

**ΝΑΤΑΣΑ ΚΥΖΑ**

**ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**“ Μοριακή απεικόνιση της  
αγγειογένεσης με μονοκλωνικό  
αντίσωμα επισημασμένο με  
<sup>99m</sup>Τεχνήτιο ”**

---

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ  
ΡΑΔΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**



# ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

---

Σε συνεργασία με το *Ινστιτούτο Πυρηνικών και  
Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας,  
Ενέργειας και Ασφάλειας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε*  
"ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ"



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γ. Φώσκολος (επιβλέπων)  
Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Χημείας

Α. Τσοτίνης  
Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Χημείας

Π. Μπουζιώτη (συνεπιβλέπουσα)  
Ερευνήτρια Β', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

ΣΕΛ.

## A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

<b>Ραδιοχημεία</b>	<b>1</b>
<b>1. Ραδιενεργά μόρια με εφαρμογή στην Πυρηνική Ιατρική.</b>	<b>2</b>
1.1. Γενικά για τα ραδιοϊσότοπα	2
1.2. Τύποι ραδιενεργού διάσπασης	3
1.2.1. Εκπομπή σωματιδίων α	3
1.2.2. Εκπομπή σωματιδίων β	4
1.2.3. Εκπομπή ακτινοβολίας γ	4
1.3. Τι καλούμε ραδιοφάρμακο	5
1.3.1. Διαγνωστικά Ραδιοϊσότοπα	6
1.3.2. Θεραπευτικά Ραδιοϊσότοπα	7
1.4. Μέθοδοι απεικόνισης	11
1.4.1. Τεχνική PET	15
1.4.2. Τεχνική SPECT	17
<b>2. Γενικά στοιχεία για το τεχνήτιο</b>	<b>20</b>
2.1. Το Τεχνήτιο (Tc)	20
2.2. Τεχνήτιο 99	22
2.3. Παραγωγή $^{99m}\text{Tc}$	23
2.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες του Τεχνητίου	25
2.5. Χημεία συμπλόκων Τεχνητίου, κυρίως Tc(I) και Tc(V)	26
<b>3. Βιομόρια και εφαρμογή τους στην πυρηνική ιατρική</b>	<b>30</b>
3.1. Γενικά περί πεπτιδίων στην ογκολογία	30
3.2. Πεπτίδια επισημασμένα με ραδιονουκλίδια	31
3.3. Γενικά περί μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ογκολογία	32
3.4. Μονοκλωνικά αντισώματα επισημασμένα με ραδιονουκλίδια	39

3.4.1. Άμεση επισήμανση	41
3.4.2. Έμμεση επισήμανση	42
<b>4. Αγγειογένεση στο καρκίνο . Αντισώματα έναντι VEGF</b>	<b>46</b>
4.1. Γενικά για την αγγειογένεση	47
4.2. Ο διακόπτης της αγγειογένεσης	49
4.3. Ο ρόλος του VEGF παράγοντα στην αγγειογένεση	53
4.4. Bevacizumab	54
<b>5. Σκοπός της εργασίας</b>	<b>59</b>

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

<b>1. Αντιδραστήρια – Πρώτες ύλες</b>	<b>61</b>
<b>2. Υλικά</b>	<b>63</b>
<b>3. Όργανα- Συσκευές</b>	<b>64</b>
<b>4. Παραγωγή του <math>^{99m}\text{Tc}</math></b>	<b>67</b>
<b>5. Επισήμανση του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab με τεχνητό μέσω <math>^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3</math>. <math>^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3</math>-bevacizumab</b>	<b>69</b>
5.1. Σχηματισμός του προσυμπλόκου [ $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$ ] $^+$	69
5.1.1. Ραδιοχημικός έλεγχος του προσυμπλόκου	69
5.2. Επισήμανση του αντισώματος με $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$	71
5.2.1. Ραδιοχημικός έλεγχος του $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab	71
5.2.2. Επίδραση χρόνου θέρμανσης στην επισήμανση	73
5.2.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος	73
5.2.4. Επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )	73
5.2.5. Καθαρισμός του συμπλόκου	73
<b>6. Επισήμανση του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab με τεχνητό μέσω <math>^{99m}\text{Tc}</math>-MDP. <math>^{99m}\text{Tc}</math>-bevacizumab</b>	<b>74</b>
6.1. Αναγωγή του bevacizumab	74

6.2.	Προετοιμασία προσκευάσματος (kit) MDP	75
6.3.	Επισήμανση του τροποποιημένου αντισώματος με $^{99m}\text{Tc}$ -MDP	75
6.3.1.	Ραδιοχημικός έλεγχος του $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab	76
6.3.2.	Επίδραση χρόνου θέρμανσης στην επισήμανση	76
6.3.3.	Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος	76
6.3.4.	Επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )	76
6.3.5.	Καθαρισμός του συμπλόκου	77
<b>7.</b>	<b><i>In vitro</i> πειράματα.</b>	<b>78</b>
7.1.	Μελέτες σταθερότητας ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab και $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab	78
7.1.1.	Σταθερότητα με τη πάροδο του χρόνου	78
7.1.2.	Σταθερότητα σε ανθρώπινο πλάσμα (plasma stability)	78
7.2.	Προσδιορισμός ανοσοδραστικότητας των ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων	78
7.3.	Μελέτη σύνδεσης ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab και $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab σε καρκινικά κύτταρα	79
7.3.1.	Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων	79
7.3.2.	<i>In vitro</i> μελέτη ειδικής σύνδεσης σε καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον αυξητικό παράγοντα VEGF-καμπύλες κορεσμού	79
<b>8.</b>	<b><i>In vivo</i> αξιολόγηση ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων <math>^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3</math>-bevacizumab και <math>^{99m}\text{Tc}</math>-bevacizumab</b>	<b>82</b>
8.1.	Μελέτη σε πειραματόζωα	82
8.2.	Ανάπτυξη πειραματικού καρκινικού μοντέλου	82
8.3.	Μελέτη βιοκατανομής ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab και $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab	82

<b>9. Μελέτες απεικόνισης</b>	<b>85</b>
9.1. Περιγραφή απεικονιστικού συστήματος	85
9.2. Απεικόνιση πειραματοζώων	87
9.3. Ανάλυση Εικόνων	88

## **Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ -ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

<b>1. <math>^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}</math></b>	<b>90</b>
1.1. Σχηματισμός και ραδιοχημικός έλεγχος του προσυμπλόκου $[\text{}^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$	91
1.2. Σχηματισμός και ραδιοχημικός έλεγχος του επισημασμένου αντισώματος με τεχνητίο μέσω $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ . $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$	91
1.2.1. Επίδραση χρόνου θέρμανσης στην επισήμανση	92
1.2.2. Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος	93
1.2.3. Επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης	93
<b>2. <math>^{99m}\text{Tc-bevacizumab}</math></b>	<b>94</b>
2.1. Αναγωγή bevacizumab	94
2.2. Προετοιμασία kit μεθυλενοδιφωσφονικού οξέος MDP	97
2.3. Σχηματισμός και ραδιοχημικός έλεγχος του επισημασμένου αντισώματος με τεχνητίο μέσω $^{99m}\text{Tc-MDP}$ . $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$	97
2.3.1. Επίδραση χρόνου θέρμανσης στην επισήμανση	98
2.3.2. Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος	98
2.3.3. Επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης	99
<b>3. <i>In vitro</i> πειράματα.</b>	<b>100</b>
3.1. Μελέτες σταθερότητας των ανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ και $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$	100
3.1.1. Σταθερότητα με την πάροδο του χρόνου	100
3.1.2. Σταθερότητα σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος	101

3.2. Προσδιορισμός ανοσοδραστικότητας των ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων	102
3.3. Συγκριτική μελέτη ειδικής σύνδεσης των ανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ και $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ σε καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον αυξητικό παράγοντα VEGF	103
<b>4. Συγκριτική μελέτη βιοκατανομής επισημασμένων ανισωμάτων <math>^{99m}\text{Tc}</math> σε παθολογικούς μύς σε 4 και 24 ώρες</b>	<b>107</b>
4.1. Μελέτη βιοκατανομής του $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ σε χρονικό διάστημα των 4και 24 h	107
4.2. Μελέτη βιοκατανομής του $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ σε χρονικό διάστημα 4 και 24 h	112
<b>5. Μελέτες απεικόνισης των ανοσοσυμπλεγμάτων <math>^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}</math> και <math>^{99m}\text{Tc-bevacizumab}</math></b>	<b>116</b>
<b>Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>120</b>
<b>Ε. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>125</b>
<b>ΣΤ. ABSTRACT</b>	<b>126</b>
<b>Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>127</b>

---

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο [Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας](#) του ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» υπό την επίβλεψη της Δρ. Π. Μπουζιώτη με τη συνεργασία του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του καθηγητή Γ. Φώσκολου.

Ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Π. Μπουζιώτη για την πολύτιμη βοήθεια, τη συνεχή υποστήριξη και καθοδήγησή της όλα τα χρόνια, που ήταν ουσιαστική για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, αλλά κυρίως για την εμπιστοσύνη την οποία έδειξε σε εμένα από την πρώτη στιγμή.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στον Δρ. Γ. Φώσκολο για την καθοδήγησή του και τις πολύτιμες συμβουλές του. Θερμά ευχαριστώ τον Δρ Α. Τσοτίνη για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις του ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Χ. Τσουκαλά, επιστημονικό συνεργάτη του ΙΠΡΕΤΕΑ, για τη πολύτιμη βοήθεια και τις ουσιαστικές υποδείξεις του. Ξεχωριστό ευχαριστώ στην Δρ. Μ. Παραβατού για την ουσιαστική συμβολή και βοήθεια της στη μελέτη αυτή. Ευχαριστώ θερμά τη Δρ. Λιβανίου για τη σημαντική βοήθεια και συνεργασία στην εκπόνηση των αξιολογήσεων. Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Α. Βαρβαρήγου για την πολύτιμη βοήθεια. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στους Δρ .Θ.Τσοτάκο, Δρ. Δ.Ψημάδα και Δρ. Ε. Φραγκογιώργη για την ουσιαστική βοήθεια και πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους που μου προσέφεραν κατά τη διεξαγωγή της μελέτης αυτής. Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στο κ. Σ.Ξανθόπουλο για την αναντικατάστατη βοήθειά του στη βιολογική αξιολόγηση της μελέτης. Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Γ. Καστή για την πολύτιμη και ουσιαστική συμβολή του στα πειράματα απεικόνισης της έρευνας. Εκφράζω θερμές ευχαριστίες στο προσωπικό του εργαστηρίου Ραδιοφαρμάκων του ΙΠΡΕΤΕΑ., και ιδιαιτέρως τον Δρ. Ιωάννη Πιρμεττή και τον Δρ. Μηνά Παπαδόπουλο, για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους και την απλόχερη βοήθεια και συμπαράστασή τους. Εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες στους συνεργάτες του Ινστιτούτου Χ. Τριάντη, Α. Μαγγίνα για τις παρατηρήσεις και την ουσιαστική βοήθειά τους. Η συμπαράσταση, υποστήριξη και η κατανόησή όλων υπήρξε συγκλονιστική. Θερμά ευχαριστώ.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγκεκριμένη μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Ραδιοφαρμακευτική Χημεία».

Το πειραματικό σκέλος της εργασίας εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών, Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών Δημόκριτος, υπό την επίβλεψη της Δρ Π.Μπουζιώτη. Σ' αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους στο Τμήμα, όχι μόνο για τη δυνατότητα που μου έδωσαν να γίνουν οι πειραματικές εργασίες στο εργαστήριο, αλλά και για την υπόδειξη και την επίβλεψη της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την παραμονή μου στο εργαστήριο και τη πολύτιμη βοήθεια που προσέφεραν κατά την εκπόνηση του πειραματικού σταδίου της συγκεκριμένης πρωτότυπης εργασίας.

# Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Η Ραδιοφαρμακευτική επιστήμη οφείλει την εξέλιξη της στην ανάπτυξη της πυρηνικής ιατρικής, ενώ αποτελεί κλάδο της φαρμακευτικής, στον οποίο εφαρμόζονται οι γνώσεις της φαρμακοχημείας σε συνδυασμό με τη ραδιοχημεία. Οι πρώτες έρευνες με ραδιενεργές ουσίες χρονολογούνται το 1920, όταν ο καθηγητής Blumgart του Πανεπιστημίου της Βοστώνης και οι συνεργάτες του χορήγησαν ράδιο σε ασθενή, ο οποίος έπασχε από καρδιακό νόσημα. Μέσω εξωτερικού ανιχνευτή ήταν εφικτός ο προσδιορισμός της ακτινοβολίας στον άλλο βραχίονα του ασθενούς, με αποτέλεσμα να προσδιοριστεί η ταχύτητα της κυκλοφορίας του αίματος.

Ορόσημο στην ανάπτυξη της Ραδιοφαρμακευτικής επιστήμης αποτελεί η λειτουργία των πυρηνικών αντιδραστήρων, οι οποίοι κατέστησαν διαθέσιμο ένα σημαντικό αριθμό ραδιονουκλιδίων για χρήση στη Πυρηνική Ιατρική. Οι συγκεκριμένες ραδιενεργές ενώσεις έβρισκαν όλο και μεγαλύτερη εφαρμογή με την πάροδο των ετών στην Ιατρική, με στόχο την αντιμετώπιση και τη θεραπεία του καρκίνου. Σημαντικό για την πρόοδο της Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας ήταν η σύνθεση συμπλόκων του τεχνητίου-99m με διάφορες φωσφορικές ενώσεις, τα οποία βρίσκουν εφαρμογή ως διαγνωστικοί παράγοντες για παθήσεις των οστών. [1]

Κατά τη χρονική περίοδο του 1990, αναπτύσσεται και οργανώνεται η έρευνα με στόχο τον σχεδιασμό περισσότερων βιολογικά εξειδικευμένων ραδιοφαρμάκων. Αποτέλεσμα είναι η καταπολέμηση ανίατων ασθενειών και η προάσπιση της ανθρώπινης ζωής, μέσω της ανάπτυξης της Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας. [1]

## 1. Ραδιενεργά μόρια με εφαρμογή στην Πυρηνική Ιατρική

### 1.1. Γενικά για τα ραδιοϊσότοπα

Η Πυρηνική Ιατρική είναι κλάδος της ιατρικής που χρησιμοποιεί ραδιενεργά στοιχεία για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Ο χρόνος ημίσειας ζωής των 1700 ραδιενεργών ισότοπων, των οποίων η ύπαρξή τους στη φύση έχει διαπιστωθεί, κυμαίνεται από μερικά κλάσματα του μικροδευτερολέπτου μέχρι τρισεκατομμύρια έτη.

Ισότοπα χαρακτηρίζονται τα άτομα ενός στοιχείου με τον ίδιο ατομικό αριθμό ( $Z$ ), αλλά με διαφορετικό αριθμό νετρονίων και κατ' επέκταση διαφορετικό μαζικό αριθμό ( $A$ ). Οι πυρήνες των διαφόρων ισότοπων ονομάζονται νουκλίδια, δηλαδή πυρήνες με συγκεκριμένο αριθμό νουκλεονίων (πρωτονίων και νετρονίων). Δεδομένου ότι αναφερόμαστε στο ίδιο στοιχείο σε θέση του περιοδικού πίνακα συνεπάγεται ότι τα ισότοπα θα έχουν και την ίδια ηλεκτρονιακή κατανομή. Έτσι, τα ισότοπα ενός στοιχείου εμφανίζουν τις ίδιες χημικές ιδιότητες αλλά διαφέρουν στις φυσικές τους ιδιότητες. [2]

Τα ισότοπα είναι σταθερά ή ασταθή. Ραδιοϊσότοπα λοιπόν, ονομάζονται τα ασταθή αυτά ισότοπα και οι πυρήνες τους, οι οποίοι διασπώνται. Αντίθετα με τα σταθερά ισότοπα, τα ασταθή (ραδιοϊσότοπα) διασπώνται αυθόρμητα με ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας. Η ενέργεια η οποία απελευθερώνεται κατά τη διάσπαση των ασταθών πυρήνων ραδιοϊσοτόπων, που διασπώνται προς πυρήνες μικρότερης μάζας ή/και ενέργειας, καλείται "ραδιενέργεια". Έχει εξακριβωθεί ότι τα ραδιενεργά στοιχεία είναι σε θέση να εκπέμπουν τριών ειδών ακτινοβολίες,  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$ . Κατά τη διάσπαση έχουμε το *μητρικό* πυρήνα, ο οποίος είναι αυτός που διασπάται και το *θυγατρικό* πυρήνα που προκύπτει κατά τη διάσπαση και μπορεί με τη σειρά του να αποτελέσει μητρικό πυρήνα για έναν άλλο, αφού είναι ικανός να υποστεί εκ νέου διάσπαση ανάλογα με το αν είναι σταθερός ή ασταθής πυρήνας. [1, 2]

Ο χρόνος ημίσειας ζωής ορίζεται ως ο χρόνος εκείνος κατά τον οποίο η παρεχόμενη ποσότητα ενός ραδιονουκλιδίου διασπάται στο μισό. Για ένα μοναδικό ατομικό πυρήνα ενός ραδιονουκλιδίου δεν μπορεί να προσδιορισθεί ο χρόνος διασπάσεως του. Αντιθέτως, όμως, για ένα μεγάλο αριθμό ασταθών ατομικών πυρήνων μπορεί να δοθεί μια πιθανότητα διασπάσεως  $\lambda$ . Η πιθανότητα αυτή ορίζεται ως η

σταθερά αναλογίας ( $\text{sec}^{-1}$ ) μεταξύ του αριθμού  $N$  των υπαρχόντων πυρήνων και του αριθμού των διασπάσεων στη μονάδα του χρόνου. Η απόλυτη τιμή αυτού του ρυθμού μεταβολής ονομάζεται ενεργότητα του δείγματος και εκφράζει τον μέσο αριθμό διασπάσεων ανά δευτερόλεπτο.

$$\lambda = -\frac{dN}{Ndt} \qquad N = N_0 e^{-\lambda t} \qquad t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{\lambda}$$

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση όπου  $N_0$  είναι ο αρχικός αριθμός ατόμων, τότε ο αριθμός των ατόμων που εξακολουθούν να υπάρχουν μετά από χρόνο  $t$  ορίζεται με βάση την εξίσωση (1.1):

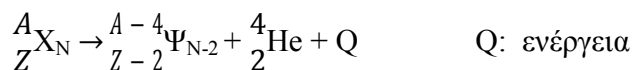
$$N = N_0 e^{-0.693 (t/t_{1/2})} \qquad (1.1)$$

## 1.2. Τύποι ραδιενεργού διάσπασης

Κατά τη ραδιενεργό διάσπαση λαμβάνει χώρα ελευθέρωση σωματιδιακής ακτινοβολίας δηλ. σωματίδια  $\alpha$  ή  $\beta$  (ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια) και ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φωτόνια  $\gamma$ ). Οι ασταθείς πυρήνες διαπώνται με εκπομπή σωματιδίων  $\alpha$  ή  $\beta$ . Στη περίπτωση που τα θυγατρικά νουκλίδια δεν είναι σταθερά και ο πυρήνας θεωρείται και πάλι ραδιενεργός, τότε αποδιεγείρεται με εκπομπή ακτινοβολίας  $\gamma$ . [1]

### 1.2.1. Εκπομπή σωματιδίων $\alpha$

Τα σωματίδια  $\alpha$  είναι πυρήνες ηλίου  ${}^4_2\text{He}$  με φορτίο  $+2$ . Αυθόρμητη εκπομπή παρατηρείται κατά τη διάσπαση των βαρέων πυρήνων. Κατά τη διάσπαση αυτή ο ατομικός αριθμός ( $Z$ ) ελαττώνεται κατά 2, άρα και ο μαζικός ( $A$ ) κατά 4.



Τα σωματίδια αυτά έχουν μικρή εμβέλεια (2-10cm) στον ατμοσφαιρικό αέρα, ενώ πολύ μικρή μέσα στα στερεά υλικά. Ένα λεπτό φύλλο μετάλλου (φύλλο αργιλίου

πάχους 0,1mm) ή ένα φύλλο χαρτιού αρκεί για την πλήρη απορρόφησή τους, ανακόπτοντας έτσι τη κίνηση τους.

### 1.2.2. Εκπομπή σωματιδίων β

Τα σωματίδια β δεν προϋπάρχουν μέσα στο πυρήνα αλλά παράγονται κατά τη στιγμή της διάσπασης. Η εκπομπή σωματιδίων β αναφέρεται σε διασπάσεις, κατά τις οποίες εκπέμπονται:

➤ *ηλεκτρόνια ( $e^-$ ):* λαμβάνει χώρα μετατροπή ενός νετρονίου (n) σε πρωτόνιο ( $p^+$ ). Έτσι ο ατομικός αριθμός (Z) αυξάνεται κατά 1, ενώ ο μαζικός δεν μεταβάλλεται. Διαφοροποιούνται οι χημικές ιδιότητες αφού σχηματίζεται πυρήνας άλλου στοιχείου (θυγατρικός πυρήνας)

ή

➤ *ποζιτρόνια (ηλεκτρόνια με θετικό φορτίο,  $\beta^+$ ):* ένα  $p^+$  του πυρήνα μετατρέπεται σε n. Ο αριθμός Z ελαττώνεται κατά 1, ενώ ο μαζικός παράμενει ίδιος

ή

➤ *γίνεται σύλληψη ηλεκτρονίου από το πυρήνα (EC: electron capture):* ο πυρήνας προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο  $e^-$ . Ένα πρωτόνιο του πυρήνα συνδέεται με το ηλεκτρόνιο αυτό και μετατρέπεται σε n. Αποτέλεσμα  $Z_{\text{μητρ.}} = Z_{\text{θυγ.}} - 1$  και A=ίδιος. Το κενό στο τροχιακό καλύπτεται από ηλεκτρόνια εξωτερικών τροχιών με σύγχρονη εκπομπή ακτίνων X.

Η εμβέλεια των σωματιδίων β στον αέρα είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή των σωματιδίων α, ίσης κινητικής ενέργειας. Τα σωματίδια β απορροφώνται από μια ίντσα ξύλου 2.3cm ή από φύλλο αργιλίου πάχους 2mm.

### 1.2.3. Εκπομπή ακτινοβολίας γ

Όταν ένας πυρήνας διασπάται με εκπομπή σωματιδίων (α) ή ηλεκτρονίων ( $\beta^-$ ) ή ποζιτρονίων ( $\beta^+$ ) ή με σύλληψη  $e^-$ , ο θυγατρικός τότε πυρήνας που προκύπτει βρίσκεται

σε διεγερμένη κατάσταση, δηλ. τα συστατικά του έχουν κινητική ενέργεια μεγαλύτερη από την κανονική και έτσι καθίσταται ασταθής.

Το ποσό αυτής της ενέργειας ελευθερώνεται με τη μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας  $\gamma$  και ο πυρήνας μεταπίπτει σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται, έχει ενέργεια ίση με τη διαφορά ενέργειας των δύο ενεργειακών καταστάσεων του πυρήνα. Η ακτινοβολία  $\gamma$  είναι ηλεκτρομαγνητικής φύσεως, δεν φέρει ηλεκτρικό φορτίο και έχει μεγάλη διεισδυτική ικανότητα. Έτσι δεν παρατηρείται μεταβολή ατομικού ή μαζικού αριθμού κατά την εκπομπή της.[3]

Η ακτινοβολία  $\gamma$  λόγω της μεγάλης διεισδυτικής ικανότητάς της μπορεί να ανακοπεί μόνο από τοίχωμα μολύβδου πάχους τουλάχιστον 5 cm. [1, 2]

### **1.3. Τι καλούμε ραδιοφάρμακο**

Τα ραδιοφάρμακα (*radiopharmaceuticals*) αποτελούν ανόργανες ή οργανικές ενώσεις ραδιονουκλιδίων (ιχνηθετών), με κατάλληλες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες προκειμένου να χορηγηθούν στον άνθρωπο με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα στα πλαίσια διάγνωσης (κυρίως) ή θεραπείας (σε μικρότερο ποσοστό) στην πυρηνική ιατρική.

Στα ραδιοφάρμακα η έννοια της “δόσης” αναφέρεται στη “χορηγούμενη ακτινοβολία” και όχι στη ποσότητα της χορηγούμενης ουσίας, όπως στα συμβατικά φάρμακα. Επομένως, έννοιες όπως της μέγιστης εφάπαξ δόσης ή μέγιστης ημερήσιας δόσης δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αυτά. Η χορήγηση των ραδιοφαρμάκων γίνεται εφάπαξ σε δόση ακτινοβολίας σε ποσότητα ικανή να διεκπεραιωθεί η εξέταση ή και η θεραπεία για την οποία προορίζονται. Τα ραδιοφάρμακα, σε ότι αφορά στη δραστική ουσία, χορηγούνται σε πολύ μικρή ποσότητα, της τάξης των mg ή  $\mu\text{g}$ . Η έννοια της “θεραπευτικής δόσης” χρησιμοποιείται στα ραδιοφάρμακα και αφορά στην ποσότητα ακτινοβολίας, η οποία δρα θεραπευτικά. Ορισμένες προϋποθέσεις, όπως οι κανόνες “ορθής διαδικασίας παραγωγής φαρμάκων” (GMP: Good Manufacturing Practice), η

στεριότητα, η απουσία πυρετογόνων, η χημική σταθερότητα, οι αντιδράσεις ευαισθησίας κλπ, ισχύουν και στα ραδιοφάρμακα.

Κατά τη χορήγηση των ραδιοφαρμάκων στον οργανισμό παρατηρείται μια εκλεκτική εντόπιση σε ένα όργανο ή ιστό του σώματος (όργανο-στόχος) [1]. Στη σύνθεση λαμβάνεται υπόψη η τροποποίηση της χημικής δομής του μορίου, ώστε να προκύπτει η εκλεκτική αυτή εντόπισή τους και η συμμετοχή σε διάφορους βιολογικούς μηχανισμούς. Κατά το σχεδιασμό λοιπόν των ραδιοφαρμάκων λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές ιδιότητές τους (το μέγεθος του μορίου, το φορτίο, η λιποφιλικότητα κ.λ.π), οι οποίες είναι καθοριστικές για την εκλεκτική πρόσληψη και παραμονή των ραδιοφαρμάκων στο επιθυμητό όργανο-στόχο. [4, 5]

Σημαντικό ρόλο στο να κατευθυνθεί ένα ραδιοφάρμακο στο όργανο-στόχο είναι η κατάλληλη φαρμακευτική μορφή για την διαμόρφωση του ραδιονουκλιδίου σε κολλοειδή ή συσσωματώματα. Έτσι ανάλογα με τις φυσικοχημικές ή βιολογικές ιδιότητες του ραδιοφαρμάκου, αυτό καθιλώνεται για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα, στα διάφορα όργανα ή ιστούς μεταφέροντας δόση ακτινοβολίας στο όργανο-στόχο. Ανάλογα με τη φύση της ακτινοβολίας, το ραδιοφάρμακο τότε δρα είτε θεραπευτικά είτε διαγνωστικά. [6]

### **1.3.1. Διαγνωστικά Ραδιοϊσότοπα.**

Η εφαρμογή των διαγνωστικών ραδιοϊσοτόπων γίνεται με σκοπό την απεικόνιση της βλάβης που έχει υποστεί ο ασθενής. Ο εντοπισμός της βλάβης γίνεται με εκπομπή ακτινοβολίας-γ καθορισμένης ισχύος, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να διαπερνάει τους ιστούς και να αντανakλάται στους ανιχνευτές, μέσω των οποίων συλλέγονται διάφορες πληροφορίες. Στον πίνακα 1.1, παρατίθενται διαγνωστικά ραδιοϊσότοπα, τα οποία βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη σύγχρονη Πυρηνική Ιατρική. [7]

Τα διαγνωστικά ραδιοϊσότοπα ανιχνεύονται μέσω της απεικονιστικής διάταξης που χρησιμοποιεί ιονίζουσα (φωτονιακή/σωματιδιακή) ακτινοβολία. Μέσω του συγκεκριμένου ανιχνευτή είναι εφικτή η συλλογή πληροφοριών σχετικά με την



κατανομή της ραδιενέργειας στους βιολογικούς ιστούς, εφόσον πρώτα καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός των ακτίνων γ-ακτινοβολίας. [7]

Ραδιοϊσότοπο	Χρόνος ημιζωής( $T_{1/2}$ )	Τρόπος διάσπασης
$^{131}\text{I}$	8.04d	$\gamma, \beta^-$
$^{67}\text{Ga}$	3.26d	$\gamma$
$^{111}\text{In}$	2.80d	$\gamma$
$^{123}\text{I}$	13.67h	$\gamma$
$^{64}\text{Cu}$	12.70h	$\gamma, \beta^-, \beta^+$
$^{99m}\text{Tc}$	6.03h	$\gamma$
$^{18}\text{F}$	1.83h	$\gamma, \beta^+$
$^{68}\text{Ga}$	1.14h	$\gamma, \beta^+$

**Πίνακας 1.1:** Τα κυριότερα διαγνωστικά ραδιοϊσότοπα.

### 1.3.2. Θεραπευτικά Ραδιοϊσότοπα.

Στην προσπάθεια καταπολέμησης ασθενειών, με τη χρήση ραδιενεργών φαρμάκων, τίθενται κάποιες προϋποθέσεις: [8]

1. Η ευαισθησία των κακοήθων όγκων στην επίδραση της ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερη, λόγω της μικρότερης ηλικίας τους, σε σχέση με τα υγιή κύτταρα, τα οποία είναι γερασμένα, στο μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού τους.

2. Η εκλεκτική προσρόφηση του ραδιοϊσοτόπου, από τον ιστό. Ένα παράδειγμα αποτελεί η προσρόφηση λόγω συγγένειας του ραδιονουκλιδίου  $^{131}_{53}\text{I}$  στο θυροειδή αδένα. Η συγγένεια προκύπτει από το γεγονός ότι ο θυροειδής αδένας αποτελεί πηγή παραγωγής του ισοτόπου του ιωδίου  $^{127}_{53}\text{I}$ . Έτσι, προς αποφυγή έκθεσης ακτινοβολίας των ιστών, οι

οποίοι δε σχετίζονται με την πληγείσα περιοχή, παρασκευάζονται ραδιοφάρμακα, τα οποία δύναται να προσροφηθούν στον προβληματικό ιστό.

3. Η περισσότερη ακτινοβολούμενη ενέργεια μελετάται ώστε, να αποτίθεται στο τέλος της διαδρομής της μέσα στον οργανισμό, σύμφωνα με την καμπύλη Bragg. Έτσι, το συγκεκριμένο τελικό-τμήμα, θα πρέπει να αποτελεί τον εσωτερικό χώρο του προβληματικού ιστού. [8]

Κατά την επιλογή ενός ραδιοϊσοτόπου λαμβάνονται υπόψη κάποια κριτήρια, τα οποία πρέπει να τηρούνται αυστηρά, ώστε να μην δημιουργούνται παρενέργειες, με αρνητικά αποτελέσματα για την υγεία του ασθενούς. [9]

Το πρώτο κριτήριο που θα πρέπει να τηρείται είναι η διάρκεια του χρόνου ημίσειας ζωής του ραδιοϊσοτόπου, η οποία θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη ή ίση με δώδεκα ώρες, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα για μεγάλη διάρκεια ακτινοβολήσης του όγκου του ασθενούς. Παράλληλα, παρέχεται ικανοποιητικός χρόνος όχι μόνο για την προετοιμασία και τη μεταφορά του επισημασμένου υλικού, αλλά και για την καθήλωση του στο όργανο-στόχο. Από την άλλη πλευρά, ο χρόνος ημιζωής δεν θα πρέπει να είναι αρκετά παρατεταμένος ( $> 10$  ημέρες), γιατί στη συγκεκριμένη περίπτωση δημιουργούνται προβλήματα στη θεραπεία του ασθενούς, λόγω των χαμηλών ρυθμών δόσεων χορήγησης των ραδιοφαρμάκων.

Το δεύτερο κριτήριο που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επιλογή ενός ραδιοϊσοτόπου, ως θεραπευτικού μέσου είναι η δραστηριότητά του, κατά την ενσωμάτωσή του σε βιολογικά υποστρώματα. Για το συγκεκριμένο λόγο δεν ενδείκνυνται, κατά την επιλογή θεραπευτικών ραδιοϊσοτόπων, τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα, τα οποία χαρακτηρίζονται αρκετά σταθερά, όπως είναι τα ευγενή αέρια. Παράλληλα, θα πρέπει τα ραδιοϊσότοπα, που θα επιλεγθούν ως θεραπευτικά, να εκπέμπουν  $\gamma$ -ακτινοβολία, σε ποσοστό μικρότερο του 10%, με στόχο να προσδιοριστούν επακριβώς οι φαρμακοκινητικές παράμετροι. Το χαμηλό ποσοστό εκπομπής  $\gamma$ -ακτινοβολίας ενός ραδιοϊσοτόπου δεν αποτελεί αρνητικό παράγοντα στην αποτελεσματικότητά του αφού η θεραπευτική αξία του ραδιοϊσοτόπου δεν καθορίζεται μόνο από αυτή καθαυτή την ακτινοβολία αλλά και την ακτινοβολία του περιβάλλοντος,

καθώς και των άλλων ιστών, οι οποίοι δεν αποτελούν στόχο. Ωστόσο, εξαίρεση στην επιλογή των θεραπευτικών ραδιοϊσοτόπων με υψηλή εκπομπή γ-ακτινοβολίας, αποτελούν εκείνα που μπορούν να διασπαστούν με εκπομπή Auger ηλεκτρονίων, διότι απαιτούνται χαμηλότερες δόσεις σε σύγκριση με ισότοπα β-εκπομπής. [13]

Ένα άλλο κριτήριο επιλογής των θεραπευτικών ραδιοϊσοτόπων αποτελεί η δυνατότητα να παραχθούν ελεύθερα φορέα, δηλαδή χωρίς την παρουσία του ίδιου ισοτόπου σε μη-ραδιενεργή μορφή. Οι βιολογικοί φορείς εκμεταλλεύονται τους φυσικά υπάρχοντες υποδοχείς των κυττάρων του στόχου. Τέτοιες αναγνωρίσιμες θέσεις είναι περιορισμένες σε αριθμό και ως εκ τούτου μπορούν να δώσουν μόνο μικρές συγκεντρώσεις του ραδιοϊσοτόπου στην περιοχή του στόχου. Έτσι, το τελευταίο κριτήριο επιλογής ενός θεραπευτικού ραδιοϊσοτόπου αποτελούν τα σταθερά ή μακρού χρόνου θυγατρικά ραδιονουκλίδια. Θα πρέπει να χαρακτηρίζονται τα θυγατρικά ισότοπα από σταθερότητα, ώστε να έχουν τη δυνατότητα να συγκεντρώνονται στον επιθυμητό στόχο, γιατί διαφορετικά μπορούν να υπάρξουν αρνητικές επιπτώσεις στη θεραπεία, λόγω των ανεπιθύμητων ακτινοβολήσεων των ιστών. [13]

Τέλος, πρέπει το ραδιοφάρμακο να παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα για το όργανο-στόχο.

Στον πίνακα 1.2, φαίνονται τα κυριότερα ραδιοϊσότοπα, των οποίων η χρήση τους στη Ραδιοφαρμακευτική Χημεία, αποσκοπεί σε θεραπευτικές εφαρμογές.

Ραδιοϊσότοπο	Χρόνος ημιζωής ( $t_{1/2}$ )	Τρόπος διάσπασης
$^{32}\text{P}$	14.3 d	$\beta^-$
$^{188}\text{Re}$	0.71 d	$\beta^-, \gamma$
$^{153}\text{Sm}$	1.95 d	$\beta^-, \gamma$
$^{177}\text{Lu}$	6.70 d	$\beta^-, \gamma$
$^{125}\text{I}$	60.10 d	EC
$^{90}\text{Y}$	2.70 d	$\beta^-$

**Πίνακας 1.2** Τα κυριότερα θεραπευτικά ραδιοϊσότοπα. [7]

Διάφορα ραδιοϊσότοπα έχουν δοκιμαστεί ή εκτιμηθεί για χρήση σε αντικαρκινικές θεραπείες, αλλά η ραδιολογική αποτελεσματικότητα των ραδιοϊσοτόπων

που εκπέμπουν άλφα- ή βήτα-ακτινοβολία διαφέρει σημαντικά. Τα ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν άλφα ακτινοβολία (για παράδειγμα τα  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ ,  $^{255}\text{Fm}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ) παρέχουν μεγαλύτερη δόση ακτινοβολίας σε μικρότερο εύρος από τα ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν βήτα ακτινοβολία (για παράδειγμα τα  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ). [10]

Ως παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί ένα σημασμένο  $^{211}\text{At}$ -ραδιοφαρμακευτικό σκεύασμα που μπορεί να παρέχει μία δόση 250Gy στην επιφάνεια ενός όγκου, ωστόσο η αποτελεσματικότητα του ελαττώνεται όταν το βάθος όγκου είναι μεγαλύτερο από 300μm. Συγκρινόμενα με ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν βήτα ακτινοβολία, μπορούν να παρέχουν αυξημένο βάθος διείσδυσης. Τα ραδιοϊσότοπα λανθανιδών ( $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) έχουν παρόμοιες χημικές ιδιότητες και προσφέρουν ποικιλία ραδιοφαρμακευτικών σκευασμάτων με διαφορετικές πυρηνικές ιδιότητες. [11]

Ορισμένα ραδιοϊσότοπα (για παράδειγμα  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ) που εκπέμπουν βήτα-ακτινοβολία εκπέμπουν και γάμμα-ακτινοβολία, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για απεικόνιση όσο και για θεραπεία. Υπάρχει και μία άλλη ομάδα ραδιοϊσοτόπων, που μπορεί να χρησιμοποιηθούν στη ραδιοθεραπεία. Οστεόφιλοι παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{186}\text{Re}$  και  $^{153}\text{Sm}$  έχουν χρησιμοποιηθεί για να θεραπεύσουν τον οξύ πόνο στα οστά που προκαλείται από μεταστατική νόσο. [12]

Ο σχεδιασμός ενός επιτυχημένου θεραπευτικού ραδιοφαρμάκου απαιτεί τα εξής:  
[13]

- Επιλογή ενός μορίου στόχευσης που θα μπορεί να μεταφέρει τη ραδιοεπισημασμένη ένωση στην πληγείσα περιοχή.
- Επιλογή του ραδιοϊσοτόπου που μπορεί να παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια, ώστε να καταστρέψει τον ιστό.
- Ανάπτυξη της μεθόδου που απαιτείται για να συνδυαστεί το ραδιοϊσότοπο με το μόριο στόχευσης, χωρίς να επηρεάζεται η ικανότητα του συζευγμένου μορίου να

στοχεύσει στον πάσχοντα ιστό. Ωστόσο, στη σύγχρονη Ραδιοφαρμακευτική επιστήμη δεν έχουν αναπτυχθεί εφικτές μέθοδοι χημικής σύνθεσης για πολλά ισότοπα. [13]

Εκτός από τη χρήση για θεραπεία συμπαγών όγκων, η θεραπεία με ραδιοϊσότοπα έχει παράλληλα χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση ασθενειών του θυρεοειδούς, για να μειωθεί ο οστικός πόνος που προκαλείται από το μεταστατικό καρκίνο, καθώς και για να ελαττωθεί η επίπτωση της στεφανιαίας επαναστένωσης, μετά από αγγειοπλαστική (η επονομαζόμενη στεφανιαία βραχυθεραπεία). Η ευρεία διαθεσιμότητα της ραδιοϊσοτοπικής θεραπείας εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των θεραπευτικών δόσεων των ραδιοϊσοτόπων σε λογικό κόστος και των κατάλληλων χημικών τεχνικών για την πρόσδεση των συνδετών, καθώς και από τη δυνατότητα επίτευξης μακροχρόνιας θεραπείας, χωρίς επιπλοκές όπως η τοξικότητα στο μυελό των οστών και η νεφρική βλάβη. [13]

#### **1.4. Μέθοδοι απεικόνισης**

Πρωταρχικό ρόλο στην αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου αποτελεί η έγκαιρη διάγνωση, καθώς όγκοι σε πρώιμα στάδια είναι αντιμετωπίσιμοι. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζεται μέχρι σήμερα η τεχνική που βοηθά στην εκτίμηση της διαφοροποίησης ενός όγκου (ιστολογική τεχνική) ή χρησιμοποιούνται τεχνικές που προσδιορίζουν την έκταση της ανάπτυξης του όγκου και προβλέπουν στην εξέλιξη του (κλινικές, χειρουργικές, παθολογοανατομικές και ραδιογραφικές) [14]. Στη κλινική εξέταση εμπίπτει η φυσική εξέταση του ασθενή, κλινικές εργαστηριακές εξετάσεις, εξέταση με ακτίνες X και ενδοσκοπική εξέταση. Στις χειρουργικές εκτιμήσεις γίνεται χειρουργική επέμβαση για την εκτίμηση της έκτασης της ασθένειας και για τις παθολογοανατομικές απαιτείται βιοψία. Τέλος, στις ραδιογραφικές τεχνικές συμπεριλαμβάνονται η υπολογιστική τομογραφία (CT: computerized tomography), η αρτηριογραφία, λεμφαγγειογραφία και η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI: magnetic resonance imaging). Όλες αυτές οι διαγνωστικές τεχνικές βασίζονται στην ανίχνευση μορφολογικών αλλαγών του πάσχοντος ιστού για την επιτυχή καθοδήγηση των επεμβάσεων, τον υπολογισμό της εξάπλωσης του καρκίνου, καθώς και τον

καθορισμό της θεραπείας και παρακολούθηση-αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας [15].

Η απεικονιστική διάγνωση συμπληρώνει ή και διευκολύνει άλλες διαγνωστικές μεθόδους, καθώς επιτυγχάνει την *in vivo* εντόπιση και παρακολούθηση των καρκινικών κυττάρων με τρόπο μη παρεμβατικό. Οι κυριότερες μέθοδοι ιατρικής απεικόνισης αποτελούν η ραδιογραφία, η αξονική τομογραφία, η μαγνητική τομογραφία, η υπερηχογραφία και η πυρηνική ιατρική.

Η πυρηνική ιατρική αφορά το ιατρικό πεδίο που χρησιμοποιεί ραδιενεργούς ιχνηθέτες *in vivo* και είναι ικανή να δώσει πληροφορίες για τη φαρμακοκινητική, και για φυσιολογικές και μη λειτουργίες, διαφόρων μεταβολικών διαδικασιών σε μοριακό επίπεδο. Για την παροχή των αποτελεσμάτων αυτών απαιτούνται οι υψηλής τεχνολογίας συσκευές απεικόνισης που στηρίζονται στη εκπομπή φωτονίων (SPECT: single photon emission computerized tomography) και πιο πρόσφατα την εκπομπή φωτονίων (PET: positron emission tomography).

Στόχος της πυρηνικής ιατρικής αποτελεί η παροχή πληροφοριών σχετικά με το μεταβολισμό του ραδιοφάρμακου στους βιολογικούς ιστούς, μέσω της τεχνικής της απεικόνισης. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση του ραδιοφαρμάκου περιλαμβάνει τα ραδιονουκλίδια, τα οποία συνδέονται με ένα μόριο-στόχο το οποίο παρουσιάζει εξειδίκευση για έναν υποδοχέα, ο οποίος υπερκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα. Το χορηγούμενο ραδιοφάρμακο δεσμεύεται στους βιολογικούς ιστούς έπειτα από την χορήγησή του στον ασθενή, με αποτέλεσμα το σύστημα απεικόνισης να καταγράφει την ένταση της ακτινοβολίας που διαπερνά το σώμα του ατόμου που έλαβε τη χορηγούμενη δόση. [16]

Η διαγνωστική πυρηνική ιατρική πλεονεκτεί ως προς την ευαισθησία της από τις άλλες μεθόδους γιατί παρέχει πληροφορίες για τη λειτουργικότητα του απεικονιζόμενου ιστού, αντίθετα με τις κλασσικές απεικονιστικές μεθόδους (CT ή MRI) που μας δίνουν ανατομικές μόνο πληροφορίες. Η εξέλιξη των ραδιοφαρμάκων δίνει τη δυνατότητα για μεγάλη εκλεκτικότητα των απεικονίσεων και μελέτη της παθοφυσιολογίας μιας νόσου [17, 18]

Το ποσό της ραδιενέργειας που δέχεται ο ασθενής κρατείται εντός συγκεκριμένων, αυστηρά καθορισμένων, ασφαλών ορίων, ακολουθώντας την αρχή ALARA (As Low As Reasonably Achievable), δηλαδή όσο το δυνατόν χαμηλότερη χορηγούμενη δόση στον ασθενή. [19].

Στη σύγχρονη πυρηνική ιατρική εφαρμόζεται η απεικόνιση με συγκεκριμένα ραδιενεργά ισότοπα, τα οποία εκπέμπουν καθορισμένης ισχύος ακτινοβολίες (ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ακτινοβολία- $\gamma$  ή ποζιτρόνια). Τα κατ'εξοχήν χρησιμοποιούμενα ισότοπα που βρίσκουν εφαρμογή στην διαγνωστική απεικόνιση είναι το  $^{99m}\text{Tc}$  (εκπομπή φωτονίου 140 keV) και το  $^{18}\text{F}$  (εκπομπή ποζιτρονίου). [16]

Για την ανίχνευση της ακτινοβολίας- $\gamma$  χρησιμοποιείται διάταξη που ονομάζεται  $\gamma$ -camera και προσφέρει δισδιάστατη απεικόνιση, οπότε η τεχνική λέγεται σπινθηρογράφημα (Planar Scintigraphy), ή τρισδιάστατη απεικόνιση, οπότε η τεχνική λέγεται υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονιακής εκπομπής (Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT) [17, 20, 21]. Η χρήση ραδιοφαρμάκων που φέρουν ραδιοϊσότοπα εκπομπής ακτινοβολίας γάμμα έχει βρει επιτυχή εφαρμογή σχεδόν για κάθε όργανο του σώματος, όπως τον εγκέφαλο, τα οστά, την καρδιά, τα νεφρά, τους πνεύμονες, τους νευρο-υποδοχείς, αλλά και για επικίνδυνες νόσους, όπως η αθηροσκλήρυνση, η θρόμβωση και ο καρκίνος.

Για την ανίχνευση των φωτονίων που παράγονται κατά την εξαύλωση ποζιτρονίων χρησιμοποιείται διάταξη που ονομάζεται PET-camera και η τεχνική ονομάζεται τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography, PET) [17, 20]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και υβριδικές απεικονιστικές διατάξεις που συνδυάζουν τη μορφολογική/ανατομική περιγραφή που παρέχεται με την αξονική ή τη μαγνητική τομογραφία, με τη λειτουργική λεπτομέρεια που παρέχεται με τις τεχνικές πυρηνικής ιατρικής [22, 23].

Το  $^{99m}\text{Tc}$  έχει γίνει το "καθολικό" ισότοπο στη πυρηνική απεικόνιση, λόγω των σχεδόν τέλειων χαρακτηριστικών του για σπινθηρογραφικές εφαρμογές (όπως είναι το γεγονός ότι παράγεται από γεννήτρια, έχει 6 ώρες χρόνο ημίσειας ζωής, εκπομπή μονοενεργειακής γάμμα ακτινοβολίας ισχύος 140 keV κατάλληλης για ανίχνευση από  $\gamma$ -

κάμερες) και της ευελιξίας του σχετικά με τις χημικές διεργασίες στις οποίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για να επισημάνει μία μεγάλη ποικιλία συνδετών. Η γεννήτρια Mo/Tc μπορεί να αποσταλεί σε εργαστήρια με σκοπό την παραγωγή μίας μονής δόσης ραδιοφαρμακευτικών προϊόντων  $^{99m}\text{Tc}$  επί τόπου, με τελικό αποτέλεσμα τη λήψη του ραδιομορίου τεχνητίου ως προϊόντος, που είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο ραδιοϊσότοπο στην πυρηνική ιατρική. [2]

Διάφορα άλλα ραδιοϊσότοπα απαιτούν τη χρήση κυκλοτρονίου ή πυρηνικού αντιδραστήρα, που είναι πιο ακριβοί και λιγότερο διαθέσιμοι για επείγουσα ή ταχεία χορήγηση. Σήμερα υπάρχουν περίπου 100 πρωτόκολλα απεικόνισης στην πυρηνική ιατρική, τα οποία χρησιμοποιούν διάφορα ισότοπα. Η διαθεσιμότητα του  $^{18}\text{F}$  και συγκεκριμένα της  $^{18}\text{F}$ -φθοροδεοξυ-D-γλυκόζης (FDG) έχει επιτρέψει την πρακτική εφαρμογή της τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίου (PET), ωστόσο ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής της πλειοψηφίας των ισοτόπων για PET (με εξαίρεση εκείνου του  $^{18}\text{F}$  που έχει 110 λεπτά), τα καθιστά μη πρακτικά για χρήση ρουτίνας, διότι απαιτούν την ύπαρξη ενός κυκλοτρονίου μέσα στο νοσοκομείο. [24]

Η μοριακή φύση της απεικόνισης στην πυρηνική ιατρική οδηγεί σε μοναδικές μη-επεμβατικές εφαρμογές, ενώ επιπρόσθετα τα μοναδικά χαρακτηριστικά της PET επιτρέπουν την ποσοτική ανάλυση φυσιολογικών διεργασιών και ειδικά του κυτταρικού μεταβολισμού. Έτσι, η εξέλιξη και το μέλλον των απεικονιστικών ραδιοφαρμακευτικών προϊόντων δεν εξαρτάται από την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων ή την ανάπτυξη νέων ραδιοϊσοτόπων, αλλά εξαρτάται κυρίως από την ανάπτυξη νέων προσδετών / συνδετών, για το τεχνητίο  $^{99m}\text{Tc}$  (για την SPECT) και το  $^{68}\text{Ga}$  (για τη PET). Οι συνδέτες αυτοί είναι ικανοί να δεσμεύουν σταθερά τα χρησιμοποιούμενα ραδιοϊσότοπα, ώστε αυτά να φτάνουν στο όργανο-στόχο. [25] Παρά τη διεισδυτική της ικανότητα, η ιονίζουσα ακτινοβολία παρουσιάζει τα μειονεκτήματα της έκθεσης του ασθενή, αλλά και του προσωπικού, στην ακτινοβολία και της απαίτησης σωστού προγραμματισμού ακτινοπροστασίας και διαχείρισης ραδιενεργών καταλοίπων. Παρ' όλα αυτά, η χρήση της αποτελεί συχνά μέθοδο επιλογής στη διαγνωστική. Η τεχνική



απεικόνισης με εκπομπή τομογραφίας ποζιτρονίου (PET), βρίσκει εφαρμογή στους τομείς της καρδιολογίας, της ογκολογίας και της νευρολογίας. [26]

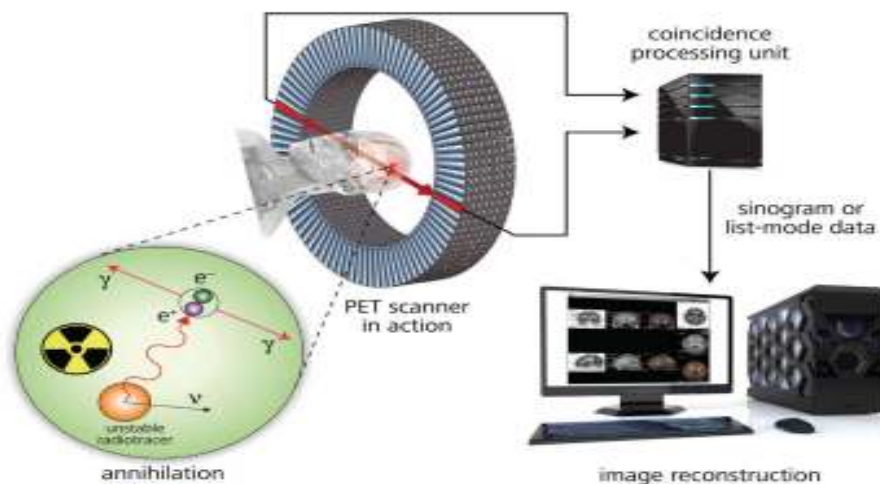
#### 1.4.1. Τεχνική PET

Ο M.E. Phelps θεωρείται πατέρας της τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων γιατί εφηύρε τον PET τομογράφο και δημοσίευσε τις πρώτες PET εικόνες [27], αλλά αποτελεί και την κινητήρια δύναμη πίσω από σχεδόν όλες τις εξελίξεις στην τομογραφία PET τα τελευταία 30 χρόνια [28].

Στην PET, η πηγή ακτινοβολίας είναι ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ποζιτρόνια κατά τη διάσπαση τους. Το ποζιτρόνιο ( $\beta^+$ ) αποτελεί την αντιύλη του ηλεκτρονίου ( $\beta^-$ ). Παράγεται σε πυρήνες με περίσσεια πρωτονίων και χαμηλό ατομικό αριθμό, όταν ένα πρωτόνιο μετατρέπεται σε ένα νετρόνιο και ένα νεutrίνο, με ταυτόχρονη εκπομπή ενός ποζιτρονίου ( $\beta^+$  διάσπαση). Τα ποζιτρόνια έχουν πολύ μικρή εμβέλεια και κατά τη διαδρομή τους μέσα στον ιστό (μερικά mm) και ερχόμενα σε επαφή με την ‘‘πληθώρα’’ ηλεκτρονίων που βρίσκουν στη διαδρομή τους, εξαϋλώνονται (αλληλεπίδραση ηλεκτρονίου- ποζιτρονίου) με την ταυτόχρονη παραγωγή ζεύγους φωτονίων, ενέργειας 511 KeV το καθένα, που κινούνται σε σχεδόν αντίθετες κατευθύνσεις (περίπου  $180^\circ$ ) [29]. Η PET camera προσδιορίζει έμμεσα το σημείο προέλευσης του ποζιτρονίου ανιχνεύοντας τα δύο φωτόνια που παράγονται κατά την εξαϋλωση του.

Οι σύγχρονες PET κάμερες αποτελούνται από τη τράπεζα εξέτασης του ασθενή και το κυλινδρικό τμήμα στο οποίο βρίσκεται η ανιχνευτική διάταξη. Κάθε ανιχνευτής αποτελείται από συστοιχίες σπινθηριστικών κρυστάλλων [30] και φωτοπολλαπλασιαστών. Όταν η φωτονιακή ακτινοβολία προσκρούσει στον κρύσταλλο διεγείρει το υλικό του, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση σπινθηρισμών. Μερικοί από αυτούς συναντούν την κάθοδο του φωτοπολλαπλασιαστή και παράγουν ηλεκτρόνια. Κατά τη πορεία αυτή τα ηλεκτρόνια ενισχύονται και μετατρέπονται τελικά σε ηλεκτρικό σήμα με ισχύ ανάλογη του αριθμού των παραγόμενων σπινθηρισμών. Η επεξεργασία του συνόλου των ηλεκτρικών σημάτων, που λαμβάνονται στη διάρκεια της εξέτασης,

γίνεται με τη βοήθεια υπολογιστικού συστήματος. Σημαντικό στην επιτυχή απεικόνιση της κατανομής των ποζιτρονίων είναι να θεωρηθεί ότι δύο φωτόνια που προέρχονται από την ίδια εξαύλωση θα πρέπει να προσπέσουν στους αντιδιαμετρικά τοποθετημένους κρυστάλλους με πολύ μικρή χρονική διαφορά μεταξύ τους (ο προσδιορισμός της κατεύθυνσης των ζευγών φωτονίων) που γίνεται εφικτός με ‘‘ηλεκτρονική ευθυγράμμιση’’ (electronic collimation). Έτσι η θέση της πηγής του ποζιτρονίου υπολογίζεται πάνω στην ευθεία γραμμή που συνδέει τους δυο ανιχνευτές. Επειδή σε έναν τυπικό PET ανιχνευτή υπάρχουν δεκάδες ή/και εκατοντάδες τέτοια ζεύγη κρυστάλλων/φωτοπολλαπλασιαστών, με τη μορφή δακτυλίου που περιβάλλει τον ασθενή, είναι δυνατή η συλλογή δεδομένων από πολλά επίπεδα σε σχέση με την πηγή ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα την παραγωγή τρισδιάστατης εικόνας.



**Σχήμα 1.1** Αρχή λειτουργίας μιας PET camera

Ο τρόπος αυτός συλλογής των δεδομένων προσδίδει στη PET υψηλή ευαισθησία και παρέχει αξιόπιστη ποσοτικοποίηση της διαδικασίας που ‘‘παρακολουθεί’’. Δίνει τη δυνατότητα μέτρησης απόλυτων συγκεντρώσεων ραδιενέργειας μέσα στο σώμα και επιτρέπει την κινητική χαρτογράφηση παραμέτρων όπως η χρήση της γλυκόζης από τον οργανισμό ή η μέτρηση της αιματικής ροής [31].

Παρόλα αυτά η χωροταξική αναλυτική ικανότητα της PET απεικόνισης είναι μειωμένη σε σχέση με τις συμβατικές απεικονιστικές μεθόδους, μιας και το ποζιτρόνιο διανύει μία έστω και μικρή απόσταση μέσα στον ιστό προτού εξαϋλωθεί. Επιπλέον η PET δεν παρέχει ανατομικές πληροφορίες της απεικονισθείσας περιοχής. Με δεδομένο ότι όλα τα ραδιονουκλίδια – εκπομποί ποζιτρονίων παράγουν σε κάθε περίπτωση δύο φωτόνια ίδιας ενέργειας, η PET είναι ακατάλληλη για τη μελέτη διαφορετικών μοριακών/βιοχημικών διεργασιών με συγχορήγηση πολλαπλών ραδιοϊχνηθετών.

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ραδιονουκλίδια της PET είναι:  $^{11}\text{C}$  ( $t_{1/2}=20\text{min}$ ),  $^{15}\text{O}$  ( $t_{1/2}=2\text{min}$ ),  $^{13}\text{N}$  ( $t_{1/2}=10\text{min}$ ) και  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2}=110\text{min}$ ). Η ευρεία χρήση τους οφείλεται στο ότι αποτελούν τις ραδιενεργές μορφές των κυριότερων συστατικών του σώματος (άνθρακας, άζωτο και οξυγόνο) μπορούν εύκολα να ενσωματωθούν σε φυσιολογικά, βιολογικά ενεργά μόρια (π.χ γλυκόζη, μεθειονίνη, λιπαρά οξέα) και να απεικονίσουν έτσι τα μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού [32].

Τα περισσότερα PET ραδιονουκλίδια είναι παράγωγα κυκλοτρονίου και η ημιπερίοδος ζωής τους είναι μικρή. Έτσι ένα κέντρο μελετών με PET απαιτεί την PET κάμερα, ένα κυκλοτρόνιο για την παραγωγή των ραδιονουκλιδίων και ένα ραδιοφαρμακευτικό εργαστήριο για την ταχεία παρασκευή των ραδιοφαρμάκων. Είναι εμφανές λοιπόν ότι η εκτεταμένη χρήση της PET στην κλινική πράξη περιορίζεται σημαντικά από προβλήματα κόστους, φροντίδας (logistics) και οργάνωσης των επιμέρους διαδικασιών [32].

#### 1.4.2. Τεχνική SPECT

Η πηγή ακτινοβολίας στη SPECT αλλά και στο σπινθηρογράφημα είναι ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν φωτόνια κατά τη διάσπασή τους, δηλαδή γ-ακτινοβολία. Έτσι υπάρχει μικρότερη πιθανότητα αλληλεπίδρασης με την ύλη σε σχέση με τα σωματίδια  $\alpha$  και  $\beta$  αφού δεν υπάρχει ούτε φορτίο, ούτε μάζα σε αυτά. Σε αντίθεση με την PET, εδώ ανιχνεύεται μονοφωτονιακή ακτινοβολία, η οποία εκπέμπεται απευθείας από το ραδιενεργό άτομο. Η γ-ακτινοβολία ως γνωστό έχει και μεγαλύτερη διεισδυτική ικανότητα από τις ακτινοβολίες  $\alpha$  και  $\beta$ . Τα φωτόνια αλληλεπιδρούν με την ύλη είτε

μέσω σκέδασης Compton είτε μέσω φωτοηλεκτρικού φαινομένου είτε μέσω παραγωγής ζεύγους σωματιδίου-αντισωματιδίου.[20]

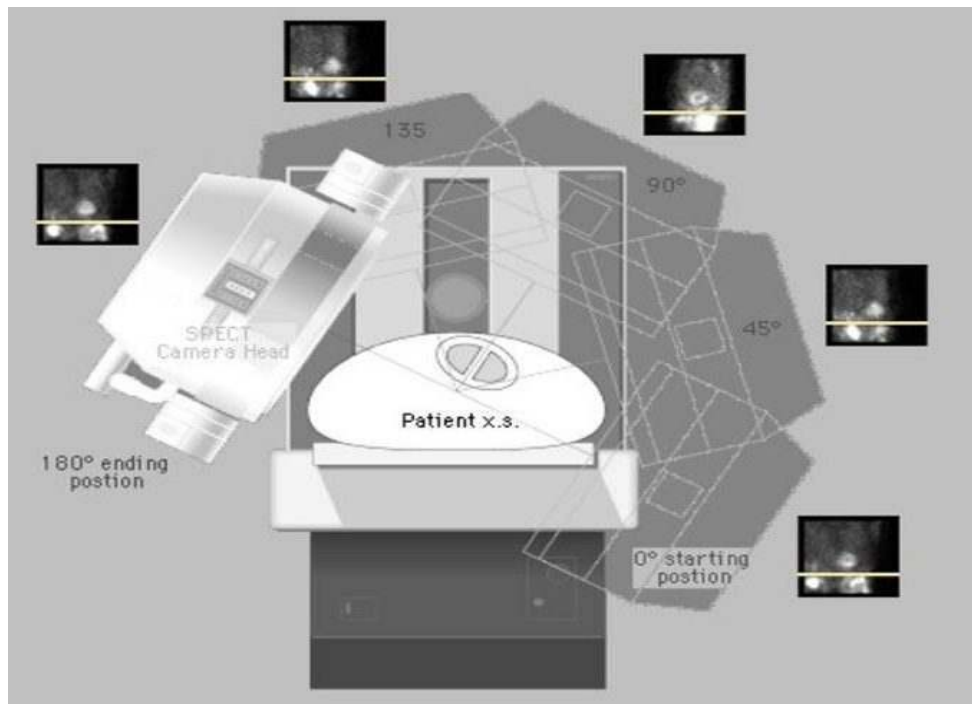
Η ανιχνευτική διάταξη που χρησιμοποιείται για τη λήψη εικόνων βασίζεται στη γ-κάμερα. Η αρχή λειτουργίας PET και SPECT είναι παρόμοιες. Στην SPECT μια γ-κάμερα αποτελείται από έναν σπινθηρογραφικό κρύσταλλο, μια σειρά φωτοπολλαπλασιαστών και ένα υπολογιστικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων. Η επιλογή των φωτονίων γίνεται μέσω φυσικής/μηχανικής ευθυγράμμισης από τον κατευθυντήρα ο οποίος έχει τέτοια κατασκευή, ώστε να του επιτρέπει τη διαλογή των φωτονίων που προσπίπτουν σε αυτό για καλύτερη απεικονιστική διαδικασία. Επιπλέον το υπολογιστικό σύστημα της γ-κάμερας αποδέχεται μόνο συγκεκριμένες ενεργειακές τιμές φωτονίων. Υπάρχει δυνατότητα επιλογής κατευθυντήρα είτε ``υψηλής ευαισθησίας`` είτε κατευθυντήρα ``υψηλής ανάλυσης``. Σήμερα, οι δύο σημαντικότεροι τύποι κατευθυντήρων είναι ο κατευθυντήρας απλής οπής (pinhole collimator) και ο κατευθυντήρας παράλληλων πολλαπλών οπών (parallel-hole collimator) [20]

Τα περισσότερα από τα συστήματα SPECT που είναι διαθέσιμα σήμερα χρησιμοποιούν ως σπινθηριστικούς κρυστάλλους, κρυστάλλους ιωδιούχου νατρίου ενεργοποιημένους με θάλλιο NaI(Tl). Πρόσφατα, αντικαταστάθηκαν με το CZT (Cadmium Zinc Telluride), ένα ημιαγωγό, με αποτέλεσμα με την πρόσπτωση φωτονίων να μη δημιουργούνται σπινθηρισμοί, αλλά ηλεκτρικό σήμα που συλλέγεται και επεξεργάζεται απευθείας από την υπολογιστική μονάδα της ανιχνευτικής διάταξης. Με αυτόν τον τρόπο εκλείπει η ανάγκη ύπαρξης φωτοπολλαπλασιαστών, ενώ παράλληλα αυξάνεται και η χωροταξική ανάλυση της μεθόδου.[20]

Η SPECT μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες χορήγησης πολλαπλών ραδιοϊχνηθετών στον ίδιο ασθενή μια και το σύστημα ανίχνευσης που χρησιμοποιεί μπορεί να διαχωρίσει τις ενέργειες διαφορετικών ραδιονουκλιδίων. [20] Το σπουδαιότερο πλεονέκτημα της SPECT, όμως, είναι ότι οι ανιχνευτές είναι μικρότεροι σε μέγεθος, απλούστεροι σε προδιαγραφές και φτηνότεροι στην παραγωγή τους. Τα SPECT ραδιοφάρμακα χαρακτηρίζονται από υψηλότερους χρόνους ημιζωής, ώστε να αποφεύγονται προβλήματα φροντίδας (logistics) και προγραμματισμού στην παραγωγή

και χορήγησή τους, είναι φτηνότερα και εκπέμπουν ακτινοβολία μικρότερης ενέργειας και διαπεραστικής ικανότητας, άρα είναι και απλούστερη και πιο αποτελεσματική η προστασία από αυτή. [32]

Σήμερα η SPECT είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος πυρηνικής απεικόνισης. Ανάμεσα στα ραδιονουκλίδια με εφαρμογή της τεχνικής SPECT είναι τα  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ . Εξέχουσα θέση ανάμεσα σε όλα τα ραδιονουκλίδια που χρησιμοποιούνται κατέχει το  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  λόγω των εξαιρετικών φυσικών ιδιοτήτων που το χαρακτηρίζουν. Πάνω από 85% των εξετάσεων που γίνονται σήμερα στην πυρηνική ιατρική χρησιμοποιούν ραδιοφάρμακα του  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .



*Σχήμα 1.2 Λειτουργία μιας SPET camera[33]*

## 2. Γενικά στοιχεία για το τεχνητίο

### 2.1. Το Τεχνητίο (Tc)

Το τεχνητίο μαζί με το ρήνιο και το μαγγάνιο ανήκουν στην 7<sup>η</sup> ομάδα του περιοδικού πίνακα. Ο ατομικός αριθμός του τεχνητίου είναι 43 και η μέση ατομική του μάζα 98. Η ηλεκτρονική του δομή είναι  $[(Kr)4d^55s^2]$ , ενώ τα ηλεκτρόνια σθένους που διαθέτει στη στιβάδα σθένους του είναι επτά. [34]

Η ανακάλυψη του τεχνητίου (Tc) πραγματοποιήθηκε το 1937, από τον ερευνητή του πανεπιστημίου του Palermo, Emilio Segre. Η προέλευση της ονομασίας του στοιχείου προέρχεται από την ελληνική λέξη "τεχνητός", εξαιτίας της σύνθεσης του στο εργαστήριο. Η ανακάλυψη του τεχνητίου έδωσε έναυσμα για την παραγωγή και άλλων ραδιενεργών ουσιών, ενώ η πρώτη εφαρμογή του ως διαγνωστικού ραδιοφαρμάκου χρονολογείται την περίοδο της σύνθεσης του για την αντιμετώπιση της λευχαιμίας. [35]

Οι τεχνικές μέτρησης των ραδιοϊσοτόπων του τεχνητίου εξαρτώνται κυρίως από το είδος της ακτινοβολίας που εκπέμπει το κάθε ισότοπο ξεχωριστά. Η χρησιμοποίηση των ανιχνευτών Geiger-Muller ή των αναλογικών απαριθμητών πραγματοποιείται για μετρήσεις των ραδιοϊσοτόπων του τεχνητίου, τα οποία εκπέμπουν β-ακτινοβολία ( $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{98}\text{Tc}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{106}\text{Tc}$ ). Οι μετρήσεις των περισσοτέρων ραδιονουκλιδίων του τεχνητίου πραγματοποιούνται με εφαρμογή του ανιχνευτή σπινθηρισμών ακτινοβολίας-γ, γιατί η διάσπασή τους λαμβάνει χώρα με εκπομπή ακτίνων-γ ή ακτίνων-X. [36]

Στη σύγχρονη Ραδιοφαρμακευτική Χημεία είναι γνωστά πάνω από 20 ραδιονουκλίδια του τεχνητίου, τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 2.1. [37]

Ραδιονουκλίδιο	$t_{1/2}$	Τρόπος διάσπασης	Μέθοδος παρασκευής
$^{93}\text{Tc}$	4,4 min	$\beta^-$ , EC	$^{95}\text{Mo}$ (d, n)
$^{93m}\text{Tc}$	2,75 h	$\beta^-$ , EC	$^{95}\text{Mo}$ (d, n)
$^{93m}\text{Tc}$	43 min	IT, EC	$^{95}\text{Mo}$ (d, n)
$^{94}\text{Tc}$	293 min	$\beta^-$ , EC	$^{94}\text{Mo}$ (d, n)
$^{94m}\text{Tc}$	53 min	$\beta^-$ , EC	$^{94}\text{Mo}$ (p, n)
$^{95}\text{Tc}$	20 h	EC	$^{95}\text{Mo}$ (p, n)
$^{95m}\text{Tc}$	65 d	$\beta^-$ , EC, IT	$^{95}\text{Mo}$ (p, n)
$^{96}\text{Tc}$	4,35 d	EC	$^{93}\text{Nb}$ (α, n)
$^{96m}\text{Tc}$	52 min	$\beta^+$ , IT	$^{93}\text{Nb}$ (α, n)
$^{97}\text{Tc}$	$2,6 \cdot 10^6$ y	EC	$^{97}\text{Ru}$ ( $\beta^-$ )
$^{97m}\text{Tc}$	91 d	IT	$^{96}\text{Mo}$ (d, n)
$^{98}\text{Tc}$	$1,5 \cdot 10^6$ y	$\beta^-$	$^{98}\text{Mo}$ (p, n)
$^{99}\text{Tc}$	$2,12 \cdot 10^5$ y	$\beta^-$	Σχάση, θυγ $^{99m}\text{Tc}$
$^{99m}\text{Tc}$	6,03 h	IT	θυγ $^{99}\text{Mo}$
$^{100}\text{Tc}$	15,8 sec	$\beta^-$	$^{100}\text{Mo}$ (p, n)
$^{101}\text{Tc}$	14 min	$\beta^-$	$^{100}\text{Mo}$ (n, $\gamma$ )
$^{102}\text{Tc}$	4,5 min	$\beta^-$	Σχάση
$^{103}\text{Tc}$	5 sec	$\beta^-$	Σχάση
$^{104}\text{Tc}$	18 min	$\beta^-$	Σχάση
$^{105}\text{Tc}$	7,7 min	$\beta^-$	Σχάση
$^{106}\text{Tc}$	37 sec	$\beta^-$	Σχάση
$^{107}\text{Tc}$	29 sec	$\beta^-$	Σχάση

**Πίνακας 2.1:** Τα ραδιονουκλίδια του τεχνητίου και τα κυριότερα πυρηνικά χαρακτηριστικά τους.

## 2.2. Τεχνητίο 99

Χαρακτηριστικό του τεχνητίου-99 αποτελεί η μεγάλη περίοδος ημίσειας ζωής του που ισούται με  $2.13 \times 10^5$  χρόνια. Αποτελεί ένα από τα μακροβιότερα ισότοπα του τεχνητίου. [38]

Μέσω της εκπομπής ακτινοβολίας-β, ισχύος ( $E_{\max} = 0.29$  MeV), το τεχνητίο-99 αποκτά σταθερότερη διαμόρφωση μεταπίπτοντας στο στοιχείο Ru. Η μετάπτωση του στο σταθερότερο στοιχείο Ru, έχει ως συνέπεια και την εκπομπή ακτινοβολίας-X πεδήσεως, εξαιτίας των ελκτικών δυνάμεων που αναπτύσσονται ανάμεσα στα ηλεκτρόνια με τα άτομα που βρίσκονται στον πυρήνα του μεταλλικού στοιχείου. [39]

Τα σημαντικότερα ραδιονουκλίδια του στοιχείου αποτελούν δύο ισότοπα του τεχνητίου-99 και είναι το ψευδοσταθερό  $^{99}\text{Tc}$  και το μετασταθέστερο  $^{99m}\text{Tc}$ . Το ψευδοσταθερό  $^{99}\text{Tc}$  είναι το μόνο που μπορεί να παρασκευαστεί σε ζυγίσιμες ποσότητες, ανάμεσα στα ισότοπα του στοιχείου με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής. Η συγκεκριμένη ιδιότητα του ψευδοσταθερού  $^{99}\text{Tc}$  είναι η αιτία της χρήσης του για τη συστηματική μελέτη των χημικών ιδιοτήτων του τεχνητίου. [1]

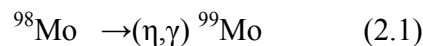
Το άλλο σημαντικό ραδιονουκλίδιο του τεχνητίου είναι το μετασταθέστερο  $^{99m}\text{Tc}$ , το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην Πυρηνική Ιατρική και στη Ραδιοφαρμακευτική επιστήμη. Η ευρεία εφαρμογή του οφείλεται στις εξαιρετικές φυσικές του ιδιότητες, οι οποίες το καθιστούν το πλέον καταλληλότερο ισότοπο για την εφαρμογή του σε διαγνωστικούς σκοπούς. Ο σχετικά βραχύς, αλλά ικανοποιητικός χρόνος υποδιπλασιασμού του  $^{99m}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6,03$  h), αποτελεί σημαντικό παράγοντα χρήσης του για τις περισσότερες διαγνωστικές εξετάσεις, καθώς και για τη σύνθεση διαφόρων ραδιοφαρμάκων. Παράλληλα, η εκπομπή ακτινοβολία  $\gamma$ , χαμηλής ισχύος (140 KeV) και η ταυτόχρονη απουσία ακτινοβολίας  $\beta$ , έχουν ως αποτέλεσμα τη μικρή επιβάρυνση του ασθενούς με ραδιενέργεια, γιατί η συγκεκριμένη ενέργεια διαπερνά σε μικρό βαθμό τους βιολογικούς ιστούς. Άλλα πλεονεκτήματα του μετασταθέστερου ισότοπου  $^{99m}\text{Tc}$  αποτελούν το συγκριτικά μικρό κόστος παρασκευής, ενώ είναι δυνατή η παρασκευή στείρου διαλύματός του, χωρίς την παρουσία πυρετογόνων. [40]



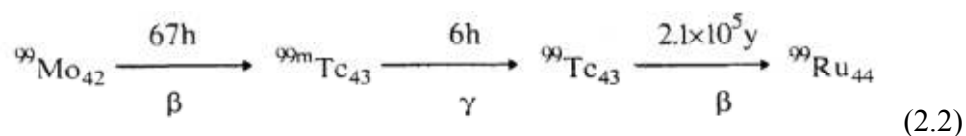
Εξίσου σημαντική θεωρείται η μονοενεργητική ακτινοβολία  $\gamma$  που εκπέμπει το συγκεκριμένο ραδιονουκλίδιο, η οποία έχει ως αποτέλεσμα απεικονίσεις υψηλής ποιότητας, εξαιτίας της υψηλής ειδικής ραδιενέργειάς του, ακόμα και στην περίπτωση χορήγησης του σε μικρές ποσότητες. Επίσης, η ιδιότητα του ως κατάλληλο διαγνωστικό εργαλείο οφείλεται στη δυνατότητα επίσημανσης πλήθους οργανικών και ανόργανων ενώσεων, κατάλληλων για εκλεκτική εντόπιση στην πάσχουσα περιοχή του οργανισμού. [40]

### 2.3. Παραγωγή $^{99m}\text{Tc}$ .

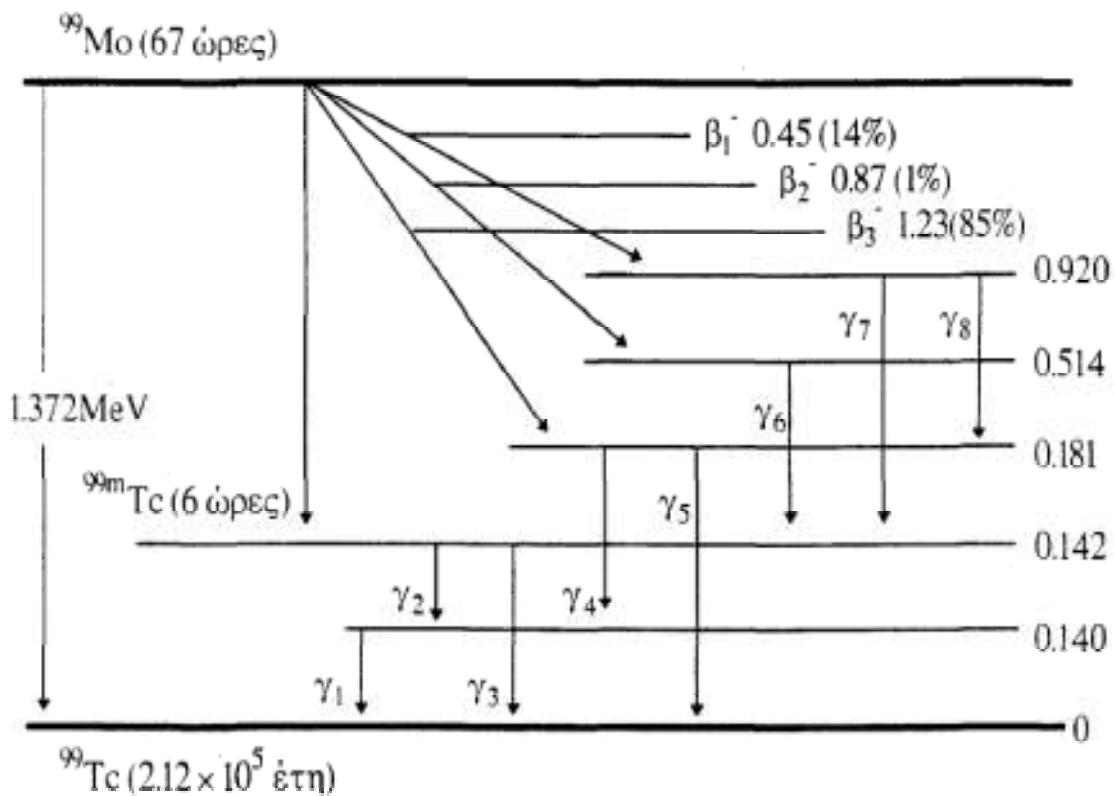
Το τεχνητίο-99m λαμβάνεται κατά την αντίδραση διάσπασης του μολυβδαινίου-99. Η παραγωγή του μητρικού ραδιοϊσοτόπου Mo-99 λαμβάνει χώρα κυρίως στον πυρηνικό αντιδραστήρα αλλά και στο κύκλοτρο. Η αντίδραση που πραγματοποιείται στον πυρηνικό αντιδραστήρα και οδηγεί στην παραγωγή του μολυβδαινίου-99, δίνεται στην εξίσωση (2.1): [39]



Ο στόχος προς ακτινοβόληση είναι φυσικό μολυβδαίνιο σε ποσοστό 23.78% Mo, το οποίο βρίσκεται στο μόριο του τριοξειδίου του μολυβδαινίου ( $\text{MoO}_3$ ). Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η εφαρμογή στόχου εμπλουτισμένου με το ισότοπο  $^{98}\text{Mo}$ , ώστε να είναι εφικτή ο σχηματισμός προϊόντος  $^{99}\text{Mo}$ , το οποίο θα διαθέτει υψηλή ειδική ραδιενέργεια. Συνοπτικά οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάσπαση του μολυβδαινίου δίνονται στην εξίσωση (2.2): [39]



Στο σχήμα 2.1, παριστάνονται τα στάδια διάσπασης του μολυβδαινίου-99. Για τη μετατροπή του προς το μετασταθερό ραδιονουκλίδιο Tc-99m (ο χρόνος ημίσειας ζωής του ισούται με 6 ώρες), το μολυβδαίνιο-99 (ο χρόνος ημίσειας ζωής του ισούται με 67 ώρες), διασπάται με εκπομπή β-ακτινοβολίας ( $\beta_3=1.23$  MeV) σε ποσοστό 85%. Το μετασταθέστερο ραδιονουκλίδιο Tc-99m μετατρέπεται προς το ψευδοσταθερό Tc-99, λόγω της διάσπασης του κάτω από την επίδραση της  $\gamma$ -ακτινοβολίας (140 KeV, ισομερής μετάπτωση, IT). Το ψευδοσταθερό Tc-99, του οποίου ο χρόνος ημίσειας ζωής του ισούται με  $2.1 \cdot 10^5$  χρόνια, μετατρέπεται προς το σταθερό ρουθίνιο (Ru-99). [39]



**Σχήμα 2.1 :** Στάδια διάσπασης του  $^{99}\text{Mo}$  ( $\gamma$ , =98.4%).

Ο διαχωρισμός του  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  από το σύστημα  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  γίνεται βάσει τριών μεθόδων, οι οποίες είναι η εξάχνωση, η εκχύλιση και η χρωματογραφία στήλης. Ο διαχωρισμός του  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  από το μητρικό του ισότοπο βάσει της χρωματογραφίας στήλης, οδήγησε στην ανάπτυξη γεννητριών και χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της απλής

εφαρμογής της. Στη συγκεκριμένη μέθοδο διαχωρισμού, το μητρικό υλικό με τη μορφή μολυβδαινικών ανιόντων ( $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ ) βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια μιας



**Σχήμα 2.2** Γεννήτρια  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$

ανιονανταλλακτικής στήλης με υλικό από αλουμίνα, η οποία αποτελεί την γεννήτρια. Η παραγωγή του  $^{99}\text{TcO}_4^-$ , πραγματοποιείται με τη διάσπαση του μητρικού υλικού ( $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ ), το οποίο κατακρατείται στη στήλη, καθώς τα ανιόντα του τεχνητίου-99 εκλύονται κατά μήκος της στήλης, με τη βοήθεια στείρου διαλύματος φυσιολογικού ορού. Τελικό αποτέλεσμα είναι η παραγωγή στείρου διαλύματος εμπλουτισμένο με υπερτεχνητικό νάτριο, το οποίο μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικές εφαρμογές. [41]. Η ακριβής περιγραφή

της γεννήτριας θα ακολουθήσει στο πειραματικό μέρος.

#### 2.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες του Τεχνητίου.

Το ατομικό βάρος του τεχνητίου είναι 98.9 και η πυκνότητα του ισούται με  $11,5\text{g/cm}^3$ . Το στοιχείο τήκεται σε υψηλή θερμοκρασία, με το σημείο τήξης του να έχει μετρηθεί στους  $2175\text{ }^\circ\text{C}$ . Αποτελεί ένα τεχνητό στοιχείο, το οποίο παράγεται σε σχετικά μεγάλες ποσότητες κατά την πυρηνική σχάση ραδιοϊσοτόπων και απελευθερώνεται στο περιβάλλον από την πυρηνική ενέργεια των φυτικών αποβλήτων, καθώς και κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων της πυρηνικής ιατρικής και των δοκιμών των πυρηνικών όπλων. Στη φύση απαντάται σε πολύ μικρές ποσότητες, η παρουσία του οποίου είναι πιθανό να οφείλεται σε αυθόρμητη σχάση του ισότοπου του ουρανίου  $^{235}\text{U}$ . [42]

Το τεχνητίο αποτελεί ένα μεταλλικό στοιχείο, χρώματος ασημί, το οποίο κάτω από την επίδραση του ατμοσφαιρικού αέρα αμαυρώνεται. Διαλύεται στο νιτρικό οξύ, σε

πυκνό θερμό θειικό οξύ και στο βασιλικό νερό, ενώ είναι μη διαλυτό στο υδροχλωρικό οξύ. Κατά τη διάλυση του σε υδατικά διαλύματα, το τεχνήτιο (Tc) μπορεί να βρεθεί σε διάφορες οξειδωτικές βαθμίδες, όπως Tc (II) , Tc (IV) , Tc (V), Tc (VI) και Tc (VII). Σε συνθήκες περιβάλλοντος ευνοείται η οξειδωτική κατάσταση δύο βαθμίδων, της τέταρτης και της έβδομης [Tc (IV) και Tc (VII)]. [43]

Κάτω από την επίδραση οξειδωτικών συνθηκών, το τεχνήτιο μετατρέπεται σε μορφή υπερτεχνητικών ανιόντων ( $TcO_4^-$ ), εφόσον βρίσκεται μέσα σε υδατικά διαλύματα, ενώ απουσία υδατικών συνθηκών μετατρέπεται σε επιτοξειδία του τεχνητίου. Αντίθετα, κάτω από την επίδραση αναγωγικών αντιδραστηρίων μετατρέπεται σε διαλύματα, όπου απαντά στην τέταρτη οξειδωτική βαθμίδα [Tc (IV)]. Επιπλέον, διάφορα σύμπλοκα του τεχνητίου [Tc (IV)] είναι πιθανό να σχηματιστούν κατά τη συναρμογή του με οργανικούς ή ανόργανους προσδέτες, όπως το EDTA, το ανθρακικό και το κιτρικό οξύ. [43]

#### **2.4. Χημεία συμπλόκων Τεχνητίου, κυρίως Tc(II) και Tc(V).**

Οι οξειδωτικές βαθμίδες στις οποίες είναι σε θέση να σταθεροποιηθεί το τεχνήτιο, απεικονίζονται στον πίνακα 2.2. Ο αριθμός των υποκαταστατών καθορίζεται από την οξειδωτική βαθμίδα του στοιχείου. Η μεγαλύτερη σταθερότητα των ενώσεων του τεχνητίου προκύπτει κατά την τέταρτη (IV) και την έβδομη (VII) οξειδωτική βαθμίδα, αντίστοιχα. Όταν δε βρίσκεται σε μία από τις παραπάνω οξειδωτικές βαθμίδες, κρίνεται απαραίτητη η συναρμογή του με υποκαταστάτες, η παρουσία των οποίων συμβάλλει στη σταθεροποίησή του. [44]

Οξειδωτική κατάσταση	Μεταλλικός πυρήνας των συμπλόκων
VII	$\text{TcO}_4^-$
VI	$\text{TcN}^{3+}$
V	$\text{TcO}^{3+}$ , <i>trans</i> - $\text{TcO}_2^+$ , $\text{Tc}_2\text{O}_3^{4+}$ , $\text{TcN}^{2+}$
IV	$\text{Tc}^{4+}$ , $\text{TcO}(\text{OH})^+$ , $\text{Tc}(\text{OH})_2^{2+}$
III	$\text{Tc}^{3+}$
II	$\text{Tc}^{2+}$
I	$\text{Tc}^+$
0	$\text{Tc}$ , $\text{Tc}_2$
-I	$\text{Tc}^-$

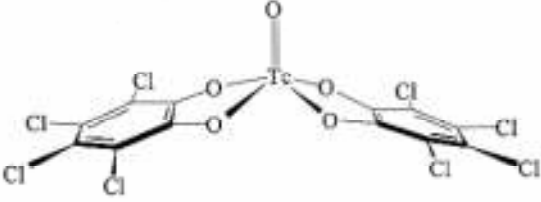
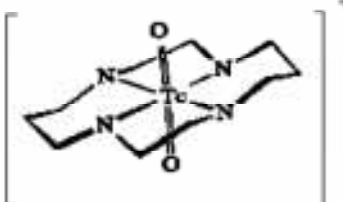

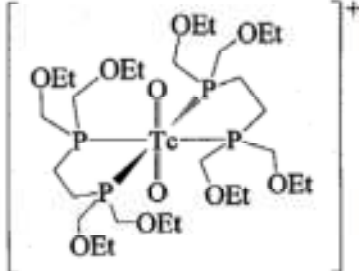
**Πίνακας 2.2:** Οι οξειδωτικές βαθμίδες του τεχνητίου και οι αντίστοιχοι μεταλλικοί πυρήνες των συμπλόκων του.

Κατά τη σταθεροποίηση του τεχνητίου σε υψηλές οξειδωτικές καταστάσεις, παρατηρείται η συναρμογή του με πολύ καλά πυρηνόφιλα άτομα, όπως το οξυγόνο, το άζωτο και το θείο. Η σταθεροποίηση του συμπλόκου επιτυγχάνεται μέσω της συμπλήρωσης της εξωτερικής στοιβάδας του μετάλλου, λόγω των ηλεκτρονίων που προσλαμβάνει από τα πυρηνόφιλα. Κατά τη συναρμογή του με ηλεκτρονιόφιλα, παρατηρείται μια σχετική αστάθεια του συμπλόκου, λόγω της περίσσειας των ηλεκτρονίων. Η συγκεκριμένη αστάθεια παρατηρείται όταν το τεχνητίο βρίσκεται σε χαμηλές οξειδωτικές βαθμίδες. [44]

Το τεχνητίο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν απαντάται στην πέμπτη οξειδωτική βαθμίδα, με την αναγωγή των υπερτεχνητικών ανιόντων, η οποία επιτυγχάνεται με την προσθήκη δύο ηλεκτρονίων. Για την επίτευξη της σταθεροποίησης του τεχνητίου στη συγκεκριμένη βαθμίδα απαιτείται η παρουσία κατάλληλων περιφερειακών υποκαταστατών, οι οποίοι συμπεριφέρονται ως δότες ηλεκτρονίων. Η πλειοψηφία των συμπλόκων του τεχνητίου (V), διαθέτουν ένα άτομο τουλάχιστον οξυγόνου στο μόριο τους γιατί η παραγωγή τους επιτυγχάνεται από την αναγωγή των υπερτεχνητικών ανιόντων. Έτσι, ανάλογα με τη φύση του πυρήνα των συμπλόκων διακρίνονται οι εξής κατηγορίες: μονοοξο-, διοξο-, διπυρηνικά σύμπλοκα με γέφυρα οξυγόνου. [45]

Το τεχνητίο κατά τη σταθεροποίηση του στην τέταρτη οξειδωτική βαθμίδα (V) σχηματίζει διαμαγνητικά ή ελαφρώς παραμαγνητικά σύμπλοκα, λόγω του χαμηλού spin. Οι δομές που προκύπτουν κατά το σχηματισμό συμπλόκων του τεχνητίου (V) είναι οκταεδρικές, τριγωνικής διπυραμίδας και τετραγωνικής πυραμίδας. Παραδείγματα σχηματισμού συμπλόκων τεχνητίου στη συγκεκριμένη οξειδωτική κατάσταση παρατίθενται στον πίνακα 2.3. [46]

Οι ενώσεις του τεχνητίου στη χαμηλή οξειδωτική βαθμίδα απέκτησαν ιδιαίτερη σημασία με στόχο την ανάπτυξη νέων ραδιοφαρμάκων και κυτταροτοξικών παραγόντων. Ειδικότερα, η ανάπτυξη νέων οργανομεταλλικών ραδιοφαρμάκων επιτεύχθηκε μέσα από συναρμογή των συμπλόκων του τεχνητίου με το νερό, όπως  $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ . Παράλληλα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συναρμογή του τεχνητίου με το τρικαρβονύλιο, με σκοπό την επισήμανση βιομορίων. Η οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου στο κέντρο του πυρήνα είναι στη χαμηλή οξειδωτική βαθμίδα (+1), με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται από σταθερότητα, γιατί υπάρχει προστασία από την επίδραση οξειδωτικών συνθηκών. Αντίθετα, η "ανοιχτού τύπου" τετραγωνική πυραμιδική δομή του  $\text{Tc(V)}$ , κατά το σχηματισμό των οξοσυμπλόκων, διαθέτει εκτεθειμένες πλευρές, με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος να αλλοιωθεί η δομή του, κάτω από συνθήκες που ευνοούν την πρωτονίωση.[47]

Άτομο Δότης	Παράδειγμα
Αλογόνα	$[\text{TcOX}_4]$ X=Cl, Br
Οξυγόνο	
Αζωτο	
Θείο	
Φώσφορος	

**Πίνακας 2.3:** Οι σημαντικότεροι δότες που συναρμόζονται με Tc (V) [46]

### **3. Βιομόρια και εφαρμογή τους στην πυρηνική ιατρική.**

Στον αιώνα μας, η αντιμετώπιση του καρκίνου φαίνεται να αποτελεί τη μεγαλύτερη πρόκληση για την επιστήμη. Όμως οι αντικαρκινικές θεραπείες που εφαρμόζονται μέχρι σήμερα παρουσιάζουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα, τόσο γιατί δεν είναι πλήρως κατανοητοί οι μηχανισμοί δημιουργίας και εξέλιξης της νόσου, όσο και γιατί δεν είναι διαθέσιμα συστηματικά μέσα διάγνωσης της σε αρχικό και θεραπεύσιμο ακόμα στάδιο. Οι κακοήθεις νεοπλασίες, ιδιαίτερα στο προχωρημένο μεταστατικό στάδιο στο οποίο γίνεται συνήθως η διάγνωση, δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν δραστικά με τα υπάρχοντα μέσα, δηλαδή με χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία ή εξωτερική ραδιοθεραπεία, οπότε συνήθως παραμένουν ανέπαφες και πρακτικά μη αντιμετωπίσιμες. Στη προσπάθεια αντιμετώπισης και καλύτερης κατανόησης της καρκινογένεσης υπάρχει έντονο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη ραδιοεπισημασμένων βιομορίων, όπως πεπτιδίων και αντισωμάτων.

#### **3.1. Γενικά περί πεπτιδίων στην ογκολογία.**

Ο όρος «πεπτίδιο» χρησιμοποιείται συνήθως σε μόρια που περιέχουν λιγότερα από εκατό αμινοξέα και έχουν μοριακό βάρος μέχρι 10 kDa [48]. Ως μικρά πεπτίδια χαρακτηρίζονται αυτά που έχουν λιγότερα από 30 αμινοξέα και μοριακό βάρος μικρότερο από 3,5 kDa. Τα μικρά πεπτίδια αποτελούν βασικά συστατικά σε θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες, περισσότερες από οποιαδήποτε άλλη τάξη μορίων και παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλη συγγένεια με τους υποδοχείς τους.

Στον οργανισμό, τα πεπτίδια έχουν το ρόλο του ``πληροφοριοδότη``. Πιο συγκεκριμένα, μεταδίδουν και αποκωδικοποιούν την πληροφορία σε αυστηρά συγκεκριμένα κύτταρα, προκειμένου να γίνουν οι απαραίτητες βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Η παραγωγή των πεπτιδίων πραγματοποιείται κατά ένα ποσοστό από τα κύτταρα. Ο ρόλος των πεπτιδίων είναι συγκεκριμένος και κατανεμημένος ομοιόμορφα, για κάθε όργανο του ανθρώπου. Επομένως, τα πεπτίδια που σχετίζονται με τις βιολογικές λειτουργίες του εγκεφάλου είναι διαφορετικά σε σχέση με τα πεπτίδια του ήπατος. [49]



Ο μηχανισμός μεταφοράς του πεπτιδίου και ο τρόπος με τον οποίον διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη αποτελούν τα κριτήρια κατά την σύνθεση πεπτιδίων με φαρμακολογική δράση. Ειδικότερα, τα συνθετικά πεπτίδια διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο για την αντιμετώπιση ανίατων ασθενειών, όπως του καρκίνου και του ιού HIV, ενώ συντελούν στην καλύτερη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου.[50]

Τέλος, οι υποδοχείς πεπτιδορμονών στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιομόρια-στόχοι στην διάγνωση ή θεραπεία του καρκίνου. Τα τελευταία χρόνια, η στρατηγική μοριακής στόχευσης των υποδοχέων αυτών με συνθετικά ανάλογα πεπτιδορμονών έχει προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας [51, 52]

### **3.2 Πεπτίδια επισημασμένα με ραδιονουκλίδια.**

Τα ραδιοπεπτίδια έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στα πεδία της πειραματικής και κλινικής ογκολογίας κατά τα τελευταία 30 περίπου χρόνια. Έχουν κατά κύριο λόγο χρησιμοποιηθεί στην *in vitro* ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό υποδοχέων πεπτιδορμονών σε κυτταρικές σειρές και παρασκευάσματα ιστών, ενώ πρόσφατα έχουν αρχίσει να εφαρμόζονται στην ανάλυση της *in vivo* κατανομής τους. Συνέχεια αυτών των εξελίξεων αποτελεί η εφαρμογή ραδιοπεπτιδίων στην απεικονιστική διάγνωση ή τη ραδιονουκλιδική θεραπεία νεοπλασιών [53-56], οι οποίες υπερεκφράζουν υποδοχείς συγκεκριμένων πεπτιδορμονών.

Πλεονέκτημα της χρήσης μικρού μεγέθους πεπτιδικών φαρμάκων (<3500 Da), σε σύγκριση με ραδιοεπισημασμένα αντισώματα ειδικά για καρκινικούς δείκτες της κυτταρικής επιφάνειας, είναι τα εξής:

1. Ταχεία και υψηλή ικανότητα διείσδυσης στους καρκινικούς ιστούς-στόχους .
2. Ταχεία αιματική κάθαρση και απομάκρυνση από τους παρακείμενους ιστούς.
3. Χαμηλή αντιγονικότητα.
4. Δυνατότητα παραγωγής σε μεγάλες ποσότητες με αυτοματοποιημένες μεθόδους σύνθεσης και σχετικά χαμηλό κόστος,

5. Μεγαλύτερη επιδεκτικότητα σε χημικές τροποποιήσεις (συνθετικά πεπτίδια) και
6. Εσωτερίκευση στα κύτταρα-στόχους: η πρόσδεση ραδιοπεπτιδίων-αγωνιστών στον υποδοχέα ακολουθείται από εσωτερίκευση του συμπλέγματος ραδιοπεπτιδίου-υποδοχέα με αποτέλεσμα την ενίσχυση του διαγνωστικού σήματος ή του θεραπευτικού αποτελέσματος (λόγω καλύτερης προσέγγισης στο γενετικό υλικό).

Επομένως, η χρήση ραδιοπεπτιδίων ως μορίων στόχευσης συνιστά αποτελεσματική, μη παραμεβατική και εύχρηστη τεχνική, η οποία επιτρέπει ταχεία και ολόσωμη απεικόνιση. Με αυτό τον τρόπο, επιτυγχάνεται η διάγνωση και η σταδιοποίηση της νεοπλασματικής νόσου καθώς και ο σχεδιασμός της θεραπείας και η αποτίμηση της αποτελεσματικότητας της. Τα πλεονεκτήματα κλινικής εφαρμογής των ραδιοπεπτιδίων έγιναν σαφή με τη κυκλοφορία του ραδιοφαρμάκου OctreoScan® ( $[^{111}\text{In-DTPA}^0]\text{octreotide}$ ) στα μέσα της δεκαετίας του 1990. Το OctreoScan® είναι ένα ραδιοεπισημασμένο ανάλογο της σωματοστατίνης το οποίο έχει καθιερωθεί ως το ραδιοφάρμακο επιλογής στην διάγνωση καρκινοειδών και άλλων νευροενδοκρινικών όγκων σε συνδυασμό με τη τεχνική SPECT. [57]

### **3.3. Γενικά περί μονοκλωνικών αντισωμάτων στην ογκολογία.**

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ένα είδος αντισωμάτων, στο οποίο μεταβιβάστηκε το αντίγονο A, σε ένα κύτταρο ενός νεοπλάσματος των Β-λεμφοκυττάρων. Αποτέλεσμα είναι η σύνθεση ενός υβριδικού κυττάρου, το οποίο έχει την ικανότητα να διαιρείται χωρίς τερματισμό. [58]

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι μόρια που προέρχονται από υβριδώματα και ο ρόλος τους είναι η αναγνώριση ενός αντιγόνου ή ενός τμήματος αντιγόνου. Τα υβριδοματικά κύτταρα παράγουν τα μονοκλωνικά αντισώματα, μέσω της σύντηξης, με τους ακόλουθους τρόπους:

- Σύντηξη ενεργοποιημένων β-λεμφοκυττάρων από το σπλήνα ανοσοποιημένου επίμυου, με αποτέλεσμα να γίνεται εφικτή η παραγωγή αντισωμάτων για το ενδιαφερόμενο αντίγονο.

- Σύντηξη κυττάρων μη εκκριτικού μυελώματος επίμυος.

Όσον αφορά το ρόλο των υβριδωματικών κυττάρων είναι η έκκριση αντισωμάτων, τα οποία διαθέτουν μοναδική ειδικότητα. [59]

Όσον αφορά τις ιδιότητες των μονοκλωνικών αντισωμάτων, όλα τα μόριά τους διαθέτουν ομοιογενή δομή και χαρακτηρίζονται από υψηλού βαθμού ειδικότητα και ευαισθησία. Η ικανότητα σύνδεσής τους περιορίζεται σε ένα μόνο επίτοπο, ενώ αποτελούν πρότυπα αντιδραστηρίων, έπειτα από τη σύνθεση τους από τα υβριδώματα, ώστε να μπορούν να αναπαραχθούν στην ίδια ποσότητα και σε σταθερή μορφή, ακολουθώντας πανομοιότυπη διαδικασία παραγωγής. [60]

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι μόρια με θεωρητικό, διαγνωστικό και θεραπευτικό ενδιαφέρον στη Ραδιοφαρμακευτική επιστήμη. Όσον αφορά τις θεωρητικές εφαρμογές τους, εξελίσσεται ένας μεγάλος αριθμός μελετών, όπως η παραγωγή υβριδωμάτων από σύντηξη ενεργοποιημένων T- κυττάρων με κυτταρικές γραμμές T λεμφοκυττάρων. [60]

Σχετικά με τις διαγνωστικές τους εφαρμογές, εστιάζονται στην αναζήτηση και τυποποίηση των ιών, των σχιζομυκητών, των παρασίτων, αλλά και στον προσδιορισμό των ορμονών, μέσω των ραδιοανοσολογικών και ανοσοενζυμικών μεθόδων. Παράλληλα, οι διαγνωστικές εφαρμογές των μονοκλωνικών αντισωμάτων πραγματοποιούνται για την τυποποίηση των αντιγόνων μεμβράνης, την απομόνωση και τον εντοπισμό του αντιγόνου. [60]

Όσον αφορά τις θεραπευτικές εφαρμογές τους, χρησιμοποιούνται έναντι της θεραπείας του άσθματος, των αυτοάνοσων ασθενειών, του καρκίνου, της σηψαιμίας, της δηλητηρίασης, της κατάχρησης ουσιών, των ιογενών λοιμώξεων, καθώς και άλλων ασθενειών. [61]

Παρόλο το μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων στη Ραδιοφαρμακευτική επιστήμη, διακρίνονται κάποια μειονεκτήματα τους, τα οποία κρίνονται σημαντικά:

1. Εγκυμονείται ο κίνδυνος παραγωγής ανθρώπινων αντισωμάτων (antimouse), λόγω της υψηλής αντιγονικότητας. Ο συγκεκριμένος κίνδυνος είναι υπαρκτός στην περίπτωση της προέλευσης τους από άλλα βιολογικούς οργανισμούς, όπως ποντίκια.
2. Ο καθαρισμός του αίματος του ασθενή επιτυγχάνεται με αργούς ρυθμούς.
3. Υψηλό κόστος παραγωγής
4. Επίτευξη χαμηλών λόγων όγκου/υποστρώματος και άρα χαμηλή απεικονιστική ευκρίνεια στα αρχικά χρονικά διαστήματα μετά τη χορήγηση, που καθιστά ασύμβατη τη χρήση βραχύβιων ραδιονουκλιδίων.
5. Η εφαρμογή ήπιων σχετικά συνθηκών επισήμανσης των αντισωμάτων είναι απαραίτητη, λόγω της ευαισθησίας τους. [50, 62]

Σήμερα πλέον η σύγχρονη επιστήμη έχει καταφέρει να μετριάσει τα μειονέκτημα αυτά διατηρώντας το κύριο και μείζον πλεονέκτημα της εξειδίκευσης των αντισωμάτων, έτσι ώστε να αποφεύγεται η τοξικότητα των υγιών ιστών.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για *θεραπευτικούς* σκοπούς βρίσκονται στο επίκεντρο των ερευνών των επιστημονικών κέντρων, τις τελευταίες δεκαετίες. Ο λόγος για το έντονο ενδιαφέρον εστιάζεται στη *μεγάλη εξειδίκευση* που παρουσιάζουν, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην εξέλιξη της ιατρικής επιστήμης, με θετικούς ρυθμούς ανάπτυξης. Τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών αριθμούνται σε περισσότερα από τετρακόσια, ενώ τα διακόσια από τα συγκεκριμένα βρίσκουν εφαρμογή στη θεραπεία κατά του καρκίνου. [63]

Πλεονεκτήματα μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι πεπτιδίων στην πυρηνική ιατρική αποτελούν τα κύρια χαρακτηριστικά τους όπως:

1. ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσης και
2. η υψηλού βαθμού συγγένεια που παρουσιάζουν σε σχέση με τους βιολογικούς ιστούς – στόχους.
3. εξαιρετική σταθερότητα, υψηλού βαθμού ειδικότητα και χημική συγγένεια.
4. δίνεται η δυνατότητα παραγωγής εξαιρετικά ειδικού αντισώματος από μη καθαρό ανοσογόνο, χωρίς να παρεμποδίζεται η βιολογική δραστηριότητα του αντιγόνου.

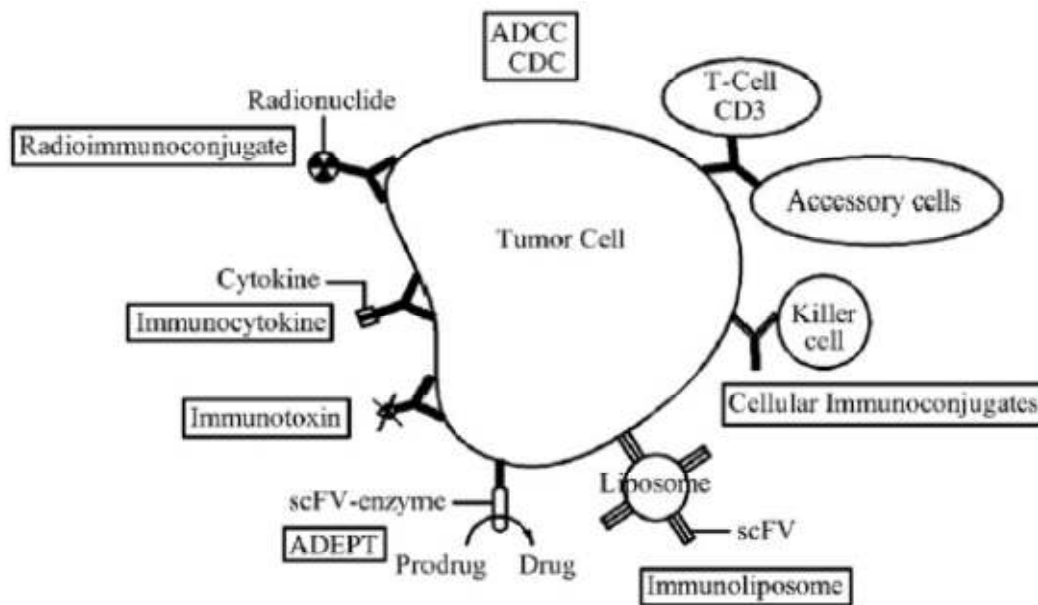
5. Είναι εφικτός ο καθαρισμός των μονοκλωνικών αντισωμάτων, ακόμα και σε μεγάλες ποσότητες, με μεθόδους που δεν καταστρέφουν την ανοσοδραστικότητα και οδηγούν σε υψηλής καθαρότητας αντιδραστήρια, έτσι ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή τους στην πυρηνική ιατρική. [64]

Από την άλλη πλευρά, τα πεπτίδια εμφανίζουν μειονεκτήματα, με το σημαντικότερο να είναι η έλλειψη σταθερότητας που εμφανίζουν σε σχέση με τα μονοκλωνικά αντισώματα. Έτσι, εμφανίζουν συχνά μικρή μεταβολική σταθερότητα. Παράλληλα, όταν γίνεται προσπάθεια επισήμανσης ενός ραδιοπεπτιδίου, τότε είναι πιθανό να υπάρξουν αλλαγές στα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά. Αποτέλεσμα αυτού είναι αλλαγές όχι μόνο στη βιοκινητική του ραδιοπεπτιδίου, αλλά και στον τρόπο αλληλεπίδρασης του με τον κυτταρικό υποδοχέα. [62]

Ο πιο σημαντικός στόχος για τη σύγχρονη ιατρική, και ειδικότερα για την ογκολογία είναι η εύρεση ενός εξειδικευμένου φαρμάκου με τη δυνατότητα να εντοπίζει και να θεραπεύει επιλεκτικά τις παθολογικές εστίες, δηλαδή τον πρωτογενή όγκο και πιθανές μεταστάσεις. Επομένως, στόχος είναι το μονοκλωνικό αντίσωμα να δρα ως “μαγική σφαίρα” (“magic bullet”), σύμφωνα με την αρχή που διατύπωσε ο P.Ehrlich ήδη στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα (ανάγκη ανάπτυξης φαρμάκων μοριακής στόχευσης). Η αρχή της “μαγικής σφαίρας” εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στην κλινική πράξη στα μέσα της δεκαετίας του 1970, με τη χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων (MAbs) για τη θεραπεία του καρκίνου. Σύμφωνα με τη προσέγγιση αυτή, MAbs ικανά να αναγνωρίζουν και να αλληλεπιδρούν με αντιγόνα-καρκινικούς δείκτες στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς κυτταροτοξικών μορίων. [65] Γι το σκοπό αυτό, τα MAbs συζεύγνυνται με τοξίνες (π.χ τοξίνη της διφθερίτιδας, εξωτοξίνη των ψευδομονάδων), ένζυμα (π.χ αλκαλική φωσφατάση, καρβοξυπεπτιδάση G<sub>2</sub>, β-λακταμάση) ή χημειοθεραπευτικά φάρμακα (doxorubicin, calicheamicin). Εναλλακτικά, στη θεραπεία του καρκίνου χρησιμοποιούνται γενετικά ανασυνδυασμένα διδραστικά (bifunctional) MAbs, τα οποία δρουν είτε μέσω ενεργοποίησης του συμπληρώματος του ανοσοποιητικού συστήματος, είτε μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, επάγοντας τελικά κυτταρόλυση.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα λειτουργούν λοιπόν, με διάφορους τρόπους έναντι των καρκινικών κυττάρων αφού μπουν στον οργανισμό όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.1. Συγκεκριμένα:

- Ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να επιτεθεί και να θανατώσει τα καρκινικά αυτά κύτταρα. (Υπάρχει περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα να προσκολληθούν και κατευθείαν στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων διευκολύνοντας την εύρεση και καταστροφή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα).
- Μπλοκάρουν τα σήματα ανεξέλεγκτης ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων μέσω σύνδεσής τους με κυτοκίνες ή άλλες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για το σκοπό αυτό.
- Προστατεύουν το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων.[66]
- Στοχεύουν μόρια στο μικροπεριβάλλον του όγκου με αποτέλεσμα να διαταράσσουν τη δομή που τρέφει και πολλαπλασιάζει τα καρκινικά αιμοφόρα αγγεία.
- Συνδεδεμένα με ένζυμα δένονται σε καρκινικό αντιγόνο προκαλώντας έμμεσα τη θανάτωση του παθολογικού κυττάρου (ADEPT: antibody-directed enzyme prodrug therapy)
- Μεταφέρουν φάρμακα, με τη μορφή λιποσωμάτων. Το αντίσωμα αποτελεί το μόριο που θα στοχεύσει, λόγω μεγάλης ειδικότητας, την πάσχουσα περιοχή και το λιπόσωμα θα αποτελέσει τον φορέα, τόσο υδρόφοβων όσο και υδρόφιλων, φαρμάκων τα οποία θα απελευθερωθούν εκεί.
- Συνδεδεμένα με ραδιοϊσότοπα: ραδιοανοσοσυμπλέγματα για διάγνωση και θεραπεία..



**Σχήμα 3.1.** Μηχανισμός δράσης μονοκλωνικών αντισωμάτων για τη θεραπεία καρκινικών κυττά

Ειδικότερα, όσον αφορά την εφαρμογή τους στη θεραπεία του καρκίνου, γίνεται συστηματικά η χρήση τους. Βέβαια, ανάλογα με το είδος της ασθένειας χρησιμοποιείται και το αντίστοιχο μονοκλωνικό αντίσωμα. Έτσι, το μονοκλωνικό αντίσωμα *rituximab* υπήρξε το πρώτο που χορηγήθηκε για την αντιμετώπιση της ασθένειας του λεμφώματος non-Hodgkin. Αργότερα, χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων εναντίον της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και για την χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Στις Η.Π.Α. το 2011 αναγνωρίστηκε ως το καλύτερο αντικαρκινικό φάρμακο [65, 67]

Ένα άλλο μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο εγκρίθηκε αργότερα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) της Αμερικής, κατά τη θεραπεία του λεμφώματος non-Hodgkin, ήταν το *ibritumomab tiuxetan*. Παράλληλα, κατά τη θεραπεία του λεμφώματος non-Hodgkin είχε χρησιμοποιηθεί και το μονοκλωνικό αντίσωμα *Brentuximab vedotin* (Adcetris). Επίσης, ένα άλλο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της οξείας λευχαιμίας του μυελού των οστών υπήρξε το μονοκλωνικό αντίσωμα *Gemtuzumab ozogamicin* (Mylotarg). Το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε κατά τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού υπήρξε το Herceptin (*trastuzumab*). Στη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου

εφαρμόστηκε η χορήγηση του αντισώματος cetuximab ως επικουρικό στη χημειοθεραπεία με φθοριοπυριμιδίνη (fluoropyrimidine).[67]

Τα χαρακτηριστικά παραδείγματα MAbs με εφαρμογή στη σύγχρονη κλινική ογκολογία συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1

Αντίσωμα	Αντιγόνο	Εμπορικό όνομα	Τύπος καρκίνου
Rituximab Ofatumumab	CD20	MabThera® (1997)	Λέμφωμα τύπου non-Hodgkin Chronic lymphocytic leukemia (CLL)
Trastuzumab	HER2/Neu	Herceptin® (1998)	Καρκίνος του μαστού
Gemtuzumab Ozogamicin	CD33	Mylotarg® (2000)	Οξεία μυελογενής λευχαιμία
Alemtuzumab	CD52	CamPath®	Χρόνια λευκοκυτταρική λευχαιμία, λέμφωμα κυττάρων
Bevacizumab	VEGF	Avastin® (2004)	Μεταστατικός καρκίνος του παχέως εντέρου
Cetuximab	HER1	Erbitux® (2004)	Breast cancer and lymphomas

**Πίνακας 2.1.** Μονοκλωνικά αντισώματα (MAbs) με κλινική εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου.

Το 2004 το μονοκλωνικό αντίσωμα *bevacizumab* εγκρίθηκε για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέως εντέρου και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου των πνευμόνων. Το *bevacizumab* χορηγείται σε συνδυασμό με τα κλασσικά χημειοθεραπευτικά σκευάσματα ως επικουρικό (chemotherapy adjuvant) και αυξάνει σημαντικά την επιβίωση των συγκεκριμένων ασθενών. Το *Ranibizumab* προέρχεται από το ίδιο αντίσωμα ποντικού και μπλοκάρει την ανάπτυξη των μη φυσιολογικών αγγείων στο μάτι με ένδειξη τη θεραπεία της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας (age-related macular degeneration -AMD) [66]



### 3.4 Μονοκλωνικά αντισώματα επισημασμένα με ραδιονουκλίδια.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα και τα πεπτίδια, επισημασμένα με κάποια ραδιενεργή ουσία, αποτελούν τα βιομόρια με το εντονότερο ενδιαφέρον για τον κλάδο της Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας. [68]

Η σύγχρονη ραδιοφαρμακευτική και πυρηνική ιατρική εναρμονιζόμενες με τις ραγδαίες εξελίξεις οδηγήθηκε στην ανάπτυξη ραδιοεπισημασμένων MAbs [69]. Στην περίπτωση βέβαια αυτή, τα MAbs γίνονται μεταφορείς ραδιονουκλιδίων με στόχο την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται στοχευμένη διάγνωση-ραδιοανοσοδιάγνωση (με διαγνωστικά ραδιονουκλίδια) ή θεραπεία- ραδιοανοσοθεραπεία (με θεραπευτικά ραδιονουκλίδια). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ραδιοανοσοδιαγνωστικού φαρμάκου είναι το  $^{99m}\text{Tc}$ -arcitumomab, ένα MAb κατά του καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου (carcinoembryonic antigen, CEA) επισημασμένου με  $^{99m}\text{Tc}$ . Το προϊόν αυτό, με το εμπορικό όνομα CEA-Scan®, εγκρίθηκε το 1996 για τη ραδιοανοσοδιάγνωση του καρκίνου του εντέρου[69].

Τα αντισώματα επισημασμένα με κατάλληλα ραδιοϊσότοπα βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη Ραδιοανοσοσπινθηρογράφιση και τη Ραδιοανοσοθεραπεία.. Η μεθοδολογία επισήμανσης των MAbs καθορίζεται από το χρησιμοποιούμενο ραδιοϊσότοπο και ειδικότερα από τις χημικές του ιδιότητες. Για την επισήμανση των MAbs υπάρχουν δύο προσεγγίσεις: η πρώτη αναφέρεται στα ραδιοϊσότοπα του ιωδίου και η δεύτερη στα ραδιομέταλλα.[70, 71] Παρακάτω θα αναφερθούμε στην επισήμανση μονοκλωνικών αντισωμάτων με ραδιομέταλλα..

Κατάλληλη μέθοδος επισήμανσης, ανεξαρτήτως του ραδιοϊσοτόπου, είναι εκείνη που οδηγεί σε ένα τελικό προϊόν, το οποίο είναι σταθερό *in vivo*, με υψηλή απόδοση επισήμανσης και με ελάχιστη απώλεια της βιολογικής δραστηρότητας του βιομορίου, δηλαδή της ανοσολογικής δραστηρότητας του αντισώματος. [72] Η σταθερότητα του τελικού προϊόντος *in vivo* είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να βρει κλινική εφαρμογή ένα επισημασμένο MAb. Σε περίπτωση που το τελικό προϊόν δεν χαρακτηρίζεται από σταθερότητα, κάτω από *in vivo* συνθήκες, τότε παρατηρείται διαμοριακή ανταλλαγή του ραδιοϊσοτόπου με ενδεχόμενους ανταγωνιστές, όπως είναι οι πρωτεΐνες του ορού

(transchelation). Αν μετά τη χορήγηση του στον οργανισμό ακολουθεί διάσπαση και απελευθέρωση του ραδιοϊσοτόπου, αυτή θα είναι ουσιαστικά μη αντιστρεπτή, καθώς το ραδιοϊσότοπο θα απομακρυνθεί γρήγορα από πρωτεΐνες του ορού (π.χ. τρανσφαιρίνη ή αλβουμίνη), ενώ τη θέση του θα καταλάβει πιθανότατα ένα από τα άφθονα κατιόντα του ορού (π.χ.  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ). [73, 74]

Επίσης, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η μέθοδος επισήμανσης καθώς και η επιλογή του ραδιοϊσοτόπου μπορούν να μεταβάλλουν σημαντικά τη φαρμακοκινητική και τη βιοκατανομή ενός αντισώματος, που ούτως ή άλλως επηρεάζεται σημαντικά από πολλούς παράγοντες μέσα σε έναν ζωντανό οργανισμό. [71, 75]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επισήμανση των MAbs με ραδιομέταλλα, καθώς η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία ραδιοϊσοτόπων, τα οποία λόγω των χαρακτηριστικών τους, μπορούν να βρουν εφαρμογή στην πυρηνική ιατρική. Μεταξύ των ραδιομετάλλων συγκαταλέγεται και το ραδιοϊσότοπο του Tc-99m, το οποίο μελετάται εκτενώς στην παρούσα εργασία. Στην περίπτωση του Τεχνητίου απαιτείται η μετατροπή του στην κατάλληλη οξειδωτική βαθμίδα.

Το αντίσωμα διαθέτει στο μόριό του διάφορες θέσεις δέσμευσης μεταλλικών ιόντων. Το μόριο του αντισώματος έχει αυτό το ίδιο την ικανότητα να δεσμεύει, συνήθως χαλαρά, ένα ραδιομέταλλο, οπότε το προϊόν που προκύπτει είναι ασταθές *in vivo*. Στις περισσότερες περιπτώσεις, όπου τα ιόντα του μετάλλου δεσμεύονται σε αυτές τις ασθενείς θέσεις, όταν το επισημασμένο MAb χορηγείται σε έναν ζωντανό οργανισμό, τα μεταλλοκατιόντα μεταφέρονται σε άλλες πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να τα δεσμεύσουν. Συμπλεγμένο με άλλη πρωτεΐνη το ραδιομέταλλο μεταφέρεται σε διαφορετικές θέσεις από αυτές που αποτελούν το στόχο [76], οδηγώντας έτσι στη δημιουργία ενός αυξημένου σήματος ραδιενεργού υπόβαθρου (background). [70, 73]

Για το σχηματισμό ενός σταθερού συμπλέγματος μεταξύ ραδιομετάλλου και MAb τις περισσότερες φορές χρησιμοποιούνται τα λεγόμενα «χηλικά μέσα διπλής λειτουργίας» (bifunctional chelating agents). Τα χηλικά μέσα διπλής λειτουργίας είναι ενώσεις οι οποίες έχουν την ικανότητα αφενός μεν να δεσμεύουν ισχυρά το μεταλλικό κατιόν, σχηματίζοντας σύμπλοκο με αυτό, αφετέρου δε, λόγω ύπαρξης κατάλληλων ομάδων στο μόριό τους, να συνδέονται ομοιοπολικά με το αντίσωμα.

Όταν συμπλεχθούν στο μόριο του αντισώματος αυτές οι ενώσεις δρουν ως ενδιάμεσοι υποκαταστάτες για τη σύμπλεξη του ραδιομετάλλου [73, 74, 77-80]. Η επιλογή της χηλικής ένωσης καθορίζεται από τη φύση του μεταλλικού κατιόντος που πρόκειται να δεσμευθεί [77, 80].

Οι μέθοδοι επισήμανσης των αντισωμάτων με ραδιομέταλλα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στην άμεση επισήμανση και στην έμμεση επισήμανση.

### 3.4.1 Άμεση επισήμανση

Οι μέθοδοι άμεσης επισήμανσης χρησιμοποιούνται κυρίως για το ραδιοϊσότοπο Τεχνήτιο-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), αλλά και για τα ραδιοϊσότοπα του Ρηνίου-186/188 ( $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ), λόγω της ομοιότητας των δύο αυτών στοιχείων (Tc, Re) ως προς τις χημικές τους ιδιότητες. [81]

Κατά την άμεση επισήμανση, η σύμπλεξη του  $^{99m}\text{Tc}$  με το μόριο του αντισώματος γίνεται μέσω ενεργών σουλφυδρυλικών ομάδων. Η χρησιμοποίηση ενός αναγωγικού μέσου, όπως είναι ο χλωριούχος κασσίτερος, οδηγεί στην αναγωγή ορισμένων δισουλφιδικών δεσμών του μορίου του αντισώματος (S-S δεσμοί) σε ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες (-SH ομάδες), οι οποίες στη συνέχεια δεσμεύουν το τεχνήτιο [82, 83]. Για τη σύμπλεξη του  $^{99m}\text{Tc}$  είναι απαραίτητη και η αναγωγή του ίδιου του ιόντος του τεχνητίου, με  $\text{SnCl}_2$ , στην οξειδωτική κατάσταση +5, δεδομένου ότι αυτό παραλαμβάνεται από γεννήτρια  $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$  ως υπερτεχνητικό ιόν ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), όπου το τεχνήτιο βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση +7. Η αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών μπορεί να γίνει με χρήση ήπιων αναγωγικών μέσων, όπως για παράδειγμα διθειοθρεϊτόλης, 2-μερκαπτοαιθανόλης ή ασκορβικού οξέος. Στις περιπτώσεις αυτές επιδιώκεται αρχικά ο σχηματισμός ασθενούς ενδιάμεσου συμπλόκου του τεχνητίου (transfer ligand) με ένα χηλικό μέσο όπως το μεθυλενοδιφωσφονικό οξύ (MDP), το πυροφωσφορικό νάτριο (PYP), το γλυκοεπτονικό ασβέστιο κ.ά. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα αντίδραση ανταλλαγής (transchelation) του  $^{99m}\text{Tc}$  από το ενδιάμεσο σύμπλοκο στο ανηγμένο αντίσωμα [84]. Αυτή η μέθοδος έχει αναπτυχθεί με διάφορες παραλλαγές που ποικίλλουν τόσο ως προς την επιλογή των αναγωγικών, όσο και ως προς την επιλογή των ενδιάμεσων χηλικών ενώσεων. [85-87]

Η άμεση επισήμανση μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό σύμπλοκων ενώσεων, οι οποίες πιθανό να είναι ασταθείς, όπως διαπιστώνεται κατά τους *in vitro* ελέγχους σταθερότητας των ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων παρουσία ορού αίματος (serum). Ένα ακόμη μειονέκτημα της άμεσης οδού επισήμανσης αποτελεί ο κίνδυνος της απώλειας ανοσοδραστικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος, λόγω της διάσπασης μερικών δισουλφιδικών γεφυρών. [88]

### 3.4.2 Έμμεση επισήμανση

Οι μέθοδοι έμμεσης επισήμανσης προϋποθέτουν την ύπαρξη ενός χηλικού υποκαταστάτη, ο οποίος θα σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο με το ραδιομέταλλο. Οι μέθοδοι αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στις «πριν τη σύμπλεξη» επισημάνσεις και στις «μετά τη σύμπλεξη» επισημάνσεις. [70, 77, 78, 89]

Η μέθοδος «πριν τη σύμπλεξη» περιλαμβάνει αρχικά την επισήμανση του χηλικού υποκαταστάτη, δηλαδή το σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταξύ του ραδιομετάλλου και του χηλικού μέσου διπλής λειτουργίας (bifunctional chelating agent). Στη συνέχεια, εάν το σύμπλοκο δεν διαθέτει στο μόριό του ομάδα κατάλληλη για τη σύμπλεξή του με το αντίσωμα, αυτή δημιουργείται με μια χημική τροποποίηση του μορίου και ακολουθεί η σύμπλεξη του επισημασμένου χηλικού υποκαταστάτη στο αντίσωμα. Με τη μέθοδο αυτή το βιομόριο δεν εκτίθεται σε έντονες συνθήκες που πολλές φορές απαιτούνται για το σχηματισμό του συμπλόκου. Για ερευνητικούς σκοπούς, η μέθοδος αυτή είναι πολύ χρήσιμη. Εντούτοις, είναι περίπλοκη και χρονοβόρα για κλινική χρήση ρουτίνας, ενώ δεν είναι πρακτική για την παραγωγή επισημασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων σε μεγάλη κλίμακα.

Στις μεθόδους «μετά τη σύμπλεξη», που είναι και οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες, το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση του χηλικού υποκαταστάτη με το αντίσωμα. Και σε αυτή την περίπτωση ο χηλικός υποκαταστάτης «ενεργοποιείται» για τη σύμπλεξη με το μόριο του αντισώματος, εάν δεν διαθέτει κατάλληλη ομάδα. Σχηματίζεται έτσι ένα σύμπλεγμα μεταξύ μονοκλωνικού αντισώματος και υποκαταστάτη (ανοσοσύμπλεγμα) το οποίο έχει την ικανότητα να δεσμεύει το ραδιομέταλλο. Η επισήμανση μπορεί να πραγματοποιηθεί απλώς με την

αντίδραση του ανοσοσυμπλέγματος με το ραδιοϊσότοπο σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα, η κλινική εφαρμογή ραδιοεπισημασμένων MAbs ή θραυσμάτων τους (F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, scFv) έχει καταδείξει σημαντικά *μειονεκτήματα* της μεθόδου αυτής, όπως:

1. Υψηλό κόστος παραγωγής
2. Μικρή ικανότητα διείσδυσης στον καρκινικό ιστό
3. Βραδεία αιματική κάθαρση/απέκκριση, ως απόρροια του μεγάλου μοριακού βάρους τους (~150 kDa)
4. Ισχυρή αντιγονικότητα, δηλαδή επαγωγή διαδικασιών ανοσολογικής απόκρισης .

Η αργή απομάκρυνση των αντισωμάτων από το αίμα και τους παρακείμενους ιστούς έχει ως συνέπεια χαμηλούς λόγους όγκου προς φυσιολογικό ιστό (tumor/non tumor ratio), και επομένως χαμηλή απεικονιστική ευκρίνεια ή αντίστοιχα χαμηλό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Για το λόγο αυτό, η εφαρμογή των ραδιοεπισημασμένων MAbs στη πυρηνική ογκολογία περιορίζεται κυρίως στη διάγνωση και θεραπεία "αιματολογικών" καρκίνων δηλ. κακοήθεις νεοπλασίες του αίματος (λευχαιμίες) και του λεμφικού συστήματος (λεμφώματα), γιατί τα MAbs είναι εύκολα προσβάσιμα σε αυτού του είδους κακοήθειες. [65, 66, 69]

Πρόσφατα, επιτυχή εφαρμογή στην κλινική πράξη έχουν παρουσιάσει τα ραδιοφαρμακευτικά σκευάσματα Zevalin® (<sup>90</sup>Y-Ibritumomab tiuxetan) και Bexxar® (<sup>131</sup>I-Tositumomab) κατά του υποδοχέα CD20 των B-λεμφοκυττάρων με ένδειξη τη θεραπευτική αντιμετώπιση λεμφωμάτων τύπου non-Hodgkin. [65, 69]

Το 2008 γίνεται έρευνα για να διαπιστωθεί η χρησιμότητα της επισήμανσης του ραδιοϊσοτόπου του χαλκού με αντίσωμα κετουξιμάμπης (cetuximab). Το ραδιοϊσότοπο <sup>64</sup>Cu, συμπλοκοποιήθηκε με 1,4,7,10-τετρααζακυκλοδεκανοNN'N''N'''-τετραοξικό οξύ (DOTA) και επισημάνθηκε με το αντίσωμα cetuximab. Πιο συγκεκριμένα, ο στόχος ήταν να διαπιστωθεί η συνεισφορά της ραδιοεπισημασμένης ένωσης <sup>64</sup>Cu-DOTA-Cetuximab, στις μετρήσεις συγκέντρωσης του υποδοχέα του επιδερμικούς αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor – EGFR), σε όγκους του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, με την τεχνική της εκπομπής τομογραφίας ποζιτρονίων (PET). Τα

αποτελέσματα έδειξαν πως η συγκεκριμένη ένωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως διαγνωστικό εργαλείο για τον εντοπισμό του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor – EGFR), σε όγκους του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. [90]

Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα έγινε προσπάθεια ανάπτυξης ενός νέου διαγνωστικού ραδιοφαρμάκου με ραδιενεργή ουσία τεχνητίο-99m. Προς επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου, ανθρώπινο αντίσωμα επισημάνθηκε με Τεχνητίο-99m έναντι του ανθρώπινου HLA-DR αντιγόνου. [91] Τα μόρια HLA αποτελούν πεπτίδια που παράγονται από γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 6, εκφράζονται στην επιφάνεια των ανθρώπινων κυττάρων και αναγνωρίζονται από τα T- λεμφοκύτταρα (CD4 και CD8) [92]. Τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών που έγιναν τόσο με *in vitro* μελέτες, όσο και με *in vivo* πειράματα οδήγησαν στο συμπέρασμα πως το επισημασμένο αυτό αντίσωμα θα μπορούσε να αποτελέσει διαγνωστικό εργαλείο για την απεικόνιση των περιοχών λεμφώματος. [91]

Σε μία άλλη έρευνα έγινε προσπάθεια να αξιολογηθεί η σπουδαιότητα της επισήμανσης του μονοκλωνικού αντισώματος ibritumomab tiuxetan με το ραδιοϊσότοπο <sup>90</sup>Y, στη θεραπεία των λεμφωμάτων τύπου non-Hodgkin. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το <sup>90</sup>Y-ibritumomab tiuxetan μπορεί να εφαρμοστεί ως θεραπευτικό ραδιοϊσότοπο, σε μεγάλο ή ακόμη και σε πλήρη ποσοστό ανταπόκρισης, στους ασθενείς αυτούς.[93]

Οι Dias et al μελέτησαν την επισήμανση του αντισώματος rituximab με τα ραδιοϊσότοπα <sup>188</sup>Re και <sup>99m</sup>Tc, με χρήση τρικαρβονυλίου ως ενδιάμεσο σύμπλοκο. Ο στόχος ήταν να αξιολογηθεί η συνεισφορά του μονοκλωνικού αντισώματος στη θεραπεία του λεμφώματος non-Hodgkin. Ο ρόλος του rituximab είναι η μείωση του πληθυσμού, καθώς και της κυκλοφορίας στο αίμα των λευκοκυττάρων που υπάρχουν σε αυτό, γνωστά ως CD-20. Η άμεση επισήμανση αυτού του μονοκλωνικού αντισώματος, έγινε χρησιμοποιώντας την εναλλακτική τεχνική του καρβονυλίου (isolink). Ο τρόπος και η περιοχή συναρμογής του μετάλλου, όταν βρίσκεται με δομή σύμπλοκης ένωσης M(CO<sub>3</sub>), δεν είναι σαφείς [94], όμως οι πραγματοποιηθείσες *in vitro* μελέτες απέδειξαν την πλήρη βιολογική δραστηριότητα και τη σταθερότητα για τα ανοσοσυμπλέγματα των

ραδιονουκλιδίων  $^{99m}\text{Tc}$  και  $^{188}\text{Re}$  με το μονοκλωνικό αντίσωμα. Ωστόσο, χρειάζεται να υπάρξουν περαιτέρω βελτιώσεις στην κινητική και στην απόδοση της συγκεκριμένης άμεσης επισήμανσης, ώστε να είναι εφαρμόσιμη στη ραδιοανοσοδιάγνωση και θεραπεία. [95]

Μία άλλη μέθοδος επισήμανσης μονοκλωνικού αντισώματος μελετήθηκε με σκοπό την ειδική απεικόνιση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα-A (VEGF-A). Το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το bevacizumab, το οποίο επισημάνθηκε με τα ραδιοϊσότοπα  $^{111}\text{In}$  και  $^{125}\text{I}$ , ενώ ο στόχος της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί κατά πόσο θα μπορούσε να εφαρμοστεί ως μέσο ειδικής απεικόνισης της έκφρασης του VEGF-A, χρησιμοποιώντας ποντίκια ως μοντέλα για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα-A σε όγκους, μπορούσε να ανιχνευθεί και να απεικονιστεί με το συγκεκριμένο ραδιοεπισημασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα. [94]

#### 4. Αγγειογένεση στο καρκίνο. Αντισώματα έναντι VEGF.

Ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων και η μετάσταση τους στους βιολογικούς ιστούς εξαρτάται από την επαρκή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στον όγκο. Πιο συγκεκριμένα, η αγγειογένεση εξαρτάται από τη δράση διαφόρων πρωτεϊνών. Ένα μέρος του συνόλου των πρωτεϊνών έχει ρόλο ενεργοποιητή, ενώ άλλες αναστέλλουν την αγγειογένεση. Τα επίπεδα έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων (ενεργοποιητές), αντανακλούν την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων στους βιολογικούς ιστούς. Από την άλλη πλευρά, οι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες (αναστολείς) έχουν ως στόχο την αντιμετώπιση της νόσου του καρκίνου και την αποτελεσματική θεραπεία των ασθενών. [96]

Η καρκινική αγγειογένεση αποτελεί μια παθολογική κατάσταση, η οποία προκύπτει από την ανώμαλη ανάπτυξη των νέων αγγείων. Η μη φυσιολογική ανάπτυξη των τριχοειδών αγγείων προκαλείται από την ενεργοποίηση των αυξητικών παραγόντων, από την πλευρά των καρκινικών κυττάρων, με σκοπό να τροφοδοτηθεί ο όγκος με αίμα και θρεπτικά συστατικά.[97]

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων πραγματοποιείται η καρκινική αγγειογένεση είναι οι εξής:

- Αγγειογένεση μέσω της αγγειακής εκβλάστησης. Η συγκεκριμένη διαδικασία προκαλείται λόγω της ικανότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων να μεταναστεύουν, και παράλληλα να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν νέα αγγεία.
- Αγγειακή ενσωμάτωση. Μέσω του συγκεκριμένου μηχανισμού, πραγματοποιείται ενσωμάτωση τριχοειδών αγγείων, με αποτέλεσμα οι όγκοι ν' αποκτούν τα δικά τους αγγεία.
- Αγγειοποίηση. Στον μηχανισμό της αγγειοποίησης συνεισφέρουν διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί, όπως τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται καρκινική αγγειογένεση.[98]



Η ανακάλυψη του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) συνέβαλε σε σημαντικό βαθμό στην έρευνα για την αγγειογένεση. Για τον συγκεκριμένο λόγο οι επιστήμονες έκαναν προσπάθειες τις τελευταίες δεκαετίες με στόχο την ανακάλυψη διαφόρων ερωτημάτων που αφορούσαν τη βιολογία του. Στη σύγχρονη εποχή είναι αποδεκτό ότι ο αγγειακός παράγοντας (VEGF), αποτελείται από διάφορες ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν βιοχημικά, ενώ πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια έχουν αποδείξει ότι επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες. [97, 99]

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση των φυσιολογικών και παθολογικών λειτουργιών της αγγειογένεσης. Για παράδειγμα, είναι σε θέση να συντελεί στην ρύθμιση του γυναικείου αναπαραγωγικού κύκλου, στην επούλωση τραύματος, φλεγμονής, στη ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας. Επίσης, συμβάλλει σε παθολογικές καταστάσεις της αγγειογένεσης, όπως ο καρκίνος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η διαβητική πάθηση του αμφιβληστροειδούς, η νεοαγγειακή μορφή της εκφύλισης της ωχράς κηλίδας. [99]

Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του αυξητικού αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα, αποτελεί η βεβασιζουμάμπη (bevacizumab). Η δράση του συγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος είναι να αναστέλλει τη διαδικασία της αγγειογένεσης με την σύνδεση του με τον VEGF (ισομορφή VEGF-A). Το bevacizumab δεν είναι σε θέση να εξουδετερώσει άλλα μέλη της οικογένειας του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα (VEGF), όπως τα VEGF-B και VEGF-C. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του σε ανθρώπους κυμαίνεται από 17-21 μέρες. [100]

#### **4.1. Γενικά για την αγγειογένεση.**

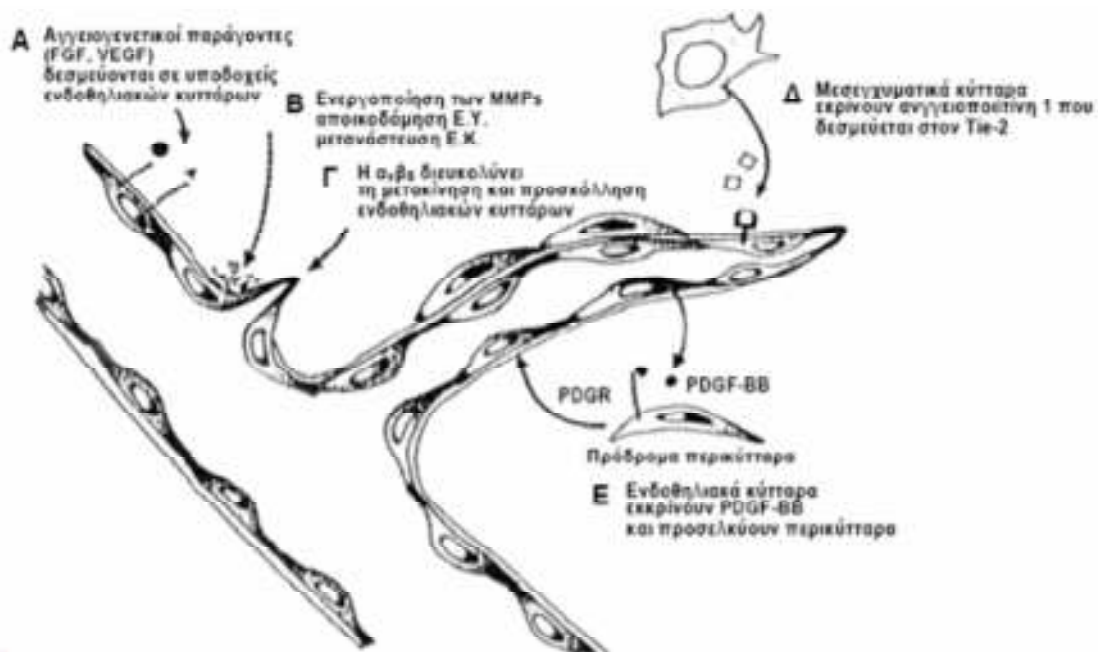
Η αγγειογένεση αποτελεί μια διαδικασία που διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στις βιολογικές λειτουργίες, γιατί σχετίζεται τόσο με την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή (φυσιολογική), αλλά και την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Στην περίπτωση που αναπτύσσονται ασθένειες λόγω της αγγειογένεσης, όπως ο σχηματισμός όγκων, τότε διακρίνεται σε παθολογική αγγειογένεση. Η αγγειογένεση κατέχει σημαντική θέση στην

επιστήμη της βιολογίας, εφόσον μέσω αυτής γίνεται προσπάθεια να κατανοηθούν μοριακοί μηχανισμοί, οι οποίοι σχετίζονται με διάφορα βιολογικά φαινόμενα. Έτσι, αποτελεί την κινητήρια δύναμη πάνω στη οποία στηρίζεται η έρευνα νέων φαρμάκων, με στόχο την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. [101]

Η αγγειογένεση πραγματοποιείται μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας, για την οποία έχουν καθοριστεί τρεις μηχανισμοί. Η ανάπτυξη νέων αγγείων σχηματίζονται είτε με εκβλάστηση (sprouting), είτε με συνδέσεις γεφυρών που σχηματίζονται ανάμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα (bridging), είτε τέλος με διχοτόμηση των αγγείων (intussusception). Από τους τρεις προαναφερθέντες μηχανισμούς, ιδιαίτερο ενδιαφέρον μελέτης παρουσίασε εκείνος που πραγματοποιείται μέσω της εκβλάστησης. [102]

Κατά τη διαδικασία της εκβλάστησης, ενεργοποιούνται τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενός μικρού αγγείου, με αποτέλεσμα να μεταβαίνει σε μία κατάσταση αγγειογενετικής μεταστροφής, δηλαδή μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται από αγγειογενετικό πολλαπλασιασμό ή διαίρεση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αγγειογενετική μεταστροφή αποτελεί η παραγωγή μεταλλο-πρωτεϊνών από το στρώμα και παράλληλα η προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους, κατά τη δίοδο τους μέσα απ' αυτό, μια διαδικασία που πραγματοποιείται με τη βοήθεια των ιντεγκρινών  $\alpha_v\beta_3$ . Τελικό αποτέλεσμα αποτελεί η δημιουργία νέων αγγείων μέσω των οργανωμένων δραστηριοτήτων των νέων ενδοθηλιακών κυττάρων. Στο σχήμα 4.1, παριστάνεται η δημιουργία νέων αγγείων μέσω του μηχανισμού της εκβλάστησης. [102]

Όσον αφορά το μηχανισμό της εκβλάστησης, θετικοί παράγοντες προς τη δημιουργία νέων αγγείων, αποτελούν όχι μόνο η αυξημένη τάση των τοιχωμάτων του αγγείου, αλλά και η αυξημένη γλοιότητα του αίματος. Μέσω της αύξησης των δύο συγκεκριμένων παραγόντων, ευνοείται η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και επομένως η παραγωγή νέων αγγείων. [103]



Σχήμα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση του σχηματισμού αγγείων με εκβλάστηση.

#### 4.2. Ο διακόπτης της αγγειογένεσης.

Διάφοροι παράγοντες είναι σε θέση να επηρεάσουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης, είτε προς τη θετική, είτε προς την αρνητική κατεύθυνση. Στην περίπτωση επαγωγής αγγειογένεσης, αυτοί οι παράγοντες ονομάζονται αγγειογενετικοί, ενώ όταν η δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του φαινομένου, διακρίνονται σε αντιαγγειογενετικούς παράγοντες.[104]

Οι αγγειογενετικοί και οι αντιαγγειογενετικοί παράγοντες ρυθμίζουν μία λειτουργία του οργανισμού, γνωστή ως "αγγειογενετικός διακόπτης". Ο διακόπτης της αγγειογένεσης εξαρτάται από την ισορροπία που επικρατεί μεταξύ των αντικρουόμενων παραγόντων. Διάφορα ηλεκτρονικά σήματα που φτάνουν στον εγκέφαλο, όπως υπογλυκαιμία, μηχανικό στρες, ανοσολογικές αντιδράσεις, χαμηλή τάση οξυγόνου, ενεργοποιούν τον διακόπτη της αγγειογένεσης. [105]

Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των ανασταλτικών και των επαγωγικών παραγόντων της αγγειογένεσης, αποτελεί το διακόπτη της αγγειογένεσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία και τη συντήρηση ενός αγγειακού δικτύου, το οποίο διογκώνεται αδιάκοπα. Η μείωση της συγκέντρωσης των αναστολέων της αγγειογένεσης αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα, στον οποίον οφείλεται η αγγειογένεση.[106]

Η ενεργοποίηση του αγγειογενετικού διακόπτη στηρίζεται στη διατάραξη ισορροπίας μεταξύ των επαγωγικών και των ανασταλτικών παραγόντων της αγγειογένεσης, με την επικράτηση των πρώτων. Από την άλλη πλευρά, η αδράνεια του συγκεκριμένου διακόπτη οφείλεται στη διατήρηση της ισορροπίας των λειτουργιών μεταξύ των δύο αντικρουόμενων παραγόντων. [107]

Στους πίνακες 4.1 και 4.2, απεικονίζονται οι επαγωγείς και οι καταστολείς της αγγειογένεσης, καθώς και ο τρόπος δράσης τους. [108]

<b>Αγγειογενετικοί Παράγοντες</b>	<b>Δράση-Λειτουργία</b>
Οικογένεια VEGF	Επαγωγή αγγειογένεσης, Αύξηση της διαπερατότητας αγγείων, Αύξηση της προσκόλληση λευκοκυττάρων
VEGFR, NRP-1	Μεταγωγή μηνυμάτων αγγειογένεσης και επιβίωσης
Ang1 & Tie2	Σταθεροποίηση αγγείων Μείωση της διαπερατότητα αγγείων
PDGF-B και οι υποδοχείς του	Επιστράτευση περικυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων
TGF-β, endoglin, υποδοχείς του TGF-β	Επαγωγή παραγωγής ECM
FGF, HGF, MCP-1	Επαγωγή αγγειογένεσης
Integrins ανβ3, ανβ5, α5β1	Υποδοχείς μορίων ECM και πρωτεϊνών
VE-cadherin, PECAM	Μόρια διασύνδεσης του ενδοθηλίου
Ephrins	Ρύθμιση της ειδικότητας αρτηριών/φλεβών
MMPs, Plasminogen activators	Αναδιαμόρφωση ECM Απελευθέρωση και ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων
PAI-1	Σταθεροποίηση νέων αγγείων
NOS; COX-2	Επαγωγή αγγειογένεσης και αγγειοδιαστολής
AC133	Ρύθμιση διαφοροποίησης αγγειοβλαστών
Chemokines	Πλειοτροπική δράση στη αγγειογένεση
Id1/Id3	Καθορισμός πλαστικότητας του ενδοθηλίου

**Πίνακας 4.1:** Επαγωγείς της αγγειογένεσης και ο τρόπος λειτουργίας τους.

<b>Αντι-αγγειογενετικοί Παράγοντες</b>	<b>Δράση-Λειτουργία</b>
Διαλυτός VEGFR1, Διαλυτός NRP-1	Δέσμευση VEGF, VEGF-B, PlGF
Ang-2	Ανταγωνιστής του Ang-1
TSP-1,-2	Καταστολή μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού, προσκόλλησης και επιβίωσης ενδοθηλιακών κυττάρων
TGF-β	Καταστέλλει την πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων Επάγει την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων Επάγει την έκφραση των TIMPs
TNF-α	Επάγει την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων
Angiostatin	Καταστολή καρκινικής αγγειογένεσης
Endostatin ( θραύσμα κολλαγόνου XVIII)	Αναστολή επιβίωσης και μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων
Vasostatin	Αναστολή ανάπτυξης του ενδοθηλίου
Platelet factor-4	Αναστολή της πρόσδεσης του bFGF και του VEGF
TIMPs; MMPs inhibitors; PEX	Καταστολή παθολογικής αγγειογένεσης
IFN-α, -β, -γ; IP-10, IL-4 IL-12, IL-18	Αναστολή μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων, μειο-ρύθμιση του bFGF
Prolactin	Αναστολή bFGF/VEGF
VEGI	Επαγωγή αγγειογένεσης και αγγειοδιαστολής
Maspin	Αναστολές πρωτεϊνών

**Πίνακας 4.2.** Αναστολείς της αγγειογένεσης και ο τρόπος λειτουργίας τους.

### 4.3. Ο ρόλος του VEGF παράγοντα στην αγγειογένεση.

Σημαντική συμβολή στη διαδικασία της αγγειογένεσης διαδραματίζει η οικογένεια του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factors), και των ισομορφών του: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και PlGF. [109]

Η οικογένεια των VEGF αποτελούν προσδέτες για μεμβρανικούς υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης - τυροσίνης (VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3), οι οποίοι εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο VEGF-A αποτελεί μόριο - κλειδί κατά τον έλεγχο της αγγειογένεσης στον καρκίνο, καθώς ενεργοποιεί τον υποδοχέα VEGFR-2, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την κινητοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων, την προαγωγή της επιβίωσης τους και την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Η υπερέκφραση του γονιδίου VEGF έχει συσχετισθεί με πρόοδο της νόσου, αλλά και με τη δυσμενή πρόγνωση σε διάφορα είδη καρκίνου.

Η *in vitro* δραστικότητα του VEGF είναι καλά τεκμηριωμένη και αφορά στην ικανότητα της προώθησης της ανάπτυξης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία προέρχονται από αρτηρίες, φλέβες και λεμφαγγεία. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) προάγει την αγγειογένεση σε *in vitro* τρισδιάστατα μοντέλα, επάγοντας συρρέοντα ενδοθηλιακά μικροαγγειακά κύτταρα, με σκοπό να εισβάλλουν σε γέλη κολλαγόνου και να σχηματίσουν μικρο-τριχοειδείς δομές.

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και οι υποδοχείς του (VEGFRs), έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη φυσιολογική και παθολογική αγγειογένεση. Καταρχήν, ο αυξητικός παράγοντας VEGF, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του κυκλοφοριακού συστήματος, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Από τις ισομορφές του VEGF, ο VEGF-A<sub>165</sub>, κατέχει εξέχουσα θέση στη βιολογική δραστηριότητα γιατί εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε πολλά ανθρώπινα όργανα, με συνέπεια να σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το σχηματισμό, την ανάπτυξη, καθώς και τη μετάσταση των όγκων. [110]

Παράλληλα, κάποιες ισομορφές, οι VEGF-B και PlGF διεγείρουν την αγγειογένεση στους βιολογικούς ιστούς, σε μικρότερο όμως ποσοστό σε σχέση με την ισομορφή VEGF-A. Ωστόσο, η αύξηση της ισομορφής PlGF έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της παθολογικής αγγειογένεσης. Από την άλλη πλευρά, η ισομορφή VEGF-C, κατέχει σημαντικό ρόλο στην εμβρυική λεμφαγγειογένεση. Επιπρόσθετα, η ηπαρίνη και η νευροφυλίνη-1, είναι σε θέση να δεσμεύσουν μόρια του VEGF-A<sub>165</sub>, με αποτέλεσμα να συμμετέχουν στην επαγόμενη ενεργοποίηση των υποδοχέων του VEGF. [110]

Από τους τρεις υποδοχείς, τον μεγαλύτερο ρόλο για την επαγόμενη φυσιολογική και παθολογική αγγειογένεση από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα κατέχει ο VEGFR-2. Μέσω του συγκεκριμένου υποδοχέα γίνεται εφικτός όχι μόνο ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά αποτελεί και σημαντικό στέλεχος για την επιβίωση τους. [111]

Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα VEGFR-2, με την ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$ . Έτσι, μεταβιβάζεται η εντολή του αυξητικού παράγοντα (VEGF), στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ώστε να μεταναστεύσουν. [112]

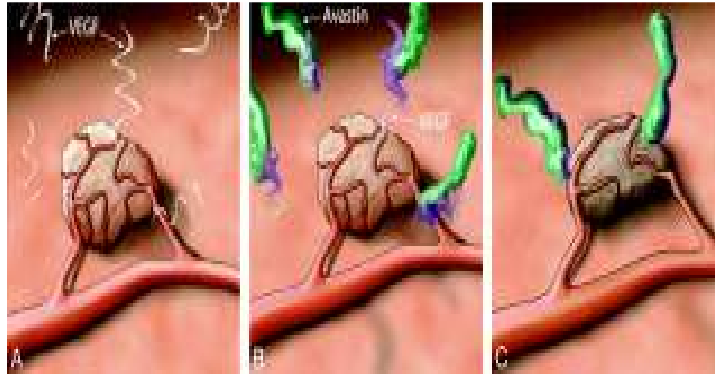
Αξίζει να σημειωθεί πως ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF), είναι υπεύθυνος για την δράση των ιντεγκρινών, από τις οποίες η ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$  συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία της αγγειογένεσης. [113, 114]

#### **4.4 Bevacizumab**

Ένα θεραπευτικό αντίσωμα αποτελεί το bevacizumab (Avastin), του οποίου ο μηχανισμός περιγράφεται παρακάτω. Η βεβασιζουμάμπη (bevacizumab) έχει την ιδιότητα να προσκολλάται σε μία ισομορφή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF-A), με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, εμποδίζει με την προσκόλληση του περιορίζει τη δράση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων στο αίμα. Αποτέλεσμα της αναστολής της δράσης



του συγκεκριμένου παράγοντα είναι η μη τροφοδότηση των καρκινικών κυττάρων με το αίμα. Έτσι, επιβραδύνεται η ανάπτυξη τους λόγω της έλλειψης οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών και επιτυγχάνεται η βαθμιαία συρρίκνωση των όγκων. Στο σχήμα 4.3, απεικονίζεται ο μηχανισμός δράσης του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab.[93]



**Σχήμα 4.3:** Ο μηχανισμός δράσης του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab.

Το bevacizumab (Avastin) χορηγείται συχνά σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τη θεραπεία των ακόλουθων τύπων καρκίνου [115]:

- Μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου ή του ορθού (ως επικουρικό στη χημειοθεραπεία με φθοριοπυριμιδίνη (fluoropyrimidine))
- Μεταστατικό καρκίνο του μαστού (σε συνδυασμό με πακλιταξέλη ή καπεσιταμπίνη)
- Προχωρημένο, μεταστατικό ή υποτροπιάζοντα μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία με συν-πλατίνη (cisplatin)
- Προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του νεφρού (σε συνδυασμό με ιντερφερόνη άλφα-2)
- Προχωρημένο επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, προχωρημένο καρκίνο των σαλπγγών ή του περιτοναίου (σε συνδυασμό με καρβοπλατίνη και πακλιταξέλη)

- Πρώτη υποτροπή του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών, του προχωρημένου καρκίνου των σαλπινγών ή του περιτοναίου (σε συνδυασμό με καρβοπλατίνη και γεμισιταβίνη). [115]

Το Bevacizumab αποτελεί ένα συνταγογραφούμενο φάρμακο, το οποίο χορηγείται ενδοφλεβίως. Ο τρόπος μεταβολισμού του δεν είναι σαφής. Ορισμένες παρενέργειες που προκαλεί η χρήση του είναι η υπέρταση, που δύναται να οδηγήσει σε σύνδρομο οπίσθιας αναστρέψιμης εγκεφαλοπάθειας, κόπωση και αδυναμία, διάρροια και κοιλιακό άλγος, αιμορραγία και διάτρηση του ρινικού διαφράγματος, καθώς και γαστρεντερική διάτρηση και αρτηριακή θρομβοεμβολή. Το Avastin δεν πρέπει να χορηγείται σε άτομα που παρουσιάζουν υπερευαισθησία (αλλεργία) στη βεβασιζουμάμπη ή σε οποιοδήποτε άλλο συστατικό του φαρμάκου, καθώς και σε κυτταρικά προϊόντα της ωοθήκης κινεζικού κρικητού (Chinese hamster ovary) ή σε άλλα ανασυνδυασμένα αντισώματα, ενώ δεν πρέπει να χορηγείται σε έγκυες γυναίκες.

Το Bevacizumab είναι γενικότερα ακριβό φάρμακο, αλλά φθινό σε σχέση με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα, ωστόσο σε ορισμένες χώρες με δημόσια συστήματα υγείας, παρέχεται ένα ποσοστό ασφαλιστικής κάλυψης. Το 2007, οι πωλήσεις του Avastin έφτασαν τα 2.7 δισεκατομμύρια δολάρια [116], ενώ το κόστος της θεραπείας ανά ασθενή μπορεί να φτάσει και τις 100.000 δολάρια κατά έτος, αν και αυτό το κόστος μπορεί να είναι χαμηλότερο σε ασθενείς με επανεμφανιζόμενο γλοιοβλάστωμα, εξαιτίας του μειωμένου χρόνου επιβίωσης αυτών των ασθενών. [117]

Μια μελέτη που διεξήχθη το 2006, έδειξε τη σπουδαιότητα εφαρμογής ενός νέου θεραπευτικού φαρμάκου σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Η σύνθεση του θεραπευτικού μορίου αποτελούνταν από ένα σύμπλεγμα πακλιταξέλης – καρβοπλατίνης, το οποίο προσδέθηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα μπεβασιζουμάμπης (bevacizumab). Το συγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα, γνωστό για τη χρησιμότητα του έναντι του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, του οποίου η εφαρμογή είχε θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου. Τελικά, η προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος στο σύμπλεγμα πακλιταξέλης – καρβοπλατίνης αποτέλεσε

ένα θεραπευτικό φάρμακο με ωφέλιμες επιδράσεις, στην επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, σε σημαντικό βαθμό. [118]

Παράλληλα, μια πιο πρόσφατη μελέτη διευκρίνησε τα αποτελέσματα της εφαρμογής της πακλιταξέλης σε συνδυασμό με βεβασιζουμάμπη (bevacizumab), ως θεραπευτικό φάρμακο έναντι στον καρκίνο του μαστού. Τα τελικά συμπεράσματα δεν υπήρξαν τόσο ενθαρρυντικά, αφού η επισήμανση της πακλιταξέλης με αντίσωμα bevacizumab, παρατείνει μόνο το χρόνο επιβίωσης, αλλά όχι τον συνολικό αριθμό των ασθενών που επιβιώνουν, σε σύγκριση με την εφαρμογή της θεραπείας μόνο με πακλιταξέλη. [95]

Το μονοκλωνικό αντίσωμα bevacizumab, σε συνδυασμό με οξαλιπλατίνα, φθοριουρακίλη και λευκοβορίνη (FOLFOX4), χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η συγκεκριμένη μελέτη διεξήχθη με σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση της Bevacizumab στη διάρκεια επιβίωσης των ασθενών, των οποίων η χημειοθεραπεία είχε ως βάση την οξαλιπλατίνα. Έγινε συγκριτική μελέτη στις ομάδες των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του παχέους εντέρου, χορηγώντας στη μία ομάδα μόνο (FOLFOX4), στην άλλη μόνο Bevacizumab και στην τρίτη συνδυασμό Bevacizumab, με οξαλιπλατίνα, φθοριουρακίλη και λευκοβορίνη (FOLFOX4). Το συμπέρασμα που εξήχθη ήταν πως η προσθήκη του bevacizumab σε οξαλιπλατίνη, φθοριουρακίλη και λευκοβορίνη, βελτιώνει τη διάρκεια επιβίωσης για ασθενείς με προηγούμενη θεραπεία μεταστατικού ορθοκολικού καρκίνου. [119]

Παράλληλα, μία άλλη έρευνα έθεσε τον ίδιο στόχο, την επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνο, χρησιμοποιώντας ως μονοκλωνικό αντίσωμα το bevacizumab. Η διαφορά ήταν ότι συνδύασαν οι ερευνητές το συγκεκριμένο αντίσωμα με φθοριουρακίλη, λευκοβορίνη και ιρινοτεκάνη. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τυχαίες ομάδες και τους χορηγήθηκαν ανεξάρτητα δόσεις bevacizumab σε συνδυασμό με φθοριουρακίλη και λευκοβορίνη και bevacizumab σε συνδυασμό με φθοριουρακίλη και λευκοβορίνη και ιρινοτεκάνη, αντίστοιχα. Το συμπέρασμα που εξήχθη ήταν πως η προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab σε συνδυασμό με

φθοριοουρακίλη και λευκοβορίνη, βελτιώνει τη διάρκεια επιβίωσης, για ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου. [120]

Σε μια παρόμοια έρευνα, μελετήθηκε η συνδυασμένη χορήγηση bevacizumab, με 5-φθοριοουρακίλη, λευκοβορίνη και ιρινοτεκάνη, σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Διαπιστώθηκε ότι η διάρκεια επιβίωσης των ασθενών επιμηκυνόταν μέχρι 5 μήνες, σε σχέση με τη μονοθεραπεία με bevacizumab των ασθενών, αντίστοιχα. Επίσης, η συνδυασμένη χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος με άλλες ουσίες, όπως δοξουριβικίνη, πακλιταξέλη, οδήγησαν σε πρόσθετη ή συνεργιστική αναστολή ανάπτυξης των όγκων. [121]

## 5. Σκοπός της εργασίας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο χαρακτηρισμός νέων ραδιενεργών ανοσοσυμπλεγμάτων του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab με το ραδιονουκλίδιο του  $^{99m}\text{Tc}$  στις οξειδωτικές βαθμίδες I και V. Για το σκοπό αυτό γίνεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του οργανομεταλλικού πυρήνα  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  καθώς και η σύνθεση του ‘‘προ-συμπλόκου’’  $^{99m}\text{Tc}\text{-MDP}$  που θα χρησιμοποιηθεί με κατάλληλα τροποποιημένο αντίσωμα, ώστε να προκύψουν τα δύο επιθυμητά παράγωγα ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων.

Η σύνθεση των προ-συμπλόκων ακολουθείται όπως μέχρι τώρα έχει εφαρμοστεί και αξιολογηθεί με επιτυχία. Η μελέτη και ο χαρακτηρισμός των ραδιοανοσοζευγμάτων γίνεται με SE-HPLC. Τα σύμπλοκα αυτά μελετώνται ως προς τη σταθερότητα τους και *in vitro* καθώς και ως προς την ικανότητα σύνδεσης τους στα καρκινικά κύτταρα πλούσια σε VEGF. Μετά, γίνεται *ex vivo* μελέτη βιοκατανομής σε κατάλληλα πειραματικά μοντέλα. Τέλος, ακολουθεί η *in vivo* σπινθηρογραφική απεικόνιση των παθολογικών πειραματικών μοντέλων με μία πειραματική γ-κάμερα, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή εφαρμογή τους στην διαγνωστική απεικόνιση καρκινικών όγκων που υπερκεφράζουν τον VEGF παράγοντα.

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι κατά τη μελέτη αυτή γίνεται μία συγκριτική αξιολόγηση δύο μεθόδων επισήμανσης του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab (AVASTIN®) με τεχνητίο, ώστε να προκύψει το πιο κατάλληλο ραδιοανοσοσύμπλεγμα που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την καλύτερη διαγνωστική απεικόνιση της σχετιζόμενης με τον VEGF αγγειογένεσης, φαινομένου συνοδού της ογκογένεσης.

## Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## 1. Αντιδραστήρια – Πρώτες ύλες.

Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν χημικώς καθαρά αντιδραστήρια και διαλύτες. Η προμήθεια τους πραγματοποιήθηκε από τις εταιρίες, Sigma Aldrich, Riedel-deHaën, Alpha, Merck, Panreac. Για τις κυτταρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και καλλιεργητικά διαλύματα της εταιρείας Biochrome. Τα φίλτρα διήθησης, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είχαν διάμετρο 0.22 μM και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Millipore.

Πιο αναλυτικά:

- Μονοκλωνικό αντίσωμα bevacizumab Avastin<sup>®</sup>, Roche/Genentech
- Η κυτταρική σειρά M165, τα οποία είναι καρκινικά κύτταρα μαστού MDA MB 231 επιμολυσμένα με τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF165, δωρεά του Ερευνητικού Ινστιτούτου Καρκίνου της Βρετανίας (Cancer Research UK).
- Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στις βιολογικές μελέτες είναι Female athymic SCID mice (μέσος όρος βάρους 20g, 5 εβδομάδων), τα οποία προμηθευτήκαμε από τις εγκαταστάσεις εκτροφής του Ινστιτούτου Βιολογίας του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος".

ΣΗΜ: Το *άθυμο ποντίκι*, όπως υποδηλώνει και το όνομα του, δεν έχει θύμο αδένες, και είναι ομόζυγο για ένα υπολειπόμενο μεταλλαγμένο γονίδιο το οποίο χαρακτηρίζεται ως "nu". Λόγω της απουσίας θύμου αδένες το ποντίκι αυτό δε μπορεί να παράγει ώριμα Τ-λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα να αδυνατεί να ενεργοποιήσει τα περισσότερα είδη της ανοσοαπόκρισης, π.χ. απόρριψη μολυσμένου, καταστροφή κακοηθών και κυττάρων μολυσμένων με ιό. Για το λόγο αυτό στο άθυμο ποντίκι είναι δυνατή η εμφύτευση μολυσμάτων ή κυττάρων που προέρχονται τόσο από άτομο του ίδιου είδους όσο και από άτομο διαφορετικού είδους.

- 2-μερκαπτοαιθανόλη
- Μεθανόλη
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA)
- Όξινο φωσφορικό νάτριο
- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο

- Ανθρακικό νάτριο
- Μονοξειδίο του άνθρακα
- Διαιθυλαιθέρας
- Νατραζίδιο
- Τρυγικό νάτριο
- Νατριοβοριοϋδρίδιο
- Υγρό άζωτο
- Υδροχλωρικό οξύ
- Υδροξείδιο του νατρίου
- Χλωριούχος κασσίτερος
- Χλωριούχο νάτριο
- Αλβουμίνη ορού βοός BSA
- Θρυψίνη

#### **Πλήρες θρεπτικό υλικό**

- Θρεπτικό υλικό DMEM
- Εμβρυϊκός ορός βοός FBS 10%(v/v)
- Πενικιλίνη 10000 Units /ml ανά 10mg/ml
- Στρεπτομυκίνη 100μg/ml
- Γλουταμίνη 1%

#### **Διάλυμα ψύξης 10% DMSO/FBS**

- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Εμβρυϊκός ορός βοός



## 2. Υλικά

- Πήκτη Sephadex G-100
- φίλτρακια Amicon Ultra της Millipore, με κατώφλι διαχωρισμού MW 50000
- Πλακίδια 24 και 96 φρεατίων
- Φιάλες και τριβλία καλλιέργειας κυττάρων
- Αποστειρωμένα μικροσιφόνια ακριβείας
- Αποστειρωμένα σωληνάκια φυγοκέντρου 15ml
- Μικροφυγοκεντρικοί σωλήνες όγκου 1ml (eppendorf)
- VEGF Elisa kit, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA

### 3. Όργανα – Συσκευές.

Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν:

- Γεννήτριες  $^{99}\text{Mo}$  -  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  DRYTEC, της εταιρίας GE Healthcare.
- Οι μετρήσεις του pH των διαλυμάτων έγιναν με pHμετρο, τύπου Metrohm-632, σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Το όργανο ρυθμίζεται πριν και μετά από τις μετρήσεις με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα, σε τιμές pH 7.0 και 4.0.
- Η ραδιενέργεια των διαλυμάτων μετρήθηκε με μετρητή ραδιοϊσοτόπων (Isotope Calibrator) της εταιρείας Capintec. Θάλαμος ιονισμού CRC®-15R
- Η μέτρηση των κρούσεων των ραδιενεργών δειγμάτων, καθώς και των βιολογικών δειγμάτων έγινε σε αναλυτή τύπου φρέατος, με κρύσταλλο NaI (μετρητή ακτινοβολίας-γ πολλαπλών δειγμάτων), τύπου MINAXI 5000 Auto gamma counter της εταιρείας Packard.

Το σύστημα της *RP - HPLC* συνίσταται από:

- Αντλία τύπου 600 Waters με δυνατότητα ροής έως 20 ml/min και εφαρμογή της ως ημιπαρασκευαστικής διάταξης.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος στη χρωματογραφική στήλη (injector UK6) με υποδοχείς δειγμάτων (loop) των 20  $\mu\text{L}$  και των 500 $\mu\text{L}$ .
- Αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης από ανοξείδωτο χάλυβα, διαστάσεων 10 $\mu$ , 4.6X250 mm τύπου Techsil CN (HPLC Technology).
- Ανιχνευτής UV, με τη δυνατότητα ταυτόχρονης καταγραφής φασμάτων σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος (οι ρυθμίσεις είναι στα 220 και στα 254 nm), Dual Absorbance Detector τύπος 2487 της εταιρίας Waters. Ο ανιχνευτής ήταν συνδεδεμένος στην έξοδο της στήλης.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, ο οποίος ελέγχει τη λειτουργία της αντλίας και του ανιχνευτή, ενώ παράλληλα συλλέγει και επεξεργάζεται τα δεδομένα.

- Ανιχνευτή ακτινοβολίας  $\gamma$  GABI - Raytest για την ανίχνευση των ραδιενεργών συστατικών.
- Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με σύστημα διαλυτών, την κινητή φάση Α μεθανόλη / 0.1% τριφθοροξικό οξύ (TFA) και την κινητή φάση Β H<sub>2</sub>O / 0.1% TFA. Οι διαλύτες έκλουσης είχαν υποστεί ειδική επεξεργασία, η οποία περιελάμβανε διήθηση υπό κενό μέσω ειδικών φίλτρων και απαέρωση με διαβίβαση ηλίου υψηλής καθαρότητας.

Το σύστημα της *SE-HPLC* συνίσταται από:

- Αντλία τύπου Waters 600.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος στη χρωματογραφική στήλη (injector UK6), με υποδοχέα δειγμάτων (loop) των 20  $\mu$ L.
- Αναλυτική στήλη διαχωρισμού με βάση το μέγεθος των μορίων (size exclusion) TSK-Gel G-2000SW, 7.8 mm (i.d.) x 30 cm, της εταιρείας Tosohaas.
- Αναλυτική προστήλη TSK-Guard-Colum SWxL SE, της εταιρείας Tosoh Bioscience.
- Ανιχνευτής UV, με τη δυνατότητα ταυτόχρονης καταγραφής φασμάτων σε διαφορετικά μήκη κύματος (οι ρυθμίσεις είναι στα 280 nm), τύπου Waters 996 Photodiode Array Detector.
- Ανιχνευτής Ραδιενέργειας. Ο ανιχνευτής ήταν συνδεδεμένος στην έξοδο της στήλης.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής, ο οποίος ελέγχει τη λειτουργία της αντλίας και του ανιχνευτή, ενώ παράλληλα συλλέγει και επεξεργάζεται τα δεδομένα.
- Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με διαλύτη κινητής φάσης phosphate buffer saline (PBS) του οποίου η σύσταση δίνεται παρακάτω (σελ.82). Οι διαλύτες έκλουσης είχαν υποστεί ειδική επεξεργασία, που περιελάμβανε διήθηση υπό κενό, μέσω ειδικών φίλτρων και απαέρωση με διαβίβαση ηλίου υψηλής καθαρότητας.

- Η συσκευή υπερκάθαρου νερού (ultra pure water) που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Barnstead.
- Οι μετρήσεις στο ορατό και το υπεριώδες φάσμα πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu, UV-1800.
- Οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυγόκεντρο πάγκου Gallenhamp junior centrifuge.
- Οι επώσεις των κυτταρικών καλλιιεργειών έγιναν σε επωαστικό κλίβανο 37°C με παροχή αέρα 95% και CO<sub>2</sub> 5% (CO<sub>2</sub> incubator FORMA) και ο χειρισμός τους σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (Laminar flow), της εταιρίας ELMED.
- Για την παρατήρηση των καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε ανάστροφο μικροσκόπιο (Zeiss).
- Η διατήρηση των κυττάρων σε συνθήκες βαθιάς ψύξης πραγματοποιήθηκε σε δοχείο υγρού N<sub>2</sub> (FORMA).

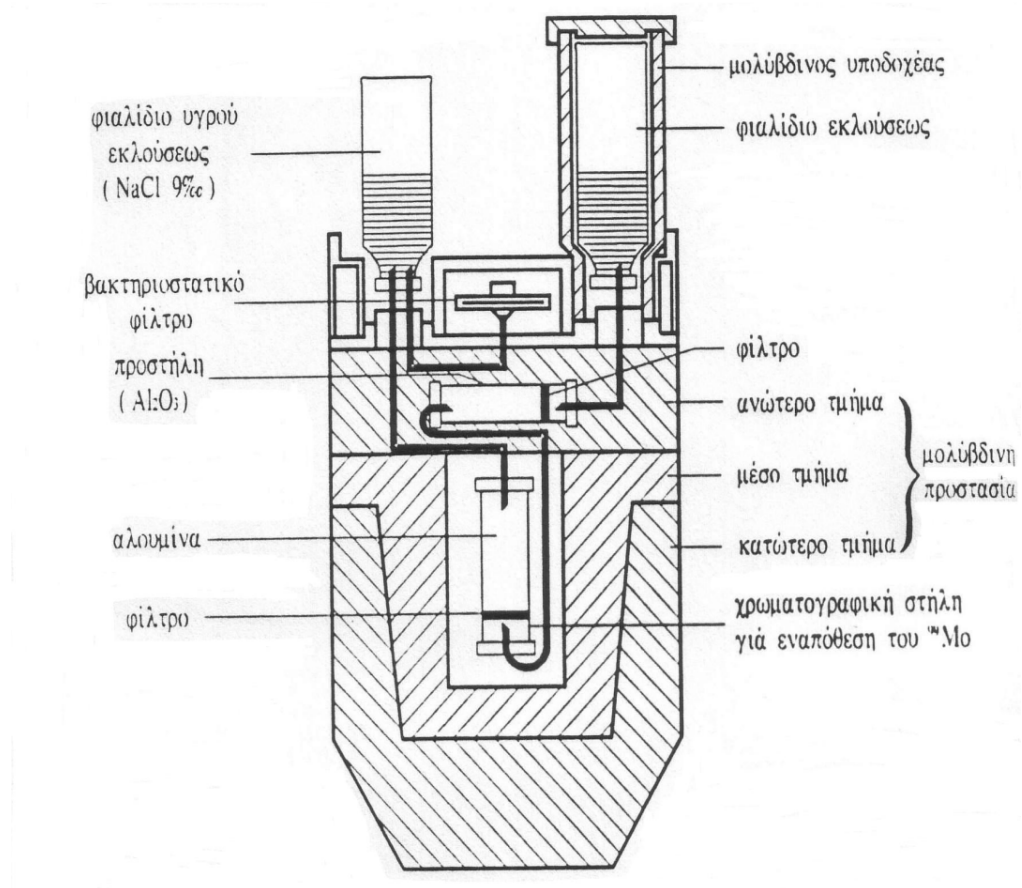
#### 4. Παραγωγή του $^{99m}\text{Tc}$ .

Το  $^{99m}\text{Tc}$  λαμβάνεται σε αποστειρωμένη μορφή από γεννήτριες  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$ . Η γεννήτρια είναι κλειστού τύπου και περιλαμβάνει χρωματογραφική στήλη μικρών διαστάσεων, με προσροφητικό υλικό  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Το  $^{99}\text{Mo}$  βρίσκεται κατάλληλα προσροφημένο στον ιοντοανταλλάκτη υπό την μορφή διαλύματος μολυβδαινικών ανιόντων.

Το  $^{99}\text{Mo}$  κατά τη διάσπαση του παράγει  $^{99m}\text{Tc}$ , το οποίο διαχωρίζεται από το  $^{99}\text{Mo}$  με έκλυση της στήλης, με στείρο διάλυμα φυσιολογικού ορού (0.9%  $\text{NaCl}$ ). Γι' αυτόν το σκοπό, το φιαλίδιο πενικιλίνης που περιέχει το διάλυμα του ορού, φέρεται στο ένα από τα δύο άκρα της γεννήτριας και καρφώνεται σε δύο βελόνες, οι οποίες υπάρχουν στα συγκεκριμένα σημεία. Στο άλλο άκρο, όπου υπάρχει μία βελόνα, τοποθετείται δεύτερο φιαλίδιο, το οποίο είναι σφραγισμένο υπό κενό (φιαλίδιο εκλούσεως).

Η μία από τις δύο βελόνες, οι οποίες βρίσκονται στο πρώτο φιαλίδιο, οδηγεί τον ορό στη χρωματογραφική στήλη, ενώ η άλλη διοχετεύει αέρα, ο οποίος περνά από βακτηριοστατικό φίλτρο, με σκοπό την εξισορρόπηση της ατμοσφαιρικής πίεσης μέσα στο φιαλίδιο. Κατά την έκλυση, το ραδιονουκλίδιο  $^{99m}\text{Tc}$  παραλαμβάνεται εκλεκτικά στο φιαλίδιο έκλυσης, με τη μορφή διαλύματος  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ . Μετά την έκλυση προσδιορίζεται η συνολική ραδιενέργεια του εκλούσματος σε μετρητή ραδιοϊσοτόπων. Στο σχήμα 4.1, απεικονίζεται η πειραματική διάταξη της γεννήτριας.

Οι γεννήτριες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της παραγωγικής διαδικασίας του  $^{99m}\text{Tc}$ , είχαν χρόνο ισχύος περίπου 20 ημέρες, έπειτα από την πρώτη έκλυση. Οι εκλούσεις της γεννήτριας ελάμβαναν χώρα περίπου κάθε 24h.



**Σχήμα 4.1.** Σχηματική παράσταση γεννήτριας <sup>99</sup>Mo-<sup>99m</sup>Tc.

## 5. Επισημάνση του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab με τεχνητό μέσω $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ . $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab.

### 5.1. Σχηματισμός του προσυμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Το προσύμπλοκο  $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  παρασκευάζεται με αναγωγή των ιόντων  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , τα οποία λαμβάνονται από τη γεννήτρια  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$ , με τη μορφή διαλύματος  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ , σε ατμόσφαιρα κορεσμένη με CO.[122]. Για το συγκεκριμένο σκοπό, φέρονται σε φιαλίδιο πενικιλίνης των 10ml, 4mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 20mg τρυγικό νάτριο και 5.5mg  $\text{NaBH}_4$ , τα οποία είναι απαραίτητα για την αναγωγή και την σταθεροποίηση του  $^{99m}\text{Tc}$  στην οξειδωτική βαθμίδα (I). Κατόπιν, το φιαλίδιο σφραγίζεται με πώμα αλουμινίου και στη συνέχεια διαβιβάζεται μέσα του ρεύμα CO για 20min περίπου, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το οξυγόνο και να κορεστεί η ατμόσφαιρα σε CO. Στη συνέχεια προστίθενται 1.5-2.0ml διαλύματος  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  10-50 mCi, με κάθε δυνατή προφύλαξη, έτσι ώστε να μην εισέλθει ατμοσφαιρικός αέρας στο φιαλίδιο, και ακολουθεί ήπια ανάδευση.

Ο σχηματισμός του προσυμπλόκου  $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  γίνεται με θέρμανση του φιαλιδίου στους  $(75-80)^\circ\text{C}$  για 20min. Κατά τη θέρμανση είναι απαραίτητο να τοποθετηθεί στο φιαλίδιο σύριγγα των 20ml, για την εξισορρόπηση της πίεσης, η οποία δημιουργείται από την έκλυση  $\text{H}_2$ . Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να ηρεμήσει, με σκοπό να εξισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min. Το pH του διαλύματος, το οποίο ελέγχεται με πεχάμετρο, βρίσκεται στην περιοχή 9.0-9.5 και ρυθμίζεται με την προσθήκη διαλύματος 1M HCl (100-150μl), σε εύρος τιμών 7.3-7.6. Η ρύθμιση του pH γίνεται με σκοπό την εξουδετέρωση τυχόν περισσειας του αναγωγικού μέσου.

#### 5.1.1 Ραδιοχημικός έλεγχος του προσυμπλόκου.

Ο σχηματισμός του προσυμπλόκου  $[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  ελέγχεται και πιστοποιείται με εφαρμογή της αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC).

Η συγκεκριμένη τεχνική (RP-HPLC), πραγματοποιείται με σύστημα διαλυτών έκλουσης, το οποίο αποτελείται από MeOH/0.1% τριφθοροξικό οξύ (TFA) και H<sub>2</sub>O/0.1%TFA.

<i>Χρόνος (min)</i>	<i>% MeOH/ 0.1%TFA</i>	<i>% H<sub>2</sub>O/ 0.1%TFA</i>
0	5.0	95.0
15.00	95.0	5.0
25.00	95.0	5.0
30.00	5.0	95.0
32.00	5.0	95.0

**Πίνακας 5.1:** Η αναλογία του διαλύτη έκλουσης της RP-HPLC σε κάθε χρονική περίοδο

Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί ειδική επεξεργασία, που περιελάμβανε διήθηση υπό κενό μέσω ειδικών φίλτρων, καθώς και απαέρωση με διαβίβαση ηλίου (He) υψηλής καθαρότητας ή με σύστημα λουτρού υπερήχων. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι ο καθαρισμός της κινητής φάσης από μικροσωματίδια, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την ανάλυση, αλλά και να βλάψουν σοβαρά τη στήλη. Προβλήματα μπορεί να δημιουργήσουν και οι μικροφουσσαλίδες αέρα που παγιδεύονται στους διαλύτες, αφού αυτές που φτάνουν στις αντλίες του οργάνου προκαλούν μεταβολή της ροής της κινητής φάσης, ενώ αυτές που περνούν από τον ανιχνευτή δίνουν ανύπαρκτες κορυφές. Σε αυτό το γεγονός οφείλεται η χρήση του He που έχει ελάχιστη διαλυτότητα στα υγρά με αποτέλεσμα να εξωθεί τον αέρα έξω από την κινητή φάση.

Για την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα εισαγωγής δείγματος του χρωματογράφου (loop), χρησιμοποιείται μικρομετρική σύριγγα των 100μl. Η ποσότητα που ενίεται εξαρτάται από τη ραδιενέργεια του δείγματος και κυμαίνεται από 10 έως 100μl. Η ροή των διαλυτών έκλουσης στη χρωματογραφική στήλη κατά τη διάρκεια της



ανάλυσης ρυθμίζεται σε 1.0ml/min. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται το μίγμα διαλυτών κλιμακωτά μεταβαλλόμενης σύστασης (gradient) που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία.

Εφόσον το προϊόν της έκλουσης διέλθει από τη χρωματογραφική στήλη, διαβιβάζεται από δύο ανιχνευτικές διατάξεις. Καταρχήν, από έναν ανιχνευτή υπεριώδους φωτός (UV) και στη συνέχεια από έναν ανιχνευτή ραδιενέργειας (κρύσταλλος ιωδιούχου νατρίου - NaI). Οι διατάξεις αυτές είναι συνδεδεμένες με ηλεκτρονικό υπολογιστή, με σκοπό τη συλλογή και την περαιτέρω επεξεργασία των λαμβανομένων μετρήσεων. Με τον συγκεκριμένο τρόπο δίνεται η δυνατότητα ταυτόχρονης καταγραφής: α) του ρυθμού μεταβολής των λαμβανόμενων κρούσεων του  $^{99m}\text{Tc}$ , β) της μεταβολής της απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος επιλογής και γ) του φάσματος υπεριώδους-ορατού (190-700) nm. Ακολουθεί η επεξεργασία και η εκτίμηση όλων των πληροφοριών που συλλέχθηκαν από τους ανιχνευτές.

## **5.2. Επισήμανση του αντισώματος με $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3$ .**

Σε 500 μg αντισώματος (20ml του εμπορικά διαθέσιμου Avastin) προσθέτονται 5mCi προσυμπλόκου [ $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$ ]<sup>+</sup> (300-600 μl, ανάλογα με τη συνολική ραδιενέργεια του προσυμπλόκου). Το δείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, υπό ανάδευση για τουλάχιστον 30 λεπτά.

### **5.2.1. Ραδιοχημικός έλεγχος του $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3$ -bevacizumab**

Ο σχηματισμός του συμπλόκου  $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3$ -bevacizumab ελέγχεται και πιστοποιείται με εφαρμογή της αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion– High Performance Liquid Chromatography, SE-HPLC). Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η SEC TSKgel G3000SWx1 της εταιρείας Tosoh Bioscience.

Η SE-HPLC πραγματοποιείται με ισοκρατική έκλυση διαλύτη (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, συγκέντρωσης 0,1M pH=7,4).

<b>Stock solution PBS 1:10</b>	
<b>10.9g άνυδρο Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Διάλυση 1:10
<b>3.2g άνυδρο NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	pH = 7.2
<b>90g NaCl</b>	
<b>Αραίωση μέχρι 1000ml με υπερέκθαρο H<sub>2</sub>O</b>	0.5g/L NaN <sub>3</sub> ως συντηρητικό του διαλύτη.

**Πίνακας 5.2.** Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) που χρησιμοποιείται ως διαλύτης για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Ο διαλύτης έκλουσης είχε υποστεί ειδική επεξεργασία, η οποία περιλάμβανε διήθηση υπό κενό μέσω ειδικών φίλτρων και απαέρωση με διαβίβαση ηλίου (He) υψηλής καθαρότητας. Για την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα εισαγωγής δείγματος του χρωματογράφου (loop), χρησιμοποιείται μικρομετρική σύριγγα των 100μl. Η ποσότητα που ενίεται είναι 20μl. Η ροή του διαλύτη έκλουσης στη χρωματογραφική στήλη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ρυθμίζεται σε 0.8ml/min.

Αφού το προϊόν της έκλουσης διέλθει από τη χρωματογραφική στήλη, διαβιβάζεται από δύο ανιχνευτικές διατάξεις, πρώτα από έναν ανιχνευτή υπεριώδους φωτός (UV-μήκος κύματος  $\lambda=280\text{nm}$ ) και στη συνέχεια από έναν ανιχνευτή ραδιενέργειας (κρύσταλλος ιωδιούχου νατρίου - NaI). Οι διατάξεις είναι συνδεδεμένες με ηλεκτρονικό υπολογιστή, με σκοπό τη συλλογή και την περαιτέρω επεξεργασία των λαμβανομένων μετρήσεων μέσω ειδικού λογισμικού EMPOWER της WATERS.

Με το συγκεκριμένο τρόπο δίνεται η δυνατότητα ταυτόχρονης καταγραφής: α) του ρυθμού μεταβολής των λαμβανόμενων κρούσεων του  $^{99\text{m}}\text{Tc}$   
β) της μεταβολής της απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος επιλογής  
γ) του φάσματος υπεριώδους-ορατού (190-700 nm).

Ακολουθεί η επεξεργασία και η εκτίμηση όλων των πληροφοριών που συλλέχθηκαν από τους ανιχνευτές.

### **5.2.2. Επίδραση χρόνου θέρμανσης στην επισήμανση**

Η αντίδραση μελετάται ως προς το χρόνο που απαιτείται για την επίτευξη της συμπλοκοποίησης του μονοκλωνικού αντισώματος με το προσύμπλοκο και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται για επώαση σε υδατόλουτρο 37°C για χρονικό διάστημα 30min, 1, 4 και 24h. Το ποσοστό επισήμανσης υπολογίζεται με τη βοήθεια της αναλυτικής SE-HPLC.

### **5.2.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος**

Είναι πιθανό η αρχική συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιείται το παράγωγο του αντισώματος να επηρεάζει την απόδοση της επισήμανσης. Για να διαπιστωθεί αυτό, η επισήμανση μελετάται σε σειρά διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ανοσοσυμπλέγματος (προερχόμενες από την ίδια αρχική συγκέντρωση Ab) υπό σταθερές συνθήκες. Η απόδοση της επισήμανσης ελέγχεται με SE-HPLC.

### **5.2.4 Επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης (μCi/μg)**

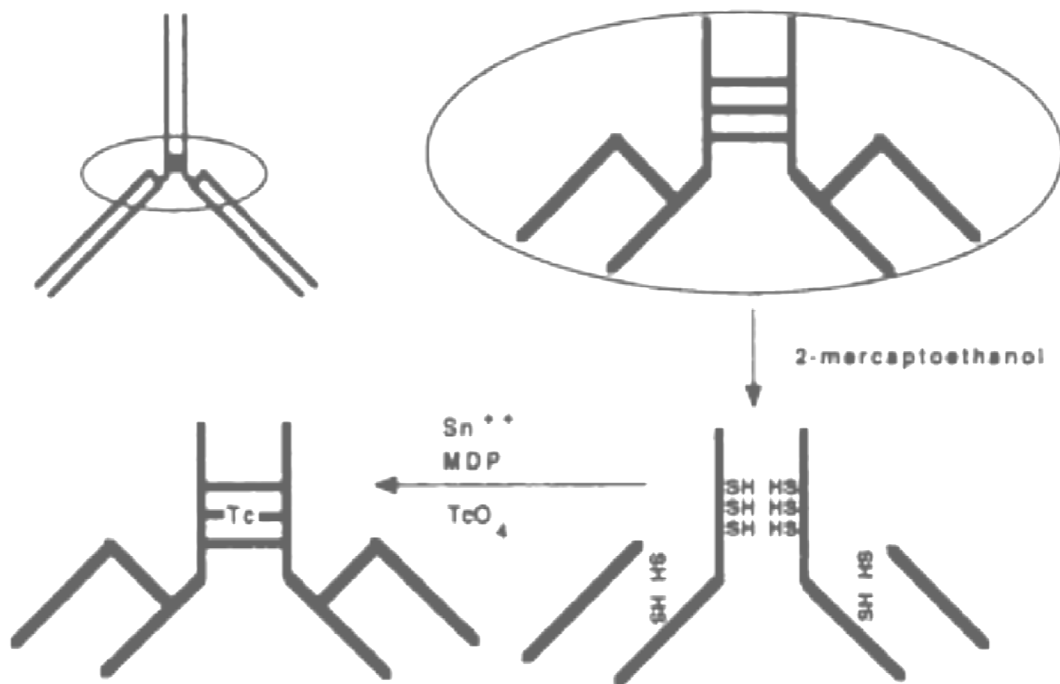
Για να μελετηθεί η επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης, η επισήμανση λαμβάνει χώρα σε διαφορετικά διαλύματα αντισώματος, ίδιας συγκέντρωσης, όπου η ποσότητα της ραδιενέργειας που προστίθεται αυξάνεται από 1,5 σε 5 mCi.

### **5.2.5. Καθαρισμός συμπλόκου.**

Το επισημασμένο ανοσοσύμπλεγμα καθαρίζεται με τη χρησιμοποίηση φίλτρων διήθησης. Το δείγμα μεταφέρεται στα φιλτράκια διήθησης Amicon Ultra, προστίθεται διαλύτης PBS μέχρι όγκου 500μl και φυγοκεντρείται. Η συμπύκνωση του γίνεται μέχρι όγκο 300μl. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3-4 φορές, μέχρι τον πλήρη καθαρισμό του επισημασμένου μορίου από την περίσσεια του προσυμπλόκου [ $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$ ]<sup>+</sup>.

## 6. Επισήμανση του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab με τεχνήτιο μέσω $^{99m}\text{Tc}$ -MDP. $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab

Για την επισήμανση του bevacizumab με Τεχνήτιο-99m στην οξειδωτική βαθμίδα V, απαιτείται η αναγωγή των υπερτεχνητικών ανιόντων  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  από +7 σε +5, καθώς και η μερική αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών του αντισώματος ώστε να προκύψουν ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες  $-\text{SH}$ , στις οποίες θα προσδεθεί το  $^{99m}\text{Tc}$ . Στο σχήμα 5.1, παριστάνεται η διαδικασία επισήμανσης του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab, με  $^{99m}\text{Tc}$  μέσω του MDP (μεθυλενοδιφωσφονικό οξύ).



**Σχήμα 6.1:** Γενικό σχήμα της διαδικασίας επισήμανσης του bevacizumab.

### 6.1 Αναγωγή του Bevacizumab.

Η αναγωγή των ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών του αντισώματος γίνεται με 2-μερκαπτοαιθανόλη, σε πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα (100μl H<sub>2</sub>O: 20μl 2-ME

stock solution). Το εμπορικά διαθέσιμο Avastin (25mg/ml,50μl), αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer saline pH=7.2), σε τελικό όγκο 500μl (τελική συγκέντρωση 2.5mg/ml), ενώ προστίθενται 25μl 2-ME (1000:1 molar ratio). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για επώαση περίπου 30 λεπτών. Αφού έχει γίνει η μερική αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών το δείγμα φορτώνεται σε στήλη Sephadex G-100 (χρωματογραφία διηθήσεως σε πηκτή), κορεσμένη με PBS, με σκοπό τον καθαρισμό του. Ακολουθεί η συλλογή δέκα κλασμάτων του 1ml, με χρήση του PBS ως διαλύτη έκλουσης. Η συγκέντρωση του αντισώματος σε κάθε κλάσμα υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς του αντισώματος ( $y=1.6127x+0.0156$ ) και την ένδειξη της απορρόφησης, η οποία καταγράφεται κατά την φωτομέτρηση των κλασμάτων σε φασματοφωτόμετρο OD, με μήκος κύματος τα 280nm. Η καμπύλη αναφοράς έχει προκύψει από την φωτομέτρηση διαδοχικά αυξανόμενης συγκέντρωσης προτύπων διαλυμάτων bevacizumab σε PBS.

## **6.2 Προετοιμασία προσκευάσματος (kit) MDP**

Για την προετοιμασία διαλύματος kit MDP (5ml), ζυγίζονται ξεχωριστά σε δύο φιαλίδια πενικιλίνης, 7.5mg MDP και 8mg SnCl<sub>2</sub>. Στο φιαλίδιο με τον χλωριούχο κασσίτερο (SnCl<sub>2</sub>), προστίθενται 5-6 σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl και 7.5ml H<sub>2</sub>O, ενώ στο πρώτο φιαλίδιο προστίθενται 4640μl H<sub>2</sub>O και 360μl του παρασκευασθέντος διαλύματος SnCl<sub>2</sub>.

## **6.3. Επισήμανση του τροποποιημένου αντισώματος με <sup>99m</sup>Tc-MDP**

Το μονοκλωνικό αντίσωμα επισημαίνεται μέσω των σουλφυδρυλομάδων που προκύπτουν από την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, με χρήση ενός ενδιάμεσου συμπλόκου που σχηματίζεται κατά την προσθήκη Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> σε διάλυμα αντισώματος που περιέχει MDP παρουσία SnCl<sub>2</sub>, που δρα ως αναγωγικό των υπερτεχνητικών ιόντων.

Σε 1 mL διαλύματος που περιέχει περίπου 500 µg ανηγμένου bevacizumab, προσθέτονται 40 µL MDP και 2-5 mCi [<sup>99m</sup>Tc] pertechnetate. Το διάλυμα επωάζεται για 30 λεπτά, σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, υπό συνεχή ανάδευση.

### **6.3.1 Ραδιοχημικός έλεγχος του <sup>99m</sup>Tc-bevacizumab.**

Ο σχηματισμός του συμπλόκου <sup>99m</sup>Tc-Avastin και η απόδοση της επισήμανσης ελέγχεται με εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion– High Performance Liquid Chromatography, SE-HPLC), όπως περιγράφεται στη παράγραφο 5.2.1

### **6.3.2. Επίδραση χρόνου θέρμανσης στην επισήμανση**

Κατά την επισήμανση του bevacizumab μέσω του προσυμπλόκου <sup>99m</sup>Tc-MDP, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται για επώαση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για χρονικό διάστημα 10, 30, και 60 min για να διαπιστωθεί εάν ο χρόνος επώασης ευνοεί την επισήμανση. Η εξέλιξη της επισήμανσης με τη πάροδο του χρόνου παρατηρείται με αναλυτική SE-HPLC.

### **6.3.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος**

Είναι πιθανό η αρχική συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιείται το παράγωγο του αντισώματος να επηρεάζει την απόδοση της επισήμανσης. Για να διαπιστωθεί αυτό, η επισήμανση μελετάται σε σειρά διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις ανοσοσυμπλέγματος (προερχόμενες από την ίδια αρχική συγκέντρωση Ab) υπό σταθερές συνθήκες επισήμανσης. Η απόδοση της επισήμανσης ελέγχεται με SE-HPLC.

### **6.3.4 Επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης (µCi/µg)**

Για να μελετηθεί η επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης, η επισήμανση λαμβάνει χώρα σε διαφορετικά διαλύματα αναχθέντος αντισώματος, ίδιας συγκέντρωσης, όπου η ποσότητα της ραδιενέργειας που προστίθεται αυξάνεται από 2,5 σε 5 mCi.

### **6.3.5 Καθαρισμός του συμπλόκου**

Από τον ραδιοχημικό έλεγχο του ραδιοανοσοσυμπλέγματος φαίνεται ότι δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμός του συμπλόκου, πράγμα που διευκολύνει τη διαδικασία επισήμανσης του bevacizumab με Τεχνητίο-99m, κατά συνέπεια και ολόκληρη την πειραματική διαδικασία.

## **7. In vitro πειράματα.**

### **7.1 Μελέτες σταθερότητας ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ και $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ .**

#### **7.1.1. Σταθερότητα με τη πάροδο του χρόνου.**

Τα επισημασμένα μόρια μελετήθηκαν ως προς τη σταθερότητα τους στα 30 λεπτά, 2, 4 και 24 ώρες επώασης μετά την επισήμανση τους. Στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Η σταθερότητα τους ελέγχεται με SE-HPLC.

#### **7.1.2. Σταθερότητα σε ανθρώπινο πλάσμα (plasma stability).**

Η επώαση πραγματοποιείται σε αναλογία επισημασμένου αντισώματος προς ανθρώπινο ορό 1:10, στους 37°C για 15 λεπτά, 2, 4 και 24ώρες. Στα διαφορετικά χρονικά σημεία της μελέτης λαμβάνονται 20μl από το δείγμα. Ο έλεγχος της σταθερότητας του επισημασμένου αντισώματος στον ανθρώπινο ορό ελέγχεται με SE-HPLC.

## **7.2 Προσδιορισμός ανοσοδραστικότητας των ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων.**

Μελετάται η ανοσοδραστικότητα των ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων, ώστε να είμαστε βέβαιοι ότι οι παραπάνω περιγραφόμενες μέθοδοι επισήμανσης δεν καθιστούν το αντίσωμα ανενεργό (μη δραστικό).

Η ανοσοδραστικότητα του αντισώματος επισημασμένου με Τεχνήτιο-99m προσδιορίζεται με χρήση δοκιμασίας VEGF ELISA, όπως περιγράφεται από τους Collingridge et al [123]. Εν συντομία, σε πλακίδια ELISA 96 φρεατίων προστέθηκαν 100 μl ανθρώπινο VEGF165 (5 μg/ml, R&D Systems; Oxfordshire, United Kingdom) και ακολούθησε ολονύχτια επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών (bicarbonate coating buffer 15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) στους 4° C. Μετά, τα φρεάτια εκπλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS και 0.1% Tween 80. Τα δύο ανοσοσυμπλέγματα αραιώθηκαν στα 10 ng/ml, προστέθηκαν στα φρεάτια (100 μl)



και αφήθηκαν να δεσμευτούν στο υπάρχον VEGF για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, το μη-δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνθηκε, τα φρεάτια πλύθηκαν τρεις φορές με PBS και 0.1% Tween 80, και το δεσμευμένο αντίσωμα παραλήφθηκε αφού διαλυτοποιήθηκε με 0.2 M NaOH. Η συνολική ραδιενέργεια που προστέθηκε αρχικά στο κάθε φρεάτιο, όπως επίσης και η ραδιενέργεια που αντιστοιχεί στο δεσμευμένο στα φρεάτια αντίσωμα μετρήθηκαν σε μετρητή ακτινοβολίας-γ πολλαπλών δειγμάτων τύπου Minaxi 5500 της εταιρείας Packard. Η ανοσοδραστικότητα προσδιορίστηκε με βάση τον πιο κάτω τύπο:

$$\text{Ανοσοδραστικότητα} = \frac{\text{Κρούσεις δεσμευμένου αντισώματος} \times 100}{\text{συνολικές κρούσεις}}$$

Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

### **7.3 Μελέτη σύνδεσης ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ και $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ σε καρκινικά κύτταρα.**

#### **7.3.1 Καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων.**

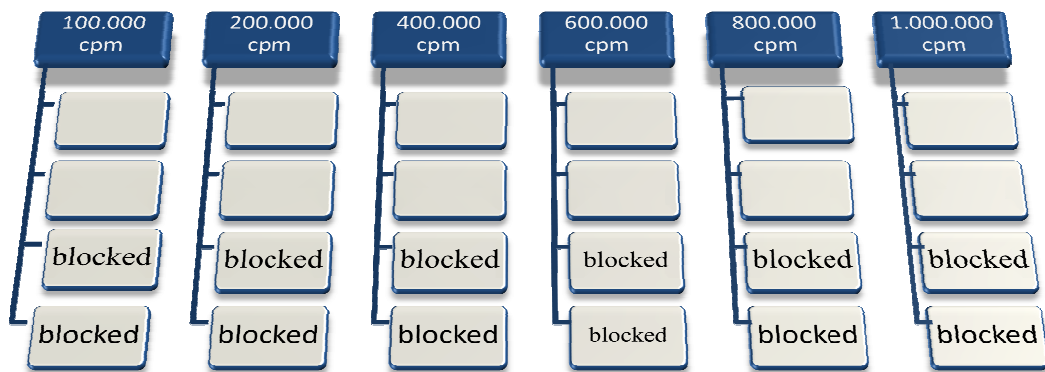
Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα M165. Τα κύτταρα M165 είναι MDA MB 231 καρκινικά κύτταρα μαστού επιμολυσμένα με τον ιό που υπερεκφράζει τον αυξητικό αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα VEGF165 (Cancer Research UK). Ο ιός αναπτύσσεται σε Phoenix κύτταρα, χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο pLXRSpBMN-IRES-GFP. Ο κλώνος VEGF είναι ανθρώπινος. Τα κύτταρα καλλιεργούνται στο ελάχιστο απαραίτητο καλλιεργητικό μέσο, μαζί με 2 mM L-glutamine, παρουσία 10% βοείου εμβρυακού ορού, στους 37°C και σε υγρασία 5% CO<sub>2</sub>, σε κλίβανο.

#### **7.3.2 *In vitro* μελέτη ειδικής σύνδεσης σε καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον αυξητικό παράγοντα VEGF-καμπύλες κορεσμού.**

Για τα πειράματα δέσμευσης κορεσμού ετοιμάστηκε αρχικά διάλυμα  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  και  $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$  με σταθερή συγκέντρωση αντισώματος 500μg. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού αυτού διαλύματος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS τελικού όγκου 1ml και τα διαλύματα που προέκυψαν

(100,000/200,000/400,000/600,000/800,000/1,000,000 cpm-κρούσεις ανά λεπτό) χρησιμοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

Γίνεται σπορά κυττάρων M165 σε πλακίδια 24 φρεατίων (cell/well), 24h πριν γίνει το πείραμα, έτσι ώστε να έχει σχηματιστεί πλήρες ταπήτιο από τα κύτταρα στα φρεάτια, την ημέρα που θα γίνει το προγραμματισμένο πείραμα. Την ημέρα του πειράματος απομακρύνεται το καλλιεργητικό υλικό από τα φρεάτια και προστίθεται φρέσκο. Στη συνέχεια για το προσδιορισμό της μη ειδικής δέσμευσης, τα κύτταρα των 12 φρεατίων επωάζονται για 1h στους 37°C, με μεγάλη περίσσεια ελεύθερου αντισώματος (συγκέντρωση αντισώματος 100 φορές μεγαλύτερη από τη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση του ραδιοεπισημασμένου μορίου). Μετά, σε όλα τα φρεάτια των πλακιδίων προστίθενται 100,000/ 200,000/ 400,000/ 600,000/ 800,000/ 1,000,000 cpm επισημασμένου παραγώγου αντισώματος επί 2 επαναλήψεις (ο συγκεκριμένος αριθμός κρούσεων διατηρείται σταθερός σε όλα τα πειράματα, για να υπάρχει μέτρο σύγκρισης) σχήμα 7.1



**Σχήμα 7.1** Κάτοψη πλακιδίου 24 φρεατίων.

Ακολουθεί επώαση των κυττάρων στους 37°C για 2h. Η επώαση διακόπτεται με απομάκρυνση του καλλιεργητικού υλικού, γίνεται γρήγορη έκπλυση των φρεατίων με παγωμένο PBS και συλλέγεται το υπερκείμενο διάλυμα. Κατόπιν, τα κύτταρα λύνονται με διάλυμα NaOH 1N, μετά από επώαση για περίπου 10min. Ακολουθεί συλλογή του διαλύματος NaOH, το οποίο περιέχει τα διαλυτοποιημένα κύτταρα, σε δοκιμαστικούς σωλήνες και η μέτρηση της ραδιενέργειας του σε μετρητή ακτινοβολίας-γ. Το κάθε πείραμα εκτελείται τρεις φορές.

## **8. In vivo αξιολόγηση ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ και $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ .**

### **8.1. Μελέτη σε πειραματόζωα.**

Τα πειραματόζωα τα οποία χρησιμοποιούνται για τις μελέτες της βιοκατανομής των επισημασμένων προϊόντων είναι λευκοί μύες τύπου SCID, γένους θηλυκού, με μέσο όρο βάρους 20-30g. Πρόκειται για άθυμους μύες τα οποία στερούνται θύμου αδένα και κατά συνέπεια είναι ανοσοκατασταλμένοι, ώστε να αναπτύσσονται ευχερώς πειραματικοί όγκοι με την εμφύτευση κυττάρων. Η προμήθειά τους έγινε από το εκτροφείο πειραματόζωων του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

### **8.2 Ανάπτυξη πειραματικού καρκινικού μοντέλου.**

Για την ανάπτυξη του πειραματικού καρκινικού μοντέλου, γίνεται εμφύτευση ενός πληθυσμού καρκινικών κυττάρων M165 ( $10^7$  κύτταρα σε 100  $\mu\text{L}$  complete medium). Η εμφύτευση πραγματοποιείται υποδόρια, στη μηριαία περιοχή του εμπρός αριστερού ποδιού, αφού το ποντίκι πρώτα έχει ακινητοποιηθεί πλήρως. Αφού εμφυτευτούν τα κύτταρα, τα πειραματόζωα παραμένουν σε ειδικούς στείρους χώρους για περίπου 15 μέρες, μέχρι να αναπτυχθεί ο όγκος. Όταν το μέγεθος του πειραματικού όγκου φθάσει στα 0,05-0,65g τότε διεξάγονται οι μελέτες βιοκατανομής. Η τροφή και το νερό που τους παρέχεται για το συγκεκριμένο διάστημα έχει αποστειρωθεί σε ειδικούς κλιβάνους αποστείρωσης.

### **8.3 Μελέτη Βιοκατανομής ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ και $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ .**

Για τις μελέτες της βιοκατανομής, τα πειραματόζωα χωρίζονται σε τρεις ομάδες των τριών ζώων. Σε κάθε ζώο χορηγείται μια δόση των 100 $\mu\text{l}$  του υπό αξιολόγηση ραδιοανοσοσυμπλέγματος της τάξης των 50 $\mu\text{Ci}/100\mu\text{l}$ . Για την αξιολόγηση της ειδικότητας σύνδεσης των μορίων μέσω του αντισώματος, χορηγείται περίσσεια

bevacizumab στο πειραματόζωο 24 ώρες πριν το πείραμα, ώστε να κατενεμηθεί και να «μπλοκάρει» τις θέσεις δέσμησης του αντισώματος, στην προκειμένη περίπτωση την ισομορφή VEGF165 του αυξητικού παράγοντα VEGF. Την επόμενη μέρα, χορηγούνται τα ραδιοανοσοσυμπλέγματα  $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  και  $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ . Το πειραματόζωο τοποθετείται σε ειδική διάταξη (παγίδα) για ακινητοποίηση. Η χορήγηση του επισημασμένου προϊόντος πραγματοποιείται με ενδοφλέβια ένεση στη φλέβα της ουράς. Σημειώνεται ο χρόνος της χορήγησης και το πειραματόζωο φέρεται σε θάλαμο, όπου συλλέγονται τα απεκκρινόμενα ούρα.

Το πειραματόζωο παραμένει στο θάλαμο για το χρονικό διάστημα που επιλέγεται για τη μελέτη της βιοκατανομής του επισημασμένου προϊόντος. Μετά τη συμπλήρωση του προκαθορισμένου χρόνου, το ζώο θυσιάζεται σε ειδικό θάλαμο κορεσμένο με ατμούς αιθέρα. Τα ζώα της πρώτης ομάδας θυσιάζονται στις 4 ώρες μετά τη χορήγηση και της δεύτερης στις 24 ώρες μετά τη χορήγηση. Τα ζώα στα οποία είχε χορηγηθεί περίσσεια ψυχρού αντισώματος ( τρίτη ομάδα) αφήνονται 24h, και μετά ακολουθεί η χορήγηση του προς εξέταση ραδιοανοσοσυμπλόκου, πριν τη θανάτωση.

Μετά τη θανάτωση σημειώνεται το βάρος του ζώου, αφαιρείται η ουρά και λαμβάνονται δείγματα αίματος σε προζυγισμένους σωλήνες. Στη συνέχεια το ζώο ανατέμνεται και απομονώνονται ήπαρ, καρδιά, νεφρά, στομάχι, έντερα, σπλήνας, πνεύμονες, ουροδόχος κύστη, καθώς και δείγματα από τους μύες. Τα αφαιρεθέντα όργανα και δείγματα των ιστών φέρονται σε προζυγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες και ζυγίζονται. Η ουροδόχος κύστη και τα απεκκριθέντα ούρα τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα χωρίς ζύγιση.

Η ραδιενέργεια των δειγμάτων μετράται σε μετρητή ακτινοβολίας  $\gamma$ , σε σύγκριση με πρότυπο διάλυμα, προκειμένου να προσμετρηθεί η παράμετρος του χρόνου υποδιπλασιασμού του  $^{99m}\text{Tc}$  στον τελικό υπολογισμό. Το πρότυπο διάλυμα αντιστοιχεί στο 1% της χορηγούμενης δόσης. Από τις κρούσεις του διαλύματος αφαιρείται το ποσοστό των κρούσεων της ουράς και η συγκέντρωση της ραδιενέργειας, ανά όργανο και ανά γραμμάριο, υπολογίζεται σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις. Για τον υπολογισμό

της δόσης στο αίμα, τα οστά και τους μύες λαμβάνεται υπόψη ότι αποτελούν το 7%, το 10% και το 43%, αντίστοιχα του βάρους του σώματος του πειραματόζωου.

$$\% \text{ Δόση/όργανο} = \frac{\text{Κρούσεις/min δείγματος} \times \text{βάρος οργάνου}}{\text{Κρούσεις/min προτύπου 1\%} \times \text{βάρος δείγματος}}$$

$$\% \text{ Δόση/g} = \frac{\text{Κρούσεις/min δείγματος}}{\text{Κρούσεις/min προτύπου 1\%} \times \text{βάρος δείγματος}}$$

## 9. Μελέτες απεικόνισης

### 9.1 Περιγραφή απεικονιστικού συστήματος

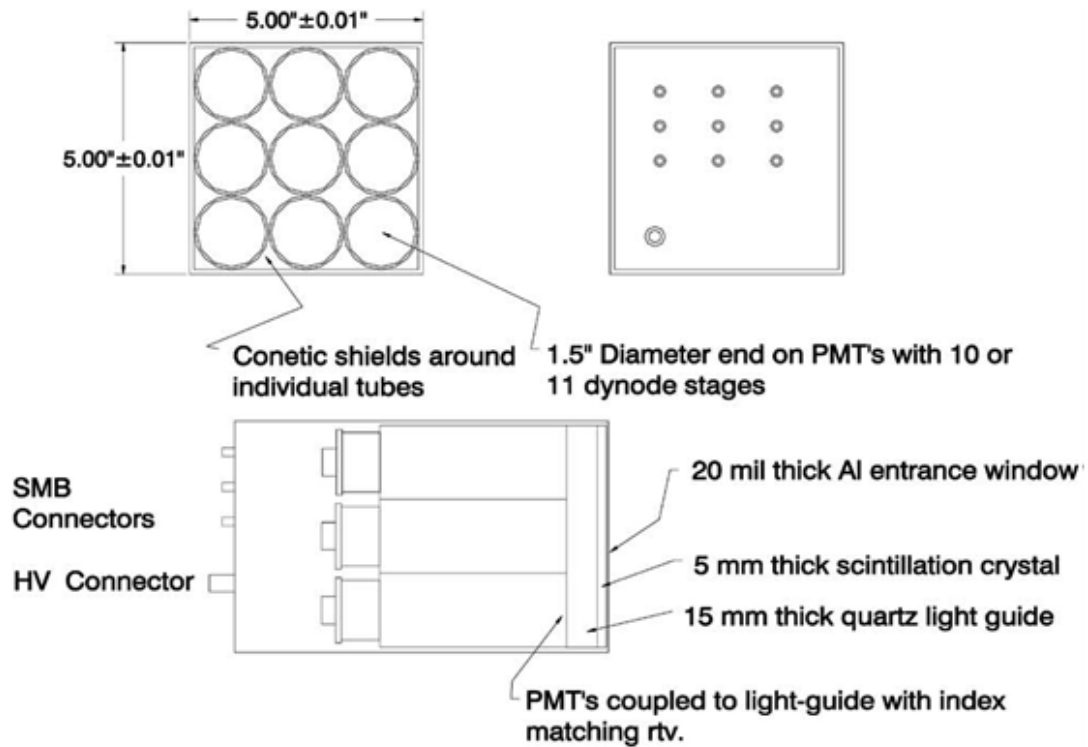
Για την λήψη των σπινθηρογραφικών εικόνων τα πειραματόζωα τοποθετούνται πάνω στη γ-κάμερα. Ο χρόνος συλλογής δεδομένων εξαρτάται από τη χορηγούμενη δόση ακτινοβολίας, ώστε να συλλεχθεί ένας στατιστικά επαρκής αριθμός κρούσεων.

Το απεικονιστικό σύστημα αποτελείται από μία μικρή *γ κάμερα* (τύπου *Anger*) σχεδιασμένη στο Center for Gamma-Ray Imaging του Πανεπιστημίου της Αριζόνα και κατασκευασμένη από την Teledyne Brown Engineering of Huntsville ( Alabama, USA) [124-126]

Η κεφαλή της γ-κάμερας περιλαμβάνει:

- τον κατευθυντήρα,
- τον σπινθηριστή (κρύσταλλο),
- τον φωτοπολλαπλασιαστή και
- τις ηλεκτρονικές διατάξεις.

Ο *κατευθυντήρας* είναι κατασκευασμένος από μόλυβδο και αποτελείται από παράλληλες οπές εξαγωνικών κυψελίδων μεγέθους 1 χιλ. και πάχους 2,7 εκ. Ο *κρύσταλλος* είναι κατασκευασμένος από Ιωδιούχο Νάτριο και ενεργοποιείται με προσμίξεις Θαλλίου [NaI(Tl)]. Είναι ένας συνεχόμενος κρύσταλλος διαστάσεων 12 x 12 εκ<sup>2</sup> και πάχους 5 χιλ. Ο σπινθηριστής, στο εξωτερικό του μέρος, καλύπτεται από λεπτό στρώμα αλουμινίου (*entrance window*) πάχους 0.5 χιλ, για προστασία από την υγρασία. Τον κρύσταλλο διαδέχεται ένας οδηγός φωτός από χαλαζία πάχους 15 χιλ, ο οποίος είναι οπτικά συζευγμένος με μία διάταξη 3x3 Hamamatsu *φωτο-πολλαπλασιαστών*. Η επιφάνεια των φωτοπολλαπλασιαστών είναι κυκλική με διάμετρο ~1.8 εκ. Ο πολλαπλασιασμός των ηλεκτρονίων γίνεται σε ένα σύστημα 10 ή 11 δυνόδων (*dynodes*). Σχεδιάγραμμα της κάμερας παρουσιάζεται στο σχήμα. 9.1.



**Σχήμα 9.1** Σχεδιάγραμμα της γ-κάμερας.

Το σύστημα στεγάζεται σε ανοδιωμένο περίβλημα διαστάσεων 12.7 x 12.7 x 24.7 εκ<sup>3</sup> (βλ. Σχήμα 9.2) το οποίο είναι θωρακισμένο με μόλυβδο πάχους 0,4 χιλ. Οι εννέα φωτοπολλαπλασιαστές τροφοδοτούνται παράλληλα από ένα καλώδιο υψηλής τάσης. Ατομικές SMB (Subminiature έκδοση B) συνδέσεις φέρνουν τα σήματα από τις ανόδους των εννέα φωτοπολλαπλασιαστών σε ένα ηλεκτρονικό σύστημα καταγραφής, ψηφιοποίησης και επεξεργασίας των αναλογικών ηλεκτρονικών σημάτων.





**Σχήμα 9.2** Φωτογραφία της  $\gamma$ -κάμερας χωρίς τον κατευθυντήρα.

## 9.2 Απεικόνιση πειραματοζώων

Όλα τα ζώα φέρουν όγκο στο αριστερό μπροστινό άκρο τους. Μετά την χορήγηση του ραδιοφαρμάκου, τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση (IP) κεταμίνης (75 mg / kg) και ξυλαζίνης (5 mg / kg) και τοποθετήθηκαν πάνω στην κάμερα. Για τα  $^{99m}\text{Tc}$  - bevacizumab και  $^{99m}\text{Tc}$  -  $(\text{CO})_3$ - bevacizumab unblocked ζώα, πραγματοποιήσαμε δυναμική απεικονιστική μελέτη με τη συλλογή 20 δίλεπτων, διαδοχικών, επίπεδων εικόνων, για τα πρώτα 80 λεπτά σε 2ώρες και 24 ώρες μετά τη χορήγηση των ραδιοφαρμάκων. Για να μελετηθεί και η εκλεκτική δέσμευση του αντισώματος και σπινθηρογραφικά, χορηγείται περίσσεια ψυχρού αντισώματος 24 ώρες πριν την απεικόνιση. Την ημέρα της απεικόνισης, χορηγούνται τα ραδιοανοσοσυμπλέγματα και τα ζώα απεικονίζονται τις 2 πρώτες ώρες της απεικόνισης, και μετά από 24 ώρες, για 60 λεπτά, για την απόκτηση μίας εικόνας.

### 9.3 Ανάλυση Εικόνων

Όλες οι εικόνες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό ImageJ [127]. Μια περιοχή-ενδιαφέροντος (ROI) επιλέχθηκε σε κάθε εικόνα στην περιοχή του όγκου (αριστερό μπροστινό άκρο) και ο μέσος αριθμός των κρούσεων ανά εικονοστοιχείο,  $m_{tumor}$ , καταγράφηκε. Ένα δεύτερο ROI παρόμοιου μεγέθους επιλέχθηκε, στην ίδια εικόνα, στο δεξιό μπροστινό άκρο του ζώου όπου δεν υπήρχε όγκος, και ο μέσος αριθμός των κρούσεων ανά εικονοστοιχείο,  $m_{tissue}$ , καταγράφηκε. Οι προαναφερθείσες μέσες τιμές είχαν ήδη διορθωθεί για απόσβεση της ραδιενέργειας, και ο λόγος μεταξύ των μέσων τιμών όγκου και του ιστού προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$R = \frac{m_{tumor}}{m_{tissue}}$$

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για όλες τις εικόνες της δυναμικής αλληλουχίας, καθώς και στις εικόνες που συλλέχτηκαν 24 ώρες μετά την χορήγηση του ραδιοφαρμάκου.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

## 1. $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$

### 1.1 Σχηματισμός και ραδιοχημικός έλεγχος του προσυμπλόκου $[\text{}^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Το προσύμπλοκο  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  σχηματίζεται με προσθήκη διαλύματος  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  σε σφραγισμένο φιαλίδιο κορεσμένο σε ατμόσφαιρα  $\text{CO}$ , όπου υπάρχουν προζυγισμένες ποσότητες  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , τρυγικού νατρίου και  $\text{NaBH}_4$  και θέρμανση. Βρέθηκε ότι το περιεχόμενο των φιαλιδίων παραμένει αναλλοίωτο στη μορφή προσκευάσματος (kit) σε θερμοκρασία δωματίου, για τουλάχιστον ένα μήνα.

Παρατηρείται ότι κατά τη θέρμανση του μίγματος της αντίδρασης για το σχηματισμό του προσυμπλόκου, ελευθερώνεται  $\text{H}_2(\text{g})$ . Η εξισορρόπηση της πίεσης που δημιουργείται εξαιτίας του εκλυόμενου αερίου εξασφαλίζεται με την τοποθέτηση σύριγγας στο φιαλίδιο κατά τη διάρκεια της θέρμανσης.

Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση σχηματισμού του προσυμπλόκου γίνεται ρύθμιση του pH, με διάλυμα  $\text{HCl}$  1N, σε περιοχή ουδέτερη έως ελαφρώς βασική (7.0 - 7.5), με σκοπό την εξουδετέρωση της περισσειας του  $\text{NaBH}_4$ .

Στο τελικό μίγμα της αντίδρασης, το  $^{99m}\text{Tc}$  μπορεί να βρίσκεται είτε με τη μορφή  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  και αριθμό οξειδωσης +1, είτε με τη μορφή  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  και αριθμό οξειδωσης +7, εάν για κάποιο λόγο οι συνθήκες δεν ευνοούν την πλήρη αναγωγή του για το σχηματισμό του προσυμπλόκου.

Ο ραδιοχημικός έλεγχος γίνεται με RP-HPLC, κατά την οποία εκτός από το προσύμπλοκο ελέγχεται και το διάλυμα  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  που χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό του προσυμπλόκου.

Τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης των παραπάνω δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1 όπου δίνονται αναλυτικά οι χρόνοι έκλουσης των ραδιενεργών συστατικών καθώς και τα ποσοστά που αντιστοιχούν σε καθένα από αυτά.

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι οι χρόνοι έκλουσης του υπερτεχνητικού ανιόντος και του προδρόμου συμπλόκου του Tc στην οξειδωτική βαθμίδα (I) διαφέρουν αρκετά, με αποτέλεσμα να μπορεί εύκολα να γίνει ο ποιοτικός διαχωρισμός τους. Συμπεραίνεται επίσης, ότι κατά την έκλουση του δείγματος του  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  το

ποσοστό που αντιστοιχεί στα  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  είναι <4%, άρα ο σχηματισμός του προσυμπλόκου έχει λάβει χώρα σε ποσοστό >96%. [128-133]

Δείγμα	Χρόνος έκλουσης - RT (min)	%
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	3.0	<4
$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$	4.5	>96

**Πίνακας 1.1** Έλεγχος σχηματισμού του προσυμπλόκου με RP-HPLC ανάλυση με μίγμα διαλυτών κλιμακωτά μεταβαλλόμενης σύστασης (gradient) MeOH/0.1%TFA και H<sub>2</sub>O/0.1%TFA.

## 1.2. Σχηματισμός και ραδιοχημικός έλεγχος του επισημασμένου αντισώματος με τεχνητό μέσω $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3$ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab

Το οργανομεταλλικό προσύμπλοκο  $[\text{}^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων ραδιοφαρμάκων στοχευμένης διάγνωσης. Βρίσκει εφαρμογή στην επισήμανση διαφόρων βιομορίων όπως είναι τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες [94, 134]

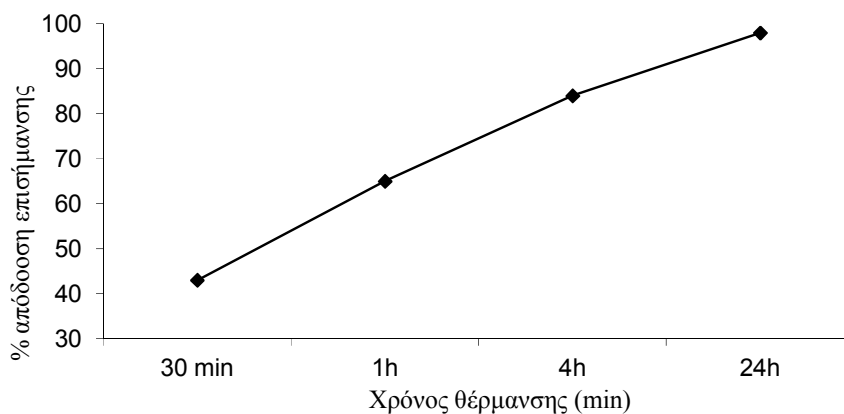
Η επισήμανση του αντισώματος με το προσύμπλοκο γίνεται απ' ευθείας χωρίς τη παρουσία χηλικού υποκαταστάτη συνδεδεμένου με το αντίσωμα. Επίσης το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε χωρίς να υποστεί καμία τροποποίηση στο μόριο του, απλουστεύοντας έτσι τη διαδικασία επισήμανσης του.

Η ακριβής θέση και τρόπος συναρμογής του  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  πυρήνα δεν είναι διευκρινισμένα. Εικάζεται όμως ότι ο μεταλλικός πυρήνας συναρμόζεται κυρίως μέσω των διαθέσιμων ιστιδινών που υπάρχουν στην περιοχή σύνδεσης του αντισώματος με το αντιγόνο (fragment antigen binding region Fab)[94, 135]

Ο σχηματισμός του επισημασμένου αντισώματος λαμβάνει χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.2 μετά τη προσθήκη του προσυμπλόκου  $[\text{}^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ , με επώαση στους 37°C σε υδατόλουτρο.

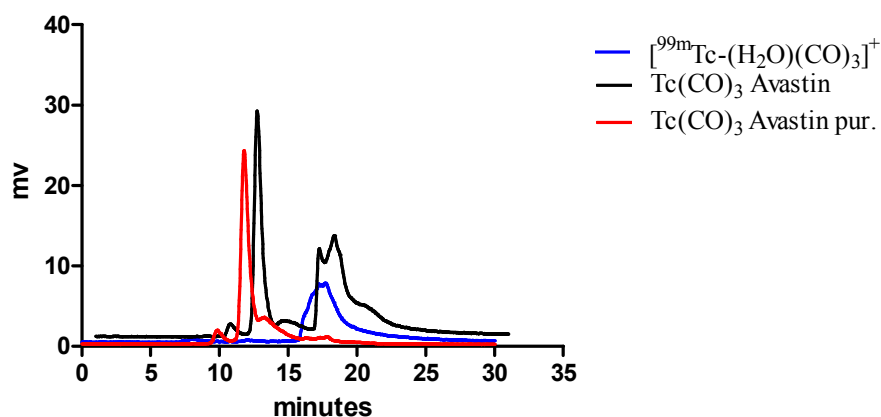
### 1.2.1 Επίδραση χρόνου θέρμανσης στην επισήμανση

Παρατηρείται ότι για τους μικρότερους χρόνους επώασης η επισήμανση δεν είναι ποσοτική, ενώ μετά από 24 ώρες επώασης το ποσοστό επισήμανσης είναι 98% (Σχήμα 1.3). Ενώ η πορεία της αντίδρασης είναι πολύ καλύτερη από αναφερόμενα στη βιβλιογραφία δεδομένα [94], προχωρήσαμε στο καθαρισμό του επισημασμένου αντισώματος με φίλτρα διήθησης Amicon Ultra-2, ώστε να αποφύγουμε την πολύωρη αναμονή και την μεγάλη απώλεια ενεργότητας του  $^{99m}\text{Tc}$  (χρόνος υποδιπλασιασμού  $T_{1/2}=6$  ώρες), καθιστώντας αδύνατον το πειραματισμό σε κύτταρα και ζώα.



**Σχήμα 1.3** Μελέτη επίδρασης του χρόνου στην επισήμανση του αντισώματος με  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ .

Τα φίλτρα φυγοκέντρησης Amicon Ultra-2 δίνουν τη δυνατότητα διαχωρισμού των συστατικών ενός διαλύματος με βάση το μοριακό τους βάρος. Τα συγκεκριμένα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματά μας είχαν όριο διαχωρισμού 50.000 Daltons, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των μικρότερου μοριακού βάρους ενώσεων όπως είναι το  $[\text{}^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  και τη παραλαβή του επισημασμένου αντισώματος μας σε καθαρή μορφή.



**Σχήμα 1.4** Χρωματογραφική αξιολόγηση (SE-HPLC) *A.* προσύμπλοκο  $[^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  *B.* επισημασμένο αντίσωμα πριν τον καθαρισμό (1 ώρα επώαση) *Γ.* επισημασμένο αντίσωμα μετά τον καθαρισμό.

### 1.2.2. Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος

Από τα αποτελέσματα κατά την επισήμανση μέσω προσυμπλόκου  $\text{Tc}-(\text{CO})_3$  συμπεραίνεται ότι το αντίσωμα επισημαίνεται ποσοτικά στις διάφορες συγκεντρώσεις του αντισώματος. Όμως για την διατήρηση των συνθηκών σταθερών και συγκρίσιμων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μετέπειτα, επισημαίνονται 20μL (500μg) εμπορικά διαθέσιμου Avastin.

### 1.2.3. Επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης

Από τη μελέτη αυτή εξάγεται το συμπέρασμα πως η αύξηση του ποσού της ραδιενέργειας που προστίθεται, οδηγεί σε επιτυχή ποσοτική επισήμανση. Ο διπλασιασμός της προστιθέμενης ραδιενέργειας λοιπόν δε φαίνεται να επηρεάζει την επισήμανση, παρά μόνο στην ένταση του σήματος.

Έτσι, όσο μεγαλύτερη ραδιενέργεια χρησιμοποιείται κατά την επισήμανση, τόσο μεγαλύτερη ειδική ραδιενέργεια θα έχει το τελικό δείγμα. Είναι επιθυμητό το επισημασμένο αντίσωμα να είναι υψηλής ειδικής ραδιενέργειας, γιατί έτσι μένουν λιγότερα μόρια μη-επισημασμένου αντισώματος(ψυχρού bevacizumab), και στον τελικό στόχο φτάνουν περισσότερα επισημασμένα μόρια αντισώματος.

## 2. <sup>99m</sup>Tc-bevacizumab

### 2.1. Αναγωγή bevacizumab

Μια μικρή αναγωγική προετοιμασία πρέπει να προηγηθεί για να επιτευχθεί με επιτυχία η επισήμανση του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab με <sup>99m</sup>Tc.

Τα 50μl εμπορικά διαθέσιμου αντισώματος συγκεντρώσεως 25mg/mL αραιώνονται μέχρι 500μl με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS. Σε αυτήν την ποσότητα μονοκλωνικού αντισώματος (1,25mg) γίνεται προσθήκη αναγωγικού 2-μερκαπτοαιθανόλης ώστε να προκύψει μια μοριακή αναλογία 1000:1 (2-ME:αντίσωμα). Η μερκαπτοαιθανόλη φαίνεται να εμποδίζει την επανοξείδωση των ελεύθερων θειολών και θεωρητικά να συμβάλλει έτσι στην επερχόμενη σύμπλεξη με το τεχνήτιο.

Μετά από επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, το αντίσωμα απομονώνεται και καθαρίζεται από στήλη μοριακού αποκλεισμού Sephadex G-100 με διαλύτη έκλουσης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS pH=7.2. Ο καθαρισμός με στήλη Sephadex G-100 δίνει τη δυνατότητα της απομάκρυνσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων που δεν αντέδρασαν, και της παραλαβής του ανηγμένου αντισώματος σε καθαρή μορφή. Συλλέγονται 10 κλάσματα του 1ml, τα οποία φωτομετρούνται σε μήκος κύματος  $\lambda=280\text{nm}$  (πίνακας 2.1). Η συγκέντρωση του αντισώματος σε κάθε κλάσμα υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς του αντισώματος ( $y=1.6127x+0.0156$ ) και την ένδειξη της απορρόφησης, η οποία καταγράφεται κατά την φωτομέτρηση των κλασμάτων σε φασματοφωτόμετρο OD. Η μέγιστη συγκέντρωση αντισώματος παρατηρείται στα κλάσματα 4 και 5 όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.1



Δείγμα (αριθμός κλασμάτων)	Abs (A)(y)	Con (mg/ml)(x)
1	0,018	0,001
2	0,020	0,003
3	0,236	0,137
4	0,865	0,527
5	0,328	0,194
6	0,067	0,032
7	0,028	0,008
8	0,031	0,010
9	0,034	0,011
10	0,036	0,013

**Πίνακας 2.1** Πειραματικές τιμές μετρήσεων απορροφήσεων –συγκεντρώσεων στα δείγματα μετά από τον καθαρισμό, μέσα από στήλη Sephadex-100, του ανηγμένου αντισώματος στα 280nm



**Σχήμα 2.1** Απορρόφιση κλασμάτων ανηγμένου αντισώματος που εκλύονται από τη στήλη Sephadex G-100

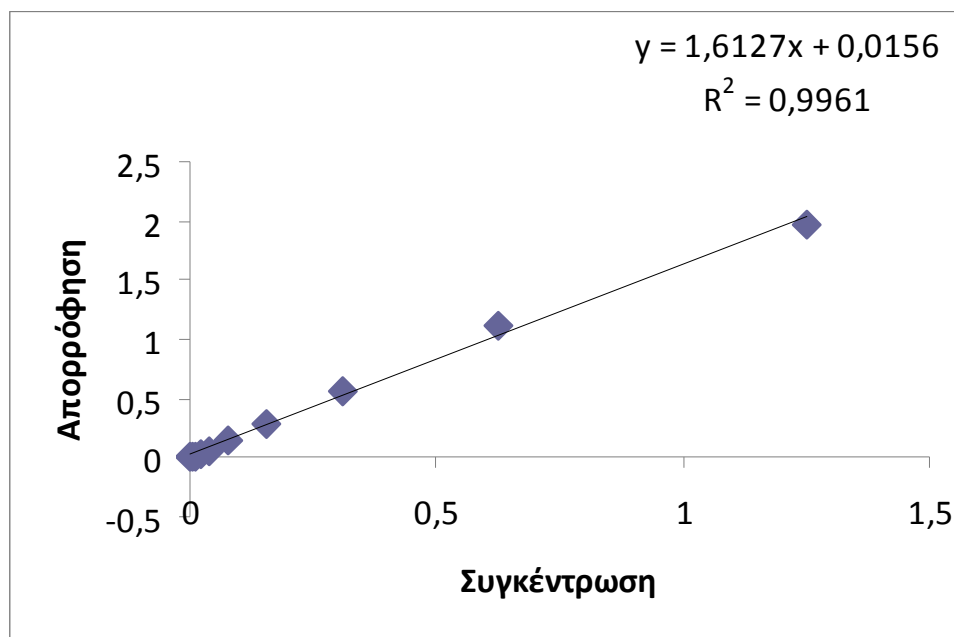
Για τον υπολογισμό της καμπύλης αναφοράς του αντισώματος, βάση της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση του αντισώματος που έχουμε σε κάθε κλάσμα που συλλέγουμε κατά τον καθαρισμό του, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα αντισώματος αυξανόμενης συγκέντρωσης όπως φαίνεται στον πίνακα 2.2.

Δείγμα (αριθμός κλασμάτων)	C (mg/ml)(x)	Abs (A)(y)
1	0,0024	0,002
2	0,0049	0,004
3	0,0098	0,009
4	0,0195	0,025
5	0,0391	0,062
6	0,0781	0,142
7	0,1563	0,296
8	0,3125	0,565
9	0,625	1,107
10	1,25	1,976

**Πίνακας 2.2.** Αποτελέσματα απορρόφησης πρότυπων διαλυμάτων συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος

Τα αποτελέσματα της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος δίνονται στο σχήμα 2.2.

Από τις τιμές του πίνακα 2.1 και την καμπύλη αναφοράς που σχηματίζεται είναι δυνατός ο υπολογισμός της απόδοσης της στήλης, όσον αφορά το ποσοστό του αντισώματος που παραλήφθηκε κατά τον καθαρισμό του. Από τους υπολογισμούς προκύπτει ότι μετά την έκλουση ελήφθησαν 936μg αντισώματος (κλάσματα 1-10), ενώ είχαν τοποθετηθεί στη στήλη Sephadex 1250μg αντισώματος για καθαρισμό. Συνεπώς η απόδοση της στήλης είναι της τάξεως του 75% και θεωρείται ικανοποιητική.



**Σχήμα 2.2.** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς υπολογισμού συγκέντρωσης αντισώματος

## 2.2. Προετοιμασία kit μεθυλενοδιφωσφονικού οξέος (MDP)

Για εξοικονόμηση χρόνου και υλικών ετοιμάστηκε διάλυμα MDP παρουσία αναγωγικών  $\text{SnCl}_2$  σε μεγάλη ποσότητα, το οποίο μοιράστηκε σε φιαλίδια και λυοφιλοποιήθηκε σε επαγγελματική λυοφιλοποιητική συσκευή που διαθέτει το εργαστήριο. Το kit MDP φυλάσσεται στην κατάψυξη στους  $-20^\circ\text{C}$ . Την ημέρα του πειράματος γίνεται ανασύσταση του έτοιμου kit με 5mL υπερκάθρου νερού.

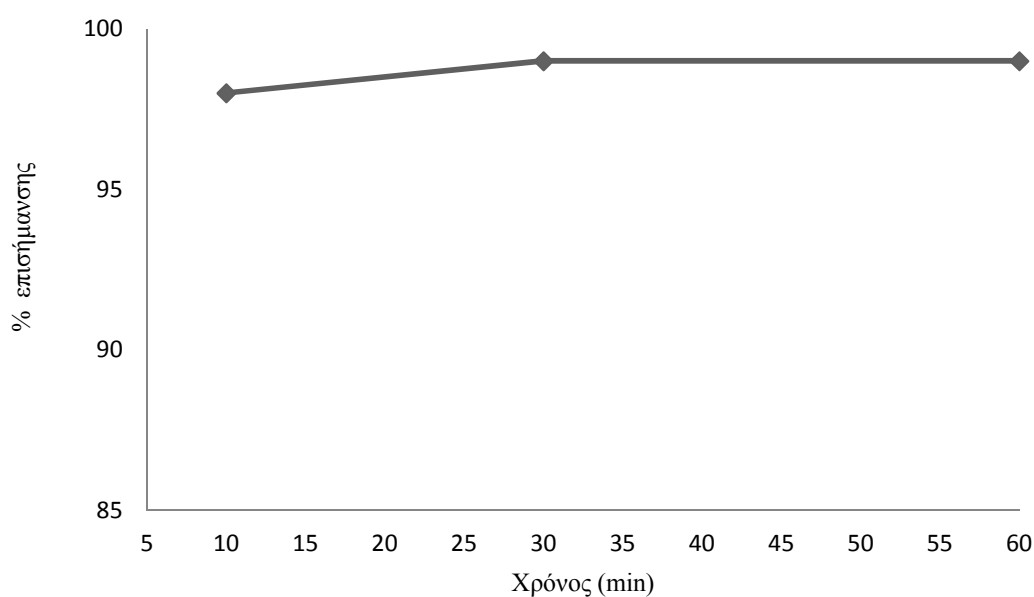
## 2.3. Σχηματισμός και ραδιοχημικός έλεγχος του επισημασμένου αντισώματος με τεχνητίο μέσω $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$ $^{99\text{m}}\text{Tc-bevacizumab}$

Για να είναι δυνατή η επισήμανση του bevacizumab με Τεχνητίο στην οξειδωτική βαθμίδα (V) απαιτείται μερική αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών του αντισώματος ώστε να προκύψουν ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες που φέρουν άτομα-δότες θείου (-S) ικανά να προσδέσουν το  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  που είναι ασθενώς συνδεδεμένο με το MDP.

### 2.3.1. Επίδραση χρόνου θέρμανσης στην επισήμανση

Η επισήμανση μελετάται σε χρόνους επώασης 10, 30 και 60 λεπτών.

Παρατηρείται υψηλό ποσοστό επισήμανσης από το πρώτο δεκάλεπτο της επώασης του bevacizumab παρουσία του προσυμπλόκου  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP. Η γρήγορη επισήμανση με αυτή τη μέθοδο μας διευκολύνει στη διεξαγωγή των υπολοίπων *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων μας.

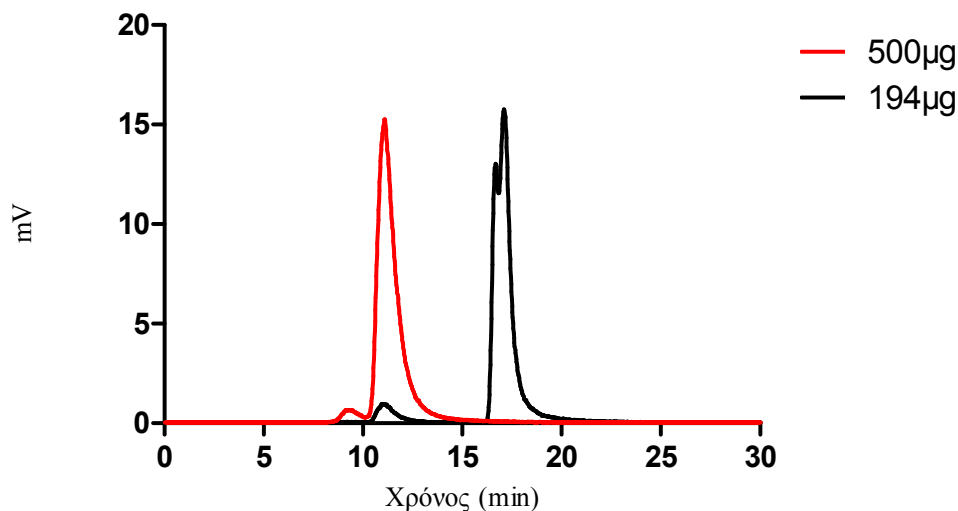


**Σχήμα 2.3** % ποσοστό επισήμανσης bevacizumab παρουσία του συμπλόκου  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP συναρτήσει του χρόνου

### 2.3.2. Επίδραση της συγκέντρωσης του αντισώματος

Από τα αποτελέσματα κατά την επισήμανση μέσω προσυμπλόκου  $\text{Tc}$ -MDP συμπεραίνεται ότι καθώς η συγκέντρωση του αντισώματος αυξάνεται, μεγαλώνει και το ποσοστό επισήμανσης. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιήθηκαν 194μg bevacizumab για την επισήμανση, το ποσοστό της επισήμανσης είναι 8% στα 30 λεπτά ενώ δεν υπερβαίνει το 10% στα 120 λεπτά. Αντίθετα, τα 500μg bevacizumab επισημαίνονται σχεδόν ποσοτικά ακόμα και στα δέκα πρώτα λεπτά χρόνου αντίδρασης.

Άρα σε όλα τα επόμενα πειράματα μας χρησιμοποιήθηκαν περίπου 500μg αναχθέντος bevacizumab ώστε να εξασφαλίζουμε άριστες και σταθερές συνθήκες επισήμανσης για κάθε μέρα πειραματισμού.



**Σχήμα 2.4** Χρωματογραφική αξιολόγηση (SE-HPLC) στα 10 λεπτά επώασης με A:500μg ανηγμένου αντισώματος και B. 194μg ανηγμένου αντισώματος

### 2.3.3. Επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης

Κατά την επισήμανση αυξάνεται η ποσότητα της ραδιενέργειας που προστίθεται, για σταθερή συγκέντρωση αντισώματος και ανοσοσυμπλέγματος, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της ραδιενεργού συγκέντρωσης στην απόδοση.

Από τα αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα πως η μεγάλη αύξηση του ποσού της ραδιενέργειας που προστίθεται, οδηγεί στο ίδιο ποσοστό της επισήμανσης. Ο διπλασιασμός της προστιθέμενης ραδιενέργειας λοιπόν δε φαίνεται να επηρεάζει την επισήμανση.

Ως εκ τούτου όσο μεγαλύτερη ραδιενέργεια χρησιμοποιείται κατά την επισήμανση, τόσο μεγαλύτερη ειδική ραδιενέργεια θα έχει το τελικό δείγμα. Όπως προαναφέρθηκε, είναι επιθυμητό το επισημασμένο αντίσωμα να είναι υψηλής ειδικής ραδιενέργειας, γιατί έτσι μένουν λιγότερα μόρια μη-επισημασμένου αντισώματος (ψυχρού bevacizumab), και στον τελικό στόχο φτάνουν περισσότερα επισημασμένα μόρια αντισώματος.

### 3. *In vitro* πειράματα

#### 3.1. Μελέτες σταθερότητας των ανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ και $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$

Τα δύο επισημασμένα μόριο μελετούνται ως προς τη σταθερότητα τους με την πάροδο του χρόνου και σε ανθρώπινο πλάσμα. Ο έλεγχος της σταθερότητας πραγματοποιείται για τα ραδιοανοσοσυμπλέγματα που λαμβάνονται σε καθαρή μορφή, μετά την επισήμανση όπως περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος 7.1.1 και 7.1.2 αντίστοιχα.

##### 3.1.1. Σταθερότητα με την πάροδο του χρόνου

Τα δύο ραδιενεργά πλέον βιομόρια αφήνονται στο υδατόλουτρο 37°C μετά την επισήμανση και το καθαρισμό τους για 30 λεπτά 2, 4 και 24 ώρες. Η σταθερότητα των ανοσοσυμπλεγμάτων ελέγχεται με SE-HPLC σε αυτά τα χρονικά διαστήματα και τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 3.1 για κάθε ραδιοανοσοσύμπλοκο σε ξεχωριστή στήλη.

Χρόνος μελέτης (ώρες)	% $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-Avastin}$ (καθαρό)	% $^{99m}\text{Tc-MDP-Avastin}$
0 λεπτά	99	100
30 λεπτά	99	100
2 ώρες	98	99
4 ώρες	98	98
24 ώρες	98	98

**Πίνακας 3.1** Μελέτη σταθερότητας του επισημασμένου bevacizumab με  $Tc(I)$  και  $Tc(V)$  σε σχέση με τη πάροδο του χρόνου με SE-HPLC.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας των ραδιοανοσοσυμπλόκων παρατηρείται ότι αυτά είναι πολύ σταθερά με τη πάροδο του χρόνου, αφού η

ραδιοχημική καθαρότητα και των δύο ραδιενεργών μορίων παραμένει πολύ υψηλή ακόμα και 24 ώρες μετά την επισήμανση (~98%). Σε σχέση με το  $^{99m}\text{Tc-MDP-Avastin}$  μπορούμε συμπληρωματικά να πούμε ότι το  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  είναι το κατάλληλο ασθενές ενδιάμεσο προσύμπλοκο που μπορεί να αποδώσει ποσοτικά το  $^{99m}\text{Tc}$  στο ανηγμένο αντίσωμα προς σύμπλεξη. Tc.[87, 136, 137] Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η παρατηρούμενη διάσπαση (~2%) θεωρείται αμελητέα για τις 24 ώρες μετά την επισήμανση.

### 3.1.2. Σταθερότητα σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος

Η σταθερότητα των δύο επισημασμένων παραγώγων μελετάται σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος μετά από επώαση στους 37°C (συνθήκες ανθρώπινου οργανισμού) για 15 λεπτά και 2, 4 και 24 ώρες μετά την επισήμανση.

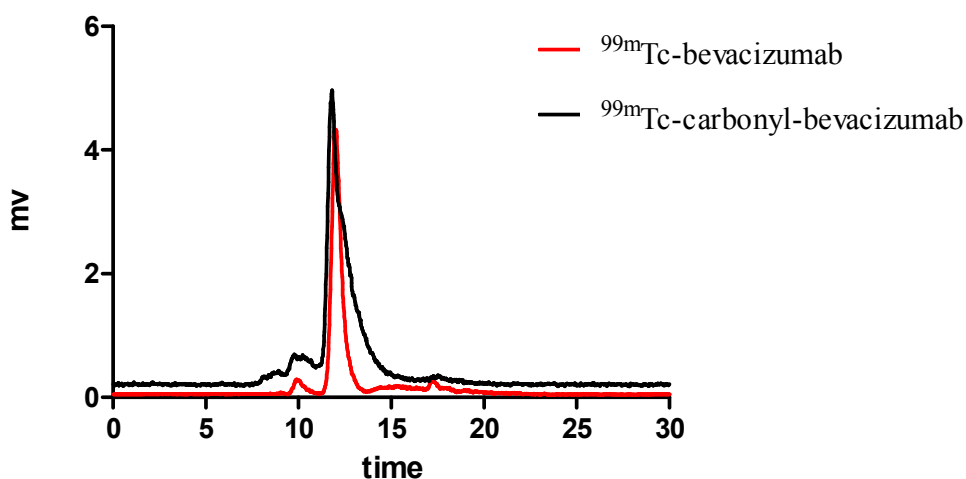
Οι πρωτεΐνες του πλάσματος, λόγω των πολλών ατόμων δοτών για το Tc που περιέχουν, αναμένεται να δράσουν ανταγωνιστικά με αποτέλεσμα τη πιθανή απόσπαση του  $^{99m}\text{Tc}$  από το αντίσωμα[47, 138]. Ο έλεγχος πραγματοποιείται με SE-HPLC. Στον πιο κάτω πίνακα 3.2 δίνονται τα αποτελέσματα της μελέτης

Χρόνος μελέτης (ώρες)	% $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-Avastin}$	% $^{99m}\text{Tc-MDP-Avastin}$
15 λεπτά	100	100
2	100	100
4	100	100
24	100	100

**Πίνακας 3.2** Μελέτη σταθερότητας του επισημασμένου αντισώματος, σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος, με  $^{99m}\text{Tc}$  σε οξειδωτική βαθμίδα I και V.

Εξ' αιτίας του μεγάλου μοριακού μεγέθους αναμένεται οι πρωτεΐνες του πλάσματος να εκλουστούν πρώτες από τη στήλη μοριακού αποκλεισμού και τελευταία

τα μικρότερα σε μέγεθος μόρια όπως τα  $\text{TcO}_4^-$ . Στα χρωματογραφήματα παρατηρούμε την ύπαρξη μιας μεγάλης οξείας κορυφής στα 12 περίπου λεπτά που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος ίδιο με αυτό του επισημασμένου αντισώματος. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τόσο το  $^{99\text{m}}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  όσο και το  $^{99\text{m}}\text{Tc-bevacizumab}$  είναι εξαιρετικά σταθερά παρουσία πλάσματος.

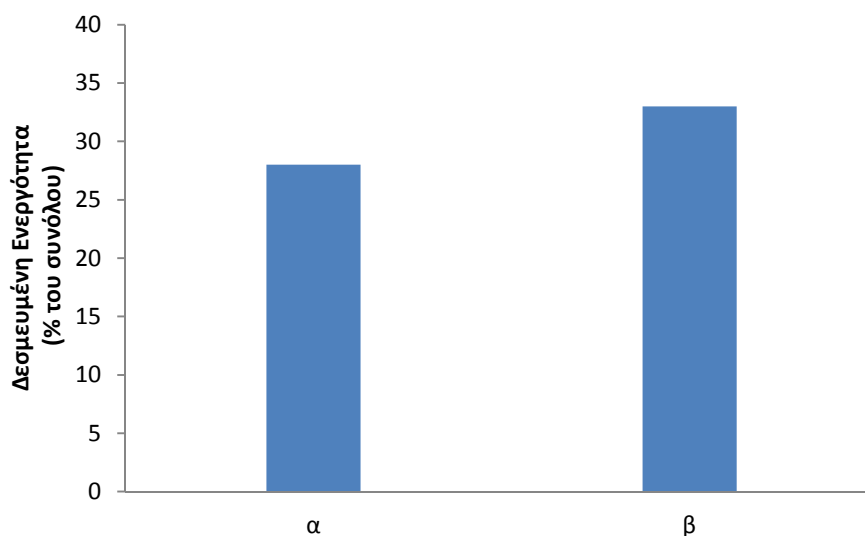


**Σχήμα 3.1:** Χρωματογραφική αξιολόγηση (SE-HPLC) μετά τα 15 λεπτά επώασης σε πλάσμα με *A.*  $^{99\text{m}}\text{Tc-bevacizumab}$  και *B.*  $^{99\text{m}}\text{Tc-carbonyl-bevacizumab}$

### 3.2 Προσδιορισμός ανοσοδραστικότητας των ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων

Η ανοσοδραστικότητα των δύο ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Η μέθοδος αναγωγής των ενδογενών δισουλφιδικών δεσμών έχει σαν αποτέλεσμα τη λίγο μικρότερη βιολογική δραστηριότητα του  $^{99\text{m}}\text{Tc bevacizumab}$  (28%) σε σχέση με το  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  (33%). Γενικά στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι διατήρηση της ανοσοδραστικότητας σε ποσοστά που κυμαίνονται από 20-50% είναι ικανοποιητικά για να θεωρείται το αντίσωμα δραστικό.





**Σχήμα 3.2** Προσδιορισμός ανοσοδραστικότητας του μονοκλωνικού αντισώματος επισημασμένου με  $^{99m}\text{Tc}$ : α.  $^{99m}\text{Tc}$  bevacizumab και β.  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab

### 3.3 Συγκριτική μελέτη ειδικής σύνδεσης των ανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3$ -bevacizumab και $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab σε καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν τον αυξητικό παράγοντα VEGF

Το αντίσωμα bevacizumab κατά την επισημάνση με  $^{99m}\text{Tc}$  υφίσταται σχετική τροποποίηση του μορίου του. Έχει σημασία λοιπόν να διασφαλιστεί ότι το επισημασμένο αντίσωμα διατηρεί την ικανότητα του να συνδέεται στο VEGF παράγοντα που υπερεκφράζεται στα καρκινικά αυτά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό συγκεκριμένος πληθυσμός κυττάρων M-165 επωάζεται με διαφορετικές συγκεντρώσεις ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων. Σε 2 κυτταρικές σειρές από φρεάτια (εις διπλούν) προστίθεται ίσος όγκος από έξι διαλύματα συγκεντρώσεων 100.000/200.000/400.000/600.000/800.000 και 1.000.000 cpm αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 2 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$  εκπλύσεις με PBS και τέλος τα κύτταρα λύνονται με καυστικό νάτριο, ενώ παράλληλα συλλέγεται και το υπερκείμενο υγρό όπως αναλυτικά περιγράφεται στο πειραματικό μέρος.

Η συγκέντρωση του αντισώματος που δεσμεύεται στα κύτταρα (bound) υπολογίζεται από τον αριθμό των κρούσεων που μετράμε στα κύτταρα μετά την λύση με

καυστικό νάτριο. Υπολογίζεται επίσης η αδέσμευτη συγκέντρωση αντισώματος (free). Τα αποτελέσματα δίνονται πιο κάτω. Υπενθυμίζεται ότι στο μίγμα της επώασης το αντίσωμα έχει αραιωθεί σε 1mL. Η αραιώση λαμβάνεται υπόψιν στον υπολογισμό των κρούσεων που απαιτούνται και της συγκέντρωσης που πρέπει να προστεθεί στην καλλιέργεια, για την εκτέλεση του πειράματος

Τα αποτελέσματα εκφράζονται με τη μορφή γραφικής παράστασης:

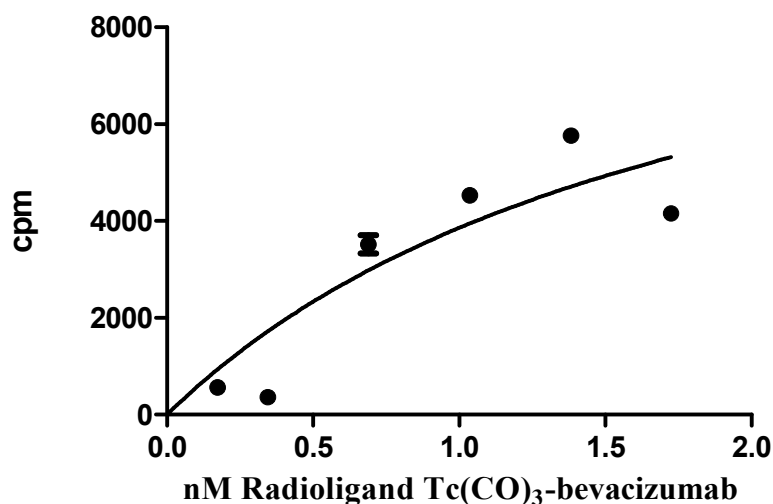
$$Y=B_{max} * X / [K_d + X] \text{ όπου,}$$

X= συγκέντρωση ραδιοεπισημασμένου αντισώματος

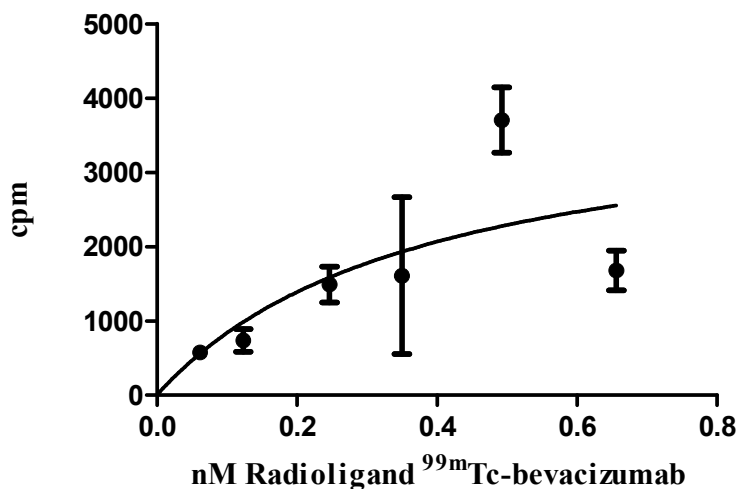
Y= ειδικότητα σύνδεσης

B<sub>max</sub>= η μέγιστη ικανότητα πρόσδεσης σε μονάδες μέτρησης ίδιας με το Y

K<sub>d</sub>= σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης, μονάδες μέτρησης ίδιας με το X. Προσδιορίζει τη συγκέντρωση του ραδιενεργού αντισώματος που απαιτείται για να επιτευχθεί το μισό της μέγιστης ικανότητας πρόσδεσης (half maximum binding) σε ισορροπία.



**Σχήμα 3.3** Καμπύλη κορεσμού του <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-bevacizumab (K<sub>d</sub>=1.89nM) σε M165 κύτταρα καρκίνου μαστού.



**Σχήμα 3.4:** Καμπύλη κορεσμού του  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab ( $K_d=0.38\text{nM}$ ) σε M165 κύτταρα καρκίνου μαστού.

Το εύρος των τιμών της  $K_d$  που πρέπει να έχει ένα αντίσωμα, για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά ως φορέας του ραδιοϊσοτόπου για ραδιοφάρμακο είναι αμφιλεγόμενο. Μελέτες που έγιναν στον παρελθόν, στις οποίες εξετάζεται πως διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την κατανομή ενός αντισώματος σε έναν όγκο αναφέρουν ότι αύξηση της συγγένειας του αντισώματος για τα καρκινικά κύτταρα, δε βελτιώνει κατ'ανάγκη και το αποτέλεσμα. [90, 123]. Η βέλτιστη συγγένεια μπορεί να ποικίλλει από αντίσωμα σε αντίσωμα καθώς εξαρτάται και από τη φύση του αντιγόνου, όπως για παράδειγμα αν το αντιγόνο εντοπίζεται στον όγκο ή εάν μπορεί να εισέλθει και στην κυκλοφορία του αίματος. Η

θα είναι γνωστή μόνο μετά από συνεχή πειράματα *in vitro* και *in vivo* σε μοντέλα πειραματοζώων και ουσιαστικά μετά από κλινικά πειράματα με αντισώματα, τα οποία διαθέτουν ένα εύρος συγγενειών. Το bevacizumab έχει βρεθεί ότι συνδέεται με όλες τις ισομορφές VEGF-A με συγγένεια  $K_d \sim 0.5\text{nM}$  [100]

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μια σειρά παραγόντων, εκτός της συγγένειας, μπορεί να επηρεάσει τη συγκέντρωση του αντισώματος στα καρκινικά κύτταρα μέσα σε ένα οργανισμό. Τέτοιοι παράγοντες είναι η κατανομή και η κάθαρση του

αντισώματος, ο τύπος, το μέγεθος και η αγγείωση του όγκου, η πυκνότητα του αντιγόνου στα καρκινικά κύτταρα, καθώς επίσης και το εάν το αντιγόνο κυκλοφορεί στον οργανισμό. Το πώς επηρεάζουν τέτοιοι παράγοντες τη συγκέντρωση του αντισώματος στον όγκο φαίνεται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο της μελέτης σε πειραματόζωα.

#### 4. Συγκριτική μελέτη βιοκατανομής επισημασμένων αντισωμάτων $^{99m}\text{Tc}$ σε παθολογικούς μύες σε 4 και 24 ώρες.

Η βιοκατανομή των ραδιοεπισημασμένων αντισωμάτων μελετάται σε άθυμους μύες στους οποίους έχει προκληθεί πειραματικός όγκος, μετά από τοπική εμφύτευση κυττάρων M-165. Η ύπαρξη του όγκου καθώς και η έκφραση του αντιγόνου στον οργανισμό είναι πιθανό να επηρεάζουν την κινητική ή την κατανομή του αντισώματος. Για το λόγο αυτό η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων γίνεται συγκριτικά μεταξύ του επισημασμένου αντισώματος με Tc(I) και Tc(V).

Αρχικά η μελέτη πραγματοποιείται σε άθυμους μύες με παρόμοιο μέγεθος όγκου. Οι όγκοι αναπτύχθηκαν για χρονικό διάστημα από 3 έως 5 εβδομάδες. Για τη μελέτη, τα ζώα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, σύμφωνα με το χρονικό διάστημα που μελετήθηκαν μετά την χορήγηση του ραδιοφαρμάκου σε 4 και 24 ώρες μετά την χορήγηση αυτού. Τα αποτελέσματα της βιοκατανομής καταγράφονται στον πίνακα πιο κάτω και παραστατικά στα ιστογράμματα.

##### 4.1. Μελέτη βιοκατανομής του $\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ σε χρονικό διάστημα των 4 και 24 h.

Η μελέτη της βιοκατανομής του  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  γίνεται στο κλάσμα που έχει καθαριστεί με τα φίλτρα Amicon όπως αναλυτικά περιγράφεται στη παράγραφο 5.2.5 και δεν περιέχει καθόλου  $[\text{}^{99m}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ .

Στους άθυμους μύες η ραδιενέργεια στο αίμα βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα από αυτή του όγκου στις 4 ώρες μετά τη χορήγηση. Φαίνεται όμως πως το  $\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  έχει μια πιο παρατεταμένη κυκλοφορία στους άθυμους μύες, εφόσον τα επίπεδα στο αίμα μειώνονται από  $23,18 \pm 4,41\%$  σε  $6,17 \pm 1,41\%$  ID/g για τη χρονική περίοδο 24 ώρες μετά τη χορήγηση.

Γενικά, συγκρίνοντας τα πειραματόζωα σημαντικές διαφορές παρατηρούνται σε χρόνους 4 και 24 ωρών όπου οι τιμές στα πλούσια σε δικτυοενδοθηλιακό σύστημα όργανα και στα νεφρά είναι υψηλότερες σε μικρότερους χρόνους παραμονής του

ραδιοανοσοσυμπλόκου στον οργανισμό ενώ αντίθετα οι τιμές στον όγκο παραμένουν υψηλές και μετά τη πάροδο 24 ωρών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο λόγος όγκος/υγιείς ιστοί να αυξάνεται σημαντικά με τη πάροδο του χρόνου.

<b>Όργανο</b>	<b>4 ώρες</b>	<b>24 ώρες</b>
Αίμα	23.18464 ± 4.407782	6.172151 ± 1.411151
Ήπαρ	14.45926 ± 1.105394	10.57578 ± 1.496312
Καρδιά	9.456743 ± 0.386412	4.277564 ± 0.679429
Νεφρά	17.33214 ± 3.123725	11.85917 ± 3.245441
Στομάχι	5.468741 ± 0.631612	1.119569 ± 0.232423
Έντερα	3.997447 ± 1.244181	1.394369 ± 0.129504
Σπλήνα	6.340798 ± 3.232963	10.73663 ± 4.19849
Μύες	1.342846 ± 0.233216	0.916372 ± 0.102803
Πνεύμονες	11.95233 ± 2.350377	6.757878 ± 0.985656
Πάγκρεας	2.952682 ± 0.036005	2.097993 ± 0.236695
Όγκος	19.72321 ± 4.06669	14.62241 ± 0.855665

**Πίνακας 4.1** Αποτελέσματα βιοκατανομής του  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  σε άθυμους μυσ, εκφραζόμενα ως %δόση ανά γραμμάριο οργάνου με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση ( $\pm\text{SD}$ )

Η παρουσία του ραδιοανοσοσυμπλέγματος αρχικά στους πνεύμονες μπορεί να αποδοθεί στην πνευμονική κυκλοφορία του αίματος στον οργανισμό.

Στα νεφρά η πρόσληψη στις 4 ώρες ανέρχεται στο  $14,33 \pm 3,12\%$  και πέφτει στο  $11,89 \pm 3,24\%$  ID/g στις 24 ώρες μετά τη χορήγηση. Συγκριτικά με άλλους υγιείς ιστούς, το ποσοστό αυτό είναι σημαντικό και αυτό μπορεί να οφείλεται σε ελεύθερες πρωτοταγείς αμινομάδες οι οποίες υπάρχουν στο μόριο και μιμούνται την αμινομάδα τις λυσίνης (παρόμοιο  $pK_a \sim 10.5$ ) Σε φυσιολογικές συνθήκες η αμινομάδα αυτή είναι

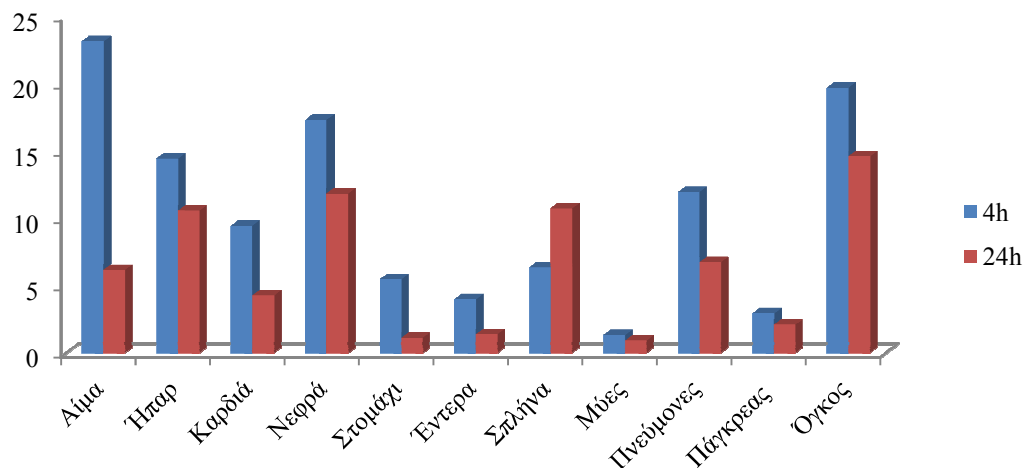
πρωτονιωμένη και έτσι θετικά φορτισμένη. Η επαναπορρόφηση λοιπόν από την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη του εγγύς σωληναρίου των νεφρών αποδίδεται στην εξουδετέρωση του φορτίου και την συσσώρευση στη νεφρική οδό.[129, 139]

Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρόσληψη από το ήπαρ στους άθυμους μύες είναι  $14,46 \pm 1,11$  % ID/g στις 4 ώρες και μειώνεται σε  $10,58 \pm 1,50$  %ID/g στις 24ώρες.

Αν και το μόριο είναι ουδέτερα φορτισμένο παρατηρείται σημαντική πρόσληψη στο ήπαρ συγκριτικά με άλλους υγιείς ιστούς.[129, 139] Σημαντική πρόσληψη εντοπίζονται από το σπλήνα.[139] Παρατηρούμε ότι στο στομάχι έχουμε χαμηλή πρόσληψη Tc(CO)<sub>3</sub>-benvacizumab, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το συμπλοκό μας παραμένει σταθερό, όσον αφορά την επανοξείδωση του προς υπερτεχνητικά, *in vivo*.

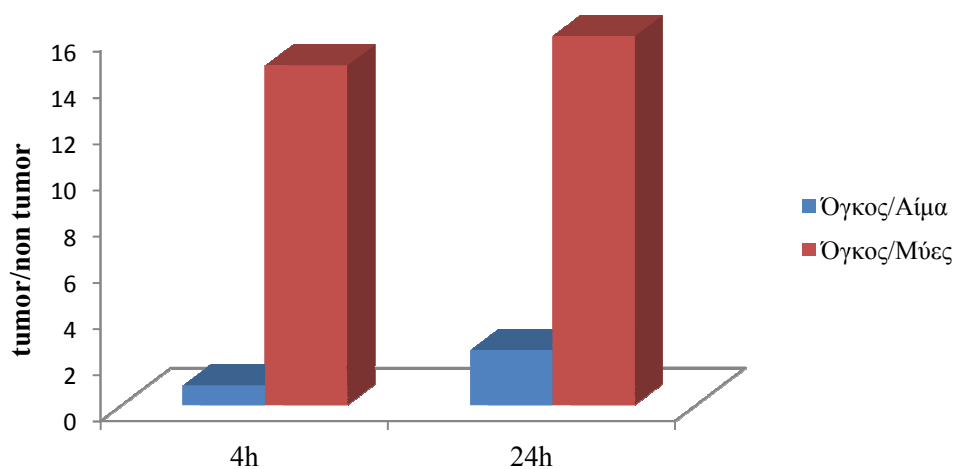
Από τα ποσοστά που βλέπουμε στα νεφρά συμπεραίνουμε ότι το σύμπλοκο απεκκρίνεται σε μικρό μόνο βαθμό από το ηπατοχολικό σύστημα. Σε κάπως μεγαλύτερο βαθμό απεκκρίνεται από το ουροποιητικό σύστημα σε 24h.

Εστιάζοντας στην πρόσληψη από τον όγκο παρατηρείται μικρή μείωση με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η απεικόνιση του σχηματιζόμενου όγκου και στις 24 ώρες μετά την επισήμανση.



**Σχήμα 4.1.** Αποτελέσματα βιοκατανομής Tc-(CO)<sub>3</sub>-Avastin σε άθυμους μύς 4 και 24 ώρες μετά τη χορήγηση, εκφραζόμενα ως % δόση ανά γραμμάριο οργάνου (% ID/g)

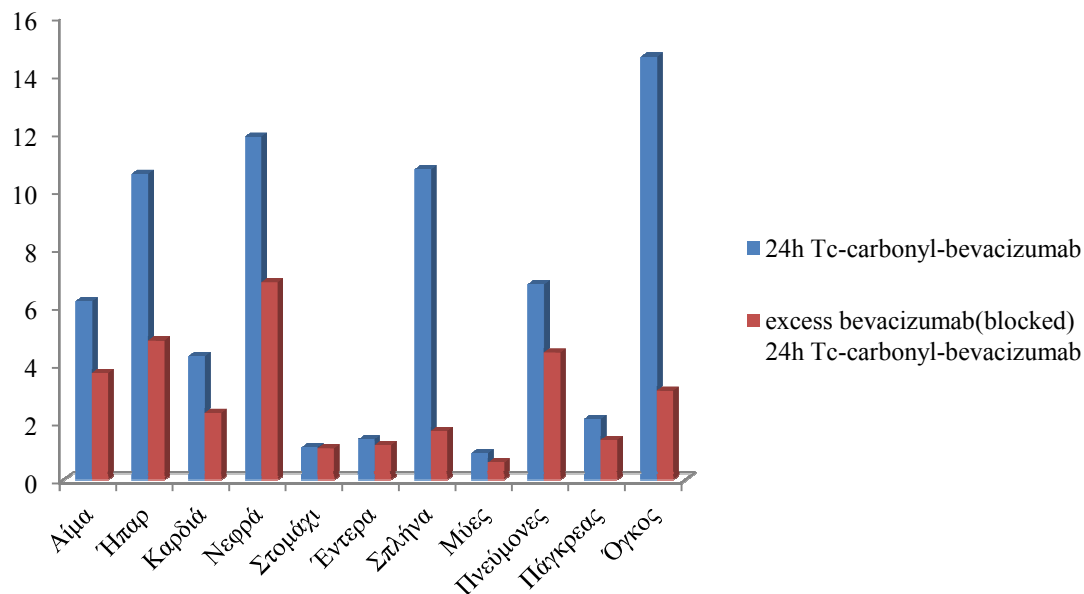
Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι δεν αρκεί πάντα ένα υψηλό ποσοστό καθήλωσης του ραδιοσκευάσματος στον όγκο. Ταυτόχρονα μπορεί να έχουμε υψηλά ποσοστά ραδιοσκευάσματος στο αίμα, λόγω αργού ρυθμού κάθαρσης από την κυκλοφορία. Ως εκ τούτου κρίνεται πιο σημαντικό να υπολογίσουμε, για κάθε ραδιοσκεύασμα ξεχωριστά, το λόγο όγκου/ιστό που είναι ένας καθαρός αριθμός και δίνει τη πραγματική τιμή καθαρής εικόνας απεικόνισης. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους πιο αντικειμενικά. (σχήμα 4.2)



**Σχήμα 4.2:** Αποτελέσματα βιοκατανομής  $Tc-(CO)_3$ -Avastin σε άθυμους μως 4 και 24 ώρες μετά τη χορήγηση, εκφραζόμενα ως ο λόγος όγκος/αίμα και όγκος/μύες.

Η σύνδεση του επισημασμένου μορίου στον όγκο γίνεται μέσω του αντισώματος στο μόριο του ραδιοανοσοσυμπλέγματος, χάριν της υψηλής συγγένειας του bevacizumab με το παράγοντα VEGF που υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η ειδικότητα σύνδεσης του αντισώματος με την ισομορφή 165 του VEGF (VEGF-165) προσδιορίζεται όπως έχει αναλυτικά περιγραφεί στη παράγραφο 8.3 Κατά τη χορήγηση περίσσειας bevacizumab, πριν τη χορήγηση του επισημασμένου μορίου  $^{99m}Tc$ -carbonyl-bevacizumab, παρατηρείται σημαντική μείωση στην πρόσληψη του ραδιοανοσοσυμπλόκου όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.3. Οι θέσεις πρόσδεσης για το επισημασμένο μόριο έχουν καταληφθεί από το ψυχρό bevacizumab αποδεικνύοντας έτσι την ειδικότητα σύνδεσης του επισημασμένου μονοκλωνικού αντισώματος.





**Σχήμα 4.3.** Συγκριτικά αποτελέσματα βιοκατανομής  $Tc-(CO)_3$ -Avastin σε άθυμους μύς στις 24 ώρες, χωρίς και με τη χορήγηση περίσσειας bevacizumab, εκφραζόμενα ως % δόση ανά γραμμάριο

Στο Σχήμα 4.3 παρατηρούνται αυξημένες τιμές του επισημασμένου αντισώματος στο αίμα, ήπαρ και πνεύμονες για τα blocked ζώα, και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κυκλοφορεί περισσότερο ραδιοανοσοσύμπλεγμα ελεύθερο, αφού οι θέσεις δέσμησης που υπάρχουν στον όγκο έχουν καταληφθεί από το ψυχρό αντίσωμα. Οπότε, το «περισσευόμενο» ραδιοανοσοσύμπλεγμα κυκλοφορεί και ανακατανέμεται στους ιστούς και στα όργανα [123]

#### 4.2. Μελέτη βιοκατανομής του <sup>99m</sup>Tc-bevacizumab σε χρονικό διάστημα των 4 και 24 h.

Δίνεται ο πίνακας με τα αναλυτικά αποτελέσματα κρούσεων ανά όργανο και στη συνέχεια το ραβδόγραμμα που αναπαριστά τα ποσοστά αυτά στις 3 χρονικές περιόδους. Η μελέτη της βιοκατανομής του <sup>99m</sup>Tc-bevacizumab γίνεται στο κλάσμα που δε περιέχει καθόλου <sup>99m</sup>Tc-MDP (παράγραφος 6.3.5).

Όργανο	4 ώρες			24 ώρες		
Αίμα	26.82641	±	1.109237	3.507215	±	0.547141
Ήπαρ	9.524782	±	2.15421	1.408672	±	0.171298
Καρδιά	5.132539	±	3.899153	1.301136	±	0.234082
Νεφρά	18.12927	±	2.954495	10.02101	±	2.891365
Στομάχι	4.269469	±	0.740614	0.810589	±	0.243888
Έντερα	2.833904	±	0.605402	0.82366	±	0.151019
Σπλήνα	11.27449	±	5.328618	2.089149	±	0.213624
Μύες	1.984471	±	0.367306	0.282984	±	0.016922
Πνεύμονες	10.99571	±	1.721816	1.773307	±	0.19311
Πάγκρεας	2.155814	±	0.257403	0.517546	±	0.0953
Όγκος	18.54571	±	10.44255	10.28199	±	0.678077

**Πίνακας 2.6.** Αποτελέσματα βιοκατανομής του <sup>99m</sup>Tc-bevacizumab σε άθυμους μύες, εκφραζόμενα ως %δόση ανά γραμμάριο οργάνου με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση ( $\pm SD$ )

Στους άθυμους μύες η ραδιενέργεια στο αίμα βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα με αυτή του όγκου για 4 ώρες μετά τη χορήγηση. Φαίνεται όμως πως το <sup>99m</sup>Tc-bevacizumab έχει μια πιο παρατεταμένη κυκλοφορία στους άθυμους μύες, εφόσον τα επίπεδα στο αίμα μειώνονται από  $26,83 \pm 1,1$  % σε  $3,51 \pm 0,55$  % ID/g στις 24 ώρες μετά τη χορήγηση.

Γενικά, συγκρίνοντας τα πειραματόζωα σε διάφορες χρονικές στιγμές σημαντικές διαφορές παρατηρούνται σε χρόνους 4 και 24 ωρών όπου οι τιμές στα πλούσια σε δικτυοενδοθηλιακό σύστημα όργανα και στα νεφρά είναι υψηλότερες σε μικρότερους χρόνους παραμονής του ραδιοανοσοσυμπλόκου στον οργανισμό σε σχέση με τις 24 ώρες μετά τη χορήγηση ενώ αντίθετα οι τιμές στον όγκο μειώνονται μεν αλλά παραμένουν αρκετά υψηλές και μετά τη πάροδο 24 ωρών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο λόγος όγκος/υγιείς ιστοί να αυξάνεται σημαντικά με τη πάροδο του χρόνου.

Η μελέτη της βιοκατανομής του  $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$  γίνεται στο κλάσμα που παίρνεται κατ'ευθείαν από την επισήμανση αφού είναι ποσοτική η επισήμανση και δε χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό (παράγραφος 6.3.5)

Η παρουσία του ραδιοανοσοσυμπλέγματος αρχικά στους πνεύμονες και τη καρδιά μπορεί να αποδοθεί τόσο στην πνευμονική όσο και στη μικρή κυκλοφορία του αίματος στον οργανισμό.

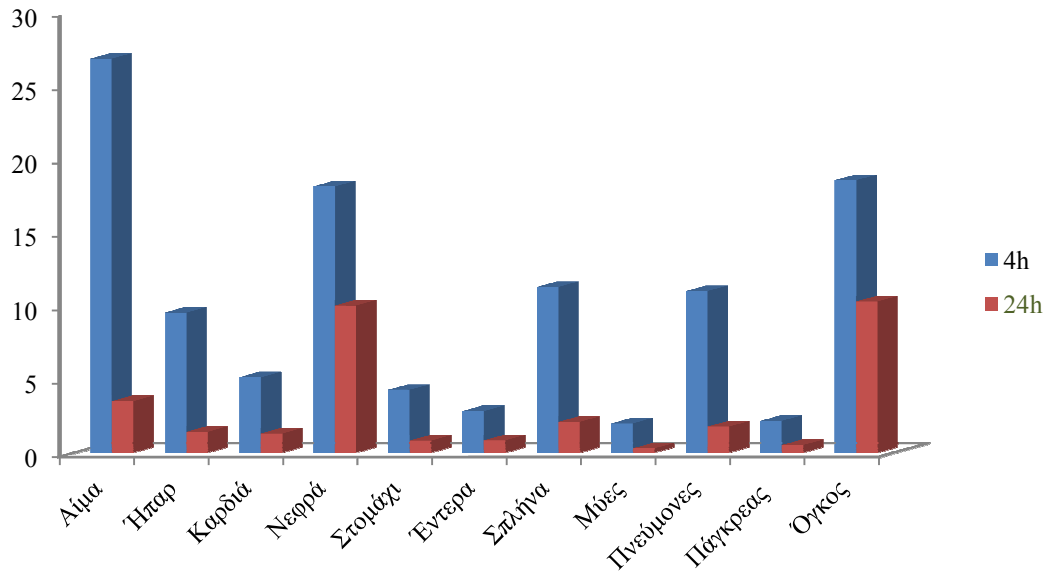
Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρόσληψη από το ήπαρ στους άθυμους μύες είναι  $9,53 \pm 2,15$  % ID/g στις 4 ώρες και μειώνεται σε  $1,41 \pm 0,17$  %ID/g στις 24ώρες.

Στα νεφρά η πρόσληψη στις 4 ώρες ανέρχεται στο  $18,13 \pm 2,96$ % και πέφτει στο  $10,02 \pm 2,89$  % ID/g στις 24 ώρες μετά τη χορήγηση.

Παρατηρούμε ότι στο στομάχι έχουμε χαμηλή πρόσληψη  $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ , γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το συμπλοκό μας παραμένει σταθερό, όσον αφορά την επανοξείδωση του προς υπερτεχνητικά, *in vivo*.

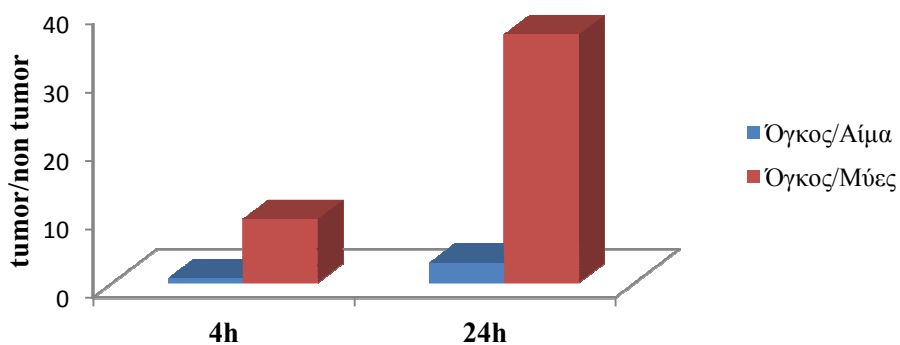
Από τα ποσοστά που βλέπουμε στα νεφρά συμπεραίνουμε ότι το σύμπλοκο απεκρίνεται σε μικρό μόνο βαθμό από το ηπατοχολικό σύστημα.. Σε μεγαλύτερο βαθμό απεκκρίνεται από το ουροποιητικό σύστημα.

Εστιάζοντας στην πρόσληψη από τον όγκο παρατηρείται μικρή μείωση με τη πάροδο του χρόνου ( $18,55 \pm 10,44$ %ID/g αρχικά και  $10,28 \pm 0,68$ %ID/g μετά από 24 ώρες) με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η απεικόνιση του όγκου 24 ώρες μετά την επισήμανση.



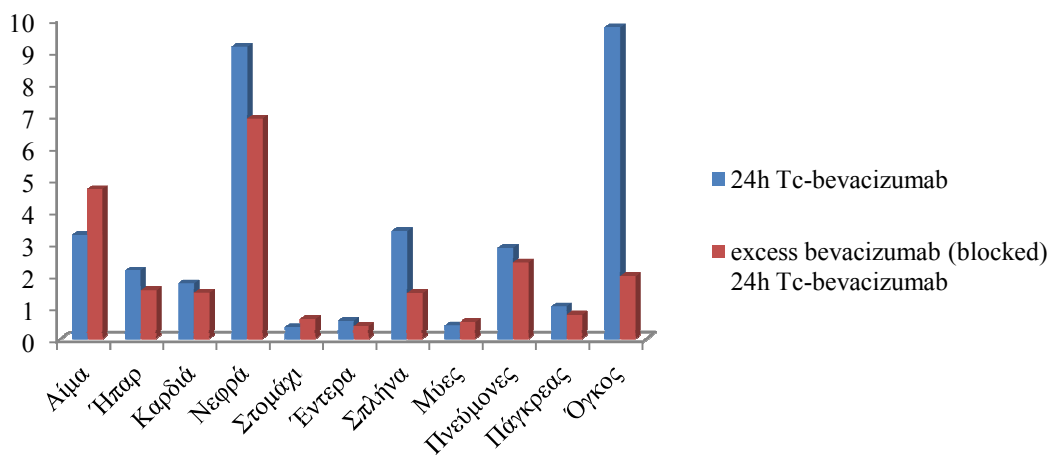
**Σχήμα 4.4.** Αποτελέσματα βιοκατανομής Tc-MDP-Avastin σε άθιμους μως 4 και 24 ώρες μετά τη χορήγηση, εκφραζόμενα ως % δόση ανά γραμμάριο οργάνου (% ID/g)

Όπως και πριν σημειώνεται ότι δεν αρκεί πάντα υψηλό ποσοστό στον όγκο γιατί έχουμε και τη κυκλοφορία του bevacizumab στο αίμα που θεωρείται ως background. Είναι λοιπόν πιο σημαντικό να συγκρίνουμε το λόγο όγκου/ιστό που είναι ένας καθαρός αριθμός και δίνει τη πραγματική τιμή καθαρής εικόνας απεικόνισης.



**Σχήμα 4.5:** Αποτελέσματα βιοκατανομής Tc-Avastin σε άθιμους μως 4 και 24 ώρες μετά τη χορήγηση, εκφραζόμενα ως ο λόγος όγκος/αίμα και όγκος/μύες αντίστοιχα

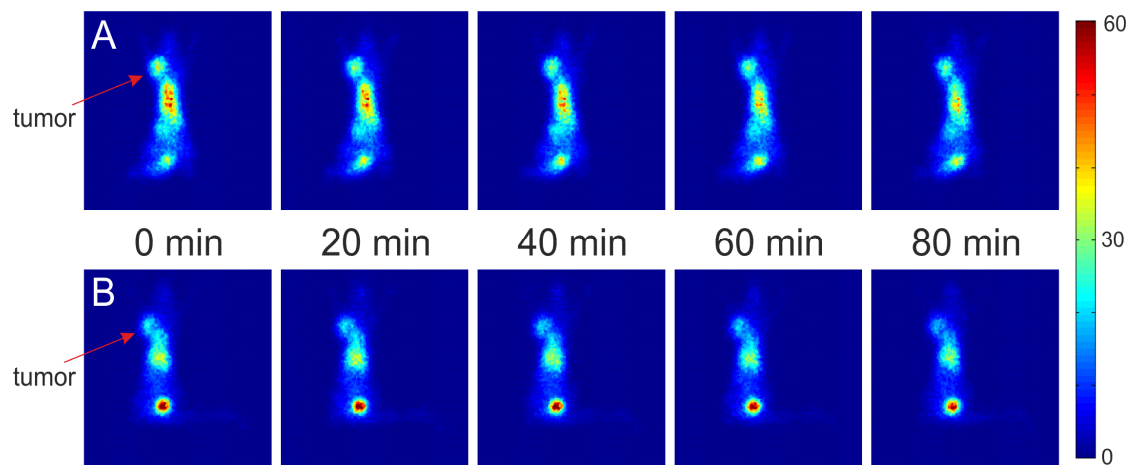
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, χορηγήθηκε περίσσεια bevacizumab για να διαπιστωθεί η ειδικότητα σύνδεσης του αντισώματος με την ισομορφή 165 του VEGF (VEGF-165). Και εδώ παρατηρείται σημαντική μείωση στην πρόσληψη του ραδιοανοσοσυμπλόκου, όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.6., ειδικότερα στη περιοχή του όγκου. Οι θέσεις πρόσδεσης για το επισημασμένο μόριο έχουν καταληφθεί από το ψυχρό bevacizumab αποδεικνύοντας έτσι, την ειδικότητα σύνδεσης του επισημασμένου μορίου μέσω του μονοκλωνικού αντισώματος.



**Σχήμα 4.6** Συγκριτικά αποτελέσματα βιοκατανομής Tc-MDP-Avastin σε άθυμους μύες στις 24 ώρες, χωρίς και με τη χορήγηση περίσσειας bevacizumab , εκφραζόμενα ως % δόση ανά γραμμάριο

## 5. Μελέτες απεικόνισης των ανοσοσυμπλεγμάτων $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$ και $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$

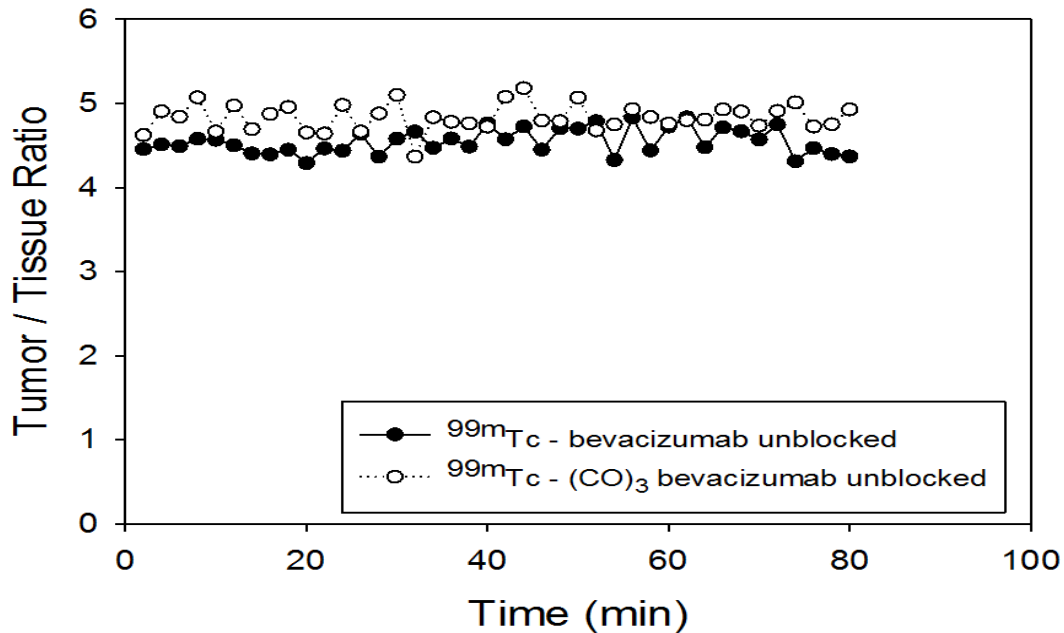
Σπινθηρογραφικές δυναμικές απεικονίσεις άθυμων μυών πραγματοποιήθηκαν με γ-κάμερα αμέσως μετά τη χορήγηση των ανοσοσυμπλεγμάτων  $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  και  $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$ . Οι απεικονίσεις δίνονται στο σχήμα 5.1 για τα πρώτα 80 λεπτά μετά τη χορήγηση των δύο ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων.



**Σχήμα 5.1:** Σπινθηρογραφική απεικόνιση με γ-κάμερα άθυμων μυών με όγκο αμέσως μετά τη χορήγηση με Α.  $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$  και Β.  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$

Διαπιστώνεται πως ο όγκος μπορεί να γίνει ορατός σχεδόν αμέσως μετά τη χορήγηση. Σε αυτό το χρονικό διάστημα παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση ραδιενέργειας που οφείλεται στη διάχυτη ραδιενέργεια τόσο στο σημείο χορήγησης όσο και στο αίμα (υψηλό background).

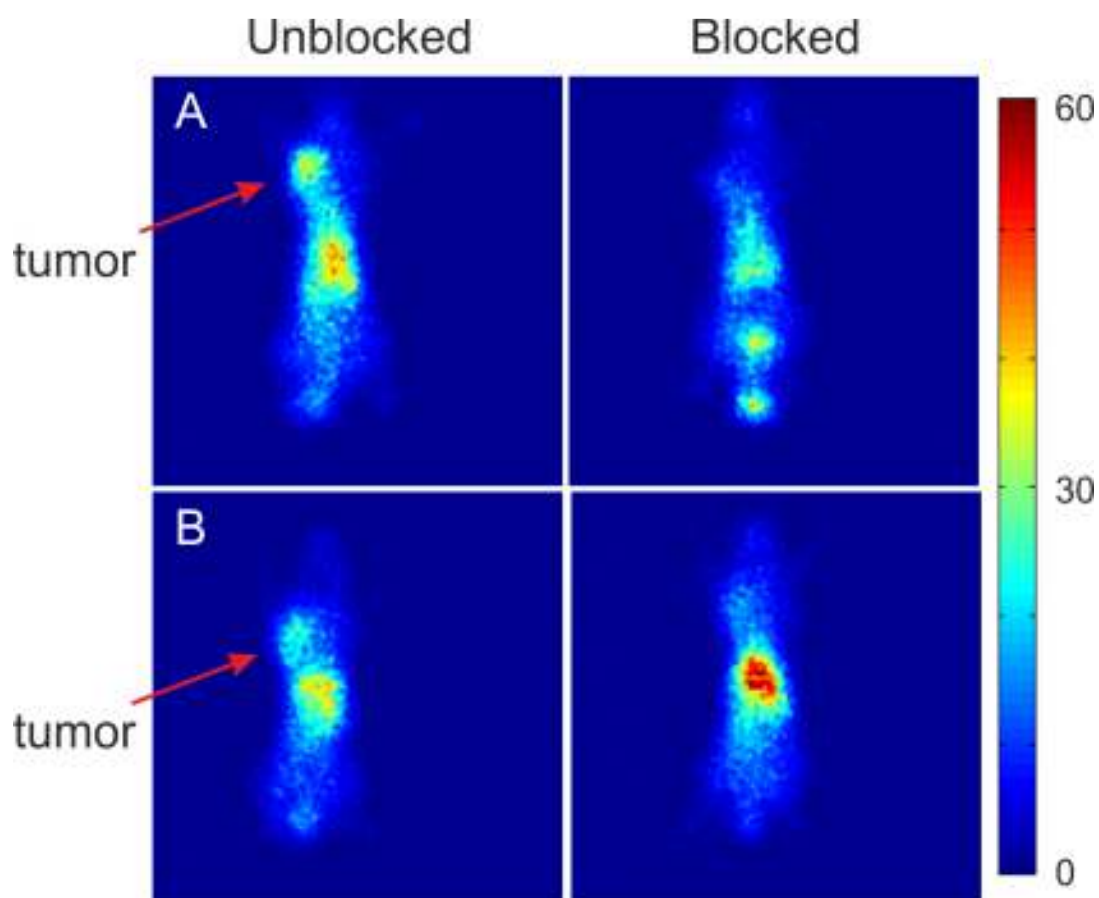
Παρ' όλα αυτά, όπως φαίνεται και από τις μελέτες βιοκατανομής, η πρόσληψη από τον όγκο μπορεί να διακριθεί από τους άλλους ιστούς, αφού οι τιμές στους άλλους (non-tumor) ιστούς είναι αρκετά χαμηλότερες σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται στον όγκο. Το σχήμα 5.2. μας δείνει το αποτέλεσμα αυτό για τα δύο ραδιοανοσοσυμπλέγματα όπως προκύπτει από την ROI ανάλυση της δυναμικής απεικόνισης.



**Σχήμα 5.2.** Καμπύλη κατακράτησης των δύο ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων για τα 80 πρώτα λεπτά της απεικόνισης εκφραζόμενα ως λόγος όγκος/υγιή ιστό. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από ROI ανάλυση.

Ευκρινής απεικόνιση του όγκου μπορεί να ληφθεί 24 ώρες μετά τη χορήγηση του επισημασμένου αντισώματος, όπου η τιμή στο αίμα είναι αρκετά χαμηλότερη και η πρόσληψη από τον όγκο είναι η μεγαλύτερη που παρατηρείται (σχήμα 5.3).

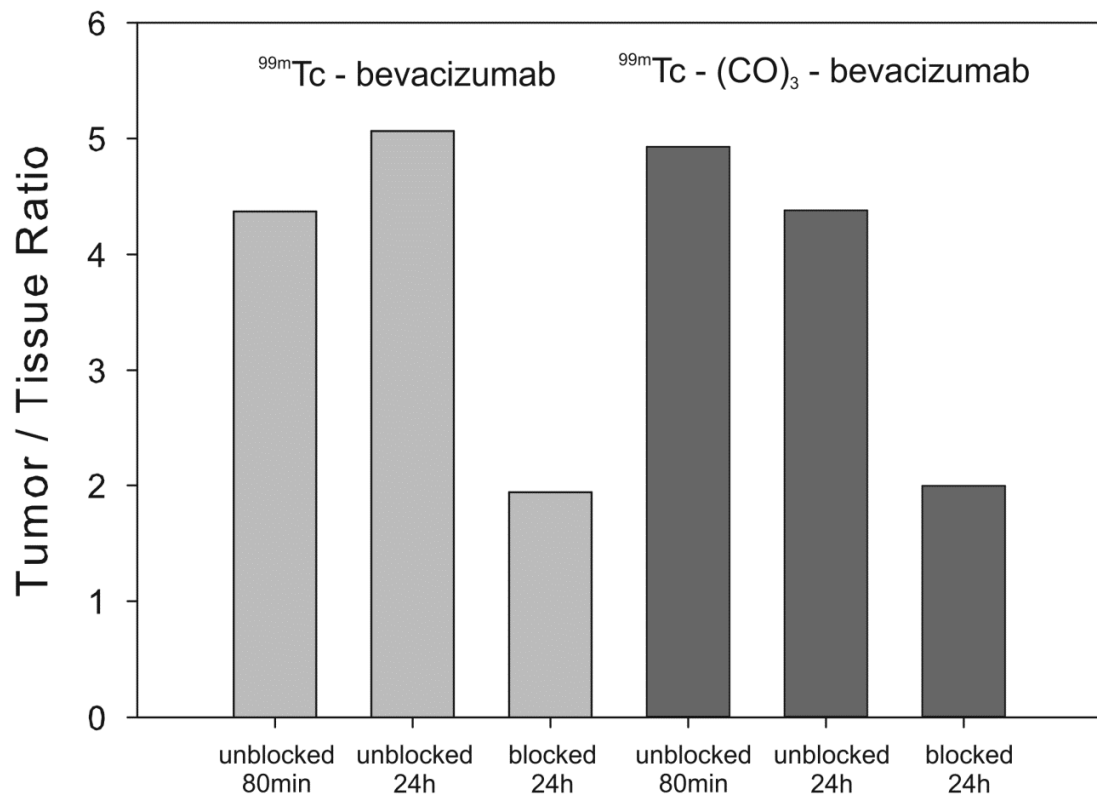
Με τη χορήγηση περίσσειας bevacizumab οι θέσεις δέσμευσης αυτού στον όγκο καταλαμβάνονται από το ψυχρό μόριο και έτσι κατά τη χορήγηση των ραδιοανοσοσυμπλεγμάτων, ο όγκος δεν απεικονίζεται. Έτσι αποδεικνύεται η εκλεκτική σύνδεση του αντισώματος στον όγκο και *in vivo*, κατά τις μελέτες απεικόνισης (σχήμα 5.3).



**Σχήμα 5.3** Σπινθηρογραφική απεικόνιση άθυμων μύων με όγκο χρησιμοποιώντας γ-κάμερα 24 ώρες μετά τη χορήγηση με Α.  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab και Β.  $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3$ -bevacizumab. Οι εικόνες δεξιά αντιστοιχούν στους μύες που έλαβαν περίσσεια αντισώματος και για τα δύο ανάλογα (πείραμα blocking).

Στο σχήμα 5.4 παρατηρούμε τα αποτελέσματα που προκύπτουν μετά από ROI ανάλυση των εικόνων του σχήματος 5.3. Επιβεβαιώνεται η εκλεκτική σύνδεση του αντισώματος που παρατηρήθηκε οπτικά από το σχήμα 5.3 ( $\text{tumor}/\text{tissue}_{\text{blocked}} = 2$ ). Ο όγκος συγκεντώνει περίπου 5 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση από τον υγιή ιστό και για τα δυο ραδιοφάρμακα στις 24 ώρες.





**Σχήμα 5.4** Αποτελέσματα απεικόνισης  $\text{Tc}$ -bevacizumab και  $\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab χωρίς (unblocked) και με (blocked) περίσσεια bevacizumab, σε άθυμους μύς, στα 80 λεπτά (unblocked μόνο) και στις 24 ώρες μετά τη χορήγηση, εκφραζόμενα ως ο λόγος όγκος/υγιείς ιστοί μετά από ROI ανάλυση.

# Συμπεράσματα

---

Στόχος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη νέων ραδιοανοσοσυμπλόκων του μονοκλωνικού αντισώματος bevacizumab, για την μοριακή απεικόνιση της αγγειογένεσης. Για το σκοπό αυτό επιτεύχθηκε επισήμανση του αντισώματος με το ραδιονουκλίδιο του  $^{99m}\text{Tc}$  στις οξειδωτικές βαθμίδες (I) και (V). Ακολούθησε ραδιοχημική και ραδιοβιολογική *in vitro* και *in vivo* αξιολόγηση των δύο παραγώγων.

Για την επισήμανση του bevacizumab με το ραδιονουκλίδιο του  $^{99m}\text{Tc}$  στην οξειδωτική βαθμίδα (I) χρησιμοποιήθηκε το προσύμπλοκο  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ . Ο σχηματισμός του  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  έγινε σε ένα στάδιο, με απευθείας αναγωγή των  $\text{TcO}_4^-$  με  $\text{NaBH}_4$  σε υδατικό διάλυμα, παρουσία CO. Ο ραδιοχημικός έλεγχος του προσυμπλόκου με RP-HPLC, έδειξε ότι σχηματισμός λαμβάνει χώρα σε ποσοστό >98%. Κατά την αντίδραση σχηματισμού χρησιμοποιείται περίσσεια  $\text{NaBH}_4$  και ατμόσφαιρα κορεσμένη σε CO, με σκοπό να εξασφαλιστεί η πλήρης μετατροπή του Tc(VII) σε Tc(I) με θέρμανση. Η σύνθεση του προ-συμπλόκου ακολουθείται ως μέχρι τώρα έχει εφαρμοστεί και αξιολογηθεί με επιτυχία.

Για την επισήμανση του αντισώματος με το  $^{99m}\text{Tc}$ (V) είναι απαραίτητο να γίνει μερική αναγωγή των δισουλφυδρικών ομάδων του αντισώματος καθώς και σύνθεση του προσυμπλόκου Tc-MDP όπου δρα ως ενδιάμεσο σύμπλοκο που θα μεταφέρει το ραδιονουκλίδιο στο μόριο του αντισώματος.

Μετά το σχηματισμό των δύο επισημασμένων ραδιοανοσοσυμπλόκων μελετήθηκαν οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιδρούν στην επισήμανση: α) ο χρόνος θέρμανσης, β) η συγκέντρωση του αντισώματος, γ) η ραδιενεργός συγκέντρωση δ) ο καθαρισμός του συμπλόκου. Τα σύμπλοκα που προκύπτουν χαρακτηρίζονται με SE-HPLC.

Μετά τον έλεγχο των παραγόντων αυτών βρέθηκε ότι για το  $\text{Tc}(\text{CO})_3$  απαιτείται παρατεταμένος χρόνος αντίδρασης (24h) μέχρι σημαντικού ποσοστού σύζευξης. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητος ο καθαρισμός του μορίου με φίλτρα Amion και τη παραλαβή του επισημασμένου αντισώματος σε καθαρή μορφή σε συντομότερο χρονικό

διάστημα. Αντίθετα κατά το σχηματισμό του  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab μέσω του προσυμπλόκου  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP η επισήμανση λαμβάνει χώρα από τα πρώτα 10min σε υψηλό ποσοστό 98% ενώ για χρόνο 30min και 60min η επισήμανση λαμβάνει χώρα σε ποσοστό 99% . Άρα ο ιδανικός χρόνος θέρμανσης κατά την αντίδραση της επισήμανσης θεωρούνται τα 30 λεπτά και ο καθαρισμός αυτού δε χρειάζεται. Μεγαλύτεροι χρόνοι δεν κρίνονται απαραίτητοι και είναι προτιμότερο να αποφεύγονται, καθώς η παρατεταμένη θέρμανση δεν ενδείκνυται για βιομόρια.

Για να διαπιστωθεί εάν η αρχική συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιείται το αντίσωμα καθώς και το ποσό της ραδιενέργειας με την οποία γίνεται η επισήμανση, επηρεάζει την απόδοση σχηματισμού του τελικού προϊόντος, η επισήμανση γίνεται σε σειρά διαλυμάτων, των δύο παραγώγων, διαφορετικών συγκεντρώσεων. Από τη μελέτη προέκυψε ότι καθώς η συγκέντρωση του αντισώματος μειώνεται , ελαττώνεται και το ποσοστό της επισήμανσης. Έτσι για το Tc-bevacizumab είναι σημαντικό το ποσό του μονοκλωνικού αντισώματος να βρίσκεται γύρω στα 500μg ώστε να επιτευχθεί επαρκής επισήμανση. Ως εκ τούτου για να υπάρχει μέτρο σύγκρισης και να διατηρηθούν σταθερές οι συνθήκες, κατά την επισήμανση του bevacizumab με το ραδιονουκλίδιο  $^{99m}\text{Tc(I)}$  χρησιμοποιούνται 500μg αντισώματος.. Εξ'άλλου η δυνατότητα επισήμανσης ελεύθερων υποκαταστατών και βιομορίων σε τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις, αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του προσυμπλόκου  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ .

Η *in vitro* σταθερότητα των επισημασμένων παραγώγων του αντισώματος μελετήθηκε: α) με την πάροδο του χρόνου, β) παρουσία πλάσματος ανθρώπινου αίματος (*plasma stability*).

Η μελέτη της σταθερότητας των δύο επισημασμένων προϊόντων με την πάροδο του χρόνου πραγματοποιήθηκε για 30 λεπτά, 2,4 και 24h από την επισήμανσή τους. Η μελέτη έδειξε εξαιρετική σταθερότητα και των δύο με την πάροδο του χρόνου. Ακόμα και 6h μετά την επισήμανση, χρόνος σημαντικός αφού είναι ίσος με το χρόνο ημιζωής του  $^{99m}\text{Tc}$ , παρουσιάζουν σταθερότητα σε ποσοστό >98%. Μετά την πάροδο 24h το ποσοστό διάσπασης που ανιχνεύεται είναι περίπου 2%.

Εν συνεχεία η σταθερότητα των δύο επισημασμένων παραγώγων μελετήθηκε παρουσία τόσο ανθρώπινου πλάσματος μετά από επώαση στους 37°C (συνθήκες ανθρώπινου οργανισμού), για 15 λεπτά 2 και 4 ώρες μετά την επισήμανση. Οι πρωτεΐνες του ορού, λόγω των πολλών ατόμων-δοτών για το Tc(I) και V που περιέχουν, θα μπορούσαν να δράσουν ανταγωνιστικά για τον ραδιενεργό πυρήνα με αποτέλεσμα τη διάσπαση των ραδιοεπισημασμένων προϊόντων. Τα αποτελέσματα της σταθερότητας όμως στο πλάσμα δείχνουν πως τα  $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  και  $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$  είναι εξαιρετικά σταθερά στις συνθήκες αυτές. Πιο συγκεκριμένα το δε φαίνεται να διασπώνται καθόλου μέχρι και για 4h επώαση σε ανθρώπινο πλάσμα.

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η ικανότητα των δύο επισημασμένων παραγώγων να συνδέονται στα καρκινικά κύτταρα που στην επιφάνεια τους υπερεκφράζουν τον VEGF παράγοντα.

Σε επόμενο στάδιο γίνεται η μελέτη και συγκριτική αξιολόγηση της *in vivo* συμπεριφοράς όλων των ραδιοχημικών μορφών του  $^{99m}\text{Tc}$  μετά από βιοκατανομή τους σε παθολογικούς μύες. Τα πειραμτόζωα είναι scid mice στα οποία αναπτύχθηκε πειραματικός όγκος του μαστού μετά από εμφύτευση καρκινικών κυττάρων M-165 σε αυτά.

Παρατηρείται ότι ο όγκος είναι πιο διακριτός 24 ώρες μετά τη χορήγηση των ραδιενεργών μορίων. Αν και για το  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-bevacizumab}$  η τιμή στον όγκο είναι μεγαλύτερη, ο όγκος με τη χορήγηση του  $^{99m}\text{Tc-bevacizumab}$  είναι πιο διακριτός αφού η τιμή στο αίμα είναι πολύ μικρότερη, με αποτέλεσμα ο λόγος T/bl και T/mus να είναι σημαντικά ψηλότερος για το παράγωγο αυτό. Διαπιστώνοντας έτσι ότι το συγκεκριμένο παράγωγο του ανηχθέντος αντισώματος είναι ελαφρώς το καλύτερο από τα δύο για απεικονιστική χρήση.

Παρατηρείται ότι και τα δύο ραδιοανοσοσυμπλέγματα έχουν σχετικά αργή κινητική μέσα στον οργανισμό, αφού ακόμα και μετά την παρέλευση 24h από τη στιγμή της χορήγησής τους εξακολουθούν να κυκλοφορούν στο αίμα. Η αργή αιματική κάθαρση των συμπλόκων αποδίδεται στην αργή κινητική της αντίδρασης όλων των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Με τη πάροδο 24ωρών η συγκέντρωση της ραδιενέργειας στο αίμα

βρίσκεται στο  $6,17 \pm 1,41$  %ID/g και  $3,51 \pm 0,55$  %ID/g για τα  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab και  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab αντίστοιχα. Η μικρή διαφορά στη τιμή της κυκλοφορίας του  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab στο αίμα μετά από πάροδο 24ωρών, μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη σύνδεσή του με τις πρωτεΐνες του αίματος, εξαιτίας της ανταλλαγής των τριών μορίων  $\text{H}_2\text{O}$  που περιέχονται σε αυτό, με ενεργές ομάδες των πρωτεϊνών. Οι υψηλές τιμές που παρατηρήθηκαν στα νεφρά στις 24ώρες μετά τη χορήγηση ( $11,86 \pm 3,25$  %ID/g για το  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab και  $10,02 \pm 2,89$  %ID/g για το  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab), δείχνουν αποβολή του συμπλόκου μέσω του ουροποιητικού συστήματος. Σημαντικό να αναφερθεί η αυξημένη συγκέντρωση  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab στο ήπαρ ( $10,58 \pm 1,50$  %ID/g) εξαιτίας του μεταβολισμού του συμπλόκου από το όργανο αυτό. Αντιθέτως το  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab έχει πολύ μικρή συγκέντρωση στο ήπαρ ( $1,41 \pm 0,17$  %ID/g)

## Περίληψη

---

Η αγγειογένεση είναι μια διαδικασία ζωτικής σημασίας στην ανάπτυξη, καθώς και τη μετάσταση των όγκων. Το μονοκλωνικό αντίσωμα bevacizumab συνδέεται στον VEGF παράγοντα που αποτελεί βιολογικό ‘‘μονοπάτι’’ ανάπτυξης της αγγειογένεσης, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων μέσω αυτής της οδού. Στόχο της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η αξιολόγηση και η σύγκριση δύο νέων ραδιοϊχνηθετών του  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab, όπου το Tc βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα (I) και (V) και επιτρέπει την μη επεμβατική απεικόνιση του VEGF παράγοντα. Στη πρώτη περίπτωση η επισήμανση του αντισώματος γίνεται με το  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ , ενώ στη δεύτερη η επισήμανση του αντισώματος απαιτεί πρώτα την αναγωγή μερικών δισουλφιδικών του σε ελεύθερες –SH. Η αναγωγή αυτή επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της 2-μερκαπτοαιθανόλης και σε αυτήν την περίπτωση ελέγχεται η ανοσοδραστικότητα του τροποποιημένου αντισώματος. Πραγματοποιείται ραδιοχημικός έλεγχος και στα δύο νέα επισημασμένα βιομόρια, καθώς και μελέτες *in vitro* σταθερότητας. Ακολουθεί μελέτη της βιοκατανομής των  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab και  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab σε παθολογικά αθυμικά ποντίκια. Ο όγκος στα ποντίκια αυτά αναπτύχθηκε αφού τους χορηγήθηκαν MDA MB 231 καρκινικά κύτταρα μαστού επιμολυσμένα με το παράγοντα VEGF<sub>165</sub>. Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας σύνδεσης μέσω του αντισώματος συν-χορηγήθηκε περίσσεια αντισώματος. Τέλος, πραγματοποιήθηκε απεικόνιση των πειραματοζώων σε 4 και 24 ώρες μετά τη χορήγηση των δύο ραδιοανosuμπλεγμάτων, καθώς και μετά από τη χορήγηση περίσσειας bevacizumab, με αποτέλεσμα την ευκρινή απεικόνιση των όγκων.

# Abstract

---

Angiogenesis is a vital process in the growth and metastasis of tumors. Bevacizumab is a humanized monoclonal antibody which binds to VEGF, thus blocking the biological pathways of VEGF-induced tumor angiogenesis. The aim of this study is the development, comparison and evaluation of two novel radiotracer of  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab in the (I) and (V) oxidation states, which enables noninvasive imaging of VEGF. The native format of the antibody was labeled with  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  in the first case. The labeling of proteins with technetium(V) is based on its high affinity for free  $-\text{SH}$  groups. The partial reduction of the disulfide bonds to produce free sulfhydryl groups ( $-\text{SH}$ ) was achieved with 2-mercaptoethanol. The immunoreactivity of the thiol-modified antibody labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  was assessed in these cases. Radiolabeling efficiency and *in vitro* stability was also investigated. *In vivo* biodistribution studies of  $^{99m}\text{Tc}$ -bevacizumab and  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -bevacizumab were performed in nude mice transplanted with MDA MB 231 breast cancer cells transfected with the VEGF<sub>165</sub> variant. Injection of the radiotracer revealed a time-dependent and specific localization of radiotracers to the tumor tissue. Excess of bevacizumab co-injection was achieved for specific binding studies. Finally, imaging studies showed high tumor-to-background contrast for both radioimmunoconjugate and need further improvement for potential routine application in radioimmunodiagnosis.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Χιωτέλλης, Ε. *Ραδιοφαρμακευτική Χημεία*, εκδ. Πήγασος. 2004, Θεσσαλονίκη.
2. Charles Du Bois Coryell, N.S., *Radiochemical studies: the fission products*. 4 ed, ed. N.N.E. Series. Vol. 9. 1951.
3. Ε., Γ., *Εισαγωγή στη σύγχρονη πειραματική φυσική*. 1992: Συμμετρία.
4. B, J., *Principles of Radiopharmacology*, P.H.C. H. Deckart, Editor. 1987, Springer: Jena.
5. Tubis, M., *Radiopharmacy*, ed. M. Tubis, Wolf, W. 1976: Wiley.
6. Saha, G.B., *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, ed. S. Edition. 1984: Springer-Verlag.
7. Γουρνή, Ε., *Μελέτη και βιολογική αξιολόγηση ραδιοεπισημασμένων πεπτιδικών παράγωγων μομπεσίνης*. Διδακτορική διατριβή διπλώματος ειδίκευσης 2007: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
8. Παπαστεφάνου, Κ., *Φυσική Ακτινοβολιών και Εφαρμογές Ραδιοϊσοτόπων*. 2001, Θεσσαλονίκη: εκδ. Ζήτη.
9. Γεωργοσοπούλου, Μ.Α. *Θεραπεία με ραδιοφάρμακα – Η αξία της δοσιμετρίας*. Available from: [www.efie.gr/index.php/67\\_897cbace761b5](http://www.efie.gr/index.php/67_897cbace761b5).
10. Imam, S.K., *Advancements in cancer therapy with a-emitters*. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 2001. **51**(1): p. 271-278.
11. Cutler, C.S., Smith, C. J., Ehrhardt, G. J., Tyler, T. T., Jurisson, S. S. & Deutch, E. , *Current and potential therapeutic uses of lanthanide radioisotopes*. Cancer Biother Radiopharm, 2000. **15**: p. 531-45.
12. Gerson, M.C., Dwivedi, A. K., Abdallah, M., Shukla, R. & Jacobson, A. F., *Significance of I-123 metaiodobenzylguanidine ((1)(2)(3)I-MIBG) lung activity in subjects with heart failure in comparison to healthy control subjects*. J Nucl Cardiol., 2013. **20**: p. 592-9.
13. McGoron, A.J., *Radioisotopes in Nuclear Medicine*. Biomedical Engineering Institute: Florida International University.
14. Ruddon, R.W., *Cancer Biology*. 2007: Oxford University Press.
15. Barentsz J1, T.S., Oyen W, Mus R, De Mulder P, Reznik R, Oudkerk M, Mali W., *Commonly Used Imaging Techniques for Diagnosis and Staging*. J Clin Oncol. , 2006. **24**(20): p. 3234-44.
16. Ορφανουδάκης, Σ. and Κ. Μαριάς. *Πυρηνική Ιατρική*. Ιατρική Απεικόνιση 2003-2004; Available from: [http://www.csd.uoc.gr/~hy571/NOTES/nuclear\\_med.pdf](http://www.csd.uoc.gr/~hy571/NOTES/nuclear_med.pdf).
17. Badawi, R.D., *Nuclear medicine*, in *Medical Physics*. 2001, Dana-Farber Cancer Institute, : 44 Binney Street, Boston, MA 02115, USA. p. 452.
18. Herzog, H., *In vivo functional imaging with SPECT and PET*. Radiochim. Acta. Vol. 89. 2001, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München. 203–214.
19. *Sources and effects of ionizing radiation* UNSCEAR, Editor. 2008: Report to the General Assembly with Scientific Annexes.
20. Levin, C.S., *Primer on molecular imaging technology*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005. **32 Suppl 2**: p. S325-45.

21. Bailey D., P.J., *Single photon emission tomography*, in *Nuclear medicine in Clinical Diagnosis and Treatment*, M.I.a.E. P., Editor. 1998.
22. Kaufmann, P.A. and M.F. Di Carli, *Hybrid SPECT/CT and PET/CT Imaging: The Next Step in Noninvasive Cardiac Imaging*. Seminars in Nuclear Medicine, 2009. **39**(5): p. 341-347.
23. Nekolla S.G., M.-M.A., *PET and MRI in cardiac imaging: from validation studies to integrated applications*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 2009. **36**(1): p. 121-130.
24. Phelps, M.E., et al., *Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method*. Ann Neurol, 1979. **6**(5): p. 371-88.
25. Okarvi, S.M., *Recent developments in 99Tcm-labelled peptide-based radiopharmaceuticals. an overview*. Nuclear Medicine Communications, 1999. **20**: p. 1093-1112.
26. Λάριου, Ε. *Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίου (P.E.T.)*. Available from: [www.physics.ntua.gr/pdf\\_doc\\_files/seminario/lariou\\_pet.pptx](http://www.physics.ntua.gr/pdf_doc_files/seminario/lariou_pet.pptx)
27. Hoffmann EJ, P.M., Mullani NA, Higgins CS, Ter-Pogossian MM, *Design and performance characteristics of a whole-body positron transaxial tomograph*. Journal of Nuclear Medicine, 1976. **17**(6): p. 493-502.
28. Nutt, R., *The History of Positron Emission Tomography*. Molecular Imaging & Biology, 2002. **4**(1): p. 11-26.
29. Α., Ζ., *Στοιχεία Ατομικής και Πυρηνικής Φυσικής – Γεννήτριες, Στοιχεία Ραδιοφαρμακολογίας*, . 2005: Εκδόσεις Λύχνος Ε.Π.Ε.
30. Μ., Α., *New technologies and directed agents for applications of cancer imaging*. J Clin Oncol., 2006. **24**(20): p. 3299-308.
31. Bengel, F.M., et al., *Cardiac positron emission tomography*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1): p. 1-15.
32. Makeyev, S.S., *A look at medical imaging trends through the eyes of a medical doctor*, in *Radiation Detectors for Medical Applications*, Stefaan Tavernier, et al., Editors. 2006, NATO
33. *Medicos de El Salvador*. Available from: [http://www.medicosdeelsalvador.com/Detailed/Im\\_genes\\_M\\_dicas/Medicina\\_Nuclear/Medicina\\_nuclear\\_de\\_coraz\\_n\\_888.html](http://www.medicosdeelsalvador.com/Detailed/Im_genes_M_dicas/Medicina_Nuclear/Medicina_nuclear_de_coraz_n_888.html).
34. Greenwood N., E., A. , *Chemistry of the Elements*, ed. n. ed. 1997: Reed Educational & Professional Publishing.
35. Πασχάλη, Α., *Η εκτίμηση της χειρουργικής αντιμετώπισης με εν τω βαθει εγκεφαλικό ερεθισμό των εξωπυραμιδικών κινητικών διαταραχών μέσω της SPECT νευροαπεικόνισης*. 2012, Πανεπιστήμιο Πατρών.
36. Μ., Π., *Σύνθεση αμινοθειολών, μελέτη των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων και συναρμογή τους με τεχνητό*. . 1991, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
37. Κυπριανίδου, Μ., *Σύμπλοκα του τεχνητίου και του ρηνίου με φαρμακευτικό ενδιαφέρον*. . 2009, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
38. Hartmann, T., A.J. Alaniz, and D.J. Antonio, *Fabrication and Properties of Technetium-bearing Pyrochlores and Perovskites as Potential Waste Forms*. Procedia Chemistry, 2012. **7**: p. 622-628.

39. Μαστροσταμάτης, Σ., *Συναρμογή του τεχνητίου με υποκαταστάτες που περιέχουν άτομαδότες άζωτο και θείο*. . 1995, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
40. Μπούρκουλα, Α., *Μελέτη μικρών συνθετικών μορίων με πιθανή φαρμακολογική δράση. Η περίπτωση των κιναζολινών*. 2009, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
41. Παπαγιανοπούλου, Δ., *Ενώσεις τεχνητίου και ρηνίου με φαρμακευτικό ενδιαφέρον*. . 2010, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
42. Nostrand's, V., *Encyclopedia of Chemistry*, I. John Wiley & Sons, Editor. 2005.
43. Keliang Shi 1, X.H., \* , Per Roos 1, Wangsuo Wu 2, *Determination of technetium-99 in environmental samples: A review*.
44. Τζανοπούλου, Σ., *Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων του ρηνίου και του τεχνητίου ως πιθανών ραδιοφαρμάκων*. . 2008, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
45. Καραγιώργου, Ο., *Νέα διλειτουργικά σύμπλοκα του Re(I) και του Tc(I). Σύνθεση, χαρακτηρισμός και βιολογική αξιολόγηση*. . 2011, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
46. Χιωτέλλης, Α., *In vivo απεικόνιση των υποδοχέων 1A της σεροτονίνης (5-HT1A) στον εγκέφαλο με ενώσεις του Tc-99m*. . 2007, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
47. Schibli, R., *Synthetic and Structural Considerations of Organometallic Compounds of the Elements Technetium and Rhenium for Use in Radiopharmacy*, in *Department of Chemistry and Applied Biosciences 2003*: ETH Zürich.
48. Lister-James J., M.B.R., Dean T., *Small peptides radiolabeled with 99mTc*. Q. J. Nucl. Med., 1996. **40**: p. 221-233.
49. Τριανταφύλλου - Πιτίδη, Α. *Τι είναι τα πεπτίδια* 2010; Available from: <http://www.atriantafyllou.gr>
50. Σαμόλης, Π., *Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός βιοδραστικών πεπτιδίων με σκέδαση ακτινών laser*. . 2012, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
51. Reubi, J.C., *Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy*. Endocr Rev, 2003. **24**(4): p. 389-427.
52. Reubi, J.C., *Neuropeptide Receptors in Health and Disease: The Molecular Basis for In Vivo Imaging*. 1995
53. Alex N. Eberle, G.M.a.S.F., *Receptor-Mediated Tumor Targeting with Radiopeptides. Part I. General Concepts and Methods: Applications to Somatostatin Receptor-Expressing Tumors*. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2004. **24**(4): p. 319-455.
54. Okarvi, S.M., *Peptide - based radiopharmaceuticals. Future tools for diagnostic imaging of cancers and other diseases*. Med Res Rev., 2004. **24**(3): p. 357-97.
55. Alan J. Fischman, J.W.B.a.H.W.S., *A Ticket to Ride. Peptide Radiopharmaceuticals*. J Nucl Med., 1993
- 34: p. 2253-2263.
56. Froidevaux S, E.A., *Somatostatin analogs and radiopeptides in cancer therapy*. Biopolymers, 2002. **66**(3): p. 161-83.
57. D. J. Kwekkeboom, E.P.K., *Radiolabeled somatostatin analog scintigraphy in oncology and immune diseases: an overview*. European Radiology, 1997. **7**(7): p. 1103-1109.

58. Alberts B, B., D, Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. , *Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας*, ed. η. έκδοση. 2006: Ιατρικές εκδ. Πασχαλίδης.
59. Φούντζηλας, Γ., Μπαρμπούνης, Γ 1997. , *Βασικές αρχές θεραπείας του καρκίνου*, in *University Studio Press*. 1997.
60. Παυλάτου, Μ., *Ανοσολογία*, ed. 3η έκδοση. 1997: Ιατρικές εκδ. Λίτσας, .
61. Schoerpf, U.J., et al., *Coronary CT angiography*. *Radiology*, 2007. **244**(1): p. 48-63.
62. Τάτση, Α., *Ραδιοεπισημασμένα ανάλογα σωματοστατίνης με διευρυμένο φάσμα κλινικών ενδείξεων στη διαγνωστική ογκολογία – Ραδιοσημασμένες Πανσωματοστατίνες*. . 2012, Πανεπιστήμιο Πατρών, .
63. Κουτρομπή, Σ., *Παραγωγή, απομόνωση και χαρακτηρισμός της δράσης μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά νικοτινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης*. . 2012, Πανεπιστήμιο Πατρών: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
64. Μ, Β. *Αλληλεπίδραση αντιγόνου/αντισώματος*. IV Σχεδιασμός Πειραμάτων και Ανάπτυξη Δοκιμασιών 2013; Available from: [www.kyttarometria.gr/files/2013k.pdf](http://www.kyttarometria.gr/files/2013k.pdf).
65. Harris, M., *Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer*. *The Lancet Oncology*, 2004. **5**(5): p. 292-302.
66. Guo, Y.-T., Q.-Y. Hou, and N. Wang, *Monoclonal antibodies in cancer therapy*. *Clinical Oncology and Cancer Research*, 2011. **8**(4): p. 215-219.
67. Modjtahedi, H., Ali, S. & Essapen, S . , *Therapeutic application of monoclonal antibodies in cancer: advances and challenges*. . *Brit Med Bull.*, 2012. **104**: p. 41-59.
68. Μ. Φάνη, Π.Μ., *Ραδιοεπισημασμένα βιομόρια στη διάγνωση και στη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου*.
69. Goldenberg, R.M.S.a.D.M., *Perspectives on Cancer Therapy with Radiolabeled Monoclonal Antibodies*. *J Nucl Med*, 2005. **46**: p. 115S-127S.
70. Potamianos, S., Varvarigou, A.D., and Archimandritis, S.C., *Radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy in cancer: principles and application*. *Anticancer Res.*, 2000. **20**: p. 925-948.
71. Srivastava, S.C., and Mease, R.C., *Progress in research on ligands, nuclides and techniques for labeling monoclonal antibodies*. . *Nucl. Med. Biol.*, 1991. **18**: p. 589-603.
72. Lamki, L.M., *Radioimmunoscintigraphy of cancer. Problems, pitfalls and prospects*. . 1990, in *Nuclear Medicine Annual*, ed. Freeman, L.M. Raven Press Ltd.: New York. p. 113-150.
73. Meares, C.F., *Chelating agents for the binding of metal ions to antibodies*. *Nucl. Med. Biol.*, 1986. **13**: p. 311-318.
74. Parker, D., *Tumour targeting with radiolabelled macrocycle-antibody conjugates*. . *Chem. Soc.Rev.* , 1990. **19**: p. 271-291.
75. Goodwin, D.A., *Pharmacokinetics and antibodies*. *J. Nucl. Med.*, 1987. **28**: p. 1358-1362.
76. Ketring, A.R., *<sup>153</sup>Sm-EDTMP and <sup>186</sup>Re-HEDP as bone therapeutic radiopharmaceuticals*. *Nucl.Med. Biol.*, 1987. **14**: p. 223-232.

77. Liu, S., and Edwards, D.S. , *Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals*. *Bioconjug. Chem.*, 2001. **12**: p. 7-34.
78. Verbuggen, A.M., *Bifunctional chelators for technetium-99m*, in *Current directions in radiopharmaceutical research and development*, S.J. ed Mather, Editor. 1996, Kluwer Academic Publications: Dordrecht, Boston, London, . p. pp. 31-46.
79. Paganelli, G., Chinol, M., Stoldt, H.S., Aftab, F., Geraghty J. and Siccardi, A.G., *Radioimmunological therapy*, in *Clinical Nuclear Medicine*, M.N. Maisey, Britton, K.E. and Collier, B.D., , Editor. 1998: Chapman and Hall, London, . p. pp. 39-52.
80. Hancock, R.D., and Martell, A.E. , *Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution*. *Chem. Rev.*, 1989. **89**: p. 1875-1914.
81. Dilworth, J.R., and Parrott, S.J. , *Radiopharmaceutical relevant chemistry of technetium and rhenium*, in *Current directions in radiopharmaceutical research and development*, S.J. Mather, Kluwer, Editor. 1996, Academic Publications,: Dordrecht, Boston, London. p. pp. 1-29.
82. Rhodes, B.A., Zamora, P.O., Newell, K.D., and Valdez, E.F. , *Technetium-99m labelling of murine monoclonal antibody fragments*. . *J. Nucl. Med.*, 1986. **27**: p. 685-693.
83. Rhodes, B.A., *Direct labeling of proteins with 99mTc*. . *Nucl. Med. Biol.*, 1991. **18**: p. 667-676.
84. Varvarigou, A.D., Archimandritis, S.C., Sekeri-Pataryas, K., Sourlingas, T.G., Sivolapenko, G., and E. and Paschali, *Radiochemical and radioimmunological data of 99Tcm-anti-CEA labelled by two diverse methods*. *Nucl. Med. Commun.*, 1996. **17**: p. 80-88.
85. Schwarz, A.a.S., A., *A novel approach to Tc-99m-labeled monoclonal antibodies*. . *J.Nucl. Med.*, 1987. **28(abstract)**: p. 721.
86. Pak, K.Y., Nedelman, M.A., Stewart, R. and Dean, R.T., *A rapid and efficient method for labeling IgG antibodies with Tc-99m Fab' antibody fragments*. . *J. Nucl. Med.*, 1989. **30(abstract)**: p. 793.
87. Mather, S.J., and Ellison, D. , *Reduction-mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies*. *J. Nucl. Med.*, 1990. **31**: p. 692-697.
88. Κουμαριανού, Ε., *Πεπτιδικά ανάλογα ραδιοεπισημασμένα με ισότοπα που εκπέμπουν β- ακτινοβολία για ανάπτυξη θεραπευτικών ραδιοφαρμάκων*. . 2009, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
89. Srivastava, S.C., and Mease, R.C., *Progress in Research on ligands, nuclides and techniques for Labeling Monoclonal Antibodies*. *Nucl. Med. Biol.*, 1991. **18**: p. 589-603.
90. Eiblmaier, M., et al., *Correlating EGFR expression with receptor-binding properties and internalization of 64Cu-DOTA-cetuximab in 5 cervical cancer cell lines*. *J Nucl Med*, 2008. **49(9)**: p. 1472-9.
91. Malviya, G., et al., *Synthesis and evaluation of 99mTc-labelled monoclonal antibody 1D09C3 for molecular imaging of major histocompatibility complex class II protein expression*. *Mol Imaging Biol*, 2011. **13(5)**: p. 930-9.

92. Δουζδουμπάνης, Π., *Επίδραση ανοσοκατασταλτικών θεραπειών στα είδη και στην λειτουργία των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων ληπτών νεφρικού μοσχεύματος*. Διδακτορική διατριβή διπλώματος ειδίκευσης στην Ιατρική 2010, Πανεπιστήμιο Πατρών: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.
93. Mukherji, S.K., *Bevacizumab (Avastin)*. AJNR Am J Neuroradiol, 2010. **31**(2): p. 235-6.
94. Dias, C.R., et al., *Radiolabeling of rituximab with (188)Re and (99m)Tc using the tricarbonyl technology*. Nucl Med Biol, 2011. **38**(1): p. 19-28.
95. Kathy Miller, M.D., Molin Wang, Ph.D., Julie Gralow, M.D., Maura Dickler, M.D., M.D. Melody Cobleigh, Edith A. Perez, M.D., Tamara Shenkier, M.D., and P.D. David Cella, and Nancy E. Davidson, M.D., *Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer*. n engl j med, 2007. **357**: p. 26.
96. Naoyo Nishida1, et al., *Angiogenesis in cancer*. Vascular Health and Risk Management, 2006. **2**(3): p. 213-219.
97. HERMAN, M.P.A.I.M., *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**: p. 947-970.
98. Σασαρώλη, Δ., *Ανάλυση του προτύπου γονιδιακής έκφρασης κατά την αγγειογένεση σε ανθρώπινους όγκους* 2009, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης.
99. Ruhrberg, C., *Vegf in Development*. 2008: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC.
100. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(5): p. 391-400.
101. J.Folkman, *Angiogenesis. An organizing principle for drug discovery.*, in *Drug Discovery*. 2007, Nature.
102. George D. Yancopoulos, S.D., Nicholas W. Gale, John S. Rudge, Stanley J. Wiegand & Jocelyn Holash, *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. NATURE 2000. **407**.
103. Hudlicka, O., Brown, M. & Egginton, S. , *Angiogenesis in Skeletal and Cardiac Muscle*. Phys Rev 1992. **72**(2): p. 369-417.
104. Chaiworapongsa, T., et al., *Maternal plasma concentrations of angiogenic/antiangiogenic factors in the third trimester of pregnancy to identify the patient at risk for stillbirth at or near term and severe late preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 2013. **208**(4): p. 287 e1-287 e15.
105. Jain†, P.C.R.K., *Angiogenesis in cancer and other diseases*. NATURE, 2000. **407**.
106. Sandra Liekens\*, E.D.C., Johan Neyts, *Angiogenesis.regulators and clinical applications*. Biochemical Pharmacology 2001. **61**: p. 253-270.
107. Weinberg†, D.H.a.R.A., *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**: p. 55-70.
108. Μπίρμπας, Χ., *Μελέτη της αντι-αγγειογενετικής δράσης των συνδετικών πεπτιδίων HB-19 και N6L*. 2012, Πανεπιστήμιο Πατρών.
109. Simons, M., *An inside view: VEGF receptor trafficking and signaling*. Physiology (Bethesda), 2012. **27**(4): p. 213-22.
110. S.Takahashi, *Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy*. Biol. Pharm. Bull. , 2011. **34**(12): p. 1785—1788

111. Shibuya M1, C.-W.L., *Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Exp Cell Res.* , 2006. **312**(5): p. 549-60.
112. Mahabeleshwar, G.H., et al., *Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis*. *Circ Res*, 2007. **101**(6): p. 570-80.
113. D.R. Senger\*, K.P.C., J. E. Benes\*, C. A. Perruzzi\*, A. P. Sergiou\*and M. Detmar\*†, *Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor.pdf*>. *Cell Biology*, 1997. **94**: p. 13612–13617.
114. Tatiana V. Byzova, C.K.G., ‡, et al., *A Mechanism for Modulation of Cellular Responses to VEGF: Activation of the Integrins*. *Molecular Cell*, 2000. **6**: p. 851–860.
115. AGENCY, E.M., *Avastin*. 2012.
116. Wikipedia. *Annual pharmaceutical drug sales*. 2014; Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Annual\\_pharmaceutical\\_drug\\_sales](http://en.wikipedia.org/wiki/Annual_pharmaceutical_drug_sales). Προσπέλαση 11/11/2013.
117. Reardon DA1, T.S., Peters KB, Desjardins A, Gururangan S, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE 2nd, Jones LW, Kirkpatrick JP, Friedman AH, Vredenburgh JJ, Bigner DD, Friedman HS., *A Review of VEGF-VEGFR-Targeted Therapeutics for Recurrent*. *J Natl Compr Canc Netw*. Apr, 2011. **9**(4): p. 414-27.
118. Alan Sandler, M.D., Robert Gray, Ph.D., Michael C. Perry, M.D., Julie Brahmer, M.D., M.D. Joan H. Schiller, Afshin Dowlati, M.D., Rogerio Lilenbaum, M.D.,, and M.D. and David H. Johnson, *Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2006. **355**: p. 2542-50.
119. Giantonio, B.J., et al., *Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(12): p. 1539-44.
120. Kabbinavar, F.F., et al., *Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(16): p. 3706-12.
121. Ferrara, H.-P.G.a.N., *Monotherapy or in Combination with Cytotoxic Therapy in Pharmacology and Pharmacodynamics of Bevacizumab as Preclinical Studies*. *Cancer Res*, 2005. **65**: p. 671-680.
122. Alberto, R., et al., *A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of [99mTc(OH2)3(CO)3]+ from [99mTcO4]- in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand*. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. **120**(31): p. 7987-7988.
123. David R. Collingridge, V.A.C., Mathias Glaser, et al., *Imaging Vascular Endothelial Growth Factor in Vivo Using The Development of [124 I]Iodinated-VG76e : A Novel Tracer for Imaging Vascular Endothelial Growth Factor in Vivo Using Positron Emission Tomography*. *Cancer Res* 2002. **62**: p. 5912-5919.
124. Furenlid, L.R., et al., *FastSPECT II: A Second-Generation High-Resolution Dynamic SPECT Imager*. *IEEE Trans Nucl Sci*, 2004. **51**(3): p. 631-635.

125. Chen, Y.-C., et al., *Calibration of Scintillation Cameras and Pinhole SPECT Imaging Systems*, in *Small-Animal Spect Imaging*, M. Kupinski and H. Barrett, Editors. 2005, Springer US. p. 195-201.
126. Furenlid, L., Y.-C. Chen, and H. Kim, *SPECT Imager Design and Data-Acquisition Systems*, in *Small-Animal Spect Imaging*, M. Kupinski and H. Barrett, Editors. 2005, Springer US. p. 115-138.
127. Abràmoff, M.D., P.J. Magalhães, and S.J. Ram, *Image processing with ImageJ*. Biophotonics international, 2004. **11**(7): p. 36-43.
128. Bellaa, R.L., *In vitro and in vivo evaluation of a <sup>99m</sup>Tc(I)-labeled bombesin analogue for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors.pdf*>. Nuclear Medicine and Biology, 2002 **29**: p. 553-560.
129. Stichelberger, A., et al., *Versatile synthetic approach to new bifunctional chelating agents tailor made for labeling with the fac-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> core (M = Tc, <sup>99m</sup>Tc, Re): synthesis, in vitro, and in vivo behavior of the model complex [M(APPA)(CO)<sub>3</sub>] (appa = [(5-amino-pentyl)-pyridin-2-yl-methyl-amino]-acetic acid)*. Nuclear Medicine and Biology, 2003. **30**(5): p. 465-470.
130. Kothari, K.K., et al., *Syntheses, in vitro and in vivo characterization of a <sup>99m</sup>Tc-(I)-tricarbonyl-benzylamino-dihydroxymethyl phosphine (NP2) chelate*. Applied Radiation and Isotopes, 2003. **58**(5): p. 543-549.
131. Langer, M., et al., *<sup>99m</sup>Tc-Labeled Neuropeptide Y Analogues as Potential Tumor Imaging Agents*. Bioconjugate Chemistry, 2001. **12**(6): p. 1028-1034.
132. Bläuenstein, P., et al., *Application of the organometallic technetium and rhenium tricarbonyl complex on neuropeptide labelling*. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 2001. **44**(S1): p. S556-S558.
133. Bullok, K.E., et al., *Characterization of Novel Histidine-Tagged Tat-Peptide Complexes Dual-Labeled with <sup>99m</sup>Tc-Tricarbonyl and Fluorescein for Scintigraphy and Fluorescence Microscopy*. Bioconjugate Chemistry, 2002. **13**(6): p. 1226-1237.
134. Bouziotis, P., et al., *Radiochemical and radiobiological assessment of a pyridyl-S-cysteine functionalized bombesin derivative labeled with the <sup>99m</sup>Tc core*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2013. **21**(21): p. 6699-6707.
135. Robert Waibell<sup>1</sup>, R.A., Jörg Willuda<sup>2</sup>, Ricarda Finnern<sup>3</sup>, Roger Schibli<sup>1</sup>, Albert Stichelberger<sup>1</sup>, and U.A. André Egli<sup>1</sup>, Jean-Pierre Mach<sup>3</sup>, Andreas Plückthun<sup>2\*</sup>, and P. August Schubiger<sup>1</sup>, *Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex*. Nature Biotechnology 1999. **17**.
136. Morales, A.A.M., et al., *Technetium-99m direct radiolabeling of monoclonal antibody ior egf/r3*. Nuclear Medicine and Biology, 1998. **25**(1): p. 25-30.
137. Morales-Morales, A., et al., *Biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-labeled anti-human epidermal growth factor receptor (EGF-R) humanized monoclonal antibody h-R3 in a xenograft model of human lung adenocarcinoma*. Nuclear Medicine and Biology, 1999. **26**(3): p. 275-279.
138. DR van Staveren, et al., *S-Functionalized Cysteine: Powerful Ligands for the Labelling of Bioactive Molecules with Triaquatricarbonyltechnetium-99m(I+) ([<sup>99m</sup>Tc(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>)*. Helvetica Chimica Acta, 2005. **88**(3): p. 447-460.



139. Ilse Novak-Hofer, K.Z., Helmuth R. Maecke, Hans Peter Amstutz, François Carrel and P. August Schubiger, *Tumor Uptake and Metabolism of Copper-67-Labeled Monoclonal Antibody chCE7 in Nude Mice Bearing Neuroblastoma Xenografts*. J Nucl Med., 1997. **38**: p. 536-544.