

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ

KATEDRA JADERNÉ CHEMIE



# Bakalářská práce

**Příprava a charakterizace  $^{161}\text{Tb}$  značeného peptidu**

Preparation and characterization of  $^{161}\text{Tb}$  labelled peptide

Autor:

Klára Šustrová

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Ján Kozempel, Ph.D.

Praha, 2024

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechnu použitou literaturu.

V Praze dne .....

Klára Šustrová .....

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce, panu doc. RNDr. Jánmu Kozempelovi, Ph.D, za vedení mé práce, korekturu textu, čas který mi věnoval a uvedení do problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Natálii Pavlačové a Ing. Vojtěchovi Scheinpflugovi za pomoc s korekturou této práce. Obrovský díky pak patří Bc. Paulíně Pažitkové, které mimo jiné také dělala korekturu této práce ale hlavně za to, že si na mě udělala čas, aby mě vedla při přípravě vzorků, jejich proměření, a nakonec se mnou prokonzultovala výsledky.

*Název práce:* Příprava a charakterizace  $^{161}\text{Tb}$  značeného peptidu

*Autorka:* Klára Šustrová

*Obor:* Jaderná chemie

*Druh práce:* Bakalářská práce

*Vedoucí práce:* doc. RNDr. Ján Kozempel, Ph.D.

*Konzultant:* není

*Abstrakt:*

Tato práce se zabývá značením modelového peptidu izotopem terbia –  $^{161}\text{Tb}$ . Teoretická část se věnuje obecně využití radioaktivních látek v medicíně, bioaktivním látkám, a nakonec i samotnému terbiu. Zahrnuto je i porovnání a s podobným nuklidy  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  a přehled vybraných peptidů a jejich vlastností. V experimentální části jsou pak popsány způsoby značení DOTA a molekuly PSMA – 617 při různých experimentálních podmínkách.

*Klíčová slova:* Terbium – 161, DOTA, VEGF, FAPI, PSMA, značení PSMA, mikrovlnný reaktor, Lutecium – 177

*Title:* Preparation and characterization of  $^{161}\text{Tb}$  labelled peptide.

*Author:* Klára Šustrová

*Branch:* Nuclear chemistry

*Type of thesis:* Bachelor 's

*Advisor:* doc. RNDr. Ján Kozempel, Ph.D.

*Consultant:* none

*Abstract:*

This paper deals with the labelling model peptide with the terbium isotope  $^{161}\text{Tb}$ . The theoretical part describes the general use of radioactive substances in medicine, bioactive substances, and finally terbium itself. A comparison with the similar nuclides  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  and an overview of selected peptides and their properties are also included. The experimental section then describes the labelling of DOTA and the PSMA-617 molecule with different experimental conditions.

Key words: Terbium – 161, DOTA, VEGF, FAPI, PSMA, marking PSMA, microwave reactor, Lutecium – 177

## Seznam zkratek

$^{18}\text{F}$ -FDG - flourodeoxyglukóza s radioaktivní fluorem 18

CAF – cancer associated fibroblast

CT – computer tomografy (počítačová tomografie)

DOTA - dodecane tetraacetic acid (kyselina dodekantetraoctová, někdy také teraxetan)

DTPA – diethylenetriaminepentaacetic acid (kyselina diethylenetriaminepentaoctová)

FAP – fibroblast activation protein

FAPI – inhibitor FAP

IZ – ionizující záření

LET – linear energy transmission (lineární přenos energie)

MR – magnetické rezonance

PET – pozitronová emisní tomografie

PSMA – prostate-specific membrane antigen (prostatický specifický membránový antigen)

ROI - region of interest

PRRT – peptide receptor radionuclide therapy

SPECT – jednofotonová emisní výpočetní tomografie (Single-photon emission computed tomography)

TAT – targeted alpha therapy

TLC – tenkovrstvé chromatografie

VEGF – vascular endothelial growth factor (vaskulární endotelový růstový faktor)



# Obsah

1 Úvod.....	1
2 Nukleární medicína .....	3
2.1 Diagnostika.....	3
2.1.1 PET.....	3
2.1.2 SPECT.....	3
2.2 Radiofarmaka .....	4
2.2.1 PRRT .....	4
2.2.2 TAT.....	5
2.3 Volba radionuklidu .....	5
3 Biologicky aktivní peptidy .....	6
3.1 Struktura .....	6
3.2 Cyklické peptidy .....	6
3.3 Peptidické hormony.....	7
4 Oligopeptidy.....	9
4.1 DOTA .....	9
4.2 DOTATOC.....	9
4.3 FAPI.....	11
4.4 PSMA.....	12
4.5 VEGF.....	13
5 Terbium .....	14
5.1 Tb – 161.....	14
5.2 Ostatní izotopy terbia .....	14
6 Srovnání Terbia – 161, Yttria – 90 a Lutecia – 177 .....	16
7 Experimenty .....	18
7.1 Použité přístroje.....	18



7.2 Použité chemikálie .....	18
7.3 Značení PSMA – 617 na termobloku .....	18
7.4 Značení DOTA .....	19
7.5 Značení PSMA – 617 v mikrovlnném reaktoru .....	19
7.6 Měření na iTLC-SG destičkách.....	19
7.7 Závislost označení PSMA na době zahřívání .....	22
7.8 Stabilita PSMA v čase .....	22
7.9 Závislost označení PSMA na pH.....	23
8 Výsledky a diskuse .....	24
8.1 DOTA .....	24
8.2 Porovnání značení PSMA na termobloku vs. v mikrovlnném reaktoru .....	25
8.3 Závislost označeného PSMA na době zahřívání .....	26
8.3.1 Poměr 1:25, 1:50 při 5 MBq.....	26
8.3.2 Poměr 1:50 při 50 MBq.....	27
8.3.3 Poměr 1:500 při 50 MBq.....	28
8.4 Stabilita PSMA v čase .....	29
8.5 Závislost označení PSMA na pH.....	30
9 Závěr.....	31
10 Použitá literatura .....	32

## 1 Úvod

Díky vysoké míře nádorových onemocnění je nukleární medicína stále rostoucím oborem. Dochází k modernizaci zaběhlých léčiv i postupů při jejich výrobě.

Díky podobným vlastnostem  $^{161}\text{Tb}$  jako  $^{177}\text{Lu}$  se o něm uvažuje jako o vhodné alternativě. Má podobný poločas rozpadu i koordinační okolí, navíc emituje Augerovy elektrony, takže má potenciál být účinnější s nižší celkovou dávkou. Z tohoto důvodu se vyvíjejí nová radiofarmaka, která využívají jako svůj radionuklid právě  $^{161}\text{Tb}$ . Současné studie popisují jeho využití pro zobrazování i pro terapii. [33,34]

Membránový specifická antigen pro prostatu je ligand, kterému se věnuje poslední dobou velká pozornost ze stran výzkumníků. V malé míře je PSMA exprimováno i ve zdravé prostatě, ovšem při karcinomu prostaty se jeho produkce zvýší až 1000x. Díky tomu, že PSMA sídlí v epitelu, je možné na něj cílit. Jedna z látek, která se na něj v těle přesně váže je PSMA – 617. [1]

Cílem této práce je literární rešerše značení s  $^{161}\text{Tb}$  a značení peptidů, následně výběr vhodného peptidu a konečně samotné značení. Tato práce se věnuje především různým způsobům značení zmíněného PSMA – 617 pomocí  $^{161}\text{Tb}$ .

# Teoretická část

## 2 Nukleární medicína

Nukleární medicína je lékařský obor, který se zabývá diagnostikou a léčbou nádorových i nenádorových onemocnění (například nukleární kardiologie). Využívá k tomu otevřené radioaktivní zářiče, které jsou ve formě radiofarmaka podávány pacientům. [4,8]

### 2.1 Diagnostika

V dnešní době existuje celá řada přístrojů, které se využívají k zobrazování v nukleární medicíně. Daly by se rozdělit podle typu detekovaného zařízení - na gamakamery (SPECT), PET a hybridní přístroje, které kombinují jeden z dříve uvedených nukleárně medicínských přístrojů a přístroj s morfologickou zobrazovací modalitou (CT, MR). [4, 8, 32]

#### 2.1.1 PET

Vyšetření PET probíhá pomocí nepohyblivých kamer, které najednou snímají 360° kolem pohyblivého lůžka. Pro snímání se využívají radiofarmaka, které emitují pozitron. Pozitron po anihilaci s elektronem emituje dva gama fotony, o energii 511 keV, které vyletují v svírají úhel 180°. Díky času a poloze, ve které byla částice detekována lze přesně určit místo anihilace, kde došlo k zadržení radiofarmaka. [4,8]

V současné době se využívá nejvíce  $^{18}\text{F}$ -FDG. Toto radiofarmakum se chová podobně jako glukóza a ve zvýšené míře se hromadí v místech nádoru a jeho metastázách. Jeho nevýhodou je však nižší specificita. [4, 8, 11]

Scany PET samy o sobě obecně neposkytují žádné informace o morfologii a nedostatečné množství informací o poloze nálezu. Proto je velmi vhodné kombinovat PET s jiným přístrojem, který tyto informace poskytuje. Z tohoto důvodu se téměř výhradně využívá kombinace PET/CT. Pro zvýšení přesnosti snímků se provádějí další, převážně počítačové korekce, jako například navigační kříž, korekce na zeslabení nebo překrytí snímků. [4,8]

#### 2.1.2 SPECT

Na základě zobrazovací modality může SPECT poskytnout dvojrozměrný nebo třírozměrný obraz distribuce radiofarmaka uvnitř pacienta. Funguje velmi podobně jako zmíněné PET. Hlavní rozdílem je, že SPECT detekuje emise gama záření, kdežto PET detekuje pozitrony. Jak již bylo zmíněno, při PET se detekují výhradně fotony o energii 511 keV, pro SPECT zobrazování mohou být použity fotony o různých energiích. Příkladem může být  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $E = 140 \text{ keV}$ ) nebo  $^{123}\text{I}$  ( $E = 159 \text{ keV}$ ), které se potencionálně dají využít současně pro

diagnostiku například Parkinsonovy choroby. Dalším rozdílem je, že gama kamery se pohybují okolo pacienta, který nehybně leží. [4, 8, 32,48]

## 2.2 Radiofarmaka

Definice radiofarmak je dána zákonem jako „radiofarmaka, kterými se rozumějí léčivé přípravky, které, jsou-li připraveny k použití, obsahují 1 nebo více radionuklidů (radioaktivních izotopů) včleněných pro lékařský účel“ [31]

Využívají takzvaného „stopovacího (indikátorového) principu“, který objevil maďarský radiochemik György Hevesy. Ten spočívá v tom, že látka se v těle chová stejně i v případě, že jeden z jejích atomů je nahrazen jeho radioaktivním izotopem. Tento princip funguje díky tomu, že vazby jsou navazovány molekulou pomocí atomového obalu, který je pro jednotlivé izotopy stejný.

Obecně se radiofarmakum dá rozdělit na biologicky aktivní složku, u které známe její farmakokinetiku a na složku radioaktivní, kterou představuje zvolený radionuklid s různým druhem záření, poločasem rozpadu a energií částic, v závislosti na tom, zda jsou určeny pro terapii nebo diagnózu.

Biologicky aktivní složku může představovat téměř cokoli, od jednoduché anorganické molekuly až po složité organické molekuly, či dokonce buňky. Radioaktivní složka je radionuklid, který se přeměňuje obvykle na stabilní izotop.

Na rozdíl od běžných farmakologických substancí nestačí radiofarmakům pouze chemická čistota, ale musí splňovat i radionuklidovou a radiochemickou čistotu. Radionuklidová čistota představuje přítomnost pouze zvoleného radionuklidu, radiochemická čistota představuje přítomnost radionuklidu pouze ve zvolené formě. [4,8]

### 2.2.1 PRRT

Jedná se o typ cílené radionuklidové terapie, které využívá terapeutické peptidy označené radionuklidem. Tyto terapeutické peptidy se primárně selektivně vážou na receptory na rakovinových buňkách. Navázaný radionuklid může svým zářením způsobit rozbití primárně jednoho řetězce dvoušroubovice DNA, to následně může vést k úmrtí buňky. Smrt buňky může nastat i jinými mechanismy, například pomocí „Bystander effect“ (efekt přihlížejících). Nejčastěji je využíván pro NET, jako radionuklid se potom používá  $^{177}\text{Lu}$ . [8, 35,47]

### 2.2.2 TAT

Jedná se o další typ terapie, které využívají radionuklidy, které emitují záření alfa. Při radioterapii je vhodné, aby zvolný radionuklid měl co největší LET, tzn. aby předal co nejvíce své ionizující energie na jednotku dráhy. Z uvedené tabulky v další kapitole (tab.1) je zřejmé, že tuto kvalitu má právě záření alfa, které také díky svému krátkému dosahu méně poškozuje zdravou tkáň v okolí místa působení. [15,20]

### 2.3 Volba radionuklidu

Tabulka 1: Charakteristika vybraných radioaktivních částic [15]

Radioaktivní částice	Energie rozpadu	Dosah v tkáni	LET [keV/ $\mu$ m]
$\beta^-$	50-2300 keV	0,05-12 mm	0,2
Augerovy elektrony	0,2-200 keV	2-500 nm	4-26
$\alpha$	5-9 MeV	40-100 $\mu$ m	80

Při volbě vhodného radionuklidu záleží na konkrétním tumoru, jeho velikosti, zda-li metastázuje atd. Z těchto důvodů jsou pro středně velké tumory účinné radionuklidy s  $\beta^-$  přeměnou. Naopak pro mikrotumory jsou velmi neefektivní, neboť svoji energii uvolňují postupně, a to i do okolní zdravé tkáně. Používají se například pro karcinom prostaty. [15]

Augerovy elektrony mají vyšší hodnotu LET, ale mají také kratší dosah, proto musí být doručeny přímo do konkrétní buňky, nejlépe až k DNA. Studie s nimi jsou značně omezené, ovšem existují podklady z testů na potkanech, kdy se povedlo prokázat remisi u rakoviny slinivky.

Jak bylo již zmíněno, alfa záření má obecně vysoké LET a krátký dosah. Díky těmto kvalitám se jedná o perfektní zdroj IZ pro mikrotumory. Další výhodou je, že nezáleží na cyklu buňky (např. některé sloučeniny emitující Augerovy elektrony zabíjí buňky jen v s-fázi) ani na množství kyslíku (kyslík obecně výrazně přispívá sekundárním reakcím – nepřímý účinek IZ). Poškození DNA je obvykle na obou řetězcích, a proto je pro buňku daleko těžší poškození opravit. Je odhadováno, že pro buněčnou smrt s pravděpodobností 99,99 % pomocí  $\beta^-$  přeměny, by bylo potřeba několik desítek tisíc rozpadů, oproti tomu by pro stejný účinek bylo potřeba jen několik alfa rozpadů. Pro preklinickou i klinickou praxi již byla TAT použita na celou řadu nádorů příklad na některé druhy nádorů mozku. [15, 43]

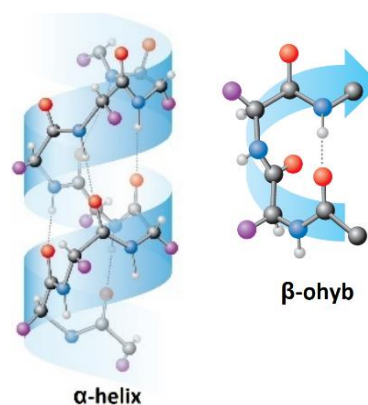
## 3 Biologicky aktivní peptidy

### 3.1 Struktura

Peptidy se skládají z aminokyselinových zbytků, které jsou spojeny peptidovou vazbou. Rozdělujeme je obecně na oligopeptidy (2-10 aminokyselin), polypeptidy (10-100 aminokyselin) a pokud je spojeno více jak 100 aminokyselin, hovoříme o proteinech (polypeptidech). Hranice, zda se jedná ještě o peptid nebo o už protein jsou trochu nejasné, některé literatury totiž uvádí, že více než 50 aminokyselin je už protein. Jiné definice zavádí taky pojem „mini proteiny“, které se obecně charakterizují hmotností 1-10 kDa.

Přesněji lze rozdělit proteiny a peptidy podle jejich prostorového uspořádání. Proteiny mají přesné prostorové uspořádání v každém jednotlivém ohybu vazeb, což definuje jejich torzní úhly a tvoří jejich sekundární strukturu. Peptidy mohou mít částečně přesně dané uspořádání v prostoru, ale kvůli své kratší délce mají méně možností vytvořit intramolekulární vazby. Lineární peptidy obecně nemají přesně definovanou geometrii a jsou poměrně flexibilní.

Zmíněná sekundární struktura popisuje uspořádání blízkých aminokyselin například pravotočivá šroubovice ( $\alpha$ -helix) nebo  $\beta$ -ohyby. [14, 22, 23]



Obrázek 1: Ukázky sekundárních struktur [40]

### 3.2 Cyklické peptidy

V roce 2013 bylo pouze kolem 40 cyklických peptidů použito jako schválená farmaka. Obvykle ani samotné peptidy nejsou požívány jako léčiva, spíše se využívají nové chemické entity (~90 %), které jsou obvykle malými molekulami a splňují Lipinského pravidla pěti. Tyto pravidla se týkají molekulové hmotnosti, vodíkových donorů a akceptorů. Peptidy mají spojeny aminokyseliny peptidovou vazbou, která podléhá v těle hydrolýze vlivem proteázy. I přesto ale vzrůstá zájem o vyvíjení nových léčiv založených na cyklických peptidech. Nabízejí totiž potencionálně nové možnosti, neboť jsou stále méně probádaným oborem, hlavně co se týká využití jejich struktury. Bylo totiž zdokumentováno, že cyklické peptidy podléhají této degradaci méně než lineární peptidy. V několika případech byla také prokázána jejich lepší membránovou propustnost, díky čemuž je možné je lépe absorbovat v těle. [22]

### 3.3 Peptidické hormony

Životní styl obecně ovlivňuje zdraví. Předpokládá se, že až 2/3 rakovin u žen a 1/3 rakovin u mužů je způsobena životním stylem. Tato statistika se týká především čtyř nejobvyklejších rakovin: prsu, prostaty, dělohy a vaječníků. Předpokládá se, že rakoviny způsobené hormony zodpovídají za 30 % všech typů rakovin v USA. Podle studií, které byly provedeny na zvířatech nebo i na lidech (v rámci epidemiologické a endokrinologické studie), hormony zodpovídající obvykle za normální růst orgánů zároveň vytváří vhodná prostředí pro neoplastickou transformaci. Neoplastická transformace je sled událostí, které vedou k tomu, že ze zdravé buňky se stane rakovinová buňka. Epidemiologické studie také naznačují, že hormony mohou způsobovat i rakoviny varlat, štítné žlázy a osteosarkom, tedy rakovinu kostí. Výše zmíněné nejčastější rakoviny jsou způsobeny především estrogenem a testosteronem, tedy pohlavními endokrinními hormony. [25, 26, 27, 29]

#### *Estrogen*

Zvýšená míra estrogenu byla potvrzena u několika žen v rané fázi rakoviny dělohy. Tento předpoklad byl potvrzen také testy na zvířatech. Dále ho potvrzuje i epidemiologická studie, ze které vyplývá, že obézní ženy jsou náchylnější k rakovině dělohy. Bylo potvrzeno, že cirkulace estrogenu v těle ženy závisí na hmotnosti jedince.

#### *Testosteron*

Rakovina prostaty je druhá nejčastěji se vyskytující rakovinou u mužů v USA. Přesný mechanismus vzniku není uspokojivě objasněn, nicméně je předpokládáno že, pokud testosteron a jeho metabolický produkt DHT, které jsou za normálních podmínek zodpovědné za zdravý růst prostaty, jsou po desítky let zvýšené, vede to k rakovině prostaty. Předpoklad vyplývající z těchto studií, že testosteron je zodpovědný za karcinom prostaty, podporuje i fakt, že vykastrování jedinci trpí touto nemocí jen ojediněle. [25, 26, 27, 29, 30]

#### *Oxytocin*

Oxytocin je hormon, který se běžně nachází v těle. Způsobuje stahování některých svalů, díky tomu má vysokou sekreci při porodu. Mimo jiné se mu přezívá hormonem štěstí a lásky. V řadě nádorů byly popsány oxytocinové receptory. Ty mohou být využity do zmíněného stopovacího principu (kapitola 2.2.1), kdy radioaktivně značená DOTA je navázaná na obdobu oxytocinu. V rámci jedné studie bylo připraveno <sup>111</sup>In – DOTA – dLVT, které se účinně a selektivně zachytilo na oxytocinových receptorech v nádorech u myši. [23,28]



### *Inzulín*

Společná práce vědců minulého století vedla k řadě objevů týkající se inzulínu. Primárně byl studován pro zlepšení kvality života lidem postižených cukrovkou. V současné době se na inzulín nahlíží i jako na neinvazivní prostředek pro studium nemocí, díky jeho využití jako sondy pro SPECT. Tato teorie byla vyzkoušena na analogu inzulín, který byl označen  $^{99m}\text{Tc}$ . [24, 29]

### *Bombesin*

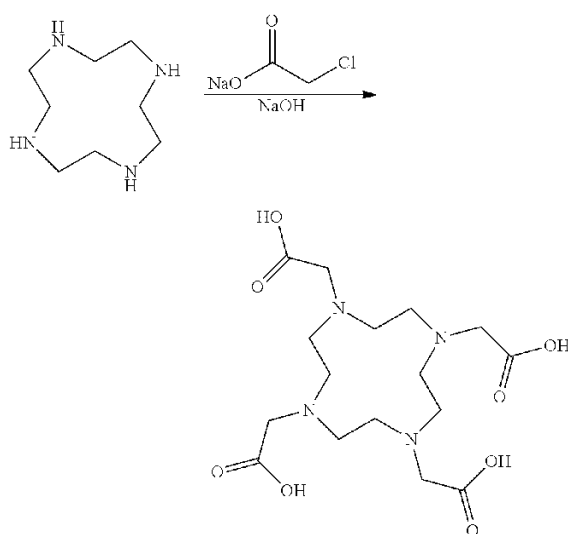
Jedná se neurohormonální polypeptid, který je pozůstatkem po obojživelnících. Má několik míst účinku v těle – mozek, plíce a trávicí trakt. Hlavně v trávicím traktu reguluje uvolňování hormonů a jeho pohyb. Peptidy strukturně podobné bombesinu regulují také pocit sytosti nebo termoregulaci. Poslední dobou se objevují výzkumy, které spojují roli bombesinu s růstem nádorů. Některé analogy byly použity pro zobrazování NET tumorů, díky tomu že označený bombesin se vázal na specifické receptory. Příklad takového radiofarmaka je  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-[Lys<sup>3</sup>]bombesin.[41, 42]

## 4 Oligopeptidy

### 4.1 DOTA

DOTA je významným chelatačním činidlem, které se hojně využívá v radiofarmacii. Funguje jako nosič konkrétního kovového radionuklidu, který se naváže do jeho struktury a vytváří komplex. Používá se převážně pro komplexy lanthanoidů. DOTA vykazuje vysokou termodynamickou stabilitu a ve fyziologických podmínkách má inertní kinetiku.

Její systematicky název je kyselina 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrayl)-tetraoctová, její triviální název DOTA je zkratka anglického systematického názvu. Je možné ji připravit několika způsoby, nejobvyklejším je syntéza pomocí halogenoctové kyseliny a anorganické báze (typicky hydroxid sodný), které se nechají zreagovat s cyklenem. Takto připravená DOTA obsahuje zbytky organických sloučenin. Pro dosažení větší čistoty se zbavuje nečistot například krystalizací. [2,5]



Obrázek 2 Příprava DOTA z cyklu [5]

### 4.2 DOTATOC

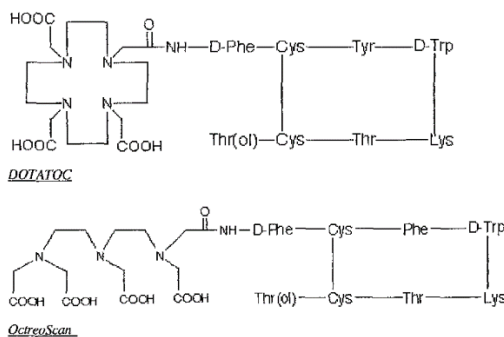
DOTATOC je jeden z cyklických peptidů, nesoucí chelátor DOTA, konkrétně H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH. Používají se pro léčbu neuroendokrinních nádorů.

Neuroendokrinní nádory (NET) jsou vzácná, pomalu rostoucí skupina nádorů. Vycházejí z neuroendokrinního systému, který produkuje peptidové hormony, bioaktivní aminy atd. NET jsou schopny vychytávat a dekarboxylovat prekurzory aminů, jako jsou například

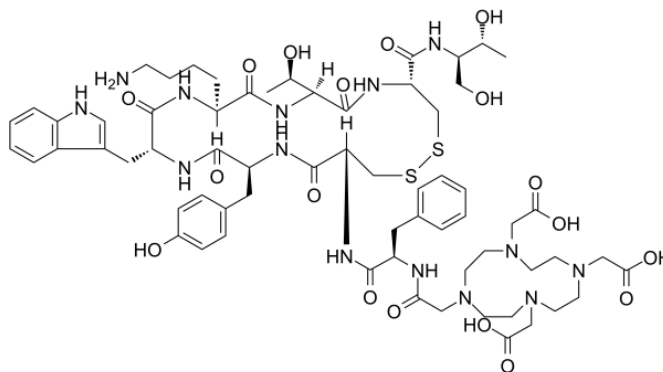
dopamin a serotonin. Vyskytují se převážně v žaludku, střevech, plicích a slinivce břišní. Základem pro jejich diagnostiku a terapii je jejich nadměrná exprese somatostatinových receptorů na nádorových buňkách.

Studie z roku 1997 s NET prokázaly lepší zobrazovací schopnosti  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC oproti dříve používanému  $^{111}\text{In}$ -octreotide (obchodním názvem OctreoScan, neboli česky pentetretid). Chelátem tohoto dříve používaného radiofarmaka není DOTA, ale PTDA. DOTATOC se rychleji vázala na hledaný nádor a bylo tak možné provést PET scany po 1 hodině od aplikace, u octerotide byly scany provedené po 4 a poté 18-24 hodinách po aplikaci. Díky těmto schopnostem se začalo  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC hojněji používat pro NET. Jiná studie z roku 2010 porovnávala stabilitu navázané DOTA vs. DTPA na Gd. Výsledkem byla stabilitní konstanta  $10^{28}$  pro Gd(DOTA) a  $10^{22}$  pro Gd(PDTPA). Dle autorů je DOTA extrémně stabilní, i když potřebuje delší čas na navázání. [7, 9, 10, 17, 48]

Podle studie z roku 2017 většina tohoto radiofarmaka byla podána v rámci klinické praxe (ne klinické studie), velká část článků publikovaná na toto téma je tedy neobjektivní. I přesto se autoři shodli že výsledky jsou konsistentní a je tím pádem možné konstatovat, že  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC je bezpečné, efektivní a účinnější než dříve používané  $^{111}\text{In}$ -octreotide. [7,9,10,17]



Obrázek 3: Struktura DOTATOC a pentetretidu [10]

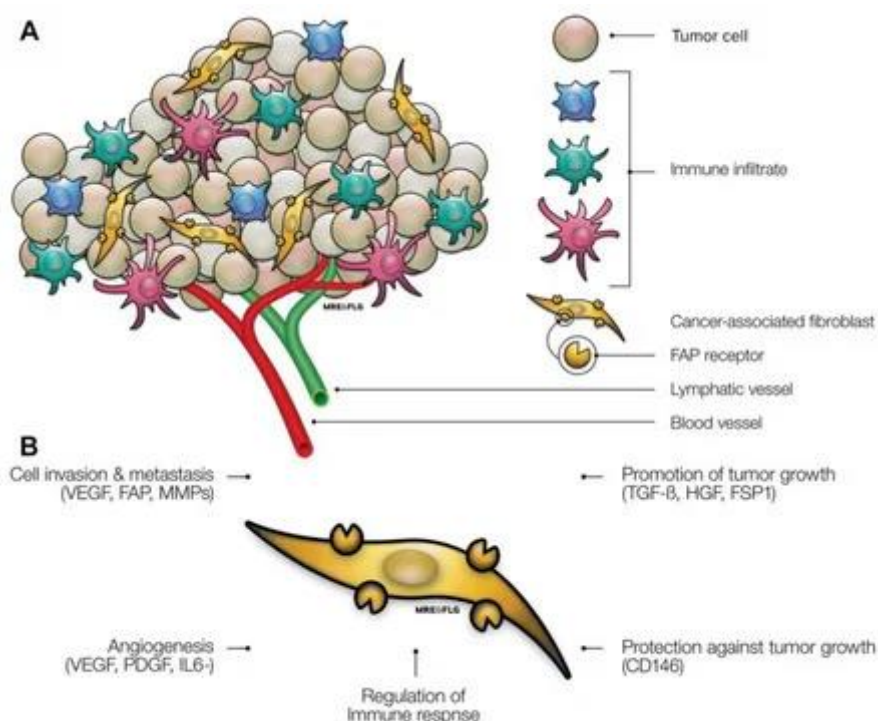


Obrázek 4: Strukturální vzorec DOTATOC [37]

### 4.3 FAPI

Aby mohl tumor růst, potřebuje si vytvořit své vlastní mikroprostředí, které se nazývá stroma. Toto prostředí poskytuje mechanickou ochranu samotnému tumoru a obsahuje živiny potřebné pro jeho růst. Stroma se tedy podílí na růstu tumoru a metastázách. Ve stromě se nacházejí CAF, tedy fibroblasty typické pro rakovinu, které se aktivují například hypoxií. Během aktivace začínají exprimovat několik povrchových markerů, mezi které patří i FAP.

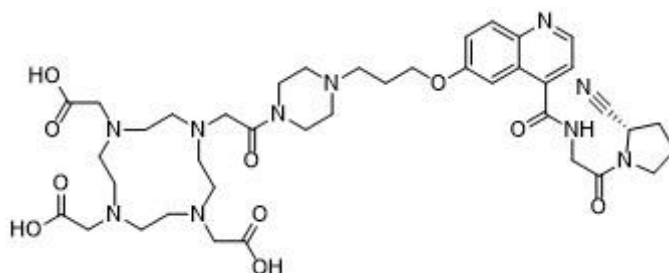
FAP je v současné době nejspecifičtějším regulovaným proteinem a můžeme ho nalézt u více než 90 % epitelových nádorů.



Obrázek 5: A) tumor a jeho stroma B) Funkce CAF [11]

Jak jsem již psala výše u PET skenů (kap. 2.1), v současné době je pro ně nejpoužívanější  $^{18}\text{F}$ -FDG. Tento radiotracker má i řadu nevýhod, mezi nimi jsou asi nejdůležitější jeho nespecificita a fakt, že není vhodný pro lidi s cukrovkou. Na rozdíl od toho  $^{68}\text{Ga}$ -FAPI je možné podat i těmto pacientům, navíc před vyšetřením není nutné držet dietu. Je možné použít i  $^{18}\text{F}$  na označení FAPI, konkrétně například FAPI-74, díky čemuž je možné snížit náklady na výrobu. Co se týče zmíněné specificity, z několika studií vyplývá vyšší přesnost FAPI oproti FDG u rakovin močové měchýře, sarkomu (tedy rakoviny

pojivových tkání), rakovin prsou, plic a dalších. Podobnou specifitu má pro například rakovinu prostaty, naopak vyšší přesnost vykazuje FDG při snímání například rakoviny lymfatického systému.



Obrázek 6: FAPI-02 [38]

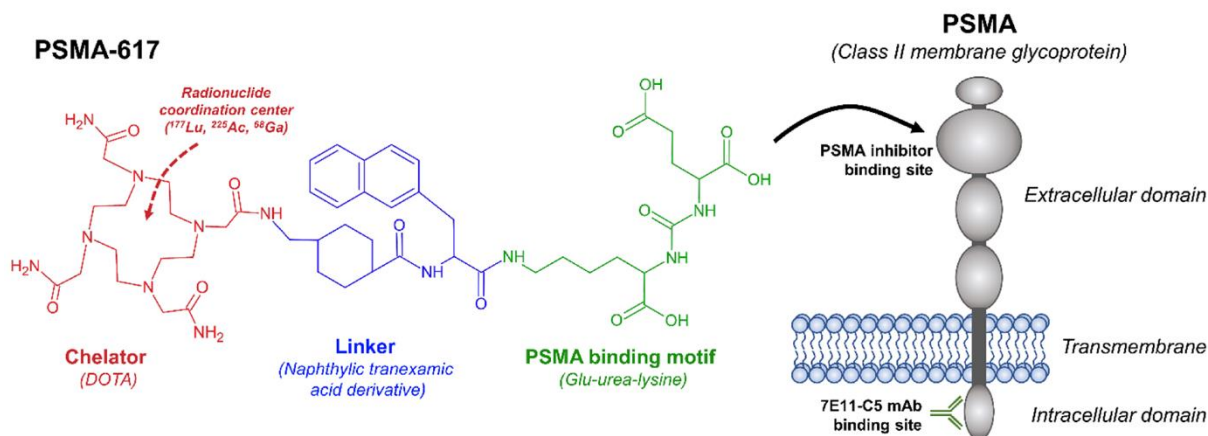
Aktivované fibroblasty se nacházejí i mimo nádorové stroma, například ve zjizvených útvech (ischemická tkáň po infarktu myokardu) nebo u chronických zánětů (revmatoidní artritida, Crohnova nemoc). Díky tomu se na ně může vázat FAPI. Je důležité být si toho vědom, pro správné čtení PET snímků, zároveň to otevírá potencionálně nové možnosti léčby těchto onemocnění. [11]

#### 4.4 PSMA

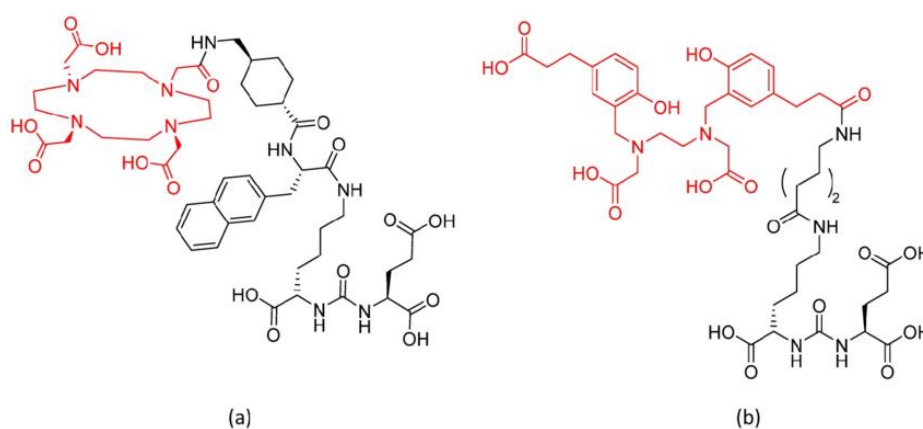
Zkratka PSMA představuje prostatický specifický membránový antigen. Nachází se i v několika dalších tkáních kromě prostaty, například v ledvinách, tenkém střevu a slinných žlázách. Při karcinomu prostaty má výrazně zvýšenou koncentraci právě v jeho místě, oproti ostatním tkáním. Je to způsobené nadměrnou produkcí PSMA u asi 90 % karcinomu prostaty, kdy má koncentraci až 1000x vyšší, oproti ostatním tkáním za normálních podmínek. [1,3,6,19]

Existuje řada inhibitorů PSMA, ovšem nejvyšší afinitu na PSMA mají ligandy na bázi močoviny. Nejpoužívanějším je pak PSMA-HBED-CC, známý také jako PSMA-11, mezi další používané patří PSMA - 617. Inhibitor lze označit vhodným radionuklidem a aplikovat pacientovi ať už pro diagnostiku nebo terapii.

Jak již bylo naznačeno v kapitole radiofarmaka (2.2), aplikovaná látka se skládá z chelátu, který do sebe váže vhodný radionuklid, bioaktivní látky, v tomto konkrétním případě inhibitoru, který se specificky váže na PSMA a linkeru, který je spojuje. [1, 3, 6, 12, 19]



Obrázek 7: Struktura PSMA 617 se zvýrazněným chelátem (červeně) spojovacím elementem (modře) a samotným inhibitorem PSMA (zelená) [1]



Obrázek 8: (a) PSMA-617, (b) PSMA-11, obě jako struktury včetně linkeru a chelátu [3]

#### 4.5 VEGF

Jde o vaskulární endotelový růstový faktor, který je zodpovědný za podporu vzniku krevní cévy. Tomuto procesu se říká angiogeneze. Z normálních okolností tento proces nastává při embryonálním vývoji, nebo při poranění, kdy tělo opravuje současný cévní systém. Hodnota VEGF je značně zvýšená při nádorovém onemocnění.

Napomáhá vývoji nových cév, které pak nádor zásobují. Při navázání radionuklidu na jejich inhibitory se dají použít jak k terapii, tak i k diagnostice. Díky nim je možné posuzovat i průběh léčby nebo agresivitu nádoru.

Tento faktor je zvláště zajímavý, protože jak je známo, nádor potřebuje být připojen na krevní řečiště, samotnou jeho inhibicí se tedy zamezuje nádoru, aby se rozšiřoval, případně může způsobit apoptózu. V kombinaci s navázáním na radionuklid může jít tedy potencionálně o velmi účinnou terapii. Toto je obecný princip antiangiogéní terapie (AAT). [18]

## 5 Terbium

Terbium je relativně tvrdý kov stříbrné barvy z řad lanthanoidů, objeven v roce 1813 Švédem Carl Gustafem Mosanderem. Na vzduchu je spíše stabilní i při vystavení vyšším teplotám. Je nerozpustný v kyselině fluorovodíkové, neboť při kontaktu na povrchu vznikne ochranná vrstva fluoridu terbitého, kromě toho ale reaguje se zředěnými kyselinami.

Terbium má protonové číslo 65 a řadu izotopů. Velká část z nich má poločas rozpadu menší, než 1 sekundu, další pak v řádu několika málo vteřin nebo minut. Pro radiofarmakologii jsou ale zajímavější spíše izotopy s poločasem rozpadu kolem půl hodiny (pro diagnostiku) anebo kolem 7 dní (pro terapii). Zároveň by se ale izotopy používané v lékařství měli rozpadat na stabilní prvek. Má jeden stabilní izotop, a to s nukleonovým číslem 159. [12, 13]

### 5.1 Tb – 161

Terbium 161 bylo poprvé pozorováno v roce 1949 Alanem Butementem. Bylo připraveno ozařováním přírodního gadolinia pomocí neutronů. Tím vznikalo  $^{161}\text{Gd}$ , které se s poločasem 218 s rozpadá na terbium 161 pomocí beta přeměny. Vzniklé  $^{161}\text{Tb}$  se se rozpadá ze 100%  $\beta^-$  přeměnou o energii 134 keV, kromě toho emituje Augerovy elektrony (přibližně 12 elektronů o energii 36 keV na jeden rozpad), a gama záření o nízkých energiích (45,3- 74,6 keV). Gama záření o těchto energiích je vhodné na SPECT. [33, 34, 39]

Jeho poločasem je 6.75 dne a rozpadá se na  $^{161}\text{Dy}$ , které je stabilní. Jak už v této práci bylo několikrát zmíněno, poločas kolem 7 dní a rozpad na stabilní prvek jsou hlavní předpoklady pro výběr k terapii pro radiofarmaka, proto se o  $^{161}\text{Tb}$  začalo uvažovat, jako o vhodném prvku pro toto použití.

V současné době se stále připravuje ozařováním neutrony, ale ozařuje se obohacené  $^{160}\text{Gd}$ , neboť přírodní obsahuje i izotop  $^{158}\text{Gd}$ , které po ozařování vede na stabilní  $^{159}\text{Tb}$  a tím pádem snižuje výtěžek a specifickou aktivitu produktu. [12, 13]

### 5.2 Ostatní izotopy terbia

#### Terbium – 149

Ke konci 90. let bylo doporučeno pro TAT. Částečně emituje alfa záření (16,7 %, energie 3,98 MeV), ale většina jeho rozpadů probíhá pomocí elektronového záchytu a pozitronové emise (83,3 %, energie 720 keV). Jeho dceřiné produkty se alfa přeměnou prakticky nevyzařují, což by zaručuje větší bezpečnost pro pacienta. Jeho poločas je 4,1 h.

Předklinické studie na myších s leukémií ukázaly slibné výsledky, ale získání radiochemicky čistého  $^{149}\text{Tb}$  se ukázalo jako velmi komplikované. [16]

Terbium – 152

Rozpadá se s poločasem 17,5 hodiny převážně pomocí  $\beta^+$  přeměny (20,3 %) nebo elektronového záchytu (79,7 %), ale též může podléhat vzácné alfa přeměně. Při svém rozpadu produkuje gama záření a rentgenové paprsky, což jej činí vhodným pro diagnostiku pomocí PET/CT. Klinická studie s  $^{152}\text{Tb}$ -DOTATOC prokázala možnost jeho budoucí aplikace. [17,44]

Terbium – 155

Podobně jako i dříve zmíněné izotopy terbia i Tb-155 je podobné Luteciu. Tento konkrétní izotop má poločas 5,32 d a rozpadá se elektronovým záchytem tentokrát přímo na stabilní Gd-155. Emituje Augerovy elektrony, rentgenové paprsky a gama záření o takových energiích, které ho dělají vhodným radionuklidem pro SPECT. [36,45]

Každý z těchto izotopů terbia má své specifické vlastnosti, které umožňují jejich využití v terapii nebo diagnostice rakoviny a dalších onemocnění.



## 6 Srovnání Terbia – 161, Yttria – 90 a Lutecia – 177

Dlouhodobě se pro léčbu NET pomocí PRRT používá  $^{177}\text{Lu}$  – DOTATATE a jeho obdoby, které se obecně považují za bezpečné. Největšímu riziku jsou vystaveny ledviny (hlavně při administrování léčiva) a kostní dřev. Z dlouhodobého pozorování vyplývá, že u 1-2 % pacientů se projeví leukémie a myelodysplastický syndrom (porucha krvetvorby).

Z těchto důvodů se začali hledat alternativy pro efektivnější léčbu bez zatěžování okolních orgánů. V rámci jedné studie tedy bylo testováno 807 pacientů s NET, bylo jim administrováno lutecium – 177 (pro porovnání), yttrium – 90 a terbium – 161 (jako alternativy). Pacienti, kterým bylo podáno  $^{90}\text{Y}$ -octreotide utrpěli poškození ledvin a kostní dřevě jak pacienti s  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE. Je to pravděpodobně protože yttrium 90 emituje  $\beta^-$  částice o vyšší energii a tím pádem delším dosahu.

Při porovnání  $^{161}\text{Tb}$  a  $^{177}\text{Lu}$  narazíme hned na několik podobností. Oba jsou to lanthanoidy, tím pádem mají podobné chemické vlastnosti. Oba také emitují  $\beta^-$  částice. Ty emituje i zmíněné yttrium, a přesto se ukázalo jako nevhodná alternativa, hlavně kvůli tomu, že emituje beta částice delšího dosahu, a tím zasahuje i zdravou tkáň kolem. Dosah  $^{161}\text{Tb}$  je podobný jako ten  $^{177}\text{Lu}$ . Navíc terbium ještě emituje Augerovy elektrony, které by měli posílit terapeutický účinek s nižší celkovou dávkou. Ze zmíněné studie vyplývá, že při použití  $^{161}\text{Tb}$  byla méně zasažena kostní dřev. [33,34]

# Experimentální část

## 7 Experimenty

### 7.1 Použité přístroje

Pro pokusy byl použit přístroj Microwave Synthesis Reactor – Monowave 200. Dále pak iTLC - SG destičky, které byly vyhodnoceny přístroji Bioscan AR-2000 Imaging Scanner (Canberra Packard) v programu WinScan ver 3.13. Dále byl použit pH metr a přístroj na výrobu superčisté vody. Pro měření aktivity byl použit Curiometr 3 (PTW)

### 7.2 Použité chemikálie

Pro pokusy byla použita kyselina octová p.a. (VWR Chemicals), kyselina chlorovodíková p.a. (VWR Chemicals), methanol p.a. (VWR Chemicals), octan amonný p.a. (Sigma-Aldrich) askorbový pufr, octan sodný bezvodý p.a. (Sigma-Aldrich) a dimethylsulfoxid p.a. (Lach-Ner). Terapeutický ligand PSMA – 617, který byl poskytnutý Dr. Martinou Benešovou. Pro měření pak plyny argon, methan a izobutan pro vytvoření inertní atmosféry (Linde Gas).

Zásobní roztok  $^{161}\text{Tb}$  byl připraven na Katedře jaderné chemie Ing. Terezou Jánskou a Bc. Matějem Štíbrem pod vedením doc. RNDr. Jánem Kozemplem.

### 7.3 Značení PSMA – 617 na termobloku

PSMA bylo již připraveno o koncentraci 1 mM, bylo tedy potřeba ho zředit. Byl odebrán 1 ml tohoto vzorku a bylo k němu přidáno 9 ml DMSO. Pro samotnou přípravu vzorku bylo odpipetováno 200  $\mu\text{l}$  0,5 M octanu amonného do mikrozkušavky Eppendorf 1,5 ml. K tomu bylo přidáno 1000  $\mu\text{l}$  0,05 M ultra čisté kyseliny chlorovodíkové. Do roztoku bylo následně přidáno potřebné množství PSMA podle tabulky uvedené níže, pro vytvoření roztoků o určitých poměrech. Ke všem roztokům bylo následně přidáno takový objem roztoku  $^{161}\text{TbCl}_3$ , aby aktivita vzorku byla 50 MBq. Odebranému terbiu byla tedy změřena aktivita a bylo zředěno. Podle aktivity a objemu vzorku bylo dopočítáno, že pro den měření bylo třeba odebrat 1,9  $\mu\text{l}$ . Toto množství terbia bylo přidáno do všech vzorků pro měření.

Tabulka 2: Molární poměry terbia a PSMA, odpipetované množství 0,1 mM PSMA

Poměr $^{161}\text{Tb}$ : PSMA	5	15	35
Množství PSMA [ $\mu\text{l}$ ]	3,7	10,7	21,4

Vzorky vloženy na termoblok po dobu 10 minut při teplotě 95°C a mírně míchány.

#### 7.4 Značení DOTA

DOTA byla označena terbiem o aktivitě 5MBq v molárním poměru 1:35. Bylo označeno obdobným způsobem, jak je uveden v sekci 7.3. Tedy roztok byl pufrován pomocí octanu amonného o koncentraci 0,5M a při pH 4,5. Bylo odpipetováno 2,5  $\mu\text{l}$  DOTA, 20,50  $\mu\text{l}$  pufru a 2,0  $\mu\text{l}$   $^{161}\text{Tb}$  (Celková aktivita 2 MBq). Celkový objem reakční směsi byl přibližně 25  $\mu\text{l}$ .

#### 7.5 Značení PSMA – 617 v mikrovlnném reaktoru

Pro značení vzorků v mikrovlnném reaktoru byly vzorky připraveny stejným způsobem jako v sekci 7.3. Místo vložení na termoblok byly ale převedeny do speciálních zkumavek do mikrovlnného reaktoru. Zkumavky byly uzavřeny a vloženy do zmíněného zařízení opět na 10 minut, zahřívání bylo nastaveno na 95°C.



Obrázek 9: Speciální zkumavky do mikrovlnného reaktoru s uzávěry a Mikrovlnný reaktor monowave 200 od Anton Paar

#### 7.6 Měření na iTLC-SG destičkách

Pro zjištění výsledků označení byla většinou použita metoda TLC. Na iTLC - SG destičku bylo odpipetováno malé množství vzorku, v případě že se experiment prováděl v aktivních laboratořích byla použita pipeta, při zahřívání v mikrovlnném reaktoru se ale často pracovalo v neaktivních laboratořích. Původně měly být použity typy pipety pro odebrání vzorku, to ale vzhledem k tvaru zahřívací nádoby nebylo možné a byly použity kapiláry. V aktivních laboratořích byly použity pipety a byly odebrány 3  $\mu\text{l}$  vzorku. Na destičce byla vyznačena

tečka 1 cm od začátku destičky, celá destička měla 8 cm. Na tečku byl nanesen vzorek a následně byla destička ponechána vyvíjet v prostředí mobilní fáze. Jako mobilní fáze byl zpravidla použit 0,1 M octan amonný s methanolem v poměru 1:1. V jedné sérii měření byl použit octan amonný o koncentraci 0,5M. Destička tak zůstala, dokud se mobilní fáze nedostala přibližně 1 cm od jejího horního ohraje. V mezičase bylo připraveno asi 40 cm tlusté lepicí pásky, odštířena byla položena na stůl lepicí stranou vzhůru. Následně byla pinzetou vytažena a vložena několik centimetrů od konce na připravenou izolepu a druhým koncem přikryta. Nadbytečné kusy lepicí pásky byla odštířena do požadovaného tvaru. Takto připravené vzorky byly popsány a změřeny.



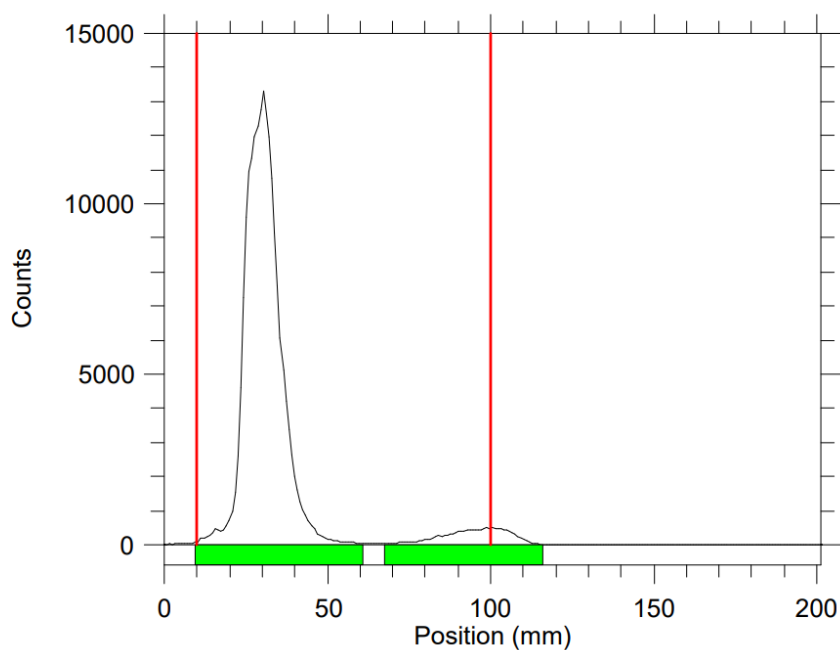
*Obrázek 10: iTLC - SG destička v mobilní fázi a Připravené vzorky k měření*

Samotné měření spočívalo v přilepení vzorků Bioscan a povolení ventilu zabezpečení přísunu plynů. Po zapnutí ovládacího programu a nastavení parametrů byly vzorky proměřeny automaticky.



Obrázek 11: Měřicí přístroj Bioscan

Při vyhodnocování výsledků se neoznačené terbium s mobilní fází nepohybovalo a zůstalo na začátku destičky. Aktivita, naměřena dál od místa nanesení vzorku odpovídala množství přítomných molekul s terbiem. Měřila se tedy aktivita terbia, které zůstal na začátku destičky, ku navázanému terbiu. Tento výsledek byl udán v procentuálním zastoupením jako „% ROI“.



Obrázek 12: Ukázka grafu z výsledného protokolu

## 7.7 Závislost označení PSMA na době zahřívání

Roztok byl připraven obdobným postupem, jak je uvedeno výše (sekce 7.4). Experiment byl opakován při různých poměrech a aktivitách, pro přehlednost je tedy uvedena aktivita, poměry a množství odpipetovaných chemikálií v tabulce níže.

Tabulka 3: Množství chemikálií a další informace k jednotlivým sériím pokusů

série	1	2	3	4	5
Poměr $^{161}\text{Tb}$ : PSMA	1:25	1:25	1:50	1:50	1:500
A [MBq]	5	5	5	50	50
V(PSMA) (0,01 mM) [ $\mu\text{l}$ ]	18,03	18,03	36,05	360	3600
NaOAc (0,5 M) [ $\mu\text{l}$ ]	200	200	200	200	100
HCl (0,05 M) [ $\mu\text{l}$ ]	1000	1000	1000	1000	500
$^{161}\text{Tb}$ [ $\mu\text{l}$ ]	5,61	8,35	8,35	42,02	42,10

Pro koncentraci 0,01mM PSMA bylo třeba ho opět naředit, k ředění se používalo DMSO. Při 4 a 5 měření by v reálu použity původní roztoky o koncentraci 0,1 a 1 mM PSMA, tím pádem se pipetovalo 36 $\mu\text{l}$ . Pro přehlednost tabulky byly ale ponechány přepočítané hodnoty tak, aby měli všechny stejnou koncentraci.

Roztoky připravené podle této tabulky byly vždy zahřáty v mikrovlnném reaktoru při teplotě 95°C. Z roztoků byly odebrány vzorky v čase 0, pak po 10, 20, 30 a 60 minutách. Změřeny byly postupem uvedeným v kapitole 7.6. Pro sérii 1 byla jako mobilní fáze použit 0,5 M octan amonný methanolem v poměru 1:1. Pro všechny ostatní byl použit octan amonný o koncentraci 0,1M, jak je uvedeno v postupu 7.6.

Jednotlivé série pokusů byly někdy provedeny v jiné dny, proto i když mají stejný poměr a aktivitu, množství odpipetovaného terbia muselo být přepočítáno pro konkrétní den, tím pádem se hodnoty odlišují.

## 7.8 Stabilita PSMA v čase

Vzorek byl připraven smícháním 14,14  $\mu\text{l}$  1 mM PSMA, 500  $\mu\text{l}$  0,05M HCl, 100  $\mu\text{l}$  NaOAc a 50 MBq terbia. Tím bylo dosaženo poměru 1:200. Vzorek byl zahřána na termobloku po dobu 10 minut při teplotě 95°C. Následně byl vzorek rozdělen na dvě části. První část byla ponechána bez přídavku jako kontrolní. K druhé části bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  askorbového pufru.

Kontrolní měření byla provedena v čase, po 4 a 24 hodinách, po 3 a po 7 dnech. Opět se postupovalo podle postupu 7.6.

### 7.9 Závislost označení PSMA na pH

Vzorky byly připraveny 14,14  $\mu$ l 1 mM PSMA, 3,6 ml 0,05M HCl a 50 MBq terbia. Tím byl zajištěn poměr 1:200. Aby bylo změněno pH roztoku, bylo měněno množství odpipetovaného octanu sodného o koncentraci 0,5M. Reálné množství stejně jako odpovídající změněné pH je uvedeno v tabulce níže.

*Tabulka 4: množství odpipetovaného 0,5 M octanu sodného a výsledné pH roztoku*

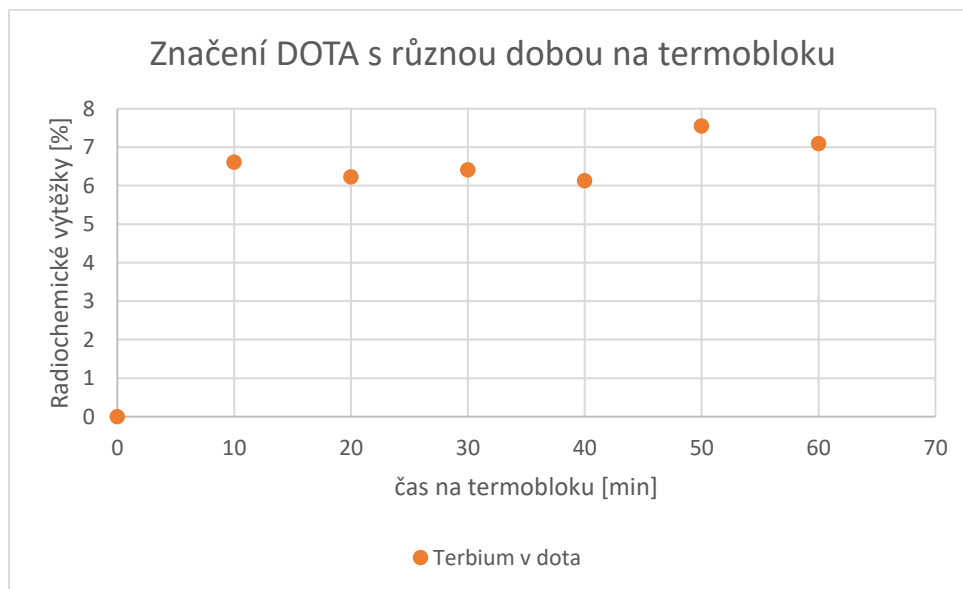
NaOAc [ml]	pH
0,9	4,16
1,2	4,51
1,5	4,72
1,8	4,85

Vzorky byly opět zahřáty na 95 °C po dobu 10 minut v mikrovlnném reaktoru. Následně byly opět proměřeny výše uvedeným postupem (7.6).



## 8 Výsledky a diskuse

### 8.1 DOTA



Graf 1: Označení DOTA v závislosti doby na termobloku

Tabulka 5: Označení DOTA v závislosti doby na termobloku

čas na termobloku [min]	Označené DOTA terbiem [%ROI]
0	0,0
10	6,6
20	6,2
30	6,4
40	6,1
50	7,6
60	7,1

Z výsledků lze vyvodit, že DOTA se dobře váže na terbium již při zahřívání kratší dobu, tedy 10 minut. Nicméně je třeba poznamenat, že zahřívání alespoň po tuto dobu je nezbytné, neboť bez zahřívání se molekuly DOTA a terbia prakticky nesetkají a nemohou se na sebe navázat. Mírná fluktuace jednotlivých bodů v grafu při delším čase na termobloku by mohla být způsobena nepřesností měření a spadá do statistické chyby měření. Je ovšem patrné, že delší doba zahřívání mírně zvyšuje účinnost značení. Důkazem tohoto je % ROI po 10 minutách vs. po 50 minutách, kde se liší téměř 1 %. Stejně tak lze ale vidět zmíněnou

fluktuaci, kde po 60 minutách je označeno méně DOTA jako po 50 minutách. Podobný fenomén lze pozorovat při 10 a 20 nebo 40 minutách.

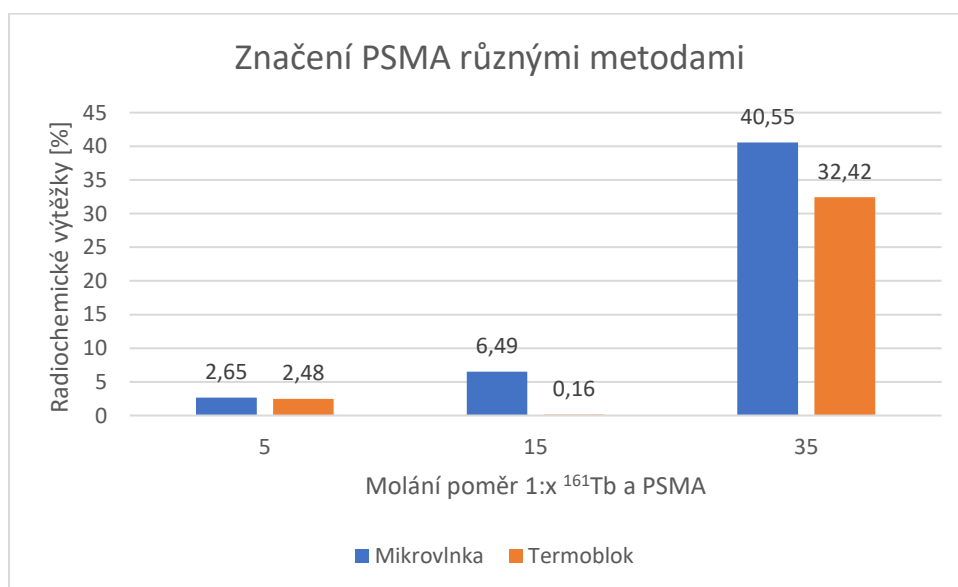
## 8.2 Porovnání značení PSMA na termobloku vs. v mikrovlnném reaktoru

Tato série experimentů byla zaměřena na porovnání způsobu zahřívání při značení.

Dle předpokladu lze konstatovat, že při vyšším nadbytku PSMA se ho i více označilo. Osobně se domnívám, že závislost mezi molárním poměrem a množstvím označených molekul vykazuje spíše exponenciální závislost. Pro potvrzení této závislosti by byla potřeba další měření.

Při porovnání mezi způsobem zahřívání lze konstatovat, že zahřívání v mikrovlnném reaktoru bylo úspěšnější než na termobloku. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že termoblok zahřívá roztok z vnějšku, kdežto mikrovlny pronikají dovnitř roztoku a zahřívají ho i zevnitř.

Experimenty byly provedeny pouze jednou. Proto z tohoto důvodu nelze vyvodit statistické výsledky. Myslím si, že při pokusu, kde byl poměr 1:15 a vzorek byl zahříván na termobloku se jedná o chybu měření. Je možné, že vzorek byl v mobilní fázi příliš „utopen“ a tím pádem se řádně nevyvinul. Pro ověření by bylo potřeba další měření.



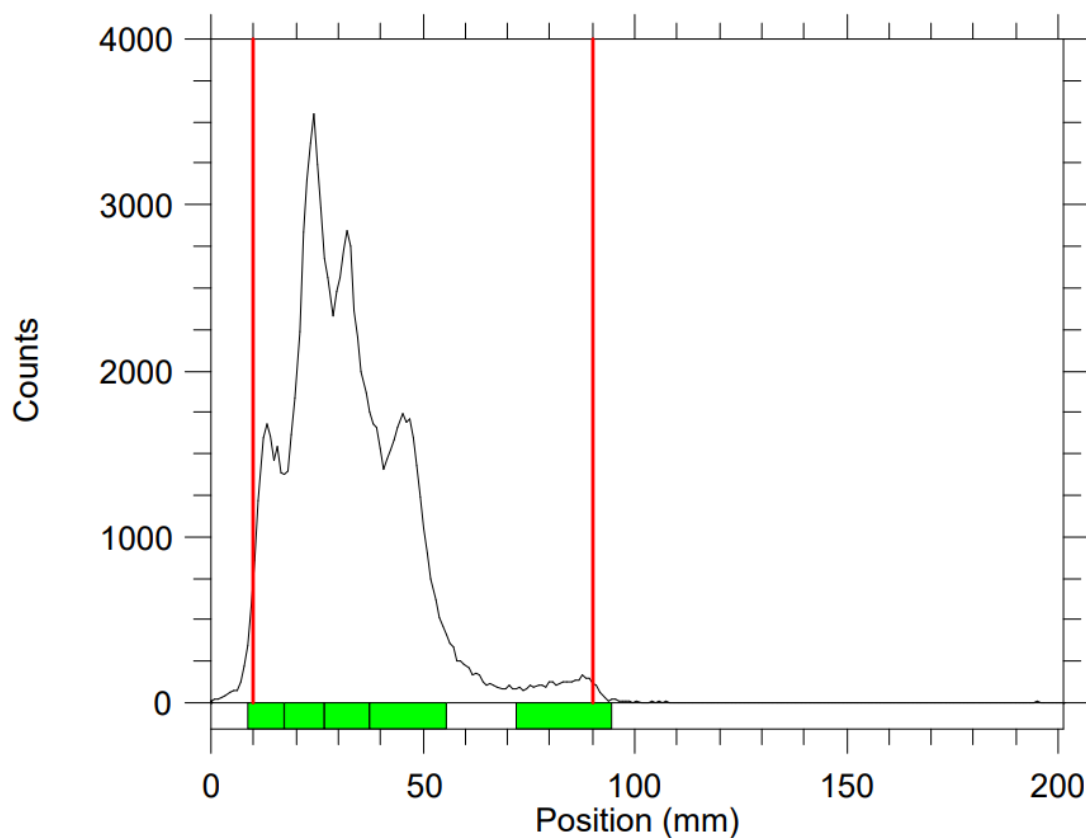
Graf 2: Značení PSMA - 617 v mikrovlnce a na term bloku

## 8.3 Závislost označeného PSMA na době zahřívání

### 8.3.1 Poměr 1:25, 1:50 při 5 MBq

Pro první, druhou i třetí sérii měření byly výsledky prakticky nulové, z tohoto důvodu nemá smysl dělat graf.

Původně jsem dospěla k závěru, že za nulový výsledek prvního měření může zapříčiněn mobilní fází, které se od předchozích pokusů lišila. K tomuto závěru mě vedl i fakt, že při vyhodnocování výsledků nebyly dobře rozeznatelné píky. Určit tedy přístrojem % ROI bylo skoro nemožné.



Obrázek 13: Ukázka grafu s použitím nevhodné mobilní fáze

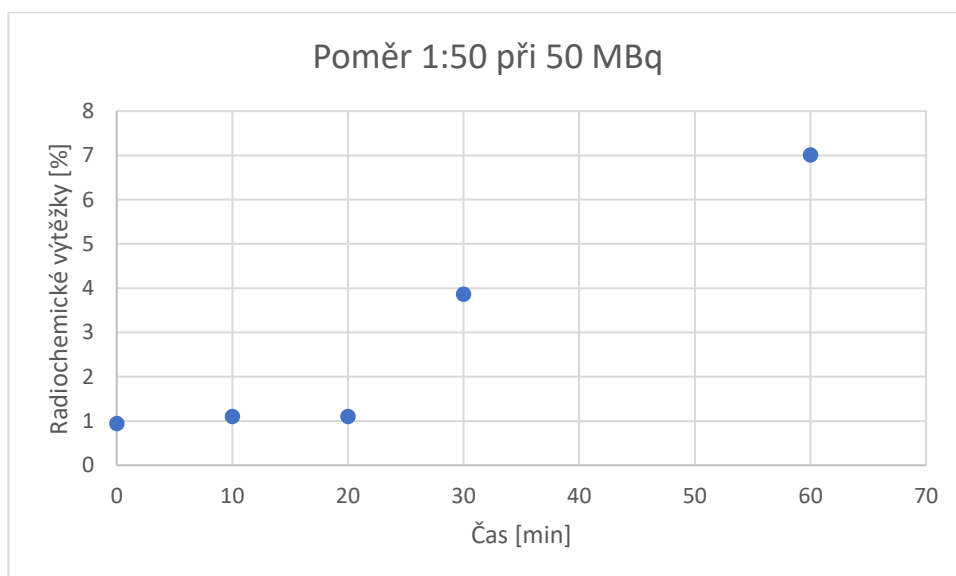
Z tohoto důvodu jsem přistoupila k zopakování pokusu s pozměněnou mobilní fází, respektive stejnou jak v předchozích měření. Zároveň jsem pokus provedla i pro poměr 1:50. I v tomto případě ale byly výsledky prakticky nulové a obecně spadali do statistické chyby měření. Vzhledem k tomu, že dříve byly provedeny pokusy s touto mobilní fází, a to i s nižšími

poměry, při kterých bylo možné ve znatelné míře označit cílený protein, dospěla jsem k závěru, že nedostávám očekávané výsledky kvůli vysokém zředění.

Při předchozích pokusech (s DOTA) jsem používala terbium o aktivitě 2 MBq, ale celkový objem reakční směsi byl přibližně 25  $\mu$ l. Značení v mikrovlnném reaktoru je ale možné až od 0,5 ml. Z tohoto důvodu se do směsi přidávalo víc než 1 ml pufru. Pro udržení poměru se pro nižší aktivitu používalo i méně koncentrované PSMA. V kombinaci s nižší koncentrací a větším objemem se kineticky skoro nemohlo terbium a PSMA potkat a tím pádem se označit. Díky tomuto ani delší čas nenapomáhal označení. Pro další měření jsem tedy používala aktivitu 50 MBq.

### 8.3.2 Poměr 1:50 při 50 MBq

Při této sérii měření lze vidět, že delší doba zahřívání napomáhala vyšší míře označení. Lze si opět povšimnout, že terbium se částečně značilo i bez zahřívání. Dle naměřených výsledků záleží na době zahřívání, kdy při krátké době zahřívání nejsou znatelné rozdíly v radiochemickém výtěžku.



Graf 3: Časová závislost značení PSMA při poměru 1:50 a aktivitě 50 MBq

Tento závěr je v lehkém rozporu s předchozími výsledky a konstatovanými fakty. V předchozích experimentech jsem uvedla, že PSMA se označí i po 10 minutách zahřívání.

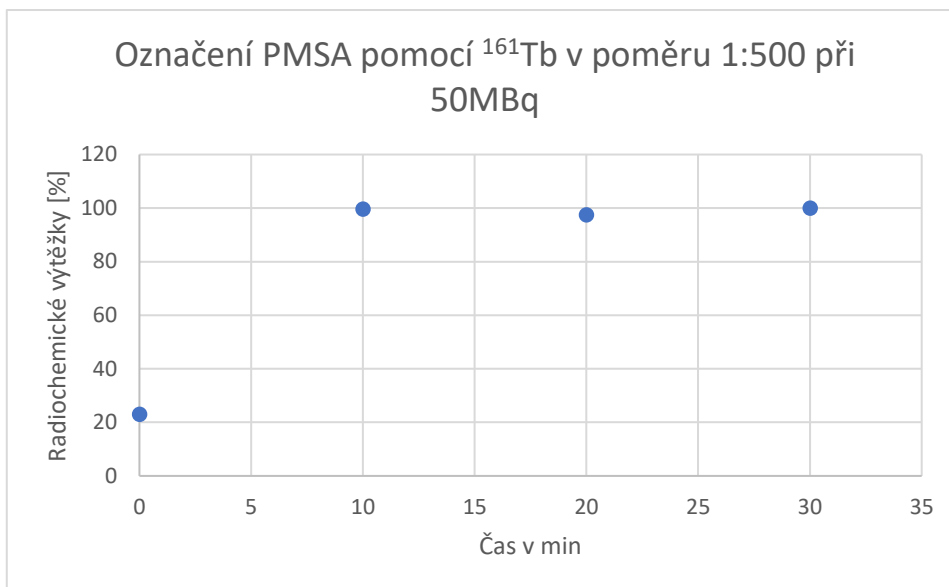
Například v sekci 8.2, kde jsem značila PSMA v mikrovlnném reaktoru, také 10 minut, a dokonce v nižším poměru. Z logiky věci by tedy mělo být množství označených molekul PSMA vyšší při vyšším poměru. Podle výsledků bylo v poměru 1:35 označeno přes 40 %, kdežto při poměru 1:50 pouhých 7 %. Je možné, nižší radiochemický výtěžek byl způsoben vzniklým Dy, v důsledku toho, že experimenty byly prováděny v jiné dny. Vliv Dy by ale alespoň částečně postihoval všechny experimenty.

Tuto nepřesnost a možná dokonce i rozpor si dovedu vysvětlit jako nepřesnost v měření. Stejně jako v minulé sérii je tedy možné, že u iTLC - SG destičky hladina mobilní fáze lícovala místo aplikace kapičky a tím pádem se řádně nevyvinuly. Samozřejmě vždy je částečná nepřesnost pipetování, především když vezmeme v úvahu pipetování malých objemů, o které tu šlo.

### 8.3.3 Poměr 1:500 při 50 MBq

Pro poslední sérii měření v této sekci byl značeno PSMA při poměru 1:500 s aktivitou 50 MBq. Dle výsledků lze vidět, že terbium se značilo i bez zahřívání na více než 20 %. Po zahřátí 10 minut bylo označeno prakticky ze 100 %.

Předpokládám, že je to v důsledku velkého nadbytku PSMA. Díky tomu byly jeho molekuly schopné potkat se s atomy terbia i bez urychlení jejich pohybu pomocí zahřívání. Je možné, že při ponechání připraveného roztoku při laboratorní teplotě delší dobu by výsledky v čase nula byly ještě vyšší.



Graf 4: Časová závislost pro značení PSMA při poměru 1:500 a aktivitě 50 MBq

#### 8.4 Stabilita PSMA v čase

PSMA i při posledním měření zůstávalo označené prakticky ze 100 %. Nebyl rozdíl mezi vzorkem s přidavkem salicylového pufru a vzorkem bez přidavku.

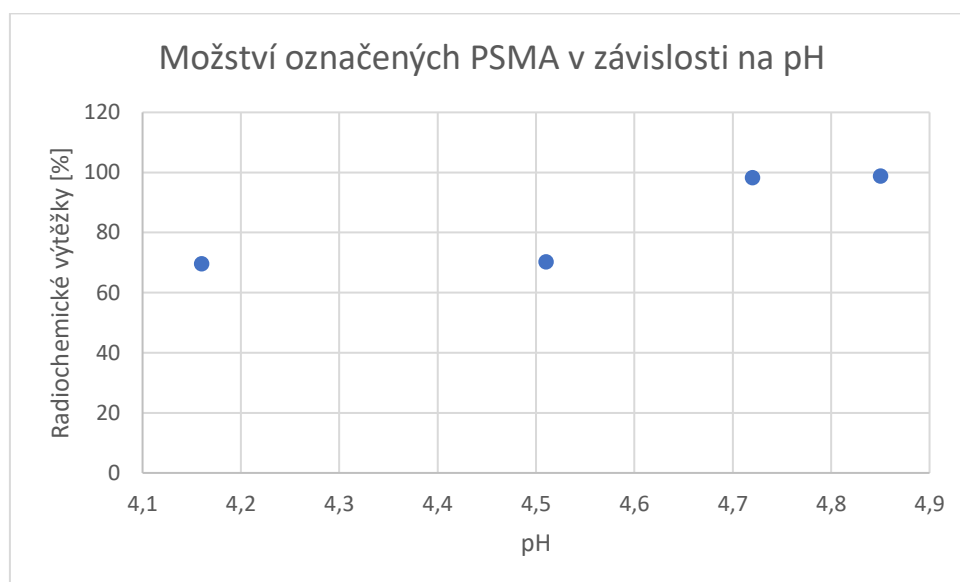
Obecně se PSMA považuje za velmi stabilní molekulu, může tomu přispívat její orientace v prostoru. Je možné tedy, že to je důvod těchto výsledků, osobně si myslím, že k tomu mohl přispět a relativně vysoký molární poměr (1:200), při kterém bylo měření prováděno. Za předpokladu, že by některé PSMA přerušilo vazbu s terbiem, v roztoku je stále jeho velký nadbytek. V případě, že vzorek zůstával několik dní v laboratoři, nenávané terbium mělo příležitost najít PSMA i bez zrychlení kinetiky pomocí teploty. Fakt, že terbium je schopné se navázat na PSMA i při laboratorní teplotě byl demonstrován v pokusu časové závislosti s poměrem 1:500 při 50 MBq, jen to vyžaduje čas, který byl ale těmto vzorkům poskytnut.

## 8.5 Závislost označení PSMA na pH

Byly připraveny pufrы, jejichž pH bylo přesně změřeno na pH metru. Následně byly všechny vzorky o poměru 1:200 a aktivitě 50 MBq zahřáty v mikrovlnce na 10 minut.

Tabulka 6: Závislost pH na procentuálním označení PSMA

pH	Radiochemické výtěžky [%]
4,16	69,7
4,51	70,2
4,72	98,3
4,85	98,8



Graf 5: Závislost značení na pH

Lze vidět skokově větší míru označení molekul při pH 4,72 a 4,85. Z rešerše vyplývalo, že ideální pH na provedená značení se pohybuje kolem 4,5. Z mou naměřených výsledků je patrné, že lépe se PSMA značí spíše když se pH blíží 4,8. Osobně si myslím, že množství označených molekul by se při měření s vyšším pH opět začalo snižovat. Na tento předpoklad by ale bylo potřeba další měření.

## 9 Závěr

### *Značení DOTA*

DOTA značená při poměru 1:35 se dobře značila i po 10 minutách na termobloku. Pro případ, že byl vzorek ponechán na termobloku delší dobu, byl pozorován lehký nárůst označené DOTA, obecně by stále spadal do statistické chyby měření.

### *Značení na PSMA na termobloku vs. v mikrovlnném reaktoru*

Značení vzorků pomocí mikrovlnného reaktoru bylo účinnější než pomocí termobloku. Při poměru 1:35 byl rozdíl označených molekul po 10 minutách přes 8 %.

### *Závislost označení PSMA v mikrovlnném reaktoru na době zahřívání při různých poměrech*

Pro vyvíjení iTLC - SG destiček s PSMA -  $^{161}\text{Tb}$  není vhodné použít jako mobilní fázi 0,5 M octan amonný 1:1 s methanolem. Při zahřívání větších objemů je třeba použít vyšší molární poměry anebo větší množství terbia (vyšší aktivitu). Při aktivitě 50 MBq a poměrech 1:500 se PSMA značí i bez zahřívání. Při stejné aktivitě, ale poměru 1:50, lze rozeznat rozdílný počet označených molekul v závislosti na době zahřívání.

### *Stabilita PSMA v čase*

Byl připraven roztok s poměrem 1:200 a aktivitou 50 MBq. Po rozdělení do dvou mikroskopavek Eppendorf byl k jedné z nich přidán askorbový pufr pro zvýšení stability. Byly udělány kontrolní měření po 4, 24, 96 a 190 hodinách. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Označené PSMA zůstávalo stabilní i bez přídatku i při posledním měření, které bylo více než týden od označení.

### *Závislost označení PSMA na pH*

Vzorky s molárním poměrem 1:200 a aktivitou 50 MBq byly pufrovány na různá pH. Předpoklad, že ideální pH na značení je 4,5 nebyl mým měřením potvrzen. Závěrem vyplývá že ideální pH je na tuto syntézu je kolem 4,8. Pro potvrzení nebo zpřesnění této hodnoty by bylo potřeba další měření.



## 10 Použitá literatura

- [1] Plichta, K.A.; Graves, S.A.; Buatti, J.M. Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Theranostics for Treatment of Oligometastatic Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12095. <https://doi.org/10.3390/ijms222212095>
- [2] Attila Kovács *Theoretical Study of Actinide(III)-DOTA Complexes ACS Omega* **2021** *6* (20), 13321-13330 DOI: 10.1021/acsomega.1c01292
- [3] Eppard, Elisabeth & Fuente, Ana & Benešová, Martina & Khawar, Ambreen & Bundschuh, Ralph & Gaertner, Florian & Kreppel, Barbara & Kopka, Klaus & Essler, Markus & Roesch, Frank. (2017). Clinical Translation and First In-Human Use of [ 44 Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Theranostics*. *7*. 4359-4369. 10.7150/thno.20586. –
- [4] KUPKA, Karel; KUBINYI, Jozef a ŠÁMAL, Martin. *Nukleární medicína*. 6. vydání (2. vydání v Nakladatelství P3K). V Praze: P3K, 2015. ISBN isbn978-80-87343-54-8.
- [5] GE Healthcare AS , Oslo ( NO) . *DOTA SYNTHESIS*. Původce Andreas Richard Meijer,; Arne Wang Aabye; Khalid Hussain; Sondre Nilsen ,; Mikkel Jacob Thaning; Jarle Andre Haugan ,; Ingvil Gausemel; Nikolai Enes; Silalahi Sumihar. OSLO. IPC: US 10,941,124 B2. Dostupné také z: <https://patentimages.storage.googleapis.com/59/7e/e3/e654afbf43f16e/US10941124.pdf>
- [6] Sedláčková, H., Dolejšová, O., Pitra, T., Ferda, J., Ferdová, E., Baxa, J., & Hora, M. (2020). Možnosti využití ligandů prostatického specifického membránového antigenu (PSMA) v diagnostice a léčbě karcinomu prostaty. *Czech urology*, *24*(číslo 4), 247-260
- [7] RNDr. Marta Šimíčková, CSc.; MUDr. Milana Šachlová, CSc.et Ph.D.; MUDr. Miroslava Nekulová; Doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc.; P. Hložková *Chromogranin A jako cirkulující marker pro monitorování nemocných s neuroendokrinními nádory* Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/chromogranin-a-jako-cirkulujici-marker-pro-monitorovani-nemocnych-s-neuroendokri/>
- [8] BIERSACK, H. J. (ed.). *Clinical nuclear medicine*. Leonard M. FREEMAN (editor), Lionel S. ZUCKIER (editor), Frank GRÜNWALD (editor). Berlin: Springer, 2007. ISBN 978-3-540-28025-5.

- [9] Graham MM, Gu X, Ginader T, Breheny P, Sunderland JJ.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC Imaging of Neuroendocrine Tumors: A Systematic Review and Metaanalysis. *J Nucl Med*. 2017 Sep;58(9):1452-1458. doi: 10.2967/jnumed.117.191197. Epub 2017 Mar 9. Erratum in: *J Nucl Med*. 2017 Oct;58(10):1707. PMID: 28280220; PMCID: PMC6944175.
- [10] Otte, A., Jermann, E., Behe, M. *et al.* DOTATOC: A powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med* **24**, 792–795 (1997). <https://doi.org/10.1007/BF00879669>
- [11] Mori Y, Dendl K, Cardinale J, Kratochwil C, Giesel FL, Haberkorn U. FAPI PET: Fibroblast Activation Protein Inhibitor Use in Oncologic and Nononcologic Disease. *Radiology*. 2023 Feb;306(2):e220749. doi: 10.1148/radiol.220749. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36594838.
- [12] E. May, M. Thoennessen, Discovery of samarium, europium, gadolinium, and terbium isotopes, *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, Volume 99, Issue 1, 2013, Pages 1-21, ISSN 0092-640X, <https://doi.org/10.1016/j.adt.2012.01.007>.
- [13] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "terbium". *Encyclopedia Britannica*, 15 Apr. 2024, <https://www.britannica.com/science/terbium>. Accessed 23 July 2024.
- [14] Crook ZR, Nairn NW, Olson JM. Miniproteins as a Powerful Modality in Drug Development. *Trends Biochem Sci*. 2020 Apr;45(4):332-346. doi: 10.1016/j.tibs.2019.12.008. Epub 2020 Jan 31. PMID: 32014389; PMCID: PMC7197703.
- [15] Nelson BJB, Andersson JD, Wuest F. Targeted Alpha Therapy: Progress in Radionuclide Production, Radiochemistry, and Applications. *Pharmaceutics*. 2020 Dec 31;13(1):49. doi: 10.3390/pharmaceutics13010049. PMID: 33396374; PMCID: PMC7824049. ----- TAT
- [16] Favaretto, C., Grundler, P.V., Talip, Z. *et al.* Terbium-149 production: a focus on yield and quality improvement towards preclinical application. *Sci Rep* **14**, 3284 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53610-2> ----- 149 tb
- [17] Baum RP, Singh A, Benešová M, Vermeulen C, Gnesin S, Köster U, Johnston K, Müller D, Senftleben S, Kulkarni HR, Türler A, Schibli R, Prior JO, van der Meulen NP, Müller C. Clinical evaluation of the radiolanthanide terbium-152: first-in-human PET/CT with  $^{152}\text{Tb}$ -DOTATOC. *Dalton Trans*. 2017 Oct 31;46(42):14638-14646. doi: 10.1039/c7dt01936j. PMID: 28825750. ----- 152 Tb

- [18] Masłowska K, Halik PK, Tymecka D, Misicka A, Gniazdowska E. The Role of VEGF Receptors as Molecular Target in Nuclear Medicine for Cancer Diagnosis and Combination Therapy. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 3;13(5):1072. doi: 10.3390/cancers13051072. PMID: 33802353; PMCID: PMC7959315.
- [19] Pratik Desai, Juan A. Jiménez, Chinghai Kao, Thomas A. Gardner, Future Innovations in Treating Advanced Prostate Cancer, *Urologic Clinics of North America*, Volume 33, Issue 2, 2006, Pages 247-272, ISSN 0094-0143, <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2005.12.005>.
- [20] Kozempel, J.; Mokhodoeva, O.; Vlk, M. Progress in Targeted Alpha-Particle Therapy. What We Learned about Recoils Release from *In Vivo* Generators. *Molecules* **2018**, *23*, 581. <https://doi.org/10.3390/molecules23030581>
- [21] Pejman Shahrokhi, Arezou Masteri Farahani, Mohammad Tamaddondar, Radiolabeled vitamins as the potential diagnostic probes for targeted tumor imaging, *Bioorganic Chemistry*, Volume 122, 2022, 105717, ISSN 0045-2068, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105717>.
- [22] Cyclic Peptides: From Bioorganic Synthesis to Applications, ed. J. Koehnke, J. Naismith, and W. A. van der Donk, The Royal Society of Chemistry, 2017, pp. P001-P004.
- [23] KODÍČEK, Milan; VALENTOVÁ, Olga a HYNEK, Radovan. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět. 2. přepracované vydání*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018. ISBN 978-80-7592-013-3.
- [24] Chitra Sundararajan, John Valliant, Radiolabeling proteins and hormones: The preparation and characterization of radiolabeled and fluorescent insulin probes, *Journal of Nuclear Medicine* May 2009, 50 (supplement 2) 1891;
- [25] Brian E. Henderson, Ronald K. Ross, Malcolm C. Pike, John T. Casagrande; Endogenous Hormones as a Major Factor in Human Cancer<sup>1</sup>. *Cancer Res* 1 August 1982; 42 (8): 3232–3239.
- [26] Rhim JS. Neoplastic transformation of human cells in vitro. *Crit Rev Oncog*. 1993;4(3):313-35. PMID: 8485202.
- [27] McGuinn LA, Ghazarian AA, Ellison GL, Harvey CE, Kaefer CM, Reid BC. Cancer and environment: definitions and misconceptions. *Environ Res*. 2012 Jan;112:230-4. doi: 10.1016/j.envres.2011.10.009. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22099913; PMCID: PMC3267861.

- [28] Chini B, Chinol M, Cassoni P, Papi S, Reversi A, Areces L, Marrocco T, Paganelli G, Manning M, Bussolati G. Improved radiotracing of oxytocin receptor-expressing tumours using the new [111In]-DOTA-Lys8-deamino-vasotocin analogue. *Br J Cancer*. 2003 Sep 1;89(5):930-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6601189. PMID: 12942128; PMCID: PMC2394487.
- [29] Mayer JP, Zhang F, DiMarchi RD. Insulin structure and function. *Biopolymers*. 2007;88(5):687-713. doi: 10.1002/bip.20734. PMID: 17410596.
- [30] Folkerd EJ, Dowsett M. Influence of sex hormones on cancer progression. *J Clin Oncol*. 2010 Sep 10;28(26):4038-44. doi: 10.1200/JCO.2009.27.4290. Epub 2010 Jul 19. PMID: 20644089.
- [31] ČESKO. § 2 odst. 2 písm. h) zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech) - znění od 1. 6. 2024. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010–2024 [cit. 23. 7. 2024]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378#p2-2-h>
- [32] U.S. Department of Health and Human Services. (n.d.). Nuclear medicine. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Dostupné z : <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/nuclear-medicine>
- [33] Gracheva, N., Müller, C., Talip, Z. *et al.* Production and characterization of no-carrier-added <sup>161</sup>Tb as an alternative to the clinically-applied <sup>177</sup>Lu for radionuclide therapy. *EJNMMI radiopharm. chem.* **4**, 12 (2019). <https://doi.org/10.1186/s41181-019-0063-6>
- [34] Hemmingsson, J., Svensson, J., van der Meulen, N.P. *et al.* Active bone marrow S-values for the low-energy electron emitter terbium-161 compared to S-values for lutetium-177 and yttrium-90. *EJNMMI Phys* **9**, 65 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40658-022-00495-7>
- [35] Merola E, Grana CM. Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT): Innovations and Improvements. *Cancers (Basel)*. 2023 May 30;15(11):2975. doi: 10.3390/cancers15112975. PMID: 37296936; PMCID: PMC10251822.
- [36] Favaretto, C., Talip, Z., Borgna, F. *et al.* Cyclotron production and radiochemical purification of terbium-155 for SPECT imaging. *EJNMMI radiopharm. chem.* **6**, 37 (2021). <https://doi.org/10.1186/s41181-021-00153-w>
- [37] Edotreotide Chemical Structure CAS No. : 204318-14-9 dostupné z: <https://www.medchemexpress.com/edotreotide.html>

- [38] Quinoline-Based Theranostic Ligands for the Targeting of Fibroblast Activation Protein. FAPI-2 dostupné z: <https://www.medkoo.com/products/33818>
- [39] Nuclear Data Sheets 112,2497 (2011)
- [40] Zobrazení struktur alfa helix a beta ohybu dostupné z: <https://e-learning.vscht.cz/mod/glossary/showentry.php?eid=50348>
- [41] M. Volková, J. Mandíková, A. Lázníčková, M. Lázníček, P. Bárta, F. Trejtnar, The involvement of selected membrane transport mechanisms in the cellular uptake of <sup>177</sup>Lu-labeled bombesin, somatostatin and gastrin analogues, Nuclear Medicine and Biology, Volume 42, Issue 1, 2015,
- [42] LaPelusa A, Jan A. Biochemistry, Bombesin. [Updated 2023 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541129/>
- [43] Biologické účinky ionizujícího záření, webové stránky Státního úřadu radiacní ochrany dostupné z: <https://www.suro.cz/cz/radiacni-ochrana/biologicke-ucinky-ionizujiciho-zareni>
- [44] Informace o Tb – 152 The PRISMAP Project funded from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 101008571 (PRISMAP), dostupné z: <https://www.prismap.eu/radionuclides/portfolio/152Tb/>
- [45] Informace o Tb – 155 The PRISMAP Project funded from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 101008571 (PRISMAP), dostupné z: <https://www.prismap.eu/radionuclides/portfolio/155Tb/>
- [46] *GA-68-DOTATOC Prescribing Information*. Drugs.com. dostupné z: <https://www.drugs.com/pro/ga-68-dotatoc.html>
- [47] Najafi M, Fardid R, Hadadi G, Fardid M. The mechanisms of radiation-induced bystander effect. J Biomed Phys Eng. 2014 Dec 15;4(4):163-72. PMID: 25599062; PMCID: PMC4289523.
- [48] K. Nwe, M. Bernardo, C.A.S. Regino, M. Williams, M.W. Brechbiel, Comparison of MRI properties between derivatized DTPA and DOTA gadolinium–

dendrimer conjugates, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 18, Issue 16,  
2010,