



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Peptidipohjaiset radiomerkkiaineet teranostiikassa

Kristina Tarson

Radiofarmaseuttinen kemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

24.3.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä: Kristina Tarson

Otsikko: Peptidipohjaiset radiomerkkiaineet teranostiikassa

Ohjaaja: Prof. Anu Airaksinen

Sivumäärä: 21 sivua + 3 sivua kirjallisuusviitteet

Päivämäärä: 24.3.2025

Tutkielman tavoite on tutustua peptidipohjaisten radiomerkkiaineiden synteesien menetelmiin sekä sovelluksiin teranostiikassa. Tutkielma käsittelee fluori-18 radioleimattujen peptidien roolia syövän kuvantamisessa positroniemissiotomografiassa (PET) ja terapiassa tai hoidossa sekä yhdisteiden synteesiä ja analyysiä.

Ensiksi tutkielmassa tarkastellaan positroniemission tomografian periaate ja peptidien kemia teoreettisen osuuden kannalta. Tutkielmassa käsitellään myös kokeellista osuutta, joka on keskittynyt synteesien tarkasteluun ja analysointiin. Lopullinen osuus keskittyy peptidien teranostistisiin sovelluksiin uusimpien tutkimusten perusteella.

Peptidit ovat lyhyitä proteiineja, jotka käytetään aktiivisesti sairauksien diagnostiikassa ja hoidossa. Peptideillä on keskeinen merkitys syövän hoidossa ja diagnostiikassa, koska ne pystyvät sitoutumaan spesifisesti syöpäsolujen reseptoreihin ja voivat antaa tarkemman tuloksen PET kuvantamisessa.

Teranostiikka on lääketieteellinen lähestymistapa. Teranostiikka perustuu saman molekyylin leimaamiseen sekä diagnostisella että hoitavalla isotoopilla. Tämä tapahtuu merkitsemällä peptidimolekyylille sekä diagnostisella että terapeuttisella isotoopilla. Positroniemissiotomografia (PET) on tärkeä tekniikka tässä prosessissa, sillä se mahdollistaa tarkat kuvat syöpäsoluista hyödyntäen radiomerkittyjä peptidejä.

Radioleimattujen peptidien etu on niiden pieni molekyyli paino, mikä johtaa nopeaan poistumiseen verenkierrosta ja ei-toivotuista kudoksista. Tämä ominaisuus parantaa kohteen ja ei-kohteen välistä kontrastia kuvantamisessa, mikä on erityisen tärkeää syövän diagnosoinnissa ja hoidossa. Lisäksi peptidit kykenevät tunkeutumaan kudoksiin tehokkaasti ja sitoutuvat kohdesolujen reseptoreihin, mikä lisää niiden tarkkuutta ja tehokkuutta.

Avainsanat: teranostiikka, peptidi, PET kuvantaminen, radiomerkkiaine

Sisällys

1.	Johdanto	5
1.1	Positronin emissio ja annihilaatio	6
1.2	Positroniemissiotomografia eli PET.....	7
1.3	PET kuvantamisen sovellukset.....	8
2.	Peptidit PET kuvantamisessa.....	9
2.1	Mikä on peptidi.....	9
2.2	Radioleiman paikka peptideissä	10
2.3	Käytettyjä analyysimenetelmiä ja karakterisointi – HPLC	11
3.	¹⁸ F -radiokemian peptidien radioleimausmenetelmiä	12
3.1	Johdanto	12
3.2	Radiofluoraus klassisen prosteettisen ryhmäkemian avulla ¹⁸ F:n radioleimaus	13
3.3	¹⁸ F -radioleimaus peptidien kanssa [¹⁸ F]fluori-akseptorikemian avulla.....	15
3.4	Klik-kemia peptidien ¹⁸ F-radioleimaukseen	17
4.	Peptidien teranostiset sovellukset	19
4.1	Radioleimattujen peptidien kliiniset sovellukset.....	19
4.2	Peptidien käytön haasteet ja rajoitteet	22
5.	Johtopäätökset ja yhteenveto	24
6.	Kiitokset.....	25

Lyhenneluettelo

FDG – [¹⁸F]-fluorodeoksiglukoosi

[¹⁸F]NFP – 4-Nitrophenyl-2-[¹⁸F]fluoropropionaatti (engl. 4-Nitrophenyl-2[¹⁸F]fluoropropionate)

[¹⁸F]FBA – 4-[¹⁸F]Fluoribentsoehappo (engl. 4-[¹⁸F]Fluorobenzoic acid)

[¹⁸F]SFB – N-Sukkinimidyyli-4-[¹⁸F]fluoribentsoehappo (engl. N-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorobenzoic acid)

[¹⁸F]FBAM – N-[6-(4-[¹⁸F]Fluoribentsylideeni)amino-oksialkyyli]maleimidi (engl. N-[6-(4-[¹⁸F]Fluorobenzylidene)aminooxyhexyl]maleimide)

[¹⁸F]FBEM – N-[2-[4-[¹⁸F]Fluoribentsoamido)etyyli]maleimide (engl. N-[2-[4-[¹⁸F]Fluorobenzamido)ethyl]maleimide)

[¹⁸F]FDG-MHO – FDG-maleimidiheksyylioksiimi (engl. FDG-maleimidehexyloxime)

[¹⁸F]ArBF₃ – aryltrifluoroboraatti (engl. aryltrifluoroborate)

AMB[¹⁸F]F – alkyylammoniometyylitrifluoroboraatti (engl. alkyllammoniomethyltrifluoroborate)

Al[¹⁸F]F NOTA-Bn-*p*NCS – S-2-(4-isotiosyanaatobentyli)-1,4,7-triasasyklononaani-1,4,7-triaketikahappo (engl. S-2-(4-isothiocyantobenzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid)

Al[¹⁸F]F NOTA – Pentetiinihappo 1,4,7-triasasyklononaani-N,N',N''-triaketikkahappo (engl. pentetic acid 1,4,7-triazacyclononane- N,N',N''-triacetic acid)

1. Johdanto

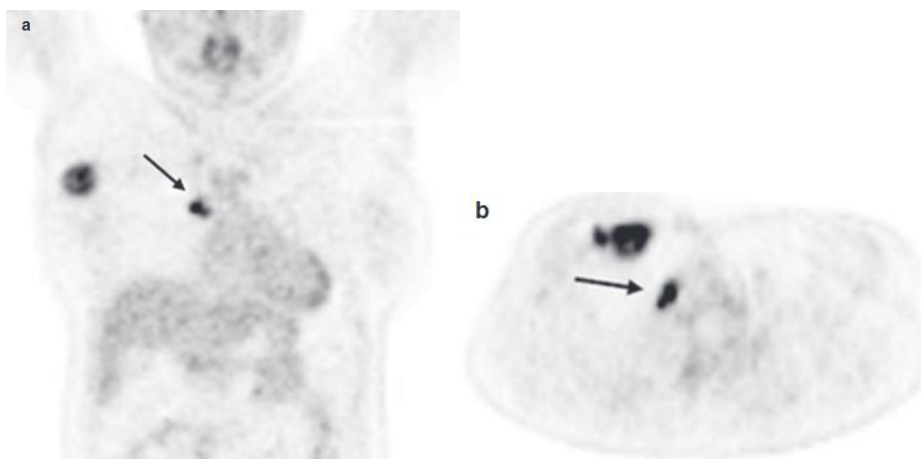
Isotooppilääketiede on lääketieteellinen ala, jossa sovelletaan radionuklideja lääketieteellisiin tarpeisiin. Isotooppilääketieteessä käytetään ainutlaatuisia radioaktiivisten alkuaineiden ominaisuuksia. Radioaktiivisilla alkuaineilla on omia fysikaalisia ominaisuuksia jotka puuttuvat stabiileista alkuaineista. Kuitenkin saman alkuaineen radioaktiivisella ja stabiililla isotoopilla on samat kemialliset ominaisuudet. Kullakin radionuklidilla on sille ominainen puoliintumisaika kun radionuklidi hajoaa emittoimalla partikkeleita kuten positroneja tai elektromagneettista säteilyä, kuten gamma säteily. [1]

Radioleimattuja molekyyliä nimetään termillä radiolääkeaine[2]. Radiolääkeaineina voivat toimia radioleimatut sokerit, oligonukleotidit tai peptidit. Tässä tutkielmassa meitä erityisesti kiinnostaa peptidipohjaiset radiolääkeaineet, joihin tutustutaan tarkemmin.

Peptidejä käytetään aktiivisesti lääketieteellisyydessä. Peptidit ovat lyhyitä aminohappoketuja, jonka takia niillä on pieni molekyylipaino. Se mahdollistaa nopean poistumisen verestä sekä ei-kohdekudoksista.

Nykypäivänä radiokemiassa ja ylipäättään radiofarmaseuttisella alalla on käytössä modernia teknologiaa. Ydinreaktorit, hiukkaskiihdyttimet ja säteilyilmaiset ovat keskeisessä käytössä radiofarmaseuttisia yhdisteitä valmistettaessa ja kehitettäessä. Isotooppikuvantaminen on yksi keino, jota käytetään useasti lääketieteessä.

Isotooppikuvantaminen on tärkeä keino kliinisessä diagnostiikassa, jota käytetään ympäri maailmaa. Isotooppikuvantamisen avulla pystytään havaitsemaan syöpä jo alkuvaiheessa sekä hoitamaan syöpää ja muita sairauksia. Syövän detektoinnissa on useasti käytetty merkkiaine on glukoosi [^{18}F]-fluorodeoksiglukoosi (FDG) [3] (kuva 1 [34])

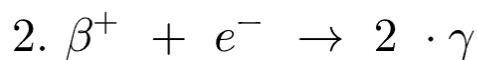
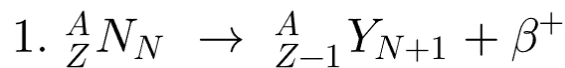


Kuva 1: Rintasyövän [^{18}F]fluorodeoksiglukoosi-PET osoittaa taudin leviämisen pieniin välikarsinainusolmukkeisiin Kuva a. on koronaalinen PET-kuva FDG:n alueellisesta kertymästä; b. aksiaalinen PET-kuva. Kuva on viitteestä 34

1.1 Positronin emissio ja annihilaatio

Positroniemissiotomografia perustuu β^+ -hajoamiseen. β^+ -hajoaminen tapahtuu, kun epästabiilin atomin ytimen protoni muuttuu neutroniksi. Samaan aikaan positroni ja neutriino emittoituvat. Näin ollen tytärytimen massaluku on sama kuin emoytimen, mutta järjestysluku pienenee yhdellä.

Positroni on itsestään antimaterian hiukkanen. Sen takia se vuorovaikuttaa elektronin kanssa eli toisin sanoen tapahtuu annihilaatio, jossa positronin ja elektronin massa muuttuu energiaksi. Annihilaatio tapahtuu aina, kun positroni emittoidaan β^+ -hajoamisessa ja se törmää atomin tai molekyylin ulkokuorella olevan elektronin kanssa. Annihilaatiossa energia vapautuu kahtena gammafotonina (γ) 511 keV, jotka emittoituvat 180 asteeseen vastakkaisiin suuntiin (kuva 2) [4].



Kuva 2: Yleinen kaava positronihajoamisessa (1) ja positronin ja elektronin annihilaatio, jonka seurauksena vapautuu energiaa (511 keV)(2)

Kahden hiukkasen massa muuttuu energiaksi $E=mc^2$. Elektronin massa on $m_e = 9.109383 \cdot 10^{-28} \text{ g} = 0.00054858 \text{ u}$ ja energia on $E_e = 510.9989 \text{ keV}$, jolloin saadaan yhteensä annihilaatiossa vapautuneeksi energiaksi: $2 \cdot 510.9989 \text{ keV} = 1.0219978 \text{ MeV}$ (taulukko 1). Energia vapautuu kahtena fotonina sähkömagneettisessa vuorovaikutuksessa.

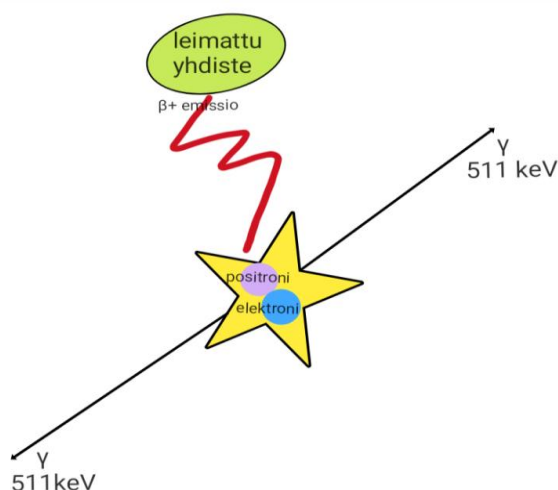
Taulukko 1: Elektronin, protonin ja neutronin yleisimmät ominaisuudet viitteestä 34

Hiukkanen	q	m		
		kg	u	MeV
Elektroni	$-1.602 \cdot 10^{-19}$	$9.109 \cdot 10^{-27}$	0.00055	0.511
Protoni	$+1.602 \cdot 10^{-19}$	$1.673 \cdot 10^{-27}$	1.00728	938.272
Neutroni	0	$1.675 \cdot 10^{-27}$	1.00867	939.566

1.2 Positroniemissiotomografia eli PET

Nykypäivänä PET kuvausta käytetään yleisesti kliinisessä lääketieteessä. PET eli positroniemissiotomografia perustuu kahden samalla suoralla olevan 511 keV:n gammasäteen koinsidenssi-ilmaisuun, jotka johtuvat positronien ja elektronin annihilaatiosta.

Potilas asetetaan PET-laitteeseen sen jälkeen, kun hänelle on injektoitu radioaktiivista ainetta sisältävä lääketta. PET:n detektorit detektoivat annihilaatiosta muodostuneet samanlaisten gammafotonien pareja (511 keV). Havaitut samanlaisten fotonien parit tallennetaan matriiseihin. (kuva 3) [5]. Näin saadaan kuva kehon tutkittavasta alueesta.



Kuva 3: Annihilaatiosta muodostuneiden gamma fotonien (511 keV) detektointi PET-kuvantamisessa.

On tyypillistä, että PET kuvantamista varten käytetään lyhytikäisiä radioisotooppeja, jotka valmistetaan syklotronilla. Syklotroni on hiukkaskiihdytin, joka pystyy tuottamaan korkean kineettisen energian protoni- tai deuteronisäteitä. Yleisimmät radioisotoopit, joita käytetään radiolääketeollisuudessa ovat ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O ja ^{13}N [6]

Taulukko 2. PET:ssä yleisten käytettyjen radioisotooppien fysikaalisia ominaisuuksia.

Radioisotooppi	Puoliintumisaika, $t_{1/2}$, (min)	E_{\max} (MeV)	Reaktion tuote
^{18}F	109,8	0,64	^{18}O
^{11}C	20,4	0,97	^{11}B
^{15}O	2,04	1,74	^{15}N
^{13}N	9,97	1,20	^{13}C

1.3 PET kuvantamisen sovellukset

Lääketeollisuudessa on lukuisia sovelluskohteita PET:lle. Positroniemissiotomografia on yksi esimerkki menetelmistä, joka voi tuottaa fysiologista tietoa, joka on välttämätön syövän diagnostiikassa kudosaineenvaihdunnan muuttumisen perusteella ja hoidon vaikutuksen seuraamiseen kudosaineenvaihdunnassa.

PET-kuvantamisella voidaan tutkia lääkkeiden kinetiikkaa ja dynamiikkaa molekyylivuorovaikutusten tasolla [7]. Isotooppilääketiede tarjoaa tietoa alueellisista molekulaarisista vuorovaikutuksista *in vivo*. Menetelmän tarkkuus ja herkkyys ovat verrattavissa radioimmunomäärityksellä tehtäviin kehon nesteitä koskeviin tutkimuksiin (*in vitro* diagnostiikka). Usein se pystyy auttamaan havaitsemaan poikkeavuuksia kehossa ennen kuin syöpä alkaa kehittyä huomattavasti, toisin sanoen ennen kuin laajoja rakenteellisia muutoksia on tapahtunut. [8]

Kirjallisuuskatsauksessa esitellään yleisimmät PET-tutkimusten käyttökohteet. Käyttökohteita ovat:

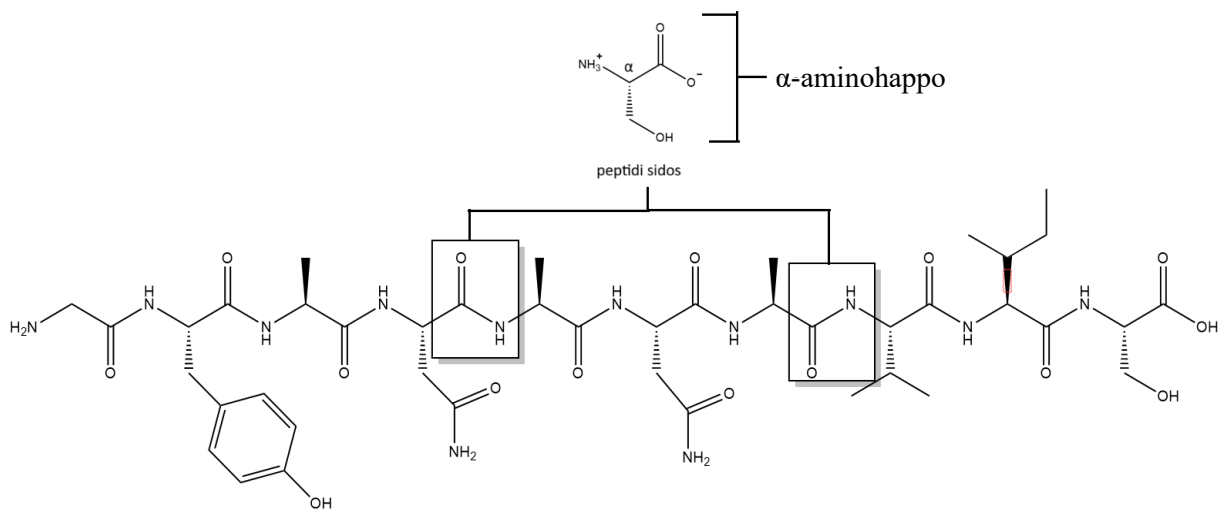
1. Syövän diagnostiikka ja hoito on yksi yleisimmistä syistä käyttää PET kuvantamista. Kuvantamisen avulla voidaan todeta pahanlaatuinen kasvain sekä tarkentaa syövän levinneisyysarviointia. PET kuvantamista käytetään uusiutuneen syövän diagnostiikassa ja hoitotarpeen arvioinnissa.
2. Neurologiset sovellukset. PET kuvantamista voidaan hyödyntää myös epilepsian diagnosoinnissa ja hoidon suunnittelussa. Dementia voidaan myös tunnistaa PET:n avulla.
3. Kardiologiset sovellukset. Yksi yleisimmistä syistä käyttää PET:a kardiologiassa on sydänlihaskemian tunnistamista varten, lisäksi PET:a voidaan hyödyntää sydänlihaksen elinkelpoisuuden arvioinnissa. [9]

2. Peptidit PET kuvantamisessa

Tässä luvussa käsitellään peptidien pääpiirteitä. Miten valitaan peptidi radiolääkeaineen kehittämiseen. Lisäksi käsitellään peptidien syntetisointiprosessia, radioleimausta ja erityisesti tässä tutkielmassa kiinnostavaa fluori-18:n leimausta sekä karakterisointia HPLC:n avulla. Tämän luvun päätavoite on tunnistaa, mitkä ovat yleisimmät strategiat, joiden kautta radioleimatut peptidit päässevät kliiniseen vaiheeseen.

2.1 Mikä on peptidi

Peptidipohjaisia radiolääkkeitä käytetään diagnostisiin ja terapian sovelluksiin. Peptidit ovat lyhyitä aminohappoketjuja, jossa aminohapot ovat kiinni toisissaan peptidisidoksen kautta eli amidisidoksen kautta (kuva 4). Peptidit ovat lyhyitä ja niillä on suhteellisesti pieni molekyyliaino, kooltaan ne ovat n. 5 ja 100 aminohapon välillä ja pituudeltaan n. 0,5 - 10 kDa. Peptideillä on korkea kasvaimen penetraatio ja yleensä suotuisa farmakokineettinen profiili. [11]



Kuva 4: yleinen α -aminohapoista koostuvan peptidin rakenne

Peptidien biokemialliseen käyttäytymiseen vaikuttaa niiden lipofiilisyytensä. Suurin osa tärkeimmistä biologisista aminohapoista on joko hydrofobisia tai polaarisesti neutraaleja, ja harvemmat ovat kationisia tai anionisia (taulukko 3). Hydrofobiset ja hydrofiiliset voimat ovat keskeisiä peptidi-proteiinivuorovaikutuksessa. Tietyt lyhyet aminohappoketjut voivat sitoutua hyvin selektiivisiin kohtiin. Esimerkiksi tripeptidi RGD (Arg-Pro-Lys) mahdollistaa peptidin adheesion integriinireseptoreihin. Toinen esimerkki on PRK (Arg-Gly-Asp), joka edistää fagosytoosia. [30]

Taulukko 3: Aminohappojen luokittelu niiden ominaisuuksien mukaan fysiologisessa pH:ssa.

Hydrofobinen	Ala, Leu, Ile, Val, Pro, Phe, Trp
Polaarisesti neutraali	Ser, Thr, Tyr, Asp, Gln, Gys
Positiivisesti varattu	Lys, Arg, ? His
Negatiivisesti varattu	Asp, Glu
? Gly	

Peptidiä on helppo syntetisoida erittäin puhtaina kustannustehokkaalla tavalla, näin niitä pystytään muokkaamaan ja optimoimaan niiden farmakokineettisten ominaisuuksien parantamiseksi. Suurin osa peptideistä on ei-immunogeenisiä (non-immunogenic) ja niillä on lyhyt *in vivo* kiertoaika. Se on tärkeä ominaisuus, kun puhutaan lääkkeistä, koska se tarkoittaa, että peptidipohjaiset lääkkeet poistuvat nopeasti verestä ja muista ei-kohde kudoksista. Nopea poistuminen verestä ja ei-kohdekudoksista varmistaa optimaalisen kohde-tausta suhteen, joka on tärkeä määre lääketeollisuudessa. Kohde-tausta suhde on kvantitatiivinen suhde, jonka avulla pystytään mittaamaan lääkkeen suhteellinen turvallisuus yliannostusriskiä kohti.

Lisäksi peptidit ovat soveltuvia radioleimauksiin ja radiofarmaseuttisiin tarkoituksiin. Yhdessä nämä ominaisuudet tekevät peptideistä hyvin suosittua ja lupaavaa vaihtoehtoa lääketeollisuuden kannalta. [12]

2.2 Radioleiman paikka peptideissä

Radioleimattujen peptidien kehittämisessä sekä diagnostiin että terapeuttisiin käyttötarkoituksiin on tärkeä kiinnittää huomiota siihen, että radioleimattu yhdiste poistuu verenkierrosta nopeasti. Yhdisteen tulisi kulkeutua ja kondnetua kohdekudokseen nopeasti ja samalla poistua nopeasti muualta elimistöstä. Näin voidaan saavuttaa korkeakohde-tausta-suhde kohde-elimessä. Kun kyse on perinteisestä lääkekehityksestä, yhdisteen kudoslukalisointi ei ole merkittävä tekijä. Radiofarmaseuttisessa kemiassa se on kuitenkin hyvin tärkeä ja kriittinen tekijä, kun halutaan yhdisteen sitoutuvan ja toimivan vain jossain tietyssä kohde-elimessä. Tämä ominaisuus on välttämätön kuvantamisen että muiden terapeuttisten sovellusten kannalta. Siksi on radiolääkkeiden kehitys eroaa perinteisestä lääkekehityksestä. Radiofarmaseuttisen lääkekehityksen päätavoitteena on maksimoida kohde-elimien signaali ja samalla minimoida sitoutumista ei-kohde-eliimiin tai ei-kohde-kudoksiin.

On otettava huomioon useita tekijöitä kehitettäessä peptidipohjaisia radiolääkkeitä. Peptidien tutkiminen on edistynyt peptidien suunnittelun, rakenneanalyysin, karakterisoinnin sekä synteesis menetelmien kehittyessä. Nämä edistykset ovat helpottaneet haluttujen peptidipohjaisten radiolääkkeiden saavuttamista. Peptidejä on helppo muokata, ja niiden monipuoliset käyttökohteet tekevät niistä kiinnostavia tutkimuskohteita radiofarmaseuttisen kemian kehityksessä.

Peptidipohjaisilla radiolääkkeillä voidaan modifioida kemiallisia ominaisuuksia, kuten lisäämällä hydrofiilisyyttä, mikä vähentää maksan kertymistä. Toinen vaihtoehto on plasman proteiineihin sitoutumisen vähentäminen muuttamalla aminohappokoostumusta.

Radioleiman paikka peptideissä on erittäin tärkeä, koska radionuklidin lisääminen voi vaikuttaa yhdisteen käyttäytymiseen, kuten sen selektiivisyyteen tai sitoutumisaffiniteettiin. Usein nuklidit kiinnitetään peptideihin bifunktionaalisen osan avulla. Bifunktionaalinen osa tarkoittaa sitä, että nuklidi pystyy samanaikaisesti sitomaan radionuklidin ja kiinnittymään peptidiin.

Radioleimattu osa voi muuttaa yhdisteen kemiallisia ja fysikaalisia ominaisuuksia sekä sitoutumiskäyttäytymistä verrattuna alkuperäiseen peptidiin ilman radioleimattua osaa. Vaikutukset voivat olla pieniä sivuvaikutuksia, kuten esimerkiksi muutoksia erittymisnopeudessa tai merkittäviä vaikutuksia kuten muutokset selektiivisyydessä tai affiniteetissa. [29]

2.3 Käytettyjä analyysimenetelmiä ja karakterisointi – HPLC

Radio-HPLC on kvantitatiivinen työkalu ja analyttinen tekniikka, jonka avulla on mahdollista tunnistaa ja erottaa seoksen komponentit. Radiofarmaseuttinen yhdiste ruiskutetaan erottelemaan kolonniin. On olemassa erilaisia kolonneja, jotka voivat olla joko normaalifaasi tai käänteisfaasikolonneja. Seuraavaksi eluoidaan sopivalla liikkuvalla faasilla, joka pumpataan sopivan kolonnin läpi.

Korkea paine ja oikein valittu kolonni tarjoavat erinomaisen mahdollisuuden erottaa yhdisteseoksen tuotteet. Radio-HPLC laite on varustettu ilmaisimilla, jotka mittaavat sekä UV absorbanssia, että näytteen radioaktiivisuutta, joka mahdollistaa radiofarmaseuttisten yhdisteen kemiallisen ja radiokemiallisen puhtauden määrittämisen. Kemiallista pitoisuutta tarkistetaan UV-detektorilla. Radioaktiivinen signaali voidaan kvantitoida tuikekiteellä tai PIN-diodiilmaisimilla ja käyttää radiokemiallisen puhtauden määrittämiseen radioaktiivisesta näytteestä sekä korkealla että alhaisella aktiivisuustasolla.

3. ^{18}F -radiokemian peptidien radioleimausmenetelmiä

3.1 Johdanto

Fluori on yksiarvoinen atomi, joka muodostaa vahvan kovalenttisen sidoksen hiilen kanssa. Kun fluori sitoutuu hiileen kovalenttisesti, fluoriatomin van der Waalsin säde on suurempi kuin vetyatomin. Fluoriatomin van der Waals säde on 1,47 Å, kun taas vetyatomin on 1,2 Å. Sitä huolimatta fluoriatomi vie vähemmän tilaa kuin metyyli-, amino-, tai hydroksyyli-ryhmä. [15]

Seuraavaksi käsitellään fluorin kemiallisia ominaisuuksia. Fluori on halogeeni ja se sijaitsee alkuaineiden jaksollisen järjestelmän seitsemännessä pääryhmässä toisessa jaksossa. Siten fluorilla on korkein hapetuspotentiaali ja se on myös jaksollisen järjestelmän elektronegatiivisin alkuaine. Sen seurauksena fluorin lisääminen molekyyliin vaikuttaa molekyylin fysikaalisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin. Fluorin läsnäolo molekyyliin voi muuttaa lähellä olevien happamien ja emäksisten funktionaalisten ryhmien pKa-arvoja muutamalla log-yksiköillä. Lisäksi yhdisteen emäksisyyttä voi vähentää korvaamalla vetyatomi fluorilla. Fluorin korkean elektronegatiivisuuden vuoksi sillä on elektronivetoinen vaikutus, joka heikentää molekyylin emäksisyyttä. Seurauksena molekyylin lipofiilisyyttä lisääntyy ja sen *in vivo* jakaumaprofiili muuttuu.

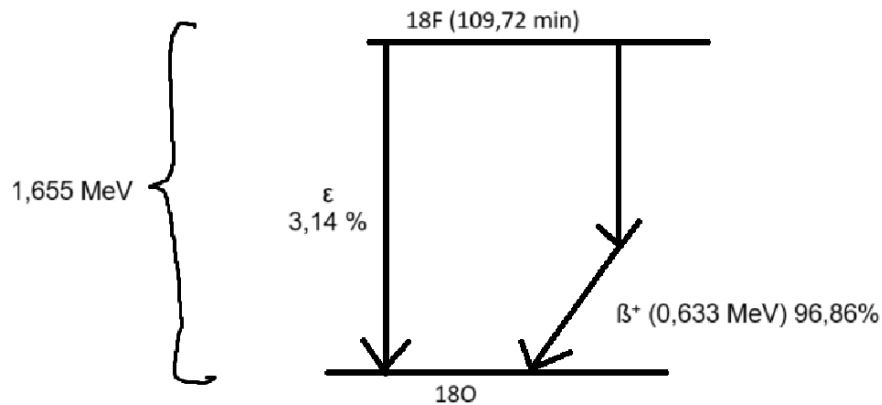
Substituutio fluorilla voi myös parantaa yhdisteen sitoutumisaffiniteettia tiettyyn kohteeseen. Lisäksi se voi parantaa yhdisteen metabolista pysyvyyttä eli stabiilisuutta estämällä metabolisesti labiileja kohtia. Näitä vaikutuksia aktiivisesti hyödynnetään lääkekehityksessä kehittämällä ^{18}F -leimattuja radiomerkkiaineita. Endogeeniset yhdisteet kuten aminohapot, sokerit tai rasvahapot eivät luonnollisesti sisällä fluoria, mutta fluori-18:n lisääminen näihin yhdisteisiin voi vaikuttaa niiden farmakologiseen käyttäytymiseen. [16]

1900-luvulla A.H. Snell syntetisoi radioaktiivista isotooppia ensimmäistä kertaa. Nykyään fluori-18 on yksi ylemmistä radionuklideista radiofarmaseuttisessa kemiassa ja sitä laajasti käytetään radionuklidina PET kuvantamisessa.

Positroneja emittoiva radiohalogeeni fluori-18 on suosittu tutkimuskohde radiokemiassa sen radioisotoopin fysikaalisten ja ydinominaisuuksien vuoksi. Fluori-18 hajoaa ^{18}O :ksi noin 110 minuutin puoliintumisajalla. Tämä puoliintumisaika mahdollistaa monivaiheisia synteettisiä leimausreaktioita. [10]

Fluori-18:n suuri positronien osuus (97 %) ja positronien pieni energia, joka on 0,64 MeV on erityisen edullinen erottelukyvyn ja dosimetrian kannalta. (Kuva 5) Fluori-18:n lyhyt positronin lineaarinen kantama kudoksessa (2,3 mm) antaa korkeimman resoluution PET-kuvat kaikista saatavilla olevista positroni emittoitavista aineista. [4] Korkea prosenttiosuus β^+

hajoamistuotteilla tarkoittaa sitä, että ytimen hajotessa emittoituu paljon positroneja, mikä lisää kuvantamisen herkkyyttä.



Kuva 5: ^{18}F :n puoliintumisaika

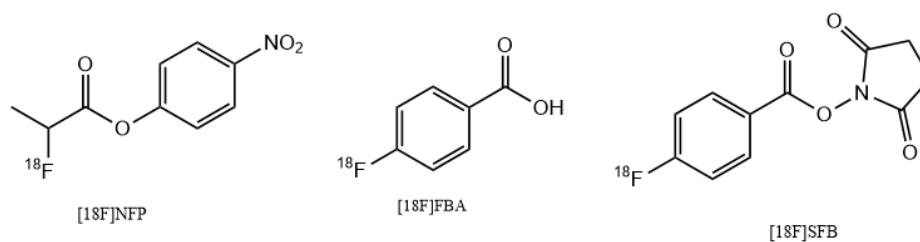
3.2 Radiofluoraus klassisen prosteettisen ryhmäkemian avulla ^{18}F :n radioleimaus

Prosteettinen ryhmä on ei-peptidinen tai ei-proteiiniosa, joka konjugoidaan biomolekyyliin kuten proteiineihin. Tämä menetelmä sisältää ^{18}F -leimatun ryhmän liittämisen peptidiin käyttämällä yksinkertaista reaktiota, kuten asylointia, alkylointia tai amidointia. Jokaisella linkitystavalla on omat etunsa ja rajoituksensa.

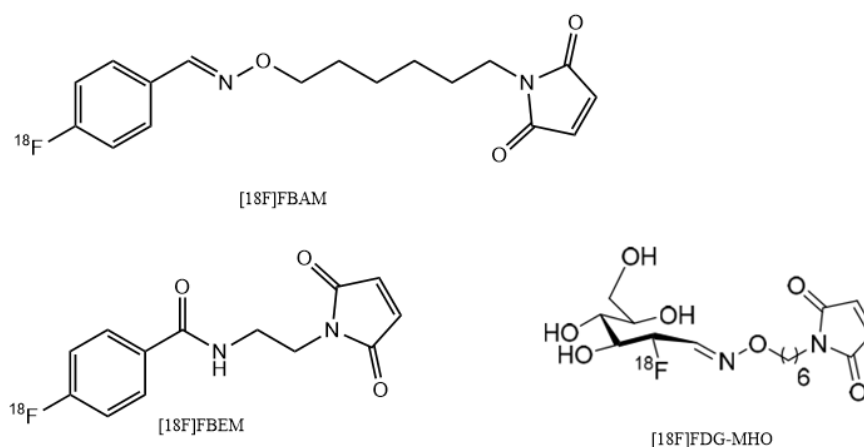
Kovalenttisen sidoksen muodostamiseksi fluorin kanssa vaaditaan suhteellisen ankarat olosuhteet. Radioleimattu prosteettinen ryhmän voidaan liittää peptidiin miedommissa olosuhteissa radioleimauksen jälkeen,. Tämä lähestymistapa vaatii pitkän monivaiheeseen synteessin ja synteessin jälkeisen ^{18}F -leimatun peptidin erottamisen ei-leimatusta peptidilähtöaineesta, reagoimattomasta prosteettisesta ryhmästä ja muista sivutuotteista.

Toisin sanoen prosteettinen ryhmä koostuu kahdesta osasta: pienimolekyulistä, johon on leimattu ^{18}F ja toinen funktionaalinen ryhmä, joka mahdollistaa biokonjugaation peptidiin. On olemassa paljon erilaisia prosteettisia ryhmiä, mutta yleisimmät ovat amiini-reaktiivisia ja tioli-aktiivisia ryhmiä (kuva 6)

NH₂ -aktiivisia prosteettisia ryhmiä:



SH -aktiivisia prosteettisia ryhmiä:



Kuva 6: NH₂ ja SH – aktiivisia prosteettisia ryhmiä

Amiini-aktiivisia ryhmiä ovat kohdennettuja lysiinin N^α-kohtaan amino-ryhmissä ja peptidirungon N^ε-amino-ryhmiä ¹⁸F -fluoroasylaation -ja ¹⁸F -fluoroamidaation kautta.

[¹⁸F]NFP ja [¹⁸F]SFB yhdisteet ovat yleisesti käytettyjä ¹⁸F-leimattuja peptidejä PET kuvantamisessa. Peptidien radioleimaus fluori-18:n kanssa kiinteällä kantajalla edustaa mielenkiitoisen tavan esitellä radioaktiivista isotooppia ¹⁸F 4-¹⁸F-fluoribensoehapon kautta ([¹⁸F]FBA).

[¹⁸F]SFB:ssa on aromaattinen [¹⁸F]fluoribentsoyyliryhmä, joka kiinnittyy helposti peptideihin konjugoimalla niiden primaarisiin amiiniryhmiin. [¹⁸F]SFB syntetisoidaan usein kolmevaiheisessa synteesissä lähtien [¹⁸F]fluoridi-ionista. Ensimmäinen radiosynteesi raportoitiin vuonna 1992 (Vaidyanathan ja Zalutsky). Synteesi alkaa kun [¹⁸F]fluoridi liitetään 4-formyyli-N,N,N-trimetyylaniliniumtriflataattiin, jonka jälkeen muodostetaan 4-¹⁸F-fluoribentsoehappo. 4-¹⁸F-fluoritolueenin hapetus tuottaa 4-¹⁸F-fluoribentsoehappoa, joka sitten reagoi N-hydroksisukkinimidin ja disykloheksyylikarbodi-imidin kanssa, jolloin saadaan S[¹⁸F]FB. Kokonaissynteesiaika, jossa huomioidaan HPLC-puhdistuksen tapahtuu 100 minuutissa ja radiokemiallinen saanto on vain 25%. [17]

Viimeaikaisten tutkimusten mukaan radiosynteesi on nopeampi ja tehokkaampi, jos Cu-välitteinen diaryylijoniumsuolan (DAI) radiofluoraus suoritetaan Bu4NOTf:lla

faasinsiirtokatalyyttinä, mitä seuraa fluoraus samassa liuottimessa. Menetelmällä [^{18}F]SFB saatiin 30 % radiokemiallisella saannolla, >99 % radiokemiallisella puhtaudella ja synteesiajalla ≤ 35 min.[18]

Tiolireaktiiviset proteettiset ryhmät käyttävät kysteinitähteitä ja maleimidejä radioleimaukseen ^{18}F -fluorialkylaatioreaktioiden mukaisesti. Kysteinin sulfhydryyliryhmä reagoi Michael-addition kautta maleimidin kanssa muodostaen tioeetterisidoksen. Tioeetterisidos on useimpien radiolääkkeiden kannalta riittävän stabiili niiden kannalta relevantilla aikaskaalalla.

[^{18}F]FDG on hyvin tärkeä radioaktiivinen merkkiaine PET-kuvantamisessa. Se on suosittu radiolääke, koska [^{18}F]FDG:lla on tehokas radiosynteesi ja [^{18}F]FDG on saatavilla melkein jokaisessa PET-keskuksessa. Vaikka [^{18}F]FDG on käytetyin radiolääke, [^{18}F]FDG:ta käytetään vain harvoin prosteettisena ryhmänä radioleimattujen yhdisteiden syntetisoinnissa.

[^{18}F]FDG:tä voidaan käyttää prosteettisena ryhmänä tiolireaktiivisen yhdisteen valmistuksessa funktionalisoimalla se ensin maleimidillä, joka reagoi selektiivisesti kysteiniä sisältäviin peptideihin ja proteiineihin. Viime vuosina maleimidipohjaiset yhdisteet ovat jo osoittautuneet olevansa hyvin tehokkaiksi kysteiniä sisältävien peptidien leimaamisessa fluori-18:lla lievissä olosuhteissa kuten neutraalissa pH:ssa.

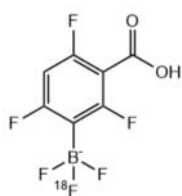
Maleimidehexyloxime, MHO, auttaa saavuttamaan peptidein ja proteiinien tioliryhmäspesifisen radioleimauksen. Näin ollen tiolireaktiivinen [^{18}F]FDG-MHO osoittaa olevansa hyvin mielenkiintoinen ja lupaava radiolääke selektiiviseen fluori-18-leimaukseen tiolia sisältävissä peptideissa ja proteiineissa. [^{18}F]FDG-MHO on helppo ja yksinkertainen valmistaa ja tuote voidaan valmistaa korkealla konjugointisaannolla.

Tiolireaktiivinen prosteettinen ryhmä [^{18}F]FDG-MHO, joka perustuu helposti saatavilla olevaan [^{18}F]FDG PET-radiomerkkiaineeseen. [^{18}F]FDG-MHO on hyvin soveltuva prosteettinen ryhmä tutkimusryhmille, joilla ei ole täydellistä PET-laitteistoa. [^{18}F]FDG-MHO:lla on kyky selektiivisesti radioleimata peptidejä ja proteiineja, jotka sisältävät kysteiniä. [19]

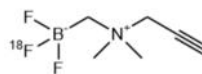
3.3 ^{18}F -radioleimaus peptidien kanssa [^{18}F]fluori-akseptorikemian avulla

Peptidien ^{18}F -radioleimaus akseptorikemian avulla on leimausmenetelmä, jossa hyödynnetään fluori-18:aa kykyä muodostaa vahvoja X-F-sidoksia. Vahvoja sidoksia fluorin kanssa voi muodostaa muun muassa Si- ^{18}F , B- ^{18}F tai Al- ^{18}F . Radioleimaus etenee ^{19}F :n ja ^{18}F :n isotooppivaihtoreaktioiden kautta. Fluoria sieppaavat prosteettiset ryhmät, jotka on kiinnitetty peptidiin akseptoriosien kautta, yksinkertaistavat radiofluorausprosessia vähentämällä sen vain yhteen fluorin sieppausvaiheeseen. (kuva 7)

Organofluoriboraatit:

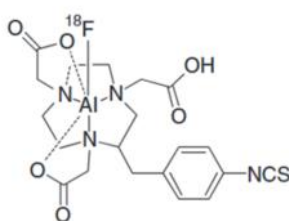


[18F]ArBF₃⁻

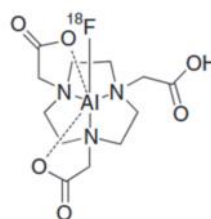


AMB[18F]F

Kelatoituidut alumiinifluoridit



Al[18F]F NOTA Bn-pNCS



Al[18F]F NOTA

Kuva 7: Eräitä tärkeitä esimerkkejä ¹⁸F-leimatuista prosteettisista iryhmistä peptidien radioleimaamiseen fluorin akseptorikemian avulla.

Organofluoriboraatin synteettisen lähestymistavan ideana oli luoda yhtä helppo menetelmä kuin fluoridi-ionin sieppaaminen vesiliuoksessa. Perrin ryhmän pitkäjänteinen tutkimustyö on johtanut AMB[¹⁸F]F:n kehittämiseen. AMBF on kahtaisioninen trifluoriboraattiammoniumprosteettinen ryhmä ja sitä on käytetty mm. bombesiin ja RGD-peptidien radiofluorileimaukseen. Tässä radioleimausmenetelmässä keskeinen rooli on ¹⁹F:sta ¹⁸F:aan-isotoopin vaihtoreaktio peptidiin kiinnitettyssä tri[¹⁹F]fluoroboraattiproteesiryhmässä.

Tämän lähestymistavan etuna on, että se tuottaa radiomerkkiaineen <30 min ja reaktiosta saatu radiokemiallinen saanto on 20-25% sekä molaarinen aktiivisuus pysyy 80-160 GBq/μmol arvoilla. Näin AMBF on osoittanut olevan stabiili fysiologisissa olosuhteissa, mikä helpottaa huolta *in vivo* defluorinaatiosta.[20]

Kelaattiin sidottu alumiinifluoridi on akseptorikemian kehittynyt menetelmä. Tätä lähestymistapaa ovat tutkineet McBride ja hänen tutkimusryhmänsä, he ovat kehittäneet alumiini-[¹⁸F]fluoridin kelaatiokemian jäljittämään yksinkertaisia radioleimausreaktioita.

Menetelmällä on kaksi merkittävää ominaispiirrettä, ensimmäinen on se, että [¹⁸F]-fluoridi reagoi nopeasti AlCl₃:n kanssa muodostaen (Al[¹⁸F]F)²⁺. Toinen on, että saatu tuote voidaan sitoa kaupallisesti saatavilla oleviin kelaatteihin kuten NOTA:aan, jota käytetään tyypillisesti radiometallien kemiassa. Täten NOTA:aan kiinnitettyjä peptidejä voidaan käyttää

sekä radiometallileimauksessa, että radiofluorauksessa ilman muutoksia. Menetelmä on osoittautunut olevan monipuolinen ja yksikertainen synteesikemiallisesti. Al[¹⁸F]F-NOTA-yhdisteet ovat myös stabiileja *in vivo*. Nämä ominaisuudet ovat tehneet alumiini-[¹⁸F]fluoridin kelaatiosta suosittun vaihtoehdon peptidien radioleimauksessa.

Menetelmä on nopea, yksinkertainen ja sen voi suorittaa yhdessä- tai kahdessa vaiheessa vesiliuoksessa. Reaktiolle tärkeät olosuhteet ja tekijät ovat lähtöaineen pitoisuus, reaktion lämpötila, pH, joka on yleensä 4 ja reaktiossa käytetty kelaattori. Reaktion optimoinnilla on mahdollista saavuttaa tuotetta >90% radiokemiallisella saannolla ja >95% radiokemiallisella puhtaudella sekä korkealla molaarisella aktiivisuudella (100-300 GBq/μmol) kokonaisuutena 20 min puhdistuksen jälkeen. [21]

3.4 Klik-kemia peptidien ¹⁸F-radioleimaukseen

Perinteinen lääkekehitysprosessi on hidas, kallis ja vaatii paljon työvoimaa. Klik-reaktiot ovat nopeita ja tehokkaita reaktioita. Yleensä reaktiot ovat bio-ortogonaalisia ja bioyhteensopivia. Klik-reaktioiden avulla on mahdollista liittää kaksi erillistä molekyyliä tai yhdistettä toisiinsa kiinnittyneiden funktionaalisten ryhmien välisten reaktioiden kautta.

Klik-reaktioiden kehityksessä tavoitteena on ollut saavuttaa korkea saanto, ja tuottaa vain haitattomia sivutuotteita, jotka on mahdollista poistaa ei-kromografisesti. Nämä ominaisuudet tulisi saavuttaa yksinkertaisissa olosuhteissa, jossa käytetään helposti saatavilla olevia lähtöaineita ja reagensseja, turvallisia liuottimia, sekä puhdistusmenetelmiä, jotka mahdollistavat tuotteiden helpon puhdistuksen. Täydellisessä tilanteessa reaktion tulisi olla inertti hapelle tai vedelle. Lisäksi reaktiotuotteen tulisi olla stabiili fysiologisessa liuoksessa. [22]

Sharpless käytti ensimmäisenä termiä ”klik-reaktio”, jolla hän viittasi alun perin 1,3-dipolaariseen Huisgen-sykloadditioon. Reaktion seurauksena muodostuu triatsoli alkyynin ja atsidin välisessä kupari(I)-katalysoimassa reaktiossa. [23]

Marik ja Sutcliffe ovat ensimmäisiä tutkijoita, jotka ovat hyödyntäneet klik-reaktiota radiofarmaseuttisessa kemiassa. Heidän tutkimuksensa tavoitteena oli todistaa, että klik-kemiaa voi hyödyntää radiokemiallisissa synteesissä. He ovat konjugoineet ω-[¹⁸F]fluorialkyyniä erilaisiin 3-atsidopropionihapolla funktionalisoiuihin peptideihin CuI-välitteisen 1,3-dipolaarisen sykloaddition kautta.

Tulokset osoittivat, että klik-reaktiomenetelmä on hyvin nopea ja tehokas tapa radioleimata peptidi ¹⁸F:llä. Synteesin kokonaisaika oli 30 min ja haluttu ¹⁸F-leimattu tuote oli mahdollista valmistaa 10 minuutissa ja sen radiokemiallisen saanto oli 54-99% sekä radiokemiallinen puhtaus 81-99%. [24]

Viime aikoina klik-kemia on saavuttanut suuren suosion radiofarmaseuttisen kemian puolella. Viime vuosikymmenten tutkimuksen perusteella useat kliinisesti merkittävät peptidit

ovat herättäneet tutkijoiden kiinnostuksen. Tässä tutkielmassa kiinnitetään tarkemmin huomiota sykloRGD peptidiin.

Hultschin tutkimusryhmän tavoitteena oli kehittää nopea ja yksinvaiheinen menetelmä radiofluorattujen peptidien valmistukseen. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että aminooksimodifioitu peptidi reagoi ^{18}F -leimatun aldehydin kanssa, jolloin muodostuu oksiimidisidos, joka on erittäin selektiivinen. Lopuksi tutkimusryhmä vertaili sykloRGD:stä saatuja tuloksia ja perinteiseen [^{18}F]FDG-yhdisteeseen syövän arvioinnissa.

[^{18}F]FDG:n käyttö aldehydisenä proteettisena ryhmänä on tutkittu aminooksiasetyylikonjugoidun syklisten RGD-peptidin avulla, jossa syklo(RGDfK(Aoa-(Boc))) toimii referenssiyhdisteenä. [^{18}F]FDG-RGD 56-93% radiokemiallista saantoa ja aktiivisuutta jopa 37 MBq. Optimoidut olosuhteet olivat 20 minuuttia 120 °C:ssa ja pH:ssa 2,5, peptidikonsteraation ollessa 5 mM.

In vivo -tutkimus M21 melanoomaa kantavilla hiirillä osoitti, että [^{18}F]FDG-RGD kertyy kasvaimiin enemmän kuin [^{18}F]galakto-RGD 120 min injektion jälkeen. Kuitenkin [^{18}F]FDG-RGD:lla on korkeampi kertyminen ei-kohde elimiin, mikä johti vastaavaan kasvain/elin-suhteet molemmille yhdisteille.

Kokonaisuutena [^{18}F]FDG-RGD:n *in vivo* radioaktiivisen merkkiaineen aktiivisuus injektion jälkeen tuotti lupavia ja samankaltaisia tuloksia kuin [^{18}F]galakto-RGD. Näin olleen [^{18}F]FDG-RGD:lla voi olla käyttöä tulevaisuudessa $\alpha_v\beta_3$ -integriinin *in vivo* PET-kuvauksessa. Tutkimus myös osoitti, että aminooksifunktionalisoitujen peptidien kemoselektiivinen ^{18}F -leimaus käyttämällä [^{18}F]FDG:tä on tehokas menetelmä ^{18}F -leimattujen peptidien tuottamiseksi korkealla saannolla ja suotuisalla farmakokinetiikalla.

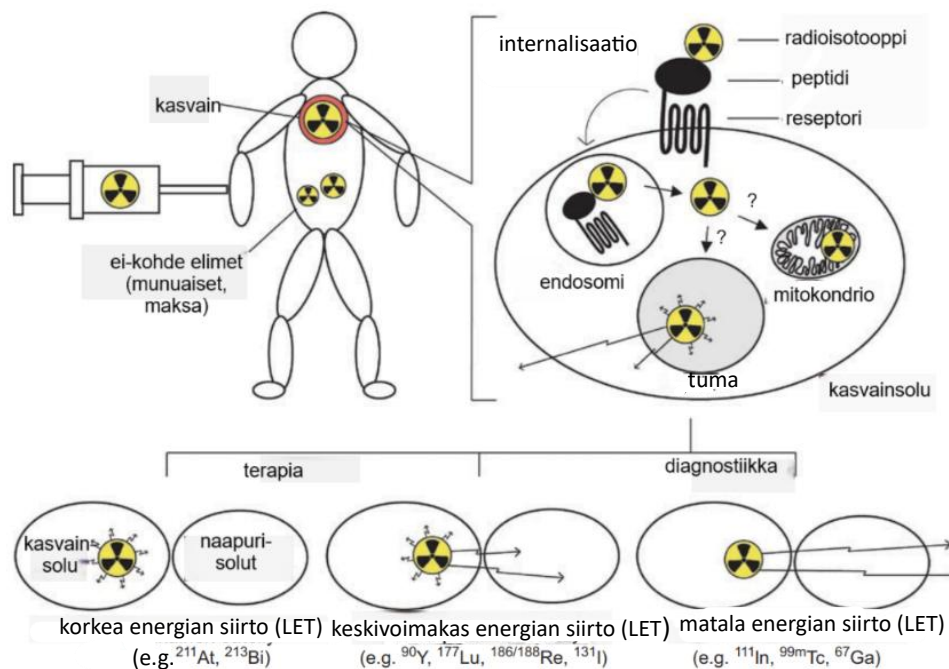
[25]

4. Peptidien teranostiset sovellukset

4.1 Radioleimattujen peptidien kliiniset sovellukset

Radiopeptidien tuumorikohdistuksen yleinen periaate on esitetty kuvassa 8[33]. Radiolääkkeiden injektointi johtaa siihen, että radiolääke kerääntyy kohde-elimien, mutta sen lisäksi myös ei-kohdekudoksiin, kuten munuaisiin, maksaan ja pernaan. Kun radiopeptidi sitoutuu reseptoriinsa, se laukaisee reseptorin soluunoton ja reseptori-ligandikompleksin internalisoinnin. Komplekseja löytyy endosomeista, ja myöhemmin osa radioaktiivisuudesta voidaan havaita solun tumassa ja mitokondrioissa Wangin tutkimuksen mukaan [32].

Radioisotooppien valinta riippuu käyttötarkoituksesta: diagnostisiin tarkoituksiin käytetään gammasäteilyä lähettäviä isotooppeja (esim. ^{67}Ga , tai ^{111}In) tai positronisäteilijöitä (esim. ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{124}I), jotka myös tuottavat gamma-fotoneja joko annihilaation tai ydinreaktioiden kautta. Terapeuttisiin tarkoituksiin suositetaan lyhyen kantaman alfasäteilijöitä (esim. ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac) tai beetasäteilijä (esim. ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{131}I). Tutkielmassa keskitytään ^{18}F peptidipohjaisiin radiolääkkeisiin.



Kuva 8: Yleiset periaatteet reseptorivälitteisestä kasvainsolujen kohdentamisesta radiopeptideillä, jotka on leimattu diagnostisilla ja terapeuttisilla radioisotoopeilla.

Kuva on piirretty viitteessä 33 esitettyä kuvaa mukailen

Integriinit sijaitsevat solunpinnalla ja ne ovat heterodimeerisiä. Ne osallistuvat solujen kiinnittymiseen ekstrasellulaariseen matriisiin (ECM) ja vuorovaikuttavat immunoglobuliinien

superperheen molekyylien kanssa. On olemassa vähintään 24 erillaista integriinin heterodimeeriä, jotka muodostuvat 18 α -alaysikön yhdistelmästä ja 8 β -alaysikköä. Eri integriiniheterodimeerit sitoutuvat spesifeihin ekstrasellulaarisiin matriksi-proteiineihin. Solujen integriinityypit määräävät, miten hyvin solu voi kiinnittyä eri pintoihin ja liikkua niillä. α_v -integriinit ja integriini $\alpha_5\beta_1$ tunnistavat RGD-sekvenssin kohdeproteiineissaan.

Monet integriinit edistävät kasvaimen etenemistä. Jotkin integriinit, kuten $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ ja $\alpha_v\beta_6$ löytyvät hyvin vähäisiä tai lähes havaitsemattomina määrinä useimmissa aikuisen epiteelikudoksissa. Siitä huolimatta niiden ilmentyminen eli ekspressio voi kuitenkin lisääntyä merkittävästi tietyissä kasvaimissa. $\alpha_v\beta_3$ -integriiniä löytyy runsaasti ihmisen kasvainbiopsianäytteiden verisuonissa, mutta normaalien kudosten verisuonissa sitä ei ole. Jodenkin integriinien, kuten $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$ ja $\alpha_v\beta_6$ lisääntynyt ekspressio on yhdistetty erityisesti syöpätaudin etenemiseen eri syöpätyypeissä. Sen takia ne ovat laajimmin tutkittuja integriinejä syöpätutkimuksissa. (taulukko 4).

Taulukko 4: syövän tyypit ja niiden ekspressoidut integriinit

Syövän tyyppi	Ekspressoidut integriinit
Melanoma	$\alpha_v\beta_3$ ja $\alpha_5\beta_1$
Rintasyöpä	$\alpha_6\beta_4$ ja $\alpha_v\beta_3$
Eturauhasen syöpä	$\alpha_v\beta_3$
Haiman syöpä	$\alpha_v\beta_3$
Munasarjan syöpä	$\alpha_4\beta_1$ ja $\alpha_v\beta_3$
Kohdun syöpä	$\alpha_v\beta_3$ ja $\alpha_v\beta_6$
Glioblastooma	$\alpha_v\beta_3$ ja $\alpha_v\beta_5$

Ryo Hosotanin ja hänen kollegoidensa tekemän tutkimuksen mukaan kohonneen $\alpha_v\beta_3$ -integriinin ilmentymisen haimakasvaimissa on raportoitu liittyvän lisääntyneeseen MMP-2-aktivaatioon ja imusolmukkeiden etäpesäkkeisiin. [26]

1970-luvun loppupuolella E. Ruoslahti tunnisti ensimmäisenä RGD-sekvenssin (Arg-Gly-Asp) fibronektiinin solukiinnityskohtana, mikä merkitsi merkittävää löytöä soluadheesiomekanismien ymmärtämisessä [27]. $\alpha_v\beta_3$ -integriini myös tunnetaan nimellä vitronektiinireseptori ja se on yksi tutkituimmista integriineistä. Vitronektiinin sitoutumista $\alpha_v\beta_3$ -integriiniin välittää vitronektiinin pinnalla oleva Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptidi-motiivi. RGD toimii useimpien integriinien tunnistusmotiivina.

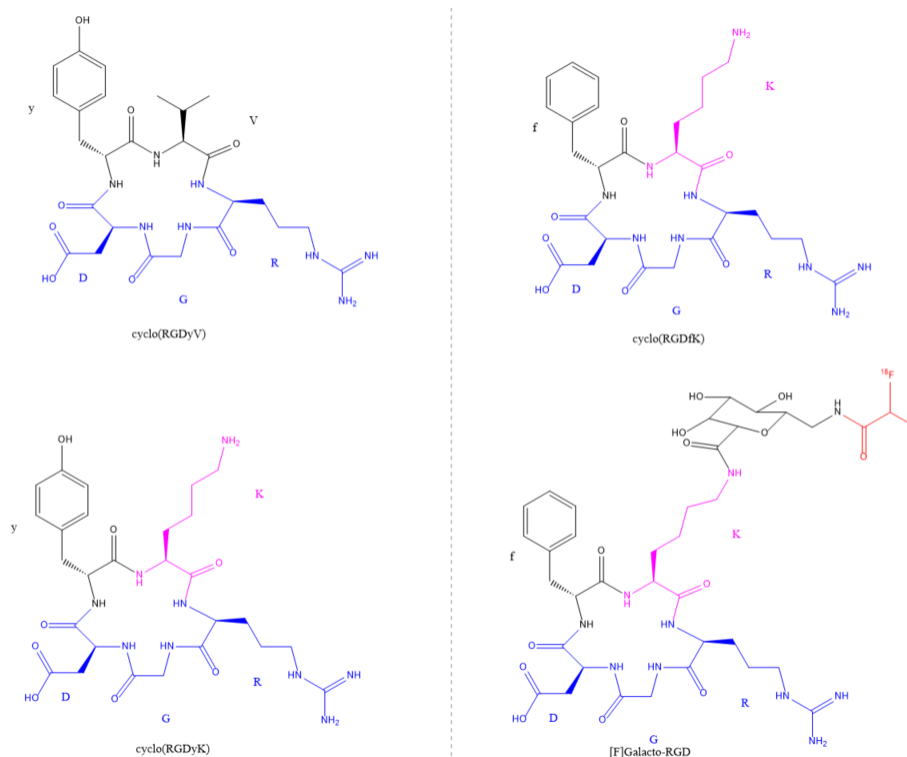
Näin RGD:n syklinen muoto näyttää oleva tehokkain miimikko ja syklistet pentapeptidit (cRGD:t) sitoutuvat rakoon α - ja β -alaysiköiden välissä. Lisäksi, syklistet pentapeptidit osoittavat suuruusluokkaa suurempaa affiniteettia $\alpha_v\beta_3$ -integriinille samalla, kun se osoittaa myös parantunutta *in vivo* stabiilisuutta verrattuna niiden lineaarisiin analogeihin. [13-14]

Terapeuttisia proteiineja ja peptideitä käytetään aktiivisesti syövän hoidossa. Integriini $\alpha_v\beta_3$ -kohdistettu radiolääke voidaan luokitella RGD-pohjaisiin kohdennettaviin aineisiin, jotka on suunniteltu joko diagnostiseen kuvantamiseen tai radionuklidihoidon.

Radiolääkkeitä voidaan käyttää reseptoriposiitiivisten kasvainleesioiden tunnistamiseen syövän hoidossa sekä hoidon suunnittelussa ja annosmittauksen määrittämisessä. Peptideitä käytetään kohdennettuun radionuklidihoidon, kun ne ovat leimattuja terapeuttisella radionuklidilla. Tässä lähestymistavassa radiolääkkeet sitoutuvat selektiivisesti kasvainsolujen kohdereseptoreihin ja antavat kasvaimelle tehokkaan säteilyannoksen, samalla minimoiden ympäröivien terveiden kudosten vauriot.

1970-luvulta alkaen tehdyt tutkimukset RGD:tä sisältävillä peptideillä ovat osoittaneet, että näillä peptideillä on korkea potentiaali kasvainten kohdentamiseen radionuklideilla. [¹⁸F]Galacto-RGD oli ensimmäinen RGD PET-merkkiaine, joka on testattu ihmisillä. Tämä yhdiste konjugoitiin sokeriaminohapon kautta syklisteksi peptidiksi c(RGDfK). Merkittävä läpimurto tuli syklisen pentapeptidisyklo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) kehityksestä, koska tämä peptidi osoittautui 100 kertaa tehokkaammaksi estämään solujen tarttumista fibronectiiniin kuin sen alkuperäinen lineaarinen versio.[28]

SykloRGD-peptidien kehitys on antanut hyvän tutkimuskohteen integriiniin $\alpha_v\beta_3$ -kohdistamisessa. Peptidin vanhoissa versioissa [sykloRGDyV] ainoa ilmeisen hyvä paikka radioleimaavan osan liittämiseksi oli asparagiinihappotähteen sivuketjugarboksylaatti (D). RGD- motiivi on sitoutumisen kannalta tärkeä ja kriittinen asia, eikä peptidirenkaan kokoa voitu muuttaa ilman spesifisyyden vaikuttamista, peptidiä suunniteltiin uudelleen. Uuden peptidin nimi on sykloRGDyK tai sykloRGDfK, muokkauksen syy oli se, että lysiinitähteen (K) sivuketjuamiini toimi funktionalisoinnin kiinnityskohtana, mikä mahdollistaa prosteettisen ryhmän kätevän ja hyvänlaatuisen kiinnittämisen. Lopuksi tämä modifioitu peptidi johti lopulta [¹⁸F]Galacto-RGD peptidiin, jota käytetään kliinisissä tutkimuksissa integriini $\alpha_v\beta_3$ -ilmentymisen kuvaamiseen.[13] (kuva 9)



Kuva 9 : Useiden integriini $\alpha_v\beta_3$:een kohdistuvien sykloRGD-peptidien rakenteet. Sitoutumiseen tarvittavat keskeiset aminohappotähteet on kuvattu sinisellä; tärkein aminohappo, jota käytetään radioleimaukseen In korostettuna violetilla; ja 2- $[^{18}\text{F}]$ fluoripropionyyliamidin protektinen ryhmä $[^{18}\text{F}]$ Galacto-RGD:ssä on esitetty punaisella. Käytetään tavallisia yksikirjaimia aminohappolyhenteitä

Toinen mahdollinen lupaava radiolääke, joka on parhaillaan kliinisissä kokeissa, on $[^{18}\text{F}]$ AH111585. Sitä tiedetään myös nimellä $[^{18}\text{F}]$ flusiklatidi ja se on uusi syklinen RGD-pohjainen radioligandi. Alkuperäinen peptidi, RGD4C, on optimoitu parantamaan *in vivo* -stabiilisuutta ja pidentämään plasman puoliintumisaikaa. Tällä radioligandilla on onnistuneesti kuvattu metastaattisia rintasyöpävaurioita, ja seitsemän testatun potilaan kaikki kasvaimet olivat näkyvissä $[^{18}\text{F}]$ flusiklatidi-PET-kuvissa, joita verrattiin tietokonetomografialla saatuihin kuviin. [28]

4.2 Peptidien käytön haasteet ja rajoitteet

Peptideillä on paljon hyviä puolia, mutta sitä huolimatta peptideistä löytyy myös rajoitteita, jotka voivat vaikuttaa peptidilääkkeiden kehitykseen. Yleensä peptidit luokitellaan lyhyeksi aminohapoiksi jotka sisältävät <50 aminohappoyksikköä ja joiden molekyylipaino on 5500 Da; peptidi jolla on enemmän kuin 100 aminohappoyksikköä luokitellaan jo proteiiniksi. Peptidien kevyt molekyylipaino mahdollistaa peptidien helpon muokattavuuden ja valmistuksen kustannustehokkuuden. Nämä edut kuitenkin heikkenevät, kun molekyylipaino kasvaa ja lähestyy 5500 Da:a. Suuremmat peptidit voivat diffundoitua kasvaimiin hitaammin ja ovat erittäin herkkiä proteolyysille. Lisäksi endogeenisillä peptideillä voi olla fysiologisia vaikutuksia, jotka voivat johtaa ei-haluttuihin sivuvaikutuksiin. Korkean spesifisen aktiivisuuden omaavien yhdisteiden tai antagonistien käyttö voi auttaa minimoimaan näitä vaikutuksia.

Useimpien endogeenisten peptidien biologinen puoliintumisaika on liian lyhyt diagnostiseen tai terapeutiseen käyttöön, mikä johtuu pääasiassa verenkierrossa tapahtuvasta nopeasta proteolyysistä. Tähän haasteeseen on kehitetty keinoja, joilla suojataan peptidejä nopealta hajoamiselta. Esimerkiksi modifikaatiot kuten D-aminohappojen sisällyttäminen, terminaalisten aminohappojen muuttaminen tai päätteen sulkeminen, voivat auttaa suojaamaan peptidejä ensyymaattiselta hajoamiselta. Tyypillisesti entsyymeillä on tietyt tehtävät. Eksopeptidaasit hajottavat peptidejä C- tai N-päästä, kun taas endopeptidaasit pilkkoutuvat sidoksissa luonnossa esiintyvien L-aminohappojen välillä. Näin ^{111}In -pentetretotidin proteolyysi voi tapahtua hitaammin, koska A-aminohappo on korvattu L-aminohapon sekvenssissä sekä molemmat terminaaliset aminohapot ovat muokattuja. Aminohappo- tai peptidimimeetit voivat myös hidastaa hajoamista. Kun tunnetaan peptidin reseptorin sitovan alueen, voidaan käyttää fragmentteja. Siinä on kuitenkin oma haaste, koska fragmentit voivat vähentää peptidin kykyä sitoutua kohdereseptoreihinsa.

Lipofiilisyyt ja hydrofiilisyyt vaikuttavat peptidin farmakokinetiikkaan ja kudonsjakaumaan. Lipofiiliset peptidit imeytyvät usein maksaan ja erittyvät hepatobiliaarisen järjestelmän kautta. Hydrofiiliset peptidit puhdistuvat yleensä munuaisten kautta. Peptidin ominaisuuksien valinta riippuu taudin sijainnista. Munuaissolusyövän tapauksessa lipofiilisempi peptidi auttaa ohjaamaan sen munuaisista maksaan. Vaikka peptidi vielä sitoutuu kohteeseensa munuaisissa, ylimäärä tai ei-kohdennettuja peptidejä erittyy maksan kautta. Peptidien syklistointi voi rajoittaa niiden joustavuutta ja parantaa reseptorin sitoutumista.

Kun peptidejä kehitetään radiolääkkeiksi, on huomioitava useita tekijöitä, jotka vaikuttavat niiden diagnostiseen ja terapeuttiseen käyttöön. Tärkeitä tekijöitä ovat muun muassa peptidien koko, molekyylipaino ja reseptorien kohdennus. Reseptorin kohdennus on hyvin tärkeä tekijä kun puhutaan kohdennetun elimen kuvantamisesta, näin peptidin on kiinnitettävä tiettyyn paikkaan saadakseen hyvin resoluution kuvantamisessa sekä ei-kohdennetut elimet eivät antaisi väärää tulosta. Yhdisteen tulisi saavuttaa korkea kertymä kohde-elimessä optimaalisessa ajassa ja lokalisoitua siihen, samalla varmistuen nopeasta eliminaatiosta muualta elimistöstä. [31]

5. Johtopäätökset ja yhteenveto

Tämä tutkielma käsittelee peptidipohjaisten radiomerkkiaineiden käyttöä teranostiikassa, erityisesti PET-kuvantamisessa ja syöpähoidossa. Peptidien pienen koon ja kevyen molekyyllipainon ansiosta niitä on mahdollista muokata ja käyttää kohdentamisen syöpäsolujen reseptoreihin. Peptidien käyttö teranostiikassa parantaa diagnostista sekä terapeutista tarkkuutta. Fluori-18 on yleisesti käytetty radionuklidi PET-kuvantamisessa sen kemiallisten sekä fysikaalisten ominaisuuksien vuoksi.

Tutkielma on keskittynyt radioleimattujen peptidien synteesimenetelmien analysointiin ja arviointiin, kuten fluori-18-leimausta ja klik-kemiaa, sekä niiden kliinisiä sovelluksia. Jokaiset menetelmät tarjoavat omat vahvuudet ja heikkoudet, jotka esiintyvät taulukossa 5.

Taulukko 5: radiosynteesien menetelmien edut ja haasteet

Menetelmä	Edut	Haasteet
Prosteettiset ryhmät	Hyvä selektiivisyys, korkea radiokemiallinen puhtaus	Pitkä ja monivaiheinen synteesi, mahdollinen aktiivisuuden heikkeneminen
Fluoriakseptorikemia	Nopea, hyvä <i>in vivo</i> stabiilisuus, korkea radiokemiallinen tuotanto ja korkea radiokemiallinen puhtaus	Tarvitaan spesifisiä kelaatteja (esim. NOTA, DOTA)
Klik-kemia	Nopea, tehokas ja korkea saanto ja suotuisa farmakokinetiikka	Katalyyttien ja liuotinten optimointi tärkeää

Menetelmien valinta riippuu halutun peptidin lopullisesta sovelluksesta sekä ominaisuudesta, kuten radioaktiivisen tuotteidentuotannosta tai biologisesta stabiilisuudesta. Menetelmien kehityksissä on otettava huomioon peptidien käyttöön liittyvät haasteet, kuten niiden metabolinen stabiilisuus ja ei-kohde elimien vaikutus.

Jatkotutkimukset keskittyvät näiden menetelmien optimointiin. Tulevaisuudessa peptidipohjaisten radiomerkkiaineiden kehitys jatkuu, ja uusia menetelmiä ja sovelluksia tutkitaan aktiivisesti.

6. Kiitokset

Lämpimät kiitokset Turun yliopiston Kemian laitoksen väelle. Kiitän Turun yliopiston Kemian laitoksen radiofarmaseuttista tutkimusryhmää, jossa sain suorittaa LuK-tutkielmaani liittyvän harjoitustyön etuajassa. Kiitän professori Anu J. Airaksista, lähiohjaaja Jesse Ponkamoja sekä kaikkia muita radiofarmaseuttisen tutkimusryhmän jäseniä.

Lähteet:

- [1] Rutherford E.; *Collision of α particles with light atoms. IV. An anomalous effect in nitrogen*; Phil.Mag.; 2010, 90, 31-37
- [2] Nesvizhevsky V., Villain J.; *The discovery of the neutron and its consequences*; C. R. Physique; 2017, 18, 592-600
- [3] Robbins R, Wan Q, Grewal R, Reibke R, Gonen M, Strauss H, Tuttle R, Drucker W, Larson S; *Real-Time Prognosis for Metastatic Thyroid Carcinoma Based on 2-[^{18}F]Fluoro-2-Deoxy-d-Glucose-Positron Emission Tomography Scanning*; The Jour. of Clin. Endocrinology & Metabolism; 2006, 91, 498-505
- [4] Miller P.; Long N.; Vilar R.; Gee A.; *Synthesis of ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O , and ^{13}N Radiolabels for Positron Emission Tomography*; Angewandte Chemie – International Edition; 2008, 47, 8998-9033
- [5] David W. Townsend, Positron Emission Tomography, Kirjassa *Basic Science of PET and PET/CT* [online], Turun yliopisto, Volter-portaali. Viitattu 11.1.2024. Saatavissa: [https://link-springer-com.ezproxy.utu.fi/chapter/10.1007/1-84628-187-3_1#keywords](https://link.springer-com.ezproxy.utu.fi/chapter/10.1007/1-84628-187-3_1#keywords)
- [6] Fowler J., Wolf A.; *Working against Time: Rapid Radiotracer Synthesis and Imaging the Human Brain*; Acc. Chem. Res. 1997, 30, 181-188
- [7] Michelle L. James, Roger R. Fulton, Johnny Vercoullie, David J. Henderson, Lucette Garreau, Sylvie Chalon, Frederic Dolle, Silvia Selleri, Denis Guilloteau and Michael Kassiou; *DPA-714, a New Translocator Protein-Specific Ligand: Synthesis, Radiofluorination, and Pharmacologic Characterization*; Jour. Of Nuc. Med., 2008, 49, 814-822
- [8] Henry N. Wagner Jr, ja Peter S. Conti; *Advances in medical imaging for cancer diagnosis and treatment*; Cancer 1991, 67, 1121-1128
- [9] M.N. Maisey; *Overview of clinical PET*; The Br. Jour. of Radiol.; 2002, 75, S1-S5
- [10] Le Bars D; *Fluorine-18 and medical imaging: Radiopharmaceuticals for positron emission tomography*; Jour. Of Fluor. Chem.; 2006, 127, 1488-1493
- [11] Fosgerau K., Hoffmann T., *Peptide therapeutics: current status and future directions*; Drug Disc. Today, 2015, 20, 122-128
- [12] Koutsopoulos, Sotirios, [Radiolabelled peptides in medical imaging](#), Kirjassa *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* [online], Turun yliopisto, Volter-portaali. Viitattu 24.1.2024. Saatavissa: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kutu/reader.action?docID=5115954&ppg=452&pq-origsite=primo>
- [13] Haubner R., Weber W., Beer A., Vabuliene E., Reim D., Sarbia M, Becker K., Goebel M., Hein R., Wester H., Kessler H., Schwaiger M., *Noninvasive Visualization of the Activated $\alpha\beta 3$ Integrin in Cancer Patients by Positron Emission Tomography and [^{18}F]Galacto-RGD*; PLoS Med., 2005, 2, 0244-0252

- [14] Desgrosellier J., Cheresh D.; *Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities*; *Cancer*, 2010, 10, 9-22
- [15] Bondi A.J.; *van der Waals Volumes and Radii* ; *J Phys Chem.*; 1964, 68; 441-451
- [16] Purser S., Moore P., Swallow S., Gouverneur V.; *Fluorine in medicinal chemistry*; *Chem. Soc. Rev.*; 2008, 37, 320-330.
- [17] Vaidyanathan G., Zalutsky; *Labeling proteins with fluorine-18 using N-succinimidyl 4-¹⁸F]fluorobenzoate*; *Int. J. Rad. Appl. Instrum.*, 1992, 19, 275–281.
- [18] V. V. Orlovskaya, O.S. Fedorova, N. B. Viktorov, R. N. Krasikova; *Simple and Efficient Synthesis of N-Succinimidyl-4-¹⁸F]fluorobenzoate (¹⁸F]SFB)—An Important Intermediate for the Introduction of Fluorine-18 into Complex Bioactive Compounds*; *Pharmaceuticals* 2024, 17, 1723
- [19] Wuest, F.; Berndt, M.; Bergmann, R.; van den Hoff, J.; Pietzsch, J.; *Synthesis and Application of ¹⁸F]FDG-Maleimidehexyloxime (¹⁸F]FDG-MHO): A ¹⁸F]FDG-Based Prosthetic Group for the Chemoselective ¹⁸F-Labeling of Peptides and Proteins*; *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 1202–1210
- [20] Bernard-Gauthier V., Lepage M., Waengler B., Bailey J., Liang S., Perrin D., Vasdev N., Schirmacher R; *Recent Advances in ¹⁸F Radiochemistry: A Focus on B-¹⁸F, Si-¹⁸F, Al-¹⁸F, and C-¹⁸F Radiofluorination via Spirocyclic Iodonium Ylides*; *Jour. of Nuc. Med.*, 2018, 59, 568-572
- [21] McBride J. Starkey R., Goldenberg D., *Radiofluorination using aluminum-fluoride (Al¹⁸F)*; *EJNMMI Res.*, 2013, 3, 1-11
- [22] Thirumurugan P., Matosiuk D., Jozwiak K; *Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical–Biology Applications*; *Chem. Rev.*; 2013, 113, 4905-4979
- [23] Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew.*; *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*; *Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004–2021
- [24] Marik, J.; Sutcliffe, J.L.; *Click for PET: rapid preparation of ¹⁸F]fluoropeptides using Cu^I catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition*; *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 6681–6684.
- [25] Hultsch, C.; Schottelius, M.; Auernheimer, J.; Alke, A.; Wester, H.J.; *Eur. J.*; *¹⁸F-Fluoroglucosylation of peptides, exemplified on cyclo(RGDfK)*; *Nucl. Med. Mol. Imaging* 2009, 36, 1469–1474.
- [26] Hosotani, R.; Kawaguchi, M.; Masui, T.; Koshihara, T.; Ida, J.; Fujimoto, K.; Wada, M.; Doi, R.; Imamura, M.; *Expression of Integrin α V β 3 in Pancreatic Carcinoma: Relation to MMP-2 Activation and Lymph Node Metastasis*; *Pancreas* 2002, 25, 30–35.
- [27] Ruoslahti, E.; Pierschbacher, D.; *New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins*; *Science* 1987, 238, 491–497
- [28] Fabienne D., Aude Le B., Veronique P.; *RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis*; *Mol. Pharmaceutics* 2012, 9, 2961–2973

- [29] Benedetti E., Morelli G., Accardo A., Mansi R., Tesauro D., Aloj L.; *Criteria for the Design and Biological Characterization of Radiolabeled Peptide-Based Pharmaceuticals*; *Biodrugs* 2004; 18, 279-295
- [30] McAfee JG, , Neumann RD.; *Radiolabeled peptides and other ligands for receptors overexpressed in tumor cells for imaging neoplasms*; *Nucl Med Biol* 1996; 23; 673-676
- [31] Weiner R.E, Thakur M. L.; *Radiolabeled Peptides in Oncology*; *Biodrugs* 2005; 19; 145-163
- [32] Wang M, Caruano AL, Lewis MR, Meyer LA, VanderWaal RP, Anderson CJ.; *Subcellular Localization of Radiolabeled Somatostatin Analogues: Implications for Targeted Radiotherapy of Cancer*; *Cancer Res* (2003), 63, 6864–6869.
- [33] Eberle, A. N., & Mild, G.; *Receptor-mediated tumor targeting with radiopeptides*; *Journal of Receptors and Signal Transduction*; 2009, 29, 1–37
- [34] Jason S. Lewis;Albert D. Windhorst;Brian M. Zeglis; Part I: First Principles. Kirjassa *Radiopharmaceutical chemistry*:[online], Turun yliopisto, Volter-portaali. Viitattu 11.3. 2035. Saatavissa: <https://research-ebSCO-com.ezproxy.utu.fi/c/sk551e/search/details/5tpxdptlvz?db=nlebk>