

# Radiooznačeni peptidi v nuklearni medicini

## Radiolabelled peptides in nuclear medicine

Marko Krošelj,<sup>1</sup> Petra Kolenc Peitl,<sup>1</sup> Aljaž Sočan,<sup>1</sup> Marijana Leskovec,<sup>1</sup>  
Irena Mlinarič Raščan,<sup>2</sup> Tanja Gmeiner<sup>2</sup>

### Izvleček

Nuklearna medicina pri obravnavi onkoloških bolnikov omogoča slikovni prikaz oziroma umeščenost tumorjev, ciljano zdravljenje ter spremljanje uspešnosti zdravljenja. Visoko specifične radiooznačene peptidne učinkovine lahko izkoristimo za ciljanje tumorskih celic, ki imajo na svoji površini čezmerno izražene receptorje za te učinkovine. Enako peptidno učinkovino lahko radiooznačimo tako z diagnostičnimi kot terapevtskimi radionuklidi. Ti teranostični pari učinkovin omogočajo personalizirani pristop pri obravnavi bolnikov. V preglednem članku opisujemo dva sistema teranostičnih parov, ki jih v nuklearni medicini uporabljamo za diagnosticiranje ter zdravljenje tumorjev. Klasičen primer takšnih teranostičnih parov so radiooznačeni analogi somatostatina, ki se rutinsko uporabljajo pri diagnosticiranju ter zdravljenju neuroendokrinih tumorjev (NET) s čezmerno izraženimi receptorji za somatostatin. Radiooznačeni analogi minigastrina, ki se vežejo na receptorje za holecistokinin-2, pa so primerni za diagnosticiranje medularnega raka ščitnice (MTC), za uporabnost in varnost pri zdravljenju pa še potekajo klinična preskušanja.

### Abstract

Nuclear medicine plays an important role in the management of oncology patients. It enables visualization and localization of tumours, targeted radionuclide therapy and monitoring patient response to therapy. Highly specific peptide molecules can target tumour cells with overexpressed receptors for regulatory peptides and their analogues. When these peptides are radiolabelled, we can use them either for diagnosis or therapy, depending on the radionuclide used. These theranostic pairs enable nuclear medicine a personalized approach to patient management. The purpose of this review is to describe the overview of radiolabelled peptides and to present two theranostic systems used in nuclear medicine. Classical examples of theranostic pairs are radiolabelled somatostatin analogues that are routinely used in diagnosis and targeted radionuclide therapy of neuroendocrine neoplasms (NEN). On the other hand, radiolabelled minigastrin analogues can be used for the diagnosis of metastatic medullary thyroid carcinoma (MTC) and have a potential to be used also in targeted radionuclide therapy.

**Citirajte kot/Cite as:** Krošelj M, Kolenc Peitl P, Sočan A, Leskovec M, Mlinarič Raščan I, Gmeiner T. [Radiolabelled peptides in nuclear medicine]. *Zdrav Vestn.* 2018;87(9–10):439–52.

**DOI:** 10.6016/ZdravVestn.2634

<sup>1</sup> Klinika za nuklearno medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

#### Korespondenca/ Correspondence:

Tanja Gmeiner, e: tanja.gmeiner@ffa.uni-lj.si

#### Ključne besede:

radiooznačeni peptidi; teranostiki; radiofarmaki; somatostatin; minigastrin

#### Key words:

radiolabelled peptides; theranostics; radiopharmaceuticals; somatostatin; minigastrin

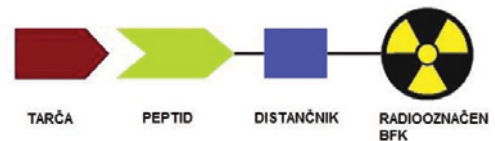
Prispelo: 10. 7. 2017

Sprejeto: 12. 9. 2017

## 1 Uvod

### 1.1 Radiofarmaki

Nuklearna medicina uporablja odprte vire radioaktivnega sevanja pri diagnosticiranju in zdravljenju različnih patofizioloških stanj. Pri obravnavi onkoloških bolnikov omogoča nuklearna medicina prikazovanje oz. umeščenost tumorskih celic, ciljano zdravljenje oziroma uničevanje prizadetih/spremenjenih celic in spremljanje uspešnosti zdravljenja. Radiofarmaki so osnova vsakega nuklearnomedicinskega posega in so sestavljeni iz radioaktivne komponente (radionuklida oz. radioizotopa) ter farmacevtske komponente (vektorska ali nosilna molekula), na katero vežemo radionuklid. Za dostavo radioaktivnosti v celice, tkiva oz. organe je odgovorna farmacevtska komponenta, pri čemer izkoriščamo morfološke značilnosti in/ali



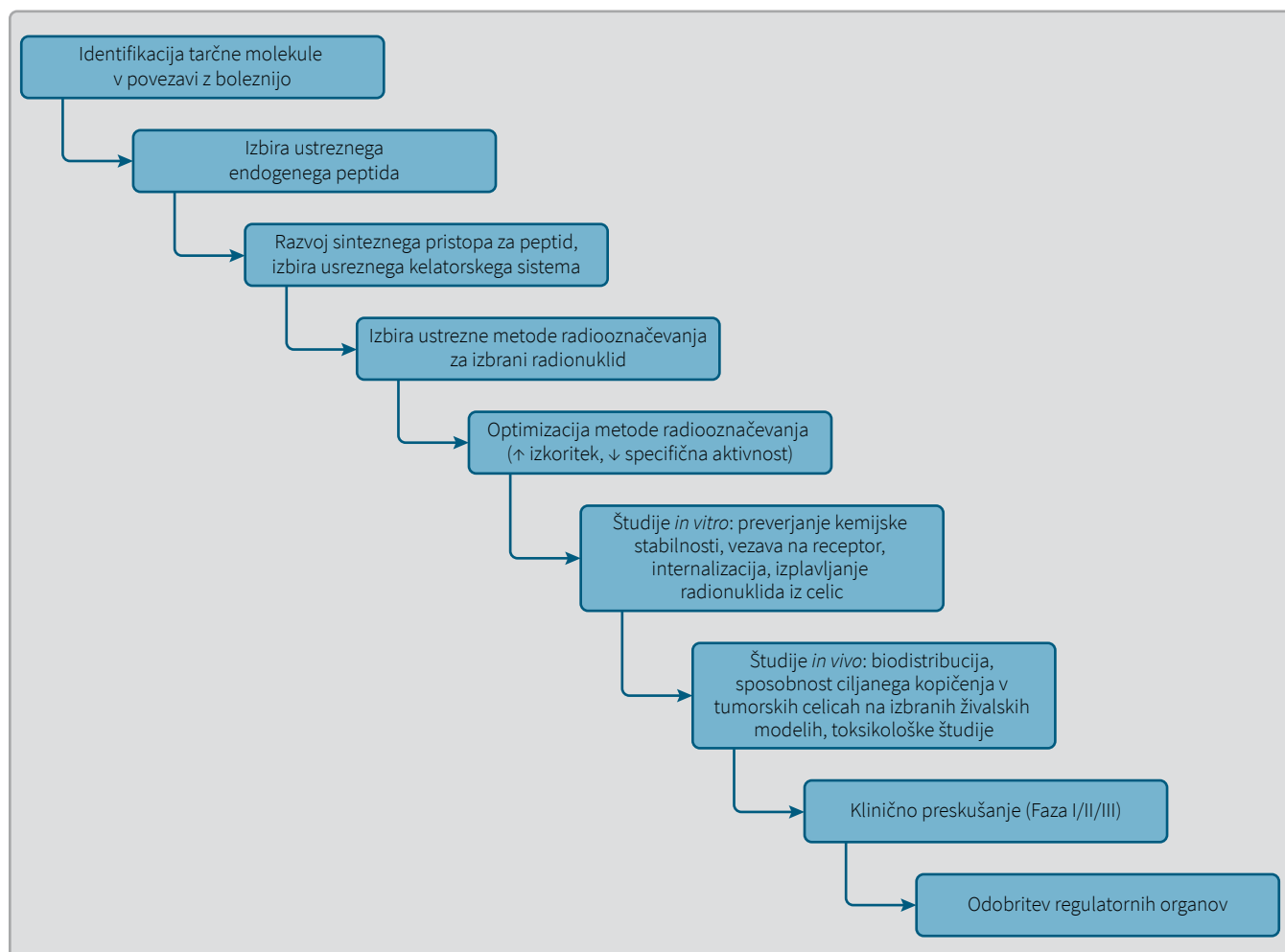
**Slika 1:** Značilna struktura radiooznačenih peptidnih učinkovin. C-terminalni del peptida, odgovoren za specifično vezavo na tarčo (receptor), distančnik, s katerim vplivamo na farmakokinetiko, ter bifunkcionalni kelator (BFK) za vezavo radionuklida.

(pato)fiziološke procese. Glede na vrsto radionuklida lahko radiofarmake uporabljamo za diagnosticiranje ali zdravljenje (Tabela 1).

Večina radiofarmakov se uporablja v diagnostične namene z uporabo radionuklidov, ki izsevajo bodisi žarke gama (indij-111, tehneций-99m) ali pozitrone, ki

**Tabela 1:** Najpogosteje uporabljeni radionuklidi (PET, SPECT in terapevtski radionuklidi), njihove razpolovne dobe ( $T_{1/2}$ ), tip sevanja ter način pridobivanja.

	Radionuklid	$T_{1/2}$	Tip sevanja	Pridobivanje
PET	ogljik-11 ( $^{11}\text{C}$ )	20,3 min	$\beta^+$ (100 %)	ciklotron
	fluor-18 ( $^{18}\text{F}$ )	110 min	$\beta^+$ (97 %)	ciklotron
	baker-64 ( $^{64}\text{Cu}$ )	12,8 h	$\beta^+$ (19 %)	ciklotron
	galij-68 ( $^{68}\text{Ga}$ )	67,6 min	$\beta^+$ (89 %)	generator
SPECT	cirkonij-89 ( $^{89}\text{Zr}$ )	78,4 h	$\beta^+$ (23 %)	ciklotron
	jod-124 ( $^{124}\text{I}$ )	4,17 dni	$\beta^+$ (23 %)	ciklotron
	galij-67 ( $^{67}\text{Ga}$ )	78,26 h	$\gamma$	ciklotron
	tehneций-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )	6,0 h	$\gamma$	generator
Terapija	indij-111 ( $^{111}\text{In}$ )	67,9 h	$\gamma$	ciklotron
	itrij-90 ( $^{90}\text{Y}$ )	64,0 h	$\beta^-$	generator
	jod-131 ( $^{131}\text{I}$ )	8 dni	$\beta^-$	fisija
	lutecij-177 ( $^{177}\text{Lu}$ )	6,71 dni	$\beta^-$	reaktor
	bizmut-213 ( $^{213}\text{Bi}$ )	45 min	$\alpha$	generator



**Slika 2:** Glavni koraki pri razvoju peptidnih radiofarmakov. Povzeto po Dash A, et al. (3).

se po združitvi z elektronom anihilirajo in izsevajo dva žarka gama pod kotom  $180^\circ$  (glej poglavje 1.3.). Za zdravljenje oz. ciljno radionuklidno terapijo pa uporabljamo radionuklide, ki pri razpadu izsevajo delce beta (jod-131, lutecij-177, itrij-90) ali alfa (bizmut-213). Pri interakciji s celicami ti delci povzročijo visoko gostoto poškodb, kar ima za posledico celično okvaro in/ali smrt celice. Citotoksičnost je lahko posledica neposredne ionizacije DNA, ali pa do nje pride posredno preko tvorbe radikalov, ki reagirajo z DNA. Radiofarmaki, označeni s terapevtskimi radionuklidi, morajo v čim večjem obsegu delovati lokalno v

obolelem organu ali tumorju, saj lahko sicer poškodujejo tudi zdrava (netarčna) tkiva, kar lahko vodi v neželene stranske učinke ciljane radionuklidne terapije.

Tumorske celice se od zdravih razlikujejo tudi po tem, da imajo na svoji površini drugače izražene receptorje za regulacijske peptide. Radioznačeni peptidi, ki se specifično vežejo na receptorje, so pomembna skupina zdravil, saj imajo visoko afiniteto in specifičnost za ta receptorska mesta in omogočajo vizualizacijo in/ali ciljno uničevanje tumorskih celic. Radiooznačeni peptidi so ponavadi sestavljeni iz peptidnega dela, ki je odgovoren za vezavo na receptor, distančnika,

s katerim moduliramo farmakokinetične lastnosti, ter bifunkcionalnega kela-torja, ki omogoča vezavo radionuklida (Slika 1).

Za slikovno diagnostiko ter ciljno terapijo različnih tumorjev so razvili veliko peptidnih radiofarmakov, med katerimi jih je kar nekaj v vsakodnevni klinični uporabi. V Tabeli 2 so povzeti glavni receptorski tarčni sistemi, ki so čezmerno izraženi pri različnih tumorjih in so tarče peptidnih radiofarmakov. Kot »dostavni sistem« lahko uporabljamo naravne ali sintetične analoge regulacijskih peptidov.

## 1.2 Razvoj radiofarmakov

Razvoj radiofarmakov je podoben razvoju neradioaktivnih klasičnih zdravil, vendar ima zaradi radioaktivne narave tudi določene posebnosti. Pri razvoju »tradicionalnih« zdravil je eden od ciljev doseči povišano plazemsko koncentracijo učinkovine, ki naj bi bila za doseganje učinka na tarčne organe čim bolj konstantna. Pri radiofarmakih pa želimo doseči sorazmerno hiter plazemski oči-stek, ki omogoča ravno dovolj časa, da se radiofarmak nakopiči v tarčnem organu, medtem ko se »preostanek« radiofar-

**Tabela 2:** Glavna področja razvoja peptidnih radiofarmakov. Faza razvoja: 1 – rutinska klinična uporaba, 2 – klinične študije, 3 – predklinične študije. Povzeto po Fani M, Maecke HR (1).

Tumor	Tarča (receptor)	Peptid	Faza razvoja
Nevroendokrini tumorji (NET), gastroenteropankreatični tumorji, ne-Hodgkingov limfom, paraganglioma, melanom, drobnocelični rak pljuč	<b>SSTR 1-5</b> ( <i>angl.</i> somatostatin receptors); somatostatinski receptorji podtipov 1-5	Somatostatin	1
Rak prostate, trebušne slinavke, želodca, drobnocelični rak pljuč	<b>GRPR</b> ( <i>angl.</i> gastrin releasing peptide receptor); gastrin sproščujoči peptid	Bombesin	2
Medularni karcinom ščitnice ( <i>angl.</i> medullary thyroid carcinoma, MTC), drobnocelični rak pljuč, astrocitom, stromalni rak jajčnikov	<b>CCK2R</b> ( <i>angl.</i> cholecystokinin 2 receptor); receptor za holecistokinin 2)	CCK/gastrin	2
Insulinom, gastrinom, feokromocitom, paragangliom, MTC	<b>GLP-1R</b> ( <i>angl.</i> glucagon-like peptide-1 receptor); receptor za glukogonu podoben peptid-1	Eksendin	2
Rak možganov, pljuč, jajčnikov, dojk	$\alpha_v\beta_3$ -integrin	RGD	2
Melanom	<b>MC1R</b> ( <i>angl.</i> melanocortin 1 receptor) receptor za melanokortin 1	$\alpha$ -MSH	2
Drobnocelični rak pljuč, rak debelega črevesja, prostate, dojk	<b>NTR1</b> ( <i>angl.</i> neurotensin receptor 1); receptor za nevrotensin 1	Nevrotensin	2
Rak dojk, prostate	<b>NPYR</b> ( <i>angl.</i> neuropeptide Y receptor); receptor za neuropeptid Y	NPY	3
Glioblastom, astrocitom, MTC	<b>NK1R</b> ( <i>angl.</i> neurokinin 1 receptor); receptor za neurokinin 1	Substanca P	2
Rak dojk, pljuč, prostate	Receptor <b>CXCR4</b> ( <i>angl.</i> C-X-C chemokine receptor type 4); kemokinski receptor C-X-C tipa 4	CXCR4	2

maka hitro izloči. S tem dosežemo, da je večina radioaktivnosti v tarčnem organu hitro po i.v. aplikaciji. Specifičnost umeščenosti pri klasičnih zdravilih ni kritična za razvoj, saj je lahko koncentracija učinkovine visoka tako na mestu, kjer želimo biološki odgovor, kot tudi v netarčnih tkivih. Pri radiofarmakih je specifičnost umeščenosti zelo pomembna, saj se tako izognemo povišanemu sevanju v netarčnih organih, kar ima za posledico slabo kakovost slik in/ali povzročitev seválnih poškodb v netarčnem tkivu, zato je pri razvoju radiofarmakov osrednjega pomena t. i. razmerje tarčni organ / ozadje (2). Ne glede na omenjene posebnosti ima razvoj peptidnih radiofarmakov podobno pot kot razvoj klasičnih zdravil. Na Sliki 2 so podrobno predstavljeni koraki pri razvoju peptidnih radiofarmakov. Glavna posebnost razvoja radiofarmakov je radiooznačevanje z izbranim radionuklidom, ki usmerja izbor ter optimizacijo metode radiooznačevanja.

Razvoj peptidne kemije omogoča načrtovanje, strukturno analizo ter sintezo novih peptidnih molekul z izboljšanimi lastnostmi (povišana specifičnost, moč vezave na tarčne molekule) za uporabo v nuklearni medicini:

- Optimizacija vezave na receptorje. Z uporabo računalniškega modeliranja ter informacij o strukturi tarčnih molekul lahko načrtujemo peptide z visoko afiniteto ( $IC_{50}$  vrednosti radiooznačenih peptidov v nanomolarnem območju) do tarčnih receptorjev na tumorskih celicah.
- Izboljšanje kemijskih lastnosti radiooznačenih peptidov. S povečanjem hidrofilitnosti teh molekul lahko zmanjšamo kopičenje v jetrih in/ali zmanjšamo vezavo na plazemske proteine.
- Izboljšanje metabolične (plazemske) stabilnosti z vpeljavo nenaravnih D-amino kislin, uporabo ciklič-

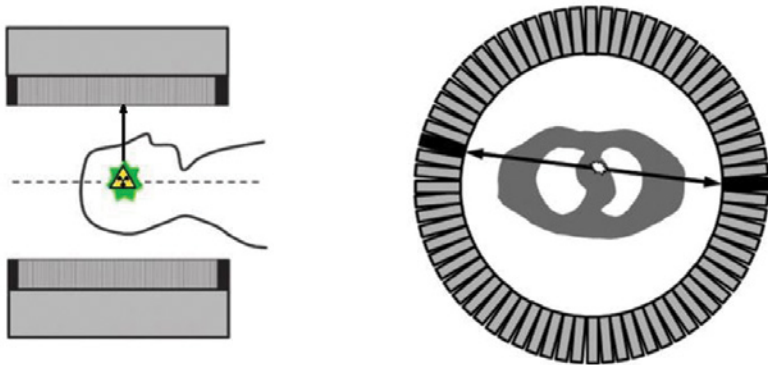
nih peptidov ali peptidomimetikov. Razpad radiooznačenih peptidov v plazmi povzroči nastanek metabolitov, ki imajo spremenjene farmakokinetične lastnosti, kar lahko vodi do neželenih učinkov.

- Uporaba različnih kelatorjev za preprečevanje »sproščanja« radionuklida iz kompleksa. »Sproščanje« radionuklidov lahko predvsem pri uporabi terapevtskih radionuklidov vodi v toksičnost zaradi biodistribucije prostega radionuklida (4). Izbrani kelatorji ne smejo vplivati na vezavno kinetiko radiooznačenega peptida, vendar morajo omogočiti stabilno vezavo radionuklida. Nekateri kelatorski sistemi omogočajo vezavo različnih radionuklidov (diagnostičnih, terapevtskih), kar izkoriščamo v t. i. teranostičnem pristopu pri obravnavi bolnikov (5).
- Naboj, lipofilnost ter stabilnost radiofarmakov *in vivo* vplivajo na pot izločanja. Z modificiranjem radiooznačenih peptidov lahko vplivamo na te lastnosti tako, da izločanje radiooznačenih peptidov poteka večinoma skozi ledvice, kar je najbolj zaželeno. Na ta način omogočimo najhitrejšo izločanje »nevezane« radioaktivnosti, s čimer se izognemo povišanemu sevanju v netarčnih organih.

### 1.3 Slikovne preiskave v nuklearni medicini

Večina (95 %) vseh nuklearnomedicinskih postopkov je diagnostičnih. Obstajata dve glavni skupini diagnostičnih preiskav, ki se delita glede na uporabljene radionuklide ter glede na princip zaznavanja radioaktivnosti:

1. Planarna scintigrafija, pri kateri uporabljamo radionuklide, ki neposredno izsevajo žarke gama oz. fotone (sevalci gama) in jih zaznamo s planarno



**Slika 3:** Princip zaznavanja radioaktivnosti. *Levo:* enofotonska izsevna tomografija oz. SPECT (zaznava fotonov z enim ali večglavim detektorskim sistemom iz različnih kotov). *Desno:* pozitronska izsevna tomografija oz. PET (zaznava fotonskih parov, ki nastanejo po združitvi pozitrona z elektronom).

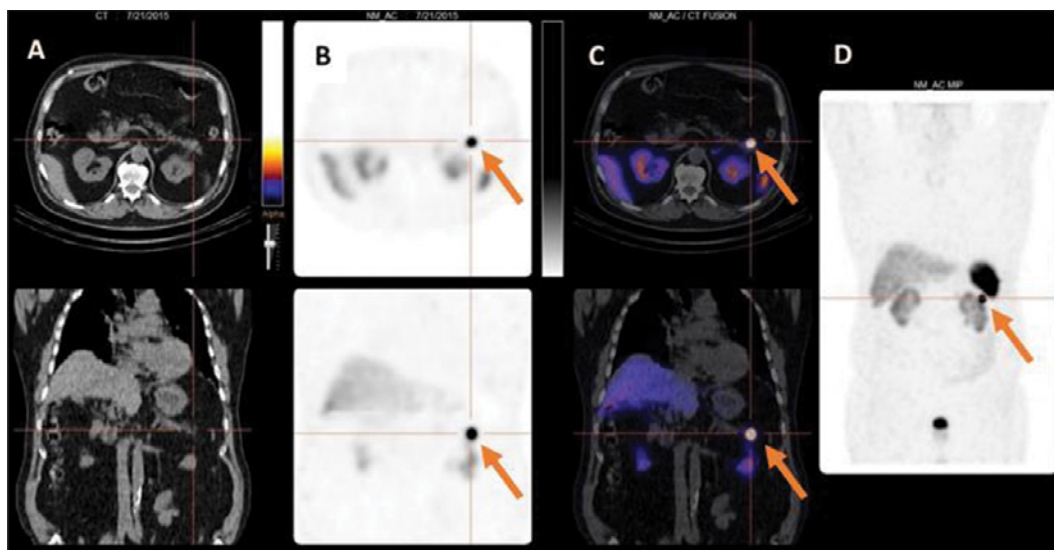
kamero gama, s katero lahko prikažemo statične ali dinamične dvodimenzionalne slike.

2. Računalniška tomografija, ki je lahko:
  - Enofotonska izsevna tomografija oz. SPECT (*angl.* single photon emission computed tomography), pri kateri uporabljamo sevalce gama. Zaznamo jih lahko z eno ali večglavim detektorskim sistemom iz različnih kotov. Z uporabo rekonstrukcijskih algoritmov obdelamo dobljene podatke ter prikažemo tridimenzionalno sliko porazdelitve radiofarmaka.
  - Pozitronska izsevna tomografija oz. PET (*angl.* positron emission tomography), pri kateri uporabljamo radionuklide, ki izsevajo pozitrone. Ti se po združitvi z elektronom anihilirajo in izsevajo dva gama žarka pod kotom  $180^\circ$  in energijo 511 keV. Ko oba fotona skoraj sočasno zazna obroč detektorjev v snemalniku PET, lahko na osi med mestoma detekcije natančnougotovimo mesto, kjer se je anihilacija zgodila, kar nam da informacijo o mestu kopičenja radiofarmaka. (Slika 3).

Pri obeh principih nastane nuklearnomedicinska slika z detekcijo nekaj milijonov fotonov (planarna scintigrafija, SPECT) oz. fotonskih parov (PET). Večina novejših snemalnikov je povezanih z rentgensko računalniško tomografijo (*angl.* computed tomography, CT). Medtem ko nam SPECT oz. PET nudita informacije o funkciji (fiziologiji, patofiziologiji) tkiv in organov, nam CT nudi informacijo o morfologiji. S kombinacijo obeh tehnik (SPECT/CT oz. PET/CT) lahko v eni preiskavi pridobimo slikovno informacijo o določenem procesu ter njegovo natančno umestitev. Z združevanjem (fuzijo) informacij lahko občutno izboljšamo diagnostično vrednost nekaterih preiskav. CT poleg morfologije omogoča tudi korekcijo t. i. slabljenja oz. atenuacije žarkov gama. Ti izhajajo iz telesa preiskovanca in različno slabijo glede na njihovo lego v različnih tkivih telesa; npr. v zraku v pljučih je atenuacija minimalna, v kosteh pa obsežna (6,7). Na združeni (zliti) sliki prikazujemo morfološke (CT) podatke v sivi lestvici, funkcijske (SPECT, PET) pa v barvni lestvici in tako funkcijsko informacijo natančno umestimo in prikažemo. Na Sliki 4 je prikazana scintigrafija somatostatinskih receptorjev z radiooznačenimi analogi somatostatina, katerih razvoj podrobneje opisujemo v nadaljevanju.

## 2 Radiooznačeni analogi somatostatina

Somatostatin je peptidni hormon, ki se izloča predvsem v prebavilih ter možganih in zavira izločanje mnogih endokrinih hormonov, kot so inzulin, glukagon ter gastrin (8). Biološki odgovor sproži z vezavo na družino somatostatinskih receptorjev, ki je sestavljena iz 5 podtipov (sst1-sst5), pri čemer so v tumorjih najpogosteje izraženi sst2. V nuklearni medicini so daleč najbolj uporabljeni ra-

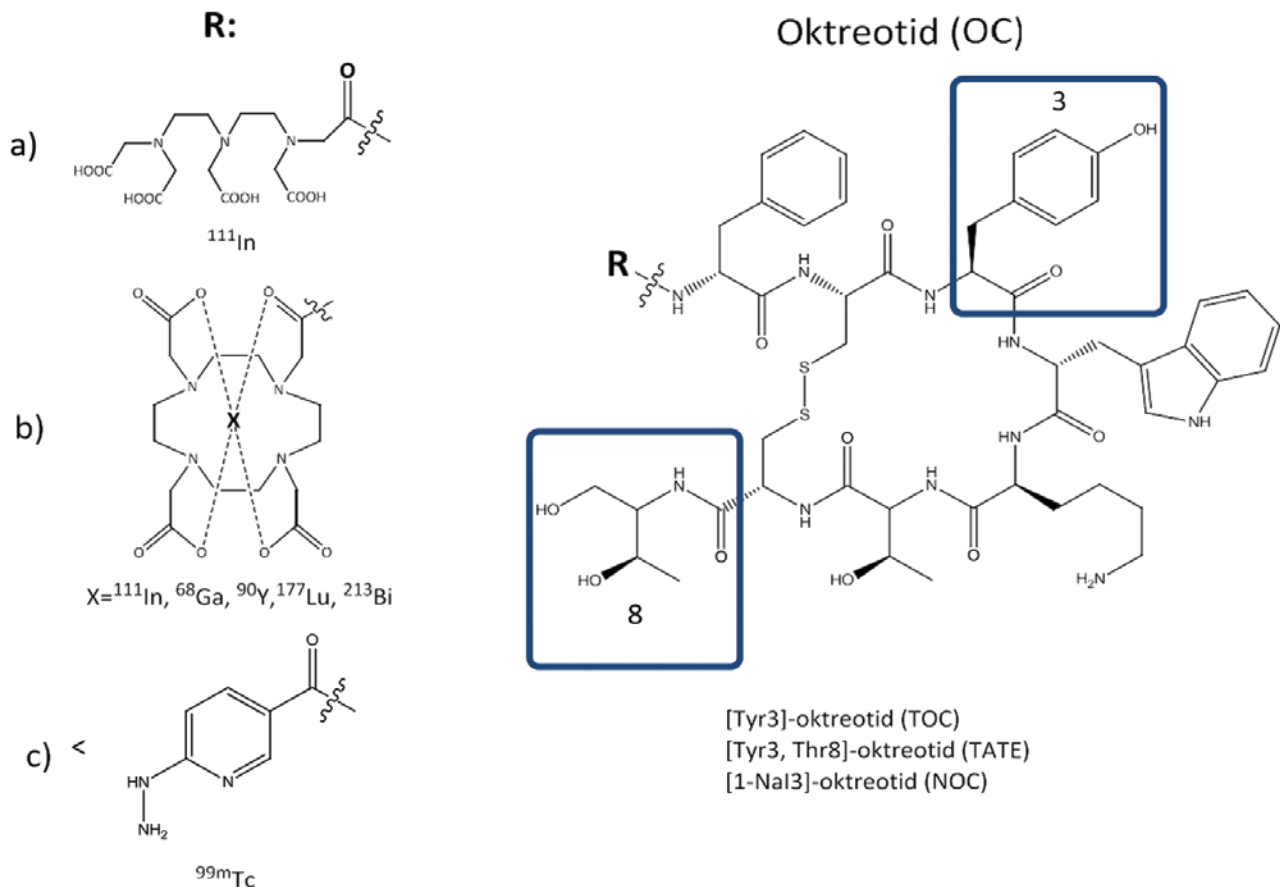


**Slika 4:** Scintigrafija somatostatinskih receptorjev z radiooznačenim peptidom  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNICTOC. A: morfološki prikaz s CT; B: SPECT; C: zlita slika SPECT/CT; D: SPECT prikaz celotnega telesa. S puščico označeno kopičenje radiofarmaka v repu trebušne slinavke. Vir: Arhiv Klinike za nuklearno medicino, UKC Ljubljana.

diooznačeni analogi somatostatina (sst), ki se uporabljajo pri diagnosticiranju in zdravljenju neuroendokrinih tumorjev (NET). Neuroendokrini tumorji se razvijajo iz celic neuroendokrinega sistema. Prisotni so v številnih organih človeškega telesa (64 % v prebavilih, 28 % v dihalih, preostali pa so NET ščitnice, kože, nadledvične žleze ter živčnih celic). So redki tumorji, a njihova incidenca v zadnjih letih narašča. Incidenčna stopnja NET prebavil (GEP NET) je 5,25/100.000 na leto, prevalenca pa je 35/100.000, kar jih uvršča na drugo mesto v skupini tumorjev prebavil. Diagnosticiranje NET zajema klinično sliko, laboratorijske preiskave, kot sta kromogranin A in 5-hidroksiindolocetna kislina, ter slikovne preiskave. Slikovna preiskava izbire je CT ali MRI v kombinaciji s scintigrafijo somatostatinskih receptorjev, ki je kot samostojna slikovna preiskava diagnostično najobčutljivejša (9).

Molekularna osnova za razvoj radiooznačenih analogov somatostatina je vi-

soka izražena receptorjev v plazemski membrani tumorskih celic. Čezmerna izražena ter gostota somatostatinskih receptorjev je dokazana pri večini NET, med katere spadajo GEP NET, feokromocitom, paragangliom, neuroblastom in meningiom. Pri inzulinomu, limfomih, raku na dojki, hepatocelularnem karcinomu, medularnem raku ščitnice in drobnoceličnem raku pljuč pa je incidenca ter gostota receptorjev nižja (10). Somatostatin je pri fizioloških pogojih prisoten v dveh oblikah: kot 14- oz. 28-aminokislinska molekula (SS14 in SS28). Radiooznačeni endogeni peptidi za klinično uporabo niso primerni, saj je njihova stabilnost *in vivo* neustrezna. Plazemski razpolovni čas somatostatina-14 je le 2–3 min. Za uspešno uporabo v klinični praksi morajo imeti radiooznačeni peptidi plazemski razpolovni čas 1 uro ali več, kar omogoča izvedbo celotnega nuklearno-medicinskega posega (11,12). V ta namen se uporabljajo krajši sintetični oktapeptidi, kot so npr. oktrotid, lanreotid ter vapreotid (8).



**Slika 5:** Strukturna formula oktreotida. Menjava aminokislin na mestu 3 in 8 vodi v zvišano afiniteto do različnih podtipov receptorjev za somatostatina. Na levi strani so strukture bifunkcionalnih kelatorjev (R), ki omogočajo radiooznačevanje z navedenimi diagnostičnimi in terapevtskimi radionuklidi: a) aciklični DTPA (diethylenetriamin pentaocetna kislina), b) makrociklični DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraocetna kislina) ter c) HYNIC (hidrazinonikotinska kislina). Povzeto po Maecke HR, Reubi JC (12).

Radiooznačeni analogi somatostatina, ki so podrobneje opisani v nadaljevanju, imajo optimalne lastnosti za klinično uporabo: vezavno afiniteto do receptorjev v nanomolarnem območju, hitro internalizacijo agonistov po vezavi na receptor, ustrezno farmakokinetiko, izločanje skozi ledvice ter visoko stabilnost kompleksa radionuklid – kelator, zaradi katere ne prihaja do sproščanja radionuklida *in vivo*.

Na Sliki 5 so predstavljeni klinično najpogosteje uporabljeni analogi somatostatina. Večinoma uporabljamo oktapeptidne derivate, kot so oktreotid, [Tyr3]oktreotid (TOC), [1-NaI3]oktre-

otid (NOC) ter [Tyr3, Thr8]oktreotid (TATE). Za radiooznačevanje peptidne derivate konjugiramo z različnimi bifunkcionalnimi kelatorji. Prvi široko uporabljeni analog somatostatina je bil z DTPA konjugirani oktreotid, radiooznačen z indijem-111 ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotid; Octreoscan®). Na Kliniki za nuklearno medicino UKC Ljubljana uporabljamo s tehnejem-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) radiooznačen hidrazinonikotinamid-[Tyr3]oktreotid ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNICTOC), ki ima v primerjavi z registriranim  $^{111}\text{In}$ -DTPA-oktreotidom več prednosti: izboljšane farmakokinetične lastnosti, višjo afiniteto do receptorja sst2, manjšo sevalno obremenitev



za preiskovanca ter nižjo ceno (13). Za radiooznačevanje s kovinskimi (3+) radionuklidi namesto DTPA uporabljamo makrociklični kelator DOTA, ki s kovinskimi 3+ radionuklidi tvori termodinamsko stabilne komplekse. To omogoča t.i. personalizirano obravnavo bolnikov z uporabo teranostičnih parov, ko isti dostavni sistem uporabimo za radiooznačevanje z različnimi radionuklidi. Tako dobljeni radiofarmaki so uporabni za diagnosticiranje, dozimetrijo in terapijo. Za slikovno diagnostiko lahko z DOTA konjugirani [Tyr<sup>3</sup>]oktrotid (DOTATOC) radiooznačimo z <sup>111</sup>In (SPECT) ali galijem-68 (PET), kar omogoča umestitev tumorja in/ali metastaz ter oceno prejetega odmerka radioaktivnega sevanja v tumorju in netarčnih tkivih (t.i. dozimetrija). DOTATOC lahko radiooznačimo tudi s terapevtskimi radionuklidi, kot so itrij-90 ter lutecij-177 (sevalca delcev β-) ter bizmut-213 (sevalec delcev α), ki se razlikujejo po dosegu citotoksičnega učinka v tkivu, kar omogoča izbor radionuklida glede na velikost tumorja. Primer odziva bolnika po ciljani radionuklidni terapiji NET je prikazan na Sliki 6.

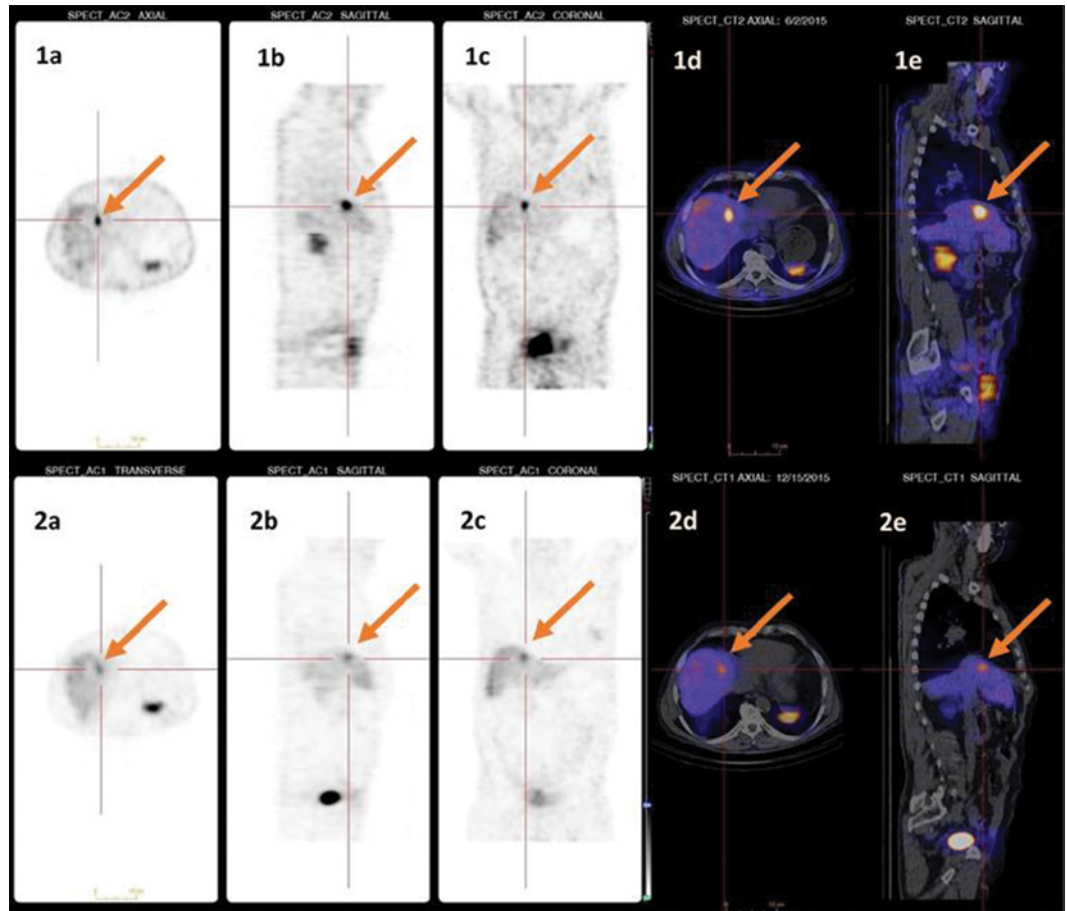
### 3 Radiooznačeni analogi minigastrina

Gastrin je linearni peptidni hormon, ki se sintetizira v endokrinih celicah G, ki se nahajajo v antrumu želodca, in se izloča iz njih. Gastrin se izloča pod vplivom dražljajev iz hrane (peptidov in aminokislin), raztegnitve stene želodca ter tudi pod vplivom avtonomnega živčevja. V telesu ga najpogosteje najdemo v treh oblikah: gastrin-34, gastrin-17 ter gastrin-14 (poimenovan tudi minigastrin). Glavne funkcije gastrina v telesu so stimulacija peristaltike v želodcu, tankem in debelem črevesu, stimulacija sekrecije HCl, praznjenje želodca, izlo-

čanja inzulina ter stimulacija izločanja HCO<sub>3</sub> in encimov pankreasa.

Holecistokinin (CCK) je peptidni hormon, ki se sintetizira in izloča iz endokrinih celic I, ki so v mukozni tankega črevesa. Najdemo ga tudi v centralnem živčnem sistemu in perifernem živčevju, ki oživčuje prebavila, kjer najverjetneje deluje kot neurotransmiter (14,15). Odgovoren je za krčenje mehurja, izločanje encimov iz trebušne slinavke ter sproščanje Oddijevega sfinktra, kar pospeši izločanje žolča v črevesje. Strukturno sta si gastrin in holecistokinin zelo podobna, saj imata na biološko aktivnem C-terminalnem mestu pet enakih aminokislin (-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>). Zaradi teh strukturnih elementov izkazujeta podobne fiziološke ter farmakološke odzive po vezavi na družino membranskih receptorjev, povezanih s proteinom G (16). Holecistokinin se veže na receptor za holecistokinin 1 (CCK<sub>1</sub>R) ter na receptor za holecistokinin 2 (CCK<sub>2</sub>R), gastrin pa ima vezavno afiniteto le do CCK<sub>2</sub>R, ki ga zato imenujemo tudi gastrinski receptor. Odkritje, da sta CCK<sub>1</sub>R in CCK<sub>2</sub>R čezmerno izražena pri določenih tipih tumorskih celic, je osnova za razvoj radiooznačenih analogov holecistokinina in gastrina. Pri človeških tumorjih je pogosteje izražen CCK<sub>2</sub>R, in sicer pri medularnem raku ščitnice (92 %), astrocitomu (65 %) ter stromalnem raku jajčnikov (100 %). V manjšem odstotku so prisotnost CCK<sub>2</sub>R dokazali pri gastroenteropankreatičnem raku, raku na dojki ter adenokarcinomu jajčnikov (17,18). Dve raziskavi sta pokazali tudi visoko incidenco CCK<sub>2</sub>R pri drobnoceličnem raku pljuč (89 % oz. 59 %). Nedrobnocelični raki pljuč teh receptorjev ne izražajo (17,19).

**Medularni rak ščitnice (MTC)** predstavlja okoli 3,5 % vseh rakov ščitnice in se uvršča med redke bolezni. MTC se ponavadi pojavi kot ščitnični gomolj



**Slika 6:** Odziv bolnika z metastatskim NET na zdravljenje s ciljano radionuklidno terapijo (7400 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE). Zgoraj: Scintigrafija somatostatinskih receptorjev z  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC pred zdravljenjem (1a-c SPECT posnetki iz različni projekcij: 1a transverzalni, 1b sagitalni in 1c koronalni posnetek; 1d-e zlita SPECT/CT slika). Dobro vidna metastaza v jetrih (*rdeča puščica*). Spodaj: Kontrolni scintigram z  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC 6 mesecev po terapiji: zmanjšano kopičenje radiofarmaka (velikost in intenzivnost barve), kar kaže na delni odziv bolnika po terapiji (2a-c SPECT posnetki, 2d-e zlita SPECT/CT slika). Vir: Arhiv Klinike za nuklearno medicino, UKC Ljubljana.

ali povečan cervikalni limfni vozle. Je neuroendokrini tumor, ki izhaja iz parafolikularnih ščitničnih celic (celic C), ki sintetizirajo in izločajo kalcitonin ter karcinoembrionalni antigen (CEA). Ker celice C ne izražajo gena za natrij-jodidni simporter (NIS), metastaze MTC ne kopičijo radioaktivnega jodida, zato je obravnava in zdravljenje te bolezni bolj zahtevno od ostalih vrst ščitničnega raka (20). Pri MTC je 10-letno preživetje okoli 75 %, vendar se to drastično

zniža pri napredovali oz. metastatski obliki (40 %). MTC ponavadi metastazira v pljuča, jetra, kosti in možgane. Pri večini bolnikov je bolezen ob odkritju že napredovala (21). Kljub agresivnemu kirurškemu zdravljenju se pri skoraj 50 % bolnikov bolezen ponovno pojavi. Pri prisotnosti metastaz je cilj zmanjšanje simptomov ter izboljšanje kakovosti življenja. Pri metastatskem MTC kemo-terapija zaradi omejene učinkovitosti ter visoke toksičnosti ni priporočljiva. Pri

uporabi novejših zaviralcev tirozin kinaz, kot sta Vandetanib in Cabozatinib, pa učinkovitost še ni potrjena, hkrati pa se v terapevtskih odmerkih pojavljajo neželeni učinki (22,23). Odkritje, da so receptorji CCK<sub>2</sub>R pri MTC čezmerno izraženi, je molekularna osnova za razvoj radioznačenih analogov minigastri- na kot novih radiofarmakov pri diagnosticiranju metastatskega MTC. Še pomembnejša pa je možnost uporabe teh analogov v ciljni radionuklidni terapiji MTC, ki bi lahko postala učinkovita metoda zdravljenja metastatskega MTC.

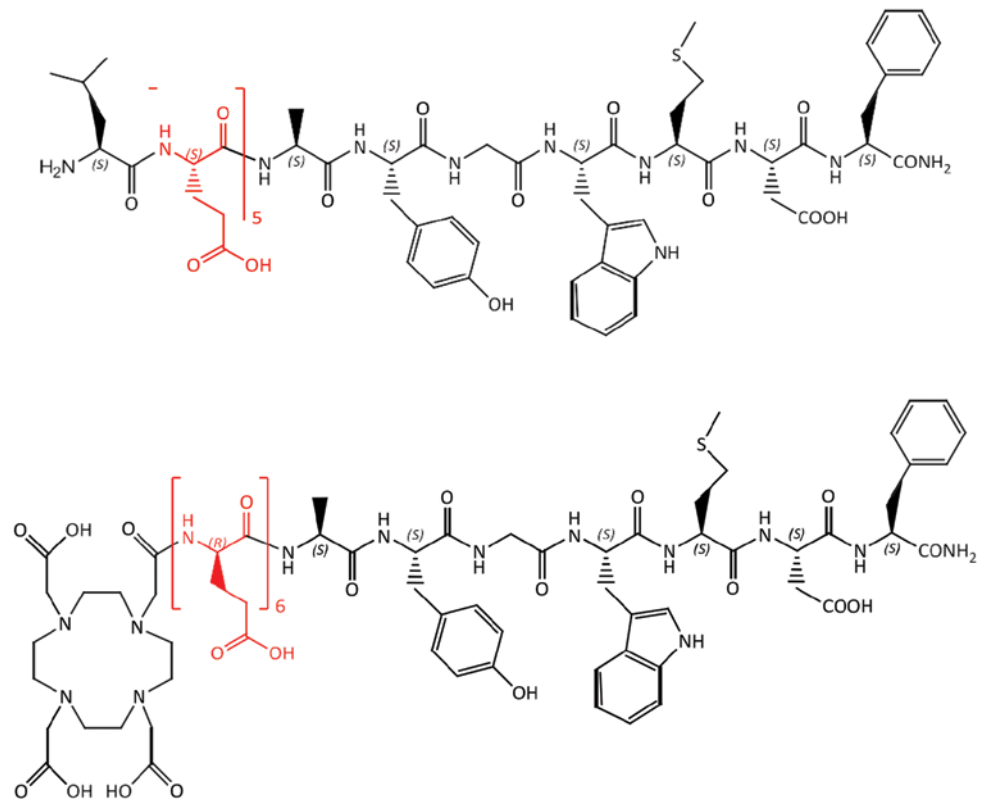
Prvi opisani analog je bil z jodom-131 (<sup>131</sup>I) radiooznačen humani gastrin-I, ki je sintetični peptid iz 17 aminokislin s piroglutamatnim preostankom na N-terminalnem delu. Ima visoko vezavno afiniteto do CCK<sub>2</sub>R, ne pa tudi do CCK<sub>1</sub>R (24). V raziskavi, v kateri so primerjali 18 radiojodiranih CCK in gastrinskih analogov, so ugotovili, da je za vezavo na CCK<sub>2</sub>R pomembno zaporedje štirih aminokislin na C-terminalnem delu peptida (Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>). Zaradi nestabilnosti radiojodiranih analogov, kjer se <sup>131</sup>I po internalizaciji ne zadrži v celicah, temveč se iz njih izloči, so preverjali tudi z dietilentriamin pentaocetno kislino (DTPA) konjugirane analoge, ki so jih radiooznačili z indijem-111 (<sup>111</sup>In). Za razliko od radiojodiranih aminokislin se aminokislina, konjugirane z bifunkcionalnimi kelatorji (DTPA, DOTA, ipd.) ter radiooznačeni z radioaktivnimi izotopi kovin, zadržijo v lizosomih, zato ne pride do izplavljanja radionuklida iz celice (t. i. "metabolic trapping") (25). V primerjavi različnih analogov minigastri- na (gastrin-14; Leu-(Glu)<sub>5</sub>-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>) *in vitro* so ugotovili, da z zamenjavo levicina z D-glutaminsko kislino pride do zvišanja metabolične stabilnosti, zato so ta analog uporabili tudi v kliničnih preizkušanjih. Kljub dobremu kopičenju

v tumorju se je izkazalo, da je glavna težava tega analoga zelo visok privzem v ledvicah (26).

Nadaljnji razvoj analogov minigastri- na je temeljil na izboljšavah v farmakokinetiki ter iskanju idealnega radiofarmaka za uporabo pri diagnosticiranju ter predvsem ciljni radionuklidni terapiji tumorjev z izraženimi CCK<sub>2</sub>R. Problema, s katerima so se raziskovalci soočili, sta nizek privzem radiooznačenih analogov v tumorsko celico ali visok privzem v ledvicah. Visok privzem radiooznačenih peptidov v ledvicah je odgovoren za nefrotoksičnost, ki je glavni neželeni učinek teh analogov pri ciljni radionuklidni terapiji.

V primerjalni študiji treh minigastri- nskih analogov, označenih s <sup>99m</sup>Tc, so ugotovili, da lahko privzem radiooznačenega peptida v ledvice znižajo s sočasnim injiciranjem peptidov iz poliglutaminskih kislin (Glu). S študijo na mišjih modelih so ugotovili, da najboljše razmerje med tumorjem ter netarčnimi tkivi izkazuje analog, ki med kelatorjem ter C-terminalnim delom peptida vsebuje dodatno amino kislino glicin (27). Pri študiji z DOTA konjugiranimi minigastri- nskiimi analogi se je z odstranitvijo pentaglutamatnega zaporedja aminokislin iz minigastri- na (MG11) privzem v tumor zmanjšal za 3-krat, hkrati pa se je zmanjšal tudi ponovni privzem v ledvicah kar za 20-krat. Izsledki teh študij so nakazali, da uvajanje ustreznega distančnika lahko statistično značilno vpliva na farmakokinetične lastnosti minigastri- nskih analogov (Slika 7) (28).

Pri nadaljnji optimizaciji in razvoju metabolično stabilnih analogov minigastri- na je pomemben delež prispevala tudi raziskovalna skupina Klinike za nuklearno medicino UKC Ljubljana. Velik korak naprej v razvoju metabolično stabilnih analogov minigastri- na je bila uvedba nenaravnih hidro-



**Slika 7:** Zgoraj: Struktura minigastrina (gastrin-14, H-Leu-(Glu)<sub>5</sub>-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>), ki je spojina vodnica pri razvoju radiooznačenih analogov minigastrina. Spodaj: Struktura minigastrinskega analoga PP11 (CP04). Uvedba 6 D- glutaminskih kislin (rdeče) kot distančnik je izjemno izboljšala farmakokinetične lastnosti ter metabolno stabilnost v primerjavi z doslej razvitimi analogi minigastrina.

filnih D-aminokislin v distančniku (Slika 7). Distančnik brez naboja iz 6 D-glutaminov se je izkazal kot optimalna rešitev, saj se je metabolična stabilnost povečala kar do 500-krat v primerjavi z drugimi analogi znotraj serije. Hkrati z zvišanjem stabilnosti se je pri nekaterih analogih znižal ponovni privzem v ledvicah, s čimer se je razmerje tumor proti netarčna tkiva povečalo tudi do 60-krat (29). Nekateri od opisanih analogov so bili testirani pod standardiziranimi pogoji v skupnem evropskem projektu COST (BM0607; Targeted Radionuclide Therapy). 12 minigastrinskih analogov CCK/ so okarakterizirali tako *in vitro* kot *in vivo*. V primerjalni študiji so primerjali vezavno afiniteto do receptorjev, internalizacijske lastnosti, biološko sta-

bilnost, metabolizem ter biodistribucijo radiooznačenih analogov. Najboljše lastnosti so izkazovale 3 spojine: nabit linearni peptid s 6 D-glutaminskimi kislinami v distančniku (PP11; DOTA-(D-Glu)<sub>6</sub>-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>), divalentni analog (MGD5; DOTA-Gly-Ser-Cys-(Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) ter ciklični peptid (ciklo- MG1; DOTA-DGlu-(Ala-Tyr)-DLys-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (ciklo DGlu-DLys)). Za uporabo v fazi I kliničnega preskušanja je bil izbran analog PP11 (oz. CP04), radiooznačen z <sup>111</sup>In in <sup>177</sup>Lu, saj je zaradi visoke metabolične stabilnosti v tkivnih homogenatih in v humanem serumu izkazoval najboljše lastnosti tudi za uporabo v ciljni radio-nuklidni terapiji (30-32).

## 4 Zaključek

Visoka specifičnost in afiniteta regulacijskih peptidov oz. njihovih analogov do tarčnih receptorjev na tumorskih celicah je predpogoj za njihovo uspešno uporabo v nuklearni medicini. Z radiooznačevanjem teh peptidov lahko do tumorskih celic dostavimo različne radionuklide (diagnostične in terapevtske), kar nuklearni medicini omogoča personalizirani pristop pri obravnavi bolnikov. Slikovna diagnostika omogoča odkrivanje in zamejitev bolezni, načrto-

vanje optimalnega načina zdravljenja ter ocenjevanje uspešnosti zdravljenja, ciljana radionuklidna terapija pa omogoča tudi uspešno zdravljenje. Dolgoletna uspešna uporaba radiooznačenih analogov somatostatina kaže na velik potencial teranostičnih parov tudi pri ostalih tumorjih s čezmerno izraženimi receptorji za regulacijske peptide. Radiooznačeni analogi minigastrina so se že izkazali kot uspešno diagnostično orodje pri metastatskem MTC, za varno in ustrezno zdravljenje pa je potrebno še dodatno klinično preskušanje.

## Literatura

1. Fani M, Maecke HR. Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012 Feb;39(1 Suppl 1):S11–30.
2. Aloj L, Panico MR, Caracó C, Zannetti A, Del Vecchio S, Di Nuzzo C, et al. Radiolabeling approaches for cholecystokinin B receptor imaging. *Biopolymers*. 2002;66(6):370–80.
3. Dash A, Chakraborty S, Pillai MR, Knapp FF Jr. Peptide receptor radionuclide therapy: an overview. *Cancer Biother Radiopharm*. 2015 Mar;30(2):47–71.
4. Cremonesi M, Schuchardt C. Dosimetry for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. Baum RP, ur. *Therapeutic Nuclear Medicine*. Springer; 2014. pp. 769–79.
5. Baum RP, Kulkarni HR. Theranostics: from molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy—the Bad Berka experience. *Theranostics*. 2012;2(5):437–47.
6. Ležaić L, Fettich J. Zlivanje nuklearnomedicinskih in radioloških preiskav: PET/CT in SPECT/CT. In: Fras Z, Poredoš P, ur. *Zbornik prispevkov: 53 Tavčarjevi dnevi*; 3.-5. november 2011; Portorož, Slovenija. V Ljubljani: Medicinska fakulteta; 2011. p. 329–37.
7. Lodge MA, Frey EC. Nuclear Medicine Imaging Devices. In: Bailey DL, Humm JL, editors. *Todd-Pokropek A, Aswegen Av, ur. Nuclear Medicine Physics: A Handbook for Teachers and Students*. Dunaj. IAEA; 2014. pp. 312–97.
8. Appetecchia M, Baldelli R. Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours, current aspects and new perspectives. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Mar;29(1):19.
9. Moltara ME, Ocvirk J. Neuroendokrini tumorji prebavil. *ONKOLOGIJA/pregledi*. 2011(2):88–92.
10. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev*. 2003 Aug;24(4):389–427.
11. Schottelius M, Wester HJ. Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods*. 2009 Jun;48(2):161–77.
12. Maecke HR, Reubi JC. Somatostatin receptors as targets for nuclear medicine imaging and radionuclide treatment. *J Nucl Med*. 2011 Jun;52(6):841–4.
13. Gabriel M, Decristoforo C, Donnemiller E, Ulmer H, Wafah Rychlinski C, Mather SJ, et al. An inpatient comparison of 99mTc-EDDA/HYNIC-TOC with 111In-DTPA-octreotide for diagnosis of somatostatin receptor-expressing tumors. *J Nucl Med*. 2003 May;44(5):708–16.
14. Owyang C, Logsdon CD. New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion. *Gastroenterology*. 2004 Sep;127(3):957–69.
15. Mutt V. Secretin and cholecystokinin. *Gastrointestinal hormones*. 1988:251–320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-027311-9.50012-3>.
16. Dufresne M, Seva C, Fourmy D. Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol Rev*. 2006 Jul;86(3):805–47.
17. Reubi JC, Schaer JC, Waser B. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res*. 1997 Apr;57(7):1377–86.
18. Charron CL, Hickey JL, Nsiama TK, Cruickshank DR, Turnbull WL, Luyt LG. Molecular imaging probes derived from natural peptides. *Nat Prod Rep*. 2016 Jun;33(6):761–800.
19. Matsumori Y, Katakami N, Ito M, Taniguchi T, Iwata N, Takaishi T, et al. Cholecystokinin-B/gastrin receptor: a novel molecular probe for human small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1995 Jan;55(2):276–9.
20. Salavati A, Puranik A, Kulkarni HR, Budiawan H, Baum RP. Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) of Medullary and Nonmedullary Thyroid Cancer Using Radiolabeled Somatostatin Analogues. *Semin Nucl Med*. Elsevier; 2016. pp. 215–24.

21. Saad MF, Ordonez NG, Rashid RK, Guido JJ, Hill CS Jr, Hickey RC, et al. Medullary carcinoma of the thyroid. A study of the clinical features and prognostic factors in 161 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1984 Nov;63(6):319–42.
22. Šabani M, Jelovac DB, Petrović MB, Gavrić M. Management of Advanced Medullary Thyroid Carcinoma. *Journal of Tumor*. 2014;2(8):202–7.
23. Wells SA Jr, Robinson BG, Gagel RF, Dralle H, Fagin JA, Santoro M, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol*. 2012 Jan;30(2):134–41.
24. Behr TM, Jenner N, Radetzky S, Béhe M, Gratz S, Yücekent S, et al. Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin. *Eur J Nucl Med*. 1998 Apr;25(4):424–30.
25. Gotthardt M, Boermann OC, Behr TM, Béhé MP, Oyen WJ. Development and clinical application of peptide-based radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des*. 2004;10(24):2951–63.
26. Béhé M, Becker W, Gotthardt M, Angerstein C, Behr TM. Improved kinetic stability of DTPA- dGlu as compared with conventional monofunctional DTPA in chelating indium and yttrium: preclinical and initial clinical evaluation of radiometal labelled minigastrin derivatives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003 Aug;30(8):1140–6.
27. Nock BA, Maina T, Béhé M, Nikolopoulou A, Gotthardt M, Schmitt JS, et al. CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with (99m)Tc-labeled minigastrin analogs. *J Nucl Med*. 2005 Oct;46(10):1727–36.
28. von Guggenberg E, Sallegger W, Helbok A, Ocak M, King R, Mather SJ, et al. Cyclic minigastrin analogues for gastrin receptor scintigraphy with technetium-99m: preclinical evaluation. *J Med Chem*. 2009 Aug;52(15):4786–93.
29. Kolenc-Peitl P, Mansi R, Tamma M, Gmeiner-Stopar T, Sollner-Dolenc M, Waser B, et al. Highly improved metabolic stability and pharmacokinetics of indium-111-DOTA-gastrin conjugates for targeting of the gastrin receptor. *J Med Chem*. 2011 Apr;54(8):2602–9.
30. Aloj L, Aurilio M, Rinaldi V, D'Ambrosio L, Tesauro D, Peitl PK, et al. Comparison of the binding and internalization properties of 12 DOTA-coupled and (1)(1)In-labelled CCK2/gastrin receptor binding peptides: a collaborative project under COST Action BM0607. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38(8):1417–25.
31. Laverman P, Joosten L, Eek A, Roosenburg S, Peitl PK, Maina T, et al. Comparative biodistribution of 12 (1)(1)In-labelled gastrin/CCK2 receptor-targeting peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38(8):1410–6.
32. Ocak M, Helbok A, Rangger C, Peitl PK, Nock BA, Morelli G, et al. Comparison of biological stability and metabolism of CCK2 receptor targeting peptides, a collaborative project under COST BM0607. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011 Aug;38(8):1426–35.