

FLUOROVANÉ SLOUČENINY ZNAČENÉ ^{18}F JAKO ÚČINNÉ LÁTKY V RADIOFARMAKÁCH

LIBOR PROCHÁZKA^a, MARTIN KROPÁČEK^a,
MARCELA MIRZAJEVOVÁ^a, JANA ZIMOVÁ^a,
MICHAELA FÖRSTEROVÁ^a, HELENA
ŠVEC OVÁ^a, FRANTIŠEK MELICHAR^a
a OTAKAR BĚLOHLÁVEK^b

^a Oddělení radiofarmak, Ústav jaderné fyziky AV ČR, v.v.i., 250 68 Řež, ^b Oddělení nukleární medicíny a PET centrum, Nemocnice Na Homolce, Roentgenova 2, 150 30 Praha 5
melichar@ujf.cas.cz

Došlo 6.3.08, přepracováno 5.1.09, přijato 20.2.09.

Klíčová slova: pozitronová emisní tomografie, radiofarmaka, syntéza značených sloučenin

Obsah

1. Úvod
2. Parametry hodnocení PET radiofarmak
3. Fluorované sloučeniny jako radiofarmaka pro pozitronovou emisní tomografii
 - 3.1. Malé peptidy
 - 3.2. Sloučeniny s vazbou na σ receptory
 - 3.3. Sloučeniny značené ^{18}F pro odhad hypoxie
 - 3.4. Sloučeniny značené ^{18}F pro sledování genového transferu
 - 3.5. Fluorované sloučeniny pro charakterizaci proliferace
 - 3.6. Fluorované sloučeniny pro určení melanomů
 - 3.7. Fluorované sloučeniny pro zobrazení mozkových nádorů
 - 3.8. Fluorované sloučeniny pro diagnostiku rakoviny prsu
 - 3.9. Fluorované sloučeniny pro diagnostiku karcinomu prostaty
 - 3.10. Sloučeniny značené ^{18}F pro diagnostiku kolorektálního karcinomu
4. Závěr

1. Úvod

Radiofarmaka značená ^{18}F dnes představují klinicky nejstudovanější část všech radiofarmak pro pozitronovou emisní tomografii (PET). Radionuklid ^{18}F je považován za téměř ideální pro PET a to ze dvou důvodů. Prvním je nízká energie emitovaných pozitronů (0,633 MeV) limitu-

jící dávkový příkon u pacientů. Důsledkem nízké energie pozitronů je také jejich relativně krátký dosah ve tkáni, který vede k vysokému rozlišení při PET zobrazování. Druhým důvodem velkého zájmu o ^{18}F je jeho poměrně dlouhý poločas rozpadu (110 min), který dovoluje použití i složitějších radiosyntéz a přitom dosažení vysokého výtěžku reakce. Dále umožňuje aplikaci radiofarmaka mimo místo přípravy, tj. transport radiofarmaka z produkčního centra do místa aplikace, a navíc i provedení časově náročných vyšetření, jako je například studium pomalých metabolických procesů.

V živé přírodě se fluor vyskytuje jen zřídka a při vytváření analogu již existující bioorganické sloučeniny je tedy nutné radioisotop fluoru do sloučeniny uměle zavést. Zavedení fluoru do organické sloučeniny většinou nezpůsobí změnu uhlíkového řetězce. Avšak v důsledku vysoké elektronegativity fluoru dochází k poklesu elektronové hustoty na atomu uhlíku, což může významně změnit fyziologické vlastnosti fluorovaných látek oproti jejich nefluorovaným analogům. Je však známa i řada fluorovaných sloučenin, jejichž metabolismus je totožný s jejich nefluorovanými analogy, event. se vlivem substituce vodíkového atomu nebo hydroxyskupiny atomem fluoru metabolický cyklus fluorované sloučeniny zastaví v jiné fázi než nefluorované sloučeniny.

Moderní radiosyntézy PET radiofarmak jsou založeny na náhradě funkční skupiny ve výchozí látce pro syntézu (prekurzoru) nukleofilní substitucí fluoridového iontu. To umožňuje syntetizovat širokou řadu biomolekul značených ^{18}F .

2. Parametry hodnocení kvality PET radiofarmak

Obecně hodnocení kvality radiofarmak, která jsou značena radionuklidy emitující pozitrony, vychází v současnosti z uplatňovaného systému zajištění jakosti přípravy PET radiofarmak (téměř vždy aseptická příprava) a analýzy rizik v jednotlivých stádiích přípravy radiofarmaka. Celý systém jistění jakosti a kontroly kvality vychází z respektování krátkého poločasu rozpadu radionuklidu ^{18}F (110 min) a nízké koncentrace radiofarmaka (jde o beznosičovou formu, kde koncentrace účinné látky v radiofarmaku je nižší než 10^{-7} mol l^{-1}).

Systém jistění jakosti je založen na splnění následujících požadavků, které vycházejí z požadavků správné výrobní praxe pro PET radiofarmaka:

- radiofarmakum je připravováno na základě validované metody přípravy,
- postup přípravy je monitorován a podrobně dokumentován v souladu se standardními operačními postupy přípravy a kontroly kvality,

- je provedena požadovaná kontrola kvality všech vstupních surovin,
- je provedena požadovaná kontrola kvality konečného produktu,
- jsou známy výsledky stabilitních studií jednotlivých vstupních surovin ale i reagensů použitých při kontrole kvality.

Kontrola kvality radiofarmaka spočívá ve stanovení radionuklidové, radiochemické a chemické čistoty, stanovení objemové aktivity, pH, stanovení osmolarity, sterility a apyrogenity.

Radionuklidovou čistotu definujeme jako podíl radioaktivity ^{18}F k celkové aktivitě analyzovaného vzorku radiofarmaka. Stanovuje se γ -spektrometrií a identita ^{18}F se potvrzuje změřením poločasu rozpadu z rozpadové křivky. Obvykle je požadována radionuklidová čistota vyšší než 99,9 %.

Radiochemická čistota se definuje jako podíl radioaktivity ^{18}F v požadované chemické formě účinné látky k celkové aktivitě analyzovaného radiofarmaka. Radiochemická čistota dle lékopisného článku je obvykle vyšší než 97 %. Radiochemická čistota se stanovuje HPLC nebo TLC.

Chemická čistota je vyjádřena jako podíl účinné látky v radiofarmaku v požadované chemické formě. K jejímu stanovení se nejčastěji používá GC nebo HPLC. Sterilita se stanovuje až dodatečně, ale je možné ji deklarovat nepřímo provedením filtrace konečného produktu filtrem o velikosti pórů 0,22 μm (kontroluje se též integrita filtru po skončení filtrace).

Stanovení apyrogenity je vlastně změření koncentrace bakteriálních endotoxinů, která nesmí překročit limit 17,5 EU ml^{-1} . Stanovení endotoxinů gramnegativních bakterií se provádí kinetickou zákalovou metodou (turbidimetricky).

Celková doba kontroly kvality by neměla přesáhnout 40–60 min nebo dobu potřebnou k transportu radiofarmaka od místa výroby k místu klinické aplikace.

3. Fluorované sloučeniny jako radiofarmaka pro pozitronovou emisní tomografii

Sloučeniny značené ^{18}F lze rozdělit jako radiofarmaka do dvou základních skupin, a to na nespecifické (všeobecné) a specifické přípravky. Všeobecnými fluorovanými sloučeninami se sleduje např. nespecifický metabolismus nádorových buněk, jako je syntéza proteinů, transport aminokyselin, syntéza nukleových kyselin a syntéza nukleosidů. Hlavním představitelem této skupiny je 2-deoxy-2- ^{18}F fluor-D-glukosa (^{18}F FDG). Do druhé skupiny specifických přípravků patří sloučeniny zabývající se určitým typem receptoru (estrogen, somatostatin), zkoumáním mozkové hypoxie nebo studiem kostního metabolismu¹.

Následující fluorované sloučeniny patří mezi nejčastěji používané či citované:

2-deoxy-2- ^{18}F fluor-D-glukosa (^{18}F FDG)

fluorované analogy aminokyselin

L-2- ^{18}F fluortyrosin

L-3- ^{18}F fluor- α -methyltyrosin

O-(2- ^{18}F fluorethyl)-L-tyrosin (^{18}F FET)

L-2- ^{18}F fluorfenylalanin

fluorované analogy somatostatinových receptorů

^{18}F fluoroktreotid

fluorované nukleosidy a nukleové báze

2'-deoxy-5- ^{18}F fluoruridin

5- ^{18}F fluoruracil (^{18}F FU)

3'-deoxy-3'- ^{18}F fluorthymidin (3'- ^{18}F FLT)

fluorované analogy buněčných fosfolipidů (cholinové analogy)

fluorované analogy steroidních hormonů

16 α - ^{18}F fluorestradiol-17 β (^{18}F FES)

fluorované sloučeniny pro odhad hypoxie

^{18}F fluormisonidazol

Na ^{18}F

1-(2-deoxy-2- ^{18}F fluor- β -D-arabinofuranosyl)-5-bromuracil (^{18}F FBAU)

1-(2-deoxy-2- ^{18}F fluor- β -D-arabinofuranosyl)-5-methyluracil (^{18}F FMAU)

1-(2-deoxy-2- ^{18}F fluor- β -D-arabinofuranosyl)uracil (^{18}F FAU)

Použití jednotlivých typů radiofarmaceutických přípravků s ^{18}F pro diagnostiku je uvedeno v následující části.

3.1. Malé peptidy

Značené malé peptidy mají vysokou specifickou (vysoký poměr aktivity cílová tkáň/pozadí), tak jako velké peptidy např. typu monoklonálních protilátek, ale na rozdíl od nich vykazují rychlejší krevní „clearance“. Jejich dalšími výhodami oproti velkým peptidům je menší imunogenita a především snazší práce při jejich syntéze a následném radioaktivním značení.

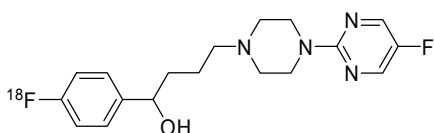
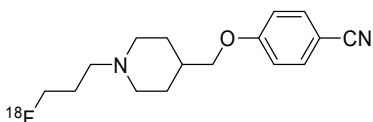
V literatuře jsou uváděny z hlediska klinické aplikovatelnosti následující peptidy značené ^{18}F (cit.^{2–4}):

- ^{18}F značený melanocyt stimulující hormon α -MSH nebo protilátkové fragmenty pro maligní melanomy,
- ^{18}F značené analogy oktreotidu pro studium somatostatinových receptorů^{3,4}. Jako jeden z těchto analogů je uváděn N^{α} -(1-deoxy-D-fruktosyl)- N^{ϵ} -(2- ^{18}F fluorpropanoyl)-Lys⁰-Tyr³-oktreotát (^{18}F FP-Gluc-TOCA),
- ^{18}F značené chemotaktické peptidy pro studium bakteriální infekce.

3.2. Sloučeniny s vazbou na σ receptory

Některé značené sloučeniny, které vykazují specifickou vazbu na σ receptory, mohou být užitečné v PET pro tomografickou detekci nádorů tlustého střeva, plic, prsu, jater a kožních melanomů.

Receptory σ modulují některé neuroreceptory, většinou dopaminergních a katecholaminergních systémů. Tyto

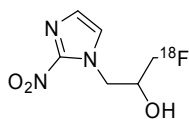
1-(4-[¹⁸F]fluorfenyl)-4-[4-(5-fluorpyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl]butan-1-ol (*I*)4-[[1-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)piperidin-4-yl]methoxy]benzonitril (*II*)

receptory jsou přítomné v nádorové tkáni a mohou být zobrazeny pomocí odpovídajících účinných látek. V této souvislosti jsou uváděny jako potenciální σ receptorové ligandy pro PET 1-(4-[¹⁸F]fluorfenyl)-4-[4-(5-fluorpyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl]butan-1-ol a 4-[[1-(3-[¹⁸F]fluorpropyl)piperidin-4-yl]methoxy]benzonitril^{5,6}.

3.3. Sloučeniny značené ¹⁸F pro odhad hypoxie

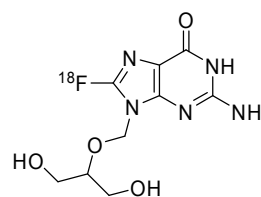
Hypoxické buňky uvnitř nádorové tkáně mohou hrát důležitou roli v její rezistenci k radioterapii a chemoterapii. Nádorové buňky jsou v přítomnosti kyslíku mnohem citlivější k radiaci než bez přítomnosti kyslíku. Množství hypoxických nádorových buněk proto často limituje účinek radiační terapie.

Mezi látky, které se selektivně váží na hypoxické buňky, patří např. [¹⁸F]fluormisonidazol ([¹⁸F]FMISO) (cit.⁷). Stanovení hypoxie metodou PET proto otvírá další možnosti odhadu správné léčby nádorové tkáně. V této souvislosti je také uváděn [¹⁸F]fluorethanidazol ([¹⁸F]FETA) (cit.⁸).

2-nitro-3-(1-[¹⁸F]fluor-2-hydroxypropan-3-yl)imidazol neboli [¹⁸F]FMISO (*III*)

3.4. Sloučeniny značené ¹⁸F pro sledování genového transferu

Slibná genová terapie potřebuje k přenesení genetického materiálu k nádorovým nebo jiným buňkám tzv. vektory, kterými mohou být např. adenoviry, retroviry, adenoasociované viry, DNA-proteinové komplexy, či liposomy. Ty musí splňovat nemálo požadavků týkajících se zejména účinnosti a bezpečnosti. Vektory, které by splňovaly

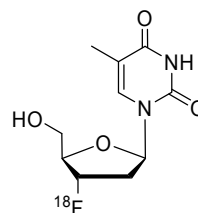
1H-2-amino-8-[¹⁸F]fluor-9-[(1,3-dihydroxypropan-2-yl)oxymethyl]purin-6-on neboli [¹⁸F]FGCV (*IV*)

všechna kritéria, nejsou zatím k dispozici. Jedním z řešení je sledovat neinvazivně genový transfer metodou PET s použitím fluorovaných sloučenin, kde jako účinnou látkou je např. 8-[¹⁸F]fluorganciklovir ([¹⁸F]FGCV) (cit.⁹).

3.5. Fluorované sloučeniny pro charakterizaci proliferace

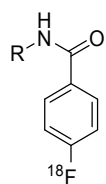
Podstatou proliferace je rychlé mitotické dělení buněk v tkáni. Typická proliferace je zánětlivá, nádorová, atd. Bohužel nepoužívanější sloučenina pro PET [¹⁸F]FDG je jen málo selektivní pro stanovení typu proliferace. Z tohoto důvodu se pro měření proliferace buněk hledají selektivnější radiofarmaka. Jedním z nich je např. 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorthymidin (3'-[¹⁸F]FLT), který se zabudovává do nově replikované DNA v nádorech¹⁰. Intracelulární retence 3'-[¹⁸F]FLT je dostatečná pro stanovení typu a rychlosti buněčné proliferace.

V této souvislosti se uvádějí i další fluorem značené pyrimidinové analogy pro studium nádorové tkáně a to např. 2'-deoxy-5-[¹⁸F]fluoruridin, který ale podléhá rychlé tkáňové degradaci a díky tomu se zabudovává do DNA i RNA. Podobně se projevuje i 1-(2-deoxy-2-[¹⁸F]fluor-β-D-arabinofuranosyl)-5-methyluracil ([¹⁸F]FMAU) (cit.²).

3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorthymidin (*V*)

3.6. Fluorované sloučeniny pro určení melanomů

Rychle rostoucí výskyt maligních melanomů stimuloval vývoj vhodných fluorovaných sloučenin pro jejich vyšetření. Zpočátku se používaly monoklonální protilátky vážající se na antigeny asociované s melanomy. Avšak v poslední době se intenzivně zkoumá menší peptid nazývaný tridekapeptid α -MSH a jeho stabilnější analog [Nle⁴,D-Phe⁷]- α -MSH, který fluorovaný může být vhod-



R = *N*-acetyl-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

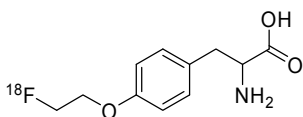
[Nle⁴,D-Phe⁷]- α -MSH (*IV*)

ným nástrojem pro zobrazení melanomů a určení jejich stádia metodou PET (cit.¹¹).

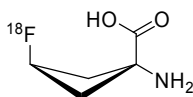
3.7. Fluorované sloučeniny pro zobrazení mozkových nádorů

Ačkoliv nejpoužívanější sloučeninou pro vizualizaci nádorů včetně nádorů mozkových je stále [¹⁸F]FDG, vzhledem k její vysoké absorpci v mozkové tkáni se hledají specifitější sloučeniny. Vhodnými kandidáty jsou fluorované aminokyseliny. Aminokyseliny snadno procházejí hematoencefalickou bariérou a málo se zachytávají v normální mozkové tkáni. Zato v nádorové tkáni se hromadí díky rychlému růstu maligní tkáně a zvýšené spotřebě aminokyselin pro syntézu bílkovin.

Zde jsou jednoznačnými favority L-2-[¹⁸F]fluorfenylalanin a L-2-[¹⁸F]fluortyrosin. Poslední vývoj však směřuje ke klinickému využití *O*-(2-[¹⁸F]fluorethyl)-L-tyrosinu ([¹⁸F]FET), který se jeví jako dostupný relativně jednoduchou syntézou s dobrým radiochemickým výtěžkem značení. Z klinického hlediska [¹⁸F]FET vykazuje vysokou stabilitu *in vivo* se stereoselektivitou a rychlou kumulací v nádorové tkáni. Pozornost je dále soustředěna na další aminokyselinu, a to l-amino-3-[¹⁸F]fluorcyklobutan-1-karboxylovou kyselinu ([¹⁸F]FACBC), u níž první preklinické výsledky vypadají slibně¹².



O-(2-[¹⁸F]fluorethyl)-L-tyrosin (*VII*)

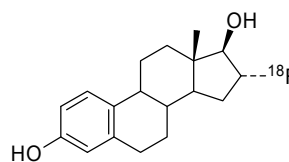


l-amino-3-[¹⁸F]fluorocyklobutan-1-karboxylová kyselina (*VIII*)

3.8. Fluorované sloučeniny pro diagnostiku rakoviny prsu

Podstatnou informací při diagnostice a terapii karcinomu prsu je výskyt a množství estrogenových a progesti-

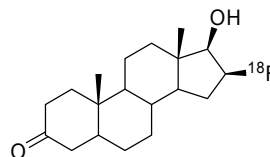
nových receptorů. Z tohoto důvodu se pro vyšetření karcinomu prsu vyvinula řada značených sloučenin steroidového typu. Jde např. o [¹⁸F]fluorethyl-norprogesteron (FENP), který ovšem vykázal určitou nespecifičnost vazby v preklinických a klinických studiích. Nyní je pozornost věnována především estrogenním steroidům značeným ¹⁸F. Např. 16 α -[¹⁸F]fluorestradiol ([¹⁸F]FES) má vysokou afinitu k estrogenovým receptorům (ER). Prokázalo se, že míra absorpce [¹⁸F]FES v nádorové tkáni odpovídá koncentraci ER v této tkáni. Klinické studie ukázaly, že s [¹⁸F]FES je možné prokázat inhibiční efekt anti-estrogenových přípravků používaných při terapii rakoviny prsu.



16 α -[¹⁸F]fluorestradiol (*IX*)

3.9. Fluorované sloučeniny pro diagnostiku karcinomu prostaty

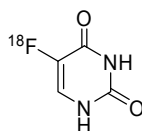
Efektivní léčba karcinomu prostaty předpokládá její včasnou diagnózu. Diagnóza je založena na absorpci androgenních hormonů typu testosteronu, dihydrotestosteronu, 19-nortestosteronu, miboleronu a metribolonu v tkáni prostaty. Proto také jsou jejich fluorované deriváty často uváděny jako potenciální radiofarmaceutické přípravky pro PET. Nejzajímavější se jeví v poslední době 16 β -[¹⁸F]fluor-4,5-dihydrotestosteron ([¹⁸F]-DHT), který je nejen citlivým diagnostikem nádorů prostaty, ale míra jeho absorpce také ukazuje na typ a stádium nádoru. To umožňuje lepší volbu léčebného postupu¹³.



16 β -[¹⁸F]fluor-4,5-dihydrotestosteron (*X*)

3.10. Sloučeniny značené ¹⁸F pro diagnostiku kolorektálního karcinomu

5-[¹⁸F]fluoruracil ([¹⁸F]FU), který je v neaktivní formě používán k léčbě jaterních metastáz, se často uvádí jako radiofarmakum pro diagnostiku kolorektálního karcinomu. Kolorektální karcinom je diagnostikován v souvislosti s výskytem jaterních metastáz. [¹⁸F]FU může sloužit k odhadu intracelulární koncentrace 5-FU v jaterní ležích a k optimalizaci léčby na základě farmakokinetické studie

5-[¹⁸F]fluoruracil (X1)

provedené pomocí PET².

4. Závěr

Studiu syntéz fluorovaných sloučenin značených ¹⁸F je věnována v radiofarmacii značná pozornost. Studovány jsou současně i jejich farmaceutické a farmakologické vlastnosti. Převážná většina těchto sloučenin se připravuje nukleofilní substitucí funkční skupiny ¹⁸F⁻ v příslušném prekurzoru. Dosud nejrozšířenějším radiofarmakem je 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluor-D-glukosa, která sleduje glukosový metabolismus tkáně. Jeho specifčnost je však pro diagnostiku mnohých onemocnění omezená. Další studium je soustředěno na sloučeniny, potenciální radiofarmaceutické přípravky, které vykazují významné farmakologické účinky, mají vhodný biologický poločas a na rozdíl od [¹⁸F]FDG vykazují vyšší specifčnost. Moderní radiofarmaceutické přípravky pro pozitronovou emisní tomografii slouží především k určení buněčného metabolismu tj. k sledování syntézy proteinů, transportu aminokyselin, syntézy nukleových kyselin a syntézy nukleosidů.

Autoři děkují grantové agentuře Ministerstva průmyslu a obchodu České republiky za podporu projektu číslo 2A-1TP1/055 a Radě programu podpory cíleného výzkumu a vývoje Akademie věd České republiky za podporu projektu číslo IBS1048352.

LITERATURA

- Couturier O., Luxen A., Chatal J. F., Vuillez J. P., Rigo P., Histinx R.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 31, 1182 (2004).
- Varagnolo L., Stokkel M. P. M., Mazzi U., Pauwels E. K. J.: *Nucl. Med. Biol.* 27, 103 (2000).
- Guhlke S., Wester H. J., Bruns C. H., Stöcklin G.: *Nucl. Med. Biol.* 21, 819 (1994).
- Wester H. J., Schottelius M., Scheidhauer K., Meisetschläger G., Herz H., Rau F. C., Reubi J. C.: *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 30, 117 (2003).
- Shiue C. Y., Bai L. Q., Shiue G. G., Rysavy J. A., Pleus R. C., Hui H., Frick M. P., Catt J. D.: *Nucl. Med. Biol.* 20, 625 (1993).
- Collier T. L., O'Brien J. C., Waterhouse R. N.: *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 38, 785 (1996).
- Rasey J. S., Koh W. J., Grierson J. R., Grunbaum Z., Krohn K. A.: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 17, 985 (1989).
- Rasey J. S., Hofstrand P. D., Chin L. K., Tewson T. J.: *J. Nucl. Med.* 40, 1072 (1999).
- Gambhir S. S., Barrio J. R., Phelps M. E., Iyer M., Namavari M., Satyamurthy N., Wu L., Green L. A., Bauer E., MacLaren D. C., Nguyen K., Berk A. J., Cherry S. R., Herschman H. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2333 (1999).
- Grierson J. R., Shields A. F.: *Nucl. Med. Biol.* 27, 143 (2000).
- Vaidyanathan G., Zalutsky M. R.: *Nucl. Med. Biol.* 24, 171 (1997).
- Laverman P., Boerman O. C., Corstens F. H. M., Oyen W. J. G.: *Eur. J. Nucl. Med.* 29, 681 (2002).
- Liu A., Dence C. S., Welch M. J., Katzenellenbogen J. A.: *J. Nucl. Med.* 33, 724 (1992).

L. Procházka^a, M. Kropáček^a, M. Mirzajevová^a, J. Zimová^a, M. Försterová^a, H. Švecová^a, F. Melichar^a, and O. Bělohávek^b (^a Department of Radiopharmaceuticals, Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Řež near Prague, ^b Department of Nuclear Medicine and Positron Emission Tomography Centre, Hospital Homolka, Prague): **Fluorinated Compounds Labelled with ¹⁸F as Radiopharmaceuticals**

Radiopharmaceuticals labelled with ¹⁸F are the most studied compounds in nuclear medicine, especially for positron emission tomography (PET). Recent studies are engaged in developing new compounds for PET, which should be more specific in certain processes than the widespread 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose ([¹⁸F]FDG). Novel radiopharmaceutical compounds trace cell metabolism, such as protein synthesis, amino acid transport, or nucleoside synthesis. Several promising fluorinated compounds are introduced.