

INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ

CENTRUM RADIOCHEMII I CHEMII JĄDROWEJ

Radionuklidy skandu dla radiofarmaceutyków teranostycznych

Rafał Walczak

Promotor pracy: prof. dr hab. Aleksander Bilewicz

Promotor pomocniczy: dr hab. Marek Pruszyński

Przez ostatnie dziesięciolecia obserwujemy burzliwy rozwój medycyny nuklearnej, a XXI wiek przyniósł nowe rozwiązania, zarówno w dziedzinie diagnostyki jak i terapii, z zastosowaniem emiterów promieniowania jonizującego. Najszybciej rozwijającą się gałęzią medycyny nuklearnej jest diagnostyka, w której najczęściej stosowanymi radionuklidami są: ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, czy ^{68}Ga . Nieco mniej zaawansowane badania trwają nad metodami terapeutycznymi z zastosowaniem emiterów promieniowania β^- (np. ^{177}Lu , ^{90}Y) i α (np. ^{225}Ac , ^{223}Ra). Obecny intensywny rozwój medycyny nuklearnej związany jest z nowymi odkryciami w dziedzinie biologii molekularnej i medycyny, które umożliwiają otrzymywanie radiofarmaceutyków celowanych, które mają trafiać bezpośrednio do patologicznie zmienionych tkanek oraz radiofarmaceutyków mogących znaleźć zastosowanie w metodach teranostycznych. Przykładem radionuklidów spełniających wymogi stawiane w medycynie nuklearnej są radionuklidy skandu: ^{43}Sc i ^{44}Sc będące emiterami promieniowania β^+ oraz β^- promieniotwórczy ^{47}Sc . Charakteryzują się one optymalnymi parametrami do zastosowania w celach diagnostycznych (^{43}Sc i ^{44}Sc) oraz terapeutycznych (^{47}Sc). Tworzą one również tzw. pary teranostyczne co oznacza, że oparte na nich radiofarmaceutyki z powodzeniem mogą znaleźć zastosowanie w nowoczesnych spersonalizowanych metodach leczenia.

Celem mojej pracy było opracowanie metody wytwarzania nowych celowanych radiofarmaceutyków opartych na radionuklidach skandu. Praca zawiera cały przekrój badań, począwszy od produkcji radionuklidów do określenia właściwości chemicznych i biologicznych zsyntezowanych radiofarmaceutyków.

Pierwszym etapem mojej pracy było opracowanie wydajnych metod cyklotronowej produkcji radionuklidów skandu. W czasie realizacji tego celu współpracowałem z krajowymi i zagranicznymi jednostkami posiadającymi cyklotrony i kadrę niezbędną do ich obsługi. Główną część badań przeprowadziłem w ramach wspólnego grantu rozwojowego NCBR z naukowcami pracującymi w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów na Uniwersytecie Warszawskim (śp. prof. Jerzym Jastrzębskim, dr. hab. Jarosławem Choińskim, dr Anną Stolarz, dr Agnieszką Trzcinską i mgr. Mateuszem Sitarzem). Tam też na cyklotronach U-200 oraz GE-PETtrace przeprowadziliśmy zaproponowane przez nas metody produkcji radionuklidów skandu w następujących reakcjach: $^{40}\text{Ca}(\alpha,p)^{43}\text{Sc}$, $^{40}\text{Ca}(\alpha,n)^{43}\text{Ti} \rightarrow ^{43}\text{Sc}$, $^{42}\text{Ca}(d,n)^{43}\text{Sc}$, $^{44}\text{Ca}(p,n)^{44}\text{Sc}$, $^{50}\text{Ti}(p,\alpha)^{47}\text{Sc}$. Produkcja radionuklidu ^{47}Sc w reakcjach $^{48}\text{Ca}(p,2n)^{47}\text{Sc}$ i $^{48}\text{Ca}(p,d)^{47}\text{Ca} \rightarrow ^{47}\text{Sc}$ była prowadzona również w Instytucie Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego PAN (prof. dr hab. Jerzy Mietelski, dr. Ryszard Misiak, mgr inż. Bogdan Wąs, inż. Mirosław Bartyzel) oraz w centrum cyklotronowym ARRONAX we Francji (prof. Férid Haddad, dr Arnaud Guertin, mgr Etienne Nigron). Przetestowane metody zapewniają możliwość produkcji radionuklidów skandu o aktywności rzędu dziesiątek GBq dla ^{43}Sc , ^{44}Sc i ^{47}Sc .

Kolejnym krokiem było opracowanie metod pozwalających na wydajne wydzielenie radionuklidów skandu z napromieniowanych tarcz. Do wydzielenia radionuklidów skandu z tarcz CaCO_3 zastosowałem chromatografię kolumnową (jonitową z użyciem żywicy Chelex100 oraz ekstrakcyjną z żywicami UTEVA i DGA) i mikrofiltrację. Natomiast do wydzielenia skandu z tarcz TiO_2 zastosowałem chromatografię kolumnową z żywicą ekstrakcyjną DGA. Dodatkowo eluat zawierający skand doczyszczalem na kolumnie wypełnionej żywicą Dowex 50WX4. Pozwoliło to także na zmianę roztworu z kwasu solnego na bufor octanowy o pH 4,5, który jednocześnie stanowi idealne środowisko do kompleksowania jonów skandu. Każdą z metod przetestowałem na symulowanym materiale tarczowym znakowanym ^{46}Sc , wyznaczyłem profile elucji i poziom odzysku materiału tarczowego. Na podstawie wstępnie uzyskanych wyników, do dalszych badań wybrałem dwie najbardziej obiecujące metody wydzielenia jonów skandu z tarcz wapniowych: ekstrakcję kolumnową z żywicą UTEVA, dla której odzysk skandu wynosił $74,4 \pm 2,2\%$ w objętości 1,8 ml, a wapnia $93,0 \pm 1,0\%$ oraz mikrofiltrację z odzyskiem skandu $95,8 \pm 1,7\%$ w 1 ml i $91,0 \pm 1,0\%$ wapnia. Dla obu metod wykonałem również kontrolę wydajności oczyszczania roztworu skandu z jonów innych metali (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} i Fe^{3+}). Ostatecznie na podstawie wszystkich uzyskanych wyników do wydzielenia radionuklidów skandu z tarczy CaCO_3 wybrałem metodę mikrofiltracyjną, którą stosowałem w dalszych etapach swojej pracy.

W celu zoptymalizowania połączenia radionuklidów z biomolekułą naprowadzającą przebadalem szereg ligandów bifunkcyjnych. Ich zadaniem jest trwale związanie kationu metalu z wektorem. Najczęściej stosowanym do tej pory ligandem jest DOTA, która tworzy stabilne kompleksy z metalami. Jednak do tego procesu zazwyczaj wymagana jest wysoka temperatura (wysoka wydajność kompleksowania w czasie 20 min zachodzi dopiero w temp. 95°C), co może wpłynąć na mniejsze zastosowanie tego ligandu do szybkiego znakowania wektorów białkowych. W celu przyłączenia radionuklidów do przeciwciał monoklonalnych i ich fragmentów, które nie są odporne na wysokie temperatury, sprawdziłem wydajność znakowania oraz stabilność wiązań dla wybranych ligandów, niewymagających podwyższonej temperatury przy znakowaniu. Do badań wybrałem ligandy DTPA, HBED, EGTA, THP oraz Lumi-4. Niestety z wybranych związków jedynie pochodna ligandu DTPA spełnia warunki niezbędne do zastosowania w medycynie nuklearnej, wykazując wydajność kompleksowania metali powyżej 92% oraz wysoką stabilność wiązania skandu. W związku z otrzymanymi wynikami do dalszych syntez stosowałem jedynie bifunkcyjne ligandy DOTA lub DTPA oraz ich pochodne.

Wybrane ligandy przyłączyłem do biomolekuł mających powinowactwo do receptorów HER-2: przeciwciało monoklonalne trastuzumab i jednodomenowe przeciwciało (nanociało) 2Rs15d. Ostatecznie otrzymałem trzy różne biokoniugaty: DOTA-nanociało, DTPA-nanociało i DTPA-trastuzumab, do których następnie przyłączyłem radionuklidy skandu. Ze względu na bardzo niską odporność białka na wysokie temperatury nie zdecydowałem się na syntezę biokoniugatu DOTA-trastuzumab, ponieważ przy próbie szybkiego kompleksowania metali przez ligand DOTA wymagana jest podwyższona temperatura. Przy znakowaniu biokoniugatu DOTA-nanociało obniżyłem temperaturę reakcji do 50°C, gdyż jest ono stabilne w tej temperaturze, jednocześnie wydłużając czas znakowania do 60 minut. Stabilność zsyntezowanych radiobiokoniugatów sprawdziłem w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami oraz w surowicy krwi ludzkiej w temp. 37°C.

Zsyntezowane radiobiokoniugaty poddałem badaniom komórkowym *in vitro*, w celu określenia ich podstawowych parametrów. Określiłem ich powinowactwo receptorowe, specyficzność wiązania oraz poziom internalizacji. Uzyskane wyniki potwierdziły, że badane związki specyficznie przyłączają się do receptorów HER-2. Ich współczynnik powinowactwa receptorowego (K_d) przyjmuje wartości w przedziale 3,24 - 5,36 nM, co jest porównywalne z wartościami dla niemodyfikowanych wektorów, odpowiednio trastuzumab $K_d = 4,09$ nM, nanociało $K_d = 3,14$ nM. Radiobiokoniugaty nanociała wykazywały umiarkowany współczynnik internalizacji w zakresie 30 - 50% po 24 h.

Z przeprowadzonych badań wynika, że związki oparte na radionuklidach skandu przyłączonych do trastuzumabu lub nanociała 2Rs15d spełniają wymagania stawiane radiofarmaceutynom i mogą zostać w przyszłości zastosowane w medycynie nuklearnej.