

CCMV-virusten proteiinkapsidin leimaaminen sukkinimidyyli-4- [18F]fluorobentsoaatilla

Dave Lumen

Pro gradu – tutkielma

Helsingin yliopisto

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Radiokemian laboratorio

Toukokuu 2015

HELSINGIN YLIOPISTO) HELSINGFORS UNIVERSITET) UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto) Fakultet/Sektion) Faculty		Laitos) Institution) Department
Tekijä) Författare) Author		
Työn nimi) Arbetets titel) Title		
Oppiaine) Läroämne) Subject		
Työn laji) Arbetets art) Level	Aika) Datum) Month and year	Sivumäärä) Sidoantal) Number of pages
Tiivistelmä) Referat) Abstract		
Avainsanat) Nyckelord) Keywords		
Säilytyspaikka) Förvaringsställe) Where deposited		
Muita tietoja) Övriga uppgifter) Additional information		

Sisältö

Tiivistelmä	1
Sisältö	2
Lyhenteet	4
1. Johdanto	5
2. Positroniemissiotomografia	6
2.1 Positronisäteilyn havaitsemisen periaatteet.....	7
2.2 PET-tutkimuksissa käytetyt radionuklidit.....	9
3. ¹⁸ F:n ominaisuudet ja tuottaminen	10
3.1 ¹⁸ F:n tuottaminen.....	12
3.2. ¹⁸ F-leimatut leimausprekursorit.....	13
3.2.2 Nukleofiilinen radiofluoraus.....	14
3.2.3 Elektrofiilinen radiofluoraus.....	17
3.2.4 Muita mahdollisuuksia fluoraamiseen	18
4. ¹⁸ F-Prosteettiset ryhmät makromolekyylien leimauksessa.....	23
4.1 N-Sukkinimidyyli-4-[¹⁸ F]fluorobentsoatti ([¹⁸ F]SFB)	26
5. Nanomateriaalit lääketieteessä	29
5.1 Nanopartikkelien rakenne ja ominaisuudet.....	29
5.2 PET- tutkimuksissa käytettyjä nanomateriaalisovelluksia	31
6. Virusperäiset nanomateriaalit.....	32
6.1 Virusten rakenne.....	33
6.2 Yleisimmät käytetyt virukset.....	34
6.2.1 CCMV-virus (Cowpea chlorotic mottle virus).....	34
6.2.2 Muut käytetyt virukset.....	35
6.3 Nanopartikkelien karakterisointi.....	37
6.3.1 Lämpöelektronimikroskoopi (TEM) ja pyyhkäisyelektronimikroskoopi (SEM)	38
6.3.2 Dynaaminen valonsironta (DLS).....	40
7. Työn tarkoitus	41
8. Materiaalit.....	42
8.1 Laitteisto.....	42
8.2 Liuokset ja kemikaalit.....	44
9. Menetelmät.....	45
9.1 Radiosynteesien valmistelut	45

9.2 [¹⁸ F]F ⁻ -tuotanto ja ¹⁸ F:n siirto lyijykaappiin.....	46
9.3 [¹⁸ F]SFB:n synteesi.....	47
9.4 Virusten leimaaminen [¹⁸ F]SFB:llä.....	48
10. Tulokset.....	49
10.1 [¹⁸ F]SFB:n synteessin optimointi.....	49
10.2 CCMV- virusten leimaaminen [¹⁸ F]SFB:llä.....	53
11. Yhteenveto ja johtopäätökset.....	59
12. Kirjallisuus.....	61

Lyhenteet

PET = Positron emission tomography = Positroniemissiotomografia

CCMV = Cowpea Chlorotic Mottle Virus

MRI = Magnetic resonance imaging = magneettikuvaus

CT/TT= Computed tomography = Tietokonetomografia

SPECT = Single-photon emission computed tomography = Yksifotoniemissiotomografia

In vivo = Elävissä organismissa tehtävä tutkimus

In vitro = Koeputkessa tehtävä tutkimus

FDG = Fluorodeoxyglucose = Fluorideoksiglukoosi

SA = Specific Activity = Spesifinen aktiivisuus

Kryptofix 2,2,2 = 4, 7, 13, 16, 21, 24-heksaoksa-1, 10- diasabisyklo-(8, 8, 8)-heksakosaani

DMSO = Dimetyylisulfoksidi

ACN = Asetonitrili

DMF = Dimetyyliformamidi

S_N2 = Bimolekulaarinen nukleofiilinen substituutio

[¹⁸F]SFB = Sukkinimidyyli-4-[¹⁸F]fluorobentsoaatti

FBA = Fluorobentsaldehydi

VLP = Virus-like nanoparticles = viruksen kaltaiset nanopartikkelit

DLS = Dynamic light scattering = Dynaaminen valonsironta

TEM = Transmission electron microscopy = Läpäiselektronimikroskopia

SEM = Scanning electron microscopy = Pyyhkäiselektronimikroskopia

1. Johdanto

Positroniemissiotomografia eli PET-kuvaus on isotooppilääketieteessä usein käytetty kuvantamismenetelmä, jossa käytetään β^+ -hajoamisen kautta puoliintuvilla radionuklideilla leimattuja radiolääkeaineita. Radiolääkeaine on radioaktiivisen nuklidin sisältämä lääkeaine. PET-kameroilla pystytään havaitsemaan kuvannettavassa kohteessa fotonit, jotka syntyvät positronin annihilaatiosta. Käytetyimmät radionuklidit PET-tutkimuksissa ovat lyhytikäisiä positronisäteilijöitä (esim hiili-11, happi-15 ja fluori-18). Erilaisten PET-kuvausten ja -tutkimusten määrä on kasvanut viimeisten vuosikymmenten aikana nopeasti. PET-kuvauksissa käytetyin radionuklidi on ^{18}F , ja ^{18}F -leimatuilla radiolääkeaineilla on monia sovelluksia, erityisesti neurologiassa ja onkologiassa.

^{18}F :n ominaisuudet tekevät siitä sopivan nuklidin PET-tutkimuksiin. ^{18}F :n suhteellisen pitkä puoliintumisaika ja matala betaenergia ovat hyödyllisiä ominaisuuksia. ^{18}F :a pystytään tuottamaan suhteellisen helposti ja korkealla saannolla. Yleisimmin ^{18}F tuotetaan hiukkaskiihdyttimillä, jolloin pystytään vaikuttamaan siihen missä muodossa ^{18}F tuotetaan. Elektronegatiivinen ja pienikokoinen fluori korvaa yleensä reaktioissa vedyn tai hydroksyyli ryhmän. Riippuen tilanteesta, voi ^{18}F :n liittäminen lääkeaineeseen tai yhdisteeseen mahdollisesti muuttaa lääkeaineen kemiallisia tai biologisia ominaisuuksia.

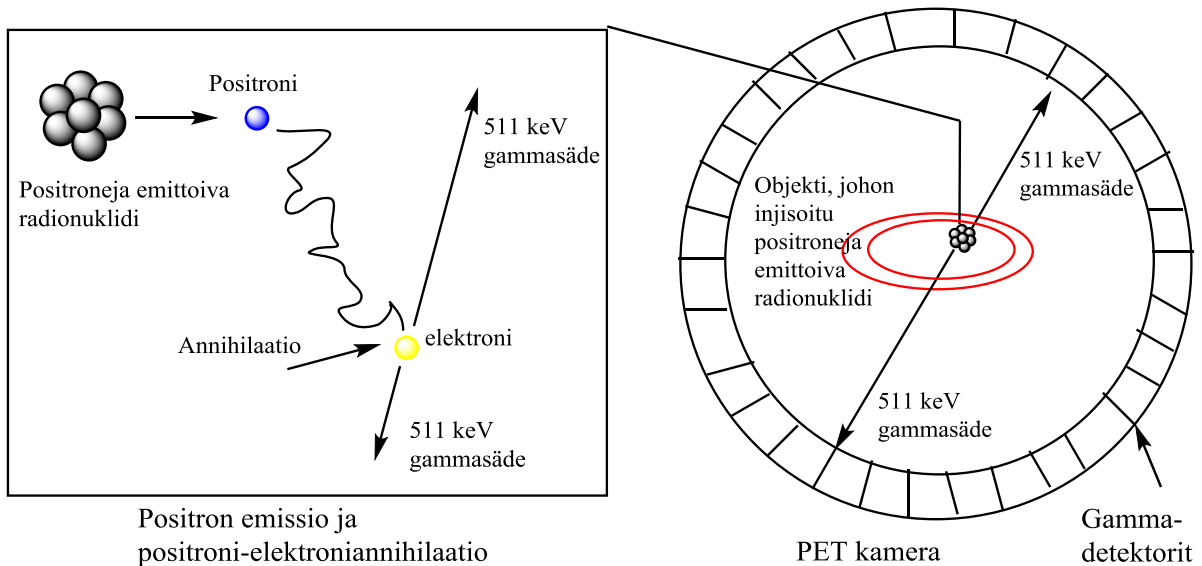
Uusia PET-tutkimuksiin soveltuvia radiolääkeaineita kehitetään koko ajan. Yksi uusi paljon mielenkiintoa saanut sovellusala on nanotieteen yhdistäminen kuvantamisen kanssa. Luonnolliset nanomateriaalit tarjoavat edullisen vaihtoehdon teollisesti tuotetuille nanomateriaaleille. Luonnolliset nanomateriaalit tuotetaan usein eristämällä ne kasveista tai bioreaktoreista, jolloin tuotanto ei vaadi monimutkaista syntetiikkaa. Lisäksi lopullinen nanomateriaali on kooltaan ja muodoltaan samanlaista eli morfologisesti homogeenista. Yksi esimerkki luonnon nanomateriaaleista ovat kasvivirus, joiden hyvin tunnettu proteiinikapsidi monine käyttösovelluksineen ja muokkausmahdollisuuksineen on herättänyt mielenkiinnon niitä kohtaan.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia mahdollisuutta leimata CCMV- virusten (Cowpea chlorotic mottle virus) proteiinikapsidin pintarakennetta ^{18}F :lla. Viruksen kapsidin pinnalla olevien vapaiden aminohappopäiden, erityisesti lysiinipäiden, oletettiin olevan sopivia kohteita leimattaessa ^{18}F -prosteettisella ryhmällä, sukkinimidyyli 4- ^{18}F -fluorobentsoaatilla. Virusten leimautuvuutta testattiin neljässä eri puskuriliuoksessa pH-välillä

6.0–8.0. Leimautuvuus mitattiin annoskalibraattorilla ja radioleimauksen jälkeen virukset karakterisoitiin dynaamisella valonsironnalla ja läpäisyelektronimikroskopiolla.

2. Positroniemissiotomografia

Positroniemissiotomografia eli PET-kuvaus on isotooppilääketieteen alaan kuuluva kuvantamismenetelmä, jossa käytetään radionuklideja, jotka hajoavat positroniemission kautta. PET-kuvauksissa käytettävien radionuklidien puoliintumisajat vaihtelevat 2 minuutista aina 4.18 päivään. Protonirikkaiden radionuklidien hajoessa sen ytimestä emittoituu positroni β^+ -hajoamisen johdosta. Positroni annihiloituu elektronin kanssa, jolloin syntyy kaksi gammakvanttia, jotka saavat energiakseen 511 keV:a ja ne etenevät toisiinsa nähden 180 asteen kulmassa.¹ PET-kameralla pystytään havaitsemaan annihilaatiossa syntyviä gammakvantteja. Annihilaatio ei tapahdu hajoavan radionuklidin omilla elektroniorbitaaleilla, sillä syntyvän positronin täytyy menettää liike-energiansa ensin väliaineessa. Positronin kulkema matka syntymäpaikasta annihilaatiopaikkaan riippuu positronin saamasta energiasta ja väliaineen tiheydestä. Positronin kulkema matka voi vaihdella suuresti. Esimerkiksi lihaksessa positronin kulkema matka voi olla 1-8 mm.² Kuvassa 1 on esitetty periaate positronin annihilaatiosta ja syntyvien fotonien detektoinnista PET- kameralla.



Kuva 1. Radionuklidista emittoitu positroni ja sen annihilaatio elektronin kanssa sekä syntyvien fotonien havaitseminen PET-kameralla. Kuva perustuu Molecular Imaging with Reporter Genes kirjaan (Gambhir S., Yaghoubi S.).

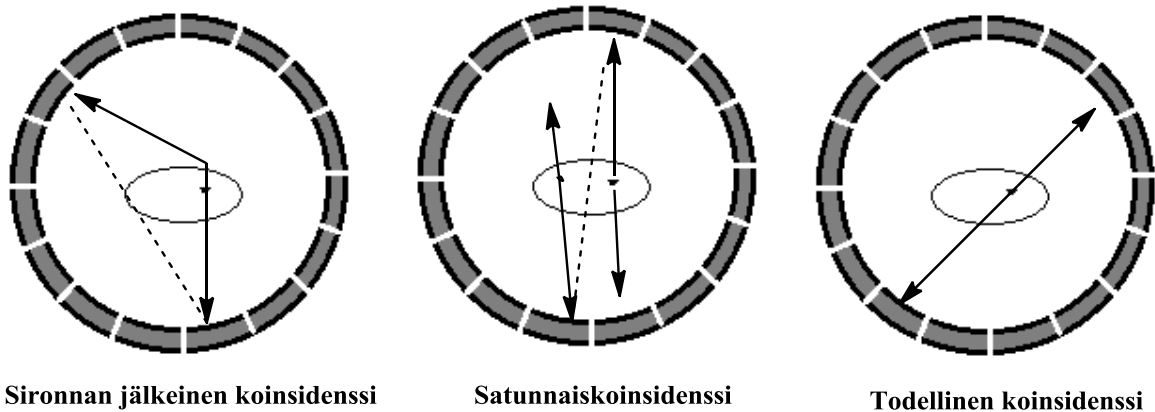
Positronin väliaineessa ennen annihilaatiota kulkeman matkan takia PET-kuvantamisesta saadut tulokset eivät ole anatomisesti yhtä tarkkoja kuin esimerkiksi muilla tomografisilla menetelmillä, kuten tietokonetomografialla (CT tai TT) tai magneettikuvauksella (MRI). PET-kuvantamisen etuina on, että se on kvantitatiivinen menetelmä ja se tarjoaa paremman herkkyyden ja resoluution verrattuna toiseen biolääketieteen kuvantamismetodiin SPECT:iin (Single-photon emission computed tomography = yksifotoniemissiotomografia). Uusimmilla PET-kameroilla, joilla päästään tilaresoluutiossa aina 1-6 mm:n tarkkuuteen, fysikaaliset rajoitukset, jotka ovat johtuneet detektorista ja kollimaattorista, on pystytty minimoimaan.³

2.1 Positronisäteilyn havaitsemisen periaatteet

PET-kameraan kuuluu sarjassa olevat tuikedetektorit, jotka on sijoitettu kuvannettavan kohteen ympärille. Gammakvantin osuessa detektorin tuikeaineeseen (tuikekide) syntyy tuikeaineessa vasteena valotuikahdus, joka aiheuttaa elektronisen pulssin valomonistimessa. Tämä elektroninen pulssi voidaan havaita ja prosessoida tietokoneen avulla ja saadun datan avulla muodostaa 3D-kuva.²

PET-kamerassa parilliset erittäin herkäät detektorit, jotka on sijoitettu vastakkaiselle puolelle detektoriympyrää, toimivat koinsidenssissä keskenään. Jos tämänlainen detektoripari havaitsee kaksi gammakvanttia koinsidenssirajojen sisäpuolelta, voidaan päätellä annihilaatiopaikan olevan kyseisten detektoreiden välisellä linjalla. Annihilaation ei tarvitse välttämättä tapahtua tarkasti keskellä tätä linjaa, vaan se voi olla lähempänä toista detektoria. Tämän takia PET-kameroissa käytetään niin sanottua koinsidenssi-ikkunaa eli annetaan detektoriparille aikaväli (4.2-12 ns) aikaa havaita tapahtunut annihilaatio. Tapahtuma detektoidaan ja tallennetaan polaarisisinä koordinaatteina (kulmana ja säteenä) eli sinogrammina. Sinogrammi on käyrä, joka esittää jokaisella koinsidenssisuoralla eli vastesuoralla havaittujen tapahtumien määrään. Jokaisella detektorilla on oma paikkansa tietokoneen elektronisessa matriisissa, jolloin saadaan tilakoordinaatit säteilyn kohdasta.³

Todellisten koinsidenssien lisäksi detektorit havaitsevat myös satunnaiskoincidenssit sekä sironnasta johtuvat koinsidenssit, jotka vääristävät todellista tulosta. Kuvassa 2 on havainnollistettu detektorin havaitsemat eri koinsidenssit.



Kuva 2. PET- kameran detektorien havaitsemat erilaiset koinsidenssit. Kuva perustuu Norman Bolusin kirjoittamaan artikkeliin.⁴

Satunnaiskoincidenssi havaitaan, kun kaksi 511 keV:n energian omaavaa fotonia kahdesta erillisestä annihilaatiosta osuvat samanaikaisesti vastakkaisiin detektoreihin. Sironnasta johtuva koinsidenssi taas havaitaan, kun samasta annihilaatiosta syntyvistä fotoneista toinen tai molemmat muuttavat suuntaansa osuessaan kudokseen ja osuvat samanaikaisesti vastakkaisiin detektoreihin. Sironnut fotonit menettävät hiukan energiaansa törmätessään kudokseen.⁵ Jotta aito säteily pystytään erottamaan sironneista ja satunnaisista fotoneista, joiden energia on alle 511 keV, käytetään aikaikkunan lisäksi energiaikkunaa, joka on säädetty 511 keV:lle.²

Koinsidenssidetektoreiden aiheuttama elektroninen piiri tuottaa PET-kameralle elektronisen kollimaattorin, joka valitsee vain ne fotonit, jotka sopivat aika- ja energiaikkunaan. Yleensä elektroninen kollimaattori päästää lävitseen vain 1 %:n siihen tulevista havaituista annihilaatioista jatkokäsittelyä varten, kun loput 99 % havaituista annihilaatioista hylätään.⁵ Elektroninen kollimaattori on syrjäyttänyt fyysisen kollimaattorin. Tästä johtuen PET-kameran herkkyys on kasvanut sata- ellei jopa tuhatkertaiseksi verrattuna yksifotoniemissiotomografiaan. Myös tarkat ja nopeat mittaukset tomografisista kudoksista biokemiallisissa prosesseissa ovat tulleet mahdollisiksi.² PET-tekniikan avulla pystytään

määrittämään leimatun yhdisteen pitoisuus kvantitatiivisesti ja tekniikka myös mahdollistaa paremman herkkyuden ja korkeamman resoluution verrattuna SPECT-kameraan.^{5,6}

SPECT eli yksifotoniemissiotomografia muistuttaa toimintaperiaatteeltaan paljon PET:ä. SPECT:ssä käytetään gammasäteilyä emittoivia nuklideja radiolääkeaineissa esim. ¹¹¹In:a. SPECT- kuvauksissa käytetään kuvantamislaitteistoa, jossa on useimmiten pyörivä detektoriosa, joka sisältää yhdestä neljään detektoria. Detektorit havaitsevat kaikki niihin tulevat gammakvantit, jotka ovat energioiltaan sen suuruisia, että detektorit pystyvät ne havaitsemaan. SPECT:ssä kamera on liikkuva, jolloin pystytään tuottamaan kolmiulotteista kuvaa.

2.2 PET-tutkimuksissa käytetyt radionuklidit

Kaikki PET-tutkimuksissa käytetyt β^+ -hajoavat radionuklidit tuotetaan keinotekoisesti. Ne tuotetaan joko syklotronilla tai ne saadaan eluoitua radionuklidigeneraattoreista.⁷ Syklotronilla saadaan tuotettua radionuklideja verrattain helposti lääketieteelliseen käyttöön. Raskaita partikkeleja, yleensä protoneita ja deuteroneja, kiihdytetään 5-100 MeV:n energialla ja ohjataan kohtioon, jossa kiihdytetyt partikkelit tuottavat ydinreaktioiden kautta haluttuja radionuklideja.⁸ Näitä radionuklideja käytetään ensisijaisesti leimattaessa yhdisteitä, joiden biologisia ominaisuuksia halutaan tutkia.⁹ Kaikki yleisesti PET-tutkimuksissa käytetyt radionuklidit ja niiden tärkeimmät fysikaaliset ominaisuudet on listattu taulukossa 1.

Taulukko 1. PET-tutkimuksissa yleisesti käytetyt radionuklidit ja niiden fysikaaliset ominaisuudet.

Nuklidi	$t_{1/2}$	E_γ (keV)	Positronin kulkema matka ennen annihilaatiota (mm)		Kohtio materiaali	Ydinreaktio	E_β (MeV)	I_β %	Valmistustapa
			Maksimimatka	Keskimatka					
Hiili-11 [¹¹ C]	20,4 min	511	5,0	0,3	¹⁴ N ₂	¹⁴ N(p, α) ¹¹ C	0,96	100	Syklotroni
Typpi-13 [¹³ N]	9,96 min	511	5,4	1,4	H ₂ ¹⁶ O	¹⁶ O(p, α) ¹³ N	1,19	100	Syklotroni
Happi-15 [¹⁵ O]	2,03 min	511	8,2	1,5	¹⁴ N ₂ +O ₂	¹⁴ N(d,n) ¹⁵ O	1,72	100	Syklotroni
Fluori-18 [¹⁸ F]	109,7 min	511	2,4	0,2	H ₂ ¹⁸ O	¹⁸ O(p,n) ¹⁸ F	0,64	97	Syklotroni
Gallium-68 [⁶⁸ Ga]	68,1 min	511	-	-	⁶⁸ Ge ^a	-	1,90	90	Generaattori
Bromi-76 [⁷⁶ Br]	16,2 h	511	-	-	⁷⁶ Se	⁷⁶ Se(p,n) ⁷⁶ Br	3,40	57	Syklotroni
Rubidium-82 [⁸² Rb]	1,25 min	511	-	-	⁸² Sr ^a	-	3,35	95	Generaattori
Jodi-124 [¹²⁴ I]	99,6 h	511	-	-	¹²⁴ Te	¹²⁴ Te(p,n) ¹²⁴ I	2,10	23	Syklotroni

^a Galliumin ja rubidiumin lähtömateriaalit ovat generaattoreissa käytetyt äitinuklidit ja muut ovat kohtioissa käytetyt kohtiomateriaalit.

Taulukossa 1 esitetyistä nuklideista kolme ensimmäistä, hiili, typpi ja happi ovat pääalkuaineita elävissä organismeissa. Tästä johtuen on luonnollista ja loogista leimata molekyyliä *in vivo*- tutkimuksiin hiilen, typen ja hapen radioaktiivisilla nuklideilla. Tästä huolimatta kaikista käytetyin positroniemitteri on ^{18}F , joka ei ole yleisesti esiintyvä alkuaine elävissä organismeissa. ^{18}F :n suurena etuna on se, että se pystytään kuitenkin yhdistämään orgaanisiin molekyyliin vaihtamalla se vedyn, hydroksyyli-ryhmän tai jonkin muun funktionaalisen ryhmän tilalle. Hiilen, typen ja hapen radionuklideilla leimatuilla yhdisteillä on usein samat biologiset ominaisuudet kuin alkuperäisellä leimattavalla yhdisteellä. Käytettäessä näitä radionuklideja lääketieteellisissä tutkimuksissa pystytään tutkimaan nopeita prosesseja esim. metaboliaa, potilaan saama radioaktiivinen annos on pieni ja tutkimuksia voidaan yhdistää ja toistaa lyhyellä aikavälillä ilman, että ylitetään annosraja.²

Radioleimauksista johtuvia mahdollisia biologisten ominaisuuksien muutoksia voidaan myös käyttää hyväksi erilaisissa tutkimuksissa. Liitettäessä molekyyliin muita radionuklideja kuin hiiltä, typpeä tai happea, muuttuvat molekyylien ominaisuudet radionuklidin lisäyksen johdosta toisenlaiseksi, jolloin molekyyli käyttäytyy erilailla. Tämä vaikeuttaa tutkimuksen ennustettavuutta ja molekyylin käyttäytymistä. Esimerkiksi molekyylin hajoaminen elimistössä voi olla erilainen, kun siihen on liitetty radionuklidi.

3. ^{18}F :n ominaisuudet ja tuottaminen

^{18}F :lla on ominaisuuksia, jotka tekevät ^{18}F :sta houkuttelevamman nuklidin verrattuna muihin lyhytikäisiin positronisäteilijöihin (esim. ^{15}O ja ^{11}C). Suhteellisen pitkä puoliintumisaika ($t_{1/2} = 109,8$ minuuttia) mahdollistaa ^{18}F :n käytön kompleksisissa ja monivaiheisissa synteeseissä sekä tarjoaa mahdollisuuden pidennettyihin kuvantamiskokeisiin. Pitkän puoliintumisajan vuoksi lähtöaineet ja tuotteet, jotka sisältävät ^{18}F :a, voidaan käyttää kohtuullisen matkan päässä niiden valmistuspaikasta.

^{18}F :n puoliintuminen tapahtuu käytännössä positroniemissiolla (97 %) ja emittoituvalla positronilla on suhteellisen pieni energia (0,64 MeV). Matalan energian takia positroni kulkeutuu esim. vedessä/kudoksessa maksimissaan vain 2,4 mm, mikä mahdollistaa korkean tila/kohde- resoluution PET- kuvauksissa ja helpottaa potilaan saaman säteilyannoksen minimoimista.

^{18}F :a voidaan tuottaa sekä kiihdyttimillä että ydinreaktoreissa ja ^{18}F :n tuottaminen onnistuu monella eri ydinreaktiolla. ^{18}F :a voidaan tuottaa syklotroneilla suuria määriä korkealla spesifisellä radioaktiivisuudella (SA), teoreettisen maksimin ollessa 63270 GBq/ μmol .¹⁰

^{18}F :a käytetään paljon lääkeainekemiassa substituenttina. ^{18}F -leimatut radiolääkkeaineet tuotetaan analogeiksi mieluummin kuin luonnollisiksi yhdisteiksi, sillä useimmat biomolekyylien rakenteet eivät sisällä fluoria. Fluoriatomilla on pieni steerinen koko ja se muodostaa suurienergiisiä hiili-fluoridoksia. Tämän lisäksi fluori on elektronegatiivisin alkuaine ja sen liittäminen yhdisteeseen voi aiheuttaa suuria muutoksia yhdisteen fysiko-kemiallisiin ja biologisiin ominaisuuksiin. ^{18}F lisätään molekyyliin substituenttina joko vetyatomien tai hydroksyyli-ryhmän tilalle. Vaikka usein kuvitellaan, että fluori korvaa isosteerisesti vedyn molekyylissä, erot elektronegatiivisuudessa ja vetysidosvoimakkuudessa tekevät fluorista enemmän hydroksyyli-ryhmän kaltaisen.

^{18}F :n liittamisestä aiheutuvaa kemiallisten ja biologisten ominaisuuksien muuttumista käytetään hyväksi tuottaessa ^{18}F -leimattuja radiolääkkeaineita sekä lääkekehityksessä.¹¹ Paras esimerkki tästä on glukoosin analogin 2-deoksi-2- ^{18}F -fluoro-D-glukoosin (^{18}F FDG) synteesi. Glukoosin OH-ryhmän substituutio ^{18}F :lla tuottaa muunnellun metabolisen käytöksen ja radiolääkeaine jää loukkoon solun sisälle glukoosia metabolisoivien solujen sisään.¹² Tätä ilmiötä käytetään hyväksi detektoitaessa syöpämetastaaseja sekä tutkittaessa solujen energiametabolian muutoksia. ^{18}F FDG:tä pidetään tärkeimpänä radiomerkkiaineena, koska sillä on monia sovelluksia lääketieteessä neurologian, kardiologian ja onkologian parissa. Noin 90 % nykyisistä kliinisistä PET-tutkimuksista tehdään ^{18}F FDG:llä.¹³

3.1 ^{18}F :n tuottaminen

^{18}F :a voidaan tuottaa usealla eri ydinreaktiolla. ^{18}F :n valmistamiseen löytyy useita tapoja, riippumatta siitä valmistetaanko sitä hiukkaskiihdyttimellä vai ydinreaktoreissa. Nykyisin suurin osa radiolääketieteellisestä ^{18}F :sta tuotetaan syklotronilla säteilyttämällä tarkoituksenmukaisia kohtioita. Kohtioita tähän tarkoitukseen on saatavilla monenlaisia. Usein ne ovat samankaltaisia verrattuna toisiinsa, mutta ne on suunniteltu tiettyä syklotronia varten. Taulukossa 2 on esitetty hiukkaskiihdyttimissä ja ydinreaktoreissa käytettyjä ydinreaktioita, joilla ^{18}F :a voidaan valmistaa.¹⁰

Taulukko 2. Ydinreaktiot, joita käytetään ^{18}F :n tuottamiseen kiihdyttimissä ja ydinreaktoreissa (Kilbourn 1990).

$^{20}\text{Ne}(d, \alpha)^{18}\text{F}$
$^{20}\text{Ne}(p, 2p)^{18}\text{F}$
$^{16}\text{O}(^3\text{He}, p)^{18}\text{F}$
$^{16}\text{O}(\alpha, pn)^{18}\text{F}$
$^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$
$^{20}\text{Ne}(^3\text{He}, n)^{18}\text{Ne}, ^{18}\text{Ne}-^{18}\text{F}$
$^6\text{Li}(n, \alpha)^3\text{H}, ^{16}\text{O}(^3\text{H}, n)^{18}\text{F}$

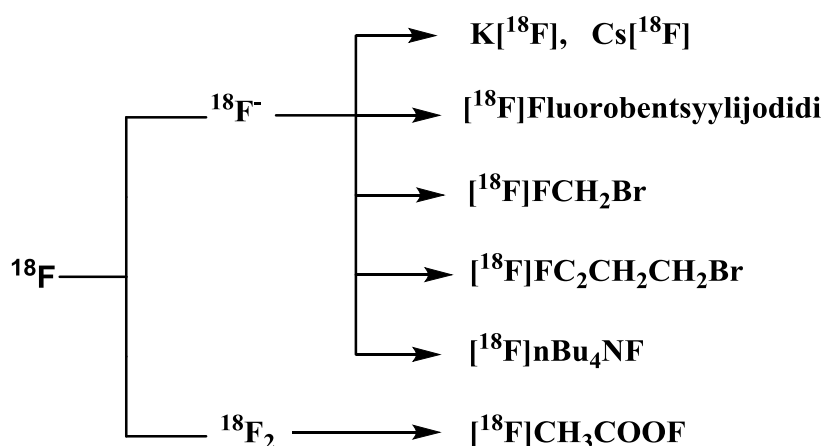
^{18}F :a voidaan tuottaa radioleimausreaktioihin kahdessa eri muodossa, joko [^{18}F]Fluoridina ([^{18}F]F⁻) tai molekulaarisena fluorikaasuna ([^{18}F]F₂), jolloin fluori pystytään liittämään halutulla ja reaktion vaatimalla tavalla prekursoriin.¹⁴ Fluori tuotetaan [^{18}F]Fluoridina, kun halutaan saada fluori liitettyä lähtöaineeseen nukleofiilisellä substituutiolla ja vastaavasti molekulaarisena fluorikaasuna ([^{18}F]F₂, kun se halutaan liittää lähtöaineeseen elektrofiilisellä substituutiolla. Molemmat fluorin muodot pystytään tuottamaan syklotronin avulla. $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ ydinreaktiolla saadaan tuotettua [^{18}F]F⁻:a rikastetusta (>97 %) [^{18}O]H₂O kohtiosta ja [^{18}F]F₂:a joko $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ reaktiolla Ne:F₂ kaasukohtiosta tai $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ reaktiolla ^{18}O :F₂ kaasukohtiosta.^{15,16} Vuosien varrella on useaan otteeseen kehitetty fluorille valmistusmetodia, suunniteltu spesifisiä kohtioita ja [^{18}F]F₂:n keräämistä, jotta tuotannosta saataisiin mahdollisimman tehokasta.¹⁷

Molekulaarisen $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$:n tuottaminen vaatii kuitenkin $^{19}\text{F}_2$ kaasun lisäämistä kantajaksi, mikä johtaa huonoon SA:han (0,37- 0,74 GBq/ μmol).⁵ Ainoastaan erityisellä kohtion jälkeisellä metodilla, jossa $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ muutetaan $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$:ksi ilman erillistä kantajaa, SA on saatu nousemaan 55 GBq/ μmol .¹⁸ $[^{18}\text{F}]\text{Fluoridi-ioni}$ voidaan tuottaa korkealla saannolla ja ilman lisättyä kantajaa protonisäteilytyksellä ^{18}O -rikastetusta vedestä ydinreaktiolla $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.^{19,20} Koska $[^{18}\text{F}]\text{fluoridi}$ tuotetaan muodossa, johon ei ole lisätty kantajanuklidia ja joka liukenee tuoton jälkeen välittömästi kohtioveeten, on $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$:n spesifinen radioaktiivisuus korkea. Tällä menetelmällä saadaan fluoridia tuotettua niin, että SA-arvo on korkeimmillaan 5180 GBq/ μmol ja rutiinituotannossa tyypillinen SA on 185 GBq/ μmol .^{21,22}

3.2. ^{18}F -leimatut leimausprekursorit

Koska $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ saadaan tuotettua kantajavapaana korkealla spesifisellä aktiivisuudella, pidetään sitä parempana valintana radioleimauksessa kuin $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$:a. Spesifinen aktiivisuus määritetään jakamalla kokonaisaktiivisuus leimatun yhdisteen massalla. Korkea spesifinen aktiivisuus on tärkeä tekijä PET-tutkimuksissa. On tärkeää pitää kantajan määrä pienenä, jotta saavutetaan mahdollisimman korkea SA lopputuotteeseen.

Primääriset lähtöaineet fluorauksessa ovat nukleofiilinen fluori $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ ja elektrofiilinen fluori $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Orgaanisissa molekyyliä varten on kehitetty sekundäärisiä fluorauksessa käytettäviä prekursoreita. Nämä yleisimmät fluorauksessa käytettävät lähtöaineet on esitetty kuvassa 3.



Kuva 3. Nukleofiilisissä ja elektrofiilisissä ^{18}F -fluorauksissa käytetyt primääriset lähtöaineet ja yleisimmät sekundääriset lähtöaineet.

Fluoridi-ioni $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ pitää aktivoida ennen kuin sitä käytetään fluorauksessa. Metallifluoridit kuten K^{18}F ja Cs^{18}F sekä tetra-n-butyylimmonium fluoridi ($\text{nBu}_4\text{N}^{18}\text{F}$) ovat yleisimmät lähtöaineet nukleofiilisissä fluorauksissa. Elektrofiilisissä fluorauksissa asetyylihydropofuoriitti ($[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$) on käytetyin lähtöaine.^{5,10} ^{18}F -leima voidaan lisätä kohdemolekyyliin joko suoraan tai se lisätään kiinnitettynä prosteettiseen ryhmään tai syntoniin. Usein liitettäessä ^{18}F :a kohdemolekyyliin, erityisesti nukleofiilisissä reaktioissa, pitää fluorin edestä poistaa suojaryhmä, jolloin synteesissä on useampi reaktiovaihe.

3.2.2 Nukleofiilinen radiofluoraus

Nukleofiilisessä radiofluorauksessa lähtöainemolekyyli reagoi ^{18}F :n kanssa tuottaen radioleimattua yhdisteen. ^{18}F -fluoridi vastaanotetaan esim. vesiseoksessa ^{18}O -kohtiosta säteilytyksen jälkeen. Vesifaasissa oleva fluoridi on kuitenkin reagoimaton, joten sitä pitää muokata hieman. Ensimmäinen vaatimus työskenneltäessä $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$:lla on poistaa rikastettu vesi ja liuottaa kuiva reagenssi orgaaniseen liuottimeen. Vedessä $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ on vahvasti hydratoitunut ja siksi inaktiivinen nukleofiilisiin reaktioihin. Tämän takia $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ pitää siirtää kemiallisesti reaktiivisempaan muotoon, jotta saavutettaisiin nopeampia reaktioaikoja ja parempia saantoja.²⁴

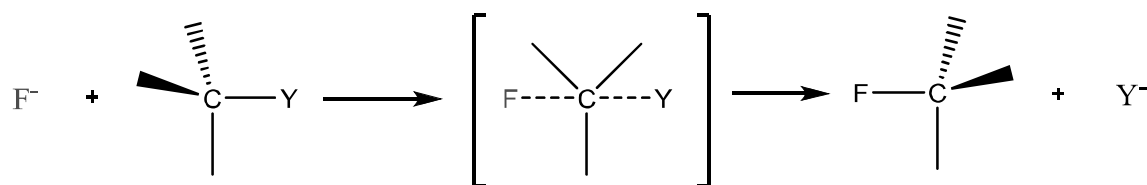
Paras metodi reaktiivisen $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$:n keräämiseen on absorboida $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ ioninvaihtohartsiin ja myöhemmin eluoida laimealla emäksellä, useasti käytetään kalium karbonaattia (K_2CO_3) asetonitriili/vesi-seoksessa. Kalium toimii vastaionina fluorille, ja koska fluori on nukleofiilisempi anioni kuin karbonaatti, ei liuoksessa oleva karbonaattianioni häiritse reaktiota. Eluoitu liuos kuivataan sen jälkeen atseotrooppisesti eli kerahaihdutuksella. Kerahaihdutuksessa liuoksessa oleva vesi saadaan haihtumaan asetonitriilin mukana, jolloin reaktioseos saadaan haihdutettua vedettömäksi.^{22,25} Faasinvaihtokatalyytin lisäyksellä (esim. Kryptofix 2,2,2:n = 4, 7, 13, 16, 21, 24-heksaoksa-1, 10- diasabisyklo-(8, 8, 8)-heksakosaanin) saadaan seos siirtymään helpommin orgaaniseen faasiin $\text{K } 2,2,2/[^{18}\text{F}]\text{KF}$ -kompleksina. Tässä reaktiivisessa kompleksissa Kryptofix 2,2,2 kelatoi vastakationin ja erottaa sen $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$:sta ja muuttaa fluorin nukleofiilisuutta vapauttamalla sen anioniksi liuokseen, jolloin se on reaktiivisemmassa muodossa.²⁶

Leimausreaktiot tehdään yleensä dipolaarisessa aproottisessa liuottimessa kuten dimetyylisulfoksidissa (DMSO), asetonitriilissä (ACN) tai dimetyyliformamidissa (DMF).

Dipolaarinen aproottinen liuotin ei kykene luovuttamaan tai vastaanottamaan protoneita tai muodostamaan vetysidoksia ja sillä on suuri dipolimomentti sen sisältämien atomien vapaiden elektroniparien ansiosta. Nukleofiilisiä radiofluorauksia käytetään alifaattisissa ja aromaattisissa substituutioreaktioissa.

Alifaattiset reaktiot ovat pääosin S_N2 reaktioita (bimolekulaarinen nukleofiilinen substituutio). S_N2 reaktiossa uusi sidos muodostuu sekä vanha sidos hajoaa samanaikaisesti, jolloin molekyyli on hetkellisesti siirtymätilassa. Käytännössä reaktiossa nukleofiili muodostaa uuden sidoksen kohdeatomien kanssa samalla, kun atomin vastakkaisella puolella olevan lähtevän ryhmän sidos hajoaa. Esimerkki S_N2 -reaktiosta on esitetty kuvassa 4.

Alifaattinen nukleofiilinen substituutio (S_N2)



Y = Lähtevä ryhmä esim. halidi, triflaatti tai tosylaat

Kuva 4. S_N2 -reaktiossa nukleofiilinen fluori muodostaa uuden sidoksen hiilen kanssa samalla, kun hiilen vastakkaiselta puolelta katkeaa lähtevän ryhmän sidos.

Lähtevinä ryhminä molekyylissä voivat olla esim. mesyyli-, tosyyli- ja triflaatti-ryhmä tai halogeenit.²⁷ Halogeeneistä bromin on osoitettu olevan reaktiivisin ja paras lähtevä ryhmä.²⁸ Reaktioille löytyy paljon erilaisia mahdollisuuksia eri variaatioihin. Reaktioon vaikuttavat käytetyt liuottimet, katalyytit, reaktiolämpötila ja lähtöaineiden molekyylirakenteet. Valittaessa lähtevää ryhmää pitää miettiä myös lähtöaineen stabiilisuutta, puhdistuksen helppoutta ja sivutuotteiden mahdollista muodostumista.

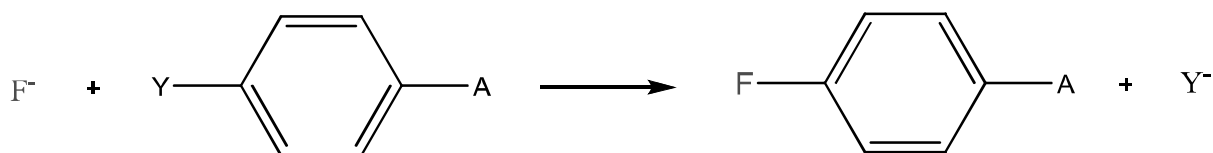
Nukleofiilinen hyökkäys S_N2 -reaktion mukaisesti tapahtuu parhaiten metyyli- ja primäärisiin halideihin, mutta paljon huonommin tertiääriseen halidiin. Tertiääristen halidien substituenttien aiheuttama streerinen este vaikeuttaa huomattavasti nukleofiilistä substituutiota.

Lähtöaineen reaktiot muiden nukleofiilien kanssa voivat olla vaikeasti puhdistettavia ja erotettavia, joten synteesiä tehtäessä tulee tämä ottaa huomioon. Lisäksi S_N2 -reaktion kanssa kilpailee eliminaatioreaktio E2. Eliminaatioreaktiossa nukleofiili voi toimia emäksenä ja reagoida lähtöaineen kanssa kaappaamalla vetyatomin jolloin muodostuu alkeeni. Lisäksi liian hapan ympäristö/liuos heikentää huomattavasti ^{18}F :n reaktiivisuutta ja lisää fluorin kiinnittymistä reaktioastian seinämiin.

Nukleofiilinen aromaattinen substituuio, jossa ^{18}F korvaa lähtevän ryhmän, on tullut suuresti käytetty menetelmä ^{18}F -kemiassa.²⁹ Aromaattiset renkaat eivät itsessään ole soveltuvia nukleofiiliselle substituuioille fluorilla, mutta jos rengas aktivoidaan yhdellä tai useammalla elektroneja puoleensa vetävällä ryhmällä orto- tai para-asemaan lähtevään ryhmään nähden, on suora S_N2 -reaktio mahdollinen.³⁰

Substituentit kuten $-\text{NO}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{CHO}$ tai $-\text{COCH}_3$ voivat toimia elektroneja puoleensavetävinä ryhminä. Lähtevänä ryhmänä voidaan käyttää useita eri ryhmiä, joista nitro- ja trimetyyliammonium-ryhmät ovat yleisimmät.³¹ Suoraa nukleofiilistä substituuotiota NO_2 -ryhmän tilalle käytetään usein tuotettaessa aryylifluoridia radiomerkkiaineleimauksissa. Nukleofiilinen aromaattinen substituuio on esitetty kuvassa 5.

Aromaattinen nukleofiilinen substituuio ($S_N\text{Ar}$)



Y = Lähtevä ryhmä esim. halidi, NO_2 tai R_3N

A = Elektroneja puoleensa vetävä ryhmä esim. CHO , COR , COOR , CN tai NO_2

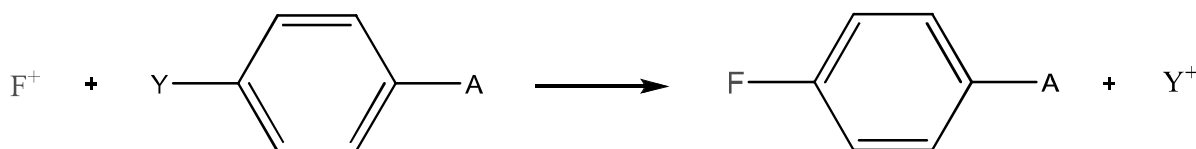
Kuva 5. Aromaattinen nukleofiilinen substituuio, jossa nukleofiilinen fluori muodostaa sidoksen aromaattisen renkaan kanssa ja lähtevän ryhmän sidos katkeaa.

3.2.3 Elektrofiilinen radiofluoraus

Lähtöaineena $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ on erittäin reaktiivinen elektrofiilisissä fluorausreaktioissa. Koska $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$:n valmistuksessa pitää reaktioon lisätä kantajaksi fluorikaasua, on $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -molekyylissä vain yksi ^{18}F -atomi ja toinen on ^{19}F -atomi. Tämän takia reaktioiden leimaussaanto jää aina alle 50 %:n. Parhaiten elektrofiilinen ^{18}F saadaan tuotettua $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ ydinreaktiolla ^{18}O -kaasusta. Tuotanto tällä reaktiolla on kaksivaiheinen: ^{18}O -kaasun säteilyttäminen tuottaa ^{18}F -kaasua, joka kiinnittyy kohtion sisäpinnalle. Toinen säteilytys tehdään lisäämällä kohtioon pieni määrä kantajafluoria inertissä kaasussa ja säteilyttämällä kohtiota, jolloin syntyy $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ -kaasua riittävällä SA:lla, jolla saadaan tehtyä elektrofiilinen fluoraus.¹⁶ Koska $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ on ei-selektiivinen elektrofiili ja toimii hapettimena, se muutetaan usein vähemmän reaktiivisempaan muotoon. Yleensä se muutetaan $[^{18}\text{F}]$ asetyylihydropfluoriitiksi, mutta myös muita mietoja fluorausreagenssejä käytetään (esim. fluoro-N-alkyyliisulfonamidi). Nämä miedot fluorausreagenssit liukenevat myös paremmin verrattuna $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$:in.

Elektrofiilisessä alifaattisessa fluorauksessa fluori liittyy elektronirikkaaseen kohtaan molekyylissä, esimerkiksi hiili-hiili kaksoissidokseen. Mikäli molekyylissä on useampi kaksoissidos, voi fluoraus tapahtua mihin tahansa kaksoissidokseen. Tämän takia pyritään käyttämään nukleofiilistä fluorausta mikäli mahdollista, jolloin saadaan helpommin aikaiseksi regioselektiivinen fluoraus. Muuten elektrofiilinen fluoraus on suhteellisen helppo ja nopea tapa verrattuna nukleofiiliseen fluoraukseen. Regioselektiivinen elektrofiilinen fluoraus on mahdollista fluorodemetallaation kautta. Fluoraus tehdään elektroneja luovuttavan ryhmän (esim. $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{NH}_2$) ollessa mukana, jolloin fluori korvaa metallisen substituentin kuten SnR_3 :n, SiR_3 tai HgR :n.³² Kuvassa 6 on esitetty elektrofiilisen substituution periaate.

Elektrofiilinen fluoraus



Y = Lähtevä ryhmä esim. H, SnR_3 , HgR tai SiR_3

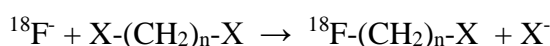
A = Elektroneja luovuttava ryhmä esim. OH , OCH_3 , NH_2 tai SR

Kuva 6. Elektrofiilinen fluori muodostaa sidoksen renkaaseen ja lähtevän ryhmän sidos katkeaa.

3.2.4 Muita mahdollisuuksia fluoraamiseen

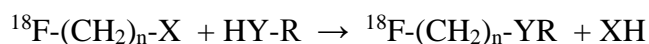
Suora nukleofiilinen substituutio on monissa tapauksissa vaikea ja joskus jopa mahdoton suorittaa kompleksisissa ja monisubstituoiduissa molekyyeissä, joita ei ole aktivoitu. Kun suora ^{18}F -fluoraus ei ole mahdollinen, voidaan käyttää ^{18}F -leimattuja prosteettisia ryhmiä, kuten alifaattisia ^{18}F -fluoroalkylaatio, -amidaatio, -asylaatioaineita, joita muodostetaan $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$:sta. Fluorausmenetelmä on silloin kaksivaiheinen.

$[\text{}^{18}\text{F}]$ Fluoratut syntonit valmistetaan ensin lisäämällä $^{18}\text{F}^-$ nukleofiilisella substituutiolla disubstituoituun alkeeniin:



jossa X on Br, OMes tai OTos.

Tehokkaan reaktion aikaansaamiseksi fluori täytyy muuttua reaktiiviseen muotoon. Apuna käytetään K_2CO_3 :a ja kompleksiagenttina aminopolyeetteriä (Kryptofix 2, 2, 2) dipolaarisessa aprottisessa liuottimessa kuten DMF, DMSO tai ACN. Substituutiosaanto kasvaa lähtevien ryhmien ollessa $\text{Br} < \text{OMes} < \text{OTos}$ ja kasvavan alkyyliketjun pituuden mukaan.²⁷ Fluoroalkylointi tekee mahdolliseksi toisen synteesivaiheen, jossa $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluoroalkyyli-ryhmä voi reagoida -NH-, -OH ja -SH ryhmien kanssa.

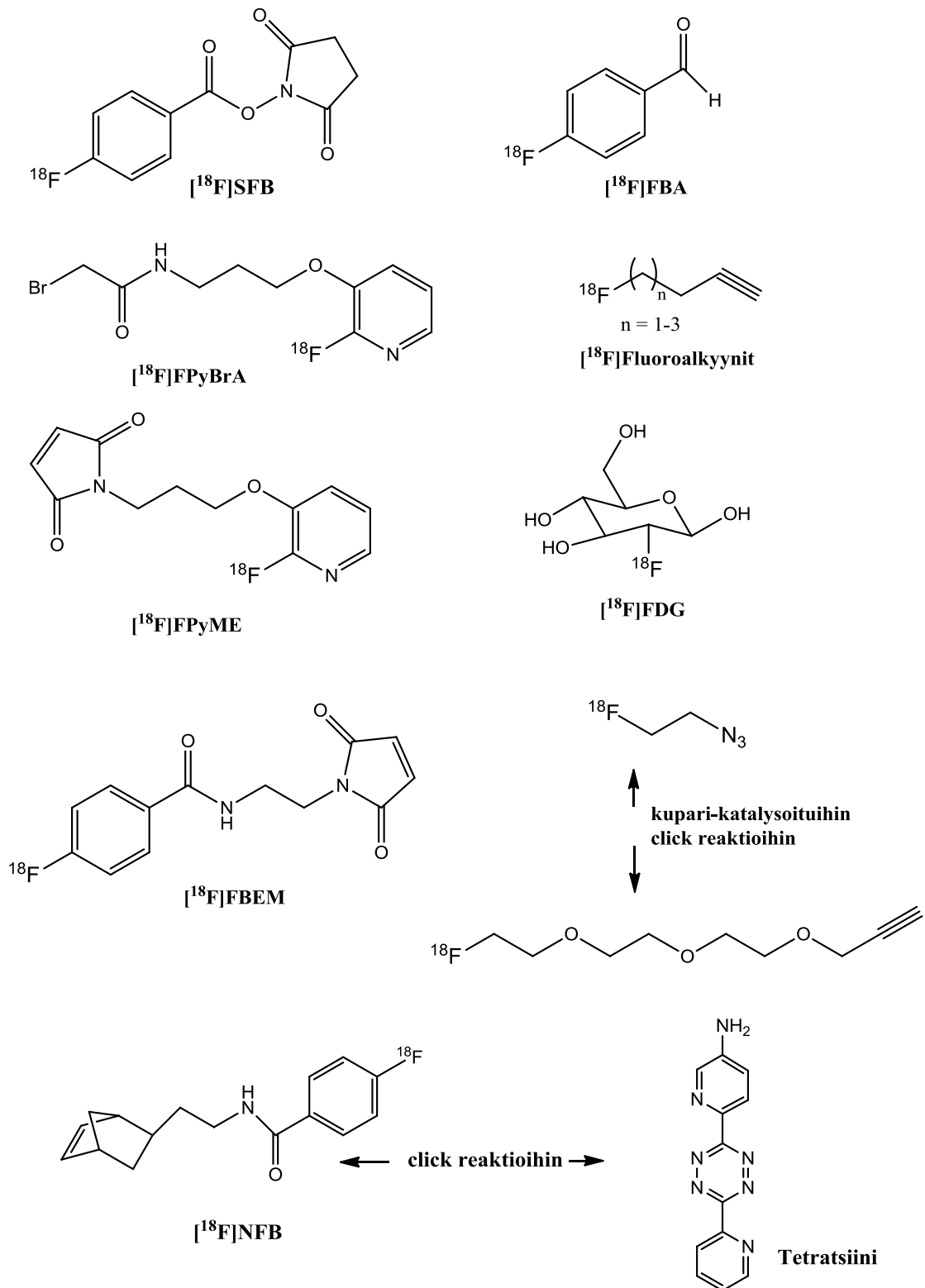


jossa Y sisältää O, S tai N-ryhmän ja X voi olla Br, OMes tai OTos.

^{18}F -Fluoroalkylaatioyhdisteet on yleensä syntetisoitu fluoraamalla vastaavat dihalo- tai disulfonaattialkyylit ja niitä käytetään myöhemmin pienten molekyylien leimaamiseen, jotka sisältävät amino-, hydroksyyli- tai tioliryhmän.^{10,27,33} $[\text{}^{18}\text{F}]$ Fluoroetyylitosylaatti ja -bromidi, kuten myös niiden propyylianalogeja, on kaikkia käytetty suoraan ^{18}F -leimaukseen. Vaihtoehtoisesti ^{18}F -fluoroalkylaatioreagenssejä on muutettu reaktiivisemmiksi jodideiksi tai triflaateiksi insitu.^{34,35} Nykyään myös $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluorometylaatioreagenssejä, erityisesti $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluorometylibromidia käytetään ^{18}F -leimausaineena.³⁶ $[\text{}^{18}\text{F}]$ Fluorometyyli-ryhmä on usein epästabiili in vivo olosuhteissa, mutta vaihtamalla yksi tai kaksi vetyä deuterium atomeiksi molekyyli stabiloituu. Pieni ^{18}F -fluoroaromaattinen yhdiste voidaan valmistaa yhdisteiden kuten $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluorobentsaldehydien ja niiden $[\text{}^{18}\text{F}]$ fluorobentsyylihalidijohdannaisten kautta. Näillä voidaan leimata makromolekyyliä

(peptidit, proteiinit), mutta yleensä käytetään monimutkaisempia leimausaineita amino-, karboksylaatti-, tai tioli-funktioiden sisältämien yhdisteiden reaktioissa.³⁷

Nykyään on jo kehitetty monia erilaisia ^{18}F -prosteettisia ryhmiä, jotka soveltuvat moniin erilaisiin reaktioihin. Prosteettiset ryhmät voivat reagoida fluoroalkylaation, fluoroasylaation ja fluoroamidaation kautta $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$ tai $-\text{COOH}$ ryhmiin. Kuvassa 7 on esitelty tunnettuja ^{18}F -prosteettisia ryhmiä.

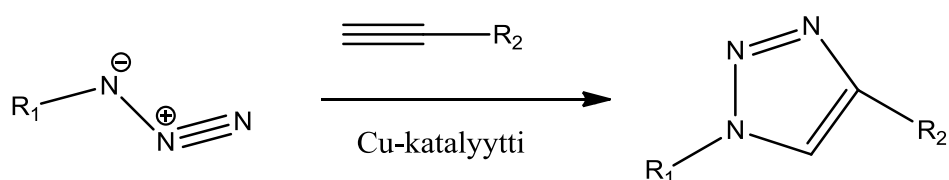


Kuva 7. Julkaistuja ^{18}F -prosteettisia ryhmiä, joilla on erilaiset kemialliset ominaisuudet. [^{18}F]SFB = N-sukkinimidyyl-4- ^{18}F fluorobentsoaatti, [^{18}F]FBA = 4- ^{18}F fluorobentsaldehydi, [^{18}F]FpyBrA = 2-bromo-N-[3-(2- ^{18}F fluoropyridiini-3-yloksi)propyyli]asetamidi, [^{18}F]FpyME = 1-[3-(2- ^{18}F fluoropyridiini-3-yloksi)propyyli]pyrrooli-2,5-dioni, tetratsiini ja [^{18}F]NFB = N-[2-(bisyklo[2.2.1]hept-5-en-2-yyli)etyyli]-4- ^{18}F fluorobentsamidi.^{26,39,40}

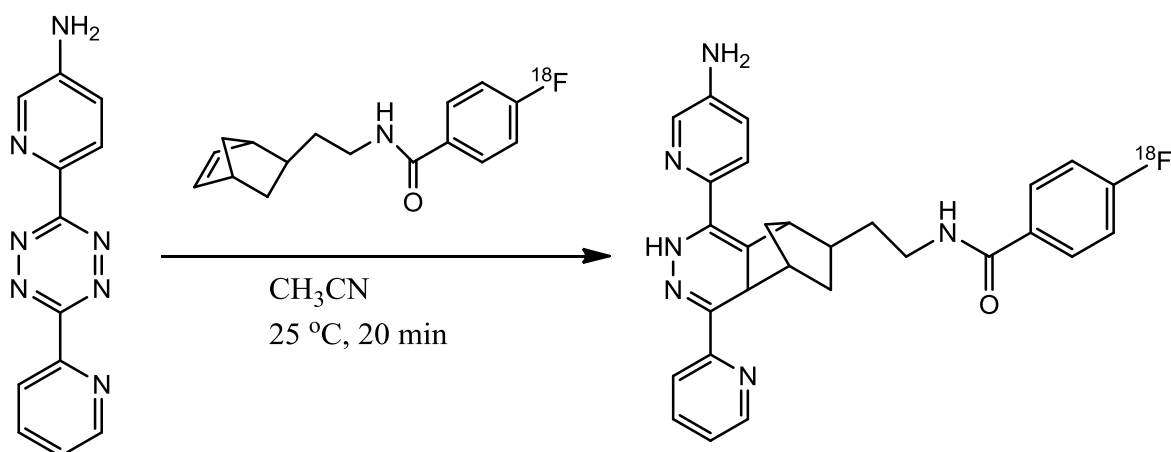
Lisättyä edellä esitettyihin traditionaalisiin radiofluoraustekniikoihin, uudenlaisia strategioita merkkiaineiden radiofluoraukseen on kehitetty viime vuosina, kuten entsyymattinen fluoraus ja niin sanottu kupari-katalysoitu ”click reaktio”, jossa 1,3-dipolaarinen sykloadditioreaktio atsidin ja terminaalisen alkyynin välillä tuottaa vastaavia triatsoleita.³⁸ Uudempi tekniikka nykyisen fluori-hiili kemian tilalle yhdistettynä [¹⁸F]fluori-pii, -boori tai -fosfaattisidoksiin ja yksinkertaisen halogeeni-vaihtoreaktioiden hyväksikäyttö voi johtaa monipuolisempaan ¹⁸F-leimaamiseen lähitulevaisuudessa.⁴¹

Entsyymattisen fluorauksen idea on, että fluoraus olisi kemoselektiivinen. Verrattuna ”normaaliin”, usein käytettyyn valikoivaan fluoraukseen, jossa muodostuu C-F-sidos, entsyymattisessa fluorauksessa fluorisidoksen muodostuminen olisi bio-katalyyttisesti ohjautuvaa. Yksi uusimmista löydöistä on *Streptomyces cattleya* bakteerista eristetty fluorausentsyymi, jolla on kyky muodostaa C-F-sidoksia. Löytö on lupauksia antava ajateltaessa entsyymattista fluorausta biomolekyyleihin.⁴²

Edellä mainituista kupari-katalysoiduista click-reaktioista käytetyin on Cu(I) katalysoitu Huisgenin reaktio, joka on 1,3-dipolaarinen sykloadditio päätealkyynien ja atsidien välillä, joka tuottaa 1,4-disubstituoituja 1,2,3-triatsoleja miedoissa reaktio-olosuhteissa. Reaktiota voidaan käyttää suhteellisen helposti, sillä molemmat tarvittavat funktionaaliset ryhmät, atsiidi ja alkyyni, voidaan liittää useisiin eri molekyyleihin. Molemmat ryhmät ovat suhteellisen stabiileja useimmissa yleisimmissä orgaanisessa kemiassa käytetyissä reaktio-olosuhteissa. Esimerkki reaktiosta on esitetty kuvassa 8.⁴³ Vaikka useimmat click reaktiot vaativat kuparikatalyytin, on kehitetty menetelmiä, jotka eivät vaadi katalyyttia toimiakseen. Esimerkiksi käänteinen Diels-Alder sykloadditio norborneeni tai trans-syklo-okteeni johdannaisten ja tetratsiinien välillä ei tarvitse kuparikatalyyttia toimiakseen. Esimerkki reaktiosta on esitetty kuvassa 9.³⁹



Kuva 8. Kupari-katalysoitu Huisgenin reaktio.⁴³



Kuva 9. Click-reaktioissa käytetty käännteinen Diels-Alder sykloaddiotti, jossa tetratsiiniin liitetään [^{18}F]NFB.³⁹

Edellisellä sivulla mainittiin uusimpia vaihtoehtoisia keinoja, C-F-sidoksen lisäksi, nopeaan ja helppoon tapaan liittää ^{18}F biomolekyyleihin. Vaihtoehtoisista menetelmistä on kokeiltu mm. [^{18}F]fluori-pii, -boori tai -fosfaattisidoksia biomolekyylien radiofluorauksessa. Yleisenä tavoitteena olisi kehittää nopea ja yksinkertaisella kemialla (ei monivaiheista synteesiä) toimiva tapa saada ^{18}F liitetyksi biomolekyyleihin, jotta saataisiin valmistettua helpommin kuvantamisaineita PET:lle. Studenov ryhmineen on onnistunut synteesissä muodostamaan ^{18}F -fosforisidoksen yksinkertaisella prekursorin ja ^{18}F :n reaktiolla, joskin tuote hydrolysoitui helposti jatkotutkimuksissa.⁴⁴ Fosforin ja ^{18}F :n kemiaa ei ole tutkittu hirveästi, mutta ^{18}F :n ja piin sidoksista on enemmän tuloksia. Myös ^{18}F -Si sidoksia on pystytty syntetisoimaan hyvällä radiokemiallisella saannolla, mutta myös sidokset piin ja ^{18}F :n välillä ovat hydrolysoituneet helposti. Tutkimuksissa on kuitenkin todettu, että steerisesti piilotetut ^{18}F -Si-sidokset ovat pysyvämpiä.⁴⁵

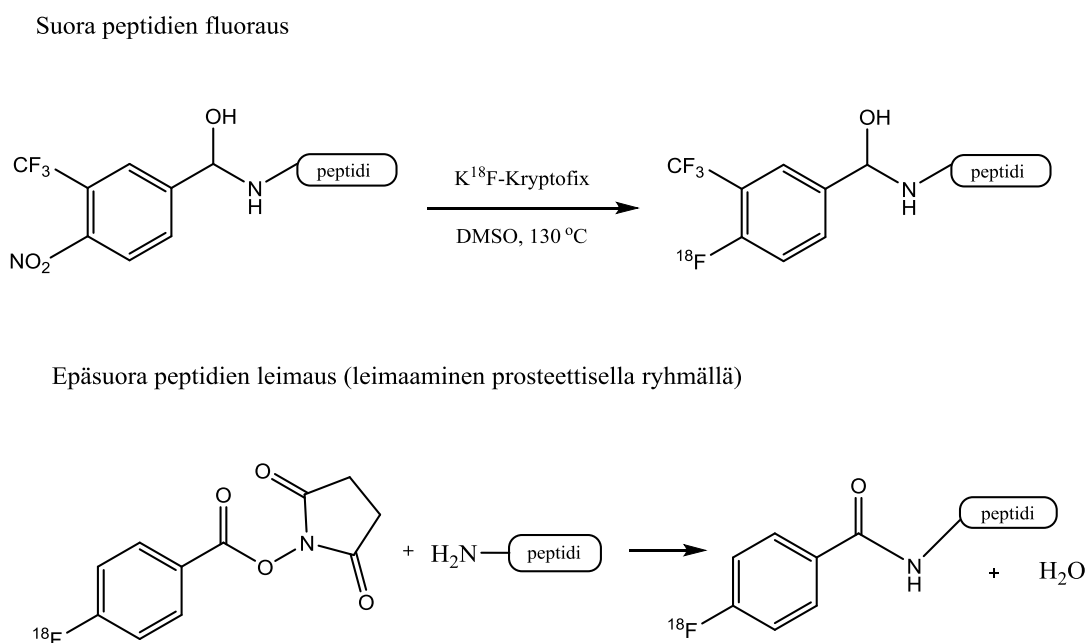
4. ¹⁸F-Prosteettiset ryhmät makromolekyylien leimauksessa

Uusien käytettävien PET-merkkiaineiden löytäminen on keskeinen tavoite PET-teknologiassa. Koko ajan kasvava määrä erilaisia peptidejä ja proteiineja on kehitetty kliinisiin tutkimuksiin, sillä peptideillä ja proteiineilla on sellaisia ominaisuuksia, joita pienillä molekyyileillä ei ole. Peptideitä ja proteiineja voidaan käyttää helposti kohdespesifisesti, ne sisältävät useita vapaita reaktiivisia funktionaalisia ryhmiä ja lisäksi niitä voidaan muokata suhteellisen helposti halutun laisiksi. Nämä makromolekyyleille ominaiset ominaisuudet ovat luoneet kiinnostusta myös radioleimattuihin proteiineihin ja peptideihin ja niiden erilaisiin sovelluksiin diagnostiikassa ja terapiassa.⁴⁶

Suurin osa erilaisista proteiineista ja peptideistä ei kestä [¹⁸F]fluoridilla tehtäviä suoran leimauksen vaativia olosuhteita. Suorassa fluorauksessa yleisesti käytettävät korkeat lämpötilat ja esimerkiksi reaktiossa käytettävät liuottimet ja seoksen pH-arvot eivät aina sovellu proteiineille ja peptideille. Näiden makromolekyylien suojaamattomat funktionaaliset ryhmät estävät suoran spesifisen fluorauksen. Ainoastaan pienten orgaanisten molekyylien sisältäviä funktionaalisia ryhmiä on kannattavaa ja mahdollista suojata erilaisilla suojaryhmillä, jotta fluori saadaan leimattua haluttuun paikkaan.⁴⁷ Hyvä esimerkki suojaryhmien käytöstä on [¹⁸F]FDG-synteesin lähtöaine, jossa mannoosin OH-ryhmät on suojattu asetyyliestereillä.²⁶ Kuitenkin, kun käsitellään kompleksisempia biomolekyyliä kuten peptidejä, proteiineja ja erilaisia vasta-aineita, jotka sisältävät laajan määrän erilaisia funktionaalisia ryhmiä ja happamia protoneita, ei suojaryhmien käyttö ole mahdollista tai järkevää. Kirjallisuudesta löytyy joitakin artikkeleita peptidien suorasta leimaamisesta [¹⁸F]fluoridilla. Esimerkiksi Jacobsonin työryhmä on käyttänyt suoraa leimaamista esikäsiteltyihin peptideihin, mutta laajemmin tätä sovellusta ei ole käytetty peptidien leimauksessa. Työryhmä kehitti yksinkertaisen ja yksivaiheisen ¹⁸F-leimausstrategian korvaamaan yleisesti käytössä olevan monivaiheisen ja aikaa vievän epäsuoran ¹⁸F-leimauksen. Mono- ja dimeerisiä syklistä RGD peptidejä modifioitiin liittämällä 4-NO₂-3-CF₃ funktionaalisuudet sisältävä areeni peptidiin, jolloin voitiin käyttää suoraa radiofluorausta.⁴⁰ Suora peptidien leimaaminen ¹⁸F:llä vaatii kuitenkin melkein aina peptidien modifioimista.

Lisäksi peptidien suora leimaus elektrofiilisellä [^{18}F]fluorauksella ei ole mahdollista reseptoritutkimuksissa liian matalan SA-arvon takia. Esimerkiksi Ogawa ryhmineen on tutkinut peptidien elektrofiilistä fluorausta [^{18}F]asetyylihypofluoriitin avulla. Tällöin fluori leimataan aminohappojen (tyrosiini ja fenyylialaniini) aromaattiseen renkaaseen. Ongelmana menetelmässä on se, että syntyy helposti mono- ja difluorautuneita aminohappoja, joita on vaikea saada erilleen. Lisäksi [^{18}F]asetyyli hypofluoriitti hapettaa helposti muita aminohappoja esim. metioniinin, kysteiinin ja tryptofaanin.⁴⁸ Kuvassa 10 on esitetty esimerkit suorasta peptidien leimauksesta ja epäsuorasta peptidien leimauksesta, jossa leimaaminen suoritetaan prosteettisen ryhmän avulla.

Edellä mainittujen syiden takia peptidien ja proteiinien leimaaminen [^{18}F]fluoridilla tehdään prosteettisten ryhmien avulla, joita voidaan kutsua myös bifunktionaaliksi leimausaineiksi. Tässä epäsuorassa leimausmetodissa ^{18}F leimataan ensin kiinni prosteettiseen ryhmään, minkä jälkeen leimattu prosteettinen ryhmä ja makromolekyylä yhdistetään miedoissa synteesiolosuhteissa, jolloin prosteettisen ryhmän vapaa funktionaalinen ryhmä voi reagoida makromolekyylin kanssa.



Kuva 10. Ylemmässä reaktiossa peptidien suora fluoraus, jossa ^{18}F leimataan suoraan peptidissä kiinni olevaan funktionaaliseen ryhmään. Alemmassa reaktiossa esitetään peptidien epäsuora leimaus, jossa ensin on leimattu prosteettinen ryhmä ^{18}F :lla ja prosteettinen ryhmä yhdistetään lopuksi peptidin kanssa.^{40,49}

Esimerkiksi Hultsch et al. on leimannut kemoselektiivisesti ^{18}F :n peptidiin käyttäen prosteettista ryhmää apuna. Peptidi, jonka pintarakennetta oli muokattu lisäämällä amino-oksi-funktionaalisuus peptidin pinnalle, leimattiin käyttäen [^{18}F]FDG:tä prosteettisena ryhmänä. [^{18}F]FDG muodosti amino-oksi-funktionaalisuuden kanssa oksiimisidoksen ja leimasi näin peptidin.⁵⁰

1990-luvulla, kun alettiin tutkia peptidien leimausta prosteettisten ryhmien avulla, kehitettiin ensimmäisenä aktiivisia estereitä sisältäviä prosteettisia ryhmiä kuten N-hydrosukkiniiniimidi ja 4-nitrofenyyli.⁵¹ Prosteettisista ryhmistä erityisesti N-sukkinimidyyli-4-[^{18}F]fluorobentsoattia ([^{18}F]SFB) on käytetty paljon asyloimaan peptidien vapaita amino-ryhmiä. Rajoittavana tekijänä [^{18}F]SFB:n käytössä on, että sen valmistus on vaativa ja siihen tarvitaan 2-3 synteesivaihetta, mutta vastapainoksi sitä voidaan valmistaa korkeilla saannoilla ja sillä on korkea stabiilisuus in vivo tutkimuksissa.^{52,53} Leimattaessa aktiivisilla estereillä tulee huomioida se, että ne voivat reagoivat useammassa kohdissa sellaisten makromolekyylien kanssa, joissa on enemmän kuin yksi yhtä voimakkaasti reagoiva amiini-ryhmä. Tämänlaisen makromolekyylin leimaaminen johtaa yleensä useasti fluorattuihin peptideihin.

Kemoselektiivisempi reaktio saadaan aikaiseksi käyttämällä prosteettista ryhmää, jossa on ^{18}F -leimattuja aldehydejä. Esimerkiksi 4-[^{18}F]fluorobentsaldehydi ([^{18}F]FBA) reagoi amino-oksi- tai hydratsiini-ryhmien kanssa muodostaen oksiimi- tai hydratsonijohdannaisia. Lisäksi [^{18}F]FBA:n valmistus on yksivaiheinen synteesi. Toki makromolekyyliä pitää ensin muokata niin, että niihin syntetisoidaan esimerkiksi hydratsiinin sisältävä molekyyli, jolloin leimaaminen [^{18}F]FBA:lla onnistuu.⁵⁴

Parempi kemoselektiivisyys saavutetaan käyttämällä prosteettisia ryhmiä tioli-ryhmien leimaamiseen, sillä -SH ryhmät eivät ole niin runsaita peptideissä kuin -COOH tai -NH₂ ryhmät. Maleimidi-johdannaisia, jotka on leimattu [^{18}F]fluorilla, käytetään tioli ryhmien leimaamiseen, erityisesti sellaisten peptidien, jotka sisältävät paljon kysteiniä. Maleimidi-johdannaisia ovat 4-[^{18}F]fluorobentsamido-etyylimaleimidi ([^{18}F]FBEM) ja 4-[^{18}F]fluorobentsaldehydibutyylimaleimidi oksimi ([^{18}F]FBBO).⁵⁵

Uusin kemoselektiivinen lähestymistapa peptidien leimaamiseen on niin kutsuttu ”click kemia”. Tunnetuin click-reaktio on kuparikatalysoitu Huisgenin sykloadditio, jossa 1,3-dipolaarinen alkyyni liitetään atsidiin. Tämä reaktio on luotettava ja helposti tehtävissä. Yleensä reaktio ei tarvitse huoneenlämpöä korkeampia reaktiolämpötiloja, mutta tarvittaessa reaktio voidaan tehdä lämpötilavälillä 0-160 °C ja pH arvoilla 5-12 useissa eri liuotimissa mukaan lukien vedessä. Edellä mainittujen syiden lisäksi kyseisen sykloaddition suosiota selittää atsidien ja terminaalisten alkyynien helppo valmistus sekä hyvä stabiilius eri olosuhteissa.⁵⁶ Click-kemiaa apuna käyttäen voidaan ¹⁸F-alkyynin tai ¹⁸F-atsidin sisältämä prosteettinen ryhmä liittää peptidin sisältämään atsido- tai alkyyni- ryhmään. Monia prosteettisia ryhmiä, kuten [¹⁸F]fluoroalkyyni, [¹⁸F]fluoroetyyliatsidia ja [¹⁸F]glykosyyliatsidia on kokeiltu click-kemiassa, makromolekyylien leimaamiseen.⁵⁷ Toinen uudempi menetelmä biomolekyylien leimaamisessa on imiinien ligaatiot. Siinä amiinit ja karbonyylit reagoivat kemoselektiivisesti ja ovat yhteensopivia muiden funktionaalisten ryhmien kanssa, joita biomolekyyliissä esiintyy. Vedellisissä olosuhteissa α -efektiiviset amiinit (hydratsiinit ja amino-oksi ryhmät) reagoivat tuottaen hydratsoneja ja oksiimeja.⁵⁸

Fluoraus vaatii yleensä aina monivaiheisen leimausprosessin ja puhdistuksen ennen lopputuotteen saamista. Jotta saavutettaisiin mahdollisimman tehokas fluoraus, on tärkeää valita kaikista sopivin prosteettinen ryhmä jokaiselle peptidille erikseen perustuen peptidin kemiallisiin ja biologisiin ominaisuuksiin.

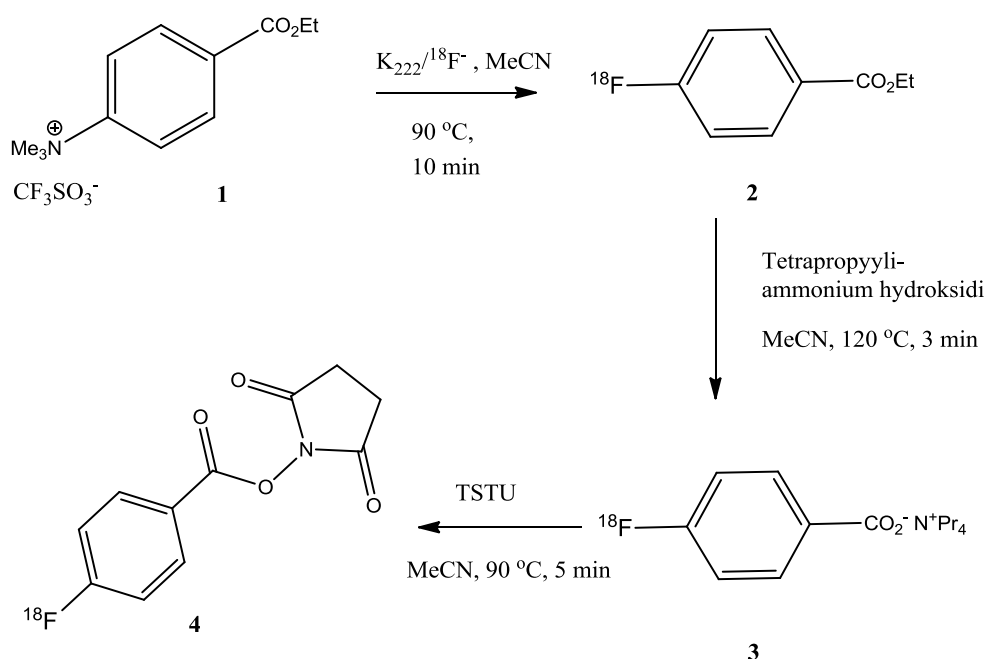
4.1 N-Sukkinimidyyli-4-[¹⁸F]fluorobentsoatti ([¹⁸F]SFB)

Lukuisista amiinireaktiivisista ¹⁸F-leimatuista prosteettisista ryhmistä asyloimiseen kehitetty N-sukkinimidyyli-4-[¹⁸F]fluorobentsoatti ([¹⁸F]SFB) on selkeästi käytetyin prosteettinen ryhmä. Tämä näkyy lukuisina radiosynteeseinä, jotka on kehitetty, jotta ainetta voitaisiin valmistaa automatisoituna tuotantona. Yleisesti amiinireaktiiviset prosteettiset ryhmät ja eritoten [¹⁸F]SFB tarjoavat laajan mahdollisuuden erilaisiin sovelluksiin bioaktiivisten peptidien kanssa, joilla on vapaa terminaalinen aminoryhmä asyloimiseen. [¹⁸F]SFB pystyy siis reagoimaan aminohapoista lysiinin kanssa sekä aminohappoketjujen vapaiden terminaalisten NH₂-päiden kanssa. Mikäli lysiiniä ei ole proteiinisekvenssissä, ei [¹⁸F]SFB pysty reagoimaan kuin terminen N-ryhmän kanssa, joita on vain yksi per aminohappoketju,

jolloin leimautuminen jää pieneksi tai olemattomaksi. Leimautuvuuteen vaikuttaa myös proteiinin tertiäärirakenne, joka voi aiheuttaa steerisiä esteitä leimaamiselle.⁴⁹

[¹⁸F]SFB:n synteesi vaatii yleensä työlää 3-vaiheisen synteessin. Muutaman viime vuoden aikana synteesiä on kehitetty nopeammaksi, tehokkaammaksi, minimoitu puhdistusvaiheita ja parannettu radiokemiallista saantoa, jotta siitä saataisiin automatisoitu tuotanto rutiinitutkimuksiin PET-kuvantamiseen. Kehitetyillä synteessimetodeilla on jokaisella etunsa ja rajoituksensa. Esimerkiksi vuonna 2007 Cai et al. julkaisivat tulokset [¹⁸F]SFB:n synteesistä, jossa he saivat puoliaikakorjatuksi saannoksi $32,5 \pm 5,9$ % synteessin kestäessä 138 minuuttia. Lopputuote puhdistettiin HPLC-menetelmällä ja radiokemiallinen puhtaus oli 98 %.⁵⁹ Synteesiä yritettiin helpottaa ja nopeuttaa vaihtamalla tuotteen puhdistus HPLC-menetelmästä kiinteäfaasipatruunoihin. Tang et al. julkaisivat vuonna 2009 synteesimenetelmän, jossa puhdistus oli tehty käyttäen C-18 plus-kiinteäfaasipatruunaa. He saivat tuotteen puoliaikakorjaamattomaksi saannoksi 25-35 %. Synteessin kokonaisaika lyheni 40 minuuttiin ja radiokemiallinen puhtaus oli vain yli 89 %. Huono puoli synteessissä oli alhainen radiokemiallinen puhtaus ja saanto.⁶⁰ Vuonna 2011 Ackermann et al julkaisivat menetelmän [¹⁸F]SFB:n synteessille, jossa puoliaikakorjattu saanto oli 80 ± 5 % synteesiajan ollessa 58 minuuttia. C-18-kiinteäfaasipatruunapuhdistus tuotti $97 \pm 1,2$ %:sen puhdasta tuotetta.⁶¹

Esimerkkisynteesi [^{18}F]SFB:n valmistamiseksi on esitetty alla kuvassa 11. Lähtöaineena käytetään etyyli-4-trimetyyliammoniumtriflaattibentsoaattia (1), joka on liuotettuna MeCN:iin. Nukleofiilinen substituutio [^{18}F]F $^-$:n kanssa tuottaa etyyli-4- ^{18}F fluorobentsoaattia (2). Etyyli-4- ^{18}F fluorobentsoaatin esteri hydrolysoidaan tetrapropyyliammoniumhydroksidilla ja seos kuivataan atseotrooppisesti (3). N,N,N',N'-Tetrametyyli-O-(N-sukkinimidyyli)uronium tetrafluoroboraatti (TSTU) lisätään astiaan MeCN:ssä ja saatu lopputuote putsataan SEP-PAK patruunoiden avulla (4).⁶⁰



Kuva 11. Esimerkki tavasta, kuinka syntetisoida [^{18}F]SFB:tä.⁶⁰

5. Nanomateriaalit lääketieteessä

Nanoteknologia on kasvava tieteenala, joka tutkii nanomittakaavassa tapahtuvia ilmiöitä ja prosesseja. Tekniikan kehityksen myötä nanoteknologiaa on alettu ymmärtämään sekä kehittämään laajemmassa mittakaavassa. Sairauksien terapiassa ja diagnostiikassa nanoteknologian sovellutuksista käytetään nimitystä nanolääketiede. Nanolääketieteessä nanopartikkelit toimivat kuljetinaeineina lääke- ja diagnostisille aineille. Verrattaessa perinteisiin lääkemolekyyleihin, nanopartikkeleilla on erilaiset fysikokemialliset ja farmakokineettiset ominaisuudet esimerkiksi koon, muodon, pintaominaisuuksien ja muunneltavuuden takia. Nämä ominaisuudet antavat mahdollisuuden uusien ja jo olemassa olevien lääkeaineiden kehitykseen. Nanoteknologiaa on hyödynnetty kohdennetussa lääkehoidossa, jolloin voidaan saavuttaa tehokkaampi kulkeutuminen vaikutuspaikalle ja parempi tehokkuus. Nanokantajan sisällä voi olla myös radiolääkeaine, jota voidaan käyttää diagnostiikassa tai mahdollisesti syövän radioterapiassa.⁶²

5.1 Nanopartikkelien rakenne ja ominaisuudet

Nanopartikkeliksi on määritetty järjestäytyneet rakenteet, joiden halkaisija on 1 nm – 1 µm. Ne voivat koostua polymeereistä, lipideistä sekä orgaanisesta että epäorgaanisesta materiaaleista. Ne voivat olla muodoiltaan melkein minkä tahansa muotoisia esim. pyöreitä, haarautuneita tai pitkiä ketjuja. Tämän lisäksi ne voivat olla elastisia tai jäykkiä rakenteeltaan.⁶³ Käytettäessä nanopartikkeleita kantaja-aineina, ne ovat inertejä partikkeleita, joiden sisään on kapseloitu tai pintarakenteeseen on liitetty lääkeaine tai kuvantamisessa käytettävä leima.⁶⁴ Nanopartikkelit ovat hyödyllisiä ja eroavat biomolekyyleistä, koska niillä on suuri pinta-ala/tilavuus-suhde, joka mahdollistaa sekä pintarakenteen muokkauksen että sisäisen muokkauksen erilaisiin lääketieteellisiin sovelluksiin.⁶⁵ Partikkelikoko vaikuttaa nanopartikkelin sisään kapseloitavan aineen kapselointitehokkuuteen. Partikkelin koon kasvaessa tehokas pinta-ala sekä kapselointitehokkuus pienenevät. Nanolääketieteessä käytetyimpiä nanomateriaaleja ovat:

Liposomit

Liposomit muodostuvat kahdesta fosfolipidikerroksesta, jotka muodostavat pyöreän hydrofobisen vesikkelin. Liposomien koko vaihtelee paljon ja niiden halkaisija voi olla 50 nm – 1 µm välillä. Lipidikoostumuksen ja partikkelikoon muutoksilla pystytään vaikuttamaan liposomin ominaisuuksiin. Fosfolipidikalvoon tai liposomin sisälle voidaan lisätä radioterapiassa tai kuvantamisessa käytettävä radionuklidi.⁶⁶

Polymeerinanopartikkelit

Polymeerinanopartikkelit järjestäytyvät spontaanisti niille ominaisiksi rakenteiksi vesiliuoksessa. Polymeeripartikkelin ydin koostuu hydrofobisista polymeereistä ja pinta hydrofiilisistä polymeereistä. Polymeerimiselli- ja dendrimeerit ovat tutkituimmat polymeerinanopartikkeli- rakenteet.

Polymeerimiselli koostuu sadoista kopolymeereistä ja sen halkaisija on 20 – 100 nm. Vaikaliukoisille lääkeaineille misellit sopivat hyvin kantaja-aineeksi. Misellin kokoa, varausta ja pintaominaisuuksia voidaan muokata kuljetettavalle lääkeaineelle sopivaksi sekä kohdentumisominaisuuksien kannalta toivottavaksi. Polymeerivalinnalla on suuri merkitys misellien ominaisuuksiin. Käytetyin polymeeri on polyetyleeniglykoli (PEG).

Dendrimeereillä on ytimenä keskusmolekyyli, johon haarautuneet polymeeriketjut ovat liittyneet. Dendrimeereillä on pieni molekyylikoko, mutta vastaavasti suuri molekyylipaino. Lääkemolekyylit liitetään funktionaalisesta ryhmästään joko dendrimeerien pintaan tai ytimen sisään. Dendrimeerien pieni partikkelikokojakauma, stabiilius ja pintamolekyylien muunneltavuus tekevät niistä hyviä kuljetusvektoreita esim. kemoterapia-aineille.⁶⁷

Epäorgaaniset nanopartikkelit

Nanolääketieteessä käytettyjä epäorgaanisia nanopartikkeleita ovat kultananopartikkelit, rautaoksidi sekä piistä muokatut nanopartikkelit. Ne ovat helposti muunneltavia rakenteita sekä myös bioyhteensopivia. Viime vuosien teknologian kehittyminen on helpottanut ja luonnut uusia mahdollisuuksia partikkelien muokkaukseen. Esimerkiksi rautaoksidinanopartikkeleita on muokattu lisäämällä PEG-rakenteita partikkelin pinnalle ja liittämällä lääkeaine PEG-rakenteisiin.⁶⁸

5.2 PET- tutkimuksissa käytettyjä nanomateriaalisovelluksia

Polymeerinanopartikkeleja on käytetty jonkin verran erilaisiin PET-tutkimuksiin. Alla on esitetty muutamia esimerkkejä. Fukukawa et al. ovat tutkineet tähden muotoisia nanopartikkeleita, joiden polymeeriketjuihin on liitetty polyetyleeniglykolisegmentti, johon on liitetty vielä funktionalisoituja DOTA (1,4,7,10-tetraazacyklododecanetraacetic acid) -yksiköitä. Nanopartikkelit leimattiin ^{64}Cu :lla, joka sitoutui DOTA yksiköihin. Leimatut nanopartikkelit injisoitiin hiiriin ja partikkelien biodistributiota seurattiin PET-kameralla.⁶⁹

Devaraj et al. ovat tutkineet rautaoksidin nanopartikkeleita. Ryhmän käyttämät nanopartikkelit olivat aminoituja ristikytettyjä dekstraani-rautaoksidi-nanopartikkeleita. Nanopartikkelin aminoryhmiin syntetisoitiin atsidi-funktionaalisuuden sisältävä molekyyli ja ^{18}F liitettiin nanopartikkeliin käyttämällä kuparikatalysoitua atsidin ja alkyynin sykloadditiota (click-kemiaa). Tällä menetelmällä he saivat leimattua nanopartikkelit alle kahdessa tunnissa ja spesifiseksi aktiivisuudeksi 0,4 MBq/mg. PET-kameralla saatiin ^{18}F -leimatuista nanopartikkeleista parempia kuvia kuin aikaisemmin kuvatuilla ^{64}Cu -leimatuilla partikkeleilla.⁷⁰

Guerrero et al. ovat käyttäneet kultananopartikkeleita tutkimuksissaan. Kultananopartikkelin pintaan liitettiin ensin peptidejä, joihin radioleima voitiin lisätä käyttämällä prosteettista ryhmää. Peptidi saatiin liitettyä kultananopartikkelin pintaan rikkisidoksen avulla. Tämän jälkeen kultananopartikkelit leimattiin ^{18}F :lla käyttäen [^{18}F]SFB:tä, joka reagoi peptideissä olevien lysiinien kanssa.⁷¹

Sarparanta et al. ovat tehneet tutkimuksia erilaisille huokoisille piinanomateriaaleille. Piipartikkelien pintarakennetta on muokattu termisesti esimerkiksi hapettamalla, jolloin pintarakenteeseen muodostuu Si-O-Si-siltoja. Piinanopartikkelien pintarakenne on leimattu suoralla yksivaiheisella ^{18}F -leimauksella ja leimattujen nanopartikkelien biojakaumaa on tutkittu in vivo. ^{18}F saatiin kiinnitettyä piihin suoralla korvausreaktiolla, jossa fluori korvasi hapen Si-O-Si-silloissa tai silyylissä kiinni olleen vetyatomien. Haluttaessa piinanopartikkelien pintaan voitaisiin liittää polymeerejä tai biomolekyyliä, jolloin pystyttäisiin vaikuttamaan niiden biojakaumaan.⁷²

6. Viruspohjaiset nanomateriaalit

Bionanoteknologiasta on tullut nopeasti kehittyvä ala tieteellisissä tutkimuksissa, koska sillä on lukemattomia erilaisia sovellusmahdollisuuksia. Biologiset materiaalit, joilla on lukemattomia erittäin tarkkoja kehittyneitä rakenteita, ovat erittäin kiinnostavia uusien nanomateriaalien kehityksen kannalta. Biologisten nanomateriaalien määritetty rakenne, yhdessä kemiallisten ja fysikaalisten ominaisuuksien kanssa, tarjoavat suuren edun verrattuna epäorgaanisiin ja orgaanisiin yhdisteisiin.

Virusnanopartikkelit (VLPs = Virus-like nanoparticles) voivat olla erikokoisia, muotoisia ja niitä voidaan muokata atomin tarkkuudella. Kuitenkin verrattuna muihin proteiinipohjaisiin nanomateriaaleihin, virukset voivat olla immunogeenisiä, joskin ne voidaan tehdä vaarattomiksi.⁷³ Monia uudenlaisia VLP:ta on tutkimuksen alla tällä hetkellä. Niistä bakteriofagit ja kasviviruset ovat suosituimpia, sillä ne ovat turvallisempia ihmisille kuin eläinperäiset virukset.⁷⁴ VLP:t ovat geneettisesti koodattuja ja itsestään järjestäytyviä erillisistä proteiineista. Niiden koko ja muoto ovat tarkkoja ja viruslajille ominaisia. Tämä ominaisuus on tehnyt viruksista erittäin mielenkiintoisen materiaalin nanoteknologiaan. Viruksien rakenteet ymmärretään usein atomitasolla ja itsestään järjestäytymistä on tutkittu erilaisilla muokatuilla partikkeleilla useissa viruskokeissa. Nämä tiedot mahdollistavat erilaisten protokolien kehittämisen viruspartikkelien tarkkaan muokkaamiseen. Tämän tason laatukontrollia ei pystytä vielä saavuttamaan syntetisoiduille nanopartikkeleille. Lisäksi kasvivirusien ja bakteriofagien tuotanto on erittäin helposti säädettävissä ja ekonomista.

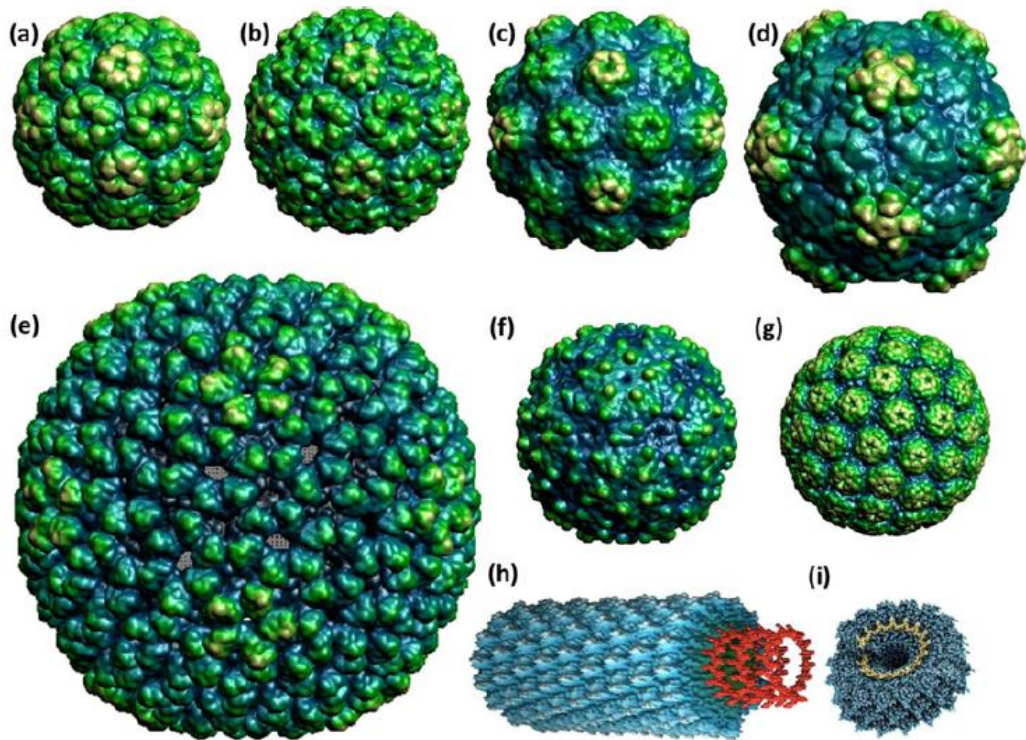
VLP:t tarjoavat ideaalin rakennuspalikan tarkan symmetrian, yhdenmukaisen koon ja muodon vuoksi. Lisäksi ne voivat muodostua tarkaksi tukirungoksi erillään olevista sadoista molekyyleistä. Osa niistä voi palautuvasti hajota ja uudelleenrakentua in vivo ja in vitro olosuhteissa. Kemiallinen ja geneettinen manipulaatio VLP:n pintarakenteeseen sekä mahdollisuus pakata viruksen sisään pieniä molekyyliä tarjoavat uniikin mahdollisuuden nanoteknologiassa.⁷⁵

6.1 Virusten rakenne

Viruksen kuori (kapsidi) rakentuu useista toistuvista proteiinialayksiköistä, jotka muodostavat säännöllisiä rakenteellisia yksiköitä symmetrialakien mukaisesti. Rakenteellisen symmetrian perusteella virukset voidaan jakaa kahteen pääluokkaan: helikaalisiin ja ikosaedriisiin partikkeleihin.⁷⁶ Viruksia voi olla monen muotoisia ja kokoisia aina yksinkertaisista helikaalisista ja ikosaedrisistä muodoista monimutkaisempiin rakenteisiin koon ollessa 20-750 nanometrin (nm) välillä. Viruskapsidin rakentuminen tapahtuu itseohjautuvasti ja sitä ohjaavat hydrofobiset ja elektrostaattiset vuorovaikutukset, jotka muodostuvat proteiinien välille sekä proteiinien ja nukleiinihapon/lipidien välille.

Ikosaedriset virukset ovat muodoltaan melkein pallon muotoisia. Ikosaedrisia viruksia ovat mm. pikornavirukset, nodaviridae-heimon hyönteisvirukset sekä comovirusiin kuuluvat kasvivirukset. Ne ovat sisältä onttoja ja niiden genomi on suojassa kuoren sisäpuolella. Ikosahedrinen virus muodostuu proteiinialayksiköistä, jotka muodostavat kolmion muotoisia pintatasoja, jotka yhteen liittyessään muodostavat ikosaedrisen symmetrisen monikulmion. Monikulmio muodostuu kahdestakymmenestä pintatasosta ja kahdestatoista kärkipisteestä. Yksinkertaisimmillaan rakenteellisia yksiköitä on yhdellä sivulla kolme, jolloin koko kuori rakentuu 60 proteiinialayksiköstä, esimerkiksi bakteriofagilla Φ X174 on yksinkertainen kapsidi. Tällainen kapsidi on erittäin stabiili alayksiköiden yhdenmukaisena toistuvan sitoutumisen vuoksi. Viruksen pinta on täynnä proteiineista muodostuneita viisi- ja kuusikulmioita rakenteita.⁷⁷

Vaihtoehtoinen viruksen muoto on helikaalinen muoto. Esimerkki helikaalisesta viruksesta on tupakan mosaiikkivirus (TMV). Sen kuoren identtiset proteiinimolekyylit ovat järjestäytyneet kiertosymmetrian mukaisesti ympyrän kehälle. Pällekkäiset toistojaksot muodostavat heliksin, jonka sisällä on viruksen genomi. Helikaaliset virukset ovat jäykkiä, sauvamaisia rakenteita, mutta ollessaan tarpeeksi pitkiä viruspartikkelit voivat olla hyvin joustavia tai muodoltaan taipuneita. Nämä ominaisuudet suojaavat osaltaan kapsidia vahingoittumiselta. Helikaaliset partikkelit ovat yleensä halkaisijaltaan 15–30 nm ja niiden pituus voi vaihdella 300 nm:stä aina 500 nm:in. Symmetrialtaan helikaalisia viruksia esiintyy bakteriofageissa, kasvien viruksissa ja vaipallisissa eläinviruksissa.^{77,78} Kuvassa 12 on esitetty yleisimpiä nanoteknologiassa käytettyjä kasviviruksia.



Kuva 12. Erilaisia viruksia, joita on käytetty nanoteknologiassa: (a) Brome mosaic virus (BMV), halkaisija 27 nm; (b) Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV), halkaisija 28 nm; (c) Turnip yellow mosaic virus (TYMV), halkaisija 30 nm; (d) Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV), halkaisija 36 nm; (e) Bakteriofagi P22, halkaisija 58 nm; (f) Bakteriofagi MS2, halkaisija 26 nm; (g) Simian virus 40, halkaisija 25 nm; (h) Tobacco mosaic virus (TMV), halkaisija 18 nm ja pituus vaihteleva; (i) TMV erikulmasta kuvattuna.⁷⁹

6.2 Yleisimmät käytetyt virukset

6.2.1 CCMV-virus (Cowpea chlorotic mottle virus)

CCMV-virus on esimerkki kasviviruksesta, joka kuuluu Bromoviradea heimon Bromovirus sukuun. Viruksen pintakapsidi koostuu 180:tä identtisestä proteiinin kopiosta, joka on 20 kDA:n kokoinen ja sisältää 190 aminohappoa. Proteiinit muodostavat ikosaedrillisen muotoisen kuoren, jonka ulkokehän halkaisija on 28 nm ja sisäkehän 18 nm. Viruksen pinnan kvarternaarinen rakenne sisältää 32 näkyvää kapsomeeriä, joista 12 on pentameerejä ja 20 heksameerejä. CCMV virus oli ensimmäinen ikosaedrillinen virus, joka in vitro olosuhteissa saatiin puhdistetuista komponenteista uudelleenkoottua kokonaiseksi viruspartikkeliksi, jossa proteiinikapsidin sisällä oli RNA-genomi. Kaikista tärkein CCMV:n ominaisuus on se, että sen kapsidi pystyy palautuvasti muuttamaan rakennettaan riippuen liuoksen pH:sta ja ionivahvuudesta. Kapsidi laajenee noin 10 %:a suuremmaksi, kun pH-arvoa nostetaan 5,0:sta

6,5:een matalassa ionivahvuudessa ($I < 0.1$ M). Turvonnut kapsidi, jossa on noin 60 kappaletta auki olevia, halkaisijaltaan 2 nm:n kokoluokkaa olevia huokoisia, mahdollistaa ionien diffuusion proteiinikapsidin lävitse. Kun liuoksen pH nostetaan yli 7:n ja ionivahvuus on yli 1,0 M:n, kapsidi alkaa hajoamaan proteiinidimeereiksi ja RNA vapautuu. RNA:n poistamisen jälkeen, laskemalla pH arvoa, saadaan proteiiniyksiköt taas uudelleen muodostamaan proteiinikapsidi. Tämä ominaisuus mahdollistaa uniikin tavan saada orgaaninen tai epäorgaaninen molekyyli viruksen sisälle ja sieltä pois.⁸⁰

CCMV-virusta saadaan eristettyä korkealla saannolla infektoituneesta kasvista (noin 1-2 mg/g), joka tekee CCMV-viruksesta ja sen proteiinikapsidista sopivan tutkimusmateriaalin. CCMV-viruksen proteiini voi olla mutantoitunut, mutta siitä huolimatta toimia aivan normaalisti. CCMV-viruksen kapsidi kestää korkeita lämpötiloja ja lukuisia eri pH-arvoja. Se on myös stabiili orgaanisissa liuottimissa esim. DMF:ssa ja vaaraton kaikille nisäkkäille. Yllä luetellut ominaisuudet mahdollistavat laajat sovellukset kapsidin kemialliseen muokkaukseen. Kapsidin pinnan avoimet amiini- (lysiini), karboksylaatti- (glutamaatti ja aspartaatti) ja tioli- (kysteini) päät ovat vapaana reagoimaan spesifisten ligandien ja peptidien kanssa kemiallisissa reaktioissa. CCMV-virusta on tutkittu ja käytetty biosensoreissa ja nanoelektrisissä laitteissa. Alustavia tutkimuksia ja kokeita (biojakauma, myrkyllisyys) on tehty CCMV:lle, jotta sitä voitaisiin käyttää lääkkeiden kohdistamisessa ja kuljetuksessa.⁸¹

6.2.2 Muut käytetyt virukset

1. CPMV-virus (Cowpea mosaic virus)

CPMV-virus kuuluu kasvivirusten comovirus-ryhmään. Myös sitä saadaan hyvällä saannolla eristettyä kasvin lehdistä (1-2 mg/g). Viruspartikkelit ovat halkaisijaltaan 30 nm ja koostuvat kahden eri proteiinin kopioista. Proteiiniyksiköitä on yhdessä viruksessa 60 kappaletta. CPMV:n proteiinikapsidi on suhteellisen vakaa huoneenlämmössä pH:n ollessa välillä 3-9. Sitä voi lämmittää korkeintaan 60 °C asteeseen ja se pysyy vahingoittumattomana 20 %:ssa DMSO:ssa 16 tunnin ajan. CPMV-kapsidin pinnassa ei ole ollenkaan kysteiniä, mutta 5 lysiniä on vapaana jokaisessa kapsidin pintaproteiiniyksiköissä.⁸²

2. RCNMV (Red clover necrotic virus)

RCNMV virus on maaperästä löytyvä ikosahedraalinen virus, jonka halkaisija on 36 nm. Viruksen kapsidi muodostuu 180:stä 37 kDa:n kokoisen proteiinin kopiosta, jotka pakkaavat ssRNA:n sisäänsä. Erilaisilla kokeilla on todettu kapsidin ottavan sisäänsä 3-15 nm:n halkaisijan omaavia partikkeleita, käyttämällä RNA-riippuvaista pakkausta, jolla tavalla viruskapsidi alun perin kokoontuu. Kapsidiin saadaan tehtyä huokosia kaksiarvoisten ionien (Ca^{2+} ja Mg^{2+}) avulla.⁸³

3. Bakteriofagi MS2

Bakteriofagi MS2 on ikosaedrinen virus, joka on halkaisijaltaan 27 nm. Bakteriofagia esiintyy kolibakteerissa ja se sisältää yhden kopion proteiinista, joka aiheuttaa bakteeri-infektion sekä 180 kopiota kuoriproteiineista, jotka ovat järjestäytyneet dimeereiksi. MS2 on todella stabiili monissa erilaisissa olosuhteissa, riippumatta lämpötilasta, pH:sta, ionivahvuudesta tai orgaanisista liuottimista. Pintaproteiinia voidaan valmistaa milligrammamäärissä bakteereissa yhdistelemällä erilaisia metodeja ja jälkikäteen koota yhteen kapsidiksi. Geneettisesti muutettuja MS2:n muotoja käytetään rokotuksissa ja kliinisessä diagnostiikassa. Myös MS2:n, kuten edellä mainittujen virusten, sisään pystytään ”pakkaamaan” kapsidin sisältämien 32:n, halkaisijaltaan 1,8 nm:n huokosten läpi pieniä partikkeleita ja reagenssejä.⁸³

4. Bakteriofagi P22

Salmonellaryhmään kuuluva bakteriofagi P22 on myös ikosaedrinen virus. Se koostuu 420 pintaproteiinkopiosta ja noin 300 tukiproteiinista. P22:n kapsidi tekee rakenteellisen muutoksen tyhjästä, halkaisijaltaan 58 nm:a olevasta esikapsidista, halkaisijaltaan 64 nm olevaksi ”kypsäksi” kapsidiksi. Muutos voidaan tehdä in vitro lämmittämällä varovasti 10 minuutin ajan 65 °C:ssa. Korkeampi lämpötila ja pidempi lämmitysaika (75 °C, 20 min) tuottaa uuden muodon, joka muistuttaa sählypalloa, jossa on 10 nm:n huokosia kapsidin jokaisella sivulla. Huokokset syntyvät pintaproteiinien vapautuessa kapsidista.⁸³

5. TMV (Tobacco mosaic virus)

TMV-virus on helikaalinen virus, jonka pituus on 300 nm ja halkaisija 18 nm. Sen kapsidi koostuu 2130:stä pintaproteiini kopiosta, jotka ovat virus-RNA:n ympärillä. Sauvamainen kierteinen rakenne (16,3 proteiinia per heliksikierre) muodostaa selvän sisäisen kanavan, joka on halkaisijaltaan 4 nm. Kapsidin proteiinit muuttavat muotoaan palautuvasti pitkistä

sauvamuodosta (asettaattipuskuri, pH 5,5) kaksinkertaiseksi levyksi siirettäessä toiseen puskuriin (fosfaattipuskuri, pH 7,0). Viruksen sisä- ja ulkopinta sisältävät paljon toistuvissa jaksoissa erilaisia aminohappopäitä esimerkiksi glutamaattia, aspartaamia, arginiinia ja lysiinia. TMV-virusta saadaan eristettyä infektoituneesta kasvista kilogrammamääriä. Virus on in vitro olosuhteissa erittäin kestävä, kestäen 80 °C:n asteen lämpötilan ja pH:n muutokset välillä 2-10. TMV-virusta käytetään erilaisissa nanojohdinsovelluksissa.⁸⁴

6.3 Nanopartikkelien karakterisointi

Nanopartikkelien karakterisointi ja mittaaminen on tärkeä osa tieteellistä tutkimusta, koska nanopartikkelin koko ja muoto kontrolloivat sen fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia. Nanomateriaalien karakterisoimiseen ja mittaamiseen on monia erilaisia mittaamenetelmiä. Käytetyimmät mittaamenetelmät ovat UV-Vis spektroskopia, dynaaminen valonsironta (DLS), läpäisyelektronimikroskopia (TEM), pyyhkäisyelektronimikroskopia (SEM) ja röntgenkristallografia.

Nanopartikkelin koko vaikuttaa vahvasti sen vuorovaikutuksiin biologisen materiaalin kanssa. Usein ne muokkautuvat tai muokataan biomolekyylien kanssa, joten suositeltavaa olisi, että nanopartikkelin kokomittaukset tehtäisiin samassa mediassa, jossa niitä käytetään in vitro ja in vivo tutkimuksissa.⁸⁵ Monia kokeellisia menetelmiä on kehitetty fysiologisissa olosuhteissa tehtäviin koon määrittäisiin. Näissä menetelmissä on usein sekä hyvät että huonot puolensa. Fysiologisissa olosuhteissa partikkelien stabiilisuus on usein heikentynyt, mistä johtuen ajan kuluessa partikkelit muodostavat helpommin erilaisia yhteen kasvaneita aggregaatteja. Jotta mittaustuloksista saataisiin mahdollisimman luotettavia, on suositeltavaa tehdä erilaisia kokeita eri määrittämenetelmillä. Eri mittaamenetelmillä on omat virhemarginaalinsa ja yhdistämällä eri mittauksia saadaan poistettua mahdollisen virheen määrää ja saadaan tuloksesta luotettavampi.⁸⁶

Läpäisyelektronimikroskopia (TEM) ja pyyhkäisyelektronimikroskopia (SEM) ovat yleisimmin käytetyt menetelmät tutkittaessa kolloidisten näytteiden kokoa ja morfologiaa. Huomioitavaa tehtäessä mittaustuloksia huoneenlämmössä on se, että näytteet pitää kuivata korkeassa vakuuissa. Tämä menetelmä voi aiheuttaa näytteeseen vahinkoa, joka näkyy otetuissa kuvissa. Suuri määrä partikkeleita pitää kuvata ja analysoida yksitellen, jotta saavutetaan riittävä tarkkuus tuloksiin. Korkea ionikonsentraatio fysiologisissa näytteissä voi

aiheuttaa suuria taustahäiriöitä, joista ei voida erottaa ei-metallisia näytteitä. Nämä taustahäiriöt voidaan välttää erillisellä kylmämittausmenetelmällä.⁸⁷

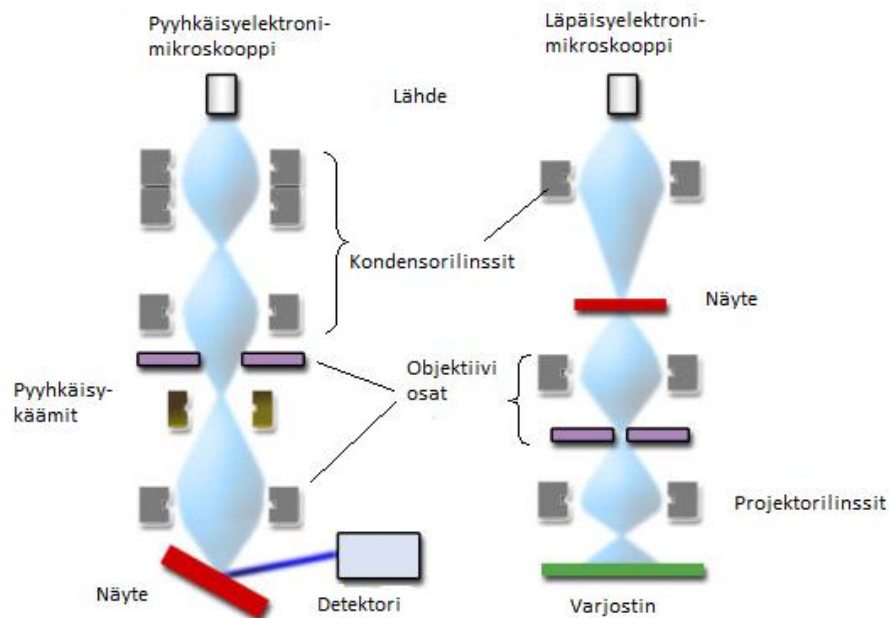
Yleisesti käytetty menetelmä nanopartikkelien kokojakauman selvittämiseksi on dynaaminen valonsironta, DLS-mittaus. DLS-mittauksella pystytään mittaamaan näytteestä nanopartikkelin koko ja partikkelien polydispersio näytteessä. Vaikeuksia mittaukseen tuottaa muut liuoksen sisältämät partikkelit, esimerkiksi biologisten näytteiden sisältämät proteiinit. Erityisesti silloin, kun nanopartikkelit ovat orgaanisia nanopartikkeleita, niiden taitekertoimet ovat hyvin lähellä liuoksen sisältämiä orgaanisten partikkelien vastaavia, jolloin niitä on vaikea erottaa toisistaan mittauksissa.

6.3.1 Lämpäisyelektronimikroskooppi (TEM) ja pyyhkäisyelektronimikroskooppi (SEM)

Lämpäisyelektronimikroskoopissa hehkukatodilla tuotetut elektronit kiihdytetään jännitteen ja magneettien avulla voimakkaaksi ja miltei yhdensuuntaiseksi elektronisuihkuksi, joka ohjataan tutkittavaan näytteeseen. Mikroskoopin sisällä pitää olla tyhjiö, jotta elektronit pääsevät kulkemaan esteettä näytteeseen. Näyte päästää lävitseen elektroneja eri tavoin, jolloin näytteen pohjalle objektiivilinssille muodostuu intensiteettivaihtelusta kuva, joka on noin 10-20-kertaa suurennettu elektronioptinen kuva. Projektiolinssi kuvaa välikuvan loistevärjostimelle, jolle kuva voidaan tarkentaa. Kun kuva on tarkka, loistevärjostimen tilalle vaihdetaan filmi, johon elektronit suoraan osuvat aiheuttaen siinä mustumia. Lopullinen suurennos voi olla miljoonakertainen.

TEM soveltuu biologisen kohteen rakenteen tutkimukseen, joten biologiset nanomateriaalit saadaan kuvattua hyvin TEM:llä. Näytteen tai siitä valmistetun kalvon on läpäistävä elektroneja, jotta kuva saadaan muodostettua näytteen taakse. Näyte saisi olla paksuudeltaan korkeintaan mikrometrin luokkaa. TEM:n tuottama kuva on eräänlainen siluetti näytteestä ja siitä ei pysty näkemään näytteen pintarakennetta. TEM:n teoreettinen resoluutio on noin 0,1 nm, mutta teoriassa resoluutio on maksimissaan 1-2 nm:ä.⁸⁸

Pyyhkäisyelektronimikroskoopissa elektronisuihku ei läpäise näytettä kuten TEM:ssa, vaan kapea elektronisuihku pyyhkii näytteen pintaa. Käytetty elektronien kiihdytysjännite on pienempi verrattuna TEM:iin, vain noin 20 kV. Näin vältetään elektronien tunkeutuminen liian syvään näytteeseen. SEM:ssa elektronisuihku muotoillaan mahdollisimman kapeaksi käyttämällä kondensorilinssejä. Muita linsejä ei tarvita, sillä kuva muodostetaan piste pisteeltä elektronisesti. Kuva saadaan muodostettua, kun kerätään sähköstaattisen tai magneettisen voimakentän avulla näytteestä heijastuvat ja emittoituvat elektronit intensiteettivaihtelua rekisteröivään detektoriin. Tarpeeksi korkeaenergiset elektronit kiihdytetään kohti tuikeilmaisinta, jossa osuessaan tuikeaineeseen ne synnyttävät fotoneita. Fotonit kulkeutuvat valomonistimeen ja synnyttävät sähkövirran, joka vahvistetaan ja jolla säädellään kuvaputken kirkkautta. Näytettä pyyhkäisevä elektronisuihku on tahdistettu tarkasti kuvaputken pyyhkäisyyn kanssa, jolloin pystytään muodostamaan kuva näytteestä. SEM:lla suurennus vaihtelee välillä 100–100 000 ja saatu kuva on usein tarkka ja kolmiulotteinen. SEM:n erotuskyky (1-5 nm) on riippuvainen näytettä pyyhkäisevän elektronisuihkun halkaisijasta. Koska SEM:lla detektoidaan myös emittoituvia elektroneja, on sen syvyserotuskyky monta luokkaa parempi verrattuna TEM:iin.⁸⁸ Kuvassa 13 on esitetty TEM:n ja SEM:n pääperiaatteet.



Kuva 13. Vasemmalla pyyhkäisyelektronimikroskoopin pääperiaate ja oikealla vastaavasti läpäisyelektronimikroskoopin pääperiaate.⁸⁹

6.3.2 Dynaaminen valonsironta (DLS)

Dynaaminen valonsironta on TEM:n kanssa suosituimpia nanopartikkelien koonmäärittämiseen käytettyjä menetelmiä. DLS:ä käytetään yleensä sellaisten partikkelien mittaamiseen, joiden koko on alle mikrometrin. Dynaamisessa valonsironnassa liuokseen suspendoituneiden partikkeleiden liikkumisnopeutta mitataan laservalolla. Yhden aallonpituuden omaava laservalo siroaa osuessaan liuoksessa oleviin partikkeleihin ja sironneen valon intensiteetti riippuu partikkelien koosta ja valon aallonpituudesta. Partikkelien ollessa paljon pienempiä kuin käytetty valon aallonpituus, ne sirottavat valoa kaikkiin suuntiin yhtä paljon eikä partikkelien muoto vaikuta siroamiseen. Suuremmilla partikkeleilla suurin osa valosta siroaa valon kulkusuuntaan sekä niiden muoto vaikuttaa siroamiseen toisin kuin pienillä partikkeleilla.

Partikkeleista siroava valo detektoidaan valomonistimilla, jotka mittaavat valon intensiteettiä. Liuokseen suspendoituneet nanopartikkelit ovat jatkuvasti Brownin liikkeessä, mikä johtuu liuoksen partikkelien ja molekyylien törmäyksistä. Liikkeessä olevien partikkelien paikka vaihtuu ajan suhteen, jolloin myös valon intensiteetti vaihtelee. Pienillä partikkeleilla intensiteetin vaihtelu on nopeaa ja suurilla partikkeleilla taas hidasta. Laitteisto laskee intensiteetin avulla partikkelien koon.

DLS-mittauksen etuna on se, että näytteitä ei tarvitse välttämättä käsitellä ennen mittausta, laitetta ei tarvitse kalibroida ja näytteet eivät tuhoudu/muutu mittauksessa. Mittauksessa ongelmana on se, että laite ei pysty erottamaan tarkasti kolmea kokoluokkaa olevia partikkeleita suspensiosta, mikä johtaa tulosten tarkkuuden jyrkkään heikkenemiseen. Kahta eri kokoluokkaa olevia partikkeleita pystytään vielä mittaamaan tarkasti. Lisäksi jos näytteessä on toinen mitattavista partikkeleista paljon toista suurempi, häiritsee se pienten partikkelien mittausta. Alle 50 nm:n kokoisten partikkelien mittauksessa liuoksen pitoisuuden pitää olla tarpeeksi suuri, koska pienistä partikkeleista siroavan valon intensiteetti on pieni.⁹⁰

7. Työn tarkoitus

Gradutyön kokeellisen osuuden tarkoituksena oli tutkia CCMV-virusten pintarakenteen leimaamista [^{18}F]SFB:llä. CCMV-viruksen proteiinkapselin pinnalla olevien lysiinien pitäisi reagoida [^{18}F]SFB:n kanssa, kuten Kuchar et al. ovat tutkimuksessaan todenneet, jolloin virukset leimautuisivat ^{18}F :lla, ja niitä voitaisiin kuvata PET-kameralla.⁴⁹ [^{18}F]SFB valittiin käytettäväksi prosteettiseksi ryhmäksi, koska sen automatisoidusta synteeseistä oli jo raportoitu, jolloin synteessin optimoimiseksi ei kuluisi liikaa aikaa. Lisäksi [^{18}F]SFB:n tiedettiin reagoivan hyvin vapaiden aminoryhmien kanssa, joten se sopi suunniteltuun tutkimukseen hyvin.

Aluksi [^{18}F]SFB:n synteessimenetelmä piti muokata Radiokemian laboratorion laitteistolle sopivaksi ja testata niin, että synteesi oli toistettavissa hyvällä radiokemiallisella saannolla. Lähtöaineena [^{18}F]SFB:n synteeseissä käytettiin etyyli-4-(trimetyyliammonium trifluorimetaanisulfonaatti)bentsoaattia.

Tämän jälkeen testattiin virusten leimautuvuutta [^{18}F]SFB:llä neljässä eri puskuriliuoksessa. Puskuriliuoksina käytettiin fosfaatti- ja boraattipuskureita, joiden pH oli välillä 6-8. Virusten leimautuvuus mitattiin annoskalibraattorilla ja virusten rakenne DLS:llä ja TEM:llä.

8. Materiaalit

8.1 Laitteisto

Työssä käytetyt laitteet ja laboratoriovälineet on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Työssä käytetyt laitteet ja välineet.

Laite	Malli	Valmistaja
Syklotroni	Cyclone 10/5 D2	Ion Beam Applications
Automaattinen synteesityksikkö		DM Automation
Annoskalibraattori	VDC 405	Veenstra Instruments
HPLC-ohjelmisto	LC-Solution	Shimadzu
HPLC-ohjausyksikkö	CBM-20A	Shimadzu
HPLC-pumppu	LC-20AD	Shimadzu
HPLC-kolonnei	μ Bondapak C18 3,9x300 mm, 10 μ m	Waters
Injektioruisku 1ml	inject [®]	B.Braun
Injektioruisku 2ml	Discardit [™] II	BD
Injektioruisku 5ml	Discardit [™] II	BD
Injektioruisku 10ml	Discardit [™] II	BD
Injektioneula 1,2 x40 mm	Microlance [™] 3	BD
Injektioneula 0,4 x 19 mm	Microlance [™] 3	BD
Injektioneula 0,70 x 40 mm	100 Sterican	B Braun
Injektioneula 0,80 x 80 mm	101 Sterican	B Braun
Pipetti 0,2-2,0 μ l	Finnpipette	Biohit
Pipetti 0,5-10,0 μ l	Finnpipette	Biohit
Pipetti 10-100 μ l	Finnpipette	Biohit
Pipetti 100-1000 μ l	Finnpipette	Biohit
Eppendorf 2ml		Brand
Sentrifuugi suodatinputki 4 ml	Amicon	Millipore
Alumina- SPE patruuna	Sep-Pak [®]	Waters
QMA- SPE patruuna	Sep-Pak [®]	Waters
C18- SPE patruuna	Sep-Pak [®]	Waters
CM- SPE patruuna	Sep-Pak [®]	Waters
Reaktioastiat ja korkit	Alltech	Grace Davison Discovery Science
Septumit reaktioastioihin	20/400 PTFE/silikoni	Grace Davison Discovery Science
Analyysivaaka	H110 Handy	Sartorius
TLC-levy	Silica gel 60 F254	Merck

[¹⁸F]SFB:n synteesissä käytetty laitteisto koostui DM Automation ohjausjärjestelmästä ja DM Automation synteesiyksiköstä. Synteesiyksikkö toimi kiinnitysalustana venttiileille (2- ja 3-tieventtiilit), reaktioastioiden lämmitys/jäähdytysyksiköille ja säteilymittarit. Säädetävällä kaasunpaineella (argon) pystyttiin siirtämään synteesin reagenssit laitteistossa ilman, että synteesiä tehdessä tarvitsi käsitellä radioaktiivisia aineita käsin. Radioaktiivisen aineen kulkeutumista laitteistossa voitiin tarkastella radiodetektoreiden avulla. Ohjausjärjestelmällä pystyttiin kontrolloimaan venttiilien asentoja sekä lämmittämään ja jäähdyttämään reaktioyksiköitä.

Synteesiyksikköön oli liitetty Ar-kaasulinja sekä syklotronilta tuleva fluori-linja, jota pitkin syklotronin kohtioon tuotettu ¹⁸F saatiin siirrettyä lyijykaappiin. Ar:n kaasunvirtausta pystyttiin säätelemään lyijykaapin ulkopuolella olevasta neulaventtiilistä. Virtausta pystyttiin säätämään välillä 0- 140 ml/min, jolloin virtausvoimakkuus pystyttiin säätämään oikeaksi riippuen synteesivaiheesta.

Synteesituotteiden puhtauden määrittämisessä käytettiin HPLC (High Performance Liquid Chromatography = korkean erotuskyvyn nestekromatografia) laitteistoa. Käytetty laitteisto oli SHIMADZU:n HPLC-yksikkö, johon oli liitetty Canberra säteilymittari, jolla pystyttiin määrittämään näytteiden aktiivisuudet. Näytteet laitettiin laitteen sisältämään automaattiseen näytteidenottajaan. Laite oli kytketty tietokoneeseen, jossa olevalla LC-solutions ohjelmalla pystyttiin säätämään esimerkiksi HPLC:n virtausnopeutta, eluenttien suhdetta toisiinsa nähden, mitattavan näytteen määrää ja mittauksen kestoa. Mittauksissa käytettiin kolonnina µBondapak C18 10µm, 3,9 x 300 mm kolonnia, joka oli liitetty laitteistoon erottamaan näytteen sisältämät aineet toisistaan.

Toinen synteesituotteiden puhtauden määrittämisessä käytetty menetelmä oli autoradiografia ja siinä käytetty laite oli FLA-5100 skanneri. Radioaktiivisesta näytteestä ajettu TLC-levy (Thin-Layer Chromatografia = ohutkerroskromatografia) laitettiin PLS- kuvantamislevyn (Photonstimulated luminescence imaging plate = fotostimuloitu luminesenssi kuvantamislevy) päälle, jolloin kuvantamislevyn BaFBr:Eu⁺²-kiteet virittyvät radioaktiivisen säteilyn takia. Mitä enemmän aktiivisuutta on, sitä enemmän aktiiviselta kohdalta kuvantamislevy aktivoituu. Kvantamislevyn virittämiseen tarvittiin vain muutama minuutti, jonka jälkeen kuvantamislevy sijoitettiin valotuskasettiin, joka laitettiin skannerin sisälle. Tietokoneeseen liitetyn skannerin ja koneella olevan Image Reader FLA-5000 Series V1.0-

ohjelman avulla voitiin rajata kuvantamislevyltä tutkittava alue. Skanneri purki kuvantamislevyn virittyneet kiteet punaisella laserilla, jonka aallonpituus oli 633 nm. Kiteiden varaustilan purkautuessa emittoituu sinisen valon aallonpituudella fotoneita (390 nm), jotka skanneri detektoi. Saatu kuva voitiin käsitellä samalla koneella olevan Aida Image Analyzer V.4.00 -ohjelman avulla, jolloin saatiin selville miten tuoteseoksen kaikki mahdolliset aineet olivat kulkeutuneet TLC-levyllä.

Virukset suodatettiin käyttämällä Milliporen Amicon sentrifuugi (Molecular weight cutoff, 12,4 kDa) suodattimia ja sentrifugoimalla niitä Centrifuge 5430 sentrifugilla. Roottorina käytettiin isoille falcon- putkille tarkoitettua roottoria, johon mahtui 8 putkea kerrallaan. Kyseisellä isolla roottorilla pystyi sentrifugoimaan 10 000 cpm:n kierrosvauhtia.

Virusten koko mitattiin Malvern Instrumentsin Zeta Sizer nano series:iin kuuluvalla laitteistolla. Virusliuokset (noin 1 ml) mitattiin muovisiin kyvetteihin, joiden pohjan pinta-ala oli 1 cm². Kyvetit sijoitettiin yksi kerrallaan mittauspaikeille laitteistoon ja viruspartikkelien koko mitattiin dynaamisella valon sironnalla. Virukset myös kuvattiin Mauri Kostiaisen ryhmän toimesta Aalto yliopistossa TEM:llä.

8.2 Liuokset ja kemikaalit

Virukset saatiin Aalto yliopistosta Mauri Kostiaisen ryhmältä Bio- ja kemianteknologian laitokselta. Virukset oli säilytetty niille optimaaliseen puskuriliuokseen. Puskuriliuos sisälsi 100 mM NaAc:a, 10 mM EDTA:ta ja 1 mM NaN₃:ta. Viruksia oli kahdessa eppendorf -putkessa, joiden konsentraatiot olivat erilaiset: 1 = 28,27 mg/ml ja 2 = 17,18 mg/ml

QMA-eluentti, jota käytettiin fluorin eluomiseen QMA-patruunasta tehtiin itse. Siihen mitattiin 237,5 mg Kryptofix 2, 2, 2:sta, 42,5 mg K₂CO₃:a, 2 ml H₂O:ta ja 50 ml ACN:ä. 0,5 M K₂CO₃-liuos, jolla esikäsiteltiin QMA-patruuna, valmistettiin punnitsemalla 6,91 g K₂CO₃:a ja liuottamalla se 100 ml:aan H₂O:ta.

Virusten leimauksessa käytetyt puskuriliuokset tehtiin myös itse. Fosfaattipuskuri, jonka pH oli 6,0 saatiin mittaamalla kaliumdivetyfosfaattia 1,36 g ja liuottamalla se 100 ml:an vettä. Fosfaattipuskuri (pH = 7,0) tehtiin punnitsemalla kaliumdivetyfosfaattia 0,68 g ja dinatriumdivetyfosfaattia 1,12 g ja liuottamalla ne 100 ml:an vettä. Puskurin pH säädettiin käyttämällä 1,0 M kaliumhydroksidia.

Boraattipuskuri (pH = 8,0) tehtiin mittaamalla natriumtetraboraattidekahydraattia 1,91 g ja liuottamalla se 100 ml:an vettä.

TLC-ajoliuos valmistettiin asetonitriilistä ja vedestä suhteessa 9:1.

[¹⁸F]SFB:n puhdistuksessa käytetty 10 % ACN-liuos tehtiin mittaamalla 2 ml ACN:a ja 18 ml H₂O:ta.

[¹⁸F]SFB:n synteeseissä käytetty lähtöaine etyyli-4-trimetyyliammoniunbentsoaatti oli Mirikka Sarparannan ja Helena Jauhon valmistamaa (Radiokemian laboratorio, MSJH101108).

Muut käytetyt kemikaalit olivat kaupallisten toimittajien valmistamia ja ne käytettiin sellaisenaan.

9. Menetelmät

9.1 Radiosynteesien valmistelut

Ennen kuin radioaktiivinen ¹⁸F siirrettiin syklotronilta kuumalaboratorion lyijykaappiin synteesiä varten, jouduttiin tekemään esivalmisteluja synteesiyksikköön aina ennen jokaista synteesikertaa. Synteessissä käytettävät aineet punnittiin, esikäsiteltiin ja liitettiin synteesiyksikköön. QMA- patruuna sekä lopputuotteen puhdistamiseen käytetyt muut kiinteäfaasipatruunat esikäsiteltiin, eli patruunoiden läpi ruiskutettiin niiden toimimiseen tarvittavat nesteet ennen niiden liittämistä synteesiyksikköön. QMA-kiinteäfaasipatruuna esikäsiteltiin 10 ml:lla 0.5 M K₂CO₃:a ja huuhdeltiin 15 ml:lla mQ-vettä. Karbonaatti-ioni sitoutuu anioninvaihtopatruunaan, jolloin F⁻ pystyy korvaamaan karbonaatin vahvempana nukleofiilinä tullessaan patruunaan. CM- ja C18- patruunat esikäsiteltiin 10 ml:lla etanolia (Etax Aa) ja 15 ml:lla mQ-vettä. Etanolia käytettiin kiinteäfaasin kostuttamiseksi ja vedellä tasapainotettiin ja huuhdeltiin patruuna. Alumina-patruuna esikäsiteltiin pelkästään 50 ml:lla mQ-vettä, jolla kasteltiin aluminahartsia ja poistettiin irrallaan oleva hartsi pois patruunasta. Synteesin lähtöaine etyyli-4-trimetyyliammoniumbentsoaatti punnittiin 3 ml:n reaktioastiaan ja liuotettiin 1 ml:an vedetöntä asetonitriiliä. QMA-patruunan eluoimiseen käytettävä QMA-eluenttia mitattiin 2 ml 3ml:n reaktioastiaan.

9.2 [¹⁸F]F⁻ -tuotanto ja ¹⁸F:n siirto lyijykaappiin

Fluori-18:ta tuotettiin IBA 10/5 syklotronilla ja [¹⁸F]F⁻-tuotannossa käytettiin suhteellisen matalia alkuaktiivisuuksia (1-1,5 GBq), sillä puhdasta lopputuotetta ei tarvittu 200 MBq enempää virusleimauksiin. [¹⁸F]F⁻:a tuotettiin ydinreaktiolla ¹⁸O(p,n)¹⁸F käyttämällä ionilähteellä tuotettuja ja syklotronilla kiihdytettyjä protoneita, jotka ohjattiin kohtioon, joka sisälsi 97 %:sti ¹⁸O:lla rikastettua vettä (H₂¹⁸O). Ennen jokaista säteilytystä H₂¹⁸O vesipullo punnittiin manuaalisesti ennen ja jälkeen sen, kun vettä oli siirretty pullosta kohtioon. Näin voitiin seurata, että vettä siirtyi kohtioon oikeat määrät säteilytystä varten.

Ensimmäisiin [¹⁸F]SFB-synteeseihin säteilytettiin kohtiota niin, että säteilytyksen integroitu kohtiovirta oli 1,0 μA/h. Säteilytykset kestivät näin pieneen määrään ainoastaan noin 4 minuuttia. Kun [¹⁸F]SFB:n synteesi oli saatu optimoitua, säteilytettiin kohtiota loppuisissa synteeseissä niin, että integroitu kohtiovirta oli 1,2 μAh. Säteilytykset kestivät tällöin 5 minuuttia. Kohtioon tuotettu radioaktiivinen ¹⁸F siirrettiin syklotronilta kuumalaboratorion lyijykaappeihin teflonlinjaa pitkin.

Heliumkaasua käytettiin kohtioon tuotettu radioaktiivisen veden siirtämiseen teflonlinjaa pitkin. Kohtio piti täyttää ensimmäisen tyhjennyksen jälkeen, täyttää uudestaan H₂¹⁸O:lla ja tyhjentää uudelleen, jotta kaikki tuotettu aktiivisuus saatiin siirrettyä kohtiolta lyijykaappiin. Lyijykaappiin syklotronilta kaasulinjaa pitkin tuleva radioaktiivisen ¹⁸F:n sisältämä vesi ohjattiin lyijykaapin sisällä olevaan synteesiyksikössä kiinni olevan QMA- patruunan lävitse H₂¹⁸O- jäteastiaan. Radioaktiivinen fluori jäi kiinni QMA- patruunaan H₂¹⁸O- veden jatkaessa patruunan lävitse. QMA- patruunan sisältämä hydrofiilinen piidioksidi pohjainen kvaternäärinen ammoniumhartsi toimii vahvana anionin vaihtajana, johon syklotronilta tuleva [¹⁸F]F⁻ tarttui.

9.3 [¹⁸F]SFB:n synteesi

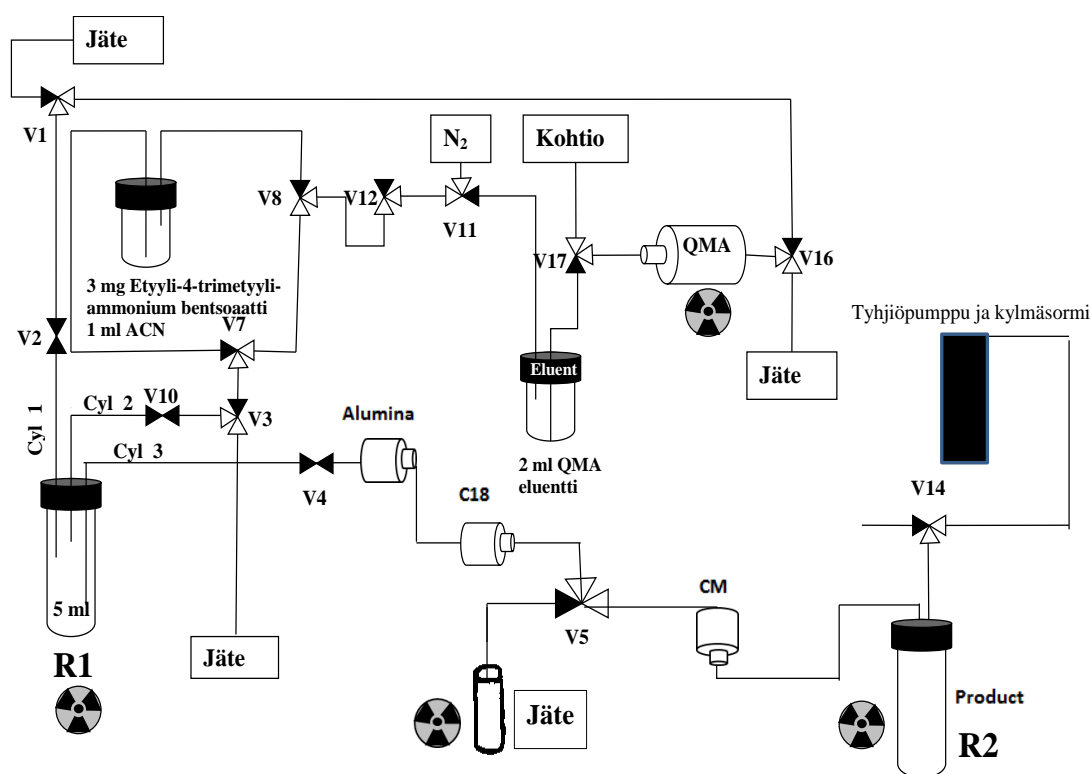
¹⁸F eluoitiin QMA-patruunasta reaktioastiaan R1 kryptofix-kompleksina käyttäen QMA-eluenttia (Kuva 14). Kryptofix (K 2.2.2)/[¹⁸F]KF kompleksi kuivattiin lämmittämällä reaktioastiaa 10 minuutin ajan 120 °C:ssa, kaasuvirtauksen ollessa noin 50 ml/min, minkä jälkeen reaktioseos jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi. Punnittu lähtöaine etyyli-4-trimetyyliammoniumbentsoaatti (3 mg), joka oli liuotettuna vedettömään asetonitriiliin (1ml), siirrettiin argonkaasun avulla reaktioastia 1:seen, jossa kuivattu radioaktiivinen fluori oli. [¹⁸F]F⁻ reagoi lähtöaineen kanssa, kun reaktioseosta lämmitettiin 90 °C:ssa 10 minuutin ajan. Reaktioseos jäähdytettiin 50 °C:seen ja 25 µl:a tetrapropyyliammonium hydroksidia, joka oli liuotettuna 200 µl:an asetonitriiliä, lisättiin käsin ruiskulla reaktioastia 1:seen. Reaktioseosta lämmitettiin 120 °C:ssa minuutin ajan, jolloin muodostui bentsoaattihappoa. Lämmityksen jälkeen astia jäähdytettiin 50 °C:seen paineen tasaamiseksi. Tämän jälkeen seos haihdutettiin kuiviin.

N,N,N',N'-Tetrametyyli-*O*-(*N*-sukkinimidyyl)uroniumtetrafluoroboraatti eli TSTU (10 mg), liuotettuna 1 ml:an asetonitriiliä, lisättiin ruiskulla reaktioastiaan. Reaktioseosta lämmitettiin 90 °C:ssa 5 minuutin ajan. TSTU:n lisäyksellä saatiin suojattua bentsoaattihapon happoryhmä sukkinimidyyliryhmällä muodostamalla sukkinimidyyliesteri.

Reaktioseos neutraloitiin lisäämällä 1 ml 2 % etikkahappoa reaktioastiaan. Seos puhdistettiin siirtämällä reaktioseos Alumina- ja C18-kiinteäfaasipatruunoiden lävitse. Patruunoiden lävitse laskettiin 1 ml 10 % asetonitriiliä, jolla saatiin mahdolliset epäpuhtaudet irtoamaan patruunoista [¹⁸F]SFB:n vielä pysyessä kiinni patruunassa. Lopullinen puhdistettu [¹⁸F]SFB saatiin eluoimalla patruunat 2 ml:lla asetonitriiliä eluointiliuoksen kulkiessa vielä CM patruunan lävitse, joka poisti liuoksessa mahdollisesti vielä esiintyviä epäpuhtauksia. Patruunat eluoitiin vielä 1 ml:lla asetonitriiliä, jotta kaikki [¹⁸F]SFB saatiin eluoitua patruunoista pois.

Synteesin lopuksi loppuseoksen asetonitriili haihdutettiin vakuumpumpun avulla. Reaktioseoksen lämpötila pidettiin 25 °C:ssa, jolloin asetonitriilin haihduttamiseen meni 15 minuuttia. Reaktioastian paine tasattiin ja alle 1 ml:n tilavuuteen saatu [¹⁸F]SFB:n liuos oli

valmis käytettäväksi virusten leimaamiseen. [^{18}F]SFB:n synteesissä käytetty synteesikaavio on esitetty kuvassa 14.



Kuva 14. [^{18}F]SFB:n synteesissä käytetty synteesikaavio. Kuvassa V1-V17 kuvaavat synteesiyksikön venttiilejä ja N_2 tyypikaasulinjaa. Kohtio kuvaa syklotronilta tulevaa kaasulinjaa, jota pitkin ^{18}F tulee lyijykaappiin. CM, C18, QMA ja Alumina kuvaavat synteesissä käytettäviä kiinteäfaasipatruunoita.

9.4 Virusten leimaaminen [^{18}F]SFB:llä

Virukset piti ennen leimaamista pestä pois liuksesta, jossa niitä oli säilytetty. Virusliuksesta otettiin finnpipetillä tarkka tilavuus virusliuosta, niin että viruksia saatiin otettua 1,5 mg kokeita varten. Virukset siirrettiin Amicon sentrifugisuodatinputkeen ja lisättiin suodattimeen 2 ml sitä puskuriliuosta, jota kussakin erässä käytettiin. Viruksia sentrifugoitiin 6200 rpm:n voimakkuudella 10 minuutin ajan. Sentrifugoinin jälkeen virukset jäivät putken yläosaan suodattimeen (noin 250 μl liuosta) ja pesuliuos oli suodattunut putken pohjalle. Virukset siirrettiin suodattimesta kolmeen eppendorf-putkeen, niin että jokaiseen putkeen tuli 0,5 mg viruksia.

Eppendorf-putkeen lisättiin 10 MBq [¹⁸F]SFB:tä, jonka tilavuus oli riippuen leimauskerrasta 180-280 µl:aa. Putkeen lisättiin vielä noin 2 ml puskuriliuosta, niin että kokonaistilavuus oli 2 ml. Eppendorf-putkia sekoitettiin kevyesti vorteksilla inkuboinnin alussa sekä 5 minuutin jälkeen. Viruksia inkuboitettiin huoneenlämmössä 10 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen seoksesta otettiin näyte ja siitä ajettiin TLC. Virukset pestiin siirtämällä virukset Amicon sentrifugisuodatinputkeen ja lisäämällä mQ-vettä putkeen, jolloin fuugauksen jälkeen virukset olivat vedessä.

10. Tulokset

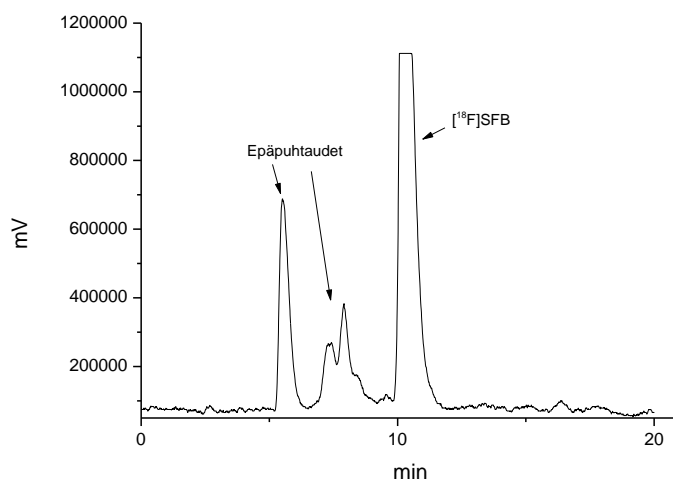
10.1 [¹⁸F]SFB:n synteessin optimointi

¹⁸F-N-Sukkinimidyyli-4-fluorobetsoaatin ([¹⁸F]SFB:n) synteesi sekä lopputuotteen puhdistus kiinteäfaasipatruunoilla saatiin optimoitua hyvin. Ensimmäisen [¹⁸F]SFB:n synteessin lopputuotetta saatiin 134 MBq ja sen radiokemiallinen puhtaus oli vain 53 %. [¹⁸F]SFB:n synteessin saantoa saatiin parannettua merkittävästi, kun varmistettiin synteessin vedettömät olosuhteet kaikissa reaktiovaiheissa. Jokainen synteessissä käytetty reagenssi oli mahdollisimman vedetön ja kaikki haihdutusvaiheet synteessissä tehtiin huolella, jotta kaikki vesi saatiin haihdutettua pois reaktioseoksesta. Lopputuotteen puhdistuksessa oli tärkeää, että Sep-Pak patruunat eivät päässeet kuivumaan puhdistuksen aikana, jotta mahdolliset epäpuhtaudet joita synteessissä syntyi, jäivät kiinni Sep-Pak patruunoihin.

[¹⁸F]SFB:n synteessin optimoinnissa lähtöaine saatiin fluorattua helposti, mutta tetrapropyylammoniumhydroksidin lisäyksen jälkeen reaktiolämpötiloja ja lämmityksen kestoja säädettiin sopiviksi. Synteeseissä kokeiltiin lämpötiloja 100-120 °C välillä, lämmitysaikojen ollessa 1-10 minuuttia. Optimoiduksi lämpötilaksi ja lämmitysajaksi tetrapropyylammoniumhydroksidin lisäyksen jälkeen saatiin 1 minuutin kestoinen lämmitys 120 °C:een lämpötilalla.

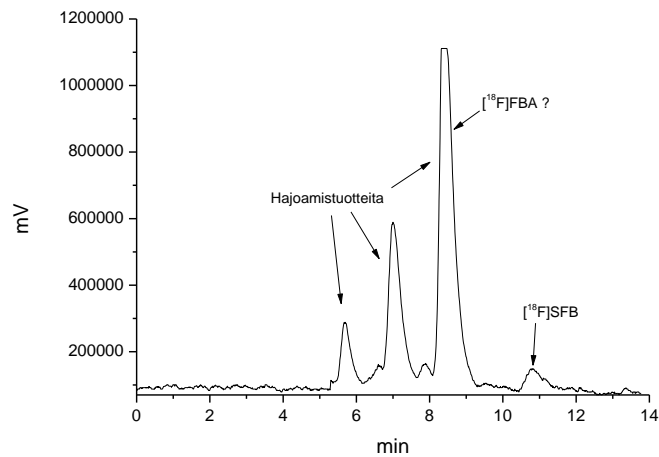
Tärkeää oli lämmitysten jälkeen jäähdyttää reaktioseosta riittävästi, ettei tuotetta menetetty siirryttäessä synteessissä eteenpäin seuraaviin vaiheisiin. Esimerkiksi tetrapropyylammoniumhydroksidin lisäyksen jälkeisen lämmityksen jälkeen paine reaktioastiassa oli niin suuri, että jollei astiaa jäähdyttänyt tarpeeksi reaktion jälkeen, menetettiin tuotetta kun linjat reaktioastiaan avattiin. Lopputuotteen puhdistamisessa huomattiin eri tavoilla puhdistusta

kokeiltaessa, että patruunat eivät saaneet kuivua puhdistuksen aikana, muuten lopputuotteeseen tuli epäpuhtauksia. Kuvasta 15 nähdään patruunoiden läpi tulleet epäpuhtaudet, kun patruunat pääsivät kuivumaan puhdistuksen aikana. 10 minuutin kohdalla näkyvän [^{18}F]SFB:n lisäksi loppuseokseen pääsi aikavälillä 5-9 minuuttia olevat epäpuhtaudet.



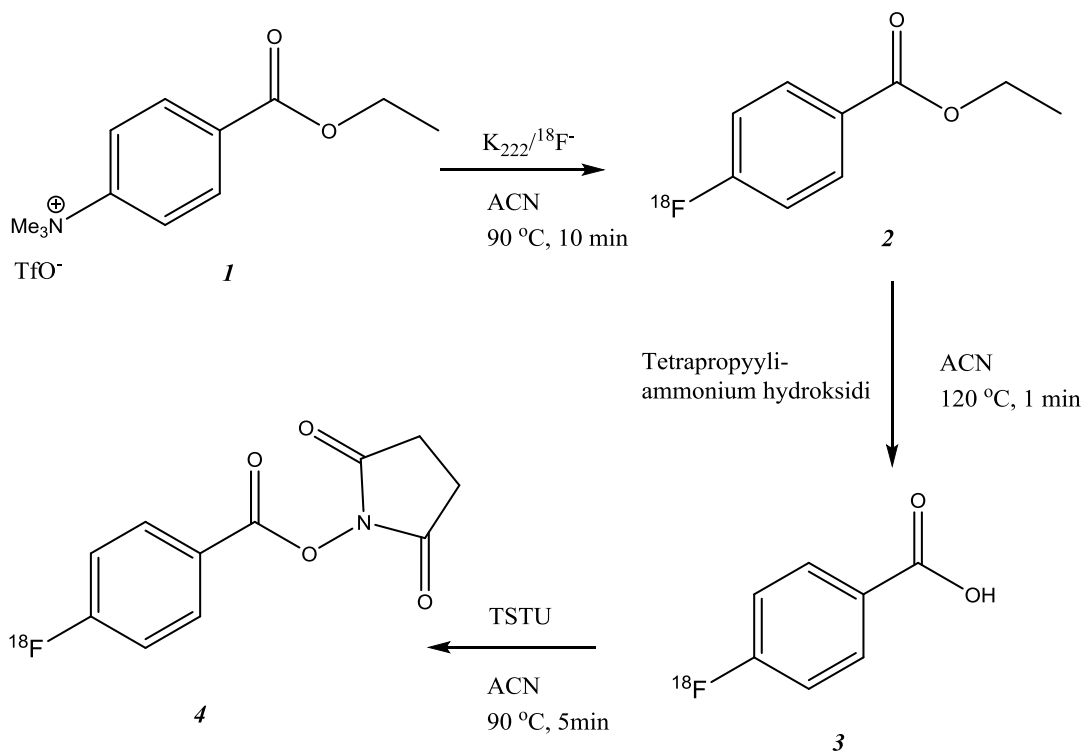
Kuva 15. Epäpuhtaudet, joita ei pystytty erottamaan lopputuotteesta, mikäli kiinteäfaasipatruunat kuivuivat puhdistuksen aikana.

Loppuseoksesta, jossa puhdistettu lopputuote oli, piti myös vähentää asetonitriilin määrää. Tämä sen takia, että asetonitriili ei olisi sopiva liuotin virusten leimaamisen kannalta. Asetonitriilin haihduttamiseksi kokeiltiin loppuseoksen lämmittämistä 50-30 °C:n välillä ja puhaltamista typpikaasulla, mutta lämmitettäessä seosta lopputuote hajosi sekä haihdutus kesti 40 min, mikä oli aivan liian pitkä aika, sillä haihdutus pitäisi pystyä tekemään noin 15 minuutin aikana. Kuvasta 16 nähdään, kuinka [^{18}F]SFB hajosi, kun asetonitriilin haihdutuksessa käytettiin liian korkeita lämpötiloja ja haihdutus kesti liian kauan. HPLC-kuvaajasta nähdään, että [^{18}F]SFB (11 min) hajosi ainakin [^{18}F]FBA:ksi (9 min) ja pariiksi muuksi tunnistamattomaksi yhdisteeksi (5-8 min).



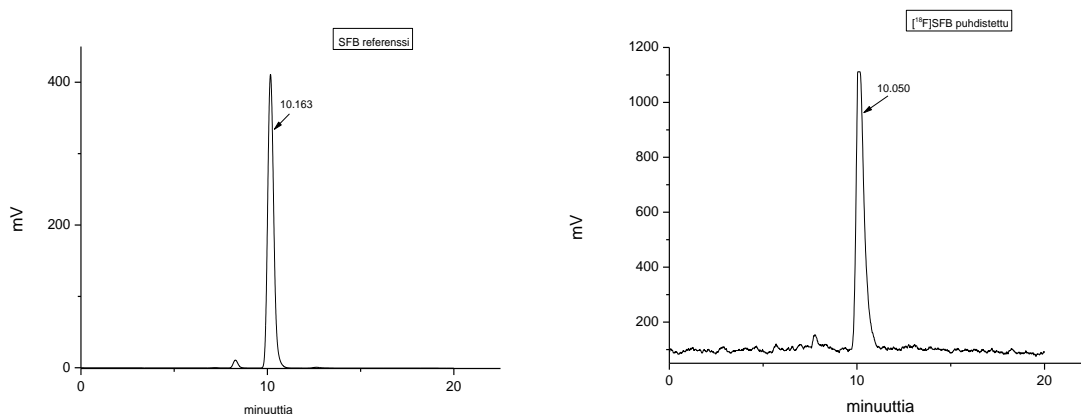
Kuva 16. $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ hajosi asetonitriilin haihdutuksessa melkein täydellisesti useiksi eri tuotteiksi.

Asetonitriilin haihduttamisen optimoiduksi menetelmäksi todettiin vakuumpumpun avulla haihduttaminen ja reaktioastian lämpötilan pitäminen $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ asteessa. Haihdutus kesti näin vain 15 minuuttia ja loppuseoksen asetonitriilipitoisuus saatiin alle 1 ml:n, johon voitiin lisätä virusten leimaamisessa käytettyä puskuriliuosta, jolloin asetonitriilin osuus leimausseoksessa ei ollut enää suuri. Alla on esitetty $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$:n synteisin optimoitu menetelmä (kuva 17).



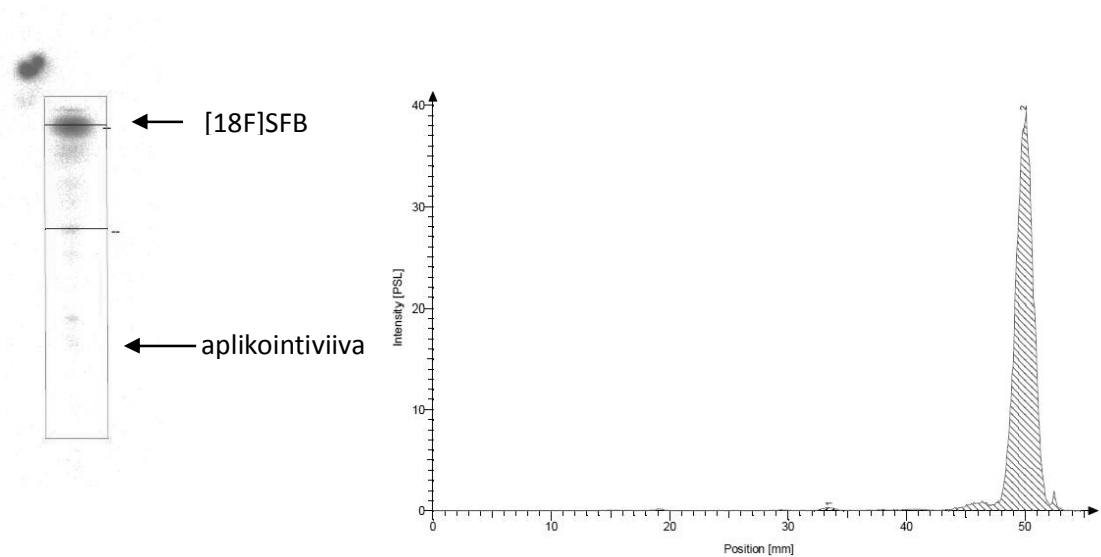
Kuva 17. $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$:n optimoitu synteesi.

[¹⁸F]SFB:n synteesin optimoinnissa päästiin siihen, että toistettavasti pystyttiin tuottamaan lopputuotetta 68- 74 %:sesti suhteessa fluorin alkuaktiivisuuteen. Lopputuotteen radiokemiallinen puhtaus oli 92-98 %. Kuvassa 18 on esitetty HPLC:llä mitatut kuvaajat puhdistetusta [¹⁸F]SFB:stä sekä SFB:n referenssinäytteestä. Vasemman puoleisessa kuvaajassa on HPLC:llä UV-detektorilla mitattu SFB:n referenssinäyte, jonka eluotumisaika on 10,163 minuuttia. UV-detektori oli säädetty mittaamaan 254 nm:n aallonpituudella. Oikean puoleisessa kuvaajassa on puhdistetusta [¹⁸F]SFB:stä radiodetektorilla mitattu näyte, joka on eluoinut 10,050 minuutin kohdalla. Koska verrattaessa referenssinäytteeseen tuote on eluoinut samaan aikaan kolonnista, pystytään se todentamaan samaksi yhdisteeksi. Oikeanpuoleisen kuvaajan mukaan [¹⁸F]SFB on radiokemiallisesti 96 % puhdasta.



Kuva 18. Vasemmanpuoleisessa kuvaajassa on HPLC:llä mitattu SFB:n referenssinäyte ($\lambda = 254 \text{ nm}$) ja oikeanpuoleisessa kuvaajassa puhdistetusta [¹⁸F]SFB:stä mitattu näyte.

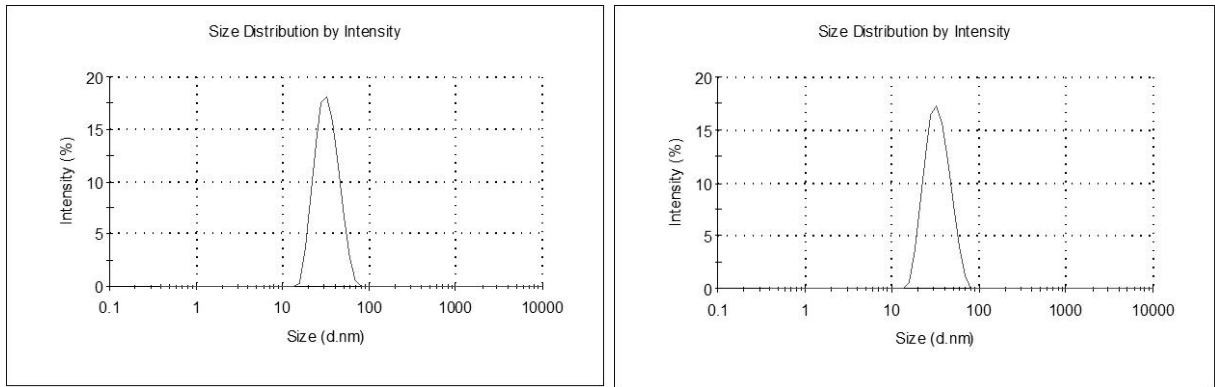
HPLC:llä ei saatu mitattua varmasti [¹⁸F]SFB:n radiokemiallista puhtautta, sillä menetelmällä ei nähdä kaikkea näytteessä mahdollisesti olevaa vapaata fluoria. Saadusta lopputuotteesta ajettiin vielä TLC ja TLC-levy skannattiin autoradiografialla, jotta saatiin varmuus [¹⁸F]SFB:n radiokemiallisesta puhtaudesta. [¹⁸F]SFB kulkeutui TLC-levyllä aplikointiviivalta eluentin mukana ylös eikä vapaata fluoria ollut jäänyt aplikointiviivalle. [¹⁸F]SFB:n radiokemiallinen puhtaus pystyttiin näin määrittämään tarkasti ja tulokseksi saatiin 97,8 %. Saadut tulokset on esitetty kuvassa 19.



Kuva 19. Kuvassa TLC:llä mitatusta $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$:n näytteestä saadut autoradiografiakuvat, joista nähdään $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ suurimpana pisteenä ja piikkinä kuvissa.

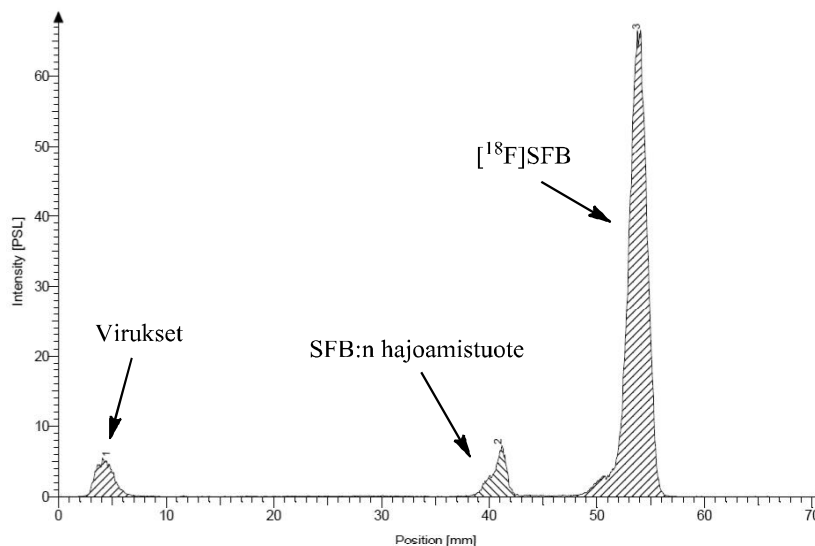
10.2 CCMV- virusten leimaaminen $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$:llä

Kun $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$:n synteesin saanto oli saatu halutulle tasolle, leimattiin CCMV-virusia neljässä eri puskuriliuoksessa. Virukset leimattiin ensin fosfaattipuskurissa, jonka pH oli 6,0. Seoksesta, jossa oli virukset ja $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$, otettiin näyte TLC:tä varten. TLC:ssä virukset jäivät aplikointiviivalle, $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$:n ja sen hajoamistuotteiden kulkeutuessa eluointiliuoksen mukana levyllä ylöspäin. Radio-TLC-kuvista nähtiin, että virukset eivät olleet leimautuneet juuri ollenkaan. TLC:n mukaan virukset olivat leimautuneet ainostaan 6.6-6.9 %:sesti. Virukset mitattiin vielä DLS:llä, jotta nähtiin oliko viruskoko muuttunut leimauksen johdosta. DLS:llä tehdystä mittauksesta nähtiin, että virukset olivat halkaisijaltaan keskimäärin 31 nm, joka oli sama kuin leimaamattomista viruksista mitattu. DLS mittausten tulokset on esitetty kuvassa 20.



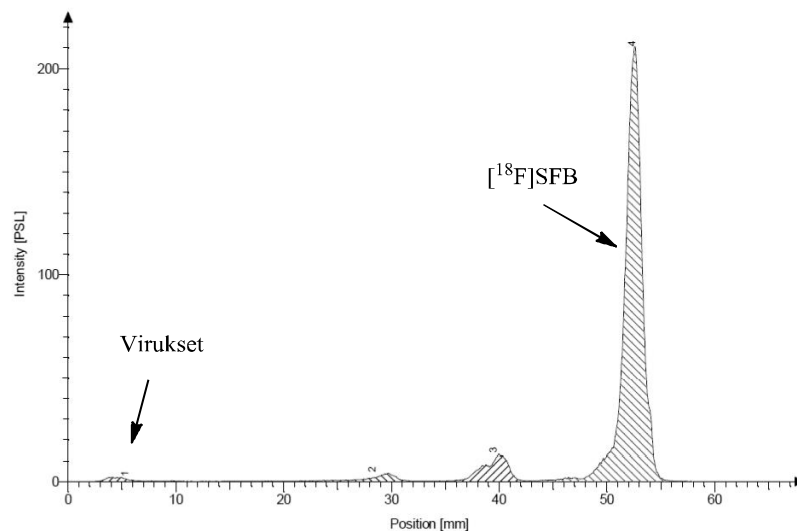
Kuva 20. DLS mittausten tulokset, joista nähdään, että virusten koko ei ole muuttunut leimauksen aikana. Vasemmalla virukset ennen leimausta (31 nm) ja oikealla leimauksen jälkeen (31 nm).

Kuvassa 21 on seoksesta mitattu radio-TLC-kuvaaja, josta nähdään, että [^{18}F]SFB ei ole hajonnut juuri ollenkaan liuoksessa ja virukset ovat leimautuneet heikosti. [^{18}F]SFB:n suojaryhmän pitäisi hajota jonkin verran seoksessa, jotta [^{18}F]SFB voisi leimata virusten pintarakenteen peptideitä. Nyt suurin osa [^{18}F]SFB:stä on pysynyt reagoimattomana (iso piikki 50–56 mm).

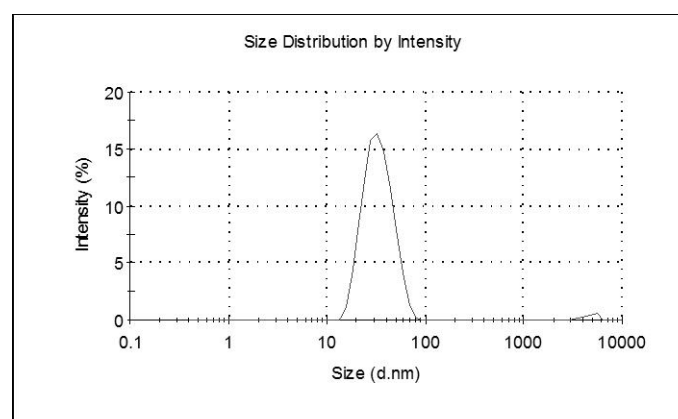


Kuva 21. Radio-TLC-kuva näytteestä, joka on otettu fosfaattipuskurissa (pH= 6,0) leimatuista viruksista. Kuvassa oikealla oleva iso piikki on [^{18}F]SFB ja pieni piikki vasemmalla alle 10 arvolla on leimautuneet virukset.

Seuraavaksi virukset leimattiin fosfaattipuskurissa, jonka pH oli 7,0. Jos edellisessä leimauksessa leimautuvuus oli heikkoa, niin nyt se oli olematonta, sillä leimautuvuus oli vain 1.1 %. Kuvasta 22 nähdään, että [^{18}F]SFB ei ole ollenkaan hajonnut seoksessa vaan on pysynyt reagoimattomana, jolloin se ei ole voinut reagoida virusten kanssa. Virusten koko ei ollut juurikaan muuttunut, kun virukset mitattiin DLS mittauksella (kuva 23). Viruksen koon voitiin todeta kasvaneen hiukan 33 nm:in, mutta se johtui luultavasti kasvaneesta pH:sta. Esimerkiksi Tama et al. ovat tutkimuksessaan todenneet virusten halkaisijan kasvavan hiukan pH-arvon noustessa.⁸⁰

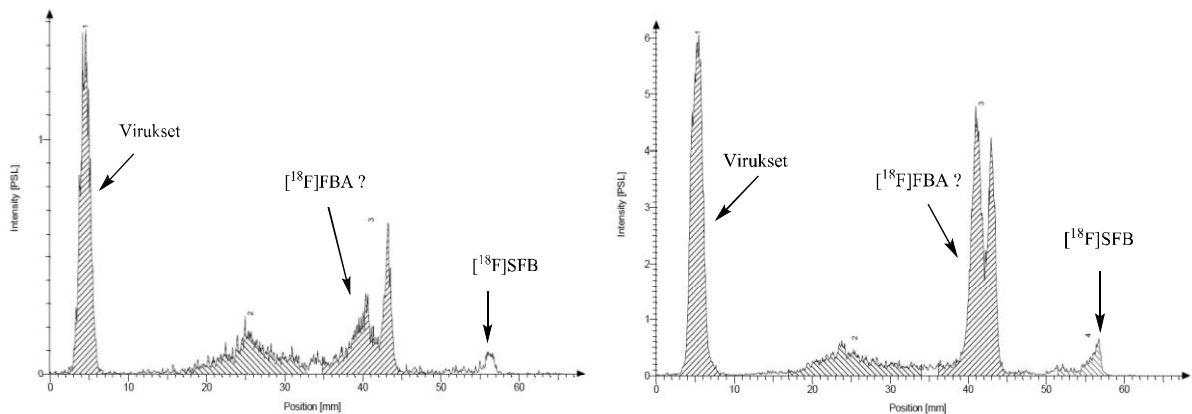


Kuva 22. Radio-TLC-kuva näytteestä, joka on otettu fosfaattipuskurissa (pH= 7,0) leimatuista viruksista. Kuvassa oikealla oleva iso piikki on [^{18}F]SFB ja olematon pieni kumpu vasemmalla alle 10 arvolla on leimautuneet virukset.

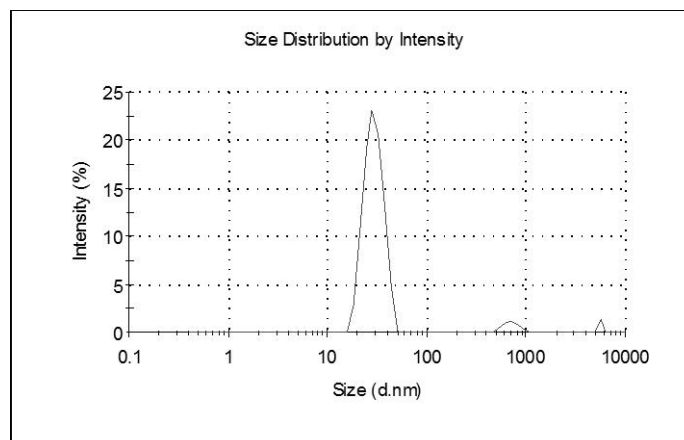


Kuva 23. Virusten koko suureni vain hiukan toisen leimauksen aikana. Nyt halkaisija oli 33 nm.

Seuraavat virusten leimaamiset tehtiin boraattipuskurissa, jonka pH oli 8,0. Tällä kertaa tulokset olivat lupaavampia, sillä virusten leimautuvuus vaihteli radio-TLC-analyysin mukaan 17 %:sta aina 40 %:in asti. TLC:n avulla nähtiin, että [^{18}F]SFB oli selvästi hajonnut osittain seoksessa, mikä oli edellytys virusten leimautuvuudelle. DLS-mittauksesta nähtiin, että viruspartikkelien koko oli kasvanut noin 40 nm:in (kuva 25), mikä viittaisi virusten turpoamiseen, mikä tosin oli odotettavissa näin korkeassa pH:ssa, kuten Tama et al. olivat tutkimuksissaan huomanneet.⁸⁰ Kuvasta 24 nähdään, että boraattipuskurista otetuista näytteistä saadut kuvaajat ovat aivan erilaisia aikaisempiin fosfaattipuskureista otettuihin verrattuna. [^{18}F]SFB on hajonnut melkein kokonaan luultavasti [^{18}F]FBA:ksi, joka näkyy kuvissa alueella 35-45. Lisäksi leimautuneet virukset näkyvät alueella 4-9 mm.

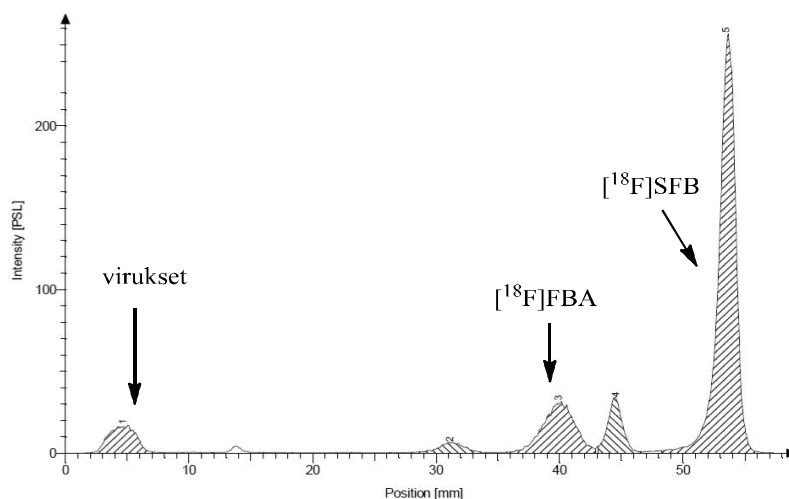


Kuva 24. Radio-TLC-kuva näytteestä, joka on otettu boraattipuskurissa (pH= 8,0) leimatuista viruksista. Kuvassa vasemmalla oleva iso piikki on [^{18}F]SFB:llä leimautuneet virukset ja muut piikit ovat syntyneet [^{18}F]SFB:n hajoamisen seurauksena.



Kuva 25. DLS mittaustulos boraattipuskurissa leimatuista viruksista. Virusten halkaisija on 40 nm.

Virusten leimaaminen toistettiin vielä boraattipuskureissa, joiden pH oli 8.0 ja 7.8, koska haluttiin toistaa aikaisemmin onnistunut leimaus. Näillä testikerroilla virukset eivät leimautuneet, kuten edellisellä kerralla, jolloin virukset oli leimattu myös boraattipuskurissa. Boraattipuskuri, jonka pH oli 8,0, oli samaa erää kuin aikaisemmin käytetty boraattipuskuri ja tämän lisäksi puskureiden pH tarkastettiin vielä kokeiden jälkeen, jotta voitiin olla varmoja puskuriliuosten pH-arvoista. Virusten leimautuvuudet olivat 2,3 %:n ja 13,2 %:n välillä, mikä oli paljon vähemmän kuin odotettiin. Virukset olivat tuoreista soluista, mutta se ei parantanut leimautuvuutta. Kuvasta 26, joka on viruksista, jotka on leimattu boraattipuskurissa (pH 8,0), nähdään, että [^{18}F]SFB ei ole taaskaan hajonnut juurikaan. Sama tulos oli myös puskurista pH 7,8 otetuista näytteissä, joiden radio-TLC-kuvista nähtiin sama ongelma.



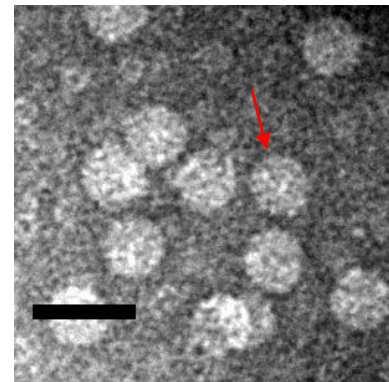
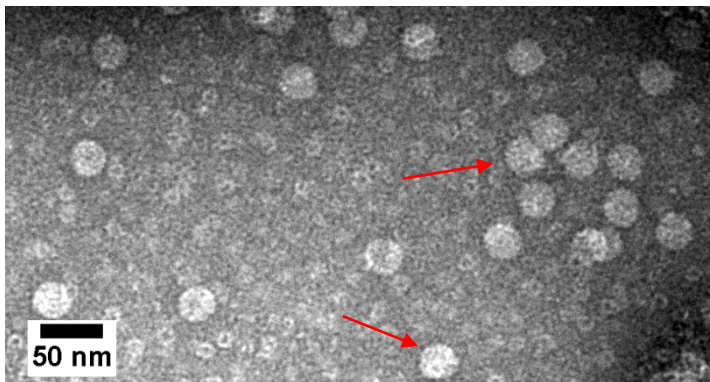
Kuva 26. Radio-TLC kuva näytteestä, joka on otettu boraattipuskurissa (pH= 7,8) leimatuista viruksista. Kuvassa oikealla oleva iso piikki on [^{18}F]SFB ja pieni piikki vasemmalla alle 10 arvolla on leimautuneet virukset. [^{18}F]SFB:n piikkistä nähdään, että se ei ole hajonnut juurikaan, vaikka aiemmin boraattipuskurissa se hajosi melkein kokonaan.

Taulukkoon 3 on taulukoitu virusleimausten tulokset.

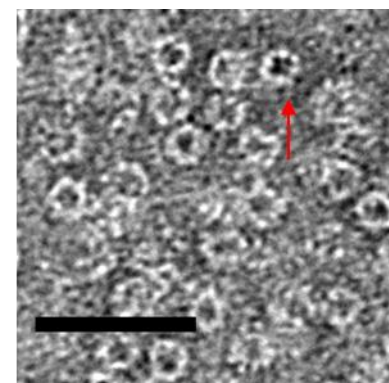
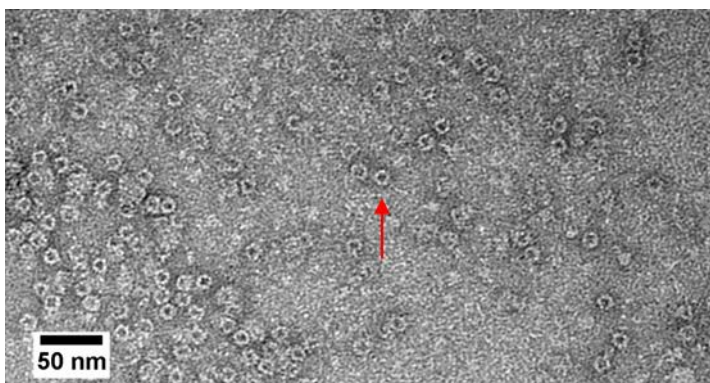
Taulukko 3. Leimautuvuuskokeiden tulokset. Virusten leimautuvuus fosfaattipuskureissa on testattu kolmesti. Boraattipuskureissa pH = 7.8 on testattu neljästi ja pH = 8,0 testattiin yhdeksän kertaa.

Virukset	Puskuriliuos	Lisätty [¹⁸ F]SFB:n aktiivisuus (MBq)	Virusten määrä (mg)	Inkubointi aika (min)	TLC:llä mitattu prosentuaalinen leimautuvuus (%)
1	Fosfaattipuskuri, pH= 6,0	10	0,5	10	6,77 ± 0,15
2	Fosfaattipuskuri, pH= 7,0	10	0,5	10	1,13 ± 0,06
3	Boraattipuskuri, pH= 7,8	10	0,5	10	6,75 ± 4,65
4	Boraattipuskuri, pH= 8,0	10	0,5	10	12,9 ± 14,9

Leimatuista viruksista mitattiin Mauri Kostiaisen ryhmän toimesta TEM-kuvat. TEM:llä kuvatut virusliuokset ovat kuvissa 27 ja 28. Kuvista pystyttiin erottamaan CCMV-virukset ja sen lisäksi joitakin pienempiä partikkeleita, jotka olivat luultavasti leimauksissa hajonneita viruspartikkeleita.



Kuva 27. Kuvissa liuoksessa olevia CCMV- viruksia, jotka on merkitty nuolin.



Kuva 28. Liuoksessa olevia muita pienempiä partikkeleita, jotka luultavasti ovat hajonneita viruskapsideita.

11. Yhteenveto ja johtopäätökset

Ensimmäinen tavoite eli [¹⁸F]SFB:n synteessin optimoiminen onnistui hyvin ja suhteellisen helposti. Laitteisto saatiin nopeasti pystytettyä synteesiä varten ja jo ensimmäisellä synteetikerralla saatiin tuotetta tuotettua hyvin. Enemmän aikaa meni lopputuotteen puhdistamisen saamiseksi sille tasolle, että epäpuhtauksia ei päässyt lopulliseen tuoteliuokseen. Kun selvisi, ettei kiinteäfaasipatruunoiden saanut antaa kuivua puhdistuksen aikana saatiin myös lopputuotteen puhdistus vaadittavalle tasolle ja lopputuotteen puhtaus reilusti yli 90 %:n. Synteetit pystyttiin toistettavasti tekemään hyvillä saannoilla 71 ± 3 % (RCY = decay-corrected radiochemical yield = puoliaikakorjattu saanto).

Ongelmia tuotti aluksi se, että asetonitriili piti saada poistettua loppuliuoksesta, ettei se häiritse virusten leimaamista. Normaali haihduttaminen kevyesti lämmittämällä ei toiminut, sillä [¹⁸F]SFB hajosi nopeasti, kun liuosta alettiin lämmittämään. Lisäksi haihduttaminen oli muutenkin hidasta. Vakuumpumpun avulla onnistuttiin lopulta haihduttamaan asetonitriili pois. Tärkeää oli pitää reaktioastia huoneenlämpöisenä, sillä jos se jäähtyi haihtumisen johdosta, kesti haihduttamisessa useita kymmeniä minutteja pidempään.

Virusia leimattiin neljässä eri puskuriliuoksessa, joiden pH oli välillä 6-8. Liuosten pH:n piti olla sopiva virusten kannalta, niin että ne eivät hajoaisi leimauksen aikana ja toisaalta leimaaminen olisi mahdollista samoissa olosuhteissa. Teoreettisesti virusten pintarakenteen leimaaminen [¹⁸F]SFB:llä piti olla mahdollista, sillä tiedettiin mm. Speirin tutkimusryhmän julkaisemien tutkimustulosten mukaan pinnan sisältävän lysiinia ja [¹⁸F]SFB:n reagoivan helposti vapaiden amino- ryhmien kanssa.⁸¹

Ensimmäiset leimaukset fosfaattipuskureilla (pH:t 6.0 ja 7.0) eivät olleet lupaavia, sillä virusten leimautuvuus oli vain parin prosentin luokkaa. Myöskin se, että [¹⁸F]SFB ei juurikaan hydrolysoitunut puskuriliuoksissa oli huolestuttavaa. Kirjallisuudessa [¹⁸F]SFB:llä on leimattu peptidejä pH-välillä 6.0-9.0, joista suurimmassa osassa parhaimmat tulokset on saavutettu pH:n ollessa yli 7.0. Boraattipuskuria päätettiin kokeilla puskuriliuoksena, koska sitä oli käytetty muissa kirjallisuudesta löytyvissä [¹⁸F]SFB:n leimauksissa ja sillä päästiin korkeammalle pH-arvolle. Ensimmäisen kerran, kun virukset leimattiin boraattipuskurissa, olivat tulokset lupaavia, sillä virukset olivat leimautuneet jopa 40 %. Myös [¹⁸F]SFB oli reagoinut voimakkaammin kuin aikaisempina kertoina. Jostain syystä virusia ei saatu enää leimautumaan, vaikka reaktioolosuhteet olivat samat seuraavilla kerroilla. Lisäksi kokeiltiin toista boraattipuskuria (pH = 7.8), leimattiin tuoreesta erästä olevia virusia ja kokeiltiin

suurempaa aktiivisuutta, mutta millään keinoin ei pystytty toistamaan erien 7-9 leimautuvuutta. Myöskin [¹⁸F]SFB ei hajonnut enää, vaan pysyi liuoksessa melkein reagoimattomana, vaikka liuoksen pH oli sama kuin onnistuneissa leimauksissa. Näin ollen kokeista ei saatu virusten leimaamiseen uutta menetelmää, jolla leimaaminen viruksen pintakapsidiin onnistuisi. Se huomattiin, että [¹⁸F]SFB ei reagoinut juurikaan matalissa (6-7) pH-arvoissa. Kirjallisuuden perusteella [¹⁸F]SFB:n pitäisi reagoida myös matalimmissa (alle 7) pH-arvoissa, vaikka parempia tuloksia on saatu joissakin kokeissa korkeimmilla pH-arvoilla.

TEM-kuvien perusteella voidaan sanoa, että osa viruksista jostain syystä luultavasti hajosi tehtäessä leimauksia, vaikka CCMV-virusten pitäisi kestää paljon haastavampia olosuhteita kuin niitä, joita tässä kokeessa käytettiin. Kuvasta 28 nähtiin selvästi, että virusliuoksessa oli joitakin sinne kuulumattomia pieniä partikkeleita, luultavasti hajonneita viruspartikkeleita, mikä osittain selittäisi virusten huonoa leimautuvuutta.

Luultavasti jollakin keinoin onnistuttaisiin virukset leimaamaan, jos tehtäisiin jatkokokeita. Virukset leimautuivat kuitenkin boraattipuskurissa tehdyssä leimauksessa sen verran voimakkaasti, että olisi luultavaa löytää sellaiset olosuhteet, jossa virusten leimautuminen onnistuisi toistettavasti. Leimausliuosten pH:ta tuskin pystyisi enää nostamaan ilman, että se rikkoisi virukset, sillä jo pH:n ollessa 8 ne turposivat suhteellisen paljon verrattuna matalampaan pH:seen. Kevyt virus-/reaktioseoksen lämmittäminen ja sekoittaminen voisi auttaa virusten leimautuvuuteen. Kirjallisuudesta löytyy peptidien leimauksesta esimerkkejä, joissa seos on lämmitetty noin 50 °C asteeseen ja inkubointiajat ovat olleet pidempiä, noin 30 min. Virusten pitäisi kestää kevyt lämmittäminen, joten tämä voisi olla kokeilemisen arvoinen tapa. Myös mahdollisesti jollain toisella ¹⁸F-leimatulla prosteettisella ryhmällä leimaaminen voisi onnistua paremmin. Pitäisi löytää sellainen prosteettinen ryhmä, joka soveltuisi leimauksiin esim. pH 7:ssä, jolloin virukset eivät välttämättä kärsisi vahinkoa leimauksen aikana.

12. Kirjallisuus

1. Le Bars, D. 2006, Fluorine-18 and medical imaging: Radiopharmaceuticals for positron emission tomography, *Journal of Fluorine Chemistry*, vol. 127, no. 11, pp. 1488-1493.
2. Granov Anatoliy, Tiutin Leonid, Schwarz Thomas (ed) 2013, *Positron Emission Tomography*, Springer Heidelberg Dordrecht London New York.
3. Phelps, M.E. (ed) 2004, *PET: Molecular Imaging and Its Biological Applications*, Springer-Verlag, New York.
4. Bolus, N.E., George, R., Washington, J. & Newcomer, B.R. 2009, PET/MRI: The Blended-Modality Choice of the Future?, *Journal of nuclear medicine technology*, vol. 37, no. 2, pp. 63-71.
5. Vallabhajosula, S. 2009, *Molecular Imaging; Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*; s.66-82, Springer- Verlag Berlin Heidelberg.
6. Logan, J. 2002; 2005, Strategies for Quantifying Pet Imaging Data from Tracer Studies of Brain Receptors and Enzymes, *Handbook of Radiopharmaceuticals*, John Wiley & Sons, Ltd, , pp. 501-527.
7. Schlyer, D.J. 2002; 2005, Production of Radionuclides in Accelerator, *Handbook of Radiopharmaceuticals* John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1-70.
8. Knapp, F.F.(Jr. & Mirzadeh, S. 1994, The continuing important role of radionuclide generator systems for nuclear medicine, *European journal of nuclear medicine*, vol. 21, no. 10, pp. 1151-1165.
9. Welch, M.J. & McCarthy, T.J. 2000, The Potential Role of Generator-Produced Radiopharmaceuticals in Clinical PE, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 41, no. 2, pp. 315-317.
10. Kilbourn Michael R (ed) 1990, *Fluorine-18 Labeling of Radiopharmaceuticals*, 1st edition, National Academy Press, Washington, D.C.
11. Park, B.K., Kitteringham, N.R. & O'Neill, P.,M. 2001, Metabolism of Fluorine-Containing Drug, *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, vol. 41, no. 1, pp. 443.

12. Gallagher, B.M., Fowler, J.S., Gutterson, N.I., MacGregor, R.R., Wan, C. & Wolf, A.P. 1978, Metabolic Trapping as a Principle of Radiopharmaceutical Design: Some Factors Responsible for the Biodistribution of ^{18}F] 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucos, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 19, no. 10, pp. 1154-1161.
13. Coenen, H.H., Elsinga, P.H., Iwata, R., Kilbourn, M.R., Pillai, M.R.A., Rajan, M.G.R., Wagner Jr., H.N. & Zaknun, J.J. 2010, Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond [^{18}F]FDG for use in oncology and neuroscience, *Nuclear medicine and biology*, vol. 37, no. 7, pp. 727-740.
14. Elsinga, P.H. 2002, Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomograph, *Methods*, vol. 27, no. 3, pp. 208-217.
15. Casella, V., Ido, T., Wolf, A.P., Fowler, J.S., MacGegor, R.R. & Ruth, T.J. 1980, Anhydrous F-18 Labeled Elemental Fluorine for Radiopharmaceutical Preparation, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 21, no. 8, pp. 750-757.
16. Nickles, R.J., Daube, M.E. & Ruth, T.J. 1984, An $^{18}\text{O}_2$ target for the production of [^{18}F]F $_2$, *The International journal of applied radiation and isotopes*, vol. 35, no. 2, pp. 117-122.
17. Guillaume, M., Luxen, A., Nebeling, B., Argentini, M., Clark, J.C. & Pike, V.W. 1991, Recommendations for fluorine-18 production, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes*, vol. 42, no. 8, pp. 749-762.
18. Bergman, J. & Solin, O. 1997, Fluorine-18-labeled fluorine gas for synthesis of tracer molecules, *Nuclear medicine and biology*, vol. 24, no. 7, pp. 677-683.
19. Ruth, T.J. & Wolf, A.P. 1979, Absolute cross sections for the production of fluorine-18 via the $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ reaction, *Radiochimica Acta*, vol. 26, no. 1, pp. 21-4.
20. Hess E., Takacs S., Scholten B., Tarkanyi F., Coenen H.H., Qaim S.M. (2001) Excitation function of the $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ nuclear reaction from threshold up to 30 MeV. *Radiochimica Acta* 89(6):357-362.
21. Solin, O., Bergman, J., Haaparanta, M. & Reissell, A. 1988, Production of ^{18}F from water targets. Specific radioactivity and anionic contaminants, *International Journal of Radiation*

Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes, vol. 39, no. 10, pp. 1065-1071.

22. Cai, L., Lu, S. & Pike, V.W. 2008, Chemistry with [¹⁸F]Fluoride Ion, *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2008, no. 17, pp. 2853-2873.

23. Chirakal, R., Adams, R.M., Firnaeu, G., Schrobilgen, G.J., Coates, G. & Garnett, E.S. 1995, Electrophilic ¹⁸F from a siemens 11 MeV proton-only cyclotron, *Nuclear medicine and biology*, vol. 22, no. 1, pp. 111-116.

24. Kim, D.W., Ahn, D., Oh, Y., Lee, S., Kil, H.S., Oh, S.J., Lee, S.J., Kim, J.S., Ryu, J.S., Moon, D.H. & Chi, D.Y. 2006, A New Class of S_N2 Reactions Catalyzed by Protic Solvents: Facile Fluorination for Isotopic Labeling of Diagnostic Molecules, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, no. 50, pp. 16394-16397.

25. Schlyer, D.J., Bastos, M.A.V., Alexoff, D. & Wolf, A.P. 1990, Separation of [¹⁸F]fluoride from [¹⁸O]water using anion exchange resin, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes*, vol. 41, no. 6, pp. 531-533.

26. Hamacher K., Coenen H.H., Stöcklin G. (1986) Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic-substitution. *Journal of Nuclear Medicine* 27(2):235-238.

27. Block, D., Coenen, H.H. & Stöcklin, G. 1987, The N.C.A. nucleophilic ¹⁸F-fluorination of 1,N-disubstituted alkanes as fluoroalkylation agents, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, vol. 24, no. 9, pp. 1029-1042.

28. Takahashi T, Ido T, Iwata R. (1991) Study of leaving groups for the preparation of [ω-¹⁸F]fluorofatty acids via nucleophilic fluorination and its application to the synthesis of 17-[¹⁸F]fluoro-3-methylheptadecanoic acid. *Applied Radiation and Isotopes*, 42: 801-809.

29. Ding, Y., Shiue, C., Fowler, J.S., Wolf, A.P. & Plenevaux, A. 1990, No-carrier-added (NCA) aryl [¹⁸F]fluorides via the nucleophilic aromatic substitution of electron-rich aromatic rings, *Journal of Fluorine Chemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 189-206.

30. Chakraborty, P.K. & Kilbourn, M.R. 1991, [¹⁸F]fluorination/decarbonylation: New route to aryl [¹⁸F]fluorides, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes*, vol. 42, no. 12, pp. 1209-1213.

31. Snyder SE and Kilbourn MR. (2003) Chemistry of fluorine-18 radiopharmaceuticals. In Handbook of Radiopharmaceuticals, eds. Welch MJ and Redvanly CS. pp. 195-227.
32. Taylor, S.D., Kotoris, C.C. & Hum, G. 1999, Recent advances in electrophilic fluorination, *Tetrahedron*, vol. 55, no. 43, pp. 12431-12477.
33. Block D., Coenen H.H., Laufer P., Stöcklin G. (1986) N.C.A. [¹⁸F]fluoroalkylation via nucleophilic fluorination of disubstituted alkanes and application to the preparation of N-[¹⁸F]-fluoroethylspiperone. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 23(10-12):1042-1044.
34. Bauman, A., Piel, M., Schirmacher, R. & Rösch, F. 2003, Efficient alkali iodide promoted ¹⁸F-fluoroethylations with 2-[¹⁸F]fluoroethyl tosylate and 1-bromo-2-[¹⁸F]fluoroethane, *Tetrahedron letters*, vol. 44, no. 51, pp. 9165-9167.
35. Zhang M. and Suzuki K. (2007) [¹⁸F]Fluoroalkyl agents: Synthesis, reactivity and application for development of PET ligands in molecular imaging. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7(18):1817-1828.
36. Solin, O., Eskola, O., Hamill, T.G., Bergman, J., Lehtikoinen, P., Grönroos, T., Forsback, S., Haaparanta, M., Viljanen, T., Ryan, C., Gibson, R., Kieczykowski, G., Hietala, J., Hargreaves, R. & Burns, H.D. 2004, Synthesis and characterization of a potent, selective, radiolabeled substance-P antagonist for NK1 receptor quantitation: ([¹⁸F]SPA-RQ), *Molecular Imaging & Biology*, vol. 6, no. 6, pp. 373-384.
37. Li, X., Haaparanta, M. & Solin, O. 2012, Oxime formation for fluorine-18 labeling of peptides and proteins for positron emission tomography (PET) imaging: A review, *Journal of Fluorine Chemistry*, vol. 143, no. 0, pp. 49-56.
38. Martarello L., Schaffrath C., Deng H., Gee A.D., Lockhart A., O'Hagan D. (2003) The first enzymatic method for C-18F bond formation: The synthesis of 5'-[¹⁸F]-fluoro-5'-deoxyadenosine for imaging with PET. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 46(13):1181-1189.
39. Knight, J.C., Richter, S., Wuest, M., Way, J.D. & Wuest, F. 2013, Synthesis and evaluation of an ¹⁸F-labelled norbornene derivative for copper-free click chemistry reactions, *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 11, no. 23, pp. 3817-3825.

40. Jacobson, O., Zhu, L., Ma, Y., Weiss, I.D., Sun, X., Niu, G., Kiesewetter, D.O. & Chen, X. 2011, Rapid and Simple One-Step F-18 Labeling of Peptides, *Bioconjugate chemistry*, vol. 22, no. 3, pp. 422-428.
41. Schirmacher R., Wängler C., Schirmacher E. (2007); Recent developments and trends in ^{18}F -radiochemistry: Syntheses and applications. *Mini-Rev Organic Chemistry* 4(4):317-329.
42. O'Hagan, D., Schaffrath, C., Cobb, S.L., Hamilton, J.T.G. & Murphy, C.D. 2002, Biochemistry: Biosynthesis of an organofluorine molecule, *Nature*, vol. 416, no. 6878, pp. 279-279.
43. Bock, V.D., Hiemstra, H. & van Maarseveen, J.H. 2006, CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective, *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2006, no. 1, pp. 51-68
44. Studenov, A.R., Adam, M.J., Wilson, J.S. & Ruth, T.J. 2005, New radiolabelling chemistry: synthesis of phosphorus [^{18}F]fluorine compounds, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, vol. 48, no. 7, pp. 497-500.
45. Ting, R., Adam, M.J., Ruth, T.J. & Perrin, D.M. 2005, Arylfluoroborates and Alkylfluorosilicates as Potential PET Imaging Agents: High-Yielding Aqueous Biomolecular ^{18}F -Labeling, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, no. 38, pp. 13094-13095.
46. D. E. Olberg and O. K. Hjelstuen 2010, Labelling Strategies of Peptides with ^{18}F for Positron Emission Tomography in *Current Topics in Medicinal Chemistry Norsk medisinsk syklotronsenter AS*, Oslo, Norway, pp. 1669-1679.
47. Okarvi, S.M. 2001, Recent progress in fluorine-18 labelled peptide radiopharmaceuticals, *European journal of nuclear medicine*, vol. 28, no. 7, pp. 929.
48. Ogawa, M., Hatano, K., Oishi, S., Kawasumi, Y., Fujii, N., Kawaguchi, M., Doi, R., Imamura, M., Yamamoto, M., Ajito, K., Mukai, T., Saji, H. & Ito, K. 2003, Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo $\alpha\beta_3$ integrin related tumor imaging, *Nuclear medicine and biology*, vol. 30, no. 1, pp. 1-9.
49. Kuchar, M., Pretze, M., Kniess, T., Steinbach, J., Pietzsch, J. & Laser, R. 2012, Site-selective radiolabeling of peptides by ^{18}F -fluorobenzoylation with [^{18}F]SFB in solution and on solid phase: a comparative study, *Amino acids*, vol. 43, no. 4, pp. 1431-1443.

50. Hultsch, C., Schottelius, M., Auernheimer, J., Alke, A. & Wester, H. 2009, ^{18}F -Fluoroglucosylation of peptides, exemplified on cyclo(RGDfK), *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 36, no. 9, pp. 1469-1474.
51. Vaidyanathan, G. & Zalutsky, M.R. 1992, Labeling proteins with fluorine-18 using N-succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, vol. 19, no. 3, pp. 275-281.
52. Tang, G., Zeng, W., Yu, M. & Kabalka, G. 2008, Facile synthesis of N-succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate (^{18}F SFB) for protein labeling, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, vol. 51, no. 1, pp. 68-71.
53. Zhang, X., Cai, W., Cao, F., Schreibmann, E., Wu, Y., Wu, J.C., Xing, L. & Chen, X. 2006, ^{18}F -Labeled Bombesin Analogs for Targeting GRP Receptor-Expressing Prostate Cancer, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 47, no. 3, pp. 492-501.
54. Indrevoll, B., Kindberg, G.M., Solbakken, M., Bjurgert, E., Johansen, J.H., Karlsen, H., Mendizabal, M. & Cuthbertson, A. 2006, NC-100717: A versatile RGD peptide scaffold for angiogenesis imaging, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 16, no. 24, pp. 6190-6193.
55. Gao, H., Niu, G., Yang, M., Quan, Q., Ma, Y., Murage, E.N., Ahn, J., Kiesewetter, D.O. & Chen, X. 2011, PET of Insulinoma Using ^{18}F -FBEM-EM3106B, a New GLP-1 Analogue, *Molecular Pharmaceutics*, vol. 8, no. 5, pp. 1775-1782.
56. Kolb, H.C., Finn, M.G. & Sharpless, K.B. 2001, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, no. 11, pp. 2004-2021.
57. Hausner, S.H., Marik, J., Gagnon, M.K. & Sutcliffe, J.L. 2008, In Vivo Positron Emission Tomography (PET) Imaging with an $\alpha_v\beta_6$ Specific Peptide Radiolabeled using ^{18}F -“Click” Chemistry: Evaluation and Comparison with the Corresponding 4- ^{18}F Fluorobenzoyl- and 2- ^{18}F Fluoropropionyl-Peptides, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 51, no. 19, pp. 5901-5904.
58. Dirksen, A. & Dawson, P.E. 2008, Rapid Oxime and Hydrazone Ligations with Aromatic Aldehydes for Biomolecular Labeling, *Bioconjugate chemistry*, vol. 19, no. 12, pp. 2543-2548.

59. Cai, W., Olafsen, T., Zhang, X., Cao, Q., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Wu, A.M. & Chen, X. 2007, PET Imaging of Colorectal Cancer in Xenograft-Bearing Mice by Use of an ^{18}F -Labeled T84.66 Anti-Carcinoembryonic Antigen Diabody, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 48, no. 2, pp. 304-310.
60. Tang, G., Tang, X. & Wang, X. 2010, A facile automated synthesis of N-succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate (^{18}F SFB) for ^{18}F -labeled cell-penetrating peptide as PET tracer, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, vol. 53, no. 8, pp. 543-547.
61. Ackermann, U., Yeoh, S.D., Sachinidis, J.I., Poniger, S.S., Scott, A.M. & Tochon-Danguy, H.J. 2011, A simplified protocol for the automated production of succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate on an IBA Synthera module, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, vol. 54, no. 10, pp. 671-673.
62. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K. & Farokhzad, O.C. 2008, Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, vol. 5, no. 4, pp. 505-515.
63. Choi HS, Frangioni JV: Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. *Molecular Imaging*. 2010 Dec;9(6):291-310.
64. Hamoudeh, M., Kamleh, M.A., Diab, R. & Fessi, H. 2008, Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 12, pp. 1329-1346.
65. Longmire, M.R., Ogawa, M., Choyke, P.L. & Kobayashi, H. 2011, Biologically Optimized Nanosized Molecules and Particles: More than Just Size, *Bioconjugate chemistry*, vol. 22, no. 6, pp. 993-1000.
66. Langner, M. & Kral, T.E. 1999, Liposome-based drug delivery systems, *Polish Journal of Pharmacology*, vol. 51, no. 3, pp. 211-222.
67. Kumar, M. 2000, Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, vol. 3, no. 2, pp. 234-258.
68. Liong, M., Lu, J., Kovoichich, M., Xia, T., Ruehm, S.G., Nel, A.E., Tamanoi, F. & Zink, J.I. 2008, Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery, *ACS Nano*, vol. 2, no. 5, pp. 889-896.

69. Fukukawa, K., Rossin, R., Hagooly, A., Pressly, E.D., Hunt, J.N., Messmore, B.W., , K.L.W., M.J.W. & Hawker, C.J. 2008, Synthesis and Characterization of Core-Shell Star Copolymers for In Vivo PET Imaging Applications, *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 4, pp. 1329-1339.
70. Devaraj, N.K., Keliher, E.J., Thurber, G.M., Nahrendorf, M. & Weissleder, R. 2009, ¹⁸F Labeled Nanoparticles for in Vivo PET-CT Imaging, *Bioconjugate chemistry*, vol. 20, no. 2, pp. 397-401.
71. Guerrero, S., Herance, J.R., Rojas, S., Mena, J.F., Gispert, J.D., Acosta, G.A., Albericio, F. & Kogan, M.J. 2012, Synthesis and In Vivo Evaluation of the Biodistribution of a ¹⁸F-Labeled Conjugate Gold-Nanoparticle-Peptide with Potential Biomedical Application, *Bioconjugate chemistry*, vol. 23, no. 3, pp. 399-408
72. Sarparanta, M., Mäkilä, E., Heikkilä T., Salonen, J., Kukk, E., Lehto, V., Santos, H., Hirvonen, J. & Airaksinen, A.J. 2011, ¹⁸F-Labeled Modified Porous Silicon Particles for Investigation of Drug Delivery Carrier Distribution in Vivo with Positron Emission Tomography, *Molecular Pharmaceutics*, vol. 8, no. 5, pp. 1799-1806.
73. Basu, A., Yang, K., Wang, M., Liu, S., Chintala, R., Palm, T., Zhao, H., Peng, P., Wu, D., Zhang, Z., Hua, J., Hsieh, M., Zhou, J., Petti, G., Li, X., Janjua, A., Mendez, M., Liu, J., Longley, C., Zhang, Z., Mehlig, M., Borowski, V., Viswanathan, M. & Filpula, D. 2006, Structure-function engineering of interferon-beta-1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation, *Bioconjugate chemistry*, vol. 17, no. 3, pp. 618-630.
74. Manchester, M. & Singh, P. 2006, Virus-based nanoparticles (VNPs): Platform technologies for diagnostic imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, no. 14, pp. 1505-1522.
75. Pokorski, J.K. & Steinmetz, N.F. 2011, The Art of Engineering Viral Nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, vol. 8, no. 1, pp. 29-43.
76. http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/virusten_rakenne/
77. Knipe, D.M, Howley, P.M (ed) 2007, *Fields Virology*, 5th edn, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

78. Hemminga, M.A., Vos, W.L., Nazarov, P.V., Koehorst, R.B.M., Wolfs, C.J.A.M., Spruijt, R.B. & Stopar, D. 2010, Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages, *European Biophysics Journal*, vol. 39, no. 4, pp. 541-550.
79. <http://www.viperdb.scripps.edu>
80. Tama, F. & Brooks III, C.L. 2002, The Mechanism and Pathway of pH Induced Swelling in Cowpea Chlorotic Mottle Virus, *Journal of Molecular Biology*, vol. 318, no. 3, pp. 733-747.
81. Speir, J.A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T.S. & Johnson, J.E. 1995, Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy, *Structure*, vol. 3, no. 1, pp. 63-78.
82. Strable, E. & Finn, M.G. 2009, Chemical Modification of Viruses and Virus-Like Particles in eds. M. Manchester & N. Steinmetz, Springer Berlin Heidelberg, , pp. 1-21.
83. Wu, Y., Yang, H. & Shin, H. 2013, Viruses as self-assembled nanocontainers for encapsulation of functional cargoes, *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 30, no. 7, pp. 1359-1367.
84. Soto, C.M. & Ratna, B.R. 2010, Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology, *Current opinion in biotechnology*, vol. 21, no. 4, pp. 426-438.
85. Kasper, J., Hermanns, M., Bantz, C., Koshkina, O., Lang, T., Maskos, M., Pohl, C., Unger, R. & Kirkpatrick, C.J. 2013, Interactions of silica nanoparticles with lung epithelial cells and the association to flotillins, *Archives of Toxicology*, vol. 87, no. 6, pp. 1053-1065.
86. Domingos, R.F., Baalousha, M.A., Ju-Nam, Y., Reid, M.M., Tufenkji, N., Lead, J.R., Leppard, G.G. & Wilkinson, K.J. 2009, Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes, *Environmental science & technology*, vol. 43, no. 19, pp. 7277-7284.
87. Mueller, W., Koynov, K., Fischer, K., Hartmann, S., Pierrat, S., Basche, T. & Maskos, M. 2009, Hydrophobic Shell Loading of PB-b-PEO Vesicles, *Macromolecules*, vol. 42, no. 1, pp. 357-361.
88. Benson, H. 1996, *University Physics*, New York.

89. <http://barrett-group.mcgill.ca/tutorials/nanotechnology/nano02.htm>

90. Filella, M., Zhang, J., Newman, M.E. & Buffle, J. 1997, Analytical applications of photon correlation spectroscopy for size distribution measurements of natural colloidal suspensions: capabilities and limitations, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 120, no. 1–3, pp. 27-46.

