomalé krevní clearance, vzhledem k jejich vysoké molekulové hmotnosti (140-160 kDa). [20]

Peptide	First Reported	Amino Acids	Tumor
Somatostatin	1973	14	Neuroendocrine tumor, neuroblastoma, renal cell carcinoma, small cell lung cancer, breast cancer, prostate cancer, malignant lymphoma, brain tumor
Bombesin	1971	14	Prostate cancer, breast cancer, small cell lung cancer, colon cancer, glioblastoma, gastric cancer
Gastrin releasing peptide (GRP)	1979	27	Prostate cancer, breast cancer, small cell lung cancer, melanoma
VIP	1970	28	Cancer of lung, stomach, colon, rectum, breast, prostate, pancreatic ducts, liver and urinary bladder, neoplasm
Neuropeptide Y	1982	36	Neuroblastoma, glioblastoma, breast cancer, ovarian adenocarcinoma, ovarian sex cord-stromal tumor, gastrointestinal stromal tumor, nephroblastomas, renal cell carcinoma, paraganglioma, pheochromocytoma
Neurotensin	1973	Linear tridecapeptide	Small cell lung cancer, colon cancer, thyroid cancer, breast cancer carcinoma, meningiomas, ewing sarcoma, astrocytoma, medulloblastoma
α -MSH	1955	Linear tridecapeptide	melanoma
Substance P	1931	11	Bronchial carcinoids, small cell lung cancer, brain tumor
CCK	1968	33	Colorectal cancer, pancreatic cancer, small cell lung cancer, medullary thyroid carcinoma, some stromal ovarian cancer, astrocytomas

Tabulka č. 2: Potenciální nádorově zaměřené peptidové hormony pro diagnostiku a léčbu různých nádorů. [49]

7.3 Význam peptidů a jejich receptorů u nádorových onemocnění

Důvodem zájmu o peptidy a peptidové receptory je možnost cílení na konkrétní receptory, které jsou často exprimovány na mnoha typech lidských novotvarů. Lze prokázat to, že peptidové receptory jsou nadměrně exprimovány na nádorových buňkách ve srovnání s jejich expresí na buňkách normální tkáně. [39]

Aby se peptidové hormony daly použít jako radiofarmaka, musí splňovat určité podmínky. Nejdůležitější podmínkou je dostatečná exprese specifických receptorů na nádorových buňkách, to znamená, že hustota receptorů v nádorové tkáni musí být vysoká. Dále by peptid měl mít k receptoru vysokou vazebnou afinitu a to i v případě, že se jedná o některý ze specifických podtypů daného receptoru. [49]

Jak již bylo řečeno, vyskytují se podtypy různých receptorů, které mohou být kódovány na odlišných chromosomech. Příslušné přirozené ligandy se váží s podobnou nebo dokonce stejnou afinitou ke všem receptorovým podtypům. To ale neplatí u chemicky modifikovaných syntetických analogů, které jsou často vysoce selektivní pouze pro jeden nebo několik těchto podtypů. [4]

Určité požadavky jsou kladeny také na samotnou chemickou syntézu radiofarmak. Většina radiofarmak je značena krátkodobými radionuklidy, proto musí být metody jejich přípravy proveditelné v relativně krátké době a vzniklé produkty by měly mít

vysokou stabilitu. Cílem radioaktivního značení je rychlý a vysoký příjem značeného radiofarmaka nádorem, ale zároveň je třeba zajistit, aby se radioaktivní peptid neakumuloval ve zdravé tkáni.

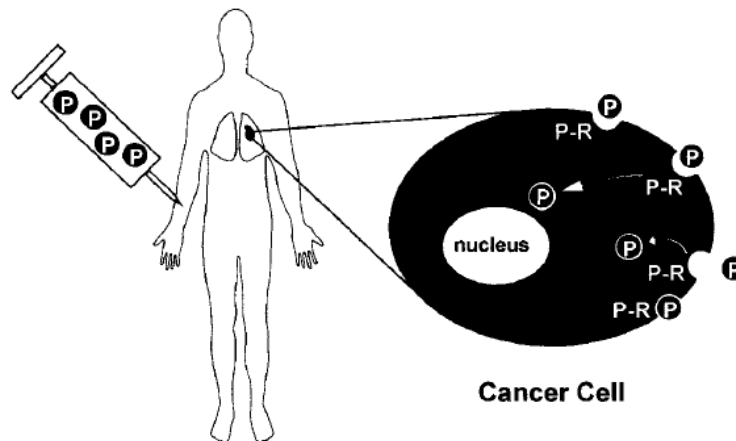
Výhodou peptidů je to, že jsou odolné i vůči nepříznivým chemickým reakčním podmínkám, kterým mohou být vystaveny při zavádění radionuklidu. Dále jsou rychle uvolňovány z plazmy a oproti proteinům jsou méně imunogenní. Nevýhodami peptidových hormonů je jejich omezená biologická dostupnost nebo možné vedlejší účinky. Za další nevýhodu může být považována nemožnost perorální aplikace.

Peptidové hormony jsou v krvi rychle metabolicky inaktivovány, jelikož jsou proteolyticky degradovány přítomnými peptidázami. Obvykle dojde k jejich úplné degradaci již během několika minut. Peptidy jsou degradovány nejenom v krvi, ale dále také v játrech a ledvinách. Je tedy obtížné zajistit to, aby docházelo k jejich dostatečnému vstřebávání v cílové tkáni. Kvůli tomu jsou vyvíjeny metabolicky stabilnější peptidové hormony. Úpravy, kterým proto peptidy podléhají, zahrnují často modifikace aminokyselinových sekvencí. Důležité je to, že tyto úpravy nijak neovlivňují vazebnou afinitu peptidu na příslušný receptor. Metabolická stabilita peptidů může být zvýšena několika různými způsoby, a to například zavedením nepřírodních aminokyselin, amidací jejich C-konce, částečnou nebo kompletní cyklizací, fosforylací aminokyselin nebo modifikací postranních řetězců.

Je důležité zajistit rovnováhu mezi pomalou a rychlou proteolytickou degradací peptidů. Peptid, který by podléhal degradaci příliš rychle, se nebude dostatečně v nádoru akumulovat a naopak peptid, který je metabolicky stabilní se bude v organismu zdržovat velmi dlouho, jelikož jeho uvolňování z krve bude pomalé. [35], [49]

K čemu dochází v těle pacienta po aplikaci radioaktivně značeného peptidu, je zobrazeno na obr. č. 1.

Peptide Receptor Targeting of Cancer



Obr. č. 1: Radioaktivně značený peptid je injekčně aplikován pacientovy a dochází k jeho distribuci v celém těle. Pokud je v těle přítomný nádor, jehož buňky exprimují odpovídající peptidový receptor, peptid se na něj naváže (P-R) a internalizuje se s receptorem do buňky, kde se akumuluje radioaktivita. Nahromaděná radioaktivita je následně detekována při celotělovém snímkování. [39]

7.4 Podmínky pro terapii receptorově specifickými radioaktivně značenými peptidy

Zda je pacient trpící nádorovým onemocněním vhodným adeptem pro léčbu radioaktivními receptorově specifickými peptidy rozhodují následující dvě kritéria, a to kritéria klinická a molekulárně biologická.

Pacienti splňující klinická kritéria jsou ti, kteří již byli léčeni jiným způsobem, jako je např. chemoterapie, která ale nebyla úspěšná, nebo se u nich vyskytují těžko operovatelné nebo neoperovatelné nádory a jejich metastázy. Vhodnými kandidáty jsou také pacienti trpící mozkovým nádorem, kde selhala předchozí chirurgická léčba.

Základním molekulárně biologickým kritériem je přítomnost odpovídajícího peptidového receptoru na konkrétním typu nádoru a jeho metastázách ve vysoké hustotě. Expresce daného peptidového receptoru je velmi heterogenní, to znamená, že některé oblasti nádoru vykazují vysokou hustotu daného receptoru a jiné oblasti receptory postrádají. Vhodným cílem pro terapii radioaktivně značenými peptidy je tedy takový nádor, který exprimuje specifické receptory homogenně. Důležitým faktorem je

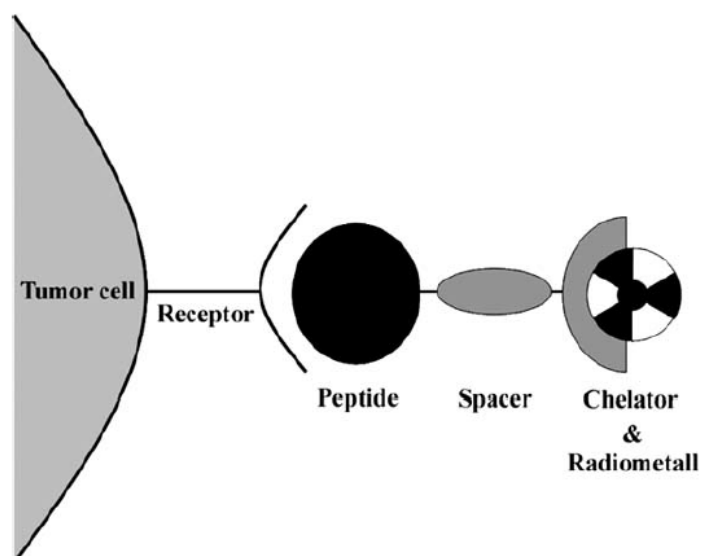
také to, zda se jedná o některý z podtypů daného receptoru. Zde je důležité, aby se peptid vázal s dostatečnou afinitou právě k přítomnému receptorovému podtypu. Pro úspěšnou léčbu by měl přítomný nádor vykazovat dostatečnou radiosenzitivitu.

Pacienti jsou tedy vybíráni na základě hustoty exprimovaných receptorů na daném typu nádoru a následně na základě provedené scintigrafie, jejímž výsledkem je potvrzení místa primárního nádoru a metastáz a rovněž vyhodnocení hustoty receptorů v konkrétním typu nádoru.

Klinické studie vykazují nejvyšší účinnost léčby u pacientů, jejichž nádory exprimují somatostatinové receptory a v menší míře receptory cholecystokininu, konkrétně CCK2. [40]

7.5 Struktura peptidového receptorově specifického radiofarmaka

Typická struktura radiofarmak na bázi peptidů využívaných pro léčbu a diagnostiku nádorů, která je zároveň zobrazena na obr. č. 2, se obvykle skládá ze čtyř částí. První částí je vlastní peptid, který musí mít takové strukturní rysy, které jsou nutné pro vazbu na příslušný receptor. Druhou část představuje tzv. spojka (spacer nebo linker), která ale není vždy nezbytnou součástí. Dá se použít pro úpravu farmakokinetických vlastností peptidu a zároveň zajišťuje požadovanou vzdálenost peptidu od bifunkčního chelatačního činidla. Třetí částí je výše zmíněné bifunkční chelatační činidlo (BFCA), které tvoří most mezi peptidem a radionuklidem. Obsahuje dvě vazebná místa, kdy jedno slouží k připojení chelatačního činidla přes spojku s peptidem a druhé pro vazbu radionuklidu. Čtvrtou část představuje vhodný radionuklid, který slouží jako zdroj záření. [20], [49]



Obr. č. 2: Cílová struktura radiofarmaka na bázi peptidu využívaného pro diagnostiku nebo léčbu nádorů. Peptid je připojený k chelatačnímu činidlu přímo nebo pomocí spaceru a chelatační činidlo vytváří komplex s radionuklidem. Takto připravené radiofarmakum se může vázat na specifické receptory exprimované na různých nádorech. [49]

7.6 Metody radioaktivního značení

Existuje několik možností jak připojit radionuklid k danému peptidu. Rozlišujeme tři hlavní přístupy:

1. přímé značení,
2. předznačení (značení před konjugací),
3. post – značení (značení po konjugaci).

Každý z těchto výše uvedených přístupů má své výhody a nevýhody. Při volbě vhodné metody je důležité zohlednit typ peptidu a vlastnosti příslušného radionuklidu. [20]

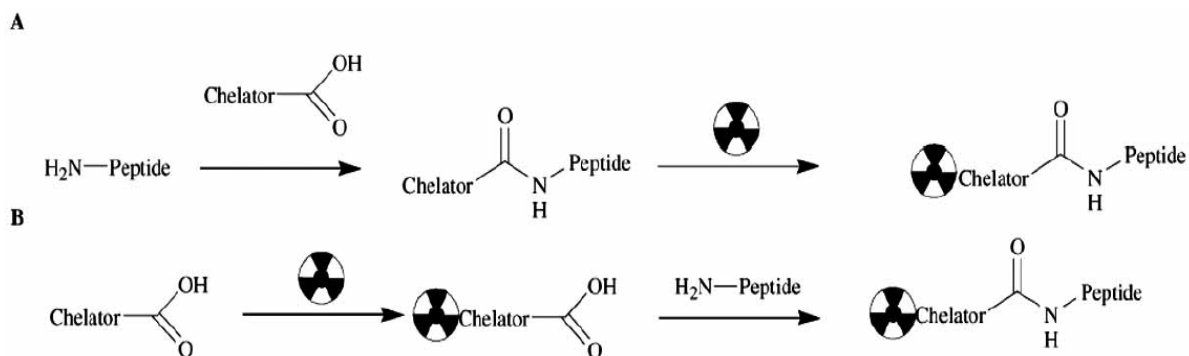
Metoda přímého značení se využívá zejména u výroby radiofarmak značených ^{99m}Tc . Jedná se o relativně časově nenáročný a snadný přístup pro značení peptidů, nebo také proteinů. Při tomto způsobu značení není potřeba žádné exogenní chelatační činidlo. Pro vazbu radionuklidu se využívají funkční skupiny přirozeně se vyskytující v sekvenci peptidového řetězce. Při této metodě se využívá redukční činidlo, které rozruší disulfidové můstky a na vzniklé volné thiohy se může vázat radionuklid.

Tato metoda ale vykazuje několik nevýhod. Za hlavní nevýhodu je považováno to, že není vhodná pro peptidy, které neobsahují disulfidové můstky. Dalším omezením je to, že v průběhu značení může dojít ke změnám ve struktuře, stabilitě a farmakokinetických vlastnostech značené molekuly, jelikož proces značení je obtížně kontrolovatelný. Metoda přímého značení je vhodná pro značení velkých proteinů, jako jsou monoklonální protilátky a jejich fragmentů. Pro značení menších peptidů se metoda přímého značení příliš nevyužívá, protože buď neobsahují disulfidové můstky, nebo si po proběhlé redukci neudrží dostatečnou vazebnou aktivitu. [14], [20]

Dalším přístupem je metoda předznačení. Metoda se skládá ze dvou po sobě následujících kroků. V prvním kroku vzniká komplex BFCA-radioizotop a následně ve druhém kroku dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi tímto komplexem a daným peptidem. Radionuklid je připojen přímo k chelatačnímu činidlu a ne k peptidu, jelikož popsané kroky jsou prováděny odděleně. Tento přístup je, ale velmi složitý a časově náročný, takže není vhodný pro zavádění radionuklidů s krátkým poločasem přeměny. Pro radioaktivní značení peptidů je metoda předznačení používána velmi zřídka.

Posledním přístupem je značení po konjugaci. Metoda je založená na navázání peptidu kovalentní vazbou k bifunkčnímu chelatačnímu činidlu. K vazbě dochází buď přímo, nebo je využit spacer. Vzniká tedy komplex BFCA-peptid. Radionuklid je poté navázán na volnou skupinu chelatačního činidla. Bifunkční chelatační činidlo je připojeno na N- nebo C-konec peptidu nebo na postranní aminokyselinový řetězec. Při přípravě radioaktivně značených peptidů jako radiofarmak je tento přístup nejpoužívanější. [20], [49]

Poslední dva uvedené způsoby značení, a to značení po konjugaci a metoda předznačení, jsou pro ilustraci zobrazeny na obr. č. 3.



Obr. č. 3: Způsoby radioaktivního značení. A) Značení po konjugaci. Chelatační činidlo je připojeno k N – konci nebo postrannímu řetězci peptidu a následně je ke vzniklému komplexu připojen radionuklid. B) Metoda předznačení. K chelatačnímu činidlu je navázán radionuklid a až poté je tento komplex připojen k N – konci nebo postrannímu řetězci peptidu. U obou způsobů značení může nebo nemusí být vyžit spacer. [49]

7.7 Chelatační činidla

Pro radioaktivní značení peptidových hormonů je důležitá přítomnost bifunkčního chelatačního činidla. Jedná se o látky se dvěma potenciálními vazebnými místy. Na prvním vazebném místě se nachází funkční skupina, která je schopná navázat příslušný peptid a druhé vazebné místo obsahuje vhodnou skupinu pro navázání radionuklidu.

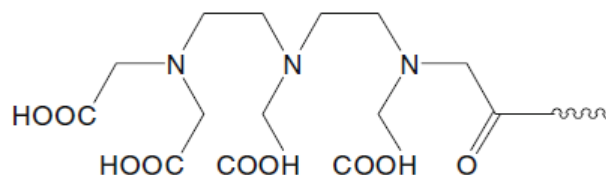
Bifunkční chelatační činidla musí splňovat několik podmínek. Musí být teplotně stabilní a vzniklý komplex radioizotop-BFCA by měl být kineticky inertní. Dodržení těchto podmínek je nezbytné pro vysokou akumulaci značeného peptidu v nádorové tkáni. [49]

7.7.1 Diethylentriaminpentaoctová kyselina

Bifunkční chelatační činidlo diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA), jehož struktura je uvedena na obr. č. 4, patří mezi acyklické polyaminokarboxylové kyseliny. Zájem o toto činidlo vzrostl zejména po úspěšném použití přípravku OctreoScan (^{111}In -DTPA-octreotid) pro diagnostiku nádorů, které exprimovaly somatostatinové receptory. [14]

DTPA může být připojeno jak k větším proteinům, jako např. albumin nebo protilátky, tak k malým peptidům. Nejvyšší *in vivo* stabilitu vykazují komplexy

DTPA-peptid s navázaným radionuklidem ^{111}In . Kineticky stabilní jsou také komplexy DTPA-peptid značené ^{90}Y . Naopak $^{99\text{m}}\text{Tc}$ má k vazebným místům tohoto chelatačního činidla nízkou afinitu, a proto se ke značení komplexů DTPA-peptid příliš nevyužívá. [20]



Obr. č. 4: Struktura chelatačního činidla diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA).

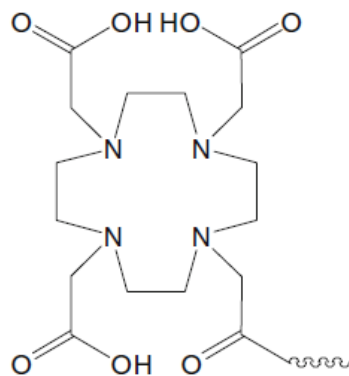
[15]

7.7.2 Tetraazacyklododekantetraoctová kyselina

1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan-1, 4, 7, 10-tetraoctová kyselina (DOTA), jejíž struktura je zobrazena na obr. č. 5, se řadí mezi makrocyclická chelatační činidla. Ve srovnání s acyklickými chelátory jsou komplexy s makrocyclickými chelatačními činidly stabilnější. [15]

Komplexy s tímto chelatačním činidlem jsou využívány zejména pro terapeutické účely. Je to dáno tím, že komplexy DOTA-peptid mohou být značeny radionuklidy ^{90}Y , ^{177}Lu a ^{111}In , za vzniku stabilních sloučenin. Bylo prokázáno, že komplexy DOTA-peptid značené ^{90}Y vykazují *in vivo* velmi dobré farmakokinetické vlastnosti. DOTA může vázat i diagnostické radionuklidy a to, ^{64}Cu nebo ^{68}Ga . Nevýhodou je, že při tomto způsobu značení může dojít k poškození peptidu, a to kvůli nutnosti zahřívání. [20], [41], [49]

Bylo vyvinuto několik derivátů tohoto bifunkčního chelatačního činidla, a to na základě obsahu 4 volných karboxylových skupin v molekule DOTA. Příkladem může být komerčně dostupný a široce využívaný derivát DOTA, tj. DOTA-tris(terc-butyl)ester, obsahující 3 terc-butylové skupiny. [49]

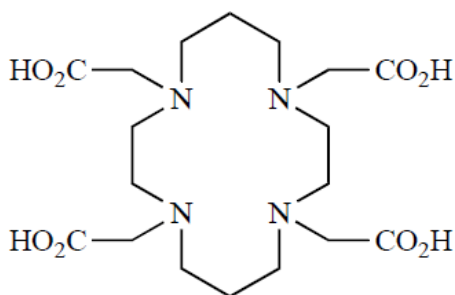


Obr. č. 5: Struktura chelatačního činidla 1, 4, 7, 10-tetraazacyklododekan-1, 4, 7, 10-tetraoctová kyselina (DOTA). [15]

7.7.3 Tetraazacyklotetradekantetraoctová kyselina

Chelatační činidlo 1, 4, 8, 11-tetraazacyklotetradekan-1, 4, 8, 11-tetraoctová kyselina (TETA), jehož struktura je zobrazena na obr. č. 6, se nejčastěji využívá pro vazbu radionuklidů mědi. Měď totiž poskytuje řadu radionuklidů od ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu až po ^{67}Cu , které mají široké rozpětí poločasů přeměny a jsou vhodné jak pro diagnostické, tak pro terapeutické účely. [20]

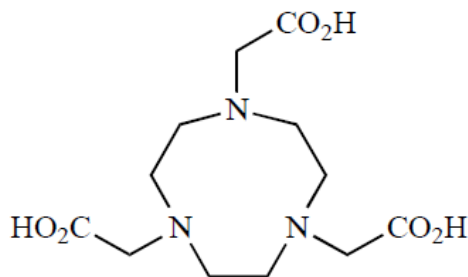
Komplexy TETA-peptid vykazují *in vivo* vyšší stabilitu než komplexy s chelatačním činidlem DTPA. [49]



Obr. č. 6: Struktura chelatačního činidla 1, 4, 8, 11-tetraazacyklotetradekan-1, 4, 8, 11-tetraoctová kyselina (TETA). [49]

7.7.4 1, 4, 7-triazacyklononan-1, 4, 7-trioctová kyselina

Po popsání chelatačního činidla 1, 4, 7-triazacyklononan-1, 4, 7-trioctová kyselina (NOTA) a jejich analogů pro jejich použití jako radiofarmak, byly popsány komplexy NOTA-peptid značené radionuklidy ^{67}Ga a ^{111}In . Toto chelatační činidlo bylo také využito pro značení protilátek a jejich fragmentů výše uvedenými radionuklidy. [20] Struktura uvedeného chelatačního činidla je uvedena na obr. č. 7.

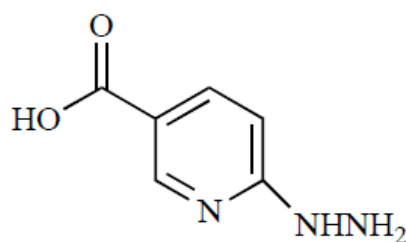


Obr. č. 7: Struktura chelatačního činidla 1, 4, 7-triazacyklononan-1, 4, 7-trioctová kyselina (NOTA). [49]

7.7.5 6-hydrazinonikotinová kyselina

6-hydrazinonikotinová kyselina (HYNIC), jejíž struktura je zobrazena na obr. č. 8, patří mezi oblíbená bifunkční chelatační činidla pro značení peptidů a proteinů radionuklidem $^{99\text{m}}\text{Tc}$, a to zejména díky jeho flexibilitě použití a atraktivním vlastnostem vzniklých radiofarmak. [21] Jako první bylo HYNIC s navázaným $^{99\text{m}}\text{Tc}$ použito ke značení polyklonálních protilátek třídy IgG. Poté se HYNIC začalo používat ke konjugaci s nejrůznějšími biomolekulami, jako např. s dalšími protilátkami, chemotaktickými peptidy, analogy somatostatinu a mnoha dalšími biomolekulami. [14]

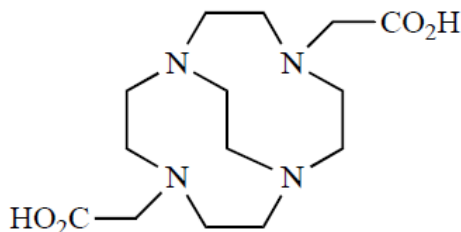
HYNIC může zaujímat pouze jedno nebo dvě koordinační místa na radionuklidu, proto je pro tvorbu stabilního komplexu nezbytné použití koligandu. [14] Mezi dva nejpoužívanější koligandy patří tricín a ethylendiamin-N-N'-dioctová kyselina (EDDA). Homogenní komplexy stabilní jak *in vitro*, tak *in vivo* vznikají za použití EDDA jako koligandu. Vyšší stabilita přípravku přispívá i k lepšímu cílení na nádorovou tkáň *in vivo*. Nevýhodou při tvorbě sloučenin s tímto koligandem je nutné zahřívání během procesu značení, kdy může dojít k narušení terciární struktury zejména větších peptidů. Sloučeniny s tricínem se naopak mohou připravovat při pokojové teplotě, ale vzniklé komplexy mají celkově nižší stabilitu. [21]



Obr. č. 8: Struktura chelatačního činidla 6-hydrazinonikotinová kyselina (HYNIC). [49]

7.7.6 4, 11-bis(karboxymethyl)-1, 4, 8, 11-tetraazabicyklo [6, 6, 2] hexadekan

Chelatační činidlo 4, 11-bis(karboxymethyl)-1, 4, 8, 11-tetraazabicyklo [6, 6, 2] hexadekan (CB-TE2A) je používáno pro značení peptidů zejména radionuklidem ^{64}Cu a jeho struktura je uvedena na obr. č. 9. V porovnání s konjugátem ^{64}Cu -TETA vykazuje konjugát ^{64}Cu -CB-TE2A zvýšenou kontinuální clearance z krve, jater a kostní dřeně. Byla také zkoumána stabilita tohoto chelatačního činidla *in vivo* v porovnání s chelatačním činidlem DOTA. Studie prováděná u myši s karcinomem prostaty prokázala vyšší clearance komplexu s chelatačním činidlem CB-TE2A oproti komplexu ve kterém bylo použito chelatační činidlo DOTA. [49]



Obr. č. 9: Struktura chelatačního činidla 4, 11-bis(karboxymethyl)-1, 4, 8, 11-tetraazabicyklo[6, 6, 2]hexadekan (CB-TE2A). [49]

7.7.7 3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo [9. 3. 1.] pentadeka-1 (15), 11, 13-trien-3, 6, 9-trioctová kyselina

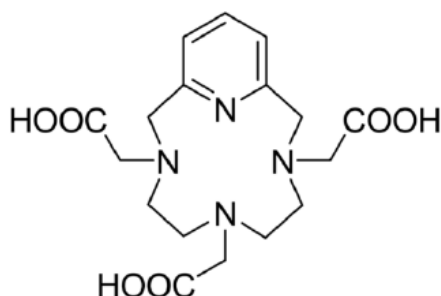
Chelatační činidlo 3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo [9. 3. 1.] pentadeka-1 (15), 11, 13-trien-3, 6, 9-trioctová kyselina (PCTA), jehož struktura je zobrazena na obr. č. 10, je díky svým vlastnostem velmi vhodné pro využití v nukleární medicíně, a to zejména v případech kde je nutná rychlá tvorba komplexu za mírných reakčních podmínek. [43]

Toto činidlo tvoří komplexy s kovy, jako jsou lutecium, indium nebo yttrium a to mnohem rychleji v porovnání s chelatačním činidlem DOTA. Rovněž vykazuje rychlou kinetiku tvorby chelátů.

Komplexy PCTA-peptid jsou úspěšně značeny radionuklidem ^{177}Lu , kdy za optimalizovaných podmínek lze dosáhnout velkého výtěžku značení. Komplex PCTA- ^{177}Lu je dle provedených *in vitro* studií vysoce stabilní jak ve fyziologickém roztoku, tak v séru. Biodistribuční studie prováděné u myši ukazují, že tento komplex není významně vychytáván v žádném životně důležitém orgánu. Jako jediné místo vychytávání byla identifikována játra a střeva. Vyšší vychytávání komplexu v játrech nastává pravděpodobně v důsledku toho, že komplex je málo hydrofilní.

Toto bifunkční chelatační činidlo se může použít i ke značení teplotně citlivých biomolekul, jako jsou např. monoklonální protilátky, a to díky tomu, že radioaktivní značení probíhá při pokojové teplotě a nemusí tedy docházet k zahřívání.

Výsledky klinických studií dokazují, že PCTA-NSC značené radionuklidem ^{177}Lu může být vhodné bifunkční chelatační činidlo pro klinické využití. [37]



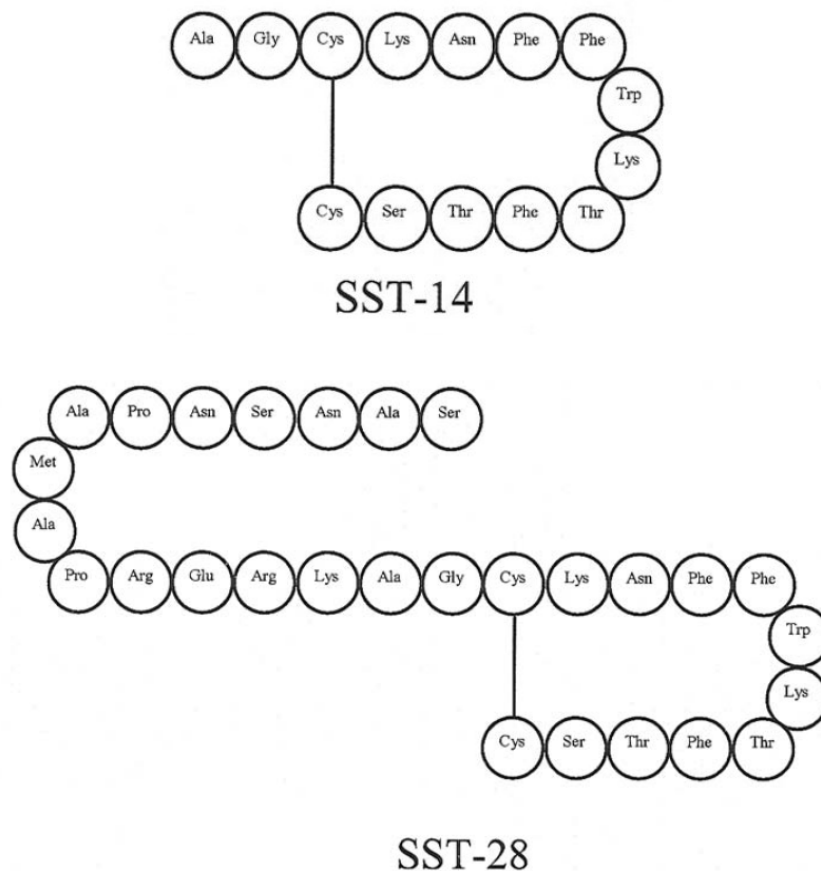
Obr. č. 10: Struktura chelatačního činidla 3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo [9. 3. 1.] pentadeka-1 (15), 11, 13-trien-3, 6, 9-trioctová kyselina (PCTA). [43]

7.8 Somatostatin

7.8.1 Charakteristika

Somatostatin je malý cyklický peptid, který je přítomný zejména v centrálním nervovém systému, včetně hypotalamu, mozkové kůry a mozkového kmene, kde působí jako neurotransmiter. Kromě CNS ho můžeme nalézt i v dalších systémech, jako je gastrointestinální trakt, exokrinní a endokrinní pankreas a imunitní systém. V periferních tkáních působí somatostatin zejména jako inhibitor, kde potlačuje uvolňování růstového hormonu, inzulínu, glukagonu a gastrinu. V mozku vykazuje somatostatin jak inhibiční, tak stimulační účinky. [6], [17], [20]

Somatostatin vzniká po proteolytickém štěpení jeho prekurzorů. Jedná se o prepro-somatostatin a pro-somatostatin. Po proběhlé proteolýze vznikají dvě biologicky aktivní formy, a to somatostatin-14 (složený ze 14 aminokyselin) a somatostatin-28 (složený z 28 aminokyselin), jejichž struktury jsou uvedeny na obr. č. 11. Oba typy působí prostřednictvím membránových receptorů spřažených s G proteinem. [17]



Obr. č. 11: Struktura somatostatinu-14 a somatostatinu-28. [14]

7.8.2 Role somatostatinu při nádorovém bujení

Somatostatin hraje důležitou roli při nádorovém bujení, jelikož jeho receptory nalézáme na nejrůznějších typech malignit. Z tohoto důvodu může být somatostatin využit v onkologii jako látka pro specifické zacílení na určité typy nádorů.

Nejvíce jsou somatostatinové receptory exprimovány na nádorech neuroendokrinního původu, dále na neuroblastomech, medulárních karcinomech štítné žlázy, feochromocytomech, na buňkách malobuněčného plicního karcinomu, ale také je můžeme nalézt u nádoru prsu nebo u hematologických malignit jako je maligní lymfom. Pokud se původně normální tkáň stane tkání nádorovou, nacházíme na jejích buňkách receptory exprimované ve velké hustotě a tudíž na ně můžeme zacílit léčbu pomocí radioaktivně značených somatostatinových analogů. [17], [20], [49]

Výskyt somatostatinových receptorů u jednotlivců je vysoce variabilní a liší se také exprese těchto receptorů napříč jednotlivými typy nádorů. Některé nádory jako jsou meningiomy exprimují receptory somatostatinu ve vysoké hustotě, naopak jiné nádory, např. lymfomy vykazují nízkou hustotu těchto receptorů.

Důležité je také rozložení somatostatinových receptorů na nádorové tkáni, tedy zda je jejich distribuce homogenní či heterogenní. Homogenní distribuci somatostatinového receptoru vykazují např. gastroenteropankreatické neuroendokrinní nádory. Heterogenní distribuci somatostatinového receptoru vykazují nádory prsu, kde nacházíme místa s vysokou hustotou těchto receptorů a místa, která tyto receptory neexprimují vůbec. U nádorů s heterogenní distribucí receptorů je velmi obtížné stanovení hustoty exprimovaných receptorů, a proto nemá velký význam. Pro diagnostiku a terapii nádorů je stanovení homogenity somatostatinových receptorů velmi důležité, a to zejména z hlediska potenciálního zacílení na tyto receptory. [39]

Výskyt somatostatinových receptorů ve vysoké hustotě není charakteristický jen pro nádorové tkáně, ale i pro nenádorová onemocnění. Například u granulomatózního onemocnění sarkoidóza byla prokázána vysoká exprese receptorů somatostatinu na epiteloidních buňkách. Zánětlivá střevní onemocnění také vykazují zvýšenou expresi receptorů, a to v cévním systému postižených částí gastrointestinálního traktu. [20]

7.8.3 Somatostatinové receptory

Rozlišujeme několik typů receptorů somatostatinu. V minulosti byly popsány pouze dvě třídy somatostatinových receptorů. První třída vykazovala vysokou afinitu pro biologicky stabilní ligandy a naopak druhá třída nevykazovala afinitu žádnou. V současné době bylo charakterizováno pět různých typů somatostatinových receptorů. Jednotlivé typy byly pojmenovány chronologicky podle pořadí jejich objevení, a to sst₁, sst₂, sst₃, sst₄ a sst₅. U podtypu sst₂ se navíc vyskytují jeho dvě varianty, a to sst_{2A} a sst_{2B}.

Každý typ receptoru je produktem jediného genu, který je uložen na jiném chromosomu. Díky tomu je regulace jejich exprese tkáňově specifická a v různých orgánech mohou zastupovat jednotlivé typy somatostatinových receptorů různé funkce. Tyto receptory patří na základě své struktury do rodiny receptorů spojených s G proteinem, které jsou charakteristické svými sedmi transmembránovými doménami. Extracelulární část zajišťuje vazbu ligandu a intracelulární domény zajišťují transdukcí signálu do buňky. [6]

Na základě farmakologických studií bylo prokázáno, že všechny podtypy somatostatinového receptoru váží s vysokou afinitou jak somatostatin-14, tak somatostatin-28. Rozdílnou afinitu vykazují receptorové podtypy ve vazbě na strukturní analogy somatostatinu. Jako příklad je možno uvést analog somatostatinu octreotid, který je s vysokou afinitou vázán podtypy sst₂ a sst₅, se střední afinitou je vázán podtypem sst₃, ale není vázán na podtypy sst₁ a sst₄. Jednotlivé podtypy se mohou lišit i ve schopnostech internalizace signálů do buňky, kdy např. při navázání ligandu se podtypy sst₃ a sst₂ internalizují lépe než podtyp sst₁. Navázání ligandu na podtyp sst₅ může spustit masivní přesun jeho intracelulárních zásob na buněčnou membránu.

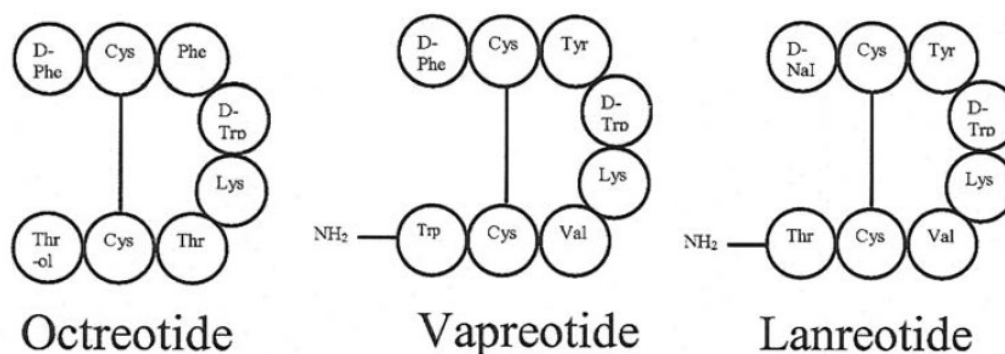
Distribuce somatostatinových receptorů a jejich podtypů na normálních lidských tkáních zatím není zcela objasněna. Na základě několika provedených studií byly somatostatinové receptory identifikovány v lidském mozku, pankreatu, trávicím traktu, štítné žláze, nadledvinkách a ledvinách a na buňkách imunitního systému. Bylo také prokázáno, že nejvíce exprimovaným podtypem je sst_{2A}, a to v pankreatických ostrůvcích, ve specifických oblastech lidského mozku a v periferním nervovém systému. Nalézáme ho také na lidských lymfocytech. Podtyp sst₂ nacházíme také v nadledvinkách a ledvinách. Podtypy sst₃ a sst₅ byly identifikovány na T-lymfocytech. Placenta a plíce exprimují zejména podtyp sst₄. [39]

7.8.4 Analogy somatostatinu

Somatostatin jako takový, není pro diagnostické a terapeutické účely příliš vhodný. Jeho biologický poločas v plazmě po intravenózním podání jsou pouze 3 minuty. Přirozeně se vyskytující somatostatin-14 a somatostatin-28 podléhají rychlé enzymatické degradaci, což vylučuje jejich použití *in vivo*. [6], [20]

Při léčbě analogy somatostatinu dochází u většiny pacientů pouze k úlevě od symptomů daného nádorového onemocnění, jako je například nadprodukce některých hormonů. K úplné nebo částečné remisi nádorového onemocnění dochází vlivem léčby těmito analogy jen velmi zřídka, a to jak po léčbě pouze somatostatinovými analogy, tak i v kombinaci s podáváním interferonu α . [23]

Od počátku 80. let byly vyvíjeny analogy somatostatinu, které by vykazovaly vyšší odolnost vůči enzymatické degradaci než samotný somatostatin. Molekula somatostatinu byla různě modifikována takovým způsobem, aby zůstala zachována biologická aktivita molekuly původní. Modifikace zahrnovaly zavedení D-aminokyselin a zkrácení původní molekuly pouze na vazebnou doménu, čímž vzniklo několik somatostatinových analogů obsahujících ve své molekule 8 aminokyselin. Jednalo se o analogy octreotid, lanreotid a vapreotid (RC-160), jejichž struktury jsou zobrazeny na obr. č. 12. [6]



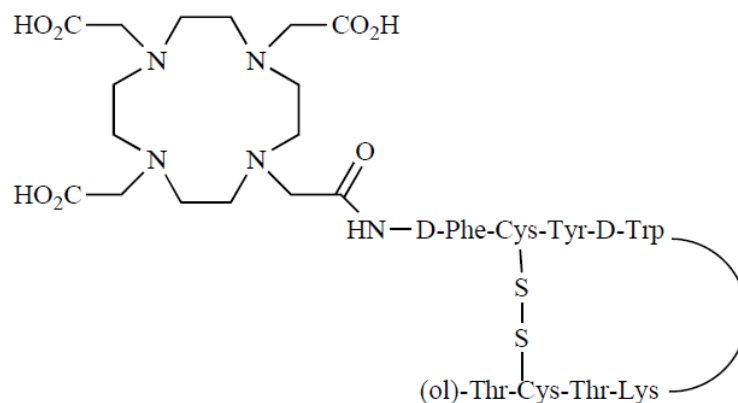
Obr. č. 12: Struktury jednotlivých analogů somatostatinu. [14]

Každý z analogů je v podstatě zkrácený somatostatin-14, kdy pro zachování jejich afinity k receptorům je nutná přítomnost aminokyselinové sekvence Phe-Trp-Lys-Thr. Jednotlivé analogy se liší v N- a C-koncových zbytcích, které se nacházejí mimo uzavřenou disulfidovou smyčku, jsou rezistentní vůči proteolytické degradaci a mají vyšší vazebnou afinitu k jednotlivým podtypům somatostatinových receptorů. [14]

Prvním somatostatinovým analogem zavedeným do klinické praxe byl právě octreotid, který se následně stal zlatým standardem mezi léčivy vykazujícími afinitu k somatostatinovým receptorům. Jednalo se o [¹¹¹In-DTPA]-octreotid (OctreoScan), který je podrobněji popsán v kapitole historie. Na základě jeho výhodných vlastností byly vyvíjeny i jeho další deriváty zaměřené na diagnostiku a terapii nádorů, které exprimují somatostatinové receptory. Octreotid se s vysokou afinitou váže k podtypům somatostatinového receptoru sst₂ a sst₅ a s malou afinitou k podtypům sst₁, sst₃ a sst₄. Aby se zvýšila afinita octreotidu vůči receptorovému podtypu sst₂, byl Phe³ vyměněn za Tyr, což ale také přispělo ke snížení afinity k podtypu sst₃. [47], [49] Specifické změny v sekvenci somatostatinu vedou ke vzniku analogů s přijatelnými biologickými vlastnostmi. Z toho také vyplývá, že i mírné modifikace v molekule octreotidu mohou výrazně ovlivnit jeho biologické chování. [20]

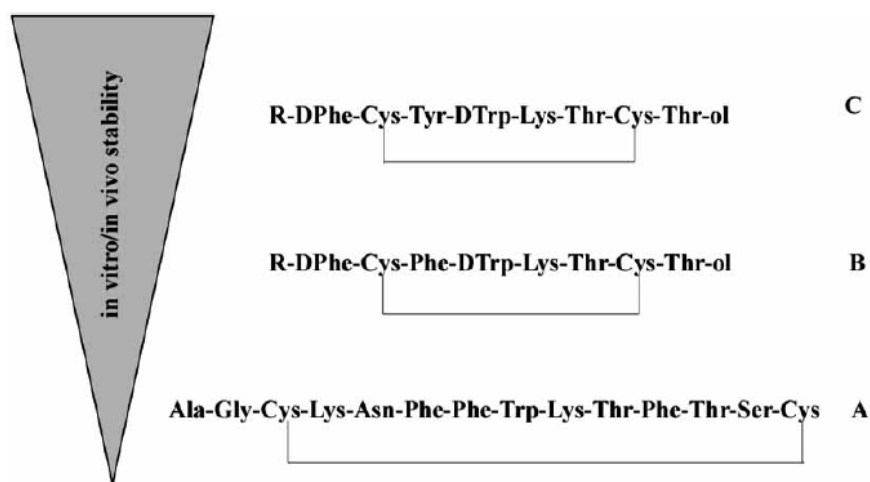
Analogy somatostatinu se významně uplatňují v diagnostice a léčbě zejména neuroendokrinních nádorů, kdy u některých analogů somatostatinu bylo prokázáno významné snížení velikosti nádoru, a tím došlo k následnému zlepšení kvality života. Je to dáno zejména tím, že analogy somatostatinu se ve většině případů váží s vysokou afinitou pouze k podtypu sst₂, a ne k jiným podtypům somatostatinového receptoru. U dvou z 26 pacientů s gastroenteropankreatickým neuroendokrinním nádorem byl po léčbě vysokými dávkami ¹¹¹In-DTPA-Octreotidu prokázán pokles velikosti nádoru o 25-50 %. Na základě tohoto zjištění byly zkoumány i další analogy somatostatinu značené radionuklidy ^{99m}Tc nebo ¹⁸⁶Re. Radionuklidem ¹¹¹In značené peptidy totiž nejsou příliš vhodné pro radioterapii, jelikož se jedná o poměrně malé částice, s nízkou schopností penetrace tkáněmi. [23], [49]

Analog somatostatinu [DOTA]-[Tyr³]-octreotid (DOTA-TOC), jehož struktura je uvedena na obr. č. 13, vykazuje jak *in vivo*, tak *in vitro* vysokou stabilitu s biologickým poločasem 90 minut. [49] Analog DOTA-TOC značený radionuklidem ⁶⁸Ga vykazuje schopnost detekovat malá nádorová ložiska pomocí PET a nabízí vysoce senzitivní zobrazování nádorů exprimujících somatostatinové receptory. Zároveň tento analog podléhá rychlé krevní clearance, takže nedochází k jeho nadměrné akumulaci v ledvinách. [20] U stejného analogu, který byl ale značen radionuklidem ⁹⁰Y, byla prokázána u 10-25 % pacientů s neuroendokrinním nádorem jeho částečná remise. [23]



Obr. č. 13: Struktura [DOTA]-[Tyr³]-octreotidu. [49]

Při použití DOTA jako bifunkčního chelatačního činidla pro výrobu různých analogů somatostatinu hraje důležitou roli výběr vhodného radionuklidu. Zároveň použití DOTA jako chelatačního činidla u analogů somatostatinu rozšířilo spektrum radionuklidů, které se dají využít jak pro diagnostické, tak terapeutické účely jimi značených analogů. Na myších modelech bylo prokázáno, že pokud by se použil radionuklid ⁶⁷Ga nebo ¹¹¹In vykazoval by takto značený somatostatinový analog příznivější farmakokinetické vlastnosti, jako jsou specifitější příjem analogu nádorem, rychlejší krevní clearance a nižší vychytávání v ledvinách než kdyby byl použit ¹¹¹In-DTPA-octreotid. Na obr. č. 14 je znázorněno porovnání stability tří peptidů, a to somatostatinu, octreotidu a [Tyr³]Octreotidu. [14], [20]

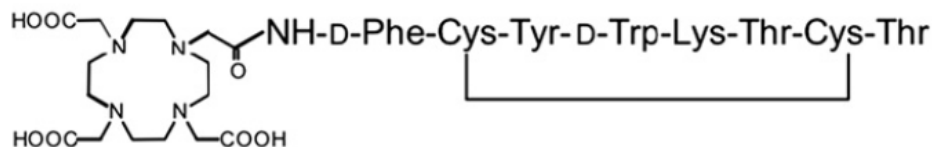


Obr. č. 14: Stabilita tří peptidů. A) somatostatin, vykazuje rychlou degradaci peptidázami *in vitro* i *in vivo*, biologický poločas 3 minuty. B) octreotid (OctreoScan), klinicky používané radiofarmakum, jeho biologický poločas je o 20 minut delší než poločas somatostatinu. C) [Tyr³]Octreotid, vykazuje nejvyšší stabilitu, biologický poločas 90 minut. [49]

Dalšími zkoumanými radionuklidy pro značení analogů somatostatinu byly ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu a ⁹⁰Y. Prokázalo se, že nádory exprimující podtyp receptoru sst₂ dostatečně přijímají takto značené analogy. Zároveň bylo použito makrocyclické chelatační činidlo DOTA. Analogy s uvedenými radionuklidy [⁹⁰Y-DOTA]-[Tyr³]-octreotid a [¹⁷⁷Lu-DOTA]-[Tyr³]-octreotát ([¹⁷⁷Lu-DOTA]-[Tyr³]-TATE) byly úspěšně využity pro léčbu neuroendokrinních nádorů.

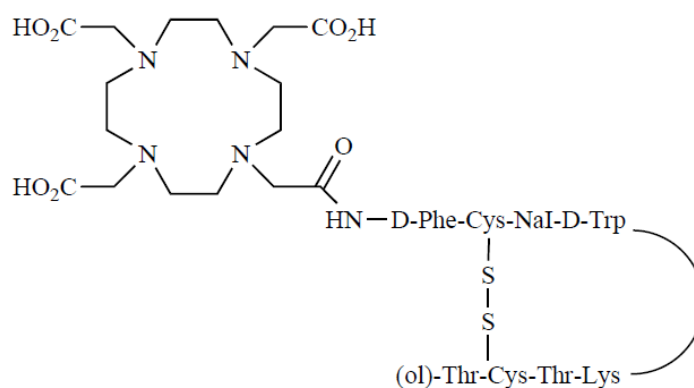
U 2 % pacientů léčených [¹⁷⁷Lu-DOTA]-[Tyr³]-octreotátem došlo k úplné remisi nádoru, u 26 % pacientů došlo k částečné remisi, minimální odpověď na léčbu byla zaznamenána u 19 % pacientů, ke stabilizaci onemocnění došlo u 35 % pacientů, a u 18 % z nich došlo dokonce k progresi nádorového bujení. [49] Rovněž bylo prokázáno, že [DOTA]-[Tyr³]-octreotát, jehož struktura je zobrazena na obr. č. 15, má až devětkrát vyšší afinitu k podtypu somatostatinového receptoru sst₂ než [DOTA]-[Tyr³]-octreotid. Léčba [DOTA]-[Tyr³]-octreotátem nevykazuje mnoho vedlejších účinků, které pokud se vyskytnou, jsou většinou přechodné. Nejčastěji se vyskytujícím nežádoucím účinkem je pouze mírný útlum produkce kostní dřeně. Léčba [¹⁷⁷Lu-DOTA]-[Tyr³]-octreotátem by měla být zahájeno co nejdříve po průkazu neuroendokrinního nádorového onemocnění, jelikož tyto nádory se mohou později diferencovat a ztrácet somatostatinové receptory. Na zvířecích modelech bylo

prokázáno, že pro větší nádory je účinnější ke značení analogu použití radionuklidu ^{90}Y , a naopak pro menší nádory je vhodnější použití radionuklidu ^{177}Lu . [23]



Obr. č. 15: Struktura [DOTA]-[Tyr³]-octreotátu. [1]

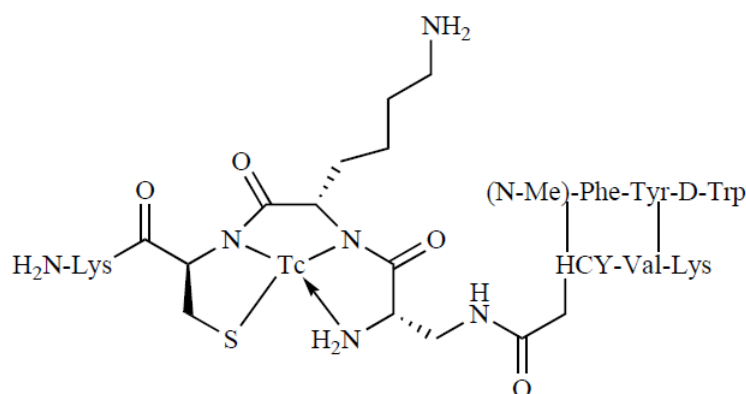
Vysokou afinitu k podtypům somatostatinového receptoru sst₂, sst₃ a sst₅ vykazuje také analog somatostatinu [DOTA]-[1-NaI³]-octreotid (DOTA-NOC), který je zobrazen na obr. č. 16. Tento analog byl úspěšně značen radionuklidy ^{111}In a ^{177}Lu , ale docházelo k jeho zvýšené akumulaci v ledvinách. Hromadění v ledvinách se podařilo snížit díky použití několika různých spojek (spacerů, linkerů), které byly začleněny do dané molekuly.



Obr. č. 16: Struktura [DOTA]-[1-NaI³]-octreotidu. [49]

Dalším analogem somatostatinu je malý cyklický hexapeptid depreotid. *In vivo* vykazuje optimální biodistribuci a vazebnou afinitu. Může být využit k diagnostice a léčbě širokého spektra nádorů exprimujících somatostatinové receptory, jelikož má vazebnou afinitu k podtypům receptoru sst₂, sst₃ a sst₅. Díky obsažené sekvenci Dap-Lys-Cys (N₃S) může být značen pomocí radionuklidu $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Depreotid značený $^{99\text{m}}\text{Tc}$, jehož struktura je zobrazena na obr. č. 17, může být pro svoje výhodné vlastnosti využit zejména u nádorů plic a prsu, melanomu, kolorektálního karcinomu a lymfomu.

Pro značení depreotidu byl využit i radionuklid ^{188}Re . Ten ale vykazoval vysokou radiotoxicitu v nenádorových tkáních, zejména v ledvinách, slezině a kostní dřeni. Kvůli těmto vlastnostem musel být podroben několika úpravám. Nejdůležitější byl správný výběr chelatečního činidla. Při použití neutrálního chelatečního činidla došlo ke zvýšení absorpce radiofarmaka nádorem a zároveň se snížila jeho akumulace v ledvinách. [49]



Obr. č. 17: Struktura $[^{99m}\text{TcO}]$ -depreotidu. [49]

7.8.5 Radionefrotoxicita analogů somatostatinu

Radionefrotoxicita, nejenom analogů somatostatinu, představuje významné riziko, jelikož radioaktivně značené peptidy využívané pro diagnostické nebo terapeutické účely se většinou trvale a ve velkém množství akumulují v ledvinách, což snižuje jejich účinnost. Pokud by se snížila hladina radioaktivity v ledvinách, aniž by došlo k současnému snížení radioaktivity dodávané do nádoru, staly by se radioaktivně značené peptidy mnohem účinnějšími pro léčbu solidních tumorů. [1], [46]

V ledvinách podléhají radioaktivně značené peptidy eliminačním procesům. Nejprve jsou vychytány z krevního řečiště glomerulární filtrací, následně jsou reabsorbovány v proximálních tubulech a metabolizovány v lysozomech. Jeden nebo více z těchto procesů může vést k dlouhodobému zadržování radioaktivity v ledvinách po podání radioaktivně značených somatostatinových analogů, ale i dalších značených peptidů. [1]

Radioaktivně značené analogy somatostatinu tedy podléhají po podání pacientům rozsáhlé glomerulární filtraci a následně jsou vyloučeny močí, jelikož u velkého

množství radioaktivně značených peptidů nedochází k vazbě na plazmatické proteiny. Většina z nich je v intaktním stavu vyloučena močí, ale přibližně 2 % z nich zůstávají v ledvinách. Pro terapeutické účely je nutné podávání somatostatinových analogů ve vysokých dávkách. Tento jev vede k tomu, že i tato malá akumulovaná část radioaktivně značených peptidů způsobuje intenzivní lokální ozáření a vede ke vzniku chronické radionefrotoxicity. [3], [46]

Glomerulární membrána obsahuje póry, které umožňují volný průchod proteinů a peptidů, jejichž molekulová hmotnost je nižší než 25 kDa. Syntetické analogy somatostatinu jako jsou [^{111}In -DTPA]-octreotid nebo [^{90}Y -DOTA]-[Tyr³]-octreotát, jejichž molekulová hmotnost je menší než uvedených 25 kDa, podléhají rychlé glomerulární filtraci a jsou tedy rychle vyloučeny z krevního oběhu. Pokud by molekula měla vyšší molekulovou hmotnost, došlo by k omezení jejího vychytávání glomerulární filtrací. K úplné inhibici glomerulární filtrace dochází u molekul, jejichž molekulová hmotnost dosahuje minimálně 60-70 kDa, kdy této velikosti dosahují zejména fragmenty protilátek. [1]

Následujícím procesem je reabsorpce peptidů v proximálním tubulu ledvin. To se děje především procesem endocytózy, ale pravděpodobně se na tubulární reabsorpci podílí více transportních mechanismů. V tomto procesu je důležitá elektrostatická interakce mezi negativně nabitými tubulárními buňkami ledvin a kladně nabitou částí bílkovin. Bylo prokázáno, že při současném podání bazické aminokyseliny lysin při léčbě octreotidem, dojde ke snížení jeho akumulace v tubulech ledvin. [1], [46]

Další látkou, která účinně snižuje renální reabsorpci při léčbě ^{111}In -octreotidem je sukcinylovaná želatina, náhrada plazmy skládající se ze směsi peptidů odvozených od kolagenu. Žádná z uvedených látek, ale nezpůsobuje úplnou inhibici renální reabsorpce radioaktivně značených peptidů, proto je třeba hledat inhibitory, které by byly účinnější. [44]

Obecně lze říci, že zvýšený počet záporně nabitých aminokyselin v molekule peptidu snižuje akumulaci radioaktivity v ledvinách. Pacientům léčených analogy somatostatinu se tedy v současné době podává infuze nebo injekce kationických aminokyselin lysinu a argininu. Mechanismus působení podávaných aminokyselin zatím není zcela jasný, ale pravděpodobně zde hraje roli přítomnost pozitivně nabitě aminoskupiny. [29]

Po injekci [^{111}In -DTPA]-octreotidu byla prokázána radioaktivita v lysozomálním kompartmentu pankreatu, přítomném nádoru a ledvinách. Zároveň nebyla v ledvinách

radioaktivita distribuována rovnoměrně. Jako místo obsahující nejvyšší množství radioaktivity byla označena kůra nadledvin, konkrétně buňky proximálního tubulu. Octreotid vykazuje zvýšenou akumulaci v ledvinách zejména díky tomu, že byl primárně vyvinut tak, aby *in vivo* byl metabolicky stabilní, tedy aby nepodléhal snadno degradaci. Bylo zjištěno, že dlouhý výskyt radioaktivity v ledvinách je způsoben zejména přítomností chelatačního činidla DTPA s navázaným radionuklidem ^{111}In . Vysoká a dlouhodobá přítomnost radioaktivity v ledvinách po podání radiofarmaka obsahujícího kovový radionuklid je způsobena tím, že jeho radiometabolity vznikající po lysozomální degradaci jsou v ledvinách nadměrně zadržovány. [1], [30]

Dle několika studií se na receptorově zprostředkované endocytóze podílí protein megalin a cubilin. Megalin je glykoprotein o velikosti přibližně 600 kDa, který patří do rodiny LDL proteinů (lipoproteinů o nízké hustotě). Ve vysoké hustotě je exprimován v proximálních tubulech ledvin, v menším množství ho nalézáme také na plicích, vejcovodech a štítné žláze. Megalin vykazuje vysokou afinitu k pozitivně nabitým molekulám, jako jsou analogy somatostatinu, jelikož sám nese negativní náboj. Megalinový receptor zajišťuje reabsorpci nejrůznějších peptidů a proteinů jako jsou například albumin, plazminogen, některých polypeptidů s nízkou molekulovou hmotností a proteinu asociovaného s receptory (RAP).

RAP je protein o velikosti 40 kDa a jeho funkcí je chránit nově nasyntetizované receptory pro megalin. RAP inhibuje vazbu všech v současné době známých ligandů na megalin. Bylo prokázáno, že při navázání přirozeného ligandu na megalinový receptor došlo k inhibici akumulace radioaktivně značených peptidů v ledvinách. To potvrzuje hypotézu, že megalin hraje roli při intracelulární akumulaci radioaktivity. Několik studií potvrzuje to, že receptor pro megalin je přímo zodpovědný za příjem radioaktivně značených somatostatinových analogů do ledvin.

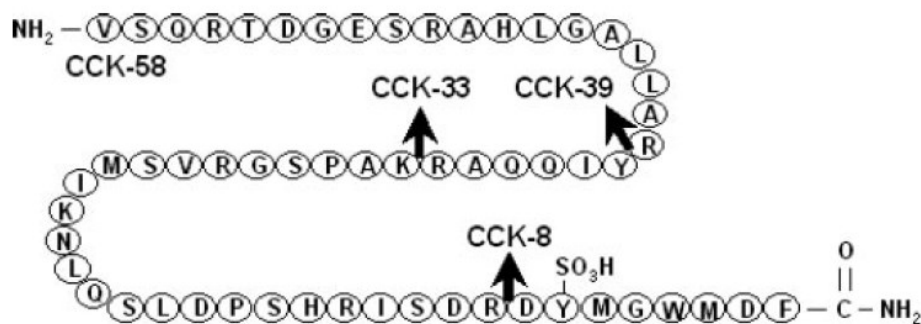
V důsledku rozdílů v chemických a biologických vlastnostech peptidů dochází i k rozdílnému buněčnému zadržování radioaktivně značených peptidů. Malé strukturní modifikace, zahrnující i substituci chelatačních činidel nebo přidání negativně nabitých aminokyselin, významně ovlivňují biologické vlastnosti, jako je vazebná afinita k somatostatinovému receptoru a zejména akumulace radioaktivity v ledvinách. [29], [46]

7.9 Cholecystokinin (CCK) a gastrin

7.9.1 Charakteristika

Peptidový hormon cholecystokinin (CCK), jehož primární struktura je zobrazena na obr. č. 18, byl poprvé identifikován v gastrointestinálním traktu. Po dalším zkoumání byl popsán jako imunoreaktivní peptid, který se strukturálně podobá gastrinu. Bylo zjištěno, že se jedná o jeden z nejrozšířenějších neuropeptidů v centrálním nervovém systému. Kromě toho, že působí jako neurotransmitter v mozku, se podílí také na regulaci různých funkcí gastrointestinálního traktu, ovlivňuje především fungování žaludku, pankreatu a žlučníku. [39], [41]

Původní izolovaný cholecystokinin se skládal z 33 aminokyselin. Peptid se ale vyskytuje v různých biologicky aktivních formách, které se sice liší počtem aminokyselin, ale je pro ně charakteristická sekvence osmi residuí na C-konci. Příkladem těchto biologických forem jsou CCK39, CCK33, CCK8 a CCK4. Nejvíce zastoupenou formou v mozku je CCK8. Všechny tyto formy vycházejí z prekurzorové molekuly skládající se ze 115 aminokyselin. [7], [41]



Obr. č. 18: Primární struktura cholecystokininu (CCK). [8]

Peptid gastrin, který je zobrazený na obr. č. 19, je tvořen 34, 17 nebo 14 aminokyselinami a jeho hlavní funkcí je regulace sekrece žaludeční kyseliny a regulace proliferace žaludeční sliznice. [15] Za normálních podmínek je ve velkém množství tvořen endokrinními G buňkami, které jsou lokalizované v části žaludku zvané antrum a ve sliznici duodena. V menším množství byl nalezen také v tračníku nebo hypofýze. [9]

Gastrin vzniká ze svého prekurzoru progastrinu, což je polypeptid skládající se z 80 aminokyselin. Progastrin podléhá během zpracovávání v endokrinních buňkách různým

modifikacím, jako je sulfatace nebo fosforylace. Gastrin se může vyskytovat buď v amidované formě, nebo ho můžeme nacházet i v neúplně zpracovaných formách. Jak bylo řečeno výše, neúčinněji je progastrin konvertován na gastrin v endokrinních a neuroendokrinních buňkách. Gastrin, ale může být tvořen i v některých buňkách nádorových, které postrádají některé nezbytné enzymy a tím pádem vzniká gastrin v neúplně zpracované formě. [9]

Gastrin se s nízkou afinitou váže na cholecystokininové receptory, které jsou exprimovány na buňkách žlučníku, hladké svaloviny žaludku, pankreatu a periferního nervového systému. Naopak vysokou afinitu vykazuje vůči gastrinovému receptoru, označovanému také jako CCK2R nebo CCKBR. Na cholecystokininové receptory se gastrin váže s přibližně 1000krát nižší afinitou než na receptory gastrinové. [9], [15] V největším množství nalézáme receptor CCK2R exprimovaný v mozkové kůře savčího mozku, dále v žaludku, a to především v jeho části zvané fundus. CCK2 receptor nalézáme také na parietálních buňkách žaludku a D-buňkách pankreatu. Studie také naznačují, že exprimovaný CCK2R můžeme nalézt i na normálních lidských β -buňkách pankreatu. Expres CCK2 receptoru, ale nebyla u člověka prokázána na normálních buňkách tlustého střeva. [9]

Gastrinové receptory nacházíme kromě normálních buněk i na buňkách nádorových. Jedná se zejména o nádory typu medulární karcinom štítné žlázy, malobuněčný plicní karcinom, karcinomy vaječníků, gastrointestinální adenokarcinom a neuroendokrinní nádory. [15]



Obr. č. 19: Primární struktura gastrinu. [8]

Gastrin a cholecystokinin mohou být produkovány v několika různých formách, které se navzájem liší svou délkou, ale mají společnou koncovou sekvenci pěti aminokyselin, a to Gly-Trp-Met-Asp-Phe-CO-NH₂. Gastrinové peptidy navíc obsahují oproti cholecystokininovým peptidům sekvenci pentaglutamové kyseliny. Oba tyto peptidy jsou u člověka kódovány dvěma různými geny, které jsou umístěné na odlišných chromosomech. Gastrin i cholecystokinin podléhají různým posttranslačním modifikacím. Jednou z nich je sulfatace tyrosinového zbytku, ke které dochází u gastrinu

v poloze 6, a u cholecystokininu v poloze 7. K sulfataci ale nedochází vždy, jelikož cholecystokinin i gastrin nacházíme i v nesulfátovaných formách, kdy například až polovina produkovaného gastrinu je v nesulfátované formě. [8], [24]

Gastrin a cholecystokinin sdílí některé biologické a farmakologické vlastnosti, a to zejména díky jejich velké vzájemné podobnosti. Účinky těchto peptidů jsou zprostředkovány prostřednictvím interakce s membránovými receptory, které jsou spřažené s G proteinem a nazývají se cholecystokininové receptory. Tyto receptory se vyskytují zejména v centrálním nervovém systému, ale kromě toho i na periferních orgánech. [8]

7.9.2 Cholecystokininové receptory

Rozlišujeme dva typy cholecystokininových receptorů, které byly pojmenovány jako typ A (alimentární) a typ B (mozkový). Později byly ale oba tyto typy přejmenovány. Původní receptor CCK-A se nyní označuje jako receptor CCK1 (CCK1R) a receptor CCK-B se označuje jako receptor CCK2 (CCK2R). Všechny uvedené typy receptorů jsou tvořeny sedmi transmembránovými doménami, tudíž se řadí do rodiny receptorů sdružených s G proteinem. [8], [41]

Receptor CCK1 byl poprvé identifikován na acinárních buňkách pankreatu, dále se vyskytuje hlavně na periferních orgánech, ale také v určitých oblastech mozku. Ve studiích na hlodavcích byla na rozdíl od člověka prokázána vysoká exprese tohoto receptoru v gastrointestinálním traktu. Exprese receptoru CCK2 byla prokázána v mozku, žaludku, pankreatu a žlučníku.

Receptory se vzájemně liší vazebnou afinitou pro gastrin, jejich distribucí a strukturou molekuly. Receptor CCK1 váže především sulfátovaný cholecystokinin, a to s až 500-1000krát vyšší afinitou než nesulfátovaný CCK. Receptor CCK2 nerozlišuje, zda se jedná o sulfátovanou nebo nesulfátovanou formu CCK a navíc se jedná o specifický receptor pro gastrin, proto se také označuje jako gastrinový receptor, jak již bylo uvedeno výše.

Identifikován byl i třetí typ cholecystokininového receptoru, a to CCK2i4sv, což je v podstatě jedna z variant CCK2 receptoru. Tento typ receptoru je u člověka exprimován na buňkách kolorektálního karcinomu. Jeho funkcí je stimulace růstu buněk prostřednictvím mechanismu, který není závislý na přítomnosti gastrinu. [41]

7.9.3 Význam cholecystokininu a gastrinu při nádorovém bujení

Nejrůznější studie potvrzují, že cholecystokinin a gastrin prostřednictvím svých receptorů podporují rozvoj a progresi nádorového bujení. Důležitým faktorem je také skutečnost, že cholecystokininové receptory mohou být exprimovány v počátečním stádiu nádorového bujení, ale v pozdějších fázích může dojít ke ztrátě jejich exprese. Cholecystokininové receptory se tedy dají využít jak pro diagnostické, tak terapeutické účely, jako je například scintigrafie receptorů nebo terapie s radioaktivními analogy. [8]

Expresce receptorů typu CCK1 a CCK2 byla identifikována na různých typech tkání normálních, ale i tkání nádorových. Pro diagnostiku a léčbu nádorů pomocí radioaktivně značených peptidů má význam zejména receptor CCK2, jehož exprese byla potvrzena na buňkách medulárního karcinomu štítné žlázy, neuroendokrinních nádorů a rovněž na buňkách malobuněčných plicních karcinomů. Malobuněčný plicní karcinom exprimuje CCK2R s incidencí přibližně 89 %, na rozdíl od nemalobuněčného plicního karcinomu, u kterého je incidence tohoto receptoru pouze 6 %. [41], [42]

Bylo také zjištěno, že incidence exprese receptoru CCK2 u medulárního karcinomu štítné žlázy je neobvykle vysoká. Na druhé straně diferencované nádory štítné žlázy tyto receptory neexprimují. Podíl medulárních karcinomů vůči všem nádorům štítné žlázy je přibližně 3-12 % a pouze 30 % pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy má šanci na 10 leté přežití, což je horší než u pacientů trpících některým jiným diferencovaným nádorem štítné žlázy. Je to dáno pravděpodobně tím, že u medulárních karcinomů štítné žlázy nedochází k akumulaci radioaktivního jódu, takže léčba pomocí radiojódů je neúčinná. [41]

Receptory CCK2 se dále vyskytují u astrocytomů, nádorů ovarií, neuroendokrinních gastroenteropankreatických nádorů, adenokarcinomů prsu a endometria nebo u nádorů měkkých tkání, jako je například leiomyosarkom. Receptory CCK1 jsou na lidských nádorech exprimovány velmi zřídka, ale můžeme je nalézt na neuroendokrinních plicních a gastroenteropankreatických nádorech, meningiomech a některých neuroblastomech. [39], [41]

Expresce receptoru CCK2i4sv byla prokázána u kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu. Na normálních buňkách kolorektální sliznice nebyla exprese prokázána. U těchto typů nádorů, bylo ale zároveň zjištěno, že exprese receptoru CCK2i4sv je poměrně nízká, takže cílení na tento receptor pomocí radioaktivně značených peptidů není účinné. Kde ale mohou být radioaktivně značené peptidy

použity úspěšně, jsou inzulinom, gastrointestinální stromální nádory a malobuněčný plicní karcinom. [41]

7.9.4 Cholecystokininové a gastrinové analogy

Na základě vysoké hustoty exprese receptoru CCK2 zejména na neuroendokrinních nádorech, se začalo uvažovat o využití radiofarmak, která by vykazovala specifickou vazebnou afinitu k tomuto typu receptoru. Léčba a zobrazování těchto typů nádorů, by tedy byla účinnější než při dosavadním používání analogů somatostatinu. Na základě těchto poznatků se začaly vyvíjet nejrůznější deriváty cholecystokininu a gastrinu jak pro diagnostické, tak terapeutické využití. [2]

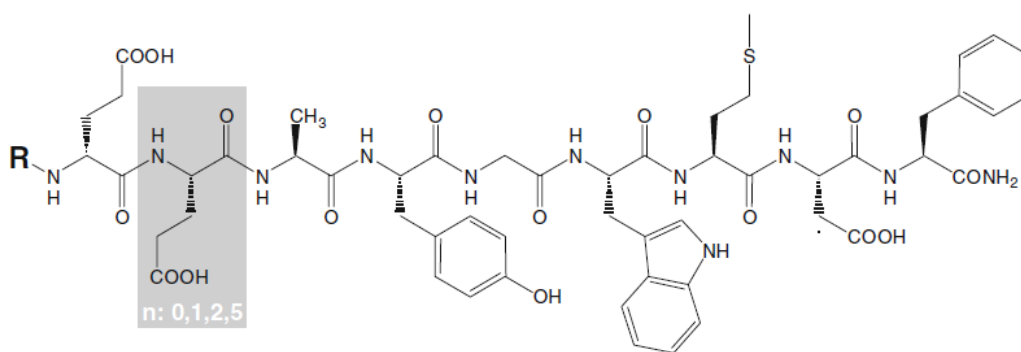
První analogy byly vyvíjeny již koncem 90. let. Jednalo se o ¹³¹I-radiojodovaný lidský gastrin I, který vykazoval slibné výsledky jak v diagnostických, tak terapeutických aplikacích. Současně bylo vyvinuto několik nesulfátovaných analogů cholecystokininu, které obsahovaly na svém N-konci navázané chelatační činidlo DTPA nebo DOTA. Tyto analogy byly úspěšně použity ve studiích na hlodavcích, ale ve studiích prováděných na pacientech těchto úspěchů nedosahovaly. [33]

Pro diagnostiku a léčbu nádorů nesoucích CCK1 receptor zatím není potřeba vyvíjet specifická radiofarmaka. Důvodem je to, že nádory exprimující CCK1 receptor exprimují také ve velké hustotě receptory somatostatinové, a proto se pro léčebné a diagnostické účely využívají radiofarmaka zaměřená právě na somatostatinové receptory. Úspěchy vykazuje zejména již několikrát zmíněný přípravek OctreoScan. [39]

Na vývoji vhodných radioligandů pro terapii cílenou na CCK2 receptory se podílelo mnoho výzkumných skupin. Bylo zjištěno, že pro vazbu receptoru je nezbytně nutná přítomnost C-koncové tetrapeptidové sekvence Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, kdy v některých případech může být methionin nahrazen za leucin nebo norleucin. Rozlišujeme několik kategorií peptidů, a to dle sekvence a formy gastrinu nebo cholecystokininu, např. lineární, cyklické nebo multimerní. [41]

Pro léčbu pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy byly zavedeny do praxe sulfátované analogy cholecystokininu, nebo také analogy minigastrinu. Tyto analogy byly nejčastěji značeny pomocí radionuklidů ¹¹¹In nebo ⁹⁰Y, a jako chelatační činidlo bylo použito DTPA. Později se ale ukázalo, že komplexy ⁹⁰Y-DTPA nejsou pro terapeutické účely příliš vhodné, zejména kvůli jejich nízké stabilitě. Použití jiných

Dalším studovaným analogem byl DTPA-MG0 značený terapeutickým radionuklidem ^{90}Y . Nevýhodou tohoto analogu je jeho toxicita, která může být přechodná, jako např. mírná hematologická toxicita (např. trombocytopenie), ale také poměrně vážná. U pacientů, kteří jsou léčeni vysokými dávkami, může dojít až k závažné nefrotoxicitě, která může skončit až selháním ledvin.



Obr. č. 21: Molekulární struktura minigastrinu, kde $n=0$: minigastrin 11, $n=1$: minigastrin 10, $n=2$: minigastrin 9, $n=5$: minigastrin 0. R= vazebné místo pro chelatační činidlo. [15]

Dalšími analogy jsou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Demogastrin 2, ^{111}In -DOTA-CCK8 a ^{111}In -DOTA-MG11. Nejlepší zobrazovací schopnosti vykazuje $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Demogastrin 2, a to pravděpodobně díky přítomnosti radionuklidu $^{99\text{m}}\text{Tc}$, který má lepší vizualizační vlastnosti než radionuklid ^{111}In . Analogy ^{111}In -DOTA-CCK8 a ^{111}In -DOTA-MG11 jsou v porovnání s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Demogastrinem 2 pro scintigrafické zobrazování méně vhodné, kvůli jejich nedostatečnému vychytávání v nádorových lézích. Rovněž jsou nedostatečné i pro terapeutické účely. Další nevýhodou, a to zejména analogu ^{111}In -DOTA-MG11, je jeho nízká stabilita. Pro zvýšení stability byla syntetizována jeho cyklická varianta, ale ani po této úpravě ke zlepšení stability nedošlo. Jinou možností ke zvýšení stability analogu *in vivo*, která ale ještě nebyla zcela prostudována, je začlenění syntetických aminokyselin. Z tohoto srovnání vychází jako slibný diagnostický i terapeutický prostředek pro pacienty s medulárním karcinomem štítné žlázy právě $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Demogastrin 2. [41]

Existují celkem 3 analogy [(D)Glu¹]minigastrinu, nazývané Demogastrin 1-3, které interagují s receptory CCK2. Aby tyto analogy mohly být značeny radionuklidem $^{99\text{m}}\text{Tc}$, nesou na svém N-konci otevřený řetězec tetraaminu (N₄). Přítomnost chelátoru N₄ je velmi důležitá pro vytvoření stabilních komplexů *in vivo*. U Demogastrinu 1 je

tetraaminový řetězec připojen přímo, na rozdíl od Demogastrinu 2 a 3 kde je navíc přítomen spacer. Všechny 3 analogy vykazují vysoký poměr nádor – nenádorová tkáň, ale jak již bylo uvedeno výše, nejlepší vlastnosti vykazuje zejména ^{99m}Tc -Demogastrin 2. [33]

Nádorové léze přítomné u pacienta trpícího medulárním karcinomem štítné žlázy byly zobrazeny již za 90 minut po podání ^{99m}Tc -Demogastrinu 2. Nejvyšší kvality zobrazení je však dosaženo 4 hodiny po injekci radiofarmaka. Scintigrafie provedená s ^{99m}Tc -Demogastrinem 2, prokázala všechny známé nádorové léze, a u čtyř ze šesti pacientů dokonce byly identifikovány léze dosud neobjevené. Na základě uvedených poznatků se scintigrafie s ^{99m}Tc -Demogastrinem 2 jeví jako velmi vhodný nástroj zejména pro diagnostické účely, a to pro průkaz recidivy nebo metastáz medulárního karcinomu štítné žlázy. [11], [33]

Další možné analogy minigastrinu a CCK8 používané v diagnostice a terapii nádorových onemocnění jsou uvedeny níže viz. tabulka č. 3.

Peptides	Peptide sequence
Minigastrin analogs	
Minigastrin	Leu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DTPA-MG0	D-Glu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DOTA-MG11	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DOTA-MG11(Nle)	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DOTA-H2-Met	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DOTA-H2-Nle	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DOTA-H6-Met	(His) ₆ -Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
[^{99m} Tc] ₂ N ₄ ⁰ , D-Glu ¹ -MG (^{99m} Tc-Demogastrin 1)	D-Glu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
[^{99m} Tc] ₂ N ₄ ⁰⁻¹ , Gly ⁰ , D-Glu ¹ -MG (^{99m} Tc-Demogastrin 2)	Gly- D-Glu-(Glu) ₅ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
^{99m} Tc-HYNIC-MG11	
^{99m} Tc-HYNIC-cyclo-MG1	$\begin{array}{c} \gamma\text{-D-Glu} \text{---} \text{D-Lys-Trp-Met-Asp-Phe-NH}_2 \\ \quad \\ \text{Ala} \text{---} \text{Tyr} \end{array}$
^{99m} Tc-HYNIC-cyclo-MG2	$\begin{array}{c} \gamma\text{-D-Glu} \text{---} \text{D-Lys-Trp-Nle-Asp-Phe-NH}_2 \\ \quad \\ \text{Ala} \text{---} \text{Tyr} \end{array}$
CCK8 analogs	
¹¹¹ In-DTPA-CCK8	D-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DTPA-CCK8(Nle)	D-Asp-Tyr-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂
^{99m} Tc-HYNIC-CCK8	D-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
^{99m} Tc-HYNIC-sCCK8	D-Asp-Tyr(OSO ₃ H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DOTA-sCCK8[Phe ² (<i>p</i> -CH ₂ SO ₃ H), Nle ^{3,6}]	D-Asp-Phe(<i>p</i> -CH ₂ SO ₃ H)-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂
¹¹¹ In-DOTA-sCCK8[Phe ² (<i>p</i> -CH ₂ SO ₃ H), HPG ^{3,6}]*	D-Asp-Phe(<i>p</i> -CH ₂ SO ₃ H)-HPG-Gly-Trp-HPG-Asp-Phe-NH ₂

Tabulka č. 3: Některé další analogy minigastrinu a CCK8 a jejich složení. [41]

7.9.5 Nefrotoxicita analogů cholecystokininu a gastrinu

Problémem terapie radioaktivně značenými analogy minigastrinu je rovněž renální toxicita, která představuje hlavní omezení při léčbě radioaktivně značenými peptidy, kdy kvůli nadměrné tubulární reabsorpci peptidů musí být snižovány jejich terapeutické dávky. Vysoká akumulace radioaktivity v ledvinách se týká především minigastrinů sdružených s chelatačním činidlem DTPA. Nižší akumulaci pak vykazují deriváty cholecystokininu s DTPA, např. sulfátovaný CCK8.

Bylo zjištěno, že injekce polyglutamátů má schopnost snížit akumulaci radioaktivity v ledvinách. Pravděpodobně je to dáno ztrátou negativního náboje glutamové kyseliny, který je za tubulární reabsorpci zodpovědný. Se svými šesti negativně nabitými zbytky kyseliny glutamové a jedním zbytkem kyseliny asparagové

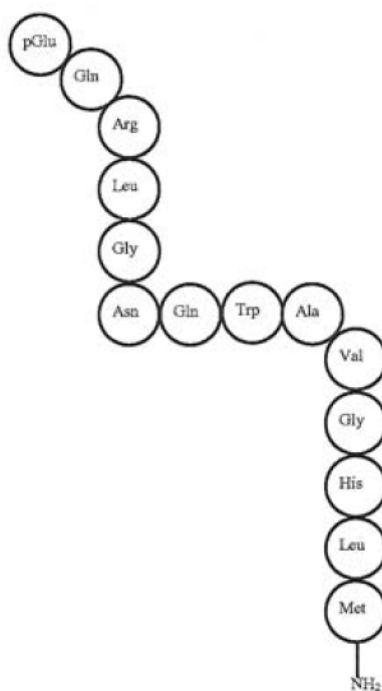
je MG0 nejvýce vychytávaným a zadržovaným analogem v ledvinách. Vychytávání analogu $^{111}\text{In-MG0}$ v ledvinách zabrání podání poly-Glu řetězců různých délek, kdy bylo prokázáno, že zejména oligo-Glu řetězce s více než pěti aminokyselinami účinně snižují hromadění radioaktivity v ledvinách.

Modifikace peptidů mohou také přispívat k nižší absorpci renální radioaktivity. V poslední době jsou ale vyvíjeny nové analogy, jejichž akumulace v ledvinách je nízká. [2], [15], [24], [30], [39]

7.10 Bombesin/Gastrin uvolňující peptid (GRP)

7.10.1 Charakteristika

Neuropeptid bombesin, zobrazený na obr. č. 22, je tvořen 14 aminokyselinami a vykazuje vysokou specifickou vazebnou afinitu k receptoru pro peptid uvolňující gastrin (GRPR). Bombesin nacházíme ve tkáních obojživelníků a jeho protějškem vyskytujícím se v lidských tkáních je právě gastrin uvolňující peptid (GRP). Gastrin uvolňující peptid obsahuje ve své molekule 27 aminokyselin a od bombesinu se liší pouze v jednom z deseti koncových karboxylových zbytků, což je příčinou jejich podobné biologické aktivity. [20], [39]



Obr. č. 22: Struktura bombesinu (BBS). [14]

Peptid bombesin se podílí na uvolňování střevních hormonů, sekreci slinivky břišní a sekreci žaludeční kyseliny, dále se uplatňuje při regulaci kontrakce hladkého svalstva a termoregulaci. [49]

GRP se podílí na regulaci nejrůznějších fyziologických procesů, jako jsou např.: kontrakce hladké svaloviny, termoregulace, cirkadiální rytmy, sytost a některé funkce imunitního systému. Kromě toho se podílí také na uvolňování některých dalších peptidových hormonů. [20], [39]

Kromě fyziologických funkcí se bombesin a GRP podílejí také na nádorovém bujení. Bylo zjištěno, že bombesin a GRP jsou syntetizovány některými primárními lidskými nádory. Poprvé byla stimulace nádorového bujení prostřednictvím bombesinu a GRP prokázána u malobuněčného plicního karcinomu. Dalšími typy nádorového bujení kde hrají roli uvedené peptidy, jsou nádory plic, prsu a pankreatu. Kromě toho GRP podporuje buněčnou proliferaci u neuroblastomu a karcinomu prostaty u mužů. [20], [39]

7.10.2 Receptory gastrin uvolňujícího peptidu

Účinky bombesinu a GRP jsou zprostředkovány prostřednictvím membránově vázaných receptorů, tzv. GRPR, které patří mezi receptory spřažené s G proteinem. Rozlišujeme čtyři podtypy GRP receptorů, a to BB₁ (podtyp receptoru neuromedin B), BB₂ (podtyp receptoru GPR) a dále podtypy BB₃ a BB₄. [14], [20] Peptidový hormon bombesin se s vysokou afinitou váže na receptorový podtyp BB₂. [49]

Fyziologicky je GRP receptor exprimován u savců v různých orgánech, zejména se pak jedná o gastrointestinální trakt a pankreas. Po navázání vhodného ligandu na GRP receptor dojde k jeho aktivaci, jejímž výsledkem je regulace různých fyziologických procesů prostřednictvím zahájení exokrinní nebo endokrinní sekrece. [19]

Bylo zjištěno, že receptory jsou účinně aktivovány po navázání agonisty GRP. Agonisté GRP vykazují proliferační účinky na buňky, které exprimují GRP receptory, ale i přes to, jsou využíváni jako nosiči jak terapeutických, tak diagnostických radionuklidů. Pro diagnostické a terapeutické účely jsou agonisté GRP vhodní zejména díky schopnosti jejich internalizace s uvedenými receptory. [14]

Exprese GRP receptorů byla prokázána u různých novotvarů vyskytujících se u člověka, jako jsou nádory prostaty, prsu, malobuněčný plicní karcinom nebo na cévách u karcinomu močových cest. [28] Z výše jmenovaných má ale klinický význam výskyt GRP receptoru ve vysoké hustotě zejména u dvou typů malignit, a to jsou karcinom prostaty u mužů a duktální karcinom prsu u žen. [39]

Nadměrná exprese GRP receptorů byla prokázána nejenom na primárních invazivních karcinomech prostaty, ale i na jeho metastázách. Hustota exprese GRP receptorů je závislá na tzv. Gleasonovo skóre. Nádory vykazující vysokou hustotu GRP receptorů mají obvykle Gleasonovo skóre nízké, naopak nádory s nízkou hustotou GRP receptorů mají Gleasonovo skóre vysoké. [28]

Naproti tomu je GRP receptor v normální prostatické tkáni detekován jen velmi výjimečně nebo vůbec, stejně je tomu i u hyperplazie prostaty. Přítomnost nebo nepřítomnost GRP receptorů proto může být využita jako marker pro časné odhalení karcinomu prostaty a odlišení zda se jedná pouze o hyperplazii nebo již o neoplazii prostaty. [39], [48]

Ve dvou třetinách případů invazivního duktálního karcinomu prsu byla také prokázána přítomnost GRP receptorů. Jako GRP pozitivní byly označeny také metastázy primárního karcinomu v lymfatických uzlinách, zatímco okolní lymforetikulární tkáň byla identifikována jako GRP negativní. Z důvodu vysoké hustoty exprese GRP receptorů u karcinomu prsu mohou být pro jejich cílenou léčbu využity analogy bombesinu.

V poslední době byla identifikována skupina neuroendokrinních nádorů, u nichž byla přesně určena exprese konkrétního receptorového podtypu. U gastrinomů byla prokázána exprese podtypu receptoru GRP (BB₂), karcinoidy lokalizované v ileu vykazovaly expresi receptoru pro neuromedin B (BB₁) a exprese receptorového podtypu BB₃ byla identifikována u bronchiálních karcinoidů a malobuněčného plicního karcinomu. [39]

7.10.3 Analogy bombesinu

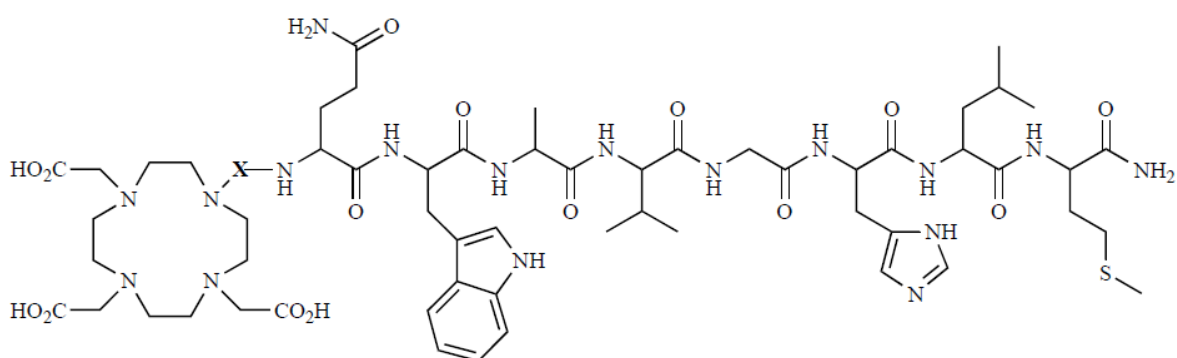
Peptidový hormon bombesin je ve své přirozené podobě v plazmě velmi enzymaticky nestabilní, jeho poločas rozpadu je v řádu několika minut, což brání jeho použití *in vivo*. Z toho důvodu se začaly syntetizovat analogy bombesinu s lepší metabolickou stabilitou, vhodnější pro *in vivo* využití. Pro specifickou a vysoce afinitní vazbu peptidu na GRP receptor je nutná přítomnost C-koncové aminokyselinové sekvence Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂, která je rovněž důležitá i pro udržení biologické aktivity. Předběžné biodistribuční studie prováděné s analogy bombesinu prokázaly jejich zvýšenou akumulaci v necílových tkáních, a to zejména v ledvinách a játrech, proto byly dále vyvíjeny nové analogy s příznivějšími biologickými vlastnostmi. [20], [49]

Analogy bombesinu byly nejčastěji značeny radionuklidy ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ¹⁸F nebo ¹⁷⁷Lu. Výhodné vlastnosti vykazoval zejména radionuklid ⁶⁸Ga, který je dobře dostupný z vhodného generátorového systému. Výtěžek značení derivátů bombesinu radionuklidem ⁶⁸Ga je velmi vysoký a výsledná radiofarmaka vykazují uspokojivou

radiochemickou čistotu a specifickou aktivitu. Na základě uvedených vlastností jsou ^{68}Ga značené analogy bombesinu rutinně používány v nukleární medicíně. [19]

Důležité je také to, zda je výhodnější použití antagonistů nebo agonistů GRP. Bylo totiž prokázáno, že pouze agonista je internalizován buňkou nesoucí GRP receptor. Z toho vyplývá, že pro klinickou aplikaci je vhodnější agonista. Naproti tomu, ale antagonisty vykazují inhibiční účinky na nádorovou tkáň, a i když antagonisté nejsou internalizováni, tak pokud jsou radioaktivně značeni, jsou obrazy získané při snímkování jasnější než při použití agonistů. [19], [20]

Byly vyvinuty analogy bombesinu značené radionuklidem ^{111}In obsahující chelatační činidlo DOTA, které je navázané na N-konec peptidu. Vzniklý analog $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-X-BBS(7-14)NH}_2$, zobrazený na obr. č. 23, kde X představuje $\beta\text{-Ala}$, 5-Ava nebo 8-Aoc, vykazuje *in vitro* vysokou vazebnou afinitu k receptorovému podtypu GRP. *In vivo* vykazovaly analogy $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-5-Ava-BBS(7-14)NH}_2$ a $[^{111}\text{In-DOTA}]\text{-8-Aoc-BBS(7-14)NH}_2$ rychlou krevní clearance a docházelo k jejich specifické akumulaci v pankreatu. [49]



Obr. č. 23: Chemická struktura DOTA-X-BBS(7-14)NH₂. [49]

Dalším použitým radionuklidem ke značení tohoto analogu je ^{64}Cu . Analog značený tímto radionuklidem se rovněž *in vitro* a *in vivo* váže s vysokou afinitou na podtyp receptoru GRP. Ve studii provedené na myších s nádorovým onemocněním byla prokázána vysoká kinetická stabilita a dobrý příjem nádorem u bombesinového analogu $[^{64}\text{Cu-NOTA}]\text{-8-Aoc-BBS(7-14)NH}_2$. Radionuklidy $^{67/68}\text{Ga}$ a ^{177}Lu byly použity ke značení analogu DOTA-PEG₄-BBS(7-14)NH₂ (DOTA-Pesin), ve kterém byl jako spacer použit polyethylenglykol (PEG).

Dalším slibným analogem s dobrými biodistribučními vlastnostmi je radionuklidem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ značený $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-(N}^{\alpha}\text{His-ac)-[Cha}^{13}\text{,Nle}^{14}\text{]BBS(7-14)}$, u nějž pro zvýšení jeho

metabolické stability byl nahrazen Leu¹³ a Met¹⁴ za cyklohexylalanin (Cha) a norleucin (Nle). Provedené biodistribuční studie prokázaly zlepšení absorpce analogu v nádorové tkáni a snížení akumulace v játrech.

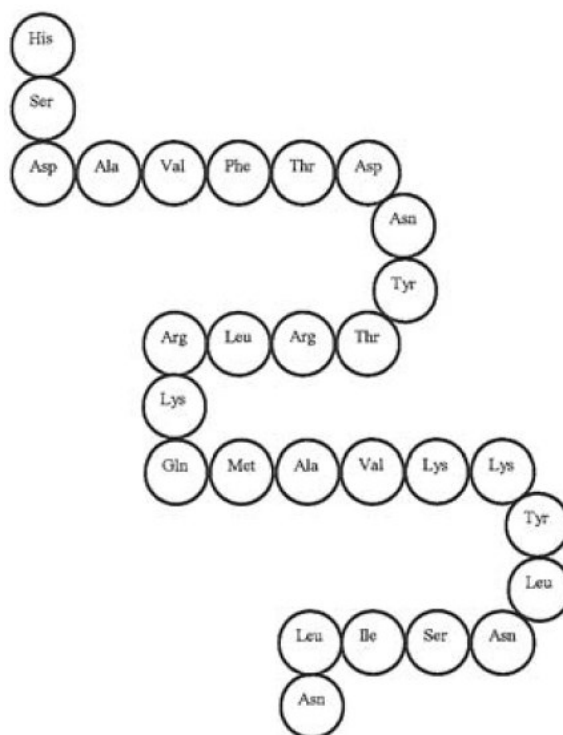
Příkladem dalšího analogu, který byl podroben klinickým studiím je [⁸⁶Y-DOTA]-[Pro¹,Tyr⁴]BBS, který vykazoval až 3krát vyšší internalizační schopnosti než peptid značený radionuklidem ⁶⁴Cu, a to po 20 hodinové inkubaci. [49]

Vývoj radioaktivně značených analogů bombesinu je důležitý zejména pro diagnostiku a léčbu karcinomů prsu a prostaty. Tyto nádory exprimují i receptory somatostatinové, ale GRP receptory, na které jsou analogy zaměřené, jsou exprimovány v mnohem větší hustotě. [39]

7.11 Vasoaktivní intestinální peptid (VIP)

7.11.1 Charakteristika

Vasoaktivní intestinální peptid, jehož struktura je zobrazena na obr. č. 24, je tvořen 28 aminokyselinami a uplatňuje se v celé řadě biologických funkcí. Spouští například průtok krve gastrointestinálním traktem, uplatňuje se při zánětlivých procesech a při vazodilataci, reguluje funkci slizničního imunitního systému, dále se podílí na sekreci vody a elektrolytů ve střevě a na sekreci různých hormonů. [20], [49] Dále se VIP rovněž uplatňuje jako důležitý neuropeptid s imunosupresivními účinky. Vykazuje také protizánětlivé účinky, jelikož má schopnost inhibovat proliferaci T buněk a produkci zánětlivých cytokinů a chemokinů z magrofágů. Důležitá je také jeho imunomodulační funkce, založená na podpoře růstu a proliferace jak normálních, tak ale i nádorových buněk. [10], [20]



Obr. č. 24: Struktura vasoaktivního intestinálního peptidu. [14]

7.11.2 VIP receptory

Účinky vasoaktivního intestinálního peptidu jsou zprostředkovány prostřednictvím vysoce afinitního receptoru pro VIP, kdy rozlišujeme jeho dva podtypy, a to VPAC₁ a VPAC₂. Oba podtypy řadíme do rodiny receptorů spřažených s G proteinem. [14]

Z normálních lidských tkání se VIP receptory vyskytují nejen v mozku, ale i na většině epiteliálních tkání, a to zejména podtyp VPAC₁. Podtyp VPAC₁ nacházíme exprimován například na hepatocytech, sliznici gastrointestinálního traktu, na folikulech štítné žlázy, prostatické žláze, na plicních acinech nebo na kanálcích pankreatu. Exprese podtypu receptoru VPAC₂ byla prokázána v hladké svalovině gastrointestinálního traktu, především žaludku. Tepny uložené v hladkém svalstvu také vykazují expresi receptoru VPAC₂. Stěna některých orgánů, jako je děloha nebo prostata rovněž exprimuje VPAC₂ receptor.

Exprese VIP receptorů ve vysoké hustotě byla identifikována i na několika lidských nádorech. Mezi nádorová onemocnění exprimující VPAC₁ receptor patří např. nádor plic, žaludku, tlustého střeva a konečníku, prsu, prostaty, jater nebo nádor močového měchýře. Receptory VPAC₂, které jsou na lidských nádorech exprimovány v podstatně menší míře než receptory VPAC₁, byly nalezeny u leiomyomů, většinou benigních nádorů vycházejících z hladké svaloviny. VIP receptory jsou často na těchto typech malignit exprimovány ve větší hustotě než receptory somatostatinové. [20], [39]

7.11.3 Analogy vasoaktivního intestinálního peptidu

Na základě identifikace těchto receptorů, byly radioaktivně značené analogy VIP použity jako specifické nástroje pro cílení na uvedené typy nádorů. Analogy byly značeny nejrůznějšími radionuklidy, jako jsou ¹²³I, ^{99m}Tc, ⁶⁴Cu nebo ¹⁸F. [14] *In vivo* byl poprvé použit VIP značený radionuklidem ¹²³I. Značení tímto radionuklidem je ale velmi časově náročné a navíc byla prokázána značná metabolická nestabilita tohoto analogu. V dalších studiích se autoři zaměřili na syntézu analogů se zvýšenou metabolickou stabilitou, ale bylo zjištěno, že z důvodu zachování specifické vazebné afinity peptidu nelze nahradit žádnou z 28 přítomných aminokyselin. [20], [49]

U dalšího analogu byl ke značení použit radionuklid ^{99m}Tc, jedná se o analog TP3654. Tento analog obsahuje na svém C-konci chelátovou aminokyselinovou sekvenci GAGG. Analog vykazuje *in vivo* rychlou krevní clearance, vylučován je

především ledvinami a v menší míře játry. ^{99m}Tc -TP3654 se na rozdíl od předchozího analogu ^{123}I -VIP akumuluje méně v normální plicní tkáni. [14], [20], [49]

Analog ^{99m}Tc -TP3654 byl úspěšně použit u pacientů s kolorektálním karcinomem, kdy docházelo k vyššímu příjmu radiofarmaka nádorem, než při použití ^{111}In -DTPA-octreotidu. Je to dáno pravděpodobně tím, že VIP receptory jsou u kolorektálního karcinomu exprimovány ve vyšší hustotě než receptory somatostatinové. [20], [49]

Bylo zjištěno, že různé malignity vyskytující se u člověka exprimují ve vysoké hustotě zároveň receptory pro VIP a receptory somatostatinové. Na základě tohoto zjištění byla použita směs obou peptidových hormonů, konkrétně ^{123}I -VIP a ^{111}In -DTPA-octreotidu. Nádory, které nebyly identifikovány jedním radioaktivně značeným peptidem, byly identifikovány druhým a naopak, tím bylo rozšířeno detekční spektrum pro lidské nádory. [20]

Dalším *in vivo* zkoumaným analogem byl TP3982. Ve studii prováděné na myších vykazoval tento analog značený radionuklidem ^{64}Cu vyšší absorpci v nádoru než předešlý analog ^{99m}Tc -TP3654. Jako nevýhoda tohoto analogu se ale ukázala pomalá krevní clearance.

Pro využití v pozitronové emisní tomografii u nádoru prsu byly zkoumány analogy TP3939, TP3982, TP4200 a TP3850 značené radionuklidem ^{64}Cu . Studie prováděné *in vitro* a *in vivo* prokázaly více než 10krát vyšší receptorovou afinitu těchto analogů v nádorové tkáni, v porovnání s tkání nenádorovou. Výhodou těchto analogů bylo zároveň jejich rychlé vyloučení z krve.

Další analog cílený na použití při nádoru prsu byl konjugovaný s kamptotecinem (CPT) za vzniku komplexu VIP-CPT. Výsledný konjugát vykazoval vysokou afinitu k receptorovému podtypu VPAC_1 , a na rozdíl od samotného peptidu inhiboval buněčnou proliferaci. Zdá se, že tento konjugát by se mohl stát novou chemoterapeutickou látkou. Nežádoucím účinkem tohoto přípravku je ale cytotoxické působení na normální buňky exprimující VPAC_1 receptory.

Výhodné vlastnosti vykazuje rovněž analog VIP značený radionuklidem ^{18}F , který, na rozdíl od nativního peptidu, vykazuje vyšší vazebnou afinitu k VIP receptorům a vyšší stabilitu. Pokud se ke značení použije jednostupňová syntéza, byla prokázána jeho vysoká stabilita v roztoku lidského sérového albuminu, rychlá krevní clearance a rychlé vyloučení z normálních tkání, jako jsou ledviny a střeva. [49]

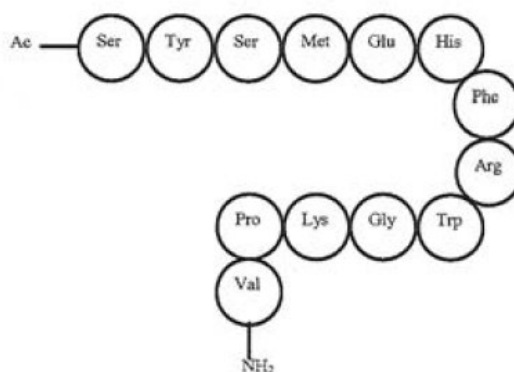
Nevýhodu používání VIP analogů, zejména analogu ^{123}I -VIP, představuje to, že VIP receptory jsou exprimovány ve vysoké hustotě na normálních plicních tkáních, takže zobrazování plicních lézí je obtížné. Stejné problémy se vyskytují i u zobrazování karcinomu prostaty, jelikož receptor VPAC₁ je kromě nádorové tkáně exprimován i tkání normální, a kromě toho i na sousední tkáni močového měchýře. Stejně tak je tomu i u primárních novotvarů a metastáz v jaterní tkáni, kdy zhruba jedna čtvrtina exprimovaných VIP receptorů je na nepostižené tkáni. [39]

Z toho vyplývá i nemožnost identifikace jaterních metastáz pankreatických nebo kolorektálních karcinomů, stejně tak výše zmíněných hepatocelulárních karcinomů. Metastázy primárních nádorů v lymfatických uzlinách také nejsou vhodné pro zobrazování pomocí ^{123}I -VIP. Tyto poznatky byly získány z experimentů prováděných *in vitro*, a není tedy vyloučeno, že VIP receptory exprimované na nádorových tkáních budou mít odlišné vlastnosti od receptorů vyskytujících se na fyziologických tkáních. Studií provedených na toto téma není mnoho, pravděpodobně z důvodu obtíženého zacílení tohoto receptoru *in vivo*. [39]

Nádory exprimující ve vysoké hustotě VIP receptory je možné léčit vysokými dávkami radioaktivně značenými VIP analogy, ale z výše uvedených důvodů je zde velké riziko radiotoxicity pro okolní necílové tkáně. Mohlo by dojít zejména k poškození imunitního systému, plic, ledvin nebo jater. [39]

7.12 α -melanocyty stimulující hormon

Alfa-melanocyty stimulující hormon (α -MSH) je lineární tri-dekapeptid, který je produkován hypofýzou jako proopiomelanokortin (POMC) z něž následně vzniká α -MSH, jehož struktura je zobrazena na obr. č. 25. Hlavní funkcí α -melanocyty stimulujícího hormonu je regulace pigmentace kůže. [20]



Obr. č. 25: Struktura α -melanocyty stimulujícího hormonu. [14]

Celkem rozeznáváme 5 typů melanokortinových receptorů, kdy působení tohoto peptidu je zprostředkováno prostřednictvím interakce s receptorem melanokortin 1 (MC1R), který řadíme mezi receptory spřažené s G proteinem. [14] Nadměrná exprese tohoto receptoru byla prokázána na melanomových buňkách, proto se radioaktivně značené α -MSH peptidy mohou použít jako diagnostické, nebo terapeutické prostředky právě u lidských melanomů. [20]

Stejně jako jiné peptidy je i nativní α -MSH rychle metabolizován proteolytickými enzymy. Z tohoto důvodu se vyvíjely nejrůznější analogy se zvýšenou stabilitou a metabolickou aktivitou *in vivo*. Syntetické analogy mohou být jak lineární, tak cyklické struktury. [14], [20] Lineární analogy α -MSH pro využití u maligního melanomu byly nejprve značeny radionuklidem ¹¹¹In a jako chelatační činidlo bylo použito DTPA. Vzniklý analog ¹¹¹In-[DTPA]-MSH ale vykazoval vysokou absorpci v necílových tkáních, zejména v ledvinách a játrech, a proto nebyl pro terapeutické aplikace využíván. Následně byly vyvíjeny analogy cyklické, značené radionuklidy ^{99m}Tc a ¹⁸⁸Re. Při jejich syntéze došlo ke koordinaci zvoleného radionuklidu do trojrozměrné struktury analogu. Vzniklé analogy již byly vhodné jak pro zobrazování melanomů, tak pro jejich využití v terapii. [39]

Bylo zjištěno, že důležitou roli při vychytávání analogů značených chelatačním činidlem DOTA v ledvinách, hraje náboj ϵ -aminoskupiny lysinového zbytku (Lys¹¹).

Pokud by se přítomný náboj neutralizoval, došlo by k významnému poklesu vychytávání analogu v ledvinách, a to beze změny vychytávání v ostatních orgánech. Amidace provedená na C-konci zase přispívá ke zvýšení schopnosti analogu vázat se na MC1R a ke zvýšenému příjmu analogu nádorem. Po provedení obou úprav vzniká DOTA-NAPamid, což je slibný analog α -melanocyty stimulujícího hormonu vhodný pro klinické využití, který vykazuje vysoký příjem v nádorové tkáni a nízkou retenci v ledvinách. [12]

7.13 Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY) se skládá z 36 aminokyselin a společně s pankreatickým polypeptidem (PP) a peptidem YY (PYY) patří do tzv. NPY rodiny. Jedná se o nejčastěji se vyskytující neuropeptid v mozku, který reguluje mnoho dalších fyziologických funkcí, jako jsou např. regulace příjmu potravy, regulace krevního tlaku, a dále kontrola úzkostného chování a stresu. [20], [49]

Působení tohoto peptidu je zprostředkováno přes Y receptory, kdy rozlišujeme jejich podtypy Y_1 až Y_6 . Fyziologicky byla prokázána exprese podtypů Y_1 , Y_2 , Y_4 a Y_5 . Antagonisté Y_1 a Y_2 by mohly najít uplatnění v léčbě poruch stravování a úzkosti. [39]

Neuropeptid Y se uplatňuje také při nádorovém bujení, kdy byl prokázán jeho vliv na proliferaci a diferenciaci buněk. Pokud neuropeptid Y působí přes receptor Y_2 , který je exprimovaný na endotelových buňkách, dochází ke stimulaci angiogeneze a vaskularizace pevných nádorů. Neuropeptid Y tedy působí jako faktor podporující růst nejrůznějších zhoubných nádorů. [13]

Na základě provedené studie byl prokázán výskyt neuropeptidových receptorů, konkrétně podtypu Y_1 , u 85 % primárních karcinomů prsu a u 100 % jeho metastáz v lymfatických uzlinách. Naproti tomu se tento receptor nevyskytuje u malobuněčného plicního karcinomu, kolorektálního karcinomu nebo karcinomu prostaty. [39] Během vzniku nádoru procházejí receptory v nádorových buňkách změnou jejich exprese. Normální prsní tkáň totiž na rozdíl od tkáně nádorové, vyjadřující receptor Y_1 , exprimuje receptor Y_2 . U nádorů nesoucích receptory Y_1 jsou tyto receptory exprimovány homogenně a ve vysoké hustotě.

Nádory prsu exprimují kromě neuropeptidových receptorů také receptory somatostatinové, VIP a GRP. Konkrétně bylo prokázáno, že nádory s vysokou hustotou receptorů vykazují 74 % expresi GRP receptorů, 66 % expresi subtypu receptoru Y_1 , 37 % expresi VIP receptorů a 21 % expresi receptorů somatostatinu. Dle těchto poznatků by mohlo být rozšířeno detekční spektrum nádorů prsu při použití směsi GRP a NPY. Pomocí označených receptorových ligandů, jako např. NPY, mohou být nádory prsu a jejich metastázy selektivně a účinně identifikovány. [49]

Neuropeptidové receptory jsou rovněž exprimovány v ovariální tkáni, kde pravděpodobně hrají roli v patogenezi a patofyziologii zhoubných nádorů vaječníků. Výskyt receptorů Y_1 a Y_2 byl rovněž prokázán u nádorů kůry nadledvin nebo neuroendokrinních nádorů, jako jsou feochromocytom nebo paragangliom. [20], [49]

U pacientů s neuroblastomem ukazovaly vysoké hladiny neuropeptidu Y v séru na špatnou prognózu a nízkou dobu přežití. Navíc byla prokázána korelace mezi zvýšením hladiny neuropeptidu Y a metastatickým onemocněním a s budoucím relapsem. Měření hladin neuropeptidu Y v séru u pacientů trpícím tímto onemocněním se dá považovat za téměř neinvazivní nástroj pro monitorování onemocnění. [13]

Vysoká hustota exprese Y_1 a Y_2 receptorů na lidských nádorech umožňuje zaměřit radioaktivně značené analogy na Y receptory, a to jak pro diagnostické, tak pro terapeutické účely. Analogy neuropeptidu Y musí splňovat příslušné farmakologické vlastnosti a musí mít dobrou biologickou dostupnost. Y_1 selektivní analogy se jeví jako slibné nosiče pro léčbu rakoviny prsu, zatímco Y_2 selektivní analogy mohou být použity pro diagnostiku, nebo pro léčbu neuroblastomů, nebo obecně neuroendokrinních nádorů. [20], [49]

7.14 Neurotensin

Neurotensin (NT) je peptid tvořený 13 aminokyselinami, který byl poprvé izolován z bovinního hypotalamu. Následně byl jeho výskyt prokázán také v některých periferních tkáních, jako např. v kardiovaskulárním systému nebo gastrointestinálním traktu. V centrálním nervovém systému se neurotensin uplatňuje jako neurotransmitter nebo neuromodulátor. V mozku se podílí na kontrole chuti, endokrinních funkcí, modulaci bolesti a patogenezí duševních poruch. Na periférii se neurotensin uplatňuje jako lokální hormon modulující zažívací trakt, dále má vliv i na imunitní odpověď střevní sliznice.

Neurotensin působí prostřednictvím tzv. NT receptorů. Nejčastější charakterizované typy receptorů jsou NTS₁, NTS₂ a NTS₃. Podtypy NTS₁ a NTS₂ patří mezi receptory spojené s G proteinem, se sedmi transmembránovými doménami, zatímco podtyp NTS₃ mezi receptory působící prostřednictvím G proteinu nepatří. Účinky působené prostřednictvím receptoru NTS₁ mohou být selektivně blokovány jeho antagonistou SR48692. [39], [36] Role receptoru NTS₃ pravděpodobně spočívá ve zprostředkování růstové stimulace neurotensinem v nádorových buněčných liniích. [20]

Neurotensin také hraje roli při nádorovém bujení, kdy *in vitro* stimuluje proliferaci nádorových buněčných linií. Naopak výše zmíněný antagonist SR48692 proliferaci nádorových buněk inhibuje. Receptory neurotensinu se vyskytují na nejružnějších nádorových buněčných liniích, jako jsou malobuněčný plicní karcinom, neuroblastom, nádory pankreatu a tlustého střeva. Klinický význam má ale exprese receptorů neurotensinu u primárních lidských nádorů jako jsou meningiomy a Ewingův sarkom.

Dále je významná exprese receptorů u duktálních karcinomů pankreatu a v menším množství jsou receptory přítomné u astrocytomů a medulárního karcinomu štítné žlázy. Naopak receptory NTS₁ jsou ve velmi malém množství exprimovány v karcinomech prsu, prostaty, vaječníků, ledvin a jater, dále v neuroendokrinních střevních nádorech, neuroblastomech nebo lymfomech. [39]

Terapeutické použití nativního neurotensinu je omezeno jeho rychlou plazmatickou degradací *in vivo* peptidázami. Pro vývoj analogů je nutné dodržet minimální sekvenci neurotensinu, NT (8-13), která stále vykazuje vysokou afinitu k příslušnému receptoru. Pro scintigrafii receptoru *in vivo*, byly proto syntetizovány krátké stabilní analogy neurotensinu. [39], [20] Na zvířecích modelech vykazovaly analogy značené radionuklidy ¹³¹I, ¹³²I, ^{99m}Tc, ¹⁸⁸Re, ¹¹¹In a ¹⁸F vysokoafinitní vazbu k NT receptorům, lepší stabilitu a biodistribuci. Pokud by u člověka bylo scintigrafické vyšetření úspěšné,

mohla by být do budoucna prováděna i cílená radioterapie pomocí analogů neurotensinu. Klinické studie se také zaměřují na možné použití antagonisty ST48692, zejména pro jeho inhibiční účinky na nádorové buňky. [39]

7.15 Substance P

Peptid zvaný substance P (SP) se skládá z 11 aminokyselin. Řadíme ho do tachykininové rodiny neuropeptidů. Jedná se o evolučně nejstarší neurotransmitery, pravděpodobně ještě starší než acetylcholin nebo katecholaminy. Zároveň se jedná o jednu z největších peptidových rodin popsanych u živočichů, od bezobratlých po savce. Poprvé byla substance P izolována v roce 1931, a to z mozku a střeva koní. Čistá forma byla izolována až na počátku sedmdesátých let z hovězího hypotalamu, a následně byla určena i sekvence aminokyselin. [32]

Neuropeptid substance P je široce distribuován v centrálním i periferním nervovém systému a dále se vyskytuje i v nervovém systému enterálním. V nervovém systému je zapojený do řady funkcí, jako je vnímání bolesti nebo vasodilatace. Kromě těchto funkcí se podílí také na dalších biologických procesech, jako jsou růst a vývoj neuronální tkáně, hojení ran, regulace cirkulačních a respiračních mechanismů na centrální i periferní úrovni, ovlivňuje sekreci slinných žláz a zánětlivé procesy. V CNS se navíc podílí na regulaci emočního chování, stresu, úzkosti a deprese. [20], [32]

Působení substance P je zprostředkováno prostřednictvím neurokininových (NK) receptorů. Tyto receptory rovněž patří do rodiny receptorů spřažených s G proteinem. Jsou známy 3 typy NK receptorů, a to NK1, NK2 a NK3, přičemž substance P se váže přednostně na NK1 receptory. Receptor NK1 se vyskytuje v centrální nervové soustavě na neuronech, na buňkách hladké svaloviny, endoteliálních buňkách, fibroblastech a na buňkách imunitního systému. [32] Přítomnost NK1 receptorů byla popsána u různých lidských novotvarů, jsou to zejména glioblastom, astrocytom, karcinom prsu, medulární karcinom štítné žlázy, malobuněčný plicní karcinom a karcinom pankreatu. Zřídka se receptor NK1 vyskytuje u nádorů gastrointestinálního traktu nebo u lymfomů. [27], [39]

U všech typů nádorů byla zjištěna exprese receptorů NK1 ve vysoké hustotě na nádorových a peritumorálních cévách. Uvedené vaskulární receptory pravděpodobně slouží jako molekulární základ pro vazodilataci, prostřednictvím substance P. Substance P má rovněž schopnost stimulovat proliferaci nádorových buněk. Antagonisté NK1 receptorů mají zase schopnost růst novotvarů u člověka inhibovat. [39]

První použitý analog substance P byl značený radionuklidem ^{111}In a jako chelatační činidlo bylo použito DTPA. Vzniklý analog ^{111}In -DTPA-substance P byl použit pro vizualizaci thymu u osob trpících autoimunitním onemocněním. Jelikož zejména nádory mozku exprimují ve vysoké hustotě receptory pro substanci P, zaměřuje se vývoj

analogů především na cílení a léčbu těchto nádorů. [39] Při použití analogu substance P obsahující radionuklid ^{90}Y a chelatační činidlo DOTAGA došlo u 13 z 20 nemocných trpících nádorem mozku ke stabilizaci nemoci nebo ke zlepšení jejich stavu. [27]

In vivo se nativní substance P rychle metabolizuje enzymatickým štěpením, kdy nejčastější vznikající fragmenty jsou SP (1-4) a SP (5-11). Ve větším množství vzniká fragment SP (5-11), který stále vykazuje dostatečnou metabolickou aktivitu, jelikož vazebné místo pro receptor NK1 je umístěno v oblasti aminokyselin 7-11. Fragment SP (5-11) není stabilní v lidském séru, ale v mozkomíšním moku stabilní je, což je důležité z hlediska jeho využití pro léčbu nádorů mozku. Z toho důvodu se právě fragment SP (5-11) často využívá pro syntézu dalších analogů. [27]

Fragment SP (5-11) značený radionuklidem ^{211}At je využíván jako potenciální radiofarmakum pro léčbu multiforního glioblastomu (GBM). Jedná se o maligní nádor mozku vyskytující se u dospělých, kdy medián přežití je pouze 14,6 měsíců. U pacientů, kterým byla aplikována substance P značená radionuklidem ^{213}Bi došlo k významnému prodloužení mediánu přežití, a to až na 29 měsíců. Radiofarmakum je aplikováno injekčně a to buď intratumorálně, nebo intrakavitálně, kdy dochází k snadnému průniku do parenchymu mozku, a k vazbě na přítomné GBM buňky. Při použití radionuklidu ^{211}At je dosaženo hlubšího a účinnějšího ozáření nádoru, ale i vzdálených metastáz.

Při aplikaci analogu ^{213}Bi -DOTA-substance P nebyla pozorována žádná lokální nebo systémová toxicita, látka vykazovala vysokou retenci v cílové tkáni a exkrece analogu byla převážně renální cestou. Cílená radioterapie prostřednictvím ^{213}Bi -DOTA substance P představuje inovativní a účinnou léčbu gliomů, které nejsou přístupné pro léčbu chirurgickou. [27]

7.16 Některé další peptidy

Hormon uvolňující gonadotropin (LHRH) je dekapeptid produkovaný v hypotalamu, který působí na úrovni hypofýzy, kde stimuluje sekreci luteinizačního a folikuly stimulujícího hormonu. Studován byl zejména kvůli jeho vlivu na kontrolu růstu endokrinně citlivých rakovinných buněk. Uplatňuje se při nádorovém bujení, konkrétně u nádoru prostaty, vaječnicků, endometria a prsu. Pro léčbu těchto nádorů byly vyvinuty dva typy LHRH analogů, a to jeho agonisté a antagonisté. Agonisté LHRH se používají pro terapii nádorů prostaty a nádorů prsu u žen před menopauzou. Antagonisté LHRH, kteří byly vyvinuti později, jsou zaměřeni hlavně na léčbu nádoru prostaty. [39], [45]

Kalcitonin je neuropeptid tvořený 32 aminokyselinami vylučovaný parafolikulárními, neboli C buňkami štítné žlázy. Hlavní funkcí kalcitoninu je regulace hladiny vápníku působením na osteoklasty a ledviny. Zvýšená exprese kalcitoninových receptorů je v osteolytických ložiscích, která jsou přítomná u metastáz kostních nádorů a u Pagetovy nemoci. Primární lidské nádory exprimující receptory kalcitoninu jsou velkobuněčný kostní nádor a medulární karcinom štítné žlázy. Kvůli nedostatku poznatků týkajících se výskytu kalcitoninových receptorů v nádorech se analogy kalcitoninu nezaměřují na cílení uvedených nádorů.

Oxytocin ve své struktuře obsahuje 9 aminokyselin a vykazuje jak centrální, tak periferní účinky. Přítomnost specifických oxytocinových receptorů byla prokázána u gliálních nádorů, neuroblastomů, nádorů prsu a endometria. Na myším modelu byl popsán účinek nového radioligandu, který je specifický pro oxytocinové receptory vyskytující se u nádorů prsu.

Peptid endotelin se skládá z 21 aminokyselin a vykazuje silné vazoaktivní účinky. Jeho působení je zprostředkováno dvěma receptory, a to ET_A a ET_B . Exprese těchto receptorů byla prokázána u nádorů prsu, vaječnicků, plic a u gliomů a meningiomů, jejichž růst a progresi může endotelin podporovat. Na základě studií provedených *in vitro* a *in vivo* bylo zjištěno, že endotelin vykazuje vůči nádorové tkáni mitogenní účinky. Na zvířecích modelech bylo prokázáno, že se radioaktivně značený smíšený antagonist receptorů ET_A a ET_B váže *in vivo* na endotelinové receptory. [20], [39]

Atriální natriuretický peptid (ANP) je tvořen 28 aminokyselinami a vzniká ze svého prekurzoru pro-ANP, působením serinové proteázy korin. Peptidový hormon ANP je produkován v srdeční síni a jeho funkcí je regulace homeostázy tekutin a elektrolytů a regulace krevního tlaku prostřednictvím působení na ledviny, kde inhibuje sekreci

reninu a aldosteronu. Působení ANP je zprostředkováno třemi typy receptorů, a to ANP_A, ANP_B a ANP_C. Receptory A a B, na rozdíl od receptoru C, obsahují ve své intracelulární doméně guanylátcyklázu. Vysoká hustota exprese ANP receptorů byla prokázána v ledvinách, nadledvinách a plicích. Mezi nádorové tkáně exprimující ANP_A receptory patří neuroblastomy a malobuněčný plicní karcinom. Obecně, ale není dostatek informací o výskytu ANP receptorů u malignit vyskytujících se u člověka. [16], [38], [39]

Glucagon-like peptid-1 (GLP-1) je inkretinový hormon, jehož hlavní funkcí je regulace hladiny glukózy v krvi. U zdravých lidí je GLP-1 uvolňován po jídle, kdy snižuje koncentraci glukózy zvýšením sekrece inzulínu a potlačuje vylučování glukagonu. Působení tohoto peptidu je zprostředkováno GLP-1 receptory, které se nacházejí na povrchu β -buněk pankreatu v Langerhansových ostrůvcích, kde dochází k postprandiální sekreci inzulínu vyvolané glukózou. Receptory GLP-1 jsou ve vysoké hustotě nalézány u inzulinomů vycházejících z β -buněk pankreatu, dále také u gastrinomu a feochromocytomu. U pacientů s benigní formou inzulinomu se jeví zobrazování pomocí značených analogů GLP-1 jako nejlepší metoda pro jejich přesnou lokalizaci. Na zvířecím modelu, byla pomocí radioaktivně značeného analogu exendin-4 provedena úspěšná vizualizace přítomného inzulinomu. [18], [39]

8 Závěr

V práci byly shrnuty poznatky týkající se radioaktivně značených receptorově-specifických peptidů. Jedná se o skupinu radiofarmak, která jsou v závislosti na použitém radionuklidu vhodná jako pro diagnostické, tak terapeutické účely. Tato oblast se neustále vyvíjí, a to zejména díky interdisciplinární spolupráci, kdy jsou uplatňovány poznatky z různých oborů, jako je chemie, biochemie, biologie, biofyzika, radiologie a nukleární medicína.

V posledních letech bylo vyvinuto a zkoumáno mnoho peptidů, které by se daly použít jako radiofarmaka. Pro terapeutické účely se do budoucna jeví jako slibné nástroje peptidy vykazující antiproliferační a apoptotické účinky. Ke zlepšení detekce nádorů, které exprimují více různých receptorů pro peptidové hormony, by mohlo přispět použití směsi několika radioaktivně značených peptidů.

Pro pacienty je zároveň přínosnější účinné cílení na nádorovou tkáň, které je spojeno s nižším výskytem nežádoucích účinků, v porovnání s jiným způsobem protinádorové léčby. Přetrvávajícím problémem používání radioaktivně značených peptidů a jejich analogů je ale jejich různý stupeň radionefrotoxicity. V současné době se ale i tento nežádoucí účinek daří řešit a to syntézou analogů s nízkou radionefrotoxicitou. Děje se to na základě jejich strukturních modifikací nebo podáním jiných sloučenin, které radionefrotoxicitu aplikovaného radiofarmaka snižují, a tím se pacientům zaručí jejich bezpečné podání s co nejnižšími riziky.

Stále jsou hledány nové peptidové receptory exprimované na nádorových buňkách a zároveň nové radioaktivně značené peptidy. Tyto nově získané poznatky jsou důležité pro jejich budoucí aplikace v diagnostice a terapii nádorových onemocnění.

9 Použitá literatura

1. AKIZAWA, H., UEHARA, T., ARANO, Y. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, vol. 60, no. 12, s. 1319-1328.
2. ALOJ, L., CARACÓ, C., PANICO, M., et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of ^{111}In -DTPAGlu-G-CCK8 for Cholecystokinin-B Receptor Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2004, vol. 45, no. 3, s. 485-494.
3. 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 International*, 2005, vol. 67, s. 969-976.
4. BEHR, T. M., BÉHÉ, M. P. Cholecystokinin-B/Gastrin Receptor-Targeting Peptides for Staging and Therapy of Medullary Thyroid Cancer and Other Cholecystokinin-B Receptor-Expressing Malignancies. *Seminars in Nuclear Medicine*, 2002, vol. 32, no. 2, s. 97-109.
5. BEHR, T. M., GOTTHARDT, M., BARTH, A., BÉHÉ, M. Imaging tumors with peptide- based radioligands. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, 2001, vol. 45, no. 2, s. 189-200.
6. BREEMAN, W. A. P., DE JONG, M., KWEKKEBOOM, D. J., VALKEMA, R., BAKKER, W. H., KOOIJ, P. P. M., VISSER, T. J., KRENNING, E. P. Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *European Journal of Nuclear Medicine*, 2001, vol. 28, no. 9, s. 1421-1429.
7. DE LUCA, S., RAGONE, R., BRACCO, CH., et al. A Cyclic CCK8 Analogue Selective for the Cholecystokinin Type A Receptor: Design, Synthesis, NMR

- Structure and Binding Measurements. *ChemBioChem*, 2003, vol. 4, no. 11, s. 1176-1187.
8. DUFRESNE, M., SEVA, C., FOURMY, D. Cholecystokinin and Gastrin Receptors. *Physiological Reviews*, 2006, vol. 86, s. 805-847.
 9. FERRAND, A., WANG, T. C. Gastrin and cancer: A review. *Cancer Letters*, 2006, vol. 238, no. 1, s. 15-29.
 10. FORGHANI, P., PETERSEN, CH. T., WALLER, E. K. Activation of VIP signaling enhances immunosuppressive effect of MDSCs on CMV-induced adaptive immunity. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 47, s. 81873-81879.
 11. FRÖBERG, A. C., DE JONG, M., NOCK, B. A., et al. Comparison of three radiolabelled peptide analogues for CCK-2 receptor scintigraphy in medullary thyroid carcinoma. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2009, vol. 36, no. 8, s. 1265-1272.
 12. FROIDEVAUX, S., CALAME-CHRISTE, M., TANNER, H., EBERLE, A. N. Melanoma Targeting with DOTA- α -Melanocyte-Stimulating Hormone Analogs: Structural Parameters Affecting Tumor Uptake and Kidney Uptake. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2005, vol. 46, no. 5, s. 887-895.
 13. GALLI, S., NARANJO, A., VAN RYN, C., et al. Neuropeptide Y as a Biomarker and Therapeutic Target for Neuroblastoma. *The American Journal of Pathology*, 2016, vol. 186, no. 11, s. 3040-3053.
 14. GIBLIN, M. F., VEERENDRA, B., SMITH, CH. J. Radiometallation of Receptor-specific Peptides for Diagnosis and Treatment of Human Cancer. *in vivo*, 2005, vol. 19, s. 9-30.
 15. GOOD, S., WALTER, M. A., WASER, B., WANG, X., MÜLLER-BRAND, J., BÉHÉ, M. P., REUBI, J. C., MAECKE, H. R. Macrocyclic chelator-coupled gastrin-based radiopharmaceuticals for targeting of gastrin receptor-expressing

- tumours. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2008, vol. 35, no. 10, s. 1868-1877.
16. GU, Y., THOMPSON, D., XU, J., LEWIS, D. F., MORGAN, J. A., COOPER, D. B., MCCATHRAN, CH. E., WANG, Y. Aberrant pro-atrial natriuretic peptide/corin/natriuretic peptide receptor signaling is present in maternal vascular endothelium in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 2018, vol. 11, s. 1-6.
 17. HOFLAND, L. J., LAMBERTS, S. W. J. The Pathophysiological Consequences of Somatostatin Receptor Internalization and Resistance. *Endocrine Reviews* , 2003, vol. 24, no. 1, s. 28-47.
 18. HUBALEWSKA-DYDEJCZYK, A., SOWA-STASZCZAK, A., TOMASZUK, M., STEFANSKA, A. GLP-1 and exendin-4 for imaging endocrine pancreas. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2015, vol. 59, no. 2, s. 152-160.
 19. CHENG, S., LANG, L., WANG, Z., et al. Positron Emission Tomography Imaging of Prostate Cancer with Ga-68-Labeled Gastrin-Releasing Peptide Receptor Agonist BBN₇₋₁₄ and Antagonist RM26. *Bioconjugate Chemistry*, 2018, vol. 29, no. 2, s. 410-419.
 20. KHAN, I. U., BECK-SICKINGER, A. G. Targeted Tumor Diagnosis and Therapy with Peptide Hormones as Radiopharmaceuticals. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 8, no. 2, s. 186-199.
 21. KING, R., SURFRAZ, M. B.-U., FINUCANE, C., BIAGINI, S. C. G., BLOWER, P. J., MATHER, S. J. ^{99m}Tc-HYNIC-Gastrin Peptides: Assisted Coordination of ^{99m}Tc by Amino Acid Side Chains Results in Improved Performance Both In Vitro and In Vivo. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2009, vol. 50, no. 4, s. 591-598.

22. KOMÁREK, Pavel a Miloslava RABIŠKOVÁ. *Technologie léků: galenika*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 8072624237.
23. KWEKKEBOOM, D. J., BAKKER, W. H., KAM, B. L., et al. Treatment of patients with gastro-entero-pancreatic (GEP) tumours with the novel radiolabelled somatostatin analogue [$^{177}\text{Lu-DOTA}^0\text{Tyr}^3$]octreotate. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2003, vol. 30, no. 3, s. 417-422.
24. LAVERMAN, P., JOOSTEN, L., EEK, A., et al. Comparative biodistribution of 12 ^{111}In -labelled gastrin/CCK2 receptor-targeting peptides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2011, vol. 38, no. 8, s. 1410-1416.
25. LÁZNIČEK, Milan a Pavel KOMÁREK. *Základy radiofarmacie*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-781-x.
26. LE BARS, D. Fluorine-18 and medical imaging: Radiopharmaceuticals for positron emission tomography. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2006, vol. 127, no. 11, s. 1488-1493.
27. LYCZKO, M., PRUSZYNSKI, M., MAJKOWSKA-PILIP, A., et al. ^{211}At labeled substance P (5–11) as potential radiopharmaceutical for glioma treatment. *Nuclear Medicine and Biology*, 2017, vol. 53, s. 1-8.
28. MANSI, R., MINAMIMOTO, R., MÄCKE, H., IAGARU, A. H. Bombesin-Targeted PET of Prostate Cancer. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2016, vol. 57, no. 10 (Supplement_3), s. 67-72.
29. 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. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2005, vol. 32, no. 10, s. 1136-1143.

30. 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. *Nuclear Medicine and Biology*, 2007, vol. 34, no. 6, s. 633-641.
31. MIAO, Y., HOFFMAN, T. J., QUINN, T. P. Tumor-targeting properties of ^{90}Y - and ^{177}Lu -labeled α -melanocyte stimulating hormone peptide analogues in a murine melanoma model. *Nuclear Medicine and Biology*, 2005, vol. 32, no. 5, s. 485-493.
32. MISTROVA, E., KRUZLIAK, P., CHOTTOVA DVORAKOVA, M. Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides*, 2016, vol. 58, s. 41-51.
33. NOCK, B. A., MAINA, T., BÉHÉ, M., et al. CCK-2/Gastrin Receptor-Targeted Tumor Imaging with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled Minigastrin Analogs. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2005, vol. 46, no. 10, s. 1727-1736.
34. NOCK, B. A., MAINA, T., KRENNING, E. P., DE JONG, M. "To Serve and Protect": Enzyme Inhibitors as Radiopeptide Escorts Promote Tumor Targeting. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2014, vol. 55, no. 1, s. 121-127.
35. OCAK, M., HELBOK, A., RANGGER, CH., et al. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2011, vol. 38, no. 8, s. 1426-1435.
36. OSADCHII, O. E. Emerging role of neurotensin in regulation of the cardiovascular system. *European Journal of Pharmacology*, 2015, vol. 762, s. 184-192.
37. PANDEY, U., GAMRE, N., KUMAR, Y., SHETTY, P., SARMA, H. D., DASH, A. A systematic evaluation of the potential of PCTA-NCS ligand as a

- bifunctional chelating agent for design of ^{177}Lu radiopharmaceuticals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2016, vol. 307, no. 1, s. 187-194.
38. PELOSI, G., VOLANTE, M., PAPOTTI, M., SONZOGNI, A., MASULLO, M., VIALE, G. Peptide receptors in neuroendocrine tumors of the lung as potential tools for radionuclide diagnosis and therapy. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2006, vol. 50, no. 4, s. 272-287.
39. REUBI, J. C. Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocrine Reviews*, 2003, vol. 24, no. 4, s. 389-427.
40. REUBI, J. C., MÄCKE, H. R., KRENNING, E. P. Candidates for Peptide Receptor Radiotherapy Today and in the Future. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2005, vol. 46, no. 1 (Supplement), s. 67-75.
41. ROOSENBERG, S., LAVERMAN, P., VAN DELFT, F. L., BOERMAN, O. C. Radiolabeled CCK/gastrin peptides for imaging and therapy of CCK2 receptor-expressing tumors. *Amino Acids*, 2011, vol. 41, no. 5, s. 1049-1058.
42. SOSABOWSKI, J. K., MATZOW, T., FOSTER, J. M., FINUCANE, C., ELLISON, D., WATSON, S. A., MATHER, S. J. Targeting of CCK-2 Receptor-Expressing Tumors Using a Radiolabeled Divalent Gastrin Peptide. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2009, vol. 50, no. 12, s. 2082-2089.
43. TIRCSÓ, G., BENYÓ, E. T., SUH, E. H., JUREK, P., KIEFER, G. E., SHERRY, A. D., KOVÁCS, Z. (S)-5-(p-Nitrobenzyl)-PCTA, a Promising Bifunctional Ligand with Advantageous Metal Ion Complexation Kinetics. *Bioconjugate Chemistry*, 2009, vol. 20, no. 3, s. 565-575.
44. VEGT, E., EEK, A., OYEN, W. J. G., DE JONG, M., GOTTHARDT, M., BOERMAN, O. C. Albumin-derived peptides efficiently reduce renal uptake of radiolabelled peptides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2010, vol. 37, no. 2, s. 226-234.

45. VENTURELLI, M., GUAITOLI, G., OMARINI, C., MOSCETTI, L. Spotlight on triptorelin in the treatment of premenopausal women with early-stage breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 2018, vol. 10, s. 39-49.
46. VOLKOVÁ, M., MANDÍKOVÁ, J., LÁZNÍČKOVÁ, A., LÁZNÍČEK, M., BÁRTA, P., TREJTNAR, F. The involvement of selected membrane transport mechanisms in the cellular uptake of ¹⁷⁷Lu-labeled bombesin, somatostatin and gastrin analogues. *Nuclear Medicine and Biology*, 2015, vol. 42, no. 1, s. 1-7.
47. WANG, Q., GRAHAM, K., SCHAUER, T., et al. Pharmacological properties of hydrophilic and lipophilic derivatives of octreotate. *Nuclear Medicine and Biology*, 2004, vol. 31, no. 1, s. 21-30.
48. WIBMER, A. G., BURGER, I. A., SALA, E., HRICAK, H., WEBER, W. A., VARGAS, H. A. Molecular Imaging of Prostate Cancer. *RadioGraphics*, 2016, vol. 36, no. 1, s. 142-161.
49. ZWANZIGER, D., BECK-SICKINGER, A. G. Radiometal Targeted Tumor Diagnosis and Therapy with Peptide Hormones. *Current Pharmaceutical Design*, 2008, vol. 14, no. 24, s. 2385-2400.