

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.04.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.04.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/01201466**
(33) Země priority: **EP**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2005**
(Věstník č. 1/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/012565**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/085418**

(21) Číslo dokumentu:

2003-2872

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
A 61 K 51/08

(71) Přihlašovatel:
MALLINCKRODT INC., St. Louis, MO, US

(72) Původce:
Wester Hans Jurgen, Illmmuenster, DE
Schottelius Margret, Muenchen, DE
Schwaiger Markus, Muenchen, DE

(74) Zástupce:
JUDr. Jan Matějka, Národní 32, Praha, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:
Peptický ligand, který váže receptor
somatostatinu

(57) Anotace:
Řešení se týká zlepšených peptidických ligandů, které vážou sst-receptor, určených pro diagnostické a terapeutické využití v nukleární medicíně.

CZ 2003 - 2872 A3

Peptidický ligand, který váže receptor somatostatinu

Oblast techniky

Vynález se týká nových radioaktivních oktreotidových derivátů, které jsou glykosylované a váží receptor somatostatinu.

Dosavadní stav techniky

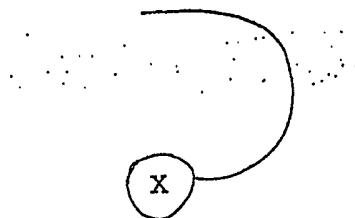
Tyto takzvané SSTR-ligandy jsou vhodné pro *in vivo* cílení („targeting“) receptorů somatostatinu a nachází široké uplatnění v nukleární medicíně.

Základními částmi těchto molekul jsou cukrové zbytky konjugované přímo nebo přes linkery na bioaktivní část molekuly. V porovnání s odpovídajícími deriváty, které neobsahují karbohydráty, vedou tyto deriváty, značené buď pomocí přímých redukčních metod, nebo pomocí tri-karbonylových komplexů radioizotopy, jakými jsou například rhenium a technecium, k účinným ligandům receptoru somatostatinu se zlepšenými poměry tumorové/netumorové akumulace a se zlepšenou farmakokinetikou a zlepšenými internalizačními kinetikami.

Podstata vynálezu

Peptidický ligand vážící receptor somatostatinu podle vynálezu se připraví z přírodních nebo nepřírodních (uměle připravených) ligandů. Tyto ligandy nesou strukturní

modifikace na N-konci nebo C-konci nebo na obou koncích. Uvedené peptidické ligandy mají afinitu pro sst-receptory a jsou graficky reprezentovány následující strukturou:



kde X označuje C-konec ligandu. V kompozicích podle vynálezu může být přítomna množina ligandů, kde je možná tvorba dimerů a multimerů smíšeným C-koncovým a N-koncovým navázáním peptidického řetězce. Do rozsahu vynálezu tedy spadají homomery, dimery, homomultimery nebo různé struktury vážící receptor, heterodimery a heteromultimery. Dimery a multimery lze připravit smíšeným C-koncovým a N-koncovým navázáním peptidického řetězce.

Kompozice ligandu podle vynálezu případně obsahuje alespoň jednu linkerovou jednotku, která může být multifunkční. Taková linkerová jednotka umožňuje navázání peptidu, cukrového zbytku a chelátoru kondenzační, acylační, alkylační, substituční nebo adiční reakcí. Typické linkerové jednotky zahrnují ligandy odvozené z peptidických nebo jiných organických struktur, jakými jsou například L-aminokyseliny nebo D-aminokyseliny, jakými jsou například lysin, ornithin, serin, kyselina glutamová, kyselina aspartová, O-amin serin, kyselina merkaptopropionová, hydroxykarbonové kyseliny, aminokarbonové kyseliny, halogenkarbonové kyseliny nebo polyaminokyseliny.

Zlepšené peptidické ligandy vážící receptor somatostatinu podle vynálezu obsahují karbohydrát, konkrétně cukr, jakým je například mono-, di- a

trisacharid. Vhodné cukry zpravidla zahrnují glukózu, galaktózu, maltózu, manózu, maltotriózu a laktózu navázanou přes kovalentní vazbu. To znamená, že cukr lze navázat Maillardovou reakcí a Amadoriho přeuspořádáním, glykosidickou vazbou, alkylací, allylací nebo navázáním přes tvorbu komplexu po modifikaci, tj. vytvořením komplexů karbohydrátů a isonitrilů nebo karbohydrátů a fosfátů.

Další složkou zlepšeného peptidického ligandu vážícího receptor somatostatinu podle vynálezu je chelátor. Typickými chelátory jsou peptidické nebo nepeptidické struktury vhodné pro tvorbu mono- nebo multidentátních komplexů radioizotopů Tc a Re. Chelátory použitelné v kompozicích podle vynálezu zahrnují jednu nebo více (ligand a koligand(y)) organických molekul obsahujících libovolný počet funkčních skupin nezbytných pro vytvoření komplexů radioizotopů kovů, v závislosti na jejich oxidačním stavu a geometrii komplexu. Příklady vhodných chelátorů jsou například histidin, pikolyamin kyseliny dioctové, hydroxynikotinamid (HYNIC), merkptoacetyl-glycyl-glycyl-glycin (MAG3) a tetrapeptidy.

Stručný popis obrázků

K jasnějšímu popisu zlepšeného peptidického ligandu vážícího receptor somatostatinu podle vynálezu poslouží rovněž odkazy na obr. 1A až 1C. Obr. 1A až 1C graficky znázorňují schematickou formou různých konfigurací, ve kterých lze peptidické ligandy podle vynálezu připravit. Odborník v daném oboru, který se bude držet popisu vynálezu, může připravit i další praktické konfigurace.

Na obr. 1A, obr. 1B a obr. 1C je znázorněn mono-, di- a multimer (kde n znamená celé číslo 2 nebo vyšší) obsahující linkerový zbytek L, cukrový zbytek S a chelátor C schopný držet radioizotop Tc a Re.

Na obr. 1A, obr. 1B a obr. 1C je C-konec peptidu označen písmenem X, přičemž opačným koncem je N-konec. Farmakoforický peptid je tedy přes C- nebo N-konec navázán na linker, chelátor atd. Jak již bylo uvedeno výše, jak peptidický ligand, tak linker (multifunkční) může obsahovat přírodní nebo uměle vytvořené aminokyseliny. Je samozřejmé, že se ligand (tj. oktreotid) v kompozicích podle vynálezu nepoužije jako linker.

Na obr. 1A jsou znázorněny různé konfigurace kompozic podle vynálezu poskytující multimery dvou nebo více peptidických ligandů. Multimery mohou obsahovat buď identické struktury vážící peptid receptoru (homodimery, homomultimery), nebo různé struktury vážící receptor (heterodimery, heteromultimery).

Na obr. 1B jsou znázorněny různé konfigurace merů, z nichž některé obsahují linkerovou jednotku (multifunkční) a čtyři z nich linkerovou jednotku neobsahují. Je tedy patrné, že multifunkční linkerová jednotka je v kompozicích podle vynálezu pouze fakultativní složkou.

Na obr. 1C jsou znázorněny dimery a multimery, ve kterých je použita množina linkerových jednotek s různou orientací peptidu a samozřejmě množina peptidických ligandů.

Dimery a multimery znázorněné na obr. 1A a 1C lze připravit kovalentním navázáním linkeru nebo peptidického

ligandu na chelátor nebo vytvořením komplexu mezi linkerem a chelátorem.

V následující části bude vynález popsán pomocí příkladných provedení vynálezu, která mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými patentovými nároky.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Detailní projekt peptidických radiofarmak: *in vitro* studie demonstrují synergický účinek karbohydratace a C-koncové oxidace oktreotidu na ligand indukovaný SST-2 internalizací

Cíle

Kromě farmakokinetiky je vhodnost izotopického indikátoru na bázi receptoru pro zobrazování a terapeutické účely určena zejména jeho farmakodynamickým profilem. Cílem této studie bylo určit vliv karbohydratace oktreotidu a oktreotátu na SSTR endocytózu a exocytózu (internalizace a externalizace) a reendocytózu (recirkulace).

Metody

Internalizace, externalizace a recyklace $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^3\text{-oktreotidu}$ (TOC), $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^3\text{-oktreotátu}$ (TOCA) a

jejich glukózových (Gluc) a maltotriózových (Mtr) derivátů se studovaly za použití souvislých monovrstev AR42J-buněk (SSTR₂). Buňky se inkubovaly s radioligandem maximálně po dobu 120 min (n=3). Ve všech okamžicích se určovala aktivita v supernatantu, navázání k povrchu a internalizovaná aktivita a získané hodnoty se normalizovaly na hodnoty TOC. Externalizace a recyklace se studovaly po 120 min inkubace v časové periodě 2 h. Specifická navázání ligandu se studovala v konkurenčním experimentu s 10 μ M Sandostatínu.

Výsledky

Po 2 h inkubace bylo množství internalizovaného ligandu [% internalizovaného TOC] následující:
Mtr-TOC (35 $\pm$ 4 %) < Gluc-TOC (121 %) < TOCA (154 %)
< Mtr-TOCA (549 %) < Gluc-TOCA (637 %). V konkurenčním experimentu poklesla internalizace všech sloučenin na hodnotu <0,1 $\pm$ 0,02 % (30 min) použité radioaktivity. Při experimentu externalizace, který umožnil recyklaci ligandů, vykazovaly TOCA a TOCA glykát přibližně 2/3 extracelulárně lokalizované radioaktivity v porovnání s experimentem bez recyklace, zatímco pro TOC, Gluc-TOC a Mtr-TOC bylo zjištěno přibližně 80 %. Karbohydratace TOC neměla významnější vliv na dostupnost ligandů na buněčném povrchu, zatímco povrchová koncentrace TOCA a Mtr-TOCA se zvýšila 2,1násobně, resp. 2,3násobně v porovnání s TOC. Gluc-TOCA vykazuje pětinašobné zvýšení dostupnosti izotopického indikátoru na buněčném povrchu v porovnání s TOC. Rychlost internalizace (internalizovaný/povrchově navázaný) TOC nebyla glykosylací významněji ovlivněna, zatímco TOCA vykazuje 1,4násobné zvýšení. U Gluc-TOCA a Mtr-TOCA byly

pozorovány 186%, resp. 171% rychlosti internalizace v porovnání s TOC.

Závěr

Při použití AR42J-buněk vede karbohydratace TOCA k významnému zvýšení koncentrace radioligandů na buněčném povrchu a k významnému zvýšení rychlosti internalizace radioligandů.

Příklad 2

Karbohydrátové deriváty Tc-99m-oktreotidu pro SPECT syntézu, radiologické značení a *in vivo* data

V průběhu posledního desetiletí byly testovány různé přístupy k ^{99m}Tc - a ^{18}F -značeným oktreotidovým derivátům pro SSTR-scintigrafii používající SPECT a PET. Decristoforo a kol. prokázal, že ^{99m}Tc -značený HYNIC-Tyr³-oktreotid s EDDA jako koligandem má příznivou biokinetiku a vysokou absorpci tumorem u myši. 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-D-Phe¹-oktreotid, tj. jediný doposud známý ^{18}F -značený oktreotidový analog, vykazuje převážně hepatobiliární exkreci, což se jeví jako nedostatek, pokud jde o jeho využití při *in vivo* SSTR-zobrazování.

Nyní se zjistilo, že N-koncová glykosylace radiologicky jodovaného Tyr³-oktreotidu (TOC) a jeho Thr⁸-derivátu Tyr³-oktreotátu (TOCA) vede k významnému zlepšení biologické distribuce, tj. ke zvýšené akumulaci v tumoru. Za účelem prověření obecné aplikovatelnosti tohoto principu se syntetizovaly glykosylované oktreotidové a

oktreotátové deriváty a hodnotily se v souvislosti s ^{99m}Tc -značením (obr. 2). Jako prekurzory pro ^{99m}Tc -značení se použily *N*-glykosylované deriváty $\text{Lys}^0(\text{N-His})\text{-TOC}$ ($\text{K}^0(\text{H})\text{TOC}$) a organokovový vodný iont $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -přístup [Egli A. a kol. *J. Nucl. Med.* 40: str. 1913 až 1917 (1999)]. Peptid se syntetizoval podle standardního Fmoc-SPPS protokolu. Konjugace s glukózou (Gluc) a maltotriózou (Mtr) se realizovala přes Amadoriho reakci. ^{99m}Tc -Značení Lys5-ochrany zbavených peptidů poskytlo $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Gluc-K}^0(\text{H})\text{TOC}$ a $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Mtr-K}^0(\text{H})\text{TOC}$ s radiochemickým výtěžkem >97 %, vztaženo k vodnému iontu.

Studie biologické distribuce u ^{99m}Tc -značených derivátů (30 min a 120 min p.i.) se prováděla u AR42J-tumor nesoucích lysých myší ($n=3-4$). K realizaci internalizačního a externalizačního experimentu se použila stejná buněčná linie.

Pro $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Gluc-K}^0(\text{H})\text{TOC}$ bylo zjištěno $2,3 \pm 0,8$ násobné zvýšení internalizace a pro $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Mtr-K}^0(\text{H})\text{TOC}$ bylo zjištěno $3,6 \pm 0,4$ násobné zvýšení internalizace oproti referenčnímu $[\text{}^{125}\text{I}]\text{TOC}$. Zatímco $[\text{}^{125}\text{I}]\text{TOC}$ se po inkubaci rychle externalizuje z buňky, $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Gluc-K}^0(\text{H})\text{TOC}$ zůstává zachycen uvnitř buňky až 120 min.

Biologická distribuce $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Gluc-K}^0(\text{H})\text{TOC}$ a $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Mtr-K}^0(\text{H})\text{TOC}$ 2 h p.i. je znázorněna v tabulce 1.

Tabulka 1

Akumulace [% iD/g] [^{99m}Tc]Gluc- $\text{K}^0(\text{H})\text{TOC}$ a [^{99m}Tc]Mtr- $\text{K}^0(\text{H})\text{TOC}$ ve tkáních u AR42J tumor nesoucích lysých myší 2 h p.i. (n=3-4)

	[^{99m}Tc]Gluc- $\text{K}^0(\text{H})\text{TOC}$	[^{99m}Tc]Mtr- $\text{K}^0(\text{H})\text{TOC}$
Krev	1,49±0,18	4,12±0,87
Játra	15,89±2,70	14,34±1,55
Střevo	2,83±0,28	2,02±0,41
Žaludek	11,28±2,74	6,22±0,75
Ledviny	19,49±2,22	17,97±2,76
Sval	0,22±0,04	0,40±0,10
Nadledvinky	6,47±1,46	4,94±0,38
Slinivka	6,43±2,09	3,32±0,38
Tumor	12,21±0,96	14,02±6,33

Obě glykosylované sloučeniny vykazují vysokou akumulaci v sst_2 pozitivní tkáni 120 min p.i. Předpokládá se, že relativně vysoká nespecifická absorpce v exkrečních orgánech, a stejně tak zpožděná krevní clearance, jsou způsobeny nedostatečnou komplexací ^{99m}Tc -jádra bidentátním histidinovým ligandem. Koordinační místo zbývajícího kovu může být *in vivo* nasyceno nativními proteiny obsahujícími thiol, což může vést k rychlému zachycení těchto komplexů v krvi, játrech a dalších exkrečních orgánech. Tvorba nasycených komplexů [$^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ -vodného iontu s tridentátními ligandy, jakými jsou například N-Ac-His, vede k významnému snížení akumulace aktivity v netumorové tkáni. Z výše uvedeného lze vyvodit závěr, že zavedený izotopický indikátor na bázi kombinace karbohydrátové konjugace oktreotidu (oktreotátu) a tridentátní komplexace

$[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO}_3)]^+$ -vodného iontu je základem nové řady velmi slibných SSTR-izotopických indikátorů.

Příklad 3

Glykace agonistů sst-receptorů: Zlepšení dopravy dynamického ligandu radiologicky značených agonistů somatostatinu

Nyní se zjistilo, že karbohydratace je účinným nástrojem pro zlepšení farmakokinetik radiologicky značeného oktreotidu a V_{V33} analogů. Glykace oktreotidu a oktreotátu významně redukuje hepatobiliární exkreci a absorpci v ledvinách a zvyšuje absorpci v tumoru a poměry tumor/tkáň. Akumulace radiologicky značeného sst₂-agonisty v tumoru závisí na dynamických procesech receptorem mediované internalizace, degradace a následné intracelulární akumulace nebo recyklace ligandu a/nebo metabolitu. Kvantitativní analýza každého kroku je velmi důležitá pro pochopení způsobu, jakým je řízena akumulace izotopického indikátoru v tumorových buňkách exprimujících sst₂. Cílem této studie bylo tedy testování vlivu glykace na internalizační a recyklační kinetiku radiologicky značených oktreotidových a oktreotátových analogů.

Tyr³-oktreotid (TOC), Tyr³-oktreotát (TOCA) a jejich příslušné glukózové (Gluc), maltózové (Malt) a maltotriózové (Mtr) deriváty se syntetizovaly přes Fmoc-SPPS a přes následnou konjugaci s karbohydrátem. Radiojodizace se realizovala za použití jodogenní metody. Radiochemický výtěžek se po RP-HPLC purifikaci pohybuje v rozmezí od 50 % do 84 %. Prekurzory pro ^{99m}Tc-značení (Gluc-Lys⁰(N-His)TOC (Gluc-K(H)-TOC) a Mtr-Lys⁰(N-His)TOC

(Mtr-K(H)TOC)) se připravily analogicky s výše zmíněnými peptidy. Značení pomocí ^{99m}Tc se provádělo podle již popsaného protokolu $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ vodný iont [Egli A. a kol. *J. Nucl. Med.* 40: str. 1913 až 1917 (1999)]. Pro srovnání se rovněž do studie zahrnuly ^{111}In OctreoScan a ^{111}In DOTATOC.

Internalizační a externalizační experimenty se prováděly za použití buněčné linie AR42J krysího pankreatického tumoru exprimujícího sst_2 . Volná, k povrchu vázaná a internalizovaná radioaktivita se stanovila po 10 min, 30 min, 60 min, 90 min a 120 min inkubace s radioligandy při 37 °C. Při externalizačních experimentech umožňujících recyklaci ligandů se určovala frakce radioaktivity uvolněné do supernatantu během 10 min, 30 min, 60 min, 90 min a 120 min, a stejně tak radioaktivita, která zůstala v buňkách. Rovněž se měřila aktivita uvolněná během 5 následných inkubací (10 min, 20 min a 3krát 30 min) s výměnou média během následujících inkubací (omezená recirkulace).

Vliv karbohydratace TOC na internalizaci je paralelou velikosti použitého cukru. V porovnání s ^{125}I TOC vykazuje zvýšenou absorpci v buňkách pouze glukózový konjugát. Naopak významně se zvýšila ($7,36 \pm 0,50$ krát a $5,68 \pm 0,38$ krát v porovnání s ^{125}I TOC) intracelulární akumulace ^{125}I Gluc-TOCA i ^{125}I Mtr-TOCA (obr. 3 a tabulka 2). Při porovnání internalizačních charakteristik TOC a TOCA a příslušných glukosylovaných derivátů byl pozorován synergický účinek obou strukturních modifikací (substituce $\text{Thr}(\text{ol})^8$ pomocí Thr^8 a karbohydratace) na povrchovou dostupnost a na rychlost internalizace. V porovnání s ^{111}In OctreoScan a ^{111}In DOTATOC byla internalizace obou

^{99m}Tc -značených karbohydrátových derivátů neočekávaně vysoká.

Předběžné experimenty používající 10 μM Sandostatinu omezily absorpci ligandu na maximálně 5 % kontroly, což naznačuje i) sst_2 specifickou absorpci a ii) že zde není žádný absorpční mechanismus závislý na karbohydrátu (tabulka 2). V případě všech testovaných izotopických indikátorů internalizovaná aktivita silně koreluje s povrchovou dostupností ligandů.

Tabulka 2

Internalizace dat získaných po 60 min inkubace s AR42J buňkami; internalizační hodnoty, a stejně tak poměry, jsou normalizovány na referenční [^{125}I]TOC

^a povrchová dostupnost = % ligandu navázaného na povrch/% volného radioligandu;

^b rychlost internalizace = % internalizovaného ligandu/% ligandu navázaného na povrch;

* předběžné experimenty 10 M Sandostatin redukovaly celulární absorpci ligandu minimálně o 95 %

	Internalizovaný ligand	Povrchová dostupnost	Rychlost internalizace ^c
[^{125}I]Mtr-TOC	42±7*	47±11	87±8
[^{125}I]Malt-TOC	66±4	68±11	95±18
[^{125}I]TOC	100	100	100
[^{125}I]Gluc-TOC	143±14	136±13	110±12
[^{125}I]TOCA	204±7*	182±6	140±8
[^{125}I]Gluc-TOCA	736±50*	583±53	196±2
[^{125}I]Mtr-TOCA	568±38*	312±25	216±26
[^{111}In]OktreoScan	16±2	24±2	63±12
[^{111}In]DOTATOC	30±7	28±7	55±11
[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Gluc-K ⁰ (H)-TOC	234±24	204±54	171±29
[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Mtr-K ⁰ (H)-TOC	298±37	195±35	186±14

Pokud jde o externalizační glykosylaci, potom se zdá, že nemá žádný vliv (obr. 4). Stupeň externalizace radioligandu z buněk je dán zejména povahou peptidu (TOC nebo TOCA) a rovněž intracelulárním osudem značení. Při externalizačním experimentu, který umožňuje recyklaci ligandu, vykazoval TOCA a jeho glykátové deriváty přibližně 2/3 extracelulárně lokalizované radioaktivity v porovnání s

experimentem bez recyklace, zatímco pro TOC, Gluc-TOC a Mtr-TOC bylo zjištěno přibližně 80 %. [^{99m}Tc]Gluc- $\text{K}^0(\text{H})$ -TOC, a stejně tak obě ^{111}In -značené sloučeniny vykazovaly téměř kvantitativní retenci v buňce během 120 min za recyklačních podmínek. Naopak intracelulární aktivita [^{111}In]OctreoScan a [^{111}In]DOTATOC se při omezení recyklace snížila přibližně o 33 %, respektive o 49 %, během 120 min.

Příklad 4

[Tc-99m] $(\text{CO})_3$ -Značené karbohydrátové SSTR-ligandy: syntéza, internalizační kinetika a biologické distribuce na modelu krysího pankreatického tumoru

Cíl

Tato studie má demonstrovat návrh izotopických indikátorů pro specifické a vysokoúrovňové cílení („targeting“) tumorů exprimujících SSTR. Pro tyto účely se použily karbohydrátové oktreotidové deriváty s cílem optimalizovat farmakokinetiku a zlepšit SSTR specifickou internalizaci a retenci v tumoru. Zde bude popsána řada nových karbohydrátových ^{99m}Tc -SSTR ligandů.

Metody

Navázání glukózy (Gluc) a maltotriózy (Mtr) na N-Lys^0 N-(Boc-His(Boc)) Lys^0 -Tyr ^{3} -Lys ^{5} (Dde)-oktreotidu (chráněného K(H)TOC) a konečné odstranění ochrany poskytly Gluc- a Mtr-K(H)TOC. ^{99m}Tc -Značení se provádělo za použití

$[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. Internalizační a externalizační studie (<2 h) se prováděly za použití SSTR₂ exprimující kryší pankreatické buněčné linie AR42J a $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^3$ -oktreotidu ($[^{125}\text{I}]\text{TOC}$) jako referenční látky. Biologická distribuce se hodnotila u lysých myší nesoucích AR42J tumory při 0,5 h a 2 h p.i. (n=4).

Výsledky

Radiologické značení produkovalo (0,5 h, RCY>97 %) rovnoměrné produkty. V porovnání s $[^{125}\text{I}]\text{TOC}$ vykazovaly oba karbohydrátové peptidy vyšší úroveň intercelulární aktivity; např. při 2 h $2,3 \pm 0,2$ násobně vyšší úroveň pro $[^{99m}\text{Tc}]\text{Gluc-K(H)TOC}$ a $3,6 \pm 0,4$ násobně vyšší úroveň pro $[^{99m}\text{Tc}]\text{Mtr-K(H)TOC}$. Externalizační studie ukázaly přibližně 50% snížení intracelulární aktivity pro $[^{125}\text{I}]\text{TOC}$ během 2 h, zatímco intercelulární úroveň $[^{99m}\text{Tc}]\text{Gluc-K(H)TOC}$ byla téměř stabilní po dobu 2 h, což demonstruje retenci tohoto izotopického indikátoru. In vivo akumulace v tumoru dosáhla $12,2 \pm 1,0$ a $14,0 \pm 6,33$ % ID/g při 2 h p.i. a při krevních hladinách $1,5 \pm 0,2$ % ID/g a $4,4 \pm 1,0$ % ID/g pro $[^{99m}\text{Tc}]\text{Gluc-K(H)TOC}$ (T/játra 0,77, T/ledviny 0,63), respektive pro $[^{99m}\text{Tc}]\text{Mtr-K(H)TOC}$ (T/játra 0,97, T/ledviny 0,84).

Závěr

Tyto výsledky potvrzují použitelnost karbohydratace jako nástroje pro zlepšení SSTR cílení („targeting“).

Příklad 5

[Tc-99m] (CO)₃-Značené karbohydrátové SSTR-ligandy: syntéza, internalizační kinetika a biologická distribuce na modelu krysího pankreatického tumoru

Cíl

Tato studie je součástí výzkumu izotopických indikátorů pro specifické a vysokoúrovňové cílení („targeting“) SSTR exprimujících tumorů. Pro tyto účely se použily vhodné karbohydrátové zbytky, s cílem optimalizovat farmakokinetiku a zlepšit SSTR specifickou internalizaci a retenci v tumoru. Budou zde prvně popsány karbohydrátové SSTR vážící peptidy značené způsobem [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ vodný iont.

Metody

N(Boc-His(Boc))Lys⁰-Tyr³-Lys⁵(Dde)-Oktreotid (chráněný K(H)TOC) se syntetizoval za použití standardní Fmoc-chemie. Navázání glukózy (Gluc) a maltotriózy (Mtr) na N-Lys⁰ a konečné odstranění ochrany poskytly Gluc- a Mtr-deriváty K(H)TOC. Tc-99m-Značení se provádělo za použití organokovového vodného iontu [^{99m}Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ (Egli A. a kol. J. Nucl. Med. 40: str. 1913 až 1917 (1999)). Internalizační a externalizační studie (<120 min) se v případě obou sloučenin prováděly za použití SSTR₂ exprimující buněčné linie AR42J. Při in vitro studiích se jako referenční látka použil [¹²⁵I]Tyr³-oktreotid ([¹²⁵I]TOC). Biologická distribuce intravenózně podávaného [^{99m}Tc]Gluc-K(H)TOC a [^{99m}Tc]Mtr-K(H)TOC se hodnotila u

lysých myší nesoucích AR42J krysí pankreatické tumory při 30 min a 120 min p.i. (n=4).

Výsledky

Tento postup značení se jevil jako účinný (30 min, RCY>97 %) a poskytoval rovnoměrné produkty (HPLC). V porovnání s referenčním [^{125}I]TOC byly oba karbohydrátové peptidy po celou dobu testování mnohem více internalizovány; například při 120 min byly zjištěny $2,3 \pm 0,2$ násobně vyšší hladiny pro [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Gluc-K(H)TOC a $3,6 \pm 0,4$ násobně vyšší hladiny pro [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Gluc-K(H)TOC a $3,6 \pm 0,4$ násobně vyšší hladiny pro [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Mtr-K(H)TOC. Externalizační studie dále odhalily přibližně 50% snížení intracelulární aktivity pro referenční sloučeninu během 120 min, zatímco vysoká hladina intracelulární aktivity [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Gluc-K(H)TOC zůstala stabilní dokonce i po 2 h, což naznačuje retenci tohoto izotopického indikátoru v testované buněčné linii. In vivo akumulace v tumoru dosáhla $12,2 \pm 1,0$ a $14,0 \pm 6,3$ % ID/g při 120 min p.i. při odpovídajících hladinách krevní aktivity $1,5 \pm 0,2$ % ID/g a $4,4 \pm 1,0$ % ID/g pro [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Gluc-K(H)TOC (T/játra 0,77, T/ledviny 0,63), respektive [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Mtr-K(H)TOC (T/játra 0,97, T/ledviny 0,84).

Závěr

Tyto výsledky potvrzují použitelnost karbohydratace jako nástroje pro zlepšení SSTR cílení („targeting“).

Příklad 6

Syntéza peptidu v pevné fázi

1. Fmoc-Lys⁰-Tyr³-Lys(Dde)⁵-oktreotid
(Fmoc-Lys⁰-TOC(Dde)) Fmoc-Thr(tBu)-ol

Roztok Fmoc-Thr(tBu)-OH (1,391 g, 3,5 mmol) ve 30 ml tetrahydrofuranu (THF) se ochladil na -10 °C. Postupně se přidal N-methylmorpholin (386 µl, 3,5 mmol) a ethylchlorformiát (333 µl, 3,5 mmol). Reakční směs se 30 min míchala při -10 °C. Přidal se borohydrid sodný (396 mg, 10,5 mmol). Během 30 min se do reakční směsi pozvolna přidalo 60 ml methanolu a směs se následně míchala 3 h při 0 °C.

Po přidání 50 ml až 70 ml 1N HCl (zakalená směs se vyčeřila) se odpařila organická rozpouštědla a zbývající vodná fáze se dvakrát extrahovala dichlormethanem (DCM). Extrakcí účinnost se monitorovala pomocí chromatografie na tenké vrstvě (R_f produktu = 0,83 v ethylacetátu (AcOEt)) obou fází. Sloučené organické vrstvy se vysušily nad bezvodým síranem hořečnatým, přefiltrovaly a po zahuštění za vakua poskytly nažloutlý olej. Surový produkt se purifikoval mžikovou chromatografií za použití AcOEt. Produkt se získal ve formě oleje (1,19 g, 89 %). Vypočtená monoizotopická hmotnost pro $C_{23}H_{29}NO_4$ = 383,21; nalezená: m/z = 406,1 $[M=Na]^+$.

SPPS Fmoc-Lys⁰-Dphe¹-Cys²-Tyr³-DTrp⁴-Lys(Dde)⁵-Thr⁶-Cys⁷-Thr-ol⁸

DHP-HM (3,4-Dihydro-2H-pyran-2-ylmethoxymethylpoly-styrolová) pryskyřice (1,000 g, 0,94 mmol/g) se nechala 1 h předboptnat v 10 ml bezvodého DCE (1,2-dichlorethan). Potom

se přidal roztok Fmoc-Thr(tBu)-olu (1,266 g, 3,3 mmol) a pyridinium-*p*-toluensulfonátu (414 mg, 1,75 mmol) v 7 ml bezvodého DCE a získaná reakční směs se míchala přes noc při 80 °C pod argonovou atmosférou. K nechráněným volným funkčním skupinám na pryskyřici se přidalo 5 ml pyridinu a suspenze se míchala dalších 15 min při teplotě místnosti. Zatížená pryskyřice se následně odfiltrovala, dvakrát propláchla DMF (*N,N*-dimethylformamid) a DCM a vysušila v exsikátoru. Finální zatížení pryskyřice bylo 0,834 mmol/g. Peptidová sekvence se na pryskyřici vážící aminoalkohol navázala za použití standardního Fmoc-protokolu. Stručně řečeno, *N*-koncový Fmoc se odstranil za použití 20% piperidinu v DMF a pryskyřice peptidu navázaného na pryskyřici se propláchla NMP (*N*-methylpyrrolidon). Navázání se provádělo v NMP uvedením 1,5 ekviv. aminokyselinového derivátu do reakce s 1,5 ekviv. HOBt (1-hydroxybenzotriazolu), 1,5 ekviv. TBTU (*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluorborátu) a 3,5 ekviv. DIPEA (*N*-ethyl-diisopropylaminu). Po umístění aktivované aminokyseliny do reakční nádoby se pryskyřice po vhodné dobu míchala (zpravidla 40 min až 60 min). Pryskyřice se potom propláchla dalším NMP. Postup přidání pro syntézu TOC byl následující: Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Lys(Dde), Fmoc-DTrp, Fmoc-Tyr, Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Dphe a Fmoc-Lys(Boc). Po navázání poslední aminokyseliny do sekvence se pryskyřice několikrát propláchla NMP a DCM. Odštěpení z pryskyřice a zbavení ochrany Thr-, Cys- a Lys⁰-vedlejších řetězců se prováděla za použití směsi TFA (kyselina trifluoroctová)/TIBS (triisobutylsilan)/voda (95:2,5:2,5) a DCM (1:1). Po 90 min se pryskyřice odfiltrovala a dvakrát propláchla DCM. Sloučené filtráty se zahustily za použití rotační odparky a

surový produkt se vysrážel etherem. Získalo se 828 mg surového produktu a výtěžek činil 83 %.

Surový peptid se resuspendoval v 50 ml THF (na 300 mg peptidu) a přidávalo se 5 mmol octanu amonného, dokud se nezískal čirý roztok. Hodnota pH se nastavila na 7 po kapkách přidávaným nasyceným roztokem NaHCO_3 . Potom se přidalo 100 μl (na 300 mg peptidu) peroxidu vodíku (30%). Po 30 min míchání při teplotě místnosti byla cyklizace kompletní (gradient HPLC-kontrola: 30 % až 80 % E během 15 min). Rozpouštědla se odpařila a cyklizovaný produkt se lyofilizoval. Výtěžky byly kvantitativní.

Vypočtená monoizotopická hmotnost pro

$\text{C}_{80}\text{H}_{100}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{S}_2 = 1548,68$; nalezená: $m/z = 1549,5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$,

$m/z = 1571,5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2. Fmoc-Lys⁰-Tyr³-Lys(Dde)⁵-oktreotid (Fmoc-Lys⁰-TATE(Dde))

Fmoc-Lys⁰-Dphe¹-Cys²-Tyr³-DTrp⁴-Lys(Dde)⁵-Thr⁶-Cys⁷-Thr⁸

Do 1,502 g bezvodé TCP-pryskyřice se přidal roztok 894 mg (2,25 mmol) Fmoc-Thr(tBu) a 321 μl (1,87 mmol) DIPEA v 15 ml bezvodého DCM. Po 5 min míchání se přidalo dalších 642 μl (3,76 mmol) DIPEA. Po 90 min bouřlivého míchání při teplotě místnosti se k nezreagovaným tritylchloridovým skupinám přidalo 1,5 ml methanolu. Po 15 min se pryskyřice přefiltrovala, dvakrát propláchla DCM, DMF a methanolem a vysušila za vakua. Finální zatížení pryskyřice bylo 0,77 mmol/g. Syntéza peptidové sekvence Cys(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Dde)-DTrp-Tyr-Cys(Trt)-Dphe-Lys(Boc)-Fmoc na amino-kyselině navázané na pryskyřici, odstranění ochrany a odštěpení z pryskyřice, a stejně tak cyklizace, se prováděly způsobem popsáním pro Fmoc-Lys⁰-TOC(Dde).

Vypočtená monoizotopická hmotnost pro

$C_{80}H_{98}N_{12}O_{17}S_2 = 1562,66$; nalezená: $m/z = ([M+H]^+)$.

Derivatizace v roztoku

1. $Lys^0(N_\epsilon\text{-Boc-His(Boc)})\text{-TOC(Dde)}$

Roztok 500 mg (0,32 mmol) Fmoc- $Lys^0\text{-TOC(Dde)}$, 170 mg (0,48 mmol) Boc-His(Boc), 65 mg (0,048 mmol) HOBt, 154 mg (0,48 mmol) TBTU a 300 μ l (1,75 mmol) DIPEA ve 3 ml DMF se míchal při teplotě místnosti. RP-HPLC Analýza (gradient: 30 % až 80 % B během 15 min) ukázala, že k ukončení reakce došlo během 30 min. Produkt se vysrážel za použití vody a vysušil za vakua. Po odstranění N-koncové Fmoc-ochranné skupiny se peptid rozpustil v 1 ml piperidinu/DMF (1:4) a 15 min míchal. Vysrážení etherem poskytlo ochrany zbavený produkt ve výtěžku 86 %.

Vypočtená monoizotopická hmotnost pro

$C_{81}H_{113}N_{15}O_{19}S_2 = 1663,78$; nalezená: $m/z = 1873,6$ $[M+H]^+$,

$m/z = 1895,7$ $[M+Na]^+$.

2. $Lys^0\text{-N}_\alpha\text{-Amadoriho deriváty } Lys^0\text{(Boc-His(Boc))}\text{-TOC(Dde)}$

Na základě již popsaného způsobu [Egli A. a kol. J. Nucl. Med. 40: str. 1913 až 1917 (1999)] se 1 ekviv. $Lys^0\text{(Boc-His(Boc))}\text{-TOC(Dde)}$ a 10 ekviv. příslušné aldózy (glukóza = S1, maltóza = S2, maltotrióza = S3) rozpustily ve směsi methanolu a kyseliny octové (95:5) a reakční směs se míchala 24 h až 48 h při 60 °C. Rozpouštědla se odpařila a surový produkt se vysrážel přidáním etheru.

Za účelem odstranění Dde-ochranné skupiny se glykosylovaný peptid opět rozpustil v malém objemu DMF,

přidala se 2 % obj. hydrátu hydrazinu a roztok se 15 min míchal při teplotě místnosti. Ochrany zbavený peptid se vysrážel přidáním etheru, propláchl etherem a vysušil za vakua. Boc-ochranné skupiny na His-zbytku se potom odstranily znovu rozpuštěním surových produktů v malém objemu TFA/TIBS/vody (95:2,5:2,5) a 15 min míchání při teplotě místnosti. Produkty se vysrážely za použití etheru a purifikovaly preparativní RP-HPLC (gradient: 10 % až 60 % B během 30 min). Výtěžky se pohybovaly v rozmezí od 17 % do 32 %.

S1

Lys⁰(His)TOC(N_a-(1-deoxy-D-fruktosyl)-Lys⁰N-His)-Tyr³-
-oktreotid): vypočtená monoizotopická hmotnost pro
C₆₇H₉₅N₁₅O₁₈S₂ = 1461,60; nalezená: m/s = 1873,6 [M+H]⁺,
m/z = 1895,7 [M+Na]⁺

S2

Lys⁰(His)TOC(N-(O-D-glukopyranosyl-(1-4)-1-deoxy-D-
-fruktosyl)-Lys⁰(N_e-His)-Tyr³-oktreotid): vypočtená
monoizotopická hmotnost pro C₇₃H₁₀₅N₁₅O₂₃S₂ = 1623,70;
nalezená: m/z = 1873,6 [M+H]⁺, m/z = 1895,7 [M+Na]⁺

S3

Lys⁰(His)TOC(N_a-(O-_a-D-glukopyranosyl-(1-4)-O-_a-D-glukopy-
ranosyl-(1-4)-1-deoxy-D-fruktosyl)-Lys⁰(N-His)-Tyr³-
-oktreotid: vypočtená monoizotopická hmotnost pro
C₇₉H₁₁₅N₁₅O₂₈S₂ = 1785,75; nalezená: m/z = 1873,6 [M+H]⁺,
m/z = 1895,7 [M+Na]⁺

3. Lys⁰(N-2-pikolylamino-...)TATE(Dde)2-Pikolylamín kyseliny N,N-dioctové²

Kyselina iminodioctová (3,25 g, 24,4 mmol) se rozpustila ve směsi 30 ml bezvodého ethanolu a roztoku 1,95 g NaOH (49 mmol) v 10 ml vody. Po přidání 4,00 g pikolylchloridu (24,4 mmol) v 9 ml vody a 1,95 g NaOH (49 mmol) v 4 ml vody se roztok míchal 2 h při 70 °C. Potom se přidalo dalších 1,95 g (49 mmol) NaOH a roztok se míchal další 1,5 h při 70 °C. TLC Kontrola reakce (AcOEt) v tomto okamžiku ukázala úplné vymizení reakčních složek. Rozpouštědla se odpařila za vakua a zbytek se opět rozpustil ve 25 ml vody. Po nastavení pH hodnoty roztoku na 1,5 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou se roztok opět odpařil dosucha. Několika následnými kroky, které zahrnovaly resuspendaci zbytku methanolem pod zpětným chladičem, filtraci horké suspenze a zahuštění filtrátu za vakua, se úspěšně odstranil přebytek NaCl. Kyselina pikolylamínodioctová se nechala přes noc krystalizovat ze zbývajícího methanolového roztoku při -20 °C. Vypočtená monoizotopická hmotnost pro C₁₀H₁₂N₂O₄ = 224,08; nalezená: m/z = [M-H]⁺ (disodná sůl).

Navázání 2-pikolylamínu kyseliny N,N-dioctové na Fmoc-Lys⁰-TATE(Dde)

Roztok 52 mg (0,19 mmol) 2-pikolylamínu kyseliny N,N-dioctové, 26 mg (0,19 mmol) HOBt, 62 mg (0,19 mmol) TBTU a 176 µl (1,75 mmol) DIPEA ve 2 ml DMF se 10 min míchal při teplotě místnosti. Tento roztok se po kapkách přidal do roztoku 200 mg (0,13 mmol) Fmoc-Lys⁰-TATE(Dde) v 1 ml DMF, a to za bouřlivého míchání. Po 30 min se produkt

vysrážel za použití diethyletheru vysušil za vakua. Ve snaze odstranit N-koncovou Fmoc-ochrannou skupinu se peptid rozpustil ve 2 ml piperidin/DMF (1:4) a míchal 10 min. Vysrážení etherem poskytlo ochrany zbavený produkt ve výtěžku 84 %.

Vypočtená monoizotopická hmotnost pro

$C_{75}H_{98}N_{14}O_{18}S_2 = 1546,66$; nalezená: $m/z = [M+H]^+$,

$m/z = [M+Na]^+$.

4. Lys⁰-N_a-Amadoriho deriváty Lys⁰(Pic)TATE(Dde)

Konjugace Lys⁰(Pic)TATE(Dde) s glukózou a následné odstranění Dde-ochrany se provádělo způsobem popsáným pro Lys⁰-N_a-Amadoriho deriváty Lys⁰(Boc-His(Boc))-TOC(Dde).

Vypočtená monoizotopická hmotnost pro

$C_{71}H_{96}N_{14}O_{21}S_2 = 1544,63$; nalezená: $m/z = [M+H]^+$,

$m/z = [M+Na]^+$.

Radiologické značení

Podle nedávno zveřejněné metody organokovový vodný iont $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ se ve skleněné baňce rozpustilo 3,10 mg NaBH_4 , 8 mg Na_2CO_3 a 41,5 mg Na/K vinanu v 600 μl $[^{99m}\text{Tc}]$ pertechnetátového eluátu. Baňka se následně propojila s balónem naplněným CO a utěsnila. Po 45 min míchání při 75 °C se roztok ochladil na ledové lázni a přidalo se 150 μl fosfátem pufovaného solného roztoku (PBS, hodnota pH 7,4). Za účelem likvidace redukčního činidla se přidalo 600 μl 1N roztoku HCl. Potom se roztok neutralizoval 500 μl nasyceného roztoku NaHCO_3 . Přítomnost $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ -

-vodného iontu se potvrdila pomocí TLC (5% roztok HCl v methanolu).

Po přidání 1 ml [$^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^{1+}$ -roztoku (51 MBq) do 700 μg S1-Lys ^{0} (His)TOC se směs ohřívala 30 min při 75 °C. Gradientová HPLC purifikace poskytla radiochemicky čistý peptid $\text{Na}-(1\text{-deoxy-D-fruktosyl})\text{Lys}^0(\text{N-His}[\text{N}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^{1+})\text{-Tyr}^3\text{-oktreotid}$ s radiochemickým výtěžkem 34 %. S3-Lys ^{0} (His)TOC se označil analogickým způsobem.

Stanovení lipofilicity

Do roztoku přibližně 300 000 cpm (počet odčítacích impulsů za minutu) radioaktivně značeného peptidu v 500 ml PBS (hodnota pH 7,4), se přidalo 500 ml oktanolu ($n=6$). Lahvičky se 3 min protřepávaly a následně se 6 min odstřeďovaly při frekvenci otáčení 15 000 min^{-1} . Alikvotní podíly 100 ml PBS a oktanolu se měřily v γ -čítači.

S1-Lys ^{0} (His)TOC: $\log \text{pow} = -0,673 \pm 0,064$

S3-Lys ^{0} (His)TOC: $\log \text{pow} = -1,304 \pm 0,040$

Experimenty *in vitro*

AR42J Buňky se udržovaly v RPMI 1640 a doplnily 10% FCS a 2 mM L-glutaminem.

Internalizační studie

Šestijamkové plotny s buněčnou populací 8krát 10^5 až 5krát 10^6 AR42J buněk na jamku se 1 h před experimentem inkubovaly při 37 °C s čerstvým kultivačním médiem (RPMI

1640, 1% BSA, 2 mM L-glutamin). Potom se do každé jamky přidalo přibližně 300 000 cpm (počet odčítacích impulsů za minutu) radiologickým kovem značeného peptidu v 10 μ l kultivačního média (experimenty pro referenční sloučeninu (vnitřní standard) [^{125} I]TOC a pro každou radiologickým kovem značenou sledovanou sloučeninu se prováděly vždy třikrát). Po 10 min, 30 min, 60 min, 90 min nebo 120 min inkubace při 37 °C se supernatant jímá a buňky se jednou propláchly 1 ml studeného média. Supernatant se sloučil se supernatantem z předcházejícího kroku. Za účelem odstranění radioaktivity navázané na receptoru (uvolnitelné pomocí kyseliny) se buňky inkubovaly při 37 °C s 1 ml 0,02M roztoku NaOAc (průplach kyselinou). Po 10 min se jímá supernatant, buňky se jednou propláchly 1 ml 0,02M roztoku NaOAc a supernatant se opět sloučil se supernatantem z předcházejícího kroku. Následně se buňky extrahovaly 1 ml 1N roztoku NaOH a jamky se jednou propláchly PBS. Tato sloučená frakce reprezentuje internalizovaný radioligand. Aktivita v NaOH frakci, a stejně tak ve frakci supernatantu a kyselinového průplachu, se sečetla v γ -čítači.

Externalizační studie

Stejně, jak bylo popsáno v souvislosti s internalizačními studiemi, se 1 h před experimentem šestijamkové plotny inkubovaly při 37 °C s čerstvým kultivačním médiem (RPMI 1640, 1% BSA, 2 mM L-glutamin). Potom se do každé jamky přidalo přibližně 300 000 cpm (počet odčítacích impulsů za minutu) radiologickým kovem značeného peptidu v 10 μ l kultivačního média (experimenty pro referenční sloučeninu (vnitřní standard) [^{125} I]TOC a pro každou radiologickým kovem značenou sledovanou sloučeninu

se prováděly vždy třikrát). Po 120 min inkubace při 37 °C se supernatant jímá a buňky se jednou propláchly 1 ml studeného média. Supernatant se sloučil se supernatantem z předcházejícího kroku. Pro kolekci externalizované radioaktivity se buňky následně inkubovaly při 37 °C 1 ml kultivačního média. Po 10 min, 30 min, 60 min, 90 min nebo 120 min inkubace při 37 °C se supernatant jímá a buňky se jednou propláchly 1 ml kultivačního média a supernatant se sloučil se supernatantem z předcházejícího kroku. Následně se buňky extrahovaly 1 ml 1N roztoku NaOH a jamky se jednou propláchly PBS. Tato sloučená frakce reprezentuje radioligand doposud lokalizovaný v buňce. Aktivita v NaOH frakci, a stejně tak ve frakci supernatantu a v externalizační frakci, se sečetla v γ -čítači.

Externalizační studie bez recyklace izotopického indikátoru

Stejně, jak bylo popsáno v předchozích experimentech, se šestijamková plotna inkubovala 120 min při 37 °C s radioligandem. Supernatant se jímá a buňky se jednou propláchly 1 ml studeného média. Supernatant se sloučil se supernatantem z předcházejícího kroku. Za účelem kolekce externalizované radioaktivity se buňky následně inkubovaly při 37 °C s 1 ml kultivačního média. Po 10 min se supernatant jímá a buňky se opět inkubovaly po dalších 20 min s 1 ml kultivačního média při 37 °C. Supernatant se jímá a buňky se ještě třikrát 30 min inkubovaly s 1 ml kultivačního média při 37 °C. Potom se buňky extrahovaly 1 ml 1N roztoku NaOH a jamky se jednou propláchly PBS. Tato sloučená frakce reprezentuje radioligand doposud lokalizovaný v buňce. Aktivita v NaOH frakci, a stejně tak

v externalizačních frakcích, se pro všechny časy sčítala v γ -čítači.

Studie biologické distribuce

Při stanovení růstu nádorů se jednodlitá monovrstva buněk ošetřila 1mM EDTA, suspendovala, odstředila a resuspendovala v RPMI 1640.

Lysé myši (samci a samice, stáří 6 až 8 týdnů) se naočkovaly s.c. tak, že se 2,5krát 10^7 až 3krát 10^7 buněk suspendovaných ve 100 μ l PBS (hodnota pH 7,4) injektovalo i.v. do ocasní žíly lysých myší nesoucích AR42J tumor. Zvířata ($n=3-4$) se usmrtila 30 min a 120 min p.i. a sledované orgány se vyjmuly. Radioaktivita se měřila v odvážených vzorcích tkáně za použití γ -čítače. Data jsou vyjádřena v % iD/g tkáně (průměr $\pm$ DS, $n = 3$ až 4).

Tabulka 1

Akumulace tkáně [% iD/g] [^{99m}Tc]S1-Lys⁰(His)TOC a [^{99m}Tc]S3-Lys⁰(His)TOC ve tkáních u AR42J tumor nesoucích lysých myší 2 h p.i. ($n=3-4$)

	[^{99m}Tc]S1-Lys ⁰ (His)TOC	[^{99m}Tc]S3-Lys ⁰ (His)TOC
Krev	1,49 $\pm$ 0,18	4,12 $\pm$ 0,87
Játra	15,89 $\pm$ 2,70	14,34 $\pm$ 1,55
Střevo	2,83 $\pm$ 0,28	2,02 $\pm$ 0,41
Žaludek	11,28 $\pm$ 2,74	6,22 $\pm$ 0,75
Ledviny	19,49 $\pm$ 2,22	17,97 $\pm$ 2,76
Sval	0,22 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,10
Nadledvinky	6,47 $\pm$ 1,46	4,94 $\pm$ 0,38
Slinivka	6,43 $\pm$ 2,09	3,32 $\pm$ 0,38
Tumor	12,21 $\pm$ 0,96	14,02 $\pm$ 6,33

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Peptidický ligand, který váže receptor somatostatinu (sst) a který obsahuje přírodní nebo umělé aminokyseliny nebo peptidomimetickou strukturu, alespoň jeden karbohydrát a alespoň jednu chelatační skupinu umožňující monodentátní nebo multidentátní komplexaci radioizotopu zvoleného z Tc a Re.

2. Peptidický ligand podle nároku 1, kde radioizotopem je izotop Tc.

3. Peptidický ligand podle nároku 1, kde je chelatační skupina navázána na N-konec peptidu a karbohydrát je navázán na chelatační skupinu.

4. Peptidický ligand podle nároku 1, kde je karbohydrát navázán na N-konec peptidu a chelatační skupina je navázána na karbohydrát.

5. Peptidický ligand podle nároku 1, kde karbohydrátem je cukr.

6. Peptidický ligand podle nároku 5, kde cukrem je monosacharid nebo polysacharid.

7. Peptidický ligand podle nároku 1, který dále obsahuje alespoň jednu multifunkční linkerovou jednotku.

8. Peptidický ligand podle nároku 7, kde cukr je navázán na receptor vážící strukturu, na multifunkční linkerovou jednotku nebo na chelátor přes glykosidovou vazbu.

9. Peptidický ligand podle nároku 7, kde cukr je vazebným produktem mezi aminoskupinou v receptor vážící struktuře, mezi multifunkční linkerovou jednotkou nebo mezi chelátorem a aldózou, který se získá pomocí Amadoriho reakce.

10. Peptidický ligand podle nároku 7, kde cukr je zvolen z množiny sestávající z glukózy, maltózy a maltotriózy.

11. Peptidický ligand podle nároku 7, kde ligand je na N-konci glykosylovaný.

12. Peptidický ligand podle nároku 7, kde radioizotop je zvolen z množiny sestávající z izotopů Tc a Re.

13. Peptidický ligand podle nároku 7, kde multifunkční linkerová jednotka je kombinována s N-konci peptidu a

karbohydrát a chelatační skupina jsou navázány na multifunkční linkerovou jednotku.

14. Peptidický ligand podle nároku 7, kde multifunkční linkerová jednotka je navázána na N-konec ligandu, chelatační skupina je navázána na multifunkční linkerovou jednotku a karbohydrát je navázán na chelatační skupinu.

15. Peptidický ligand podle nároku 1, který dále obsahuje alespoň jednu multifunkční linkerovou jednotku a alespoň dvě peptidické skupiny struktur vážících sst-receptor.

16. Peptidický ligand podle nároku 14, kde dvě peptidické skupiny jsou navázány na multifunkční linkerovou jednotku a chelatační skupina i karbohydrát jsou navázány na multifunkční linker.

17. Peptidický ligand podle nároku 14, ve kterém se nacházejí dvě karbohydrátové jednotky, z nichž každá je navázaná na N-konec jedné z peptidických jednotek, přičemž každá z uvedených karbohydrátových jednotek je navázána na multifunkční linkerovou jednotku, a chelatační skupina je navázána na multifunkční linkerovou jednotku.

18. Peptidický ligand podle nároku 14, ve kterém se nachází dvě multifunkční linkerové jednotky, z nichž každá

je navázána na N-konci peptidu, dále jedna chelatační skupina vážící multifunkční linkerové jednotky a rovněž dvě karbohydrátové skupiny, z nichž každá je navázaná na jednu z multifunkčních linkerových jednotek.

19. Peptidický ligand podle nároku 14, kde radioizotop je zvolen z množiny sestávající z izotopů Tc a Re.

20. Peptidický ligand podle nároku 14, kde karbohydrátem je cukr, který je vazebným produktem mezi aminoskupinou v receptor vážící struktuře, mezi multifunkční linkerovou jednotkou nebo mezi chelátorem a aldózou, který se získá pomocí Amadoriho reakce.

21. Peptidický ligand podle nároku 14, kde cukr je navázán na strukturu vážící receptor, na multifunkční linkerovou jednotku nebo na chelátor přes glykosidovou vazbu.

22. Farmaceutická kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje peptidický ligand podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič.

23. Farmaceutická kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje peptidický ligand podle nároku 7 a farmaceuticky přijatelný nosič.

24. Farmaceutická kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje peptidický ligand podle nároku 14 a farmaceuticky přijatelný nosič.

25. Způsob zobrazování zvolený z množiny sestávající z sst-zobrazování, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podání farmaceutické kompozice podle nároku 22 pacientovi.

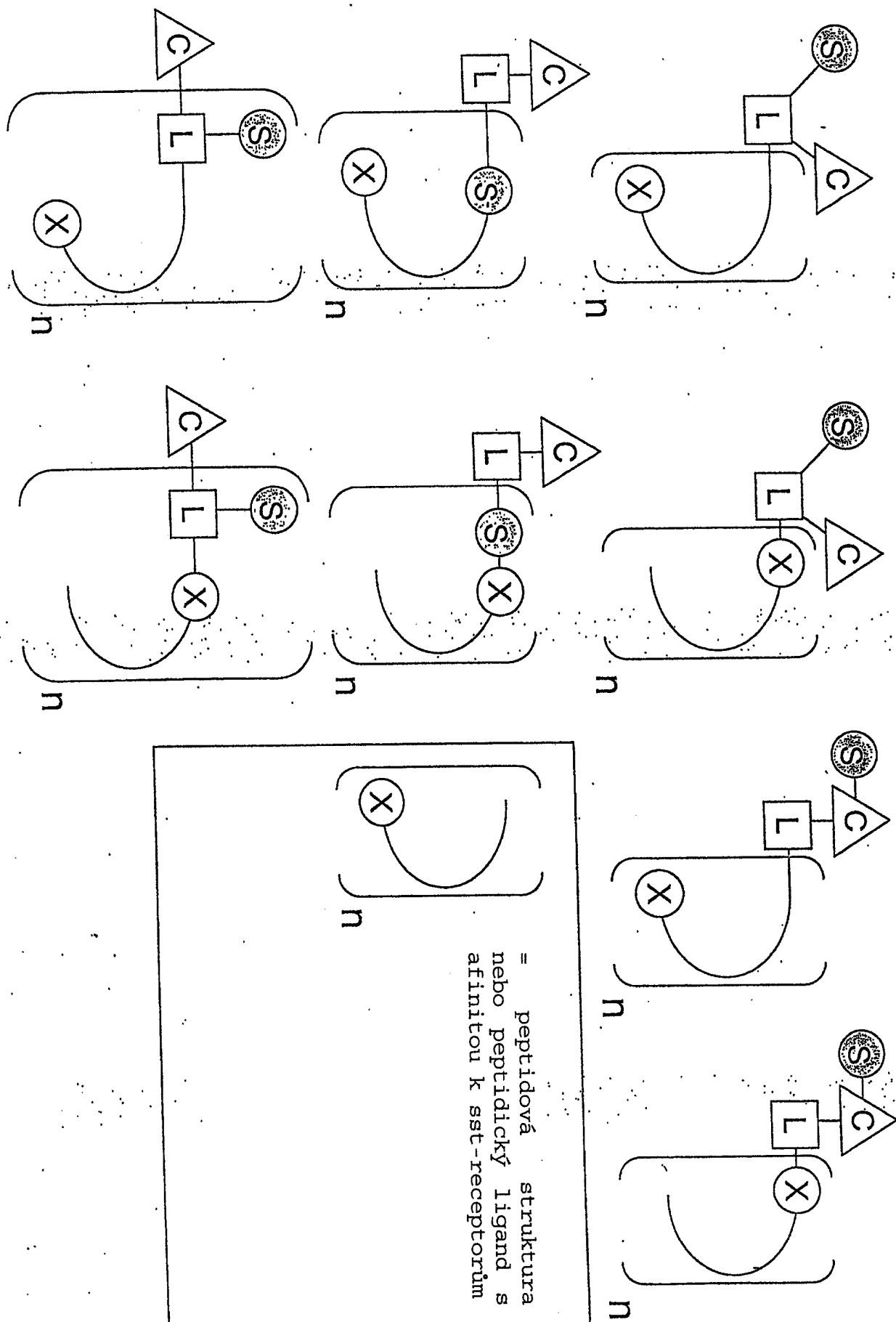
26. Způsob zobrazování zvolený z množiny sestávající z sst-zobrazování, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podání farmaceutické kompozice podle nároku 23 pacientovi.

27. Způsob zobrazování zvolený z množiny sestávající z sst-zobrazování, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podání farmaceutické kompozice podle nároku 24 pacientovi.

28. Sloučenina [^{99m}Tc]Gluc-K⁰(H)TOC.

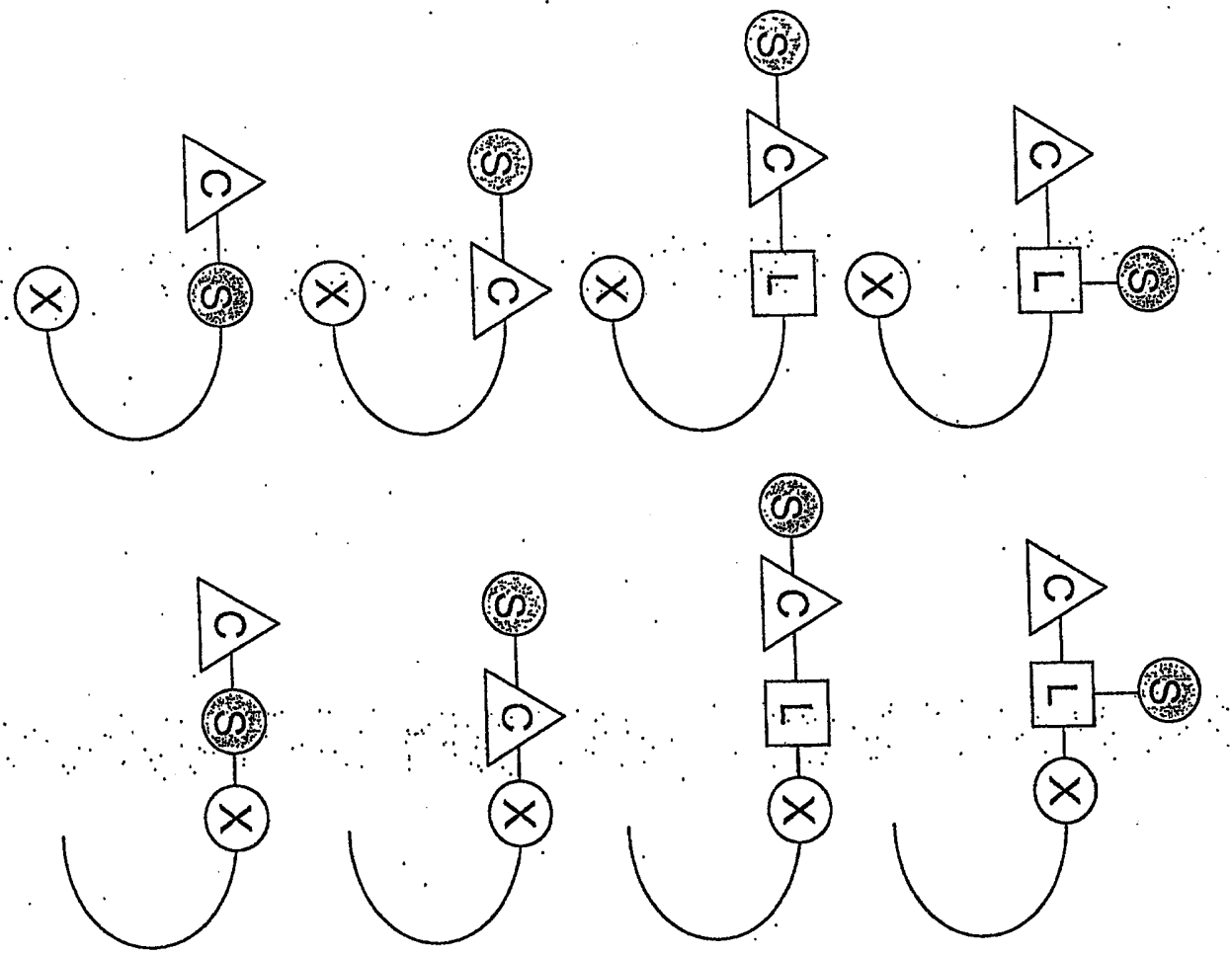
29. Sloučenina [^{99m}Tc]Mtr-K⁰(H)TOC.

Obr. 1A



2/2

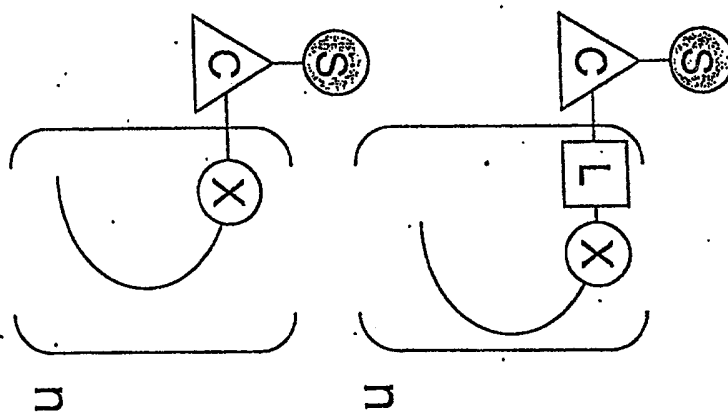
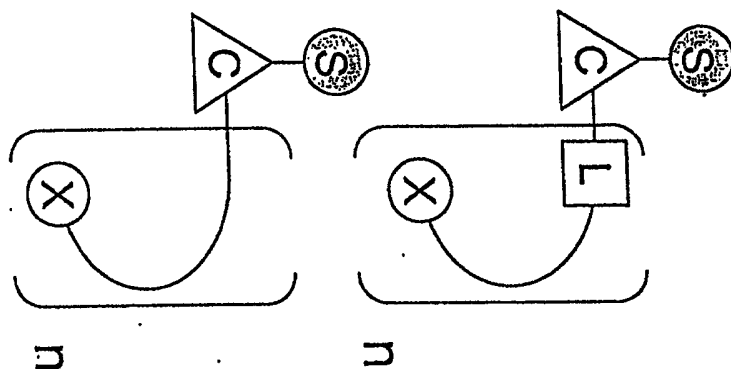
2007-2872



Obr. 1B

7/1

2003-2572



obr. 1c