

ARTYKUŁY

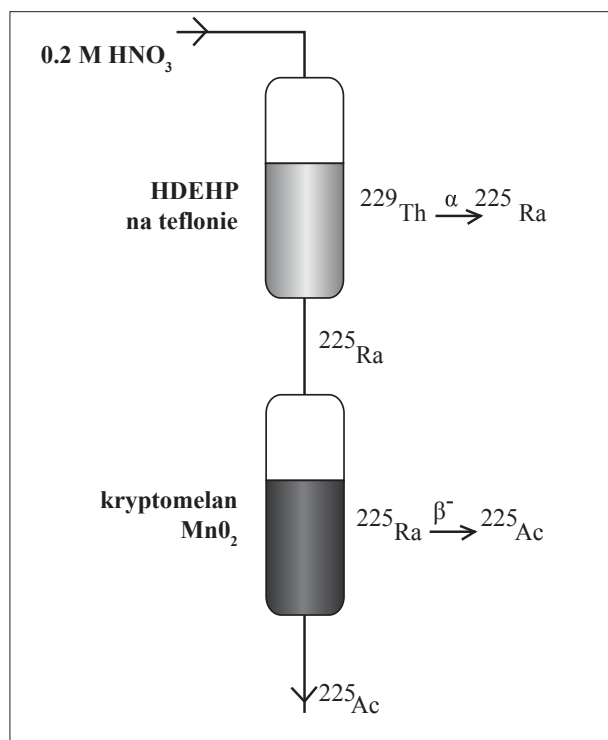
BADANIA CHEMICZNE W INSTYTUCIE CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ NAD PROJEKTOWANIEM I SYNTEZĄ NOWYCH RADIOFARMACEUTYKÓW

Aleksander Bilewicz, Leon Fuks, Ewa Gniazdowska, Agata Kasperek, Przemysław Koźmiński, Seweryn Krajewski, Edyta Leszczuk, Monika Łyczko

W latach 70. oraz 80. w Zakładzie Radiochemii Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej prowadzono prace badawcze głównie w dwóch kierunkach: podstawowe prace dotyczące chemii koordynacyjnej oraz prace aplikacyjne związane z uruchomieniem pierwszej polskiej elektrowni jądrowej w Żarnowcu. Nagłe przerwanie w roku 1990 programu budowy siłowni jądrowych w Polsce postawiło wtedy młody, ale doświadczony już w tematyce chemii jądrowej, zespół przed koniecznością zmiany tematyki badawczej. Postanowiono wówczas kontynuować tematykę związaną z nowymi metodami rozdzielczymi, szczególnie z zastosowaniem selektywnych jonitów. Potencjalne zastosowanie tych badań zostało jednak ukierunkowane na analizę i oczyszczanie wód oraz odpadów przemysłowych.

Jednocześnie w tym samym czasie, na bazie posiadanego dużego doświadczenia w dziedzinie radiochemii, w Zakładzie Radiochemii IChTJ zaczął się rozwijać nowy temat badawczy ukierunkowany na medycynę nuklearną. Początkowo było to projektowanie nowych generatorów radionuklidów oraz otrzymywanie diagnostycznych/terapeutycznych radioizotopów. Nasze pierwsze prace dotyczyły opracowania generatora $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ (wykorzystano w nim selektywny dla Sr^{2+} kwas poliantymonowy) [1], generatora $^{115}\text{Cd}/^{115\text{m}}\text{In}$ [2] i $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$, w którym zastosowano zsyntezowany w zespole dwutlenek manganu w formie kryptomelanu, wykazujący wyjątkowo wysoką selektywność w stosunku do jonów Rb^+ [3]. Opracowano też nowy, bardzo wydajny generator *alfa* emitera ^{225}Ac (rys. 1) [4].

Równocześnie na zastosowanie w medycynie nuklearnej ukierunkowano także prowadzone wówczas prace dotyczące chemii koordynacyjnej. Ostatecznie w Zakładzie Radiochemii IChTJ powstał zespół pracowników naukowych zajmujący się ważnym w radiofarmacji zagadnieniem, jakim jest trwałe wiązanie otrzymanego radionuklidu z biologicznie czynną w żywym organizmie cząsteczką (tzw. biomolekułą). Ponieważ



Rys. 1. Generator ^{225}Ac opracowany w naszym zespole

większość radionuklidów stosowanych w medycynie nuklearnej to kationy metali, najlepszą metodą połączenia ich z cząsteczkami biologicznie aktywnymi jest utworzenie trwałego kompleksu danego radionuklidu i w takiej formie wiązania go z biomolekułą. Wykorzystując nasze doświadczenie w projektowaniu i syntezie ligandów oraz w metodach badania kompleksów początkowo zajęto się badaniem kompleksowania technetu-99m – najbardziej popularnego diagnostycznego radionuklidu w medycynie nuklearnej. Badania te nabrały rozmachu po trzech wizytach naukowych, finansowanych przez MAEA, w wiodących ośrodkach zajmujących się radiofarmaceutykami technetowymi. Szczególnie inspirujące były wizyty w zespole prof.

Rogera Alberto na Uniwersytecie w Zurichu, gdzie prowadzone były prace nad zastosowaniem nowych kinetycznie inertnych metaloorganicznych kompleksów technetu. Tematyka ta podjęta przez nasz zespół stała się początkiem nowej, ale intensywnie rozwijającej się w IChTJ tematyki badawczej radiofarmacji.

Kolejnym kamieniem milowym w rozwoju badań radiofarmaceutycznych było uzyskanie grantu europejskiego w programie Marie Curie „Transfer of Knowledge” w latach 2004-2008. Pozwoliło to na uczestniczenie w badaniach w najlepszych europejskich ośrodkach radiofarmaceutycznych, takich jak: Uniwersytet w Zurychu i Paul Scherrer Institute w Szwajcarii, Uniwersytet w Moguncji i Instytut Radiofarmacji, HZDR, Rossendorf w Niemczech, Uniwersytet w Goeteborgu i ITN Sacaven w Portugalii. W ramach tego grantu w laboratoriach Zakładu Radiochemii IChTJ, poza naukowcami z wyżej wymienionych instytucji, goszczono także pracowników naukowych z wielu innych, wiodących w dziedzinie radiofarmacji, ośrodków. Uczestnictwo zespołu IChTJ w programie Marie Curie spowodowało rozszerzenie badań o radiofarmaceutyki terapeutyczne oparte na emiterach β^- i α oraz radiofarmaceutyki dla pozytonowej tomografii (PET), a nawiązane kontakty, już po zakończeniu projektu, umożliwiły dalszą współpracę w ramach międzynarodowych bilateralnych programów badawczych.

Badania w dziedzinie radiofarmacji prowadzone przez zespół IChTJ zyskały aplikacyjny charakter po nawiązaniu kontaktów ze środowiskiem medycznym i farmaceutycznym w Polsce, szczególnie z Zakładem Medycyny Nuklearnej Uniwersytetu Medycznego w Warszawie (prof. dr hab. med. Leszek Królicki – Konsultant Krajowy ds. Medycyny Nuklearnej), Zakładem Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Mikiciuk-Olasik – dziekan Wydziału Farmaceutycznego), z instytutami w Warszawie: Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Instytutem Farmaceutycznym i Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN. Nawiązana współpraca pozwoliła ukierunkować prowadzone w IChTJ badania na aktualne potrzeby medycyny nuklearnej w Polsce.

Obecnie w Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej tematykę chemii radiofarmaceutycznej realizuje dziesięć osób, w tym dwie osoby są na stażach poddoktorskich. Prowadzone badania koncentrują się na następującej tematyce: (1) projektowanie i synteza radiofarmaceutyków terapeutycznych z niskoenergetycznymi emiterami β^- , (2) otrzymywanie radionuklidów i synteza radiofarmaceutyków dla pozytonowej tomografii, (3) projektowanie i synteza radiofarmaceutyków

astatowych, (4) synteza biokoniuugatów opartych na nancząstkach znakowanych emiterami α , (5) znakowanie nowych biomolekuł wykazujących powinowactwo receptorowe, (6) komputerowo wspomagane projektowanie leków (CADD). Poniżej przedstawiono aktualnie prowadzone prace oraz plany na przyszłość.

Projektowanie i synteza radiofarmaceutyków terapeutycznych opartych na niskoenergetycznych emiterach β^-

Terapeutyczne wykorzystanie radionuklidów – emiterów promieniowania korpuskularnego jest stosowane od dziesiątków lat. Radionuklid jod-131 jest powszechnie stosowany w terapii chorób tarczycy. Także inne emiterzy β^- , takie jak stront-89, samar-153, lutet-177 czy ren-188 w postaci prostych soli lub ich kompleksów fosfomianowych znalazły szerokie zastosowanie w terapii paliatywnej. W zależności od wielkości chorej tkanki dobiera się radionuklid tak, aby efekt terapeutyczny był optymalny. Tak więc dla dużych guzów nowotworowych najodpowiedniejsze okazały się radionuklidy emitujące wysokoenergetyczne promieniowanie β^- (itr-90, ren-188). Poza już zarejestrowanym preparatem Zevalin® (przeciwciała monoklonalne rituximab znakowane itrem-90), szereg peptydów znakowanych wyżej wymienionymi radionuklidami aktualnie przechodzi testy kliniczne. Jednak w przypadku małych guzów ciągle istnieje duże zapotrzebowanie na radiofarmaceutyki wykazujące efekt terapeutyczny w stosunku do małych zmian nowotworowych rozsianych na dużej powierzchni tkanki, przerzutów nowotworowych lub nowotworów we wczesnym stadium rozwoju. Te warunki mogą spełniać emiterzy miękkiego promieniowania β^- , elektronów Augera oraz promieniowania α . Spośród emiterów niskoenergetycznego promieniowania β^- szersze zastosowanie znalazł jedynie lutet-177. Niestety radionuklid ten w większych aktywnościach jest otrzymywany w reakcji jądrowej (n,γ), co powoduje, że powstały produkt zawiera także atomy nośnika. Otrzymywanie bežnośnikowego lutetu-177 jest wyjątkowo trudne, ponieważ wymaga oddzielenia go od iterbu, który jest pierwiastkiem o prawie identycznych właściwościach chemicznych. Także większość innych proponowanych do terapii niskoenergetycznych i średnioenergetycznych emiterów β^- jest izotopami lantanowców (erb-169, terb-161, tul-167, samar-153, promet-149, holm-161 i holm-166) i podobnie, jak w przypadku lutetu-177, bardzo trudno otrzymać je w formie bežnośnikowej.

Równolegle w IChTJ prowadzono badania z dwoma bardzo obiecującymi niskoenergetycznymi emiterami promieniowania β^- , skandem-47 i rodem-105.

W odróżnieniu od radiolantanowców, te radionuklidy można stosunkowo łatwo oddzielić od naświetlonego materiału tarczowego, odpowiednio tytanu-47 i ruteniu-104. Celem zaplanowanych prac doświadczalnych było zbadanie możliwości otrzymywania ^{47}Sc w reakcji $^{47}\text{Ti}(n,p)^{47}\text{Sc}$ w reaktorze Maria w Świerku poprzez naświetlanie tarczy tytanowej (wzbogaconej w izotop ^{47}Ti) w strumieniu neutronów prędkich ($E > 1 \text{ MeV}$), a następnie opracowanie prostej metody wydzielenia z tarczy uzyskanego radionuklidu. Zaproponowano zastosowanie jako tarczy soli litowej fluorkowego kompleksu tytanu, $\text{Li}_2^{47}\text{TiF}_6$, która charakteryzuje się dużą odpornością termiczną oraz dobrą rozpuszczalnością w rozcieńczonych roztworach kwasów mineralnych. Stosując $\text{Li}_2^{47}\text{TiF}_6$ jako tarczę opracowano prostą metodę wydzielenia skandu-47 z naświetlonej neutronami prędkimi tarczy [5]. Sposób otrzymywania ^{47}Sc z tarczy $\text{Li}_2^{47}\text{TiF}_6$ został zgłoszony do ochrony patentowej [6]. Ewentualną produkcją radionuklidu skandu-47 zainteresował się zespół Reaktora Maria w Świerku i aktualnie, po odpowiedniej modernizacji kanału naświetlania neutronami prędkimi, istnieje możliwość otrzymania terapeutycznych aktywności skandu-47, rzędu 30-40 GBq.

Innym radionuklidem, którego właściwości jądrowe są zbliżone do właściwości lutetu-177, ale wydzielenie z tarczy jest znacznie łatwiejsze, jest rod-105. W ramach projektu ramowego Europejskiej Współpracy w Nauce i Technologii (COST), zespół pracowników IChTJ uczestniczył w akcji BM0607 dotyczącej celowanej terapii radionuklidowej. Celem badań było opracowanie nowej, prostszej, od już znanych, metody otrzymywania radionuklidu rodu-105 oraz synteza jego kompleksów, trwałych w warunkach fizjologicznych. W opracowanej metodzie do naświetlania w reaktorze zastosowano, zamiast używanego dotychczas metalicznego ruteniu, rozpuszczalną w wodzie sól $(\text{NH}_4)_2[\text{RuCl}_5(\text{H}_2\text{O})]$. Po naświetleniu tarczę rozpuszczano w roztworze kwasu ortonadjudowego, H_5IO_6 , a następnie w podwyższonej temperaturze pozostałość Ru^{3+} utleniało do RuO_4 . Powstały hydrofobowy tetratlenek rodu ekstrahowany był do fazy organicznej (CCl_4) i w ten sposób oddzielany od rodu-105, który pozostawał w fazie wodnej. Przedstawiony powyżej proces został zgłoszony do ochrony patentowej [7].

Kation Rh^{3+} jest miękkim kwasem według teorii Pearsona, dlatego też najodpowiedniejszymi związkami do kompleksowania radionuklidu ^{105}Rh są ligandy zawierające miękkie atomy donorowe, takie jak S, P czy N. Aktualne badania wykazały także, że najtrwalszy kompleks powstaje z cyklicznym tioeterowym ligandem 1,5,9,13-tetratiocykloheksadekan-3,11-diol (16S_4 -diol). Ligand ten posiada cztery donorowe atomy

siarki oraz dwie grupy hydroksylowe wpływające na hydrofilowość kompleksu. Grupy te mogą także służyć jako miejsce chemicznej modyfikacji cząsteczki ligandu w celu przyłączenia biomolekuły.

W przypadku prac z rodem-105 badane były także możliwości wykorzystania w medycynie nuklearnej metaloorganicznych kompleksów rodu(I). Redukcję Rh(III) do Rh(I) za pomocą CO i jednoczesną syntezę dikarbonylkowego rdzenia $\text{Rh}(\text{CO})_2^+$ prowadzono przy zastosowaniu dwóch metod, różniących się sposobem uzyskiwania w środowisku reakcji (*in situ*) substratu CO. W pierwszej metodzie źródłem cząsteczek CO był rozkład termiczny kwasu mrówkowego (HCOOH) – reakcja prowadzona była w temperaturze 95°C , w drugiej zaś – N,N-dimetyloformamid (DMF), a reakcja przebiegała w temperaturze 130°C . Ponieważ w dikarbonylkowych kompleksach rodu(I) dwa miejsca koordynacyjne w pozycji *cis* zajmowane są przez dwie grupy CO, a pozostałe dwa, oczywiście także w pozycji *cis*, są wolne, do syntezy kompleksów $\text{Rh}(\text{CO})_2\text{L}$ wybrane zostały ligandy bidentne, których budowa uwzględniała możliwość przyłączenia do cząsteczki ligandu grupy funkcyjnej, umożliwiającej z kolei przyłączenie biomolekuły. Obie metody wykorzystane zostały następnie do syntezy kompleksów z radionuklidem ^{105}Rh . Syntezy kompleksów $^{105}\text{Rh}(\text{CO})_2\text{L}$ prowadzone w obecności HCOOH zakończyły się niepowodzeniem – na radiochromatogramach nie zaobserwowano nowych pików świadczących o powstawaniu w mieszaninie reakcyjnej produktów reakcji. Przyczyną tego faktu było zbyt niskie stężenie $^{105}\text{Rh}^{3+}$ w mieszaninie reakcyjnej, uniemożliwiające powstawanie pośredniego kompleksu – dimeru $[\text{Rh}(\text{CO})_2\text{Cl}]_2$, i dalej w reakcji wymiany jonów Cl^- na ligand L – powstawanie kompleksu $^{105}\text{Rh}(\text{CO})_2\text{L}$. W przypadku kompleksów $^{105}\text{Rh(I)}$ syntezowanych w środowisku DMF wyniki analiz wykonanych techniką HPLC-RP pokrywają się z wynikami otrzymanymi dla kompleksów z nieaktywnym rodem. Niestety, pojedynczego produktu nie można wydzielić w prosty i szybki sposób, co bardzo ogranicza możliwość wykorzystania tej metody w radiofarmacji.

Aktualnie prowadzone prace z kompleksami $^{105}\text{Rh}^{3+}$ koncentrują się na syntezie i badaniu radiobiokoniugatów, w których radionuklid rodu-105 skompleksowany jest poprzez cztery donorowe atomy siarki bifunkcyjnego makrocyclicznego ligandu $16\text{S}_4\text{-COOH}$. Wykorzystując drugą grupę funkcyjną ligandu zamierzamy połączyć kompleks rodu z biomolekułą (z peptydami – oktreatydem i substancją P). Otrzymane radiobiokoniugaty zostaną wszechstronnie zbadane, zarówno w warunkach *in-vitro*, jak i *in-vivo*.

Ponadto prowadzone są także badania nad możliwością otrzymywania rodu-105 w cyklotronie, w reakcji $^{104}\text{Ru}(d,n)^{105}\text{Rh}$. Pierwsze uzyskane wyniki wskazują już, że terapeutyczne ilości ^{105}Rh będzie można uzyskać tą drogą w małych cyklotronach medycznych dostępnych w wielu ośrodkach PET.

Otrzymywanie radionuklidów oraz synteza radiofarmaceutyków dla pozytonowej tomografii

W ciągu ostatnich kilkunastu lat znacznie udoskonalone zostały metody detekcji promieniowania i komputerowego przetwarzania danych. Dzięki temu diagnostyczne metody medycyny nuklearnej, szczególnie pozytonowa tomografia (PET), są dziś niezastąpionym narzędziem lekarza, zarówno diagnosty, jak i terapeuty, znacznie ułatwiając kontrolowanie przebiegu procesu leczenia.

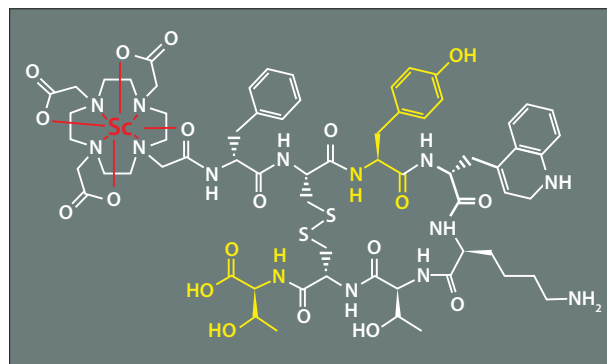
PET jest nowoczesną metodą diagnostyczną, która przez komputerową obróbkę sygnału podaje informację o biochemicznych parametrach patologicznej tkanki oraz o jej dokładnym umiejscowieniu w organizmie. Metoda ta polega na wprowadzeniu do organizmu pacjenta substancji biologicznie czynnej, która wybiórczo akumuluje się w chorych tkankach. Substancja ta znakowana jest emiterym β^+ (np. ^{18}F -fluorodeoksyglukoza, FDG), który rozpadając się emituje pozyton (e^+). W wyniku praktycznie natychmiastowej anihilacji pozytonu z elektronami ośrodka emitowane są dwa kwanty *gamma* o energii 511 keV, rozchodzące się w przeciwnych kierunkach. Kwanty te przenikają otaczające tkanki i rejestrowane są przez odpowiednio umieszczone wokół pacjenta detektory *gamma*. Informacje z detektorów są przesyłane do komputera, który buduje przestrzenny rozkład radionuklidu w ciele pacjenta.

W tomografii pozytonowej stosuje się głównie krótkożyłowe radionuklidy lekkich pierwiastków, takie jak węgiel-11, azot-13, tlen-15, fluor-18 (ten ostatni jest radionuklidem obecnie najpowszechniej używanym w metodzie PET). Wykorzystując te izotopy mamy możliwość syntezy znakowanych prostych związków chemicznych, umożliwiających badania przepływu gazów i cieczy w ciele pacjenta, lub, ulegając metabolizmowi – badania funkcjonowania danego narządu.

W przypadku niektórych komórek nowotworowych, np. przy wysoko zróżnicowanych rakach neuroendokrynnych, wychwytywanie FDG jest znikome lub nie występuje w ogóle. Dlatego też istnieje zapotrzebowanie na inne znakowane radionuklidami β^+ preparaty, którymi mogą być radiobiokoniugaty utworzone z kompleksów metalicznych emiterym β^+ i biologicznie aktywnych cząsteczek (np. analogów somatostatyny), charaktery-

zujących się dużym powinowactwem do receptorów obecnych na komórkach nowotworowych. Potencjalnymi emiterym β^+ , mogącymi znaleźć zastosowanie w technice PET, są radionuklidy: gal-68, itr-86, jod-124, skand-44, tytan-45, miedź-64 i cyrkon-89.

Obecnie w pracach zespołu IChTJ skoncentrowano się na wykorzystaniu w diagnostyce PET nowego, obiecującego radionuklidu – skandu-44. Radionuklid ten charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami jądrowymi ($E_{\beta^+} = 1,5$ MeV, $T_{1/2} = 3,93$ h, wysoka wydajność promieniowania β^+ rzędu 95%), a ponadto ze względu na jego dłuższy niż galu-68 ($E_{\beta^+} = 1,9$ MeV, $T_{1/2} = 67,63$ min) okres połowicznego rozpadu nadaje się on do znakowania nie tylko krótkich peptydów o szybkiej farmakokinetyce, ale również biomolekuł, których biodystrybucja i metabolizm w ciele pacjenta są procesami powolnymi. Kolejną zaletą ^{44}Sc w stosunku do ^{68}Ga jest jego podobieństwo chemiczne do stosowanych w celowanej terapii radionuklidowej ^{90}Y i ^{177}Lu . Prace eksperymentalne wykazały bardzo zbliżone wartości lipofilowości biokoniugatów DOTATATE znakowanych ^{44}Sc , ^{90}Y i ^{177}Lu , podczas gdy lipofilowość ^{68}Ga -DOTATATE jest znacznie mniejsza [8]. Chemiczne podobieństwo izotopów ^{44}Sc , ^{90}Y i ^{177}Lu oraz ich biokoniugatów pozwala na planowanie terapii radionuklidami ^{90}Y i ^{177}Lu na podstawie badań diagnostycznych wykonywanych przy użyciu ^{44}Sc (rys. 2).

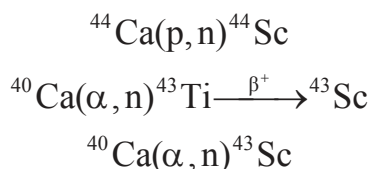


Rys. 2. Radiobiokoniugat ^{44}Sc -DOTATATE

W ramach akcji COST D38 prowadzone były prace dotyczące rozwoju innowacyjnych sond diagnostycznych, którymi między innymi są biomolekuły znakowane skandem-44. Udział w tym międzynarodowym przedsięwzięciu pozwolił prowadzić badania w wiodących ośrodkach europejskich. Dwoje doktorantów z IChTJ uczestniczyło w pracach nad generatorem $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ oraz w pracach obejmujących tematykę znakowania radionuklidem ^{44}Sc stosowanego już w terapii analogu somatostatyny (DOTA-oktreotydu). Prace te

wykonywane były w grupie prof. Röscha na Uniwersytecie Johanna Gutenberga w Moguncji [9,10].

Wspólnie z zakładem IHCP – I.4 Nanobionauki, Ispra, Włochy (Wspólnotowe Centrum Badawcze Komisji Europejskiej, Instytut Zdrowia i Ochrony Konsumenta), prowadzone były badania nad cyklotronową produkcją izotopu skandu-44, a także izotopu skandu-43, który jest również obiecującym emitorem β^+ ($E_{\beta^+} = 1,2$ MeV, $T_{1/2} = 3,89$ h). Radionuklidy te powstają w wyniku następujących reakcji:



Cyklotronowa produkcja skandu-44 ze wzbogaconej w wapń-44 tarczy daje centrom PET możliwość samodzielnej produkcji tego izotopu, bez konieczności zakupu drogiego generatora ${}^{44}\text{Ti}/{}^{44}\text{Sc}$. Zaletami radionuklidu ${}^{43}\text{Sc}$ są niska energia emitowanego promieniowania *gamma* (372,91 keV) i niska intensywność tego promieniowania (23%), a także możliwość zastosowania naturalnej tarczy wapniowej (wapń-40), co znacząco obniża koszt produkcji tego radionuklidu. Jedynym problemem ograniczającym stosowanie radionuklidu ${}^{43}\text{Sc}$ jest konieczność zakupu tego izotopu od jednostek dysponujących cyklotronem zaopatrzonym w źródło cząstek α .

W badaniach eksperymentalnych prowadzonych przez zespół IChTJ w Isprze otrzymano 2.5 GBq ${}^{44}\text{Sc}$, to jest ilość radionuklidu wystarczającą na przygotowanie kilkunastu porcji ${}^{44}\text{Sc}$ -radiofarmaceutyku. Opracowano również prostą i szybką metodę wydzielenia tego izotopu z tarczy wapniowej przy użyciu żywicy chelatującej Chelex 100. Następnie przeprowadzono znakowanie ${}^{44}\text{Sc}$ biokoniugatu DOTA-d-Phe-Cys-Tyr-d-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (DOTATATE) z wydajnością powyżej 98% stosując zaledwie 10 nmoli biokoniugatu, czym potwierdzono wysoką czystość chemiczną otrzymanego radioizotopu. Powyższą procedurę wydzielenia radionuklidu z tarczy zastosowano również w przypadku ${}^{43}\text{Sc}$, a produkt procesu znakowania – radiobiokoniugat ${}^{43}\text{Sc}$ -DOTATATE z wydajnością powyżej 98% uzyskano już przy użyciu 15 nmoli biokoniugatu, co również potwierdziło wysoką czystość chemiczną otrzymanego radioizotopu. Wyniki naszych eksperymentów zachęcają do rozpoczęcia badań przedklinicznych nad zastosowaniem nowego potencjalnego radiofarmaceutyku diagnostycznego – znakowanego ${}^{44}\text{Sc}$ lub ${}^{43}\text{Sc}$ biokoniugatu DOTATATE, który następnie może być bardzo przydatny w planowaniu celowanej terapii radionuklidowej.

Prowadząc prace związane ze znakowaniem koniugatów ${}^{44}\text{Sc}$ zaproponowano innowacyjną koncepcją znakowania biomolekuł, w której pomijany jest etap wydzielenia radionuklidu z materiału tarczowego. Stosunek stałych trwałości kompleksów Sc-DOTA/Ca-DOTA jest rzędu 10^{10} , co umożliwi znakowanie biokoniugatów ${}^{44}\text{Sc}$ bezpośrednio po rozpuszczeniu materiału tarczowego. Taka sama zależność występuje między stałymi trwałości kompleksów Y-DOTA/Sr-DOTA, co sugerowało, że analogicznie jak poprzednio, możliwe będzie znakowanie biomolekuł radionuklidem ${}^{86}\text{Y}$ (emiter β^+ stosowany jest już w badaniach klinicznych) bez uprzedniego wydzielenia go z tarczy strontowej. Dzięki dobrej współpracy z ośrodkiem w Isprze możliwe było przeprowadzenie odpowiednich eksperymentów w tamtejszym laboratorium i potwierdzenie naszej koncepcji wynikami doświadczalnymi (rys. 3). Wydajność znakowania DOTATATE przy użyciu 31 nmoli tego biokoniugatu wyniosła ponad 70% w przypadku radionuklidu ${}^{44}\text{Sc}$ i ponad 95% w przypadku radionuklidu ${}^{86}\text{Y}$. Końcowym etapem zaproponowanej przez zespół procedury jest oddzielenie radiobiokoniugatu od materiału tarczowego, do czego zastosowano kolumny Sep-Pak® C18. W zakresie ostatnio nawiązanej współpracy z Zakładem Fizjologii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Herlev, Dania, planowane są prace nad wdrożeniem radiofarmaceutyków znakowanych ${}^{44}\text{Sc}$ do rutynowych badań klinicznych.

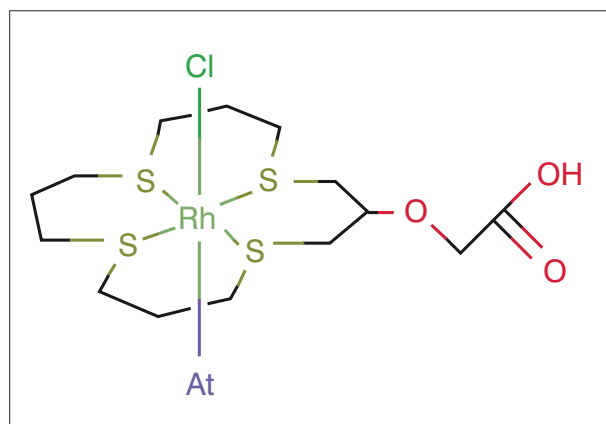


Rys. 3. Laboratorium w Isprze, Włochy (fot. IChTJ)

Projektowanie i synteza radiofarmaceutyków astatowych

Współczesna medycyna nuklearna wykorzystuje w terapii przeciwnowotworowej głównie radiofarmaceutyki oparte na emiterach β^- (itr-90, ren-186 i ren-188, jod-131). Radionuklidy te charakteryzują się wysoką energią promieniowania oraz posiadają stosunkowo duży zasięg w tkance, dzięki czemu mogą znaleźć zastosowanie w terapii dużych guzów. W przypadku małych, rozsianych i często nieoperacyjnych, lub w bardzo wczesnym stadium rozwoju zmian nowotworowych najodpowiedniejszymi preparatami terapeutycznymi wydają się być radiofarmaceutyki oparte na emiterach cząstek α . Tak zwana celowana *alfa* terapia (wykorzystująca radiofarmaceutyki zawierające stosunkowo łatwo dostępne i trwale związane α -emitory) stałaby się doskonałym uzupełnieniem terapii wykorzystującej radiofarmaceutyki zawierające emitory β^- . Spośród emiterów cząstek *alfa* największe znaczenie zyskuje obecnie radionuklid astat-211. Izotop ten produkowany jest w reakcji jądrowej $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$, w cyklotronach, co jest istotnym czynnikiem hamującym zarówno rozwój badań nad radiofarmaceutykami astatowymi, jak i ich szersze zastosowanie w badaniach klinicznych. Konieczny bowiem jest tu akcelerator przyspieszający cząstki *alfa* (wiązkę jonów He^{2+}) do energii ok. 30 MeV. Niemniej od roku 2011 możliwa jest produkcja astatu-211 z wykorzystaniem (po modernizacji) cyklotronu ciężkich jonów pracującego od ponad 15 lat w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów Uniwersytetu Warszawskiego. Kolejnym wyzwaniem w syntezie radiofarmaceutyków astatowych jest uzyskanie trwałego związku ^{211}At w związek chemiczny i połączenie tego związku z biologicznie czynną cząsteczką – wektorem (przeciwciałem monoklonalnym, jego fragmentem lub peptydem), który kierowałby radionuklid astatu do zmienionych nowotworowo tkanek. Znane metody połączenia chlorowców do związków organicznych [11] nie mogą być tu zastosowane, ponieważ astat, w odróżnieniu od pozostałych chlorowców, nie tworzy silnych połączeń z atomami węgla i otrzymane na drodze astatowania radiofarmaceutyki byłyby mało stabilne. Ponieważ niskospinowe kompleksy Rh^{3+} wykazują dużą kinetyczną inertność, a anion At^- , zgodnie z teorią miękkich kwasów i zasad, trwale łączy się z kationem rodu, postanowiono wykorzystać kompleksy rodu z przyłączonym poprzez mostek metaliczny astatem jako prekursorzy przyszłych radiofarmaceutyków astatowych. Związki te, poprzez dodatkowe sfunkcjonalizowanie ligandu, można następnie połączyć z wybraną biomolekułą.

W roku 2003 w Zakładzie Radiochemii i Chemii Jądrowej zostały rozpoczęte, trwające do dziś, badania nad otrzymywaniem i charakteryzacją związków astatu. Jako pierwszy otrzymano kompleks $\text{Rh}(\text{S4-16-ane-diol})^{211}\text{At}$ z tioeterowym ligandem 1,5,9,13-tetratiocykloheksadekano-3,11-diolem (S4-16-ane-diol) [12]. Kompleks ten okazał się trwały, a badania jego biodystrybucji przeprowadzone w Duke University Medical Center (Durham, NC) są bardzo obiecujące [13]. Trwałość wyżej wymienionego kompleksu skłoniła zespół do podjęcia dalszych badań, w których zastosowano, podobny do poprzedniego, ligand dwufunkcyjny 2-(1,5,9,13-tetratiocykloheksadekan-3-yloksyl) kwas octowy (16-ane-S4-COOH). Otrzymany kompleks, poprzez grupę $-\text{COOH}$ ligandu, może zostać połączony z grupą aminową biomolekuły. Metodę otrzymywania kompleksu $\text{Rh}(\text{S4-16-ane-COOH})^{211}\text{At}$ (rys. 4) opracowano w ramach realizacji projektu rozwojowego własnego NCBiR pt. „Znakowanie biomolekuł radionuklidem ^{211}At – otrzymywanie radiofarmaceutyków terapeutycznych dla medycyny nuklearnej” (01.08.2009 – 31.01.2012). Następnie, używając jodu-131 jako analogu astatu, opracowano metodę otrzymywania biokoniugatu kompleksu $\text{Rh}(\text{S4-16-ane-COOH})^{131}\text{I}$ z substancją P(5-11) (neuropeptydem z rodziny tachikinin, który, w postaci pełnego peptydu lub krótszego fragmentu, po wyznakowaniu emiterem α ma ogromne szanse znaleźć zastosowanie m.in. w *alfa* terapii glejaków mózgu). Kontynuując nasze prace zamierzamy przeprowadzić szerokie badania zsyntezowanego biokoniugatu $\text{Rh}[\text{16-ane-S4-COOH}]\text{I-Cl-SP(5-11)}$ pod kątem jego trwałości, powinowactwa receptorowego oraz biodystrybucji na modelach zwierzęcych.



Rys. 4. Proponowany przez nas prekursor radiofarmaceutyków astatowych - $\text{Rh}(\text{S4-16-ane-COOH})^{211}\text{At}$

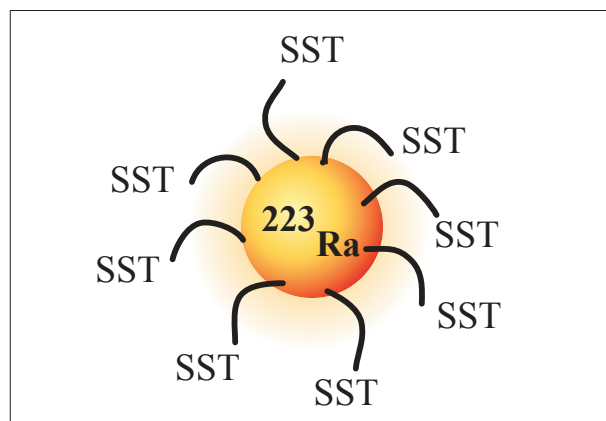
Synteza biokoniugatów opartych na nanocząstkach znakowanych emiterami α

Niektóre radionuklidy posiadają bardzo atrakcyjne dla medycyny nuklearnej właściwości jądrowe, jednakże nie tworzą trwałych połączeń kompleksowych, które pozwoliłyby dalej na ich trwałe związanie z biomolekułą. Do tej grupy można zaliczyć diagnostyczne radionuklidy talu-201, rubidu-82m i rubidu-82 czy strontu-83, które jako kationy pierwszej i drugiej grupy układu okresowego nie tworzą wystarczająco trwałych połączeń chelatowych. Podobnie trudno jest związać z biomolekułą bardzo atrakcyjne radionuklidy terapeutyczne, do których należą β^- emitery: srebro-111, złoto-198 i złoto-199 oraz α emitery: astat-211, rad-223 i rad-224.

Większość α emiterów w wyniku rozpadu tworzy inne stosunkowo długożyjące radionuklidy i utrzymanie takich par radionuklidów: izotop macierzysty \rightarrow produkt α -rozpadu (np. $^{212}\text{Pb} \rightarrow ^{212}\text{Bi}$, $^{225}\text{Ac} \rightarrow ^{213}\text{Bi}$ czy $^{230}\text{U} \rightarrow ^{226}\text{Th}$) w jednym związku kompleksowym jest praktycznie niemożliwe. Dlatego też poszukuje się innych rozwiązań pozwalających na trwałe związanie wymienionych powyżej radionuklidów. Wykorzystuje się tu procesy nanotechnologiczne, które pozwalają na skonstruowanie odpowiednich układów nanocząstkowych, wykorzystywanych następnie jako nośniki radionuklidów. W ostatnim dziesięcioleciu opracowano wiele rodzajów nośników, opartych na nanocząstkach zarówno organicznych (liposomy, micelle, dendrymery) jak i nieorganicznych (nanocząstki złota, tlenku żelaza, srebra, nanozeolity oraz kropki kwantowe).

W badaniach naszego zespołu jako nośniki radionuklidów terapeutycznych będących emiterami cząstek α zastosowano nanocząstki zeolitów oraz tlenku tytanu.

Zeolity są to glinokrzemiany o strukturze krystalicznej, w których obecne są przeciwjony o ładunku +1 lub +2, którymi najczęściej są kationy I i II grupy układu okresowego. Kationy te są labilne i mogą swobodnie poruszać się w sieci zeolitu, co determinuje właściwości jonowymienne tych związków. Istnieje wiele zeolitów o różnych strukturach, charakteryzujących się różną selektywnością względem jonów. I tak nanozeolity typu A charakteryzują się wysoką selektywnością w stosunku do dużych kationów grupy I i II (Cs^+ , Ba^{2+} i Ra^{2+}). Zatem zastosowanie nanozeolitów tego typu pozwoli na związanie radionuklidów $^{223,224,225}\text{Ra}$. Przedstawiony powyżej sposób trwałego związania radionuklidów radu, a następnie połączenia uzyskanego produktu z biomolekułą, np.: analogiem somatostatyny (rys.5) został zgłoszony do ochrony patentowej [14].



Rys. 5. Radiobiokonjugat składający się ze znakowanego ^{223}Ra nanozeolitu i analogów somatostatyny (SST) jako naprowadzających wektorów

Na obecnym etapie prac przeprowadzono badania z radionuklidami radu-224 i radu-225. Uzyskano ich trwałą immobilizację w strukturze nanozeolitu typu A. Przeprowadzone badania trwałości preparatów w roztworach soli fizjologicznej, roztworach zawierających nadmiarowe stężenia konkurencyjnych ligandów zawierających grupy tiolowe i aminowe (glutataion, cysteina) oraz w surowicy krwi wykazały ich dużą stabilność w długim okresie. Następnie, po odpowiedniej modyfikacji nanozeolitu, poprzez silanizację, do powierzchni nanocząstek zostanie przyłączony wektor (cząsteczka biologicznie aktywna) naprowadzający terapeutyczny preparat do chorobowo zmienionych tkanek. Otrzymany ostatecznie radiobiokonjugat ma szansę stać się przydatnym narzędziem w terapii emiterami α . Powyższe badania finansowane są z projektu badawczego NCN 2011/01/M/ST4/06756.

Jako inny nośnik radionuklidów terapeutycznych zastosowano nanocząstki tlenku tytanu (TiO_2). Zastosowanie takiego nośnika wzbudza szerokie zainteresowanie przede wszystkim ze względu na dostępność tlenku tytanu, jego wysoką stabilność chemiczną, nietoksyczność, właściwości optoelektroniczne oraz wysoką aktywność fotokatalityczną w stosunku do związków organicznych. Kolejną zaletą tlenku tytanu jest możliwość budowania nanostruktur o różnych wielkościach i kształtach. Mogą to być nanocząstki, nanoprzewody, nanorurki i nanowstążki. Nanocząstki tlenku tytanu posiadają wiele istotnych zalet. Charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą oraz dużą stabilnością w roztworach. Jednak szczególną cechą, która kwalifikuje je do grupy potencjalnych nośników radionuklidów, jest wysokie powinowactwo sorpcyjne w stosunku do wybranych kationów metali ciężkich, takich jak Pb^{2+} , Ag^+ , Ac^{3+} Bi^{3+} , czy UO_2^{2+} . Kationy te mogą adsorbować się na

powierzchni nanocząstek TiO_2 z dużą selektywnością.

Do tej pory w naszej grupie przeprowadzono badania nad możliwością trwałego zaadsorbowania następujących par izotopów: ^{225}Ac - ^{213}Bi i ^{212}Pb - ^{212}Bi do nanocząstek tlenku tytanu o różnej wielkości. Zmodyfikowano również powierzchnię nanocząstek nanosząc metaliczne srebro, co pozwoliło na trwałe związanie ^{211}At . Przeprowadzone wielogodzinne badania trwałości w roztworze soli fizjologicznej, w roztworach zawierających konkurencyjne związki kompleksujące oraz w surowicy krwi wykazały ich dużą stabilność.

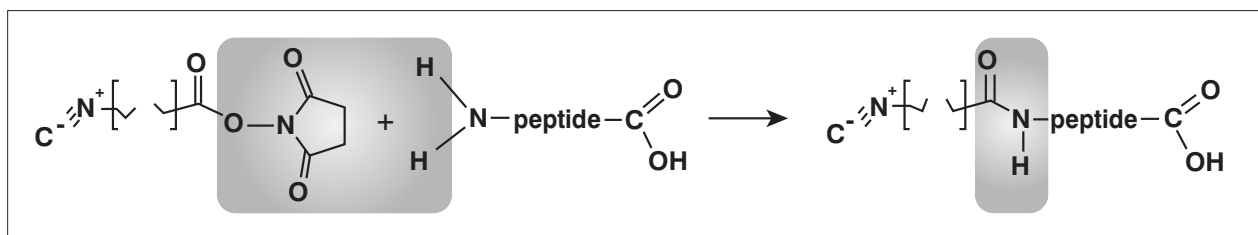
Następny planowany etap badań, podobnie jak w przypadku nanozeolitów typu A, będzie dotyczył opracowania procedury przyłączenia do powierzchni nanocząstek tlenku tytanu odpowiedniej biomolekuły, wykazującej duże powinowactwo do receptorów znajdujących się na powierzchni komórek nowotworowych.

Znakowanie nowych biomolekuł wykazujących powinowactwo receptorowe

Droga rozwoju medycyny nuklearnej to badania prowadzone w dwóch kierunkach: (i) poszukiwanie nowych radiofarmaceutyków (cechujących się coraz bardziej korzystnymi właściwościami), zmierzające do poszerzenia zakresu badań i zapewnienia wiarygodności uzyskiwanych wyników oraz (ii) rozwój urządzeń służących do obrazowania, tak by zapewnić jak najlepszą ich jakość, a jednocześnie uczynić badanie mniej uciążliwym dla pacjenta. Poszukiwania nowych radiofarmaceutyków to zarówno dobieranie odpowiednich radionuklidów (rodzaj i energia promieniowania), jak też szukanie nowych biomolekuł, BM, (w środowiskach medycznych nazywa się je 'ligandami'), które „dostarczają” radioizotop w odpowiednie miejsce, umożliwiając zobrazowanie bądź terapię danej tkanki. Biomolekuły (peptydy, fragmenty przeciwciał monoklonalnych) dobiera się w oparciu o znajomość funkcji pełnionych przez daną tkankę - są one w tej tkance wychwytywane, metabolizowane lub uczestniczą w jej fizjologicznych procesach. W diagnostyce uzyskuje się w ten

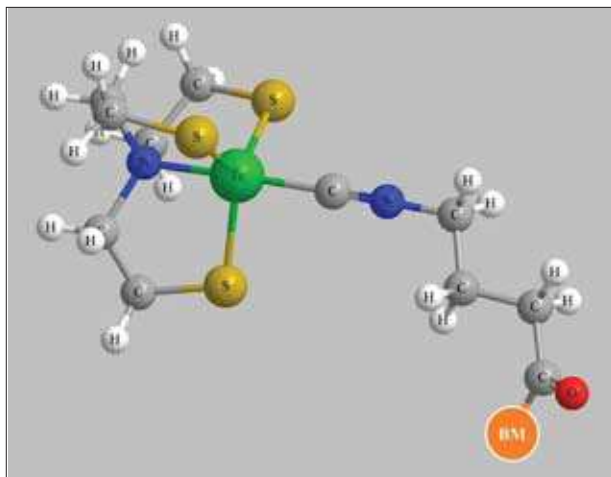
sposób informację o stanie narządu poprzez informację o pełnieniu przez niego swojej funkcji, co stanowi zasadniczą różnicę pomiędzy metodami scyntygraficznymi, a innymi technikami obrazowania. Utrudnieniem w diagnostyce/terapii przy użyciu radiofarmaceutyków, podobnie jak w przypadku stosowania leków standardowych, może być często pojawiająca się oporność na stosowane preparaty. Jest ona wynikiem zahamowania transportu preparatu do komórki w wyniku mutacji receptora (czyli punktu uchwytu radiofarmaceutyku) lub (w przypadku radiofarmaceutyków internalizowanych) nasilenia transportu preparatu na zewnątrz komórki na skutek aktywacji błonowej glikoproteiny P. Co więcej, także sama komórka zdolna jest do wytworzenia alternatywnego szlaku metabolicznego lub nasilenia naprawy DNA. Wiadomo także, że w przypadku wielu typów nowotworów na błonie komórkowej występuje nadekspresja często kilku różnych receptorów, wobec których powinowactwo wykazują różne biomolekuły. Tak więc poszukiwania nowych radiofarmaceutyków wymagają umiejętności znakowania coraz to nowych biomolekuł. W ramach prac prowadzonych przez nasz zespół w Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej IChTJ początkowo kompleksami technetu-99m na różnych stopniach utlenienia znakowane były pojedyncze aminokwasy (alanina, lizyna), następnie modelowy trójpeptyd glicyna-glicyna-tyrozyna, a w docelowym etapie prac biomolekuły wskazywane przez środowisko farmaceutów i lekarzy. Biomolekuły znakowane były radionuklidem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ przy użyciu dwufunkcyjnego łącznika CN-BFCA (Bifunctional Coupling Agent), zawierającego grupy funkcyjne: izonitrylową CN-, trwale kompleksującą kation technetu-99m, i grupę karboksylową w formie estru imidobursztynianowego. W reakcji przyłączenia biomolekuły pomiędzy grupą karboksylową dwufunkcyjnego łącznika i grupą aminową N-końca peptydu szybko i z dużą wydajnością powstaje wiązanie amidowe (rys. 6).

Radionuklid technet-99m używany do znakowania biomolekuł stosowany był najczęściej w formie kompleksu z mieszanymi ligandami, typu "4+1", w którym kation technetu na +3 stopniu utlenienia skompleksowa-



Rys. 6. Schemat reakcji przyłączenia biomolekuły do dwufunkcyjnego łącznika CN-BFCA

ny jest przez tetradentny ligand tris (2-merkaptoetylo) amina, NS_3 , (zawierający trzy atomy donorowe siarki i jeden atom azotu $N(CH_2CH_2SH)_3$) oraz wspomniany już powyżej monodentny ligand izonitrylowy, sprzężony uprzednio z biomolekułą (rys. 7).



Rys. 7. Budowa radiobiokoniugatu $^{99m}Tc(NS_3)(CN-BM)$

Dla wszystkich syntezowanych w skali n.c.a. radiobiokoniugatów wykonywane były badania ich trwałości w funkcji czasu w roztworze buforu PBS o $pH=7,4$ (roztwór taki imituje warunki płynów ustrojowych), w roztworach zawierających w dużym nadmiarze ligandy konkurencyjne (ligandy z aktywnymi grupami $-NH_2$, $-SH$, $-COOH$, np. cysteina, histydyna) oraz w surowicy ludzkiej. Wyznaczano ich lipofilowość w układzie n-oktanol/PBS $pH=7,4$, oraz, przy użyciu wybranej linii komórkowej, ich powinowactwo względem odpowiednich receptorów. Dla najlepiej rokujących radiobiokoniugatów wykonywano badania biodystrybucji.

Wspólnie z Instytutem Radiofarmacji, HZDR, Rosendorf w Niemczech, prowadzone były prace nad znakowaniem białka RGD [15] i bombezyny [16]. Białko RGD (Arg-Gly-Asp) to sekwencja trzech aminokwasów: argininy, glicyny i kwasu asparaginowego. W formie cyklicznej białko cRGDyK wiąże się swoiście z receptorem integrynowym $\alpha_v\beta_3$, którego nadekspresja występuje na wielu typach komórek nowotworowych. Wiążąc się z receptorami zlokalizowanymi na komórkach nowotworowych hamuje proces angiogenezy, migrację komórek nowotworowych oraz tworzenie przerzutów. Bombezyna to zbudowany z 14 aminokwasów peptyd, uwalniający gastrynę (GRP, Gastrin Releasing Peptide). Charakteryzuje się on dużym powinowactwem do receptorów GRPr (Gastrin-Releasing Peptide receptor) BB1 i BB2, których nadekspresję stwierdzono na komórkach wielu rodzajów nowotworów, w tym nowotworów

piersi, prostaty, trzustki, drobnokomórkowej postaci raka płuc. Do syntezy technetowych radiofarmaceutyków bombezyny stosowano jej krótszy analog 7-14, zawierający $\beta Ala \beta Ala$ jako łącznik i dwa nienaturalne aminokwasy cykloheksyloalaninę (Cha^{13}) i norleucynę (Nle^{14}) stabilizujące peptyd w warunkach *in vivo*.

W latach 2007-2009 zespół realizował grant badawczy specjalny Nr DAAD/48/2007 finansujący wykonywaną przez stronę polską część badawczą dwustronnego projektu „Zastosowanie nowych kompleksów Tc i Re z mieszanymi ligandami (4+1) do znakowania peptydów”, przyjętego do Programu Wykonawczego na lata 2007-2008, na mocy porozumienia pomiędzy Ministerstwem Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Departament Współpracy Międzynarodowej) i Niemiecką Akademią Centralą Wymiany (DAAD). W ramach tego projektu opracowano syntezę technetowego radiobiokoniugatu peptydu wazopresyna (AVP). Według danych literaturowych występowanie dużej nadekspresji receptorów wazopresyny (Arginine vasopressin receptor 2, AVPR2, V2) zostało stwierdzone w przypadku drobnokomórkowej postaci raka płuc (SCLC, small-cell lung cancer), nowotworu szczególnie złośliwego, występującego w postaci rozsianej i nieoperowalnej. Następnie wykonano syntezę technetowego radiobiokoniugatu zawierającego analog wazopresyny $d(CH_2)_5[D-Tyr(Et^2)-Ile^4-Eda^9]AVP$ – antagonistę receptorów V2 (próbkę tego peptydu otrzymaliśmy od Profesora Maurice Manning, University of Toledo, Toledo, Ohio, United States. Radiobiokoniugat zawierający antagonistę receptorów V2 charakteryzował się większą stabilnością w surowicy ludzkiej oraz większym powinowactwem do receptorów V2 obecnych na komórkach linii H-69.

Aktualnie prowadzone przez zespół prace to synteza i badania technetowych radiobiokoniugatów grelinowych. Grelina jest 28-aminokwasowym endogenym hormonem występującym we krwi. W ostatnich latach pojawiły się liczne doniesienia o występowaniu nadekspresji receptora GHS-R1a na komórkach różnych typów nowotworów (gruczolak przysadki, guzy neuroendokrynne tarczycy, płuc, piersi, gonad, rak prostaty, żołądka, jelita grubego, endokrynne i nieendokrynne guzy trzustki). W ramach tych badań opracowano metodę przyłączania biomolekuły poprzez odpowiednio zmodyfikowaną grupę karboksylową C-końca peptydu [17]. Metoda ta może znaleźć zastosowanie praktyczne w przypadku peptydów, których fragment farmakoforowy, odpowiedzialny za oddziaływanie biomolekuła – receptor, obejmuje (tak jak w przypadku greliny) aminokwasy położone na N-końcu peptydu. Następnie wykonano syntezę radiobiokoniugatów grelinowych stosując różne kompleksy technetu-99m i zbadano, jak

właściwości fizykochemiczne kompleksów technetowych wpływają na powinowactwo radiobiontów do receptorów GHS-R1a obecnych na komórkach linii DU-145. Tematyka ta była podmiotem promotorskiego grantu badawczego MNiSzW, Nr NN204 186039, „Badania wpływu właściwości fizykochemicznych koniugatów kompleksów technetu-99m z n-oktaacyl-[Ser³]-greliną(1-6) na powinowactwo greliny do jej receptorów” (20.08.2010–19.11.2011).

Kolejną biomolekułą, której technetowe radiobiont-koniugaty obecnie badamy, to substancja P (SP). Jest to 11-aminokwasowy peptyd, którego receptory zostały zlokalizowane na komórkach nowotworowych glejaka mózgu. Aktywnym fragmentem tego peptydu (odpowiedzialnym za powinowactwo do receptorów NK1, NK2 i NK3, Neurokinin receptors) jest sekwencja pięciu ostatnich aminokwasów C-końca peptydu Phe-Phe-Gly-Leu-Met. Dlatego też rolę wektora doprowadzającego receptorowy radiofarmaceutyk do patologicznej tkanki mogą pełnić także krótsze fragmenty tego peptydu. Celem naszych badań jest synteza radiobiont-koniugatów zawierających pełny peptyd SP oraz jego fragmenty SP(4-11) i SP(5-11), a następnie porównanie powinowactwa receptorowego tych radiobiont-koniugatów.

W projekcie rozwojowym NCBI R Nr N R13 0150 10 „Opracowanie metody otrzymywania receptorowego radiofarmaceutyku diagnostycznego do obrazowania raka sutka typu HER-2 – Lapatinibu znakowanego technetem-99m” (02.12.2010–30.11.2012) prowadzone są badania nad otrzymaniem diagnostycznego radiofarmaceutyku receptorowego, którym może być lek antynowotworowy Lapatinib połączony z kompleksem technetu-99m. Lek Lapatinib (stosowany w leczeniu onkologicznym guzów litych, takich jak rak sutka i rak płuca), dopuszczony 13 marca 2007 r. przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) do leczenia zaawansowanych (z przerzutami) przypadków raka, wykazuje silne powinowactwo do receptora Her 2, występującego na powierzchni komórek nowotworowych w około 30% przypadków raka piersi (tzw. nowotwory piersi typu Her-2 dodatnie).

Wspólnie z Zakładem Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi prowadzimy badania nad znakowaniem technetem-99m pochodnych takryny – związku wykorzystywanego w leczeniu choroby Alzheimera. Związek ten jest inhibitorem enzymu acetylocholinesterazy (rozkładającym acetylocholinę do choliny i kwasu octowego), a więc hamuje aktywność tego enzymu i w ten sposób zwiększa ilość wolnej acetylocholinę w szczeliny synaptycznej. Towarzyszy temu wzrost przewodności sygnałów

w układzie cholinergicznym ośrodkowego układu nerwowego (OON), co zmniejsza objawy otępienia występujące w chorobie Alzheimera. Można spodziewać się, że po wprowadzeniu do organizmu znakowanych technetem-99m związków takryny staną się one sondami diagnostycznymi, czyli będą kumulowały się w miejscach, gdzie znajdują się cholinoesterazy, dzięki czemu można będzie określić poziom neuroprzekaźnika w mózgu, a tym samym określić rejon, gdzie doszło do jego neurodegeneracji.

Komputerowo wspomagane projektowanie leków (CADD)

W trakcie ostatnich dwu dekad obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania nauk farmaceutycznych wykorzystaniem zaawansowanych technik obliczeniowych w procesie poszukiwania nowych substancji biologicznie aktywnych. Dynamiczne zwiększanie się mocy obliczeniowej komputerów, pojawienie się coraz dokładniejszych i szybszych algorytmów oraz technologii programowania spowodowało obniżenie kosztów oraz skrócenie czasu trwania tego procesu. Podstawowe obliczenia można już dziś przeprowadzić przy zastosowaniu komputerów klasy PC.

Do podstaw metodologii tzw. racjonalnego projektowania leków (ang. *rationalized drug design*) należą aspekty obejmujące wykorzystanie technik komputerowych (tzw. *in silico*) w m.in. parametryzacji cząsteczek, oszacowaniu ich podstawowych właściwości fizykochemicznych i elektronowych, jak również przewidywaniu szlaków ich syntezy oraz ich właściwości biologicznych. Jedną z podstawowych metod komputerowo wspomaganego projektowania leków (CADD, ang. *Computer-Aided Drug Design*) bazuje na optymalizacji tzw. struktur wiodących kompleksów przy wykorzystaniu różnorodnego oprogramowania (HyperChem, Spartan, Gaussian, ADF, MOPAC itp.), licznych metod obliczeniowych (techniki DFT, MP2, MM etc.) i związanych z nimi baz funkcyjnych. Dlatego też, równolegle do prac doświadczalnych dotyczących różnych aspektów radiofarmacji, prowadzono prace zmierzające do wdrożenia uzyskanych wspomnianą techniką obliczeń teoretycznych zarówno budowy, jak i podstawowych właściwości elektronowych kompleksów metali o potencjalnym znaczeniu farmaceutycznym [18-19]. Obiektami badań obok kompleksów platyny(II), były – trikarbonylkowe kompleksy technetu(I) oraz renu(I). Modelowanie molekularne wybranych związków wykonywane było we współpracy oraz z wykorzystaniem bazy komputerowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego w Warszawie.

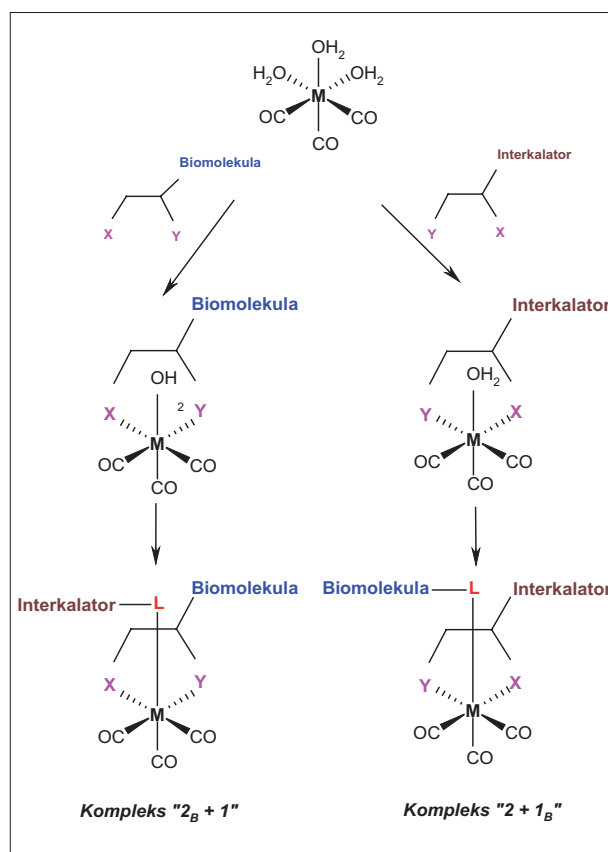
Porównując wyznaczoną metodą dyfrakcji rentgenowskiej strukturę molekularną wspomnianych kompleksów ze stosunkowo niedużymi ligandami organicznymi (zawierającymi jednocześnie donorowe atomy azotu oraz siarki), z uzyskaną na drodze obliczeń kwantowo-mechanicznych strukturą tych kompleksów, charakteryzującą się najniższą energią, wykazano, że zastosowanie już stosunkowo prostego funkcjonału MPW1PW prowadzi do uzyskania wyników prawidłowo obrazujących strukturę kompleksów metali *d*-elektronowych planowanych jako potencjalne farmaceutyki/radiofarmaceutyki.

Cel poznawczy kolejnych badań realizowano poprzez wykonanie obliczeń kwantowo-mechanicznych dla trikarbonylkocych kompleksów technetu(I) i renu(I) typu „2+1” (rys. 8) na bardziej zaawansowanym poziomie DFT. Uzyskane wyniki pozwoliły nam dokładniej zrozumieć wpływ oddziaływań metal-ligand na rozkład elektronowy w obrębie kompleksów oraz trwałość tych kompleksów *in vitro*. Wyniki te wskazały na wystąpienie znacznego przeniesienia gęstości elektronowej z ligandu bidentnego na centralny rdzeń $M(CO)_3^+$ oraz wzrost kierunkowego charakteru π -elektronowego wiązań w obrębie ligandów C-O.

Na drodze obliczeń wyznaczono efekty energetyczne tworzenia trikarbonylkowych kompleksów technetu(I)/renu(I) z ligandami bidentnymi (pochodnymi 2-pirydynokarboksyamidów, tiosemikarbazonami) oraz efekty energetyczne hydrolizy tych kompleksów. Obliczenia wykazały, że trwałość *in vitro* kompleksów trikarbonylkowych technetu(I) i renu(I) kontrolowana jest przez entalpowe czynniki termodynamiczne ich tworzenia. Zamiana chloru lub cząsteczki wody w kompleksie typu „2+1_B” na powszechnie stosowany w chemii radiofarmaceutycznej do wiązania biomolekuły ligand izonitrylowy powoduje obniżenie energii kompleksu o 4-5 kcal/mol, a co za tym idzie jego większą trwałość. Z kolei, przyłączenie biomolekuły do cząsteczki ligandu tworzącego kompleks typu „2_B+1” nie pociąga za sobą ani znacznych skutków strukturalnych, ani nie wpływa na rozkład elektronowy w obrębie cząsteczki kompleksu. Nie generuje także istotnych różnic energetycznych w procesie kompleksowania technetu/renu.

Podsumowanie

Przedstawione powyżej, realizowane i planowane prace badawcze będą kontynuowane w nowo otwartym, zmodernizowanym budynku Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej. Wyposażenie Centrum w najnowocześniejszą aparaturę pozwoli na zintensyfikowanie i rozszerzenie prac. Zamierzamy także rozpocząć bada-



Rys. 8. Zasada ligandów mieszanych „2_B + 1” (z lewej strony) oraz „2 + 1_B” (z prawej strony) przyłączania biomolekuły warunkującej dotarcie leku do pożądanego organu (tzw. terapia celowana)

nia w nowej tematyce, m.in. nad otrzymywaniem radionuklidu ^{99m}Tc na cyklotronach medycznych z tarczy ¹⁰⁰Mo (podejmujący tą tematykę grant NCBIR został już zakwalifikowany do finansowania) oraz otrzymywaniem znakowanych *alfa* emitarami tzw. nanobodies. Nanobodies są najmniejszymi fragmentami przeciwciał monoklonalnych i po wyznakowaniu mogą być wykorzystywane w terapii w przypadku guzów nowotworowych, które posiadają na powierzchni komórek miejsca wiążące te przeciwciała. Aktualnie tematyką tą zajmuje się dr Pruszyński przebywający na stypendium doktorskim w Duke University, USA, i zamierza ją kontynuować po powrocie do Centrum.

W tematyce znakowania biomolekuł planowane jest wyznakowanie technetem-99m antagonisty receptorów NK1 oraz porównanie powinowactwa receptorowego takiego radiobiokoniugatu z powinowactwem radiobiokoniugatu zawierającego substancję P. Planuje się także zsyntezować radiobiokoniugat zawierający kompleks diagnostycznego/terapeutycznego radionuklidu i dwie różne biomolekuły. Preparat taki może być bardziej skutecznym narzędziem w przypadku no-

wotworów, które na błonie komórkowej posiadają kilka różnych receptorów. Ponadto, dzięki wyposażeniu Centrum w najnowocześniejszą aparaturę możliwe będzie przygotowywanie w warunkach absolutnej czystości tzw. zestawów „kit”, to jest zestawów gotowych do użycia w warunkach klinicznych i zawierających (w odpowiednich ilościach w postaci zliofilizowanej) wszystkie reagenty konieczne do syntezy radiobionugatu.

*prof. dr hab. Aleksander Bilewicz,
dr Leon Fuks,
dr Ewa Gniazdowska,
mgr Agata Kasperek,
mgr Przemysław Koźmiński,
mgr Seweryn Krajewski,
mgr Edyta Leszczuk,
dr Monika Łyczko,
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,
Warszawa*

Literatura:

1. A. Bilewicz, „Separation of ^{90}Y from ^{90}Sr on crystalline antimonite acid” *Radiochim. Acta* 69, 137-140 (1995).
2. B. Bartoś, A. Bilewicz, „Separation of In^{3+} from Cd^{2+} on crystalline antimonite acid. ^{115}Cd - ^{115}mIn generator” *J. Radioanal. Nucl. Chem. (Letters)* 201, 89-96 (1995).
3. B. Bartoś, A. Bilewicz, R. Delmas, C. Neskovic, „Synthesis and ion exchange properties of various forms of manganese dioxide for cations of the I and II groups”, *Solv. Extr. Ion Exch.* 15, 533-546 (1997).
4. B. Włodzimirska, B. Bartoś, A. Bilewicz, „Preparation of a ^{225}Ac and ^{228}Ac generators using cryptomelane manganese dioxide sorbent” *Radiochim. Acta* 91, 553-556 (2003).
5. B. Bartoś, A. Majkowska, A. Kasperek, S. Krajewski, A. Bilewicz, „New separation method of no-carrier-added ^{47}Sc from titanium targets” *Radiochim. Acta* 1-5, DOI 10.1524. (2012).
6. A. Kasperek, A. Bilewicz, „Sposób otrzymywania terapeutycznych ilości radionuklidu ^{47}Sc ” zgłoszenie patentowe nr P - 391262 (2010).
7. S. Krajewski, A. Bilewicz, „Sposób otrzymywania terapeutycznych ilości radionuklidu ^{105}Rh ” zgłoszenie patentowe nr P - 391280 (2010).
8. A. Majkowska-Pilip, A. Bilewicz, „Macrocyclic complexes of scandium radionuclides as precursors for diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals” *J. Inorg. Biochem.* 105, 313-320 (2011).
9. M. Pruszyński, N. S. Loktionova, D. Filosofov, F. Rösch, „Post elution processing of $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generator-derived ^{44}Sc for clinical application” *Appl. Radiat. Isotopes* 68, 1636 (2010).
10. M. Pruszyński, A. Majkowska-Pilip, N.S. Loktionova, E. Epard, F. Rösch, „Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter ^{44}Sc ” *Appl. Radiat. Isotop* 70, 974-979 (2012).
11. M. Pruszyński, A. Bilewicz, „Astat w chemii i medycynie” *Wiadomości Chem.*, 58, 5-6 (2004).
12. Yu. Norseev, A. Bilewicz, M. Pruszyński, „ ^{211}At -Rh(16- S_4 -diol) as a starting complex for preparing an astatine-labeled radiopharmaceuticals” *Radiochemistry*, 50, 208-212 (2008).
13. M. Pruszyński, A. Bilewicz, M. R. Zalutsky, „Preparation of Rh[16ane S_4 -diol] ^{211}At and Ir[16ane S_4 -diol] ^{211}At complexes as potential precursors for astatine radiopharmaceuticals. Part I: Synthesis”, *Bioconjugate Chem.*, 19, 958-965 (2008).
14. A. Kasperek, A. Bilewicz, „Radiofarmaceutyk terapeutyczny znakowany radionuklidami radu oraz sposób jego wytwarzania” zgłoszenie patentowe nr P-3943402 (2011).
15. J.-U. Kunstler, G. Seidel, R. Bergmann, E. Gniazdowska, M. Walther, E. Schiller, C. Decristoforo, H. Stephan, R. Haubner, J. Steinbach, H.-J. Pietzsch, „Novel $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ‘4+1’ peptide conjugates: Tuning the biodistribution by variation of coligands”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 3645-3655 (2010).
16. J.-U. Kunstler, R. Bergmann, E. Gniazdowska, P. Koźmiński, M. Walther, H.-J. Pietzsch, „Impact of functionalized coligands on the pharmacokinetics of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (III) ‘4+1’ mixed-ligand complexes conjugated to bombesin”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1383-1390 (2011).
17. P. Koźmiński, E. Gniazdowska, L. Fuks, A. Oszczak, „Labeling of peptides with technetium-99m complexes through the modified C-terminal group”, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 292, 67-74 (2012).
18. L. Fuks, E. Gniazdowska, J. Mieczkowski, N. Sadlej-Sosnowska, „Structural Features of Tricarbonyl (N-methyl-2-pyridinecarboxamide)chlororhenium(II) - Potential Precursor of Radiopharmaceuticals”, *Polyhedron*, 27 1353-1360 (2008)
19. L. Fuks, E. Gniazdowska, N. Sadlej-Sosnowska, „Tricarbonyltechnetium(II) and tricarbonylrhenium(II) complexed with N-methyl-2-pyridinecarboxamide as potential radiopharmaceuticals - A computational study”, *Struct. Chem.* 21, 827-835 (2010)