

Plasman proteiineihin sitoutumisen ja stabiilisuuden arviointimenetelmät radiofarmaseuttisille lääkkeille

Radiofarmaseuttisen kemian
LuK-tutkielma

Laatija:
Isla Pinta

18.12.2024
Turku

Kandidatutkielma

Oppiaine: Kemia

Tekijä: Isla Pinta

Otsikko: Plasman proteiineihin sitoutumisen ja stabiilisuuden arviointimenetelmät radiofarmaseuttisille lääkkeille

Ohjaajat: Proviisori Pyry Dillemuth ja apulaisprofessori Xiang-Guo Li

Sivumäärä: 17 sivua

Päivämäärä: 18.12.2024

Tutkielma käsittelee radiofarmaseuttisten lääkkeiden sitoutumista plasmaproteiineihin sekä stabiilisuutta plasmassa sekä näiden arviointimenetelmiä. Mahdollisia uusia merkkiaineita etsiessä tulee selvittää merkkiaineen mahdollinen metabolia veressä ja kohdekudoksessa. Stabiilisuutta arvioidaan HPLC-menetelmällä ja sitoutumista plasmaproteiineihin TLC-menetelmällä. Molemmat menetelmistä ovat universaaleja ja hyvin tunnettuja.

Tavoitteena oli selvittää; miksi radiofarmaseuttisten aineiden stabiilisuutta tulee arvioida, miten plasmanäytteet valmistellaan, näytteiden HPLC- ja TLC-analyysit, miten alkuperäisen radiofarmaseuttisen aineen identiteetti määritetään sekä kuinka radiofarmaseuttisen aineen proteiiniton osuus määritetään.

Merkkiaineen tulee kulkeutua kohdesolukkoon alkuperäisessä muodossaan, joten metabolian havaitseminen in vitro vaiheessa useimmiten keskeyttää tutkimukset merkkiaineen kohdalla. Samoin merkkiaine ei myöskään voi liiammin sitoutua plasman proteiineihin, sillä se estää merkkiaineen kulkeutumisen kohdesolukkoon.

Menetelminä tarkasteltiin HPLC:tä ja TLC:tä. Tulosten perusteella radiofarmaseuttisesta aineesta osataan tunnistaa metabolia elimistössä sekä sitoutuminen plasmaproteiineihin ja näin myös mahdollisuus PET-kuvantamisen merkkiaineeksi.

Johtopäätöksissä todetaan käsiteltyjen menetelmien olevan sopivia ja luotettavia radiofarmaseuttisen aineen metabolian ja plasmaproteiineihin sitoutumisen määrittämiseksi. Pohditaan myös prosessin tulevaisuutta ja mahdollista tekoälyn hyödyntämistä data-analyysin tukena.

Avainsanat: radiofarmaseuttinen merkkiaine, metabolia, proteiinisitoutuminen, HPLC, TLC, tekoäly

Sisällysluettelo

1	Johdanto	4
1.1	Radiofarmaseuttisten valmisteiden stabiilisuuden analysointi plasmassa.....	5
1.2	Tutkimuksen toteutus	6
2	Menetelmät	7
2.1	Näytteiden valmistelu	7
2.1.1	Plasma.....	7
2.1.2	Aivot.....	7
2.2	HPLC ja TLC näytteiden analysointi	8
2.3	Metaboliittien määrittäminen	9
2.4	Radiofarmaseuttisen aineen sitoutumisen proteiinin osuus	10
2.5	Halutut tulokset.....	11
3	Tulevaisuus	13
3.1	Tulosten hyödyntäminen	13
3.2	Tekoälyn käyttö analyysissä	13
4	Johtopäätökset	15
	Lähteet	16

1 Johdanto

Tämä LuK-tutkielma on kirjallisuuskatsaus, jossa tarkastellaan radiofarmaseuttisten lääkkeiden sitoutumisen plasman proteiineihin ja stabiilisuuden arviointimenetelmiä. Tutkielma käsittelee analyysimenetelminä HPLC- sekä TLC-menetelmiä verestä sekä aivoista tehtäviin metabolia- sekä proteiineihin sitoutumismittauksiin plasmassa.

Radiofarmaseuttisilla merkkiaineilla kuvannetaan erilaisia elimistön toimintoja PET-kameralla. Positroniemissiotomografiakuvantamisella (PET-kuvantaminen) saadaan tietoa elimistön toiminnasta, metaboliasta ja verenkierrosta seuraamalla merkkiaineen käyttäytymistä elimistössä. Radioaktiivinen aine säteilee hajotessaan positroneja, jotka muodostavat gammasäteitä kohdatessaan kudoksissa elektronin. Näistä gammasäteistä muodostuu kuva kohdekudoksesta. PET-kuvaus on tomografiaa eli kuvia otetaan leikkeinä ja leikkeiden yhdistelmästä saadaan kolmiulotteinen malli, josta käy ilmi, mihin ja miten merkkiaine on jakautunut. [1]

Kun PET-kuvantamisessa selvitetään solujen energian käyttöä, merkkiaineena käytetään yleensä radioaktiivisesti leimattuja hiilihydraatteja. Hyvä radioaktiivinen leima ei hajoa elimistössä vaan käyttäytyy vastaavasti kuin merkkiaine ilman radioaktiivista leimaa ja näin ollen kuvaus on potilaalle kivuton. Radioleimalla varustetulla sokerilla selvitetään kudosten energiakulutusta ja samalla voidaan löytää mahdolliset syöpäpesäkkeet tai -kasvaimet. Aivojen PET-kuvauksessa käytettävät molekyylit kehitetään aina injektoitaviksi ihmiseen. Aivot käyttävät energialähteenään sokeria, joten aivosyövän tapauksessa aktiivisuus kasvaimessa on suurempaa kuin terveessä kudoksessa. Aivojen PET-kuvantamisessa merkkiaine injektoidaan tutkittavan verenkiertoon. [1]

Ennen kuin PET-kuvauksessa voidaan ottaa käyttöön uusi merkkiaine, tulee varmistaa, ettei sillä ole haitallisia metaboliitteja eli se on stabiili elimistössä. Pahimmassa tapauksessa merkkiaineeksi suunniteltu uusi molekyyli voi tuottaa niin reaktiivisen metaboliatuotteen, että se sitoutuu kovalenttisesti DNA:han ja näin saa aikaan mutaatioita ja mahdollisen syövän alkupesäkkeen [2]. Uuden leiman turvallisuus ihmiselle selvitetään ennen klinisiä kokeita eläinkokeilla.

Ensin metaboloitumista testataan siis plasmalla in vitro. Jos in vitro kokeissa tulokset plasmassa ovat metaboliset, voidaan olettaa, että myös in vivo tehtävät plasma kokeet osoittaisivat metaboloitumisen.

Koska radiofarmaseuttiset merkkiaineet tulevat käyttöön ihmisille, on hyvä tutkia myös merkkiaineiden metaboliittien mahdollisia haitta- ja hyötyvaikutuksia. PET-kamera ei myöskään pysty erottamaan alkuperäistä merkkiainetta (eng. parent fraction) sen radiometaboliiteista. PET-kamera pystyy havaitsemaan vain radioaktiivisen säteilyn, mutta se ei kerro, mikä merkkiaine sen tuottaa. On hyvä selvittää merkkiaineesta erillään, vaikuttavatko radiometaboliitit PET-kuvaan, jos merkkiaine metaboloituu radiometaboliiteiksi nopeasti ja näin kuvissa havaittavasta säteilystä suuri osa aiheutuu radiometaboliiteista, Näin pystytään korjaamaan PET-kuvat tunnettujen radiometaboliittien mukaisesti.

Metaboliitit mitataan verestä eroteltavasta supernatantista, josta eroteltu veren kaikki proteiinit, jotta voidaan varmistaa, että merkkiaine pystyisi kulkeutumaan aivoihin. Jos merkkiaineet sitoutuisivat veren muihin osiin, eivät ne pääsisi kulkeutumaan mitattavaan kasvaimen tai aivoihin. Tämä johtuu siitä, että veren puna- ja valkosolut ovat niin isoja kulkeutumaan verisuonten seinämien läpi ja täten pääsemään mitattavaan alueeseen. HPLC-laitteisto voisi myös mahdollisesti hajota, jos siihen injektoidaisiin verta. HPLC on analyysitekniikka, joka perustuu korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan[3].

1.1 Radiofarmaseuttisten valmisteiden stabiilisuuden analysointi plasmassa

Lääkeaineen proteiinisisitoutuminen plasmassa (eng. plasma-protein binding, PPB) tarkoittaa radiofarmaseuttisen merkkiaineelle määritettävää suuretta, affiniteettia, joka kertoo missä määrin merkkiainetta sitoutuu veriplasman proteiineihin[4]. Sitä analysoidaan tehokkaan lääkeainepitoisuuden säätelyssä. Äkillinen vapaan lääkeaineen pitoisuuden kasvu elimistössä voi aiheuttaa toksisuutta ja vaatia näin annoksen säätöä. Vapaan lääkeaineen pitoisuus on myös hyödyllistä tietää arvioitaessa lääkepitoisuutta, joka voi johtaa metaboliaan liittyviin lääke-lääke-interaktioihin. Sairauksia, kuten syöpiä, mallinnetaan laajasti eläimillä ennen kuin tutkittava yhdiste voidaan viedä kehitykseen. Sitoutumattoman lääkeaineen pitoisuus ja siten PPB-tiedot eri lajeilla ovat hyödyllisiä, kun määritetään turvallisuusmarginaaleja sekä valittaessa ensimmäisen ihmiskokeen annosta ja tehokkaan ihmiskokeen annosta. [5]

Lääkeaineen tulisi olla sitoutumaton plasman proteiineihin, jotta se voi supernatantin mukana kulkeutua kohdesoluun tai molekyyliin. PPB-tiedoilla voidaan arvioida radiofarmaseuttisen aineen toimivuutta ja mahdollisuuksia menestyä sen käyttökohteessa.

Aivojen PET-kuvauksessa radiofarmaseuttisen aineen on pystyttävä ylittämään veriaivoeste. Radiofarmaseuttinen aine kuljetetaan aivoihin veren plasmassa. Veriaivoeste rajoittaa tehokkaasti polaaristen ja vesiliukoisten lääkeaineiden pääsyä keskushermostoon, mikä luo merkittävän esteen lääkkeiden kulkeutumiselle. [6] Jos tutkittava alue on jokin muu kuin aivot, radiofarmaseuttisen aineen ei ole välttämätöntä ylittää veri-aivoestettä.

Jos radiofarmaseuttinen lääke hajoaa nopeasti plasmassa, se tarkoittaa, että sen tehokkuus myös in vivo on heikko. Plasmassa havaittava epävakaus voi johtaa harhaanjohtaviin in vitro-tuloksia, mikä voi vaikeuttaa esimerkiksi plasman proteiineihin sitoutumista koskevien tietojen tulkintaa. Toisin sanoen plasmassa havaittava merkkiaineen epästabiilisuus voi olla haitallista, koska lääkeaineen pitoisuus in vivo vähenee, mikä vaikuttaa lääkkeen tehoon. [7]

1.2 Tutkimuksen toteutus

Tutkimukseen käytettyjä julkaisuja on etsitty Google Scholar -hakupalvelusta hakusanoja ja -lauseita, kuten ”stability evaluation methods” ja ”plasma protein binding”, käyttämällä. Tietoa triviaaleista asioista, kuten HPLC, TLC ja UF-kalvot, on etsitty myös googlen hakukoneella käyttämällä kyseisiä käsitteitä. Innovaatioihin liittyviä tekoälyartikkeleita on etsitty käyttämällä hakusanoja ja -lauseita ”analysis with artificial intelligence”, ”tekoäly metabolia”, ”tekoäly analysoinnissa”, ”AI and data analytics” ja ”PET-image analysis with AI”.

2 Menetelmät

2.1 Näytteiden valmistelu

2.1.1 Plasma

Kromatografisia analyysejä varten Eppendorf-putkeen pipetoidaan plasmaa ja asetonitriiliä suhteessa 1:2 plasmaproteiinien saostamiseksi. Seosta vorteksoidaan noin 10 sekuntia ja sentrifugoidaan (12 100 x g, 90 s), ja näin saatava supernatantti kerätään radio-TLC-analyysia varten.

Plasmanäyte valmistetaan käyttämällä proteiinisaostusta, ja siihen on valittu plasman ja asetonitriilin suhteeksi 1:2 v/v, jotta plasmaproteiineja saadaan saostettua mahdollisimman paljon ja samalla näytteen radioaktiivisuuspitoisuus pysyy mahdollisimman suurena optimaalisen lähtöfraktion kvantifioinnin kannalta. Saostuksen tarkoituksena on mahdollistaa optimaalinen kromatografinen erotus vähentämällä matriisia TLC-levyn ylikuormituksen estämiseksi. Tämä vaikutus helpottaa näytteen absorbointia TLC-levylle ennen eluointia, koska yleensä C-18-modifioidut TLC-levyt eivät absorboi vesipitoisia näytteitä hyvin. Lisäksi proteiinien konformaation muuttaminen orgaanisella liuottimella vapauttaa analyyttien ja proteiinien välisen sitoutumisen. Asetonitriili lisää myös lipofiilisten analyyttien liukoisuutta supernatanttiin sen sijaan, että ne sitoutuisivat proteiinipellettiin. Nämä vaikutukset maksimoivat supernatantin radioaktiivisuuskonsentraation lisäämällä uutotehokkuutta, mikä auttaa metabolia-analyysiä parantamalla signaali-kohinasuhdetta ja sisällyttämällä kaikki plasmassa olevat komponentit analyysiin. Tämä on erityisen tärkeää, sillä eri yhdisteet ovat suurelta osin sitoutuneita plasman proteiineihin eri suhteissa, joka on huomioitava analyysiä tehdessä. [8]

2.1.2 Aivot

TLC-mittauksia varten aivonäytteet valmistetaan leikkaamalla aivokudosta leikkeleiksi. Noin kolmannes aivoista homogenisoidaan TLC:n liikkuvaan vaiheeseen. Homogenisoitu näyte sentrifugoidaan (12,100 x g, 90 s), ja kuten verinäytteissäkin, aivonäytteen supernatanttia käytetään TLC-analyysiin. [8] Merkkiaineen stabiilisuutta tutkitaan aina veressä sekä kohdekudoksessa, koska mahdollinen metabolia voi tapahtua eri tavalla erilaisissa soluissa.

2.2 HPLC ja TLC näytteiden analysointi

RadioTLC on menetelmä radiofarmaseuttisten valmisteiden määrittämiseksi ohutkerroskromatografialla. Tässä analyysimenetelmässä on ohut levy, jossa tutkittu seos liikkuu huokoisessa aineessa liuottimen avulla. Eri aineet kulkevat siinä eri tavoin ja näin havaitaan erot näytteiden välillä.[9] Näytteet liukenevat liuottimeen ja kiinnittyvät niille tunnusomaisin väliajoin levyn pintaan. Kiinnittyminen johtuu näytteiden ja levyn pintamateriaalin välisistä van der Waalsin vuorovaikutuksista, dipoli-dipoli-vuorovaikutuksista, vetysidoksista ja kemisorptiosta. Kemisorptiossa näyte reagoi levyn pintamateriaalin kanssa. Aineet voidaan tunnistaa esimerkiksi värin perusteella tai UV-valolla. [22]

RadioHPLC on toinen menetelmä radiofarmaseuttisen valmisteen yhdisteiden erottamiseksi. Tässä menetelmässä edellytetään, että yhdisteet liukenevat liuottimeen tai liuotinseokseen, jota laitteisto kestää. HPLC:tä on kahdenlaista: NP-HPLC (normaalifaasi) ja RP-HPLC (käänteisfaasi). Kun kiinteä faasi on polaarimpi kuin liikkuva faasi, kyseessä on NP-HPLC. Liikkuvana faasina käytetään orgaanisten liuottimien seoksia. Ei-polaariset yhdisteet eluoituvat kolonnissa ennen polaarisia yhdisteitä. NP-HPLC:tä ei käytetä yhtä paljon kuin RP-HPLC:tä. Kyseessä on RP-HPLC, kun liikkuva faasi on polaarimpi kuin kiinteä faasi. Tässä tapauksessa polaariset yhdisteet eluoituvat nopeammin. Liikkuva faasi on tavallisesti veden ja vesiliukoisen orgaanisen liuottimen seos. HPLC järjestelmän viimeinen osa on detektori. Yleisimmin käytetyt detektorit ovat UV-, UV-VIS-, fluoresenssi-, sähkökemialliset ja taitekerroin(IR)-detektorit. IR-detektori on huomattavasti vähemmän herkkä kuin UV-detektori ja se on myös herkkä lämpötilan vaihteluille kromatografian aikana. Nykyään käytetään myös paljon massaspektrometriaa nestekromatografidetektorina. [10]

RadioHPLC vaatii kalliita laitteita, enemmän liuottimia ja kaikkien piikkien yksilöllistä vaimenemiskorjausta. Toistaalta radioHPLC:llä on joitain etuja, kuten monipuolisemmat erotusmahdollisuudet esimerkiksi gradienttimenetelmien vuoksi. Alhainen radioaktiivisuuspitoisuus ja pienet näytteet edellyttävät erittäin herkkiä ja lineaarisia radioaktiivisuuden havaitsemiskykyjä. Nämä ongelmat eivät liity radioTLC menetelmään, koska alhaisten radioaktiivisuuspitoisuuksien näytteiden radioaktiiviteetin kvantitointi digitaalisella autoradiografialla on lineaarista laajalla radioaktiivisuusalueella. [8]

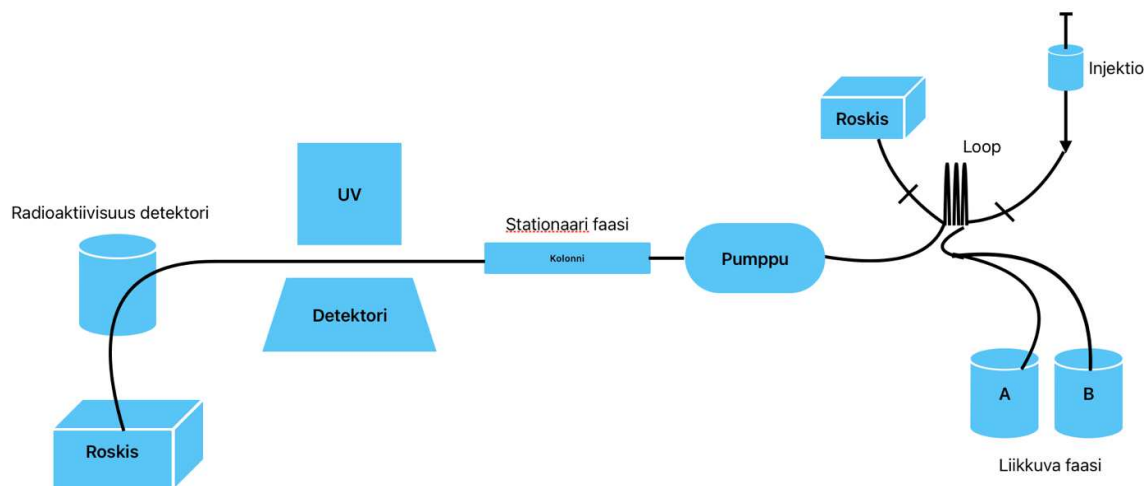
Aika plasman erottelusta siihen, että kehitetty TLC-levy, jossa on standardi, plasma, aivosupernatantti sekä kudokset, asetetaan valotuskasettiin voi olla niinkin vähän kuin 12 minuuttia. Useita näytteitä useista eri kohteista voidaan levittää samalle levyille ja analysoida samanaikaisesti, mikä on valtava etu. Myös useita levyjä voidaan kehittää samanaikaisesti.[8]

Ennen kuin saaduista tuloksista voidaan olla täysin varmoja, tulee vaihtoehtoisia analyysimenetelmiä kehittää molemmille HPLC- ja TLC-menetelmille. Menetelmien tulee olla optimoituja spesifisesti kyseessä olevalle merkkiaineille ennen kuin radioanalyysijä ristiinvalidoidaan radiofarmaseuttisten lääkkeiden kliinisen toteutuksen laadunvalvonnan kehittämisen aikana. [11]

2.3 Metaboliittien määrittäminen

Plasman ja aivojen näytteiden alkuperäinen muuttumaton radiofarmaseuttinen aine (eng. parent fraction) analysoidaan käyttämällä radioTLC:tä sekä radioHPLC:tä. Aarnio et al. ovat kehittäneet merkkiaineelle [¹⁴C]SMW139 radioTLC:tä hyödyntävän menetelmän metaboliittien määrittämiseen. He toteavat parhaaksi käyttää Silica gel 60 RP-18 TLC-levyä ja sen ajossa liikkuvana faasina asetoni-triiliini, vesi ja trifluorietikkahapon seosta tilavuussuhteessa 65:35:0,1. TLC-levyä tulee kehittää, kunnes migraatioetäisyys on 4 senttimetriä. Kehitetty ja valokuvattu levy altistetaan poistetulle autoradiografiakuvauslevylle noin tunniksi, jotta saadaan rekisteröityä erotettujen radioaktiivisten yhdisteiden jakautuminen. Kuvauslevy skannataan tämän jälkeen laserilla käyttäen fosforikuvauslaitetta ja analysoidaan käyttämällä autoradiografialle suunniteltua kuvankäsittelyohjelmaa. Autografiassa käytetty kuvantamislevy varastoi radioaktiivisuudesta tulevan energian itseensä, joka sitten luetaan kuvauslaitteella. Näkyvällä valolla voidaan vapauttaa tämä varastoitunut energia, jonka fosforikuvauslaite havaitsee. Tämä varastoitunut energia ilmoitetaan yleensä fotostimuloituna luminenssina (PSL). Prosessista saadusta kuvasta analysoidaan muuttumattoman merkkiaineen sekä radiometaboliittien PSL-arvo ja verrata näitä koko plasmanäytteen PSL-arvoon. Näin saadaan muuttumattoman merkkiaineen sekä radiometaboliittien osuus näytteestä. Lisäksi autoradiografia-analyysissä on korjattu taustaradioaktiivisuus. [8] Esiteltyä spesifistä menetelmää voidaan pääpiirteittäin käyttää myös muiden merkkiaineiden metaboliittien määrittämisessä, mutta ne voivat tarvita erilaisia menetelmiä, kuten eri TLC-levyn ja eri liikkuvan faasin.

RadioHPLC-analyysissä HPLC-laitteistoon (kuva 1) injektoidaan plasma sekä aivonäytteet erilisille ajoille. Käytettäessä käänteisfaasilaitteistoa poolisemmat merkkiaineen metaboliitit, tulevat näkymään graafissa ennen merkkiaineen parent fraction piikkiä. HPLC-laitteisto vain erottelee eri liukoisuusominaisuudet omaavat näytteen osat toisistaan, mutta se ei kerro metaboliittien ominaisuuksista muuten. [10]



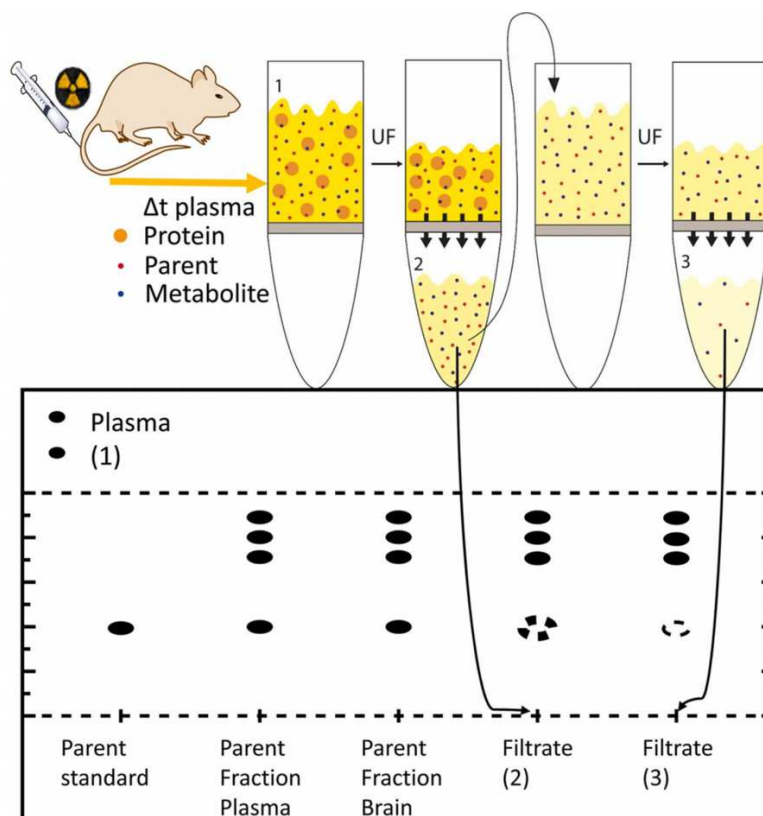
Kuva 1. HPLC-laitteisto

2.4 Radiofarmaseuttisen aineen sitoutumisen proteiiniton osuus

Lääkeaineen proteiiniton osuuden (eng. protein-free fraction) määrittämiseksi in vivo - plasmanäytteen radioaktiivisuuspitoisuus mitataan levittämällä tunnettu määrä plasmaa kahdesti TLC-levyn yläosaa, liikkuvan faasin eturajan yläpuolelle. Autoradiografian avulla laskettiin PSL eli tilavuuspitoisuus. Plasmassa olevan emoaineen (eng, parent tracer) analyysin tuloksista voidaan määrittää emoaineen ja sen metaboliittien pitoisuudet plasmassa. [8]

Proteiinista vapaan molekyylin ja sen proteiinista vapaiden radiometaboliittien erottamiseen proteiiniin sitoutuneista käytetään 10 kDa UF-puoliläpäisevää kalvoa. UF laite on kalvonerotustekniikalla tuotettu suodatuslaite, jolla voidaan erotella liuoksia tai puhdistaa niitä [12] . Vähintään 80 uL plasmaa käytetään analyysin suorittamiseen, mukaan lukien kalvon korjausanalyysiin tarvittava plasma. Plasmaa sentrifugoidaan (14 100x g, 7 minuuttia), jotta saadaan vähintään 40uL suodos (eng. filtrate). Tämä suodos siirretään toiseen samanlaiseen

UF-laitteeseen ja sentrifugoidaan neljä minuuttia, jotta saadaan vähintään 15uL uutta suodosta. Samalla alkuperäistä plasmaa sentrifugoidaan lisää, jotta saadaan enemmän ensimmäistä suodosta. Radioaktiivinen standardi alkuperäisestä emoaineesta, plasmanäyte ja aivonäytteen supernatantti sekä ensimmäinen ja toinen suodos levitetään saman TLC-levyn levityslinjalle. Kuivattu levy kehitetään, digitalisoidaan ja analysoidaan. Kuva 2. alla on otettu artikkelista ja siinä havainnollistetaan TLC-analyysiä. [8]



Kuva 2. TLC-analyysin mallinnus

TLC-levystä voidaan arvioida siis metaboliittien sekä proteiinisitoutumisen määrä plasmassa sekä aivoissa.

2.5 Halutut tulokset

Tuloksissa halutaan olevan mahdollisimman vähän merkkiaineen radiometaboliitteja. Radiometaboliittien tunnistamisen tarkoituksena on määrittää alkuperäisen radiomerkkiaineen määrä plasmassa ja joko sulkea pois radiometaboliitin pääsy aivoihin tai korjata sen kertyminen perifeerisiin kudoksiin eli ääreishermoston kudoksiin. PET-kuvantamisessa merkkiaineen radiometaboliittien muodostuminen voi olla huolestuttavaa, koska radiometaboliset tuotteet voivat jakautua kehossa eri tavalla kuin varsinainen radioaktiivinen merkkiaine, mikä voi johtaa

merkittäviin eroihin jakautumiskuvissa. [13] Radiometaboliakokeissa halutaan siis selvittää merkkiaineen mahdolliset metaboliitit sekä niiden positiivinen ja negatiivinen käyttäytyminen kehossa. Uutta ihmisiin injektoidavaa PET-kuvantamiseen käytettävää merkkiainetta kehittäessä on turvallisinta löytää merkkiaine, joka ei metaboloidu tai metaboloituu vain vähän, ja näin sen radiometaboliitit eivät voi aiheuttaa ihmisessä vastetta.

Proteiinisitoutuminen plasmassa tulisi olla merkkiaineelle mahdollisimman vähäistä. Merkkiaineen mahdollinen sitoutuminen plasman proteiineista tapahtuu pääosin albumiiniin. Proteiinisitoutuminen ei kuitenkaan merkkiaineelle ole toivottavaa, sillä vain sitoutumattomalla osiolla merkkiaineesta eli vapaalla fraktiolla on farmakodynaamista merkitystä. Jos merkkiaine sitoutuu plasman proteiineihin, ei sillä ole mahdollisuutta kulkeutua kohdesolukkoon ja toimia PET-kuvauksessa. Joillain merkkiaineilla proteiineihin sitoutuessa voi mahdollisesti olla interaktioita. Näin ollen merkkiaineella voi olla vaikutusta elimistöön, joka ei ole tavoiteltavaa. [14]

3 Tulevaisuus

3.1 Tulosten hyödyntäminen

Metaboloitumisen analysointi laboratoriomenetelmin ohjaa tutkimuksen etenemistä kohti tehokkaampia tutkimusvalintoja. In vitro -metaboliadatan avulla voidaan ennustaa mahdollisimman hyvin merkkiaineen käyttäytymistä ihmisessä sekä yhteisvaikutuksien todennäköisyyksiä. Merkkiaineen kehittäjille jää tällöin in vitro -tulosten perusteella resursseja tutkia muita mahdollisia merkkiaineita, jos yhdisteen metaboliset piirteet eivät ole toivottuja. Lisäksi eläinkokeiden tarpeen arviointi on rationaalisempaa, kun tiedetään ihmisen ja koe-eläinten metabolian yhtäläisyyksistä ja eroista tutkittavan merkkiaineen kohdalla. [15] In vitro -metaboliadatalla pystytään ennustamaan merkkiaineen toiminnan yksilöllistä vaihtelua[16]. Metabolia vaikuttaa merkittävästi siihen, miten radiofarmaseuttinen aine käyttäytyy elimistössä ja sen seurauksena määrää radiofarmaseuttisen aineen vaikutuksen ja keston. Metaboliaan vaikuttaa lukuisat sekä geneettiset että ympäristötekijät.[17]

Vastaavalla tavalla kuin metaboliadatallakin niin plasman proteiineihin sitoutumistutkimustulosten perusteella voidaan arvioida radiofarmaseuttisen aineen sopivuutta PET-kuvantamisen merkkiaineeksi. Plasman proteiinit eivät tuota farmakologista vastetta elimistöön, mutta samalla merkkiaine ei myöskään pääse kulkeutumaan kohdesoluunsa. Jos merkkiaine sitoutuu voimakkaasti plasmaproteiineihin, tulee se huomioida injektoitavan merkkiaineen annoksen tilavuuden kasvattamisella. [18] Vapaan lääketeorian (eng. free drug theory) mukaan ilman energiaa vaativissa prosesseissa, vakaan tilan tasapainon saavuttamisen jälkeen vapaan lääkeaineen pitoisuus plasmassa on yhtä suuri kuin vapaan lääkeaineen pitoisuus kudosten farmakologisissa kohdereseptoreissa. [4]

3.2 Tekoälyn käyttö analyysissä

Tekoälyn (eng. artificial intelligence) sovelluksista erityisesti koneoppimista olisi mahdollista hyödyntää datan analysoinnissa. Koneoppimisen (eng. machine learning) hyödyntämiseksi ja kouluttamiseksi tarvitaan kuitenkin paljon dataa ja tietoa. [19]. Koneoppimisalgoritmit ovat hakumenetelmiä, jotka etsivät koulutusaineiston eli tässä tapauksessa metaboliadatan perusteella sopivan hypoteesin. Algoritmien optimoinnissa käytetään yleensä gradienttipohjaisia matemaattisia menetelmiä. Ohjelma, jota datan analysointiin käytetään,

oppii esimerkkiaineiston perusteella tekemään päätöksiä. Tällaisia päätöksiä voivat olla esimerkiksi, onko merkkiaineella metaboliitteja tai onko PET-kuvien perusteella merkkiaine kulkeutunut haluttuun kohdekudokseen. [21]

Tekoälysovellus vaatii eri viranomaisten luvat, jotta sitä voitaisiin käyttää kliinisissä tutkimuksissa[19]. Ensimmäiset tekoälypohjaiset kuvien analysointisovellukset ovat kuitenkin jo saatavilla kliiniseen käyttöön. Tulevaisuudessa tekoälyn avulla voidaan hyödyntää potilaan aikaisempien kuvien tietoja yhdistäen niitä uusien kuvien antamiin tietoihin. [20]

4 Johtopäätökset

Katsauksessa oli tarkoituksena selvittää radiofarmaseuttisille aineille tehtävän menettelyn menetelmät ja tavoitteet, jotta aine voitaisiin ottaa mahdollisesti käyttöön PET-kuvantamisen merkkiaineena.

HPLC-menetelmää voidaan vaivatta hyödyntää merkkiaineen metaboliittien havaitsemiseen plasma- sekä aivonäytteistä. Useimmiten tutkimuksissa käytetään käänteisfaasi nestekromatografiaa, jonka takia alkuperäistä merkkiainetta vesiliukoisempien metaboliittien graafipiikit tulevat ajon aikana aikaisemmin. Tavoitteena kuitenkin on, ettei merkkiaine metaboloituisi plasmassa eikä kohdesolukossa.

TLC-menetelmää hyödynnetään merkkiaineen proteiinisitoutumisen arvioimiseen plasmassa, kuten kuva 1 havainnollistaa. Näytteitä valmistetaan alkuperäisestä näytteestä suodattamalla, jonka vuoksi TLC-levyllä ajettavista näytteistä voidaan laskea suoraan proteiinisitoutumisen määrä.

HPLC- ja TLC-menetelmät osoittautuivat toimiviksi ja luotettaviksi menetelmiksi analyysin tekemiseen, kunhan molemmat analyysimenetelmät optimoidaan tutkittavalle merkkiaineelle. Tulosten in vitro on oltava varmoja, jotta merkkiaineiden kehitystä kohti kliinisiä kokeita voidaan jatkaa.

Tutkimuksista tulee analysoitavaksi suuria määriä dataa. Tätä helpottamaan tekoäly voidaan integroida analyysiprosessiin mukaan. Tekoäly tarjoaa tehokkaita ja luotettavia laskennallisia malleja suuren datan käsittelyyn ja mahdolliseen automaattiseen keräämiseen laitteistoista. Tekoälyn käyttäminen tutkimuksissa kuitenkin aina vaatii viranomaisten lupaa. Tekoälyä kuitenkin käytetään jo PET-kuvien analysoinnin tukena, joten tulevaisuudessa on todennäköistä, että myös muiden merkkiaineen kehittämisprosessin osien tutkimustulosten analyysivaihetta kehitetään tekoälyn avulla.

Lähteet

- [1] ”PET-kuvantaminen - Älykäs teknologia - Metropolia Confluence”. Viitattu: 23. lokakuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <https://wiki.metropolia.fi/display/alykas/PET-kuvantaminen>
- [2] H. Raunio, K. Husgafvel-Pursiainen, S. Anttila, E. Hietanen, A. Hirvonen, ja O. Pelkonen, ”Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-a review”, *Gene*, vsk. 159, nro 1, ss. 113–121, kesä 1995, doi: 10.1016/0378-1119(94)00448-2.
- [3] E. Wong, ”HPLC-analyysimenetelmien kehitys Tunnetuille pienmolekyyleille”.
- [4] T. Bohnert ja L.-S. Gan, ”Plasma protein binding: From discovery to development”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vsk. 102, nro 9, ss. 2953–2994, 2013, doi: 10.1002/jps.23614.
- [5] T. Bohnert ja L.-S. Gan, ”Plasma protein binding: From discovery to development”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vsk. 102, nro 9, ss. 2953–2994, syys 2013, doi: 10.1002/jps.23614.
- [6] R. E. Olson ja D. D. Christ, ”Chapter 33. Plasma Protein Binding of Drugs”, teoksessa *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, vsk. 31, J. A. Bristol, Toim., Academic Press, 1996, ss. 327–336. doi: 10.1016/S0065-7743(08)60472-8.
- [7] ”Plasma Stability”, Evotec Website (English). Viitattu: 23. lokakuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <https://www.evotec.com/en/drug-metabolism/plasma-stability>
- [8] R. Aarnio *ym.*, ”Novel plasma protein binding analysis method for a PET tracer and its radiometabolites: A case study with [11C]SMW139 to explain the high uptake of radiometabolites in mouse brain”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vsk. 219, s. 114860, syys 2022, doi: 10.1016/j.jpba.2022.114860.
- [9] ”Virtuaalinen laboratorio-opas”. Viitattu: 6. marraskuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <http://virtuaali.tkk.fi/fi/orgaaninenkemia/labraopas/metodit/reakseuranta/TLC/TLC.htm>
- [10] ”Analyysimenetelmät 2.6. Nestekromatografia”. Viitattu: 23. lokakuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmät_2-6_nestekromatografia.html
- [11] E. L. Hooijman *ym.*, ”Radiolabeling and quality control of therapeutic radiopharmaceuticals: optimization, clinical implementation and comparison of radio-TLC/HPLC analysis, demonstrated by [177Lu]Lu-PSMA”, *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, vsk. 7, nro 1, s. 29, marras 2022, doi: 10.1186/s41181-022-00181-0.
- [12] ”UF-kalvot | Ultrasuodatus | Grönmark”. Viitattu: 6. marraskuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <https://www.gronmark.fi/tuote/uf-kalvot/>
- [13] K. K. Ghosh, P. Padmanabhan, C.-T. Yang, S. Mishra, C. Halldin, ja B. Gulyás, ”Dealing with PETradiometabolites”, *EJNMMI Res*, vsk. 10, nro 1, s. 109, syys 2020, doi: 10.1186/s13550-020-00692-4.
- [14] ”Lääkehoidon opintojakso”. Viitattu: 2. joulukuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: http://eosaja.hamk.fi/oppimisaihiot/koulutusohjelmat/laakehoito/farmakologia/farmakoki_netikka_2.htm
- [15] ”Mitä tiedämme lääkeaineiden metaboliasta”. Viitattu: 23. lokakuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <https://www.duodecimlehti.fi/duo80230>
- [16] H. Järvinen, ”SYTOKROMI P450 2C19- TAI SYTOKROMI P450 2D6 - GENOTYYPATUT IHMISEN MAKSAN MIKROSOMIT LÄÄKEAINEIDEN FARMAKOKINETIIKASSA ESIINTYVÄN YKSILÖLLISEN VAIHTELUN ENNUSTAMISESSA”.

- [17] Ullapitkanen, ”Lääkkeiden imeytymiseen vaikuttaa moni asia”, Finnilco Ry. Viitattu: 2. joulukuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <https://www.finnilco.fi/post/lääkkeiden-imeytymiseen-vaikuttaa-moni-asia>
- [18] ”RLO: Drug distribution : Plasma proteins”. Viitattu: 2. joulukuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: https://www.nottingham.ac.uk/nursing/sonet/rlos/bioproc/plasma_proteins/page_six.html
- [19] ”Tekoäly ja mikrobilääkeresistenssi”. Viitattu: 2. joulukuuta 2024. [Verkossa]. Saatavissa: <https://www.duodecimlehti.fi/duo18299>
- [20] D. Hellwig, N. C. Hellwig, S. Boehner, T. Fuchs, R. Fischer, ja D. Schmidt, ”Artificial Intelligence and Deep Learning for Advancing PET Image Reconstruction: State-of-the-Art and Future Directions”, *Nuklearmedizin*, vsk. 62, nro 6, ss. 334–342, marras 2023, doi: 10.1055/a-2198-0358.
- [21] https://moodle.utu.fi/pluginfile.php/3303758/mod_resource/content/2/Luento5JohdatusKoneoppimiseen.pdf
- [22] https://peda.net/p/myllyviita/spektroskopia/o3ko4aral/ara:file/download/efc4de90cc06693d2947af43d93721e1e8f2dcb0/Orbitaali3_2019_AineenRakenteenAnalyysimenetelmat.pdf