



1949

**$^{68}\text{Ga}$ -jelzett laktózamin tartalmú radiofarmakonok szintézise és biológiai vizsgálata**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Gyuricza Barbara  
témavezető neve: Dr. Fekete Anikó

DEBRECENI EGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács  
Kémia Tudományok Doktori Iskola  
Debrecen, 2022

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács **Kémia Tudományok** Doktori Iskola **K/5** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Debrecen, 2023. 03. 07.*

.....  
*a jelölt aláírása*

*Tanúsítom, hogy **Gyuricza Barbara** doktorjelölt **2018- 2022** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/5** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét. Az értekezés elfogadását javaslom.*

*Debrecen, 2023. 03. 07.*

.....  
*a témavezető aláírása*

# **<sup>68</sup>Ga-jelzett laktózamin tartalmú radiofarmakonok szintézise és biológiai vizsgálata**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a kémiai tudományágban

Írta: Gyuricza Barbara okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia Tudományok doktori iskolája  
(K/5: Szénhidrátok és heterociklusok kémiája és biokémiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Fekete Anikó

Az értekezés bírálói:

Dr. ....  
Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök:

Dr. ....

tagok:

Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 20... . . . .

# Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	1
2. Bevezetés .....	3
3. Irodalmi áttekintés .....	6
<b>3.1. Angiogenezis</b> .....	6
<b>3.2. Az angiogenezis kimutatására alkalmas biomarkerek</b> .....	7
3.2.1. <i>Integrinek</i> .....	7
3.2.2. <i>Aminopeptidáz N</i> .....	9
<b>3.3. Galektinek</b> .....	11
3.3.1. <i>Galektin-1</i> .....	12
3.3.2. <i>Galektin-7</i> .....	12
3.3.3. <i>Galektin-9</i> .....	13
<b>3.4. Galektin-3 fehérje</b> .....	14
3.4.1. <i>A galektin-3 felépítése</i> .....	14
3.4.2. <i>A galektin-3 fehérje lokalizációja és funkciói</i> .....	15
3.4.3. <i>Galektin-3 és a tumor angiogenezis</i> .....	15
3.4.4. <i>A galektin-3 és a metasztázis</i> .....	16
3.4.5. <i>Galektin-3 inhibitorok</i> .....	17
3.4.6. <i>A galektin-3 inhibitorok klinikai jelentősége</i> .....	21
<b>3.5. Radiokémiai jelölési módszerek</b> .....	23
3.5.1. <i>Radiofluorozás</i> .....	23
3.5.2. <i>Komplekképzésen alapuló radiokémiai jelzések</i> .....	24
<b>3.6. Peptid alapú radiógyógyszerek farmakokinetikájának javítására alkalmas kémiai módosítások</b> .....	29
3.6.1. <i>D-Aminosavak alkalmazása a peptid szekvenciában</i> .....	30
3.6.2. <i>Pegilálás</i> .....	31
3.6.3. <i>Konjugálás szénhidrátokkal</i> .....	32
<b>3.7. RGD alapú radiofarmakonok</b> .....	33
3.7.1. <i><sup>18</sup>F-jelzett RGD peptidek</i> .....	33
3.7.2. <i><sup>68</sup>Ga-jelzett RGD származékok</i> .....	34
<b>3.8. NGR alapú radiofarmakonok</b> .....	42
3.8.1. <i>Monomerek</i> .....	42
3.8.2. <i>Heterodimer</i> .....	43
<b>3.9. Radiojelzett galektin-3 inhibitorok</b> .....	44
4. Eredmények .....	47
<b>4.1. Célkitűzés</b> .....	47
<b>4.2. NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> szintézise és radiokémiai jelzése <sup>68</sup>Ga izotóppal</b> .....	48

4.2.1.	<i>Kémiai szintézis</i> .....	48
4.2.2.	<i>Radiokémia</i> .....	52
<b>4.3.</b>	<b><sup>68</sup>Ga-jelzett ciklikus NGR alapú radiofarmakonok szintézise és preklinikai vizsgálata</b> .....	<b>56</b>
4.3.1.	<i>Kémiai szintézis</i> .....	56
4.3.2.	<i>Radiokémia</i> .....	59
4.3.3.	<i>Biológia</i> .....	62
<b>4.4.</b>	<b><sup>68</sup>Ga-jelzett 3'-(2-naftil)metilezett laktózin alapú radiofarmakonok szintézise és preklinikai vizsgálata</b> .....	<b>66</b>
4.4.1.	<i>Kémiai szintézis</i> .....	66
4.4.2.	<i>Radiokémia</i> .....	70
4.4.3.	<i>Biológia</i> .....	74
<b>5.</b>	<b>Anyagok és Módszerek</b> .....	<b>79</b>
<b>5.1.</b>	<b>Kémiai szintézisek</b> .....	<b>80</b>
5.1.1.	<i>3-Azido-propil-6-O-terc-butil-difenilszilil-2-ftálimido-2-dezoxi-β-D-glükopiranozid (2)</i> .....	80
5.1.2.	<i>3-Azido-propil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-6-O-terc-butil-difenilszilil-2-dezoxi-2-ftálimido-β-D-glükopiranozid (4)</i> .....	81
5.1.3.	<i>3-Azido-propil-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-6-O-tert-butil-difenilszilil-2-amino-2-dezoxi-β-D-glükopiranozid (5)</i> .....	82
5.1.4.	<i>3-Azidopropil-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-2-amino-2-dezoxi-β-D-glükopiranozid (6)</i> .....	82
5.1.5.	<i>NODAGA-LacN (8)</i> .....	83
5.1.6.	<i>DBCO-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (11)</i> .....	83
5.1.7.	<i>NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (12)</i> .....	83
5.1.8.	<i>DOTAGA-LacN (14)</i> .....	84
5.1.9.	<i>DBCO-cKNGRE (17)</i> .....	84
5.1.10.	<i>DBCO-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (18)</i> .....	85
5.1.11.	<i>DOTAGA-LacN-cKNGRE (19)</i> .....	85
5.1.12.	<i>DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (20)</i> .....	85
5.1.13.	<i>DOTAGA-cKNGRE (21)</i> .....	86
5.1.14.	<i>DOTAGA-LacN(NAP) (28)</i> .....	86
5.1.15.	<i>DBCO-PEG<sub>4</sub>-cRGDfK (30)</i> .....	87
5.1.16.	<i>DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK (31)</i> .....	87
5.1.17.	<i>DOTAGA-cRGDfK (32) szintézise</i> .....	88
<b>5.2.</b>	<b>Radiokémia</b> .....	<b>88</b>
5.2.1.	<i>A 12-es vegyület <sup>68</sup>Ga izotóppal történő radiokémiai jelzésének a vizsgálata különböző prekursor koncentrációk alkalmazása során</i> .....	88
5.2.2.	<i>A 12-es vegyület <sup>68</sup>Ga izotóppal történő radiokémiai jelzése különböző hőmérsékleten</i> .....	88
5.2.3.	<i>A NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (12) <sup>68</sup>Ga izotóppal történő optimalizált radiokémiai jelzése</i> 89	
5.2.4.	<i>A DOTAGA-LacN (14), DOTAGA-LacN-cKNGRE (19) és a DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (20) prekursorok radiokémiai jelzése <sup>68</sup>Ga izotóppal</i> .....	89
5.2.5.	<i>DOTAGA-cKNGRE (21) radiokémiai jelzése <sup>68</sup>Ga izotóppal</i> .....	90

5.2.6.	<i>DOTAGA-LacN(NAP) (28), DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK (31) és DOTAGA-cRGDfK (32) prekursorok radiokémiai jelzése <sup>68</sup>Ga izotóppal</i>	90
5.2.7.	<i>Oktanol/víz megoszlási hányados meghatározása:</i>	91
5.2.8.	<i>Stabilitás vizsgálat</i>	91
<b>5.3.</b>	<b>Biológia</b>	91
5.3.1.	<i>Állattartás</i>	91
5.3.2.	<i>B16-F10 tumor indukciója</i>	92
5.3.3.	<i>In vivo PET képalkotás és kép analízis</i>	92
5.3.4.	<i>Statisztikai elemzés</i>	93
5.3.5.	<i>Ex vivo szervi eloszlás vizsgálat</i>	93
6.	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	94
7.	<b>SUMMARY</b>	98
8	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b>	102
9.	<b>Köszönetnyilvánítás</b>	111

## 1. Rövidítések jegyzéke

ACN	acetonitril
APN	aminopeptidáz N
Arg	arginin
Asn	aszparagin
BBN	bombezin
BFC	bifunkciós kelátor
bFGF	basic fibroblaszt növekedési faktor
cKNGRE	ciklikus lizin-aszparagin-glicin-arginin-glutamát
CRD	szénhidrát felismerő domén
cRGD	ciklikus arginin-glicin-aszparaginsav
cRGDfK	ciklikus arginin-glicin-aszparaginsav-D-fenilalanin-lizin
cRGDyK	ciklikus arginin-glicin-aszparaginsav-D-tirozin-lizin
CT	komputer tomográfia
DBCO-NHS	dibenzociklootkin- <i>N</i> -hidroxiszukcinimidil-észter
DFO	deferoxamin
DIPEA	diizopropil-etilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DOTA	2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetrail)tetraecetsav
DOTAGA	2,2',2''-(10-(1,3-dikarboxi-propil)-1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7-triil)triecetsav
ECM	extracelluláris mátrix
FAK	fokális adhézions kináz
[ <sup>18</sup> F]FB	4-[ <sup>18</sup> F]fluoro-benzoil
Gal-3	galektin-3
GalNAc	<i>N</i> -acetyl-galaktózamin
Glc	glükóz
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-glükózamin
Glu	glutamát
GnTV	<i>N</i> -acetyl-glükózamin transzferáz V
GRPR	gasztrin releasing peptid receptor
HATU	2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium hexafluorofoszfát
HIF	hipoxia indukált faktor
His	hisztidin
ID	injektált dózis
IgE	immunglobulin E
LacN	laktózamin
LacNAc	<i>N</i> -acetyl-laktózamin
MMP	metalloproteáz

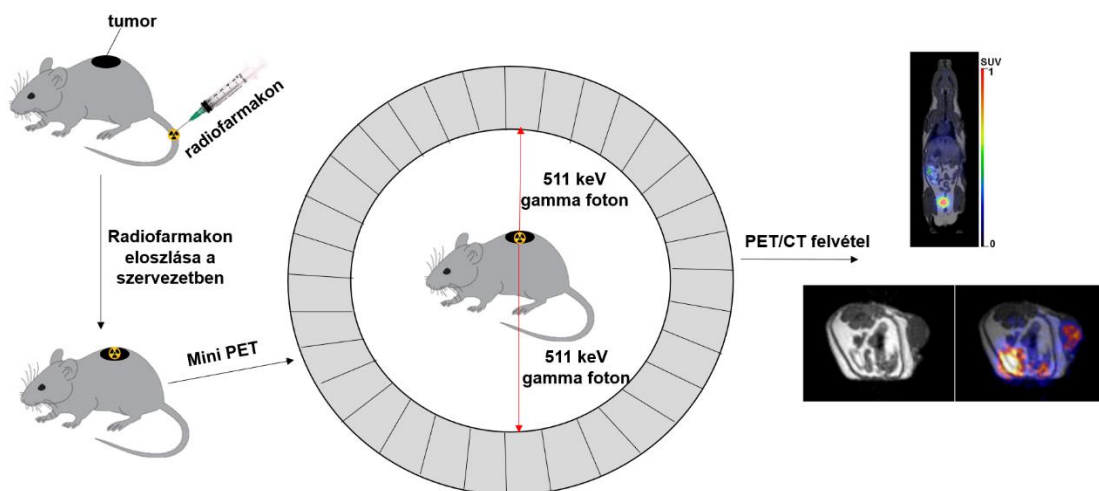
NGR	aszparagin-glicin-arginin
NOTA	2,2',2''-(1,4,7-triazaciklononán-1,4,7-triil)triecetsav
NODAGA-NHS	2,2'-(7-(1-karboxi-4-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-4-oxobutil)-1,4,7-triazonán-1,4-diil)diecetsav
NWGR	aszparagin-triptofán-glicin-arginin
PBS	foszfát-pufferes sóoldat
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PEG	polietilén-glikol
PET	pozitron emissziós tomográfia
SPAAC	gyűrűfeszültség indukálta azid alkin cikloaddíció
SPECT	egyfoton kibocsátásos komputer tomográfia
SUV <sub>max</sub>	maximális standardizált felvételi érték
SUV <sub>mean</sub>	átlagos standardizált felvételi érték
T/M	tumor/izom arány
TNF	tumor nekrózis faktor
TRAP	3,3',3''-(((1,4,7-triazonán-1,4,7-triil)tris(metilén))tris(hidroxifoszforil))tripropánsav
TRP	triptofán
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VEGFR	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor

## 2. Bevezetés

A nukleáris medicinában alkalmazott molekuláris képalkotó eljárások nagymértékben segítik a különböző patológiás folyamatok korai klinikai diagnosztikáját. Ezek a képalkotó technikák a Hevesy György (kémiai Nobel díj, 1943) által felfedezett radioaktív nyomjelzésen alapulnak. A módszer lényege, hogy egy elem izotópjai kémiaiilag azonosnak tekinthetők. Ennek megfelelően, ha egy biológiailag aktív molekulába a kiválasztott elem radioaktív izotópját építjük be (pl.  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{13}\text{N}$ ), akkor kémiai szempontból ugyanúgy fog viselkedni, mint az eredeti molekula. Tehát a radiojelzett vegyület sorsát az élő szervezetben az általa kibocsátott sugárzás detektálásával nyomon tudjuk követni. Erre alkalmas technika a pozitron emissziós tomográfia (PET), illetve az egy foton kibocsátásos komputer tomográfia (SPECT).

A PET működési alapelvét a pozitron-elektron annihiláció adja, mely során két, egymással  $180^\circ$ -os szöget bezáró, egyenként 511 keV energiájú gamma foton keletkezik. Az egy időben becsapódó megsemmisülési gamma fotonokat a gyűrűs detektorban elhelyezkedő szcintillációs kristályok érzékelik. A PET kamera esetében nincs szükség kollimátorra, ezért nagy érzékenység és jó felbontás jellemzi.

A PET egy funkcionális képalkotó eljárás, mely a kóros folyamatokat már a morfológiai elváltozások előtt, a különböző anyagcsere folyamatok szintjén képes detektálni. Ezen tulajdonsága miatt a PET kiemelt jelentőséggel bír az onkológiai diagnosztikában, ahol a minél korábbi diagnózis jelentősen javíthatja a beteg túlélési esélyeit.



1. ábra: A PET vizsgálat lépései

A klinikai gyakorlatban a 2-dezoxi-2-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluoro- $\beta$ -D-glükózt, azaz a [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-t alkalmazzák legelterjedtebben PET radiogyógyszerként. Ez a glükóz analóg a fokozott glükóz anyagcserét mutatja ki nagy érzékenységgel, ami nagymértékben jellemző a daganatos sejtekre. Azonban néhány szerv, például a szív és az agy is fokozott glükóz metabolizmussal jellemezhető, ezért a [ $^{18}\text{F}$ ]FDG nem tekinthető specifikusnak ezeknek a szerveknek a vizsgálata során. Továbbá megnövekedett [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-felvétel jellemző a fertőzésekre és gyulladásokra is, amelyeket ezért tévesen rosszindulatú daganatként diagnosztizálhatnak. Ezek a tények indokolják a minél tumor-specifikusabb radiofarmakonok fejlesztésének szükségességét.

A receptor-ligand kölcsönhatáson alapuló radiofarmakonok nagy affinitással és szelektivitással képesek kötődni a daganatos sejtek felszínén, illetve a tumoros sejteken belül fokozottan kifejeződő receptorokhoz, amelyeket biomarkereknek is neveznek. Ebbe a csoportba tartoznak a peptid alapú radiofarmakonok is, melyeket egyre elterjedtebben alkalmaznak a neoplastikus sejtek PET képalkotással történő detektálására, illetve a daganat ellenes terápiák nyomon követésére a klinikai gyakorlatban is.

2016-ban kapcsolódtam be az Orvosi Képalkotó Intézet Nukleáris Medicina Tanszékén folyó kutatásba, ahol számos  $^{68}\text{Ga}$ - és  $^{44}\text{Sc}$ -jelzett kelátor-konjugált peptid

alapú radiogyógyszer kifejlesztését és preklinikai vizsgálatát valósították már meg korábban.

A kutatás során a feladatom szénhidrát egységet tartalmazó radiogyógyszerek előállítására és biológiai vizsgálata volt. A doktori munkám során a galektin-3 receptor egyik ismert ligandjának, a laktózámnak a származékait építettem be RGD és NGR peptid alapú radiofarmakonokba. Ezenkívül a galektin-3 detektálására alkalmas, vektor molekulaként csak laktózamin származékot tartalmazó radiofarmakonok szintézisét is megvalósítottam. Ezen a területen elért eredményeimet foglaltam össze a doktori értekezésemben.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. Angiogenezis

Az érhalózat biztosítja a szervezet sejtjei számára megfelelő oxigén és tápanyag szintet, tehát létfontosságú szerepe van a mindennapi életben. Az angiogenezis, azaz az érképződés folyamata rendkívül szabályozottan zajlik mind az embrionális fejlődés során, mind a felnőtt szervezetben. Normál esetben felnőtt korban például a sérült szövetek regenerálódása, valamint a női nemi ciklus során figyelhető meg az angiogenezis, csak hogy ezekben az esetekben az érképződés folyamata egy bizonyos idő után leáll [1]. Előfordulnak azonban olyan patológiás folyamatok, mint például a rheumatoid arthritis, ischemia, allergiás dermatitis, valamint a tumor növekedés és metasztázisok kialakulása [1], amikor az érképződést szabályozó, aktiváló faktorok (VEGF, angiopoetin-2, neuropillin-1), valamint gátló faktorok (angiostatin, endostatin, interferon) egyensúlya felborul, és az érképződés kontroll nélkül megy végbe [2]. Ehhez a folyamathoz önmagában nem elég az aktiváló faktorok fokozott termelése, ezen kívül szükség van az antiangiogén molekulák szintjének a csökkenésére is [2]. A továbbiakban a daganatos megbetegedések kialakulása során bekövetkező érképződést szeretném ismertetni.

A tumorok kezdetben nem rendelkeznek saját érhalózattal, ezért növekedésük egy bizonyos idő után leáll az oxigén- és tápanyaghiány következtében. Alacsony oxigénszint, vagyis a hipoxia hatására azonban aktiválódik a hipoxia indukált faktor (HIF-1) és beindítja az érképződés folyamatát [3]. A HIF-1 két alegységből, HIF-1- $\alpha$  és HIF-1- $\beta$  komponensekből épül fel. A HIF-1- $\beta$  a normoxiás sejtekben állandó jelleggel megtalálható, míg a rövid felezési idejű HIF-1- $\alpha$  csak az oxigénhiányos sejtekben mutatható ki, mivel oxigén jelenlétében a prolin hidroxiláz hatására elbomlik [3]. A HIF-1- $\alpha$  megjelenése számos gén transzkripcióját indítja el, beleértve a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), valamint a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) átírását [4,5]. Ezek a molekulák arra ösztönzik az endothél sejteket, hogy fehérjebontó enzimeket, úgynevezett proteázokat kezdjenek el termelni. Ezeknek az enzimeknek a segítségével képesek degradálni az alaphártyát, valamint az extracelluláris mátrixot, így az endothél sejtek kijuthatnak, és

osztódásuk által új, instabil mikroereket hozhatnak létre az inger irányába [6]. Ez az angiogenikus átkapcsolás, vagyis „angiogenic switch” ad lehetőséget a nyugvó daganatnak arra, hogy újra növekedésnek induljon és hatására a tumor áttétképző hajlama is jelentős mértékben megemelkedik, továbbá agresszivitása fokozódik [7].

Az angiogenikus erek olyan receptorokat, úgynevezett biomarkereket expresszálnak, amelyek a normál erekben csak nagyon kis mennyiségben, vagy egyáltalán nem találhatóak meg. Ezek a receptorok lehetőséget biztosítanak a személyre szabott rákellenes terápiák kidolgozására, valamint olyan tumor-diagnosztikai ágensek fejlesztésére, amelyek a daganat detektálását, valamint a terápiák nyomon követését egyaránt megkönnyíthetik, ugyanakkor kevésbé károsítják az egészséges szöveteket.

A tumoros sejtekben fokozottan kifejeződő biomarkerek például az  $\alpha_v\beta_3$  integrinek, az aminopeptidáz N, valamint a galektin-3 receptorok is [8, 9, 10]. Kutatómunkám során olyan radiofarmakonok szintézisét valósítottam meg, amelyek ezekhez a receptorokhoz kötődnek nagy affinitással és szelektivitással, mivel az angiogenezis gátlásán alapuló rákellenes terápiák, valamint a daganatok érképződésének kimutatását célzó diagnosztikai módszerek jelentős mértékben növelhetik a betegség kezelésének a hatékonyságát, és ezáltal a betegek túlélési esélyeit [11].

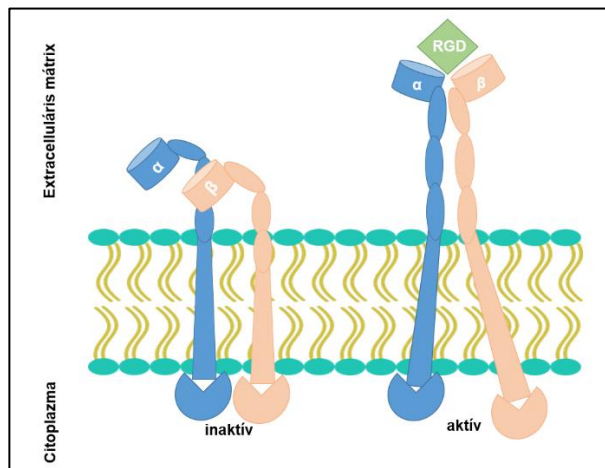
## **3.2. Az angienezis kimutatására alkalmas biomarkerek**

### *3.2.1. Integrinek*

Az integrinek sejtadhéziós, heterodimer transzmembrán glikoproteinek, melyek egy  $\alpha$  (1-18) és egy  $\beta$  (1-8) alegységből épülnek fel [12]. Az  $\alpha$  és  $\beta$  alegységek kombinációja határozza meg a jelátvitel tulajdonságait, valamint a ligandumok specifikus kötődését az integrin receptorokhoz. Az integrinek fontos szerepet töltenek be a sejt-sejt, valamint a sejt-extracelluláris mátrix (ECM) közötti kölcsönhatások kialakításában. Ezek az interakciók nemcsak fizikai jellegűek, hanem különböző jelátviteli utakat aktiválnak [13], melyek hatással vannak a daganatfejlődés különböző folyamataira, úgymint a malignus átalakulás, a tumor növekedés, a progresszió, az invázió, illetve az áttétképzés [14].

Az integrinek közül talán az  $\alpha_v\beta_3$  vesz részt legnagyobb mértékben az érképződés szabályozásában, mivel serkenti az angiogenikus növekedési faktorok (TNF- $\alpha$ , Interleukin-8, FGF-2) termelését, valamint komplexet alkot a VEGF receptorral és az aktivált PDGF faktorról. Az  $\alpha_v\beta_3$  integrin az apoptózis gátlásával elősegíti a neoplasztikus sejtek túlélését, továbbá specifikusan kötődik az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) tripeptid szekvenciát tartalmazó ECM proteinekhez, mint például a fibronectinhez, a fibrinogénhez, a von Willebrand faktorhoz, valamint a vitronektinhez [15]. Ez a kötődés segíti elő az endothél sejtek migrációját.

Az endothél sejteken kifejeződő  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorokra két állapot jellemző. Inaktív állapotban az ECM domain hajlított, tehát az RGD kötőhely rejtve van. Aktív állapotban azonban az ECM domain kiegyenesedik, lehetővé téve az RGD szekvencia kötődését. Az  $\alpha_v\beta_3$  integrinek citoplazmában lévő része sokkal kisebb, mint az ECM-ban található domain, azonban fontos szerepet tölt be az aktiváció során (2. ábra) [16].



2. ábra Az  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor felépítése, és konformáció változása

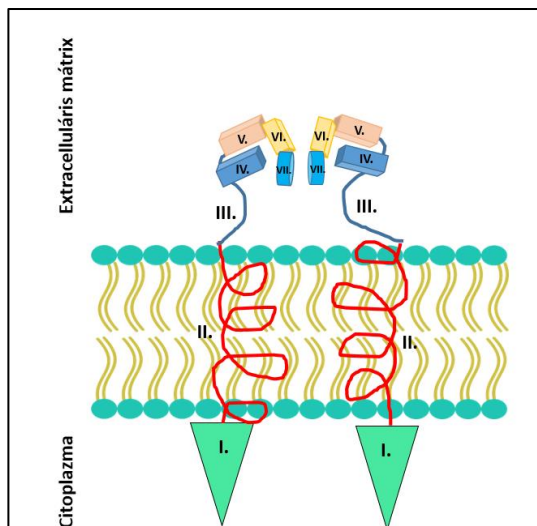
A különböző típusú tumoros sejteken kifejeződő  $\alpha_v\beta_3$  integrinek száma korrelál a betegség progressziójával. Mellrák esetén az  $\alpha_v\beta_3$  megemelkedett szintje összefüggésbe hozható a csontáttekkel [17], valamint szabályozza a neoplasztikus sejtek kemoterápiára adott válaszát [18]. Például a  $\beta_3$  alegység megnövekedett expressziója növeli a tumoros sejtek paclitaxel terápiával szembeni ellenállóképességét [19]. Prostatata karcinóma esetén a csontmetasztázis megjelenése szintén összefüggésbe hozható az  $\alpha_v\beta_3$  integrinokkal [19],

továbbá a melanómák áttétképző hajlama is jól korrelál az integrinek megnövekedett expressziójával [20].

Ezért az  $\alpha_v\beta_3$  integrinek kiváló célpontjai lehetnek a kemo- és célzott radionuklid terápiának. A specifikus kötődést a korábban már említett RGD tripeptid szekvencia biztosítja. A különböző kutatócsoportok által előállított RGD peptid analógok lehetővé teszik a citotoxikus szerek (pl. doxorubicin, paclitaxel), vagy a terápiás radionuklidok (pl.  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) célzott daganatos sejtekhez juttatását, így csökkentve az esetleges mellékhatásokat. Azonban az RGD peptid származékok nemcsak a terápiás gyógyszerhordozó rendszerek targetáló egységei lehetnek, hanem a tumordiagnosztikára alkalmas radiofarmakonoké is.

### 3.2.2. Aminopeptidáz N

Az aminopeptidáz N (APN) vagy más néven CD13, egy cink-függő transzmembrán exopeptidáz, mely 967 aminosavból épül fel, amelyek 7 különböző domént (I-VII) alkotnak [21]. A citoszolban található I-es domén, vagyis N-terminális rész felelős az APN/CD13 sejthez történő rögzítéséhez, a II-es domén pedig egy membránon átívelő, alfa-hélix szerkezetű egység. A III-as domén már a sejten kívül található, és az APN/CD13 katalitikus részét képezi. A IV-es domén nem vesz részt számottevően az enzimatis aktivitásban, azonban az egyik N-glikozilációs hely ebben a tartományban található. Az V-ös és VI-os domén tartalmazza a  $\text{Zn}^{2+}$  kötőhelyet, tehát jelentős szerepük van az enzim aktiválódásának folyamatában. A VII-es domén a C-terminális rész, mely főleg alfa-hélix szerkezetű és felelős a APN/CD13 dimer kialakításáért [21]. (3. ábra).



3. ábra Az aminopeptidáz N/CD13 felépítése

Az APN/CD13 egy multifunkciós glikoprotein, mivel enzim, receptor és jelátviteli molekula is egyben. Az APN/CD13 legalább három különböző mechanizmussal vesz részt az angiogenezis szabályozásában. Egyrészt degradálja az N-terminális végen semleges aminosavval rendelkező ECM proteineket és peptideket, másrészt elősegíti az angiogénikus és/vagy az antiangiogénikus fehérjék termelését, harmadrészt jelátviteli utakon keresztül aktiválja az angiogénikus és növekedési faktorokat [22]. Az aktivált angiogénikus erekben megnövekedett APN/CD13 szint összefüggésbe hozható a daganatok progressziójával, valamint inváziójával, mivel növeli azok áttétképző hajlamát [23]. A kutatók számos APN/CD13-pozitív tumor típust azonosítottak, így például a melanóma, a petefészekrák, a prosztata karcinóma, a tüdődaganat és a mellrák esetében is fokozott APN/CD13 szintet mutattak ki [24]. Ennek megfelelően szükség van olyan molekulák azonosítására, amelyek specifikusan képesek kötődni az APN/CD13 receptorhoz, így lehetővé téve új terápiás gyógyszerhordozó rendszerek, valamint diagnosztikai ágensek fejlesztését, amelyek az APN/CD13-pozitív tumoral diagnosztizált betegek körében javíthatják a rákellenes kezelések hatékonyságát, ezáltal életminőségüket, illetve túlélési esélyeiket.

Pasqualini és munkatársai fág-display technika segítségével kiválasztottak egy aszparagin-glicin-arginin (NGR) tripeptid szekvenciát tartalmazó peptidet, amely kellő

szelektivitással képes kötődni az APN/CD13-hoz, és így kiváló ligandja ennek a receptornak [25]. Továbbá megállapították, hogy bár az APN/CD13 normál szövetekben (pl. mieloid sejtek, prosztata, antigénprezentáló sejtek, keratinociták) is megtalálható, de az NGR alapú peptidek csak az angiogenikus ereken kifejeződő APN/CD13-hoz képesek kötődni. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy a normál szövetekben, valamint az angiogenikus ereken expresszálandó APN/CD13 receptor különböző formában található meg [26]. Ennek köszönhetően az NGR származékot tartalmazó terápiás és diagnosztikai ágensek célzottan a APN/CD13-pozitív tumorokhoz kötődnek [27].

### 3.3. Galektinek

A galektinek a lektinek családjába tartozó fehérjék, amelyek specifikusan képesek felismerni a különböző glikokonjugátumokban (glikoproteinek, glikolipidek) található  $\beta$ -galaktozidokat. Eddig 14 emlős eredetű galektint azonosítottak, amelyeket Hirabayashi és Kasai összefoglaló munkájukban három különböző csoportba soroltak az alapján, hogy milyen molekuláris szerkezettel jellemezhetők [28]. A prototípus (prototype) csoportba tartozó fehérjék 14 kDa tömegűek és egyetlen szénhidrátkötő doménnel (CRD) rendelkeznek. Jellemző rájuk, hogy fiziológias körülmények között nem kovalens kötéssel keresztül dimereket alkothatnak. Ebbe a csoportba tartozik a galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, és -14. A kiméra típusnak jelenleg csak egyetlen képviselője van, a galektin-3, ami egy körülbelül 30 kDa tömegű fehérje. Jellemző rá, hogy multidoménnel rendelkezik, amely egy lektin típusú, azaz egy szénhidrátkötő doménből (CRD) és egy nem lektin típusú N-terminális doménből áll. Az N-terminális domén szerkezete eltér a CRD-től, de hasonlít a heterogén nukleáris ribonukleoprotein komplex szerkezetéhez, valamint az L-myc gén második exonjának felépítéséhez. Az N-terminálisának köszönhetően a kiméra típusú galektin-3 a lektin funkción kívül, más biológiai aktivitással is rendelkezik. A Gal-3-nak ezeket a biológiai funkcióit számos kutatócsoport vizsgálta, akik különböző neveket adtak neki, mint például IgE-kötő protein vagy aktivált makrofág antigén. Az utolsó csoport a tandem-ismétlődő (tandem-repeat) elnevezésű, amelyek körülbelül 32 kDa tömegű galektinek. Az ide tartozó galektinek két szénhidrátkötő doménnel rendelkeznek,

melyeket egy linker köt össze. Ezt a linkert a proteázok könnyen hasíthatják, így a prototípusnak megfelelő hasított fehérjék jönnek létre. Ebbe a csoportba tartozik a galektin-4, -6, -8, -9, és -12.

A következő fejezetekben a galektin család néhány biológiai szempontból fontos tagját szeretném ismertetni.

### 3.3.1. *Galektin-1*

A galektin-1 (Gal-1) a 22q12 kromoszómán az LGALS1 gén által kódolt, 14 kDa tömegű fehérje, amely a prototípusú galektinek közé tartozik [29]. A Gal-1 egy tipikus citoplazma protein, amely homodimer formában is megtalálható a szervezetben. Kristályszerkezetét tekintve két, egymással ellentétes lefutású  $\beta$ -lemezből áll [30]. A Gal-1 létfontosságú szerepet tölt be a daganatképződés során. A Gal-1 fokozott expressziója aktiválja az onkogéneket, és elősegíti a normál sejtek malignus átalakulását, valamint a sejtciklus szabályozásával felgyorsítja a tumorok növekedését [31]. Továbbá a Gal-1 elősegíti a neoplasztikus sejtek migrációját, invázióját [32] és fontos szerepet tölt be a tumor angiogenezis folyamatában is, amelyet  $Lgals1^{-/-}$  állatmodellel igazoltak [33].  $Lgals1^{-/-}$  egerek nem képesek expresszálni a galektin-1 fehérjét és ennek hiányában a daganatok növekedése visszaszorult a vizsgálat során az elégtelen érképződés miatt.

### 3.3.2. *Galektin-7*

A galektin-7 (GAL-7) a 19-es kromoszómán az LGALS7 gén által kódolt, 15 kDa tömegű fehérje, mely a prototípusú galektinek közé tartozik [34]. A Gal-7 megtalálható a citoplazmában, a sejtmagban, és nem klasszikus szekréciós útvonalon keresztül az extracelluláris térbe is szekretálódik. A Gal-7 nagymértékű szöveti specificitással rendelkezik, és expressziója főként a többrétegű hámsejtekre korlátozódik [35]. A Gal-7 expresszióját számos transzkripció faktor szabályozza. Ezen kívül a p53 gén indukálja a Gal-7 expresszióját a vastagbélrákban [36]. Az intracelluláris Gal-7 elősegíti a sejtek apoptózist azáltal, hogy növeli a kaszpáz-3 aktivitását, gyorsítja a citokróm C felszabadulását, valamint fokozza az amino-terminális kinázok működését, amelyek

fontos szerepet töltenek be az epidermális homeosztázis fenntartásában [37, 38]. A Gal-7 ezen kívül részt vesz a sejtek adhéziójában és migrációjában, a sebgyógyulás folyamatában, a daganatok progressziójában, az embrionális fejlődésben, az autoimmun megbetegedésekben, valamint a transzplantációs kilökődés folyamatában [39]. Továbbá a Gal-7 fokozza mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) expresszióját, amely létfontosságú szerepet tölt be a daganat- és áttétképzés folyamatában. Ueda és munkatársai arról számoltak be, hogy SCID egereken végzett vizsgálataik során a galektin-7 fehérjével transzfektált humán vastagbélcarcinóma tumorok (DLD-1-Gal7) lassabban növekedtek, mint a normál DLD-1 tumorok [40]. Valószínűleg a galektin-7-tel transzfektált sejtek érzékenyebbek az apoptózisra, így ezzel magyarázható DLD-1-Gal-7 típusú tumorok lassabb növekedése. Moisan és kutatócsoportja azonban a galektin-7 fokozott expresszióját figyelték meg olyan esetekben amikor a limfóma sejtek közel álltak a metasztatikus állapothoz [41]. Ezek alapján a Gal-7 pozitív és negatív hatást is gyakorolhat a tumorok növekedésére és progressziójára. Ez a jelenség galektin-7 összetett biológiai kölcsönhatásaival, valamint a tumorok heterogenitásával magyarázható [42].

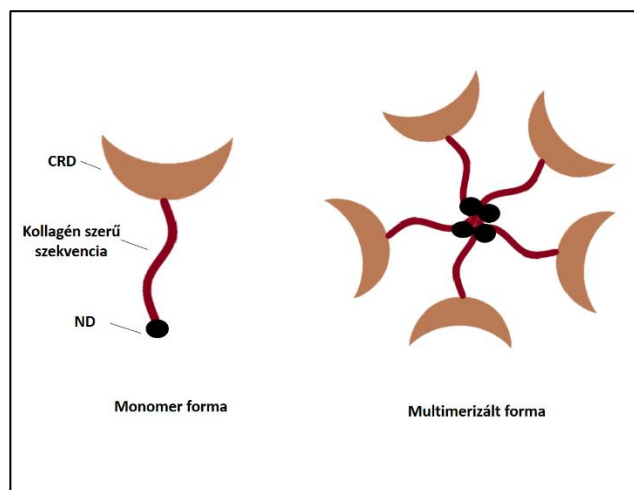
### 3.3.3. *Galektin-9*

A galektin-9 (Gal-9) a 17-es kromoszómán LGALS9 gén által kódolt 36 kDa tömegű fehérje [43]. A Gal-9 két különböző, de homológ CRD-t (N-CRD, C-CRD) tartalmaz, amely a tandem-ismétlődő galektinekre jellemző [44]. A C-CRD határozza meg a receptorfelismerést és aktiválja T sejtek halálát kiváltó szignalizációs utat, míg az N-CRD a dendritikus sejteket aktiválja. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a Gal-9 megtalálható például a májban, a lépben, a gyomorban, a vastagbélben, a nyirokcsomókban és a csontvelőben [43]. Az intra- és extracelluláris Gal-9 különböző ligandumokkal lép kölcsönhatásba, és szabályozza azok biológiai funkcióit. Ilyen ligandumok például a T-sejt immunglobulin mucin-3 (Tim-3), glükóz transzport protein-2, CD44, sejt felszíni fehérje diszulfid izomeráz [43, 45]. A Gal-9 ezekkel a ligandumokkal kölcsönhatásba lépve, a következő folyamatok kialakulásában vesz részt: autoimmun betegségek, transzplantációs kilökődés, fertőzések és daganatok progressziója [43].

### 3.4. Galektin-3 fehérje

#### 3.4.1. A galektin-3 felépítése

A galektin-3 (Gal-3) az egyetlen kiméra szerkezettel rendelkező galektin, mely a humán genomban a 14-es kromoszómán LGALS3 gén által kódolt, körülbelül 30 kDa tömegű fehérje. A Gal-3 egyedülálló szerkezete egy N-terminális doménből (ND), egy ismétlődő, glicinben, prolinban és tirozinban gazdag kollagénszerű szekvenciából, valamint egy szénhidrátfelismerő doménből (CRD) épül fel (4. ábra) [46, 47].



4. ábra A galektin-3 fehérje felépítése

A Gal-3 alapvetően monomer formában található meg a szervezetben, azonban bizonyos körülmények között (pl. magas koncentráció) akár multimerizálódhat is (4. ábra) [46]. A multimerizációért az ND felelős, amely 12 aminosavból épül fel. Az ND azonban érzékeny a szelektív proteolízisre, amelyet a mátrix metalloproteázok MMP-2 és MMP-9 végeznek. Az Ala<sup>62</sup>-Tyr<sup>63</sup> pozícióban történő hasítás után keletkező 22 kDa tömegű hasított származék elősegíti a CRD affinitását a szénhidrát ligandumokhoz, azonban ez által csökken a Gal-3 multimerizációra való hajlama [48]. A CRD körülbelül 130 aminosavból áll, ezek az aminosavak egy gömbszerű szerkezetet hoznak létre, amely helyet ad a szénhidrátkötő helynek. Ezek az információk röntgenkristallográfiás szerkezet-analízisen alapulnak. A vizsgálat kimutatta, hogy a CRD két, ellentétes lefutású

$\beta$ -lemezből áll, amelyek öt (F1-F5) és hat (S1-S6)  $\beta$ -száלבól épülnek fel [49]. A CRD tartalmaz egy különleges aszparagin-triptofán-glicin-arginin (NWGR) aminosav szekvenciát, amely jelentős hasonlóságot mutat a Bcl-2 családba tartozó fehérjék BH1 doménjével, és ez az NWGR rész felelős mind a Bcl-2, mind a Gal-3 anti-apoptotikus aktivitásáért [50].

#### *3.4.2. A galektin-3 fehérje lokalizációja és funkciói*

A Gal-3 intracellulárisan és extracellulárisan is megtalálható a szervezetben, tehát jelen van a sejtmagban, a citoplazmában, a sejtfelszínen, valamint az extracelluláris mátrixban is. A citoszolban található molekulák közül többet is azonosítottak Gal-3 ligandumként (pl. Bcl-2, CD95, synexin), melyek biológiai szerepe rendkívül sokoldalú [51]. Ezért a citoplazmában található Gal-3 fehérje különböző intracelluláris folyamatokban vesz részt, úgymint az apoptózis szabályozása, a sejt proliferáció, valamint differenciáció. A sejtmagban található Gal-3 ribonukleoprotein komplexekhez társul, ezáltal pre-mRNS splicing faktorként funkcionál, ami a spliceoszómák összeállítását segíti elő [52]. Ezen kívül Lin és munkatársai a sejtmagi Gal-3 fehérjét összefüggésbe hozták a gén átíródással is [53]. Az extracelluláris Gal-3 részt vesz az immunreakciókban, az angiogenezis, valamint az áttétképzés folyamatában, ezenkívül elősegíti a tumoros sejtek migrációját, invázióját, valamint adhézióját [52].

#### *3.4.3. Galektin-3 és a tumor angiogenezis*

A Gal-3 fehérjét hipoxia hatására aktiválódó, proangiogenikus faktorként azonosították. Ezenkívül Zeng és munkatársai [52] bebizonyították, hogy a HIF-1 $\alpha$  szabályozza a galektin-3 expresszióját, mivel a HeLa sejteken végzett vizsgálatok során a prolil 4-hidroxiláz inhibitorral (DMOG) kezelt sejtekben jelentősen megemelkedett a Gal-3 mRNS szintje. Markowska és munkatársai [54] demonstrálták, hogy a Gal-3 részt vesz a VEGF, valamint a basic fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) által mediált angiogenezis szabályozásában is. Ennek oka, hogy a Gal-3 szénhidrát felismerő doménje képes kötődni

az  $\alpha\beta_3$  integrineken található GnTV-módosított N-glikánokhoz és ezáltal aktiválódik a FAK-mediált jelátviteli út, ami elősegíti az endothél sejtek migrációját [54]. Ez a kutatócsoport arról is beszámolt, hogy a galektin-3 képes kötődni a VEGFR2 receptorhoz, megakadályozva annak internalizációját, ami fokozott angiogén válaszhoz vezet [55]. D'Haene és munkatársai [56] a VEGFR1 és VEGFR2 receptorok foszforilációját vizsgálták és megállapították, hogy ha a galektin-1 és galektin-3 fehérjéket együttesen adják hozzá az E.A.hy926 endothél sejtekhez, akkor bekövetkezett a foszforiláció. Azonban, ha a galektin-1-et és galektin-3-at külön-külön adják hozzá a sejtekhez, akkor a VEGFR1 receptor foszforilációja nem történt meg. Tehát a VEGFR1 receptor részt vesz a galektin-1 és galektin-3 által kiváltott érképződés szabályozásában [56]. Yang és kutatócsoportja [57] bebizonyította, hogy a Gal-3 képes kölcsönhatásba lépni az APN/CD13 enzimmel is, amely szintén elősegíti az új erek képződését az angiogenezis korai fázisában.

#### *3.4.4. A galektin-3 és a metasztázis*

A daganatos áttétképződés még mindig az egyik legnagyobb kihívást jelenti az onkológusok számára, annak ellenére, hogy sokat fejlődött a diagnosztika, korszerűbbek lettek a műtéti beavatkozások, illetve jelentősen fejlődtek a tumorelles terápiaik is.

Az áttétképzés összetett, több lépésből álló folyamat. Az első lépés a primer daganat növekedésével kezdődik, melynek hatására elindul a primer tumor érképződésének folyamata. Ezt követően néhány neoplasztikus sejt leválik a primer tumorról, melyek keresztüljutnak az extracelluláris mátrixon, és a vérkeringés segítségével szétterjednek a szervezetben. A kapillárisokban a levált tumoros sejtek aggregátumokat alkotnak, melyek onnan a környező szövetekbe jutnak, és növekedésnek indulnak [10].

A galektin-3 részt vesz a sejt-extracelluláris mátrix heterotípusos adhéziójában, amely a primer daganatról történő leválást szabályozza, azáltal, hogy kötődik az extracelluláris mátrix glikokonjugátumaihoz, úgymint a lamininhez, a fibronectinhez, a kollagén IV-hez és az elasztinhoz [51, 58]. Tehát a galektin-3 részt vesz a neoplasztikus sejtek migrációjának és inváziójának folyamatában. A galektin-3 fehérje dimer vagy multimer

formája hozzájárul az áttétképzés folyamata során a vérkeringésbe jutott tumoros sejtek aggregációjához, mindezt a glikokonjugátomokhoz (pl. Mac2-BP) való keresztkötéssel éri el [59]. Ennek megfelelően a galektin-3 indukálja a homotípusos aggregációt, ami növeli az áttétképző-hajlamot. A daganatok áttétképzéséhez elengedhetetlen az extravazáció, vagyis az érrendszerből a környező szövetekbe történő kilépés. A Thomsen-Friedenreich antigén (T antigén), amelynek terminális része  $\beta$ -galaktózt tartalmaz, részt vesz a daganatos sejtek endothélhez való tapadásában. A galektin-3 képes kötődni a T-antigénhez [10]. Amikor a neoplasztikus sejtek és az endothélsejtek egymáshoz tapadnak, az endothélsejteken lévő galektin-3 a tumoros sejtekkel való érintkezés helyére tömörül, a daganatos sejtekben lévő galektin-1 pedig túlnyomóan a sejt-sejt kapcsolatok helyén halmozódik fel [10]. Több tanulmányban is beszámoltak arról, hogy a metasztatikus szövetek nagyobb mértékben fejezik ki a galektin-3 receptorokat, mint a primer tumorok [60].

#### 3.4.5. *Galektin-3 inhibitorok*

A galektinek szénhidrát felismerő doménja (CRD) körülbelül 135 aminosavból áll, amelyek 5 alegységet (A-E) alkotnak. Az alegységeket felépítő aminosavak határozzák meg az egyes galektinek specifitását. Ez az oka annak, hogy a galektinek biológiai szerepe rendkívül sokoldalú [61].

A galektin-3 CRD-je nyolc konzervatív aminosavból (Arg144, His158, Asn160, Arg162, Asn174, Trp181, Glu184, és Arg186) épül fel, ezek felelősek az adott szénhidrát kötődéséért. A galaktóz a legkonzerváltabb C alegységhez kötődik, míg a szénhidrát felismerés szempontjából szintén kiemelten fontos D alegységet egy másik monoszacharid foglalja el, amelyhez a galaktóz  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), illetve  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) interglikozidos kötéssel kapcsolódhat [61]. Az első esetben a monoszacharid lehet glükóz (Glc) vagy *N*-acetil-glükózamin (GlcNAc), míg a második esetben lehet GlcNAc vagy *N*-acetil-galaktózamin (GalNAc).

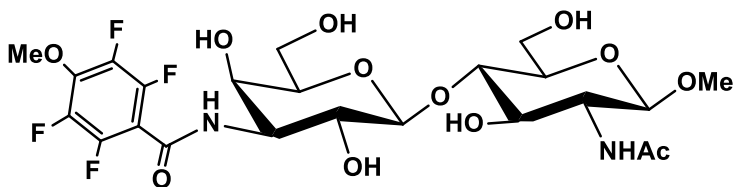
Seetharaman és munkatársai [49] röntgendiffrakciós mérésekkel vizsgálták a humán galektin-3 CRD laktózzal, illetve *N*-acetil-laktózaminnal (LacNAc) képződött komplexét

és az alábbi kölcsönhatásokat mutatták ki. A galaktóz egység 4'-OH csoportja hidrogénkötést alakít ki a His158, az Asn160, és az Arg162 aminosavakkal. Továbbá a galaktóz gyűrűs oxigénje hidrogénkötést létesít az Arg162-vel, valamint Glu184-gyel. A 6'-OH szintén hidrogénkötésen keresztül lép kapcsolatba az Arg162 és Glu184 aminosavakkal. Tehát összesen hét hidrogénkötés alakul ki a galaktóz egység és a galektin-3 CRD-je között. Ezen kívül a galaktóz egység 3'-H, 4'-H, és 5'-H atomjai van der Waals kölcsönhatáson keresztül lépnek interakcióba a Trp181 oldallánccal. Továbbá a *N*-acetyl-glükózamin egység 3-OH csoportja hidrogénkötés alakít ki a Glu184 és Arg162 aminosavakkal. Mivel a laktózamin 2-es helyzetben lévő *N*-acetyl csoportja képes további kölcsönhatásba lépni a Glu165-tel és Arg186-tal, ezért az *N*-acetyl-laktózamin 5-ször nagyobb affinitással kötődik a galektin-3 CRD-jéhez a laktóz molekulához képest.

Azonban ezeknek a természetes ligandumoknak a gátlási hatékonysága alacsony, mivel az 50%-os gátlási potenciált (IC<sub>50</sub>), csak a 0,1-1 mM-os koncentrációtartományban éri el. Ahhoz, hogy ezeket a molekulákat hatékonyan lehessen használni galektin-3 inhibitoroként terápiás vagy diagnosztikai célra legalább 10 mM-os koncentráció alkalmazására lenne szükség a biológiai rendszerekben [62, 63]. Ezért indokolt a minél nagyobb affinitással és specificitással rendelkező galektin-3 inhibitorok szintetikus előállítását. Mivel a galaktóz egység 3'-OH és 2'-OH csoportjai nem lépnek közvetlenül kölcsönhatásba a galektin-3 fehérjével, ezért a C-3' és a C-2' helyzet kémiai módosítása növelheti a receptorhoz való kötődést. A különböző kutatócsoportok a hatékonyabb galektin-3 inhibitorok kifejlesztése során főként a galaktóz egység C-3' helyzetben történő kémiai módosítására összpontosítanak, mivel 3'-OH csoport mutat a CRD mélyedésébe és ezért a galaktóz egység C-3' helyzetben történő meghosszabbítása további kölcsönhatásokat tesz lehetővé a galektin-3 fehérjével, valamint növeli a ligand Gal-3 szelektivitását a Gal-1-hez képest [62].

Sörme és munkatársai [63] számos C-3' helyzetben szubsztitult LacNAc származékot állítottak elő és vizsgálták Gal-3 affinitásukat. A szintézis stratégiájuk az volt, hogy a galaktóz egység 3'-OH csoportját amino csoporttal helyettesítették, amely lehetővé tette különböző csoportok közvetlen kapcsolását az *N*-acetyl-laktózaminhoz. A Gal-3 inhibíciós vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy három a C-3' pozícióban aromás

amidot tartalmazó vegyület jelentősen magasabb inhibitor aktivitással rendelkezik, mint a referenciaként alkalmazott LacNAc metil glikozidja. Például a C-3' helyzetben *p*-metoxi-2,3,5,6-tetra-fluorobenzamid csoportot tartalmazó laktózin származék 50-szer erősebben képes gátolni a galektin-3 proteint, mint a referencia vegyület [63] (5. ábra).



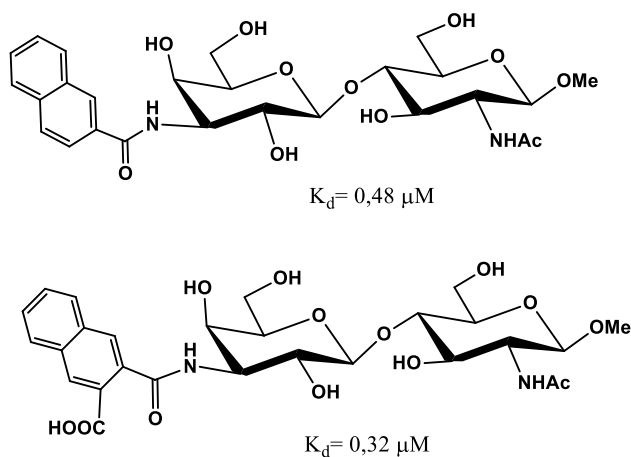
5. ábra: Metil 3-dezoxi-3-N-(4-metoxi-2,3,5,6-tetrafluorobenzamid)- $\beta$ -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4) 2-N-acetil-2-dezoxi- $\beta$ -D-glükopiranozid

Ezenkívül beszámoltak még C-3' helyzetben szulfonamid és karbamid csoportot tartalmazó, valamint 3'-*O*-benzil származékok szintéziséről [64].

Később röntgenfrakciós mérésekkel vizsgálták a 3'-benzamid és 3'-*p*-metoxi-2,3,5,6-tetra-fluorobenzamid csoportot tartalmazó ligandok Gal-3 fehérje CRD-jével alkotott komplexeit [65]. A vizsgálatok alapján megállapították, hogy a benzamid csoport kölcsönhatásba tud lépni a CRD B alegységében található Arg144 oldalláncával, melynek során konformáció változást idéz elő az oldalláncban. Továbbá a benzamido gyűrű beleül egy apoláros zsebbe, amelyet Arg144, Ala146 és Asn160 oldalláncai alkotnak. Ezenkívül egy harmadik kölcsönhatás is segíti az erős kötődés kialakulását, mégpedig az, hogy Arg144 guanidino csoportja kation- $\pi$ , azaz arginin-arén kölcsönhatást képes kialakítani a Gal-3 inhibitor benzamid csoportjával. Ugyanakkor meglepő, hogy a *p*-metoxi-2,3,5,6-tetra-fluorobenzamid csoport – guanidin kölcsönhatás ilyen nagymértékben képes növelni a galektin-3 inhibitorok kötődését, mivel a fluorozott arének elektronszegény  $\pi$ -rendszerrel rendelkeznek, ezért csak gyenge kation- $\pi$  kölcsönhatás kialakítására képesek. A kation és a  $\pi$ -rendszer állandó kvadropól-momentuma közötti elektrosztatikus vonzás nem magyarázza teljes mértékben a kation- $\pi$  kölcsönhatásokat tartalmazó rendszerekben megfigyelt energetikai viszonyokat, ezért figyelembe kell még venni a van der Waals, valamint a  $\pi$ - $\pi$  kölcsönhatások, illetve a töltésátviteli és polarizációs kölcsönhatások hozzájárulását is [66]. Az erős kötődés kialakulását az is segíti, hogy a laktózin származék metoxi csoportja az Arg144 guanidin csoportja között elektrosztatikus

kölcsönhatás alakul ki [67]. Az elektronküldő csoportot (pl. dimetilamino csoport) tartalmazó aromás szubsztituensek erősebb kation- $\pi$  kölcsönhatást képesek kialakítani [65]. A leírt kölcsönhatások alátámasztják, hogy az *N*-acetil-laktózamin alapú galektin-3 inhibitorok affinitását hatékonyan lehet növelni azzal, ha a galaktóz egység C-3' helyzetében aromás szubsztituens alakítunk ki.

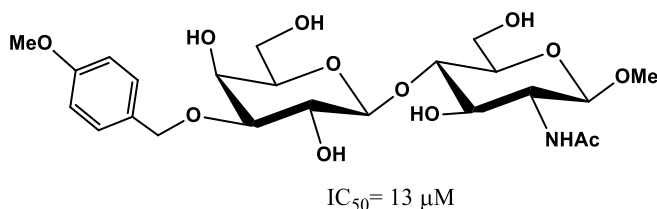
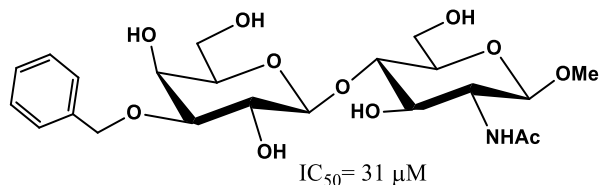
Sörme és munkatársai [65] további 42 C-3' helyzetű aromás amid származékot állítottak elő. A szintetizált vegyületek közül két 2-naftamido származék (6. ábra) mutatott nagyobb inhibitor aktivitást, mint a *p*-metoxi-2,3,5,6-tetra-fluorobenzamid származék ( $K_d = 0,88 \mu\text{M}$ ).



6. ábra: *N*-acetil-laktózamin alapú naftilcsozott amid származékok

Ez azzal magyarázható, hogy a naftil gyűrű kiválóan alkalmas arra, hogy kation- $\pi$ kölcsönhatást alakítsanak ki az Arg144 guanidino csoportjával, valamint, hogy kitöltse az Arg144 C $\beta$  – C $\delta$  hidrofób hasadékot. Ez az oka annak, hogy ezek a származékok kifejezetten jó  $K_d$  értékkel rendelkeznek (A  $K_d = 0,48 \mu\text{M}$ ; B  $K_d = 0,32 \mu\text{M}$ ) [65].

Mivel azonban a C-3'aromás amid, szulfonamid és karbamid származékok előállítására bonyolult, több reakciólépéses folyamat, ezért Sörme és munkatársai [64] próbáltak egyszerűbb szintézisutat választani a galektin-3 inhibitorok előállítására és megvalósították a metil aglikonnal rendelkező *N*-acetil-laktózamin 3'-OH csoportjának regioselectív alkilezését különböző benzil származékokkal sztanilén acetálon keresztül, ezek közül a *p*-metoxi-benzil szubsztituenssel rendelkező galektin-3 inhibitor  $\text{IC}_{50}$  értéke  $13 \mu\text{M}$ -nak adódott [64] (7.ábra).



7. ábra: *N*-acetil-laktózamin alapú benzil éter származékok

Összeségében, tehát elmondható, hogy a laktózamin származékok galaktóz egységének C-3' pozíciójába történő aromás szubsztituens bevezetése nagy affinitással rendelkező galektin-3 inhibitorokat eredményezhet.

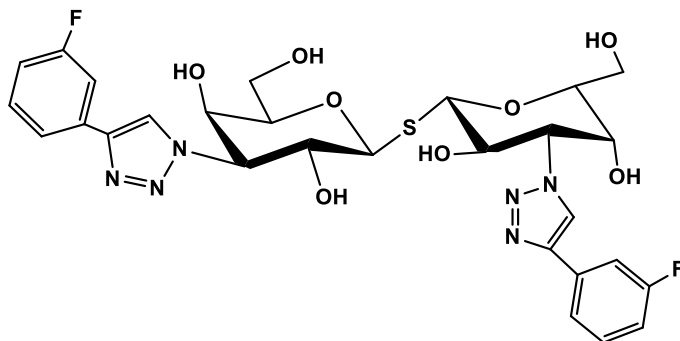
Végül meg kell jegyeznünk, hogy a dolgozat terjedelmi korlátai miatt ebben a fejezetben csak laktózamin alapú inhibitorokról számoltunk be, de ezen a vegyület típuson kívül számos más alapszerkezettel rendelkező Gal-3 inhibitor szintéziséről is olvashatunk az irodalomban, például különböző galaktóz, illetve ditiogalaktózid származékokról. Néhány összefoglaló közlemény pedig kiválóan összesíti ezeket az eredményeket [68, 69, 70].

#### 3.4.6. A galektin-3 inhibitorok klinikai jelentősége

A Gal-3 biológiai jelentőségét tárgyaló korábbi fejezetek egyértelműen alátámasztják, hogy a galektin-3 expressziója szorosan összefügg a malignus transzformációval. Továbbá jelentős diagnosztikai és prognosztikai értéket képvisel a Gal-3 receptor pozitív daganattípusok azonosításában. Iurisci és munkatársai [71] az emlő-, gyomor-, bélrendszeri-, tüdő- és petefészekrákban, melanómában, valamint Hodgkin-limfómában szenvedő betegek szérumában emelkedett galektin-3 fehérje szintet mutattak ki. Xu és munkatársai [72] arról számoltak be, hogy a hámsejt eredetű, rosszindulatú pajzsmirigydaganatok és a papilláris karcinóma nyirokcsomó áttétei is fokozottan

expresszálják a galektin-3 és galektin-1 fehérjéket. Azonban sem a jóindulatú pajzsmirigydaganganatok, sem a környező egészséges szövetek nem mutatnak galektin-1 vagy galektin-3 pozitivitást. Ezek a tanulmányok is alátámasztják, hogy a Gal-3 receptor a tumorellenes terápiák számára ígéretes célfehérje.

A teljesség igénye nélkül megemlítenék néhány, a rákellenes terápiák során eddig alkalmazott galektin-3 inhibitor. A G3-C12 (ANTPCGPYTHDCPVKR) peptid a Gal-3 egyik peptid alapú inhibitora, amelyet fág display technika segítségével választottak ki, és kiváló gátlást ( $K_d = 72$  nM) mutatott a galektin-3-mal szemben [73], a vele végzett preklinikai terápiás vizsgálat során sikeresen megelőzte az emlőrák áttétképzését a tüdőbe [73]. A pektinek olyan összetett poliszacharidok, amelyek főként anhidro-galakturonsavból, galaktózból, és arabinózból állnak, és képesek kötődni a galektin-3 fehérjéhez. Az egyik módosított citruspektin (MCP) a Safescience által fejlesztett GBC-590, amely II-es fázisú klinikai vizsgálatok során képes volt visszaszorítani a vastagbélrákot [74]. A Galectin Therapeutics által fejlesztett GM-CT-01 (Davant<sup>®</sup>) tulajdonképpen egy természetes galaktomannán poliszacharid, melynek átlagos tömege körülbelül 60 kDa. Ez a vegyület a galektin-3-hez is kötődik ( $K_d = 2,9$   $\mu$ M), de galektin-1 inhibitorként is megállja a helyét ( $K_d = 10$   $\mu$ M). A Davant<sup>®</sup> hasznosnak bizonyult a végstádiumban lévő vastagbélrákos betegek körében elvégzett I-es és II-es fázisú klinikai vizsgálatok során [75]. Az egyik leghatékonyabb inhibitor a 3,3'-deoxi-3,3'-bis-(4-[m-fluorofenil]-1H-1,2,3-triazol-1-il)-tio-digalaktozidot (TD139), egy svéd startup, a Galecto Biotech fejlesztette ki (8. ábra). A TD139 kiváló gátlószere mind a galektin-1-nek ( $K_d = 10$  nM), mind a galektin-3-nak ( $K_d = 14$  nM), továbbá az Amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hatóság (FDA) az idiopátiás tüdőfibrózis kezelésére javasolta [74,76].



8. ábra: A TD139 szerkezeti képlete

Diagnosztikai célra azonban eddig csak néhány preklinikai fázisban vizsgált radiojelzett vegyületet állítottak elő, amelyeket egy későbbi fejezetben ismertetek.

### 3.5. Radiokémiai jelölési módszerek

#### 3.5.1. Radiofluorozás

A fluor-18 radionuklid közel 100%-os pozitron bomlási százalékkal (97%  $\beta^+$ -bomlás), alacsony  $\beta^+$ -energiával ( $E(\beta^+)_{\max} = 635 \text{ keV}$ ), valamint ideális, 109,8 perces felezési idővel rendelkezik, tehát a fluor-18 kiválóan alkalmas a PET képalkotásra [77]. A  $^{18}\text{F}$  izotóp előállítását  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$  magreakcióval történik. A target lehet  $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ , vagy  $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$ , attól függően, hogy nukleofil vagy elektrofil szubsztitúcióval történik a fluor-18 beépítése a prekursor molekulába. Az előbbi esetben a  $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$  ion vizes oldata keletkezik, míg az utóbbi esetben  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  és nem radioaktív  $\text{F}_2$  gáz keveréke jön létre, melynek körülbelül az 50%-a a radioaktív  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  gáz [78]. A két kémiai forma közötti különbség a moláris aktivitás értékében mutatkozik meg, ugyanis a nukleofil  $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$  ion moláris aktivitása a  $10^2 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  tartományba esik, míg az elektrofil  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  gázkeverék sokkal alacsonyabb, 100-600  $\text{MBq}/\mu\text{mol}$  moláris aktivitással jellemezhető [79]. Ezért a radiojelzésekhez, a nukleofil fluorozást alkalmazzák elterjedtebben.

A fluorid ion erős nukleofil, viszont vizes közegben, vagy protikus oldószerekben hidrogénkötést hoz létre a környező oldószer molekulákkal, így a fluorid ion reaktivitása jelentősen lecsökken [80]. Tehát a ciklotron által termelt  $[^{18}\text{F}]\text{fluorid}$  ion vizes oldatát dehidratálni kell, annak érdekében, hogy az visszanyerje reaktivitását. A nukleofil

szubsztitúcióval történő radiofluorozáshoz szükséges vízmentes közeg poláros aprotikus szerves oldószerekkel biztosítható, például dimetil-szulfoxiddal, *N,N*-dimetilformamiddal, vagy acetonitrillel [81]. A nukleofil szubsztitúcióval történő radiofluorozás lépései a következők [82]:

- A [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O targettól a [<sup>18</sup>F]fluorid iont anion cserélő oszlop (pl. QMA) segítségével választják el, a módszer során az oszlop megkötö a [<sup>18</sup>F]fluorid ionokat.
- Ezután az oszlopról általában a [<sup>18</sup>F]fluorid iont Kriptofix<sub>222</sub> koronaétert tartalmazó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oldat és acetonitril elegyével eluálják, majd a reaktorba juttatják, ahol azeotróp bepárlással szárazra párolják.
- Ezt követően kerül a reaktorba a jelöltni kívánt prekursor molekula megfelelő vízmentes poláros aprotikus oldószerben oldva, majd viszonylag magas hőmérsékleten (általában 80-120 °C-on) végbemegy a radiojelzés.
- A következő lépésben, ha szükséges, akkor eltávolítják a védőcsoportokat.
- Az előállított nyersterméket különböző kromatográfiás módszerekkel tisztítják a radiokémiai és kémiai szennyeződésektől.
- Végül a tisztított, radiojelzett terméket formulálják, és sterilizálják a klinikai, vagy preklinikai vizsgálatokhoz.

Tehát elmondható, hogy a radiofluorozás vízmentes körülményeket igénylő, általában többlépéses és magas hőmérsékleten végbemenő folyamat. A nukleofil szubsztitúcióhoz szükséges vízmentes körülmények miatt a peptidek és az antitestek közvetlen radiofluorozása nem lehetséges, úgynevezett prosztetikus csoportokra van szükség a radiojelzés kivitelezéséhez [79], ami további reakciólépésekkel hosszabbítja és bonyolítja a radioszintézist.

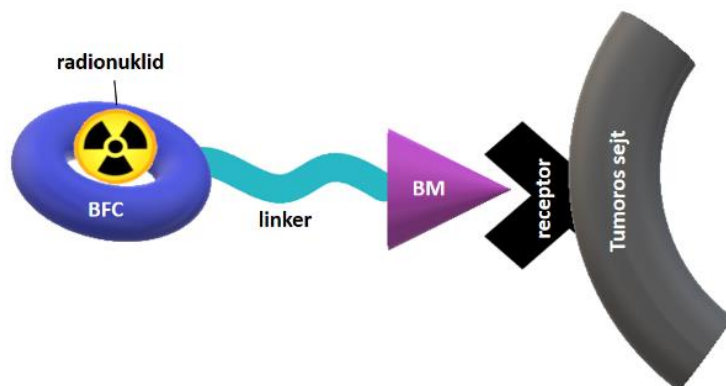
### 3.5.2. *Komplekképzésen alapuló radiokémiai jelzések*

A receptor-ligand kölcsönhatáson alapuló radiofarmakonok egyre nagyobb teret hódítanak, mind a molekuláris képalkotás, mind a célzott radioterápia területén. Ennek oka, hogy ezzel a módszerrel a radionuklidokat célzottan a rákos szövetekhez lehet

juttatni, ami magasabb tumor-háttér arányt eredményez és az egészséges szövetek sugárterhelése is alacsonyabb lesz.

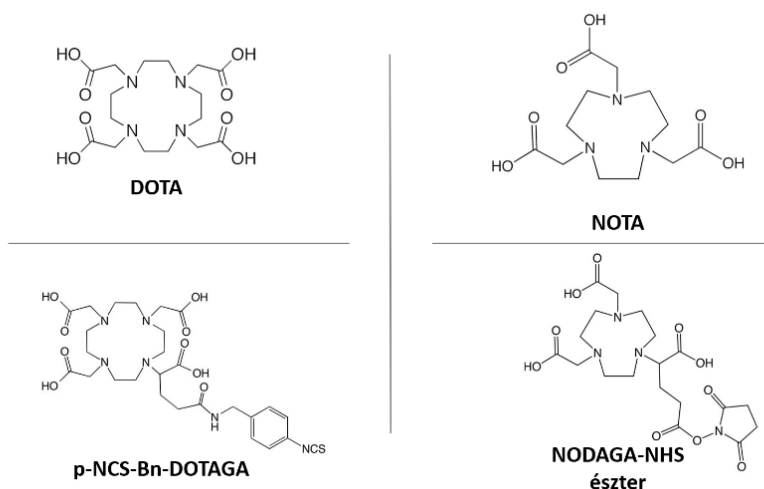
A target-specifikus radiógyógyszerek alapját általában peptidek, vagy antitestek képezik és radiokémiai jelzésükhöz olyan módszerre van szükség, amely lehetőleg vizes közegben egyszerűen kivitelezhető, valamint viszonylag gyorsan, azaz néhány perc alatt megvalósítható. Az antitestek jelzése során az alacsony hőmérséklet is fontos szempont. A komplexképzésen alapuló radiokémiai jelzés rendelkezik ezekkel a tulajdonságokkal és a módszer hatékonyságát bizonyítja a számos ismert  $^{99m}\text{Tc}$ -jelzett SPECT radiofarmakon népszerűsége. Másik motiváló erő, hogy egyre elterjedtebbek a diagnosztikai (PET) és terápiás célokra használható radio-fémizotópok kiváló nukleáris tulajdonságaik miatt. A fémizotópokkal történő jelzések kivitelezéséhez a biológiailag aktív molekulát egy komplexképzőhöz kell kapcsolni. Azonban figyelembe kell venni, hogy a komplexáló ágens jelenléte jelentős szerkezeti változást eredményez, amely befolyásolhatja a radiojelzett molekula farmakokinetikai tulajdonságait, illetve csökkentheti a targetáló, azaz vektor egység receptorhoz való kötődését.

Ennek megfelelően a target-specifikus radiofarmakonok szerkezete négy, jól elkülöníthető aleggységre bontható: radionuklid, bifunkciós kelátor, linker, biológiailag aktív (vektor) molekula [83]. A bifunkciós kelátor (BFC) egyrészt koordinálja a jelzéshez választott radioaktív fémizotópot, másrészt valamilyen linkeren (pl. farmakokinetikai módosító) keresztül biológiailag aktív molekula (BM) kapcsolható hozzá, amely a receptorokhoz történő specifikus kötődést biztosítja (9. ábra).



9. ábra Target-specifikus radiofarmakonok felépítése

A radioaktív fémizotóp komplexálását végző bifunkciós kelátornak számos követelménynek kell megfelelni, melyek közül talán a legfontosabb a fémkomplex nagymértékű stabilitása *in vivo* körülmények között. Ez azért nagyon fontos, mert a radionuklid kilépése a komplexből radiotoxicitáshoz vezet, továbbá a diagnosztikai radiofarmakonok esetében a kép minőségének romlását is okozza. Fontos, hogy az alkalmazott BFC megfelelő töltéssel rendelkezzen, gyűrűmérete a radioaktív fémizotóp ionsugarához igazodjon, valamint a központi atomhoz viszonyítva, optimális mennyiségben tartalmazzon donoratomokat [84]. A 10-es ábrán látható kelátorokat elterjedten alkalmazzák a nukleáris medicina alap-, illetve klinikai kutatásaiban.



10. ábra A nukleáris medicinában gyakran alkalmazott komplexképzők

A PET képalkotáshoz pozitron sugárzó fémizotópok szükségesek, ilyenek például a  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 67,71$  min, 89%  $\beta^+$ -bomlás,  $E(\beta^+)_{\text{mean}} = 890$  keV) [85], a  $^{44}\text{Sc}$  ( $t_{1/2} = 3,97$  h, 94,27%  $\beta^+$ -bomlás,  $E(\beta^+)_{\text{mean}} = 630$  keV), a  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2} = 12,7$  h, 17,4%  $\beta^+$ -bomlás,  $E(\beta^+)_{\text{mean}} = 278$  keV) és a  $^{52}\text{Mn}$  ( $t_{1/2} = 5,59$  nap, 29,6%  $\beta^+$ -bomlás,  $E(\beta^+)_{\text{mean}} = 240$  keV). Figyelembe véve a biológiai felezési időket a rövidebb felezési idejű  $^{44}\text{Sc}$  vagy  $^{68}\text{Ga}$  izotópok főként a peptidek radiojelzésére alkalmasak, míg az antitesteket általában a hosszabb felezési idejű  $^{64}\text{Cu}$  vagy  $^{52}\text{Mn}$  radionukliddal célszerű jelölni [86]. A teljesség igénye nélkül a terápiás fémizotópok közül is megemlítenék néhányat, ide tartozik például a  $^{177}\text{Lu}$  ( $t_{1/2} =$

6,7 nap,  $\beta^-$ -bomlás,  $E(\beta^-)_{\text{mean}} = 497 \text{ keV}$  [87], az  $^{90}\text{Y}$  ( $t_{1/2} = 2,67 \text{ nap}$ ,  $\beta^-$ -bomlás,  $E(\beta^-)_{\text{mean}} = 2280 \text{ keV}$ ) és a  $^{213}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 46 \text{ perc}$ ,  $\alpha$ -bomlás,  $E_\alpha = 440 \text{ keV}$ ) [88].

A  $^{68}\text{Ga}$  izotópot előszeretettel alkalmazzák mind a preklinikai, mind pedig a klinikai kutatások során, főként a peptid alapú prekursorok radiojelzéséhez. Népszerűségének egyik oka, hogy a gallium-68  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátorból nyerhető, tehát azokban a PET centrumokban is elérhető, amelyek nem rendelkeznek ciklotronnal. A kereskedelmi forgalomban kapható generátorok zárt rendszerek és lényegében egy árnyékoló konténerben lévő, kromatográfiás oszlopból állnak, amelyek egy egyensúlyban lévő anyaelem keveréket tartalmaznak.

A  $^{68}\text{Ge}$  anyaelemet  $^{69}\text{Ga}_2\text{O}_3(p, 2n)^{68}\text{Ge}$  magreakció segítségével ciklotronban állítják elő, felezési ideje 270,8 nap [89]. Az előállított  $^{68}\text{Ge}$  anyaelemet abszorbeálják egy kromatográfiás oszlophoz, melynek mátrixát szerves fémoxidok (pl.  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$ ), valamint szerves pirogallol-formaldehid gyanták alkotják [89]. Az anyaelem mellől a  $^{68}\text{Ga}$  radionuklid szelektíven eluálható, leggyakrabban a sósav különböző koncentrációival (0,05 M – 5,5 M), azonban az etiléndiamin-tetraecetsav, vagy 8-hidroxiquinolin is alkalmas lehet a leányelem szelektív elúciójára [90]. Nagyon fontos a megfelelő kromatográfiás oszlop megválasztása, ugyanis a  $^{68}\text{Ge}$  anyaelem áttörése a klinikai felhasználás során radiotoxicitást okozhat. Ezen kívül a kromatográfiás oszlop anyagából származó nem kívánatos fémszennyeződések (pl. Sn, Ti, Al) zavarhatják a radiokémiai jelzéseket [91]. Egy másik jelentős probléma, hogy a  $^{68}\text{Ga}$  leányelem bomlása során stabil  $\text{Zn}^{2+}$  keletkezik, ami a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátor állása során felhalmozódhat. A felhalmozódott  $\text{Zn}^{2+}$ , mint fémszennyező szintén zavarhatja a radiojelzést, valamint negatívan befolyásolhatja a moláris aktivitás értékét. Ezért a radiokémiai szintézisek előtt 1 nappal, de legalább 4 órával érdemes úgynevezett tisztító elúciót végezni a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátoron, annak érdekében, hogy a cink szennyezőtől megszabaduljunk. A  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátor eluálása során nyert teljes  $^{68}\text{Ga}$  eluátumot nem használják fel közvetlenül radiojelzésre, egyrészt a fentebb említett okok következtében, másrészt az eluátum nagy térfogata (5-10 ml), valamint magas savtartalma (0,1 N – 1 N) miatt. Ezen problémák kiküszöbölésére három különböző gallium utófeldolgozási módszert dolgoztak ki a különböző kutatócsoportok:

Az anioncserés tisztítási módszer lényege, hogy magas sósav koncentráció (> 5,5 M) mellett a  $\text{Ga}^{3+}$  ion negatív töltésű  $[[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_4]^-$  komplexszé alakul át, ami kvantitatív módon adszorbeálható egy erős anioncserélő gyantához (pl. AG 1×8), miközben a kationok és a szerves szennyezők szelektíven eltávolíthatók mellőle. Ezután kis mennyiségű vízzel lehet eluálni a csökkenő protonkoncentráció következtében visszaalakuló  $\text{Ga}^{3+}$  iont az oszlopról [92].

A kationcserélő tisztítási módszer esetében alacsony sósav koncentráció (0,05 M, 0,1 M) alkalmazható, tehát a  $\text{Ga}^{3+}$  ionos formában marad, amely erős kationcserélő gyantához köthető (SCX). Mivel az áttört  $^{68}\text{Ge}(\text{IV})$  anyaelem nem kötődik az ioncserélő oszlophoz, ezért sikeresen elválasztható a  $^{68}\text{Ga}$  leányelemtől. A további fémszennyeződések (pl. Ti, Fe, Al, Zn) a 0,15 M HCl/aceton (20:80) elegyével moshatóak le az oszlopról. Végetetül az aceton tartalom növelésével (98%) a  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  ion a radiokémiai jelzéshez megfelelő formában elulálható le az oszlopról [93].

A harmadik technika a fracionált elúció, mely a legegyszerűbben kivitelezhető és a legelterjedtebben alkalmazott eljárás. A módszer hatékonyságát az biztosítja, hogy az elúció során a  $^{68}\text{Ga}$  leányelem aktivitásának Gauss-görbéhez hasonló eloszlása van, ami eltér a szennyezést okozó fémionok elúciós profiljától. A generátor elúciója során több frakció gyűjtésére kerül sor, melyek aktivitását gamma számláló segítségével határozzák meg. A radiojelzésekhez, pedig a legmagasabb aktivitás-koncentrációjú frakciókat használják (1-2 ml). A módszer során teljesen nem lehet megszabadulni a fémszennyezőktől, viszont az összmennyiségük jelentősen csökken a kisebb térfogatnak tulajdoníthatóan. Ez az alacsony fémkoncentráció már nem befolyásolja a komplexképzési folyamatot [94].

A  $^{68}\text{Ga}$  radionuklid  $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$  magreakció segítségével ciklotronban is előállítható, mely költséghatékony megoldást jelent a ciklotronnal rendelkező PET centrumoknak. Lin és munkatársai [95] ciklotron segítségével a következő módon állították elő a pozitron sugárzó  $^{68}\text{Ga}$  fémizotópot: targetként 7 mm átmérőjű 60-120 mg tömegű  $^{68}\text{Zn}$  izotóppal dúsított korongot alkalmaztak, melyet először platina korongon galvanizáltak 0,05 N HCl oldat segítségével. Ezt követően a targetet behelyezték a ciklotronba, majd 14,5 MeV energiájú, 15-40  $\mu\text{A}$  áramerősségű protonnyalábbal

sugarazták be. A besugárzást követően a targetet pneumatikusan hozták ki. Az előállított  $^{68}\text{Ga}$  radionuklidot szintézispanelen tisztították. A target kihozatala után a besugárzott korongot 10 N HCl-val oldották fel, majd a nyers  $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Zn}$  oldatot AG<sup>®</sup> 50W-X4 kationcserélő gyantát tartalmazó oszlopra vitték fel.  $^{68}\text{Zn}$  és további fémszennyeződések 10 N HCl-val történő mosás segítségével távolították el. Ezt követően a  $^{68}\text{Ga}] \text{GaCl}_3$ -ot 4 N HCl-val deszorbeálták, majd UTEVA<sup>®</sup> gyantát tartalmazó oszlopra vitték fel. Ezt az oszlopot 4 N HCl-val mosták, majd a  $^{68}\text{Ga}] \text{GaCl}_3$ -ot 0,05 N HCl-val eluálták. Az így kapott  $^{68}\text{Ga}] \text{GaCl}_3$  oldatot további tisztítás nélkül használták fel a jelzési reakciókhoz.

Kutatómunkám során a radiojelzésekhez felhasználtam  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátor eluciójával nyert, valamint ciklotronban előállított  $^{68}\text{Ga}] \text{GaCl}_3$  oldatot is.

### **3.6. Peptid alapú radiogyógyszerek farmakokinetikájának javítására alkalmas kémiai módosítások**

A peptidek kevesebb, mint 50 aminosavból álló, kis molekulású ( $< 5500$  Da), biológiai és orvosi szempontból is kiemelten fontos molekulák. Az utóbbi időben több peptid alapú terápiás szert fejlesztettek ki a különböző betegségek, úgymint a diabétesz, a szklerózis multiplex, vagy a daganatos betegségek kezelésére [96]. A peptidek terápiás vagy diagnosztikai alkalmazásának számos előnye van a fehérjékkel vagy az antitestekkel szemben [97]:

- kisméretűek
- viszonylag egyszerű az előállításuk
- nagy affinitással és specificitással kötődnek a receptorokhoz
- hamar kiürülnek a vérből és a nem célzott szövetekből
- jobb tumor-háttér arányt biztosítanak
- alacsony toxicitással és immunogenitással jellemezhetők
- farmakokinetikai tulajdonságaik könnyebben módosíthatóak
- a kelátor-konjugált peptidek radiojelzése fémizotópokkal könnyen megvalósítható

- a radiofémek jelzésekre szükséges bifunkciós kelátorok viszonylag könnyen kapcsolhatóak hozzájuk
- jobban ellenállnak a kémiai vagy radiokémiai reakciók során alkalmazott erősebb körülményeknek, mint az antitestek.

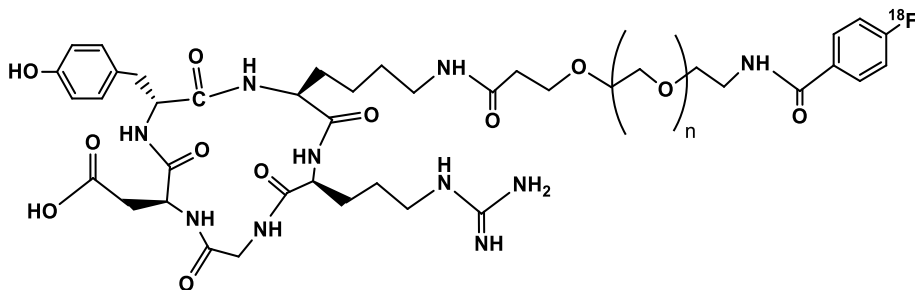
Hátrányuk azonban, hogy általában rövid biológiai felezési idővel ( $t_{1/2} = 2-30$  perc) rendelkeznek. Ennek egyik oka a szervezetben jelenlévő proteázok, amelyek enzimatisz hasítással degradálják a peptideket. A másik oka pedig, hogy a glomeruláris filtráció által a vesén keresztül hamar kiválasztódnak alacsony molekulatömegük miatt [98]. A proteázokkal szembeni ellenállóképesség javítására több módszer is rendelkezésre áll, például megfelelő D-aminosav alkalmazása, a peptid kötés szubsztitúciója, az amino csoportok cseréje imino csoportokra, ciklizáció, nem hasítható izosztérikus kötés kialakítása, terminális-fedési eljárás (pl. N-terminális vég acetilálása, vagy a C-terminális karboxil-amiddá alakítása), vagy peptid mimetikumok alkalmazása [99].

### 3.6.1. D-Aminosavak alkalmazása a peptid szekvenciában

A természetben megtalálható peptidek egészen kismértékű *in vivo* stabilitással jellemezhetők, ami korlátozza a terápiás vagy diagnosztikai jellegű felhasználásukat. Mivel a peptidázok csak az L-aminosavakat ismerik fel, ezért ezt az előnyt kihasználva sokszor D-aminosavakat, vagy nem természetes aminosavakat építenek be az előállítani kívánt peptidekbe, mely által stabilitásuk jelentősen növelhető. Például a c(RGDxX) pentapeptid analógok 4-es pozícióban D-fenilalanint (f = D-Phe), D-tirozint (y = D-Tyr), vagy D-triptofánt (w = D-Trp) tartalmaznak, melyek elengedhetetlenek az  $\alpha_v\beta_3$  integrinekhez történő kötődés során [99]. Ennek megfelelően a következő módosított RGD származékokat, az cRGDfK és a cRGDyK peptideket, mint  $\alpha_v\beta_3$  integrin antagonistákat, előszeretettel alkalmazzák a kutatócsoportok a különböző radiógyógyszerek előállítása során. Ennek oka, hogy ezek a pentapeptidek nagy affinitással és szelektivitással képesek kötődni az  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorhoz [96].

### 3.6.2. Pegilálás

A peptidek *in vivo* stabilitását gyakran oligomerekhez, polimerekhez történő konjugálással is biztosítják. A legelterjedtebb ilyen típusú módszer, amikor a peptidet polietilén-glikol (PEG) rövidebb, hosszabb fragszéhez kapcsolják kovalens kötésen keresztül [100]. A pegilálás késlelteti a peptidek eliminációját, azáltal, hogy a molekulába beépített PEG egység hatására megnő a molekulatömeg, így a peptidek glomeruláris filtrációja visszaszorul, ezenkívül a proteolízist is gátolja. Tehát a megfelelő hosszúságú PEG egységgel történő szerkezetmódosítás növeli a peptidek biológiai felezési idejét [101], így növeli a célzott szövet radiofarmakon-felvételét. Például Chen és munkatársa [102] egy  $^{18}\text{F}$  izotóppal jelzett c(RGDyK) molekulát agytumor leképezésére alkalmaztak és receptor specifikus tumorfelvétellel jellemezték. Azonban a radiotracer hepatobiliáris eliminációja, valamint gyors kiürülése a tumorból korlátozta a klinikai felhasználását. Ennek kiküszöbölésére az eredeti molekulába, a 4- $^{18}\text{F}$ fluoro-benzoil ( $^{18}\text{F}$ FB) prosztetikus csoport és az RGD közé PEG (M.W. 3400) egységet építettek be (11. ábra).



11. ábra:  $^{18}\text{F}$ FB-PEG-RGD szerkezete

U-87 MG tumormodellen végzett biodisztribúciós vizsgálatok alapján megállapították, hogy a pegilált jelzett vegyület hamar kiürült a vérből, ugyanakkor lassabban távozik a tumorból és így magasabb a tumor radiofarmakon-felvétele ( $2,56 \pm 0,12$  %ID/g, 2 h) az eredeti  $^{18}\text{F}$ FB-RGD molekulához képest ( $1,56 \pm 0,35$  %ID/g, 2h). Ezen kívül a  $^{18}\text{F}$ FB-PEG-RGD kezdeti felhalmozódása a vesében lényegesen magasabb volt, mint a  $^{18}\text{F}$ FB-RGD-é ( $8,1 \pm 0,3$  %ID/g vs.  $3,2 \pm 0,3$  %ID/g 30 percnél) [84]. Ezekből az értékekből arra következtethetünk, hogy a pegilált jelzett molekula a pegilálás hatására hidrofilebb lett és főleg vesén keresztül ürül ki, ami magasabb tumor-háttér



A radiogyógyszer képalkotó és farmakológiai tulajdonságait M21 humán melanóma xenograft modellen, valamint egér osteoszarkómán vizsgálták. Mindkét esetben magas tumorfelvételt tapasztaltak. A szervieloszlás vizsgálatok eredménye azt mutatta, hogy a [<sup>18</sup>F]F-Galacto-RGD főként a vesén keresztül ürül, valamint gyorsan kiválasztódik a vérből és az izomszövetből is, amely kedvező tumor-háttérarány értékeket eredményezett [104].

### 3.7. RGD alapú radiofarmakonok

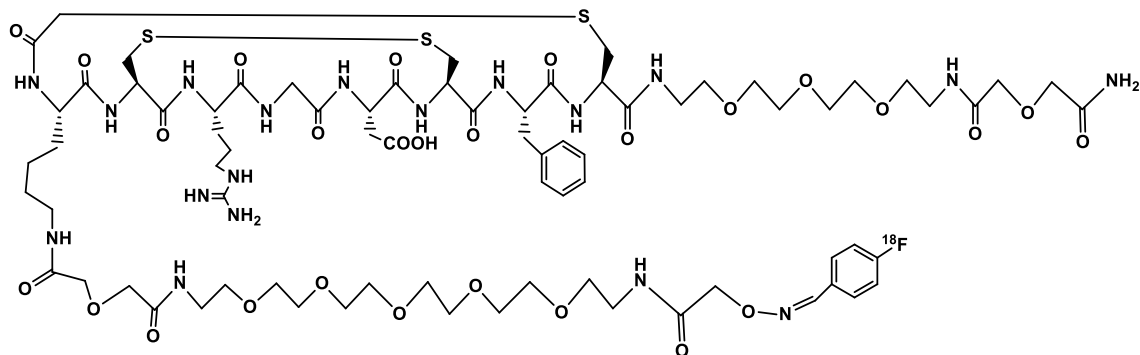
#### 3.7.1. <sup>18</sup>F-jelzett RGD peptidek

Mivel a <sup>18</sup>F felezési ideje jól korrelál a peptidek *in vivo* biológiai felezési idejével, ezért számos esetben alkalmazták RGD peptidek radioaktív jelzéséhez [105]. A peptidek radiofluorozása kihívást jelent a radiokémikusok számára, mivel jelzésük úgynevezett prosztetikus csoportokon keresztül valósítható meg, amelybe a <sup>18</sup>F radionuklid beépítése nukleofil szubsztitúcióval történik. Ezt követően ezt a radiojelzett molekulát konjugálják hozzá a megfelelően funkcionizált peptidhez [79].

Az első nyíltláncú radiofluorozott RGD peptid származékot Bansal és munkatársai [106] állították elő. Az általuk elvégzett biodisztribúciós vizsgálatok alapján azonban ezek a radiojelzett nyíltláncú peptidek gyorsan lebomlottak a szervezetben, anélkül, hogy specifikus halmozódást mutattak volna a tumorban. Ezt a jelenséget a szervezetben jelenlévő peptidázoknak tulajdonították. Ezen kívül fokozott máj-és vesefelvételt is tapasztaltak.

Az enzimatis hasítással szembeni ellenálló képességet a nyíltláncú RGD peptidek ciklizációja, valamint az aminosavak nem természetes D konfigurációjának a beépítése (pl. d-Phe) biztosíthatja, továbbá megoldást kellett találni a hepatobiliáris kiválasztódás csökkentésére is. Ezt a peptidek különböző kémiai módosításával érték el, például glikozilációval (pl. a korábban már említett [<sup>18</sup>F]F-Galacto-RGD [104]), hidrofil aminosavak bevitelével, illetve polietilén-glikollal (PEG) történő konjugálással. Ezek a kémiai módosítások növelték a molekulák hidrofil jellegét, ezáltal a kiválasztódás a vese irányába tolódott. Erre példa a GE Healthcare által fejlesztett integrin-specifikus PET

radiofarmakon, a [ $^{18}\text{F}$ ]fluciclatide [107], amellyel már klinikai vizsgálatokat is végeztek. A radioszintézis prekursora az aminosaxi csoportot tartalmazó RGD peptid származék, melyet AH111585-nek neveztek el. A molekula radiofluorozásához *p*-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorobenzaldehid prosztetikus csoportot alkalmaztak (13. ábra).



13. ábra: [ $^{18}\text{F}$ ]fluciclatide szerkezete

Az előállított radiogyógyszer előnyös farmakokinetikai tulajdonságai valószínűleg a PEG egység beépítésének köszönhetőek, míg a diszulfid híd a degradáció minimalizálását segítette elő. Humán vizsgálatok [108] során különböző mértékű radiofarmakon-felvételt tapasztaltak a léziókban, azonban standardizált felvételi értékek (SUV) minden esetben 2.0 és 40.0 között voltak. Ezek az értékek jól korreláltak a [ $^{18}\text{F}$ ]F-Galacto-RGD alkalmazása során kapott értékekkel.

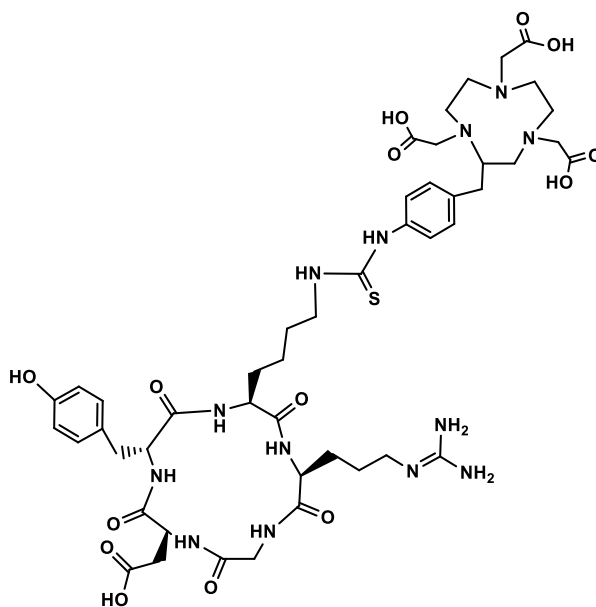
### 3.7.2. $^{68}\text{Ga}$ -jelzett RGD származékok

#### 3.7.2.1. Monomerek

A peptidek radiojelzését jelentősen egyszerűsítették a komplexképzésen alapuló módszerek. A pozitron sugárzó  $^{68}\text{Ga}$  fémizotóp megfelelő nukleáris tulajdonságokkal rendelkezik a PET képalkotáshoz, közel 68 perces felezési ideje pedig jól korrelál a kis molekulású peptidek biológiai felezési idejével. Mindezen tulajdonságok alapján, számos  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett RGD peptid analóg előállításával találkozhatunk az irodalomban.

Jeong és munkatársai [109] írták le a  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGD radiofarmakon szintézisét. A prekursor molekula előállítását, a ciklikus pentapeptid, nevezetesen c(RGDyK) peptid lizin oldalláncának amino csoportja, valamint a tioizocianáto-benzil csoporttal

funkcionalizált NOTA bifunkciós kelátor közötti tiokarbamid kötés kialakításával valósították meg (14. ábra).

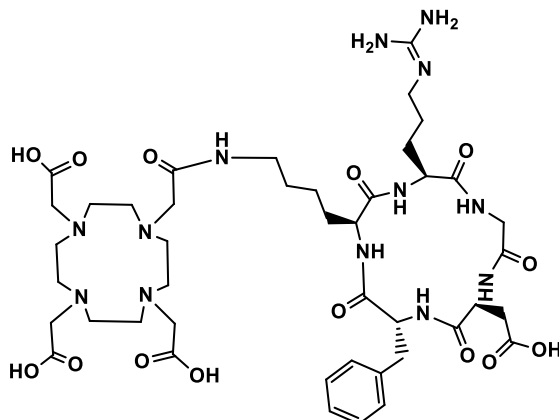


14. ábra: NOTA-RGD szerkezete

Az előállított  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGD hatékonyságát humán vastagbélrák (SNU-C4) xenograft modellen végezték. A biodisztribúciós vizsgálatok alapján magas tumor/háttér arányokat (tumor/izom (T/M) 9,3; tumor/vér (T/B) 10,3) mértek [109]. Az első klinikai vizsgálat során 6 májattétellel rendelkező vastagbél-daganatos beteget vizsgáltak [ $^{18}\text{F}$ ]F-FDG-vel, valamint [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD-vel [110]. Három páciensnél közepesen emelkedett tumorfelvételi értékeket mértek a májattéteknél, a másik három beteg vizsgálati eredménye azonban negatív volt. Az antiangiogenikus terápiát (FOLFOX, bevacizumab) követően ismételtén megvizsgálták a klinikai tanulmányba bevont 6 beteget. A PET felvételek alapján megállapították, hogy azoknál a betegeknél, akiknél a terápia előtt emelkedett [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD tumorfelvételt tapasztaltak, részlegesen reagáltak a kezelésre. A másik három beteg esetében, akik [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD radiofarmakonnal végezett PET felvétele negatív volt az antiangiogenikus terápia előtt a kezelés hatástalannak bizonyult [110].

Decristoforo és kollégái [111] írták le a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-RGD radiotracer (15. ábra) szintézisét. A c(RGDfK) pentapeptidet terc-butil-észter csoportokkal szelektíven védett

DOTA kelátorhoz konjugálták, kapcsolószerként HATU-t, a racemizáció csökkentésére 1-hidroxi-7-azabenzotriazolot, bázisként diizopropil-etilamint, oldószerként pedig *N,N*-dimetil-formamidot alkalmazták.

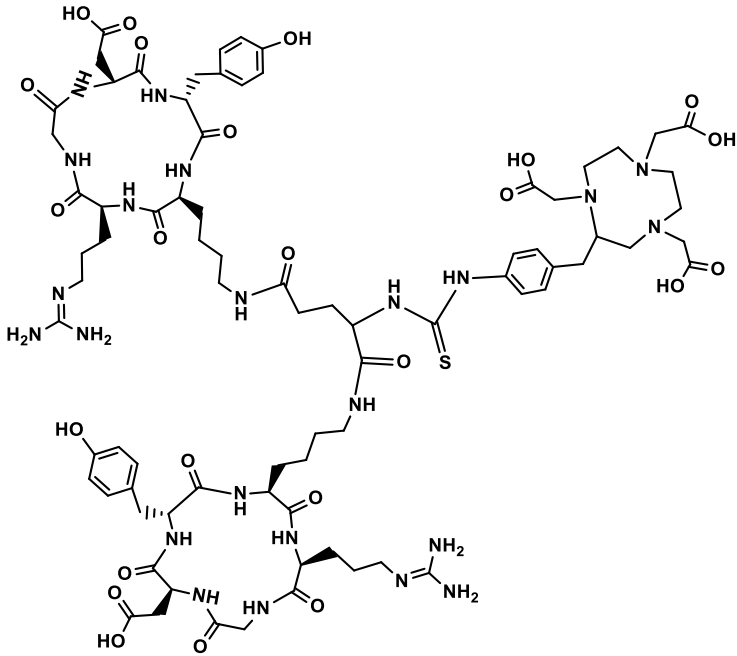


15. ábra: DOTA-RGD szerkezete

Az *in vivo* preklinikai vizsgálatokat M21 humán melanóma xenograft modellen végezték. A szervi eloszlás vizsgálat és a PET felvételek alapján elmondható, hogy a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-RGD}$  dúsult az  $\alpha_v\beta_3$  pozitív M21 melanóma tumoros sejtekben, de ugyanakkor alacsonyabb tumor-háttér arány jellemzi a  $[^{18}\text{F}]\text{F-Galacto-RGD}$ -hez képest [111].

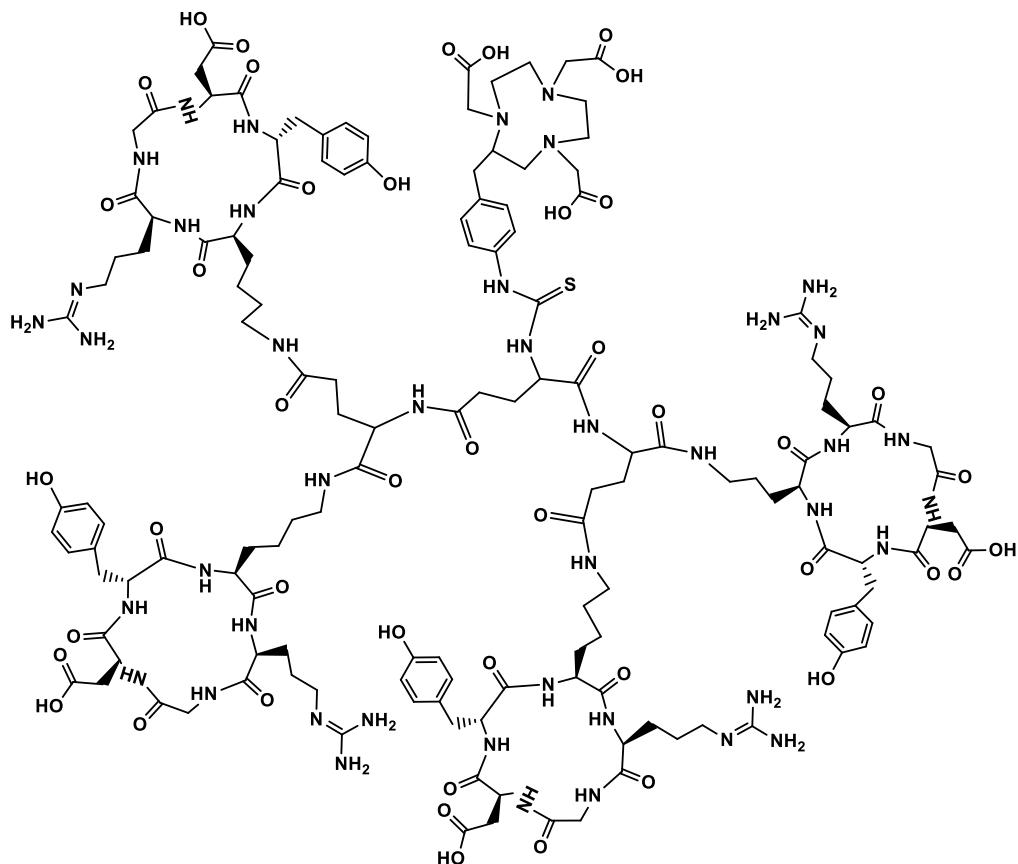
### 3.7.2.2. Multimerek

A tumor radiofarmakon-felvételének a javítására szolgáló egyik hatékony módszer az úgynevezett multimerizáció, amikor a jelzett vegyület több vektormolekula részletet tartalmaz. Ebben a fejezetben ilyen típusú RGD származékokat mutatok be. Például a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-RGD2}$  (16. ábra) és a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-RGD4}$  (17. ábra) multimerek szintézisét és biológiai vizsgálatát Li és munkatársai [112] publikálták. A dimer és tetramer RGD peptid analógokat p-SCN-Bn-NOTA kelátorhoz konjugálták  $\text{NaHCO}_3$  pufferben (pH = 9).



16. ábra: NOTA-RGD2 szerkezete

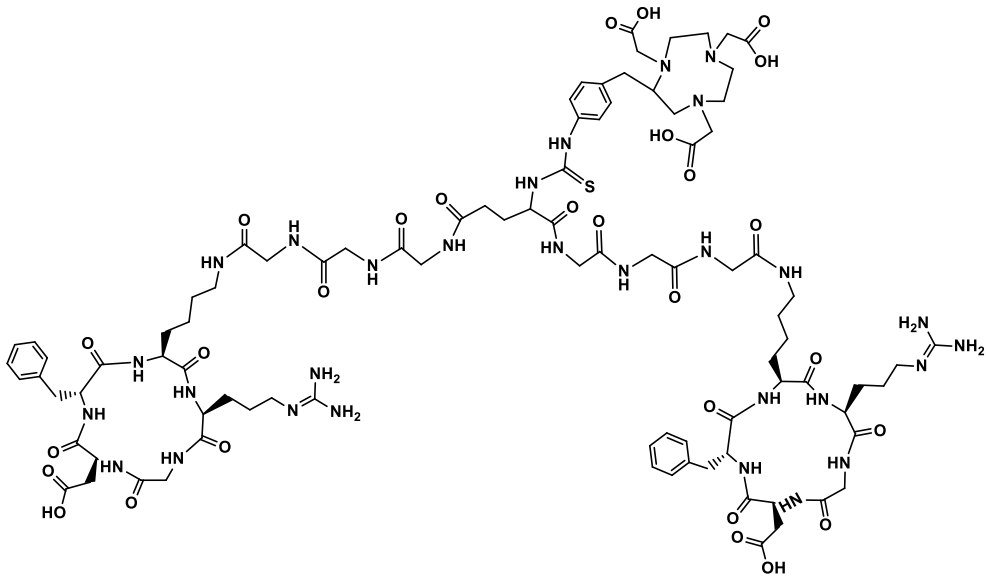
A preklinikai vizsgálatokhoz humán glioblasztóma U87MG xenograft modellt alkalmaztak. Standard vegyületként pedig a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-RGD}$ -t használták. Az elvégzett biológiai vizsgálatok alapján azt tapasztalták, hogy mindhárom radiofarmakon kiváló tumorfelvételt mutatott, valamint a vesén keresztül ürült.



17. ábra: NOTA-RGD4 szerkezete

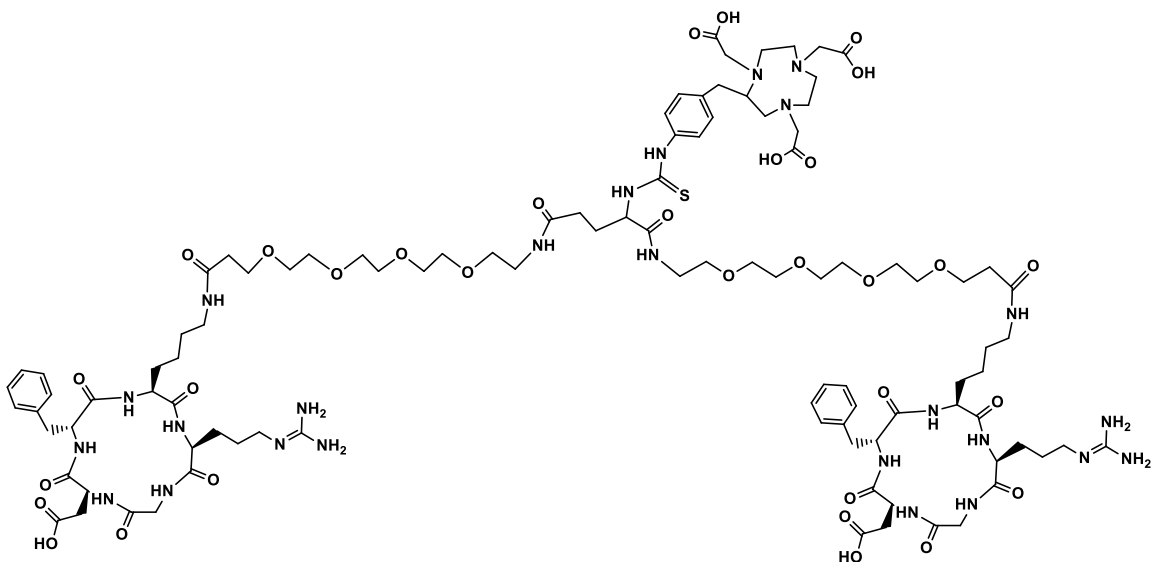
A legmagasabb tumorfelvételi értékeket [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD4 radiotracer esetében tapasztalták, ezt követte a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD2, majd a standardként alkalmazott [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD. Azonban [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD4 vesefelvételi értéke majdnem a kétszerese volt a másik két radiofarmakonhoz viszonyítva, ezért a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD4 radiotracer klinikai alkalmazását nem javasolják [112].

Liu és munkatársai [113] tovább folytatták a kutatást, céljuk az  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorhoz való kötődés növelése, valamint a farmakokinetikai tulajdonságok javítása volt. Ennek érdekében két új E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> dimer peptid származékot fejlesztettek ki. A glicin-glicin-glicin (Gly<sub>3</sub>) tripeptid szekvenciát tartalmazó E[Gly<sub>3</sub>-c(RGDfK)]<sub>2</sub>-t (18. ábra), valamint az oligoetilénlikol (PEG<sub>4</sub>) egységeket tartalmazó E[P<sub>4</sub>-c(RDGfK)]<sub>2</sub> peptidet (19. ábra).



18. ábra: NOTA-G<sub>3</sub>-RGD<sub>2</sub> szerkezete

Mindkét RGD származékot p-SCN-NOTA kelátorhoz konjugálták a fentebb már említett módon. Referencia vegyületként a NOTA-RGD<sub>2</sub> dimert alkalmazták. A biológiai vizsgálatok alapján megállapították, hogy a két új [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-G<sub>3</sub>-RGD<sub>2</sub>, valamint a [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-P<sub>4</sub>-RGD<sub>2</sub> radiotracer nagyobb affinitással kötődik az αvβ<sub>3</sub> integrin receptorhoz, mint a referencia vegyület.

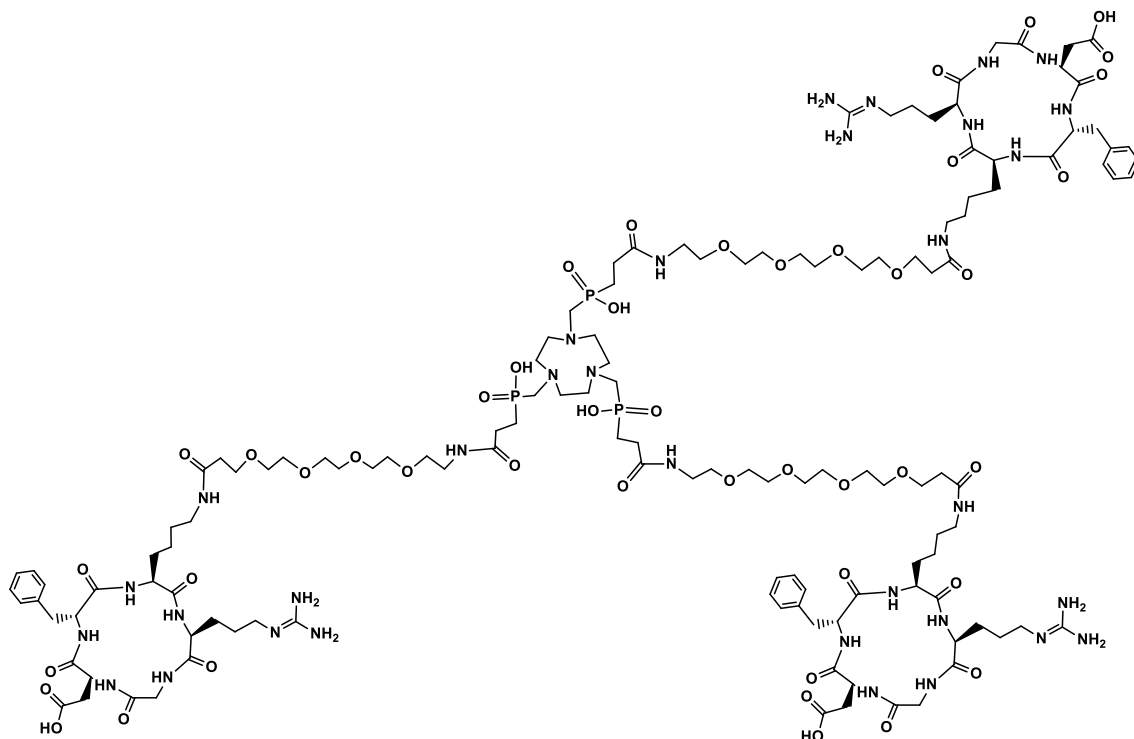


19. ábra: NOTA-P<sub>4</sub>-RGD<sub>2</sub> szerkezete

Ez valószínűsíthetően annak köszönhető, hogy a linkerek (Gly<sub>3</sub>, PEG<sub>4</sub>) beépítésével az RGD peptid egységek között megnövelték a távolságot. Ezen kívül a [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-

G<sub>3</sub>-RGD<sub>2</sub>, valamint a [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-P<sub>4</sub>-RGD<sub>2</sub> radiofarmakonok a beépített linkereknek köszönhetően kiváló farmakokinetikai tulajdonságokkal is rendelkeznek, tehát ígéretes jelöltek lehetnek a klinikai felhasználás szempontjából [113].

Notni és kutatócsoportja fejlesztette ki a [<sup>68</sup>Ga]Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub>, másnéven a [<sup>68</sup>Ga]Ga-Avebetrin radiofarmakon szintézisét [114] (20. ábra).



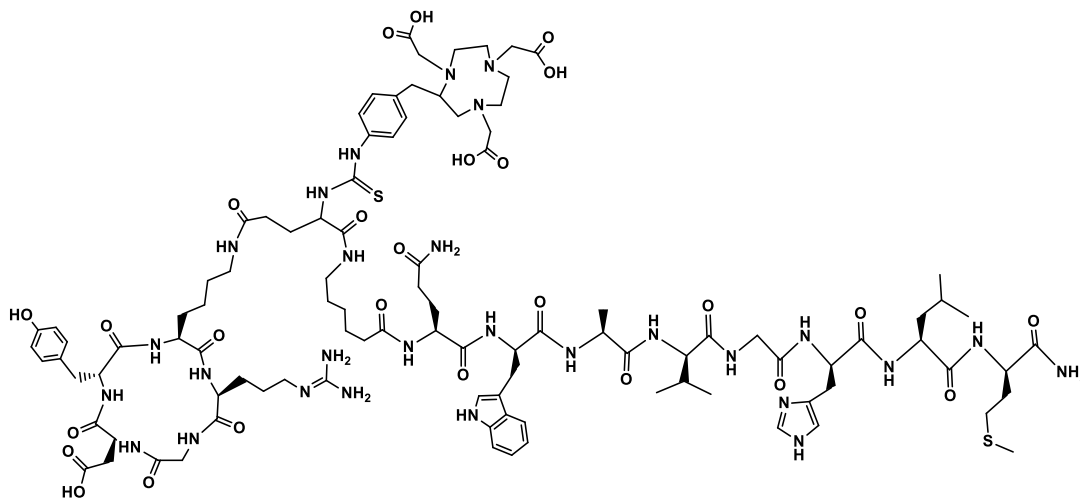
20. ábra: TRAP-RGD<sub>3</sub> szerkezete

Az újonnan előállított vegyület  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorhoz való kötődését összehasonlították a [<sup>18</sup>F]F-Galacto-RGD-vel, valamint a [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-RGD-vel. A kapott eredmény alapján a [<sup>68</sup>Ga]Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> affinitása az  $\alpha_v\beta_3$  integrin felé 7,3-szor volt nagyobb, mint a [<sup>18</sup>F]F-Galacto-RGD-jé, valamint 7,6-szor volt nagyobb, mint a [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-RGD-jé. A biológiai vizsgálatokat M21/M21L humán melanoma xenograft modellen végezték. A [<sup>68</sup>Ga]Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> tumorfelvétele ( $6.08 \pm 0.63\%$  ID/g) szignifikánsan magasabb volt, mint a [<sup>18</sup>F]F-Galacto-RGD ( $1.35 \pm 0.53\%$  ID/g), és [<sup>68</sup>Ga]Ga-NOTA-RGD ( $1.45 \pm 0.11\%$  ID/g) radiofarmakonoké. Ezen kívül a [<sup>68</sup>Ga]Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> kiváló farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, ugyanis a vesén

keresztül ürül, valamint magas *in vivo* stabilitással is jellemezhető, ezért alkalmas radiofarmakon az  $\alpha\beta_3$  kimutatására PET képalkotással [114].

### 3.7.2.3. Heterodimer

A tumor radiofarmakon-felvételét növelni lehet úgynevezett kettős targetálású, heterodimer radiotracerek alkalmazásával is. A módszer azon a megfigyelésen alapul, hogy egyes tumor típusok képesek különböző receptorokat nagyobb mértékben expresszálni. Erre jó példa az androgén-független prosztatarák, amely nagymértékben fejezi ki az  $\alpha\beta_3$  integrin, valamint a gasztrin releasing peptid receptorokat (GRPR). Ennek a tumortípusnak a kimutatására fejlesztették ki a pozitronsugárzó  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett bombesin (BBN) és RGD alapú heterodimer radiofarmakont [115] (21. ábra).



21. ábra: NOTA-BBN-RGD szerkezete

A bombesin analóg a GRPR-hez, míg az RGD származék az  $\alpha\beta_3$  integrin receptorhoz kötődik nagy affinitással és szelektivitással. A referencia vegyületek előállításakor az RGD, valamint BBN peptid analógot p-SCN-NOTA kelátorhoz konjugálták külön-külön, továbbá ezt a kelátort alkalmazták a heterodimer előállításakor is. A radiofarmakonok hatékonyságát humán prosztatarák (PC-3) xenograft modellen vizsgálták. Az *in vivo* PET felvételeken a  $^{68}\text{Ga}$ -Ga-NOTA-BBN-RGD tumorfelvétele magasabb volt, mint a két referencia vegyületé, de a  $^{68}\text{Ga}$ -Ga-NOTA-RGD standardhez viszonyítva sokkal magasabb volt a heterodimer radiofarmakon tumor akkumulációja. Továbbá a

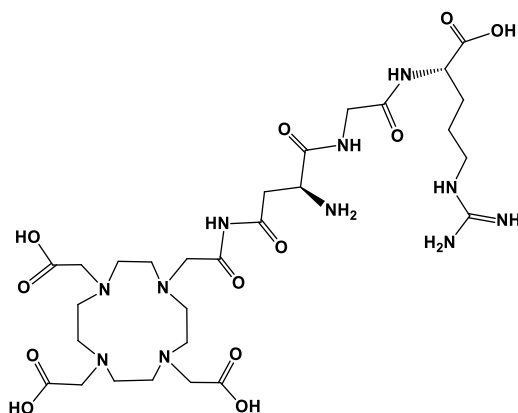
heterodimer farmakológiai tulajdonságai is javultak a monomerekhez képest [115]. A [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-BBN-RGD heterodimerrel klinikai vizsgálatokat is végeztek [116], amely alapján a radiofarmakon biztonságosnak és hatékonynak bizonyult mind a primer és mind a nyirokcsomó és csontáttétes prosztatarák kimutatására PET képalkotással, valamint felhasználásával hasznos információ nyerhető a tumor stádiumbeosztásáról, valamint a terápiára adott válasz hatékonyságáról.

### 3.8. NGR alapú radiofarmakonok

#### 3.8.1. Monomerek

Az irodalomban fellelhető néhány különböző bifunkciós kelátorokhoz konjugált NGR peptid származék előállítása és *in vivo* vizsgálata, melyeket általában PET képalkotást lehetővé tévő pozitron emittáló  $^{68}\text{Ga}$  vagy  $^{64}\text{Cu}$  radiofémekkel jelzettek.

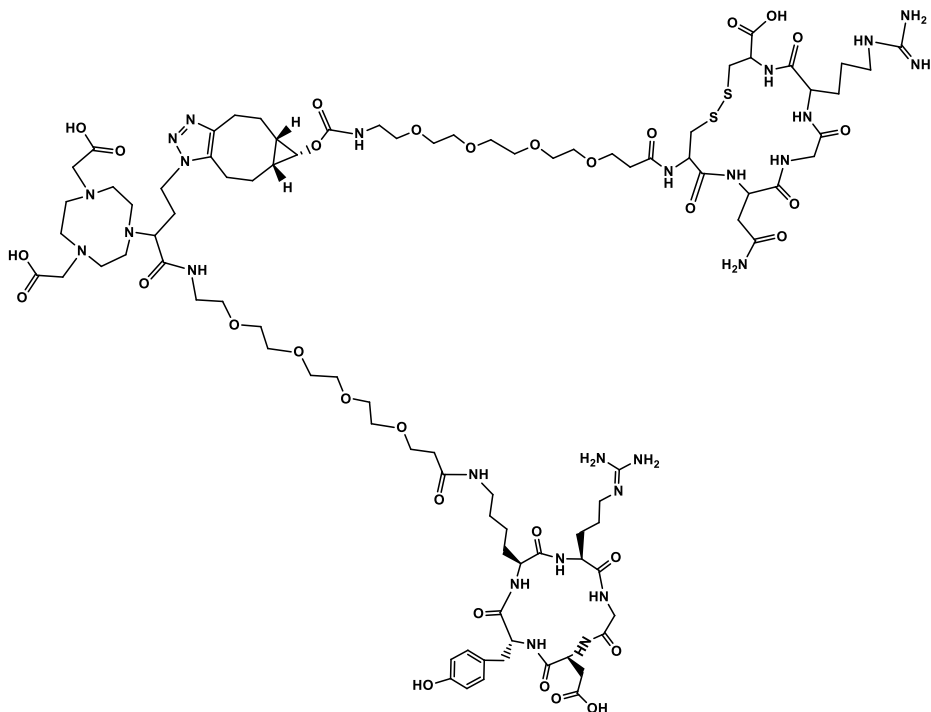
Zhang és munkatársai [117] egy  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett nyíltláncú NGR származék képalkotó tulajdonságait vizsgálták. A nyíltláncú NGR peptid analógot DOTA kelátorhoz konjugálták (22. ábra), majd az így előállított DOTA-NGR prekuzort  $^{68}\text{Ga}$  izotóppal jelölték.



22. ábra: DOTA-NGR szerkezete

A preklinikai vizsgálatokhoz APN/CD13-pozitív humán kissejtes tüdőcarcinóma (A549) xenograft modellt alkalmaztak. A biodisztribúciós vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-NGR radiotracer viszonylag gyorsan távozik a vérből, illetve főként a vesén keresztül ürül. A többi szervben, főleg a hasi részen alacsony





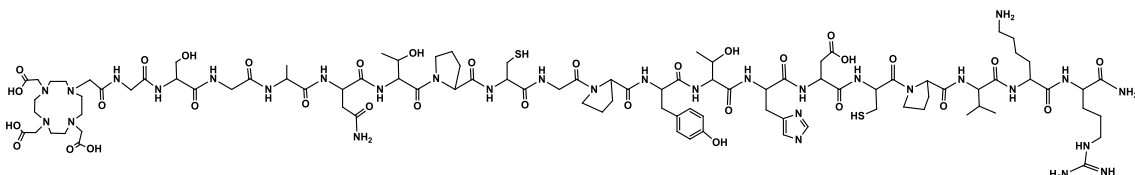
24. ábra: NOTA-RGD-NGR szerkezete

A radiojelzett [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NOTA-RGD-NGR hidrofil sajátságú, amelyet mind a biodisztribúciós vizsgálatok, mind az oktanol/víz megoszlási hányados meghatározása is alátámasztott. Az *in vivo* PET/CT képalkotás során a radiotracer dúsult a vizsgált tumorban, azonban a heterodimer tumor akkumulációját indokolt lenne még javítani [119].

### 3.9. Radiojelzett galektin-3 inhibitorok

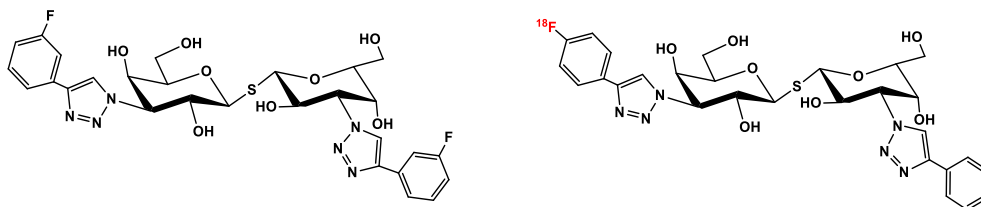
Deutscher és munkatársai [120, 121] radiojelölték a fág display által kiválasztott Gal-3 inhibitorokat, a G3-C12 (ANTPCGPYTHDCPVKR) peptidet, valamint a gal-3SP (PPKGDVHTNRTYACC) peptidet, amelyeket glicin-szerin-glicin tripeptid spaceren keresztül konjugáltak a DOTA kelátorhoz szilárd fázisú peptidszintézis során. Az előállított DOTA-(GSG)-G3-C12, és DOTA-(GSG)-gal-3SP prekursorokat gamma sugárzó  $^{111}\text{In}$  radionukliddal ( $t_{1/2} = 2.8$  nap) jelölték. Az [ $^{111}\text{In}$ ]In-DOTA-(GSG)-G3-C12 radiotraceret magas, 65,4 GBq/ $\mu\text{mol}$  moláris aktivitással állították elő. Az *in vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat, valamint a SPECT képalkotást humán MDA-MB-435

mellrák [120], valamint humán PC3-M prosztata karcinóma xenograft modelleken [121] végezték. Mindkét esetben jó tumorfelvételi értékeket tapasztaltak, valamint a radiofarmakonok gyorsan kiürültek a vérből és a vesén keresztül távoztak a szervezetből. MicroSPECT/CT felvételeken a PC-3M, valamint az MDA-MB-435 tumorok jól vizualizálhatóak voltak. Tehát az elvégzett preklinikai vizsgálatok alapján az előállított [<sup>111</sup>In]In-DOTA-(GSG)-G3-C12 alkalmas a galektin-3 pozitív tumorok kimutatására.



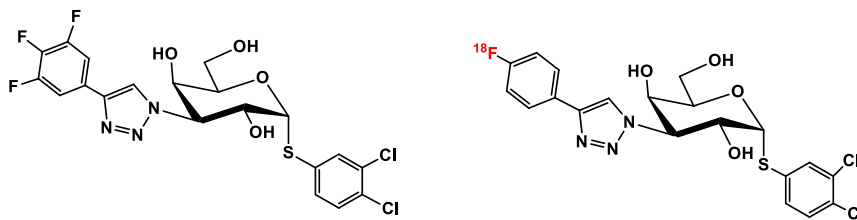
25. ábra: DOTA-(GSG)-G3-C12 szerkezete

Bratteby és munkatársai [122] két glikomimetikus gyógyszerjelölt, az idiopátiás tüdőfibrozis kezelésére javasolt TD139 diszacharid, valamint a tüdő adenokarcinóma kezelését szolgáló GB1107 monoszacharid radiofluorozott analógjainak *in vivo* farmakokinetikáját vizsgálták PET képalkotással (26-27. ábra).



26. ábra: A TD139 diszacharid és <sup>18</sup>F-jelzett analógjának szerkezete

Először megvizsgálták a tervezett nem radioaktív fluorozott analógok affinitás profilját és összehasonlították az eredeti molekuláéval. A TD139 helyettesítésére szánt vegyület hasonló mértékben kötődött a galektin-3 fehérjéhez, mint a TD139 ( $K_d = 5$  nM és 2 nM). A GB1107 monoszacharid helyettesítésére szánt molekula 10-szer gyengébben kötődött a galektin-3-hoz, mint az eredeti vegyület ( $K_d = 357$  nM és 37 nM).



27. ábra: A GB1107 monoszacharid és <sup>18</sup>F-jelzett analógjának szerkezete

A radiofluorozott vegyületeket magas radiokémiai tisztasággal állították elő. Az *in vivo* biodisztribúciós vizsgálatok alapján a két gyógyszerjelölt eltérő szisztémás hatékonysággal jellemezhető, ugyanis a TD139 molekulát helyettesítő radiojelzett származék hamar kiválasztódott, míg a GB1107 monoszacharidot helyettesítő PET tracer lassabban ürült ki a szervezetből, így az utóbbi alkalmas a szisztémás felhasználásra. A PET felvételeken azt tapasztalták, hogy egyik radiofluorozott vegyület sem alkalmas a galektin-3 expresszió kimutatására hasnyálmirigyrák esetén, ugyanis a radiofluorozott diszacharid túlságosan gyorsan eliminálódott a szervezetből, míg a monoszacharid lassú eliminációja jelentősen rontotta a tumor-háttérarányt [122].

D'Alessandria és munkatársai [123] írták le a DFO komplexképzővel konjugált Gal-3 specifikus monoklonális patkány antitest (M3/38)  $^{89}\text{Zr}$  radionukliddal történő radiokémiai jelzését és preklinikai vizsgálatát. Az *in vivo* immunoPET vizsgálatokat három különböző pajzsmirigy daganat modellen végezték el. Az FRO82-1, a WRO82-1, és a BCPAP daganatos sejtekkel oltott egerek farokvénájába injektálták a  $^{89}\text{Zr}$ -mal jelölt monoklonális antitestet, majd 48 óra múlva készítették el a PET felvételeket. A statikus PET/CT felvételek magas tumor/háttér aránnyal voltak jellemezhetőek, amelyeken jól elkülöníthető volt a tumor elhelyezkedése. Tehát az előállított immunoPET radiofarmakon alkalmas a Gal-3 pozitív pajzsmirigyrák detektálására [123].

## 4. Eredmények

### 4.1. Célkitűzés

A kutatómunka során  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett laktózin tartalmú PET diagnosztikai ágensek előállítását tűztük ki célul. A laktózin egység beépítésével egyrészt peptid alapú radiofarmakonok farmakológiai tulajdonságait szeretnénk volna javítani, másrészt a daganatok progressziójában fontos szerepet betöltő galektin-3 receptort nagyobb mértékben expresszáló tumorok kimutatására alkalmas laktózin alapú radiogyógyszerek fejlesztését terveztük. Mivel a laktózin ismert liganduma a Gal-3 receptornak, ezért a peptid vektor molekulát és laktózin származékot is tartalmazó jelzett vegyületek kettős targetálást tesznek lehetővé, és ez a módszer növelheti a tumor radiofarmakon-felvételét [115]. Ezeket a vegyületeket heterodimereknek is nevezik, szintézisükhöz pedig az irodalomból ismert, angiogenezis kimutatására szolgáló cRGD valamint cNGR peptid származékokat választottuk. Mindkét peptidre magas májfelvétel jellemző, amely kedvezőtlenül befolyásolja a klinikai felhasználást [103]. Mivel a peptidok kis molekulásúlyuk miatt, valamint a szervezetben jelenlévő proteázok következtében rövid biológiai felezési idővel is rendelkeznek, ezért a jelzett vegyületek farmakokinetikai tulajdonságainak javítására a glikoziláció mellett pegilálást is alkalmaztunk.

A heterodimer radiofarmakon előállításához a szintézis-stratégia a következő volt. A laktózin konjugálását a peptid molekulához klikk reakcióval terveztük, ezért azido-propil aglikonnal láttuk el. Míg a bifunkciós kelátort a laktózin amino csoportjához terveztük kapcsolni.

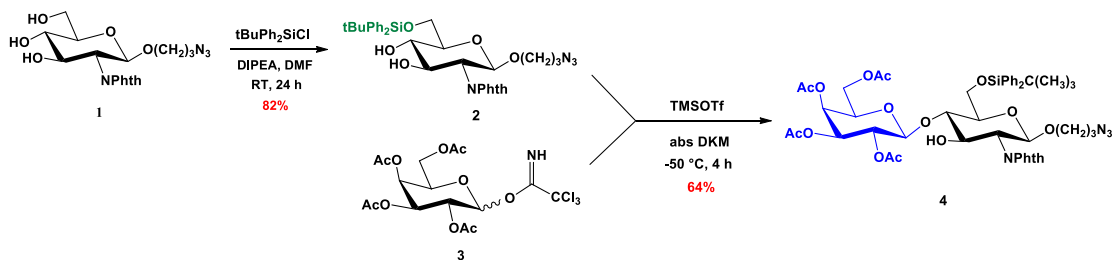
A kutatómunka során előállított jelzett laktózin származékok biológiai vizsgálata alapján nyilvánvalóvá vált, hogy hatékony, a Gal-3 receptor kimutatására alkalmas radiofarmakon előállításához szükség van arra, hogy a laktózin egység affinitását növeljük a galektin-3 fehérjéhez, amelyet kémiai módosítással terveztük megvalósítani. Irodalmi adatok alapján a galaktóz egység C-3' pozícióba történő aromás szubsztituens beépítésével hatékonyan lehet növelni a laktózin galektin-3 receptorhoz történő kötődését. Erre a célra (2-naftil)metil csoportot választottuk, amelyet a laktózin 3'-

hidroxil csoportjának regioszelektív alkilezésével terveztük kialakítani, annak reményében, hogy az ily módon módosított, valamint pozitron sugárzó izotóppal jelzett származékok alkalmasak lesznek a galektin-3 pozitív tumor sejtek detektálására PET képalkotással.

## 4.2. NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> szintézise és radiokémiai jelzése <sup>68</sup>Ga izotóppal

### 4.2.1. Kémiai szintézis

A szintézist a **6**-os funkcionális laktózin származék előállításával kezdtük, amelyet a következő módon valósítottunk meg: kiindulási vegyületnek a 3-azido-propil-2-dezoxi-2-*N*-ftálimido-β-D-glükopiranozid (**1**) [62] választottuk, melynek 6'-OH csoportját *tert*-butil-difenil-szilileztük. A 3-as és 4-es helyzetben védőcsoportot nem tartalmazó 2-ftálimido-glükózamin akceptorok regioszelektív (1→4)-glikozilezéséről Ellervik és Magnusson számolt be először [124], majd Sörme és munkatársai [63] is sikeresen alkalmazták ezt a módszert laktózin alapú Gal-3 inhibitorok előállítására. A fent említett irodalmi eredmények alapján az előállított **2**-es glikozil akceptort regioszelektíven glikozileztük 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopiranozil triklóracetimidáttal (**3**) [125]. A glikozilezési reakciót száraz diklórmetánban -50 °C-on hajtottuk végre, promotorként trimetilszilil-trifluor-metánszulfonátot alkalmaztunk. A reakció során 64 %-os hozammal állítottuk elő a **4**-es (1→4)-regioizomert (28. ábra).



28. ábra

Az előállított **4**-es vegyület NMR adatai alapján nem volt egyértelmű, hogy melyik hidroxil csoportot glikozileztük. Ezért a glikozilezési reakció regioszelektivitását úgy igazoltuk, hogy az előállított vegyület egy kis részletét ecetsavanhidrid és piridin

elegyében acetileztük. A kapott vegyület NMR spektrumából már egyértelműen kiderült, hogy a glikozilezési reakcióban az (1→4)-regioizomer képződött, mivel az acetilezési reakció során képződött termék H-3 protonjának kémiai eltolódása a korábbi 4,45 ppm-ről 5,73 ppm-re változott, ami egyértelműen jelezte, hogy a 3-as hidroxil csoport acetileződése játszódott le. A szerkezetigazoláshoz előállított 3-azidopropil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-3-*O*-acetil-6-*O*-terc-butil-difenil-szilil-2-dezoxi-2-ftálimido-β-D-glükopiranozid NMR adatai az 1-es táblázatban találhatóak meg. A reakcióelegy TLC kromatogramján nem tudtuk detektálni az (1→3)-regioizomert.

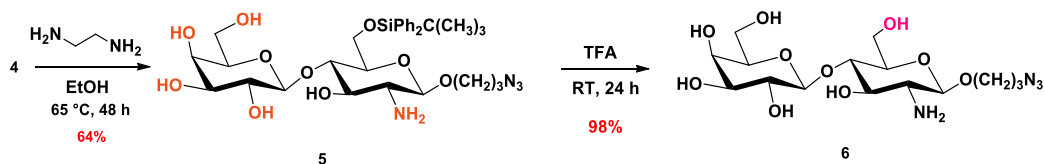
**Táblázat 1.** 3-Azidopropil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-3-*O*-acetil-6-*O*-terc-butil-difenil-szilil-2-dezoxi-2-ftálimido-β-D-glükopiranozid NMR adatai ( $\delta$  [ppm],  $J$  [Hz])

	$\delta$ <sup>1</sup> H	$\delta$ <sup>13</sup> C
<b>Glc<sub>p</sub></b>		
<b>1</b>	5,35 ( $J_{1,2} = 8,5$ )	97,91
<b>2</b>	4,25 ( $J_{2,3} = 11$ )	55,12
<b>3</b>	<b>5,73 (<math>J_{3,4} = 9</math>)</b>	71,22
<b>4</b>	4,20 ( $J_{4,5} = 9$ )	74,99
<b>5</b>	3,60-3,47	75,24
<b>6</b>	4,04-3,97	61,33
<b>Gal<sub>p</sub></b>		
<b>1</b>	4,86 ( $J_{1,2} = 8$ )	100,35
<b>2</b>	5,08 ( $J_{2,3} = 10$ )	69,35
<b>3</b>	4,92 ( $J_{3,4} = 3,5$ )	70,80
<b>4</b>	5,32-5,31	67,01
<b>5</b>	3,81-3,74	70,72
<b>6</b>	4,16-4,08	61,19

A 2-es akceptor molekula 4-es hidroxil csoportjának regioszelektív glikozilezése valószínűleg azért valósulhat meg, mert a 2-es pozícióban lévő ftálimido csoport sztérikus akadályt képezve csökkenti a 3-as hidroxil csoport hozzáférhetőségét és így reaktivitását.

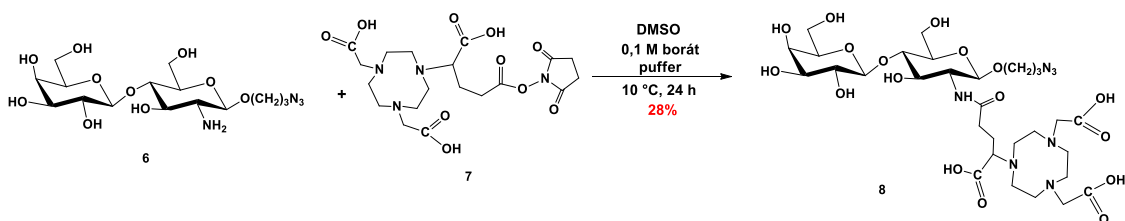
A következő lépésekben a 4-es diszacharidról eltávolítottuk a védőcsoportokat. Először az acetil és ftálimido védőcsoportokat etiléndiaminnal, etanolban történő refluxáltatással távolítottuk el, melynek eredményeként megkaptuk az 5-ös vegyületet.

Ezt követően a *tert*-butil-difenil-szilil védőcsoport trifluoecetsavval történő savas hidrolízisét valósítottuk meg, így nyertük a **6**-os laktózamin származékot (29. ábra).



29. ábra

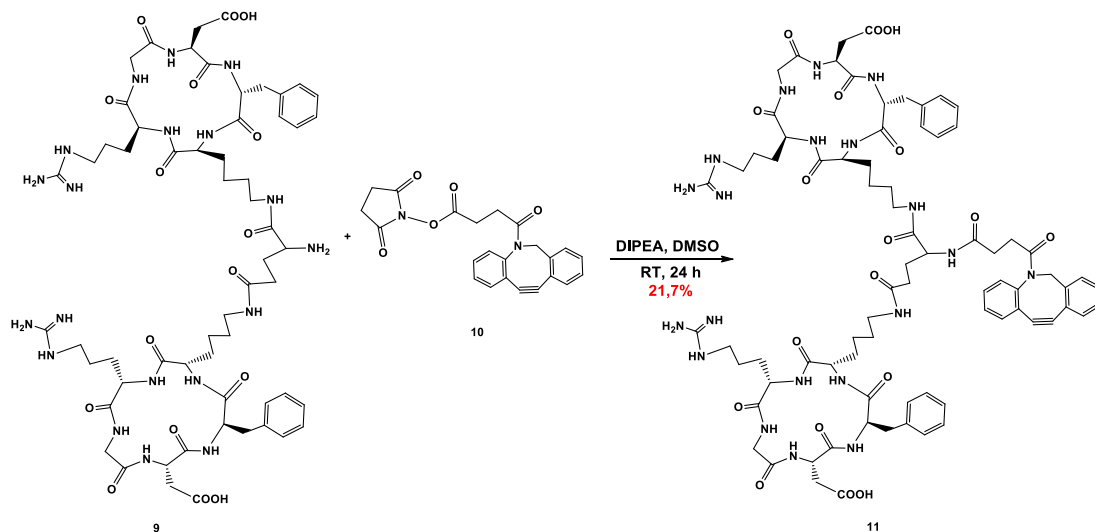
A radiokémiai jelzéshez az előállított **6**-os laktózamin származékot NODAGA-*N*-szukcimidil észter (**7**) bifunkciós kelátorhoz konjugáltuk. A Ga<sup>3+</sup> ion 6-os koordinációs számmal rendelkezik [126], ezt figyelembe véve választottuk a kisebb gyűrűméretű 1,4,7-triazaciklononán vázzal rendelkező makrociklusos komplexképzőt a prekursor szintéziséhez, mert így a <sup>68</sup>Ga radionukliddal történő radiokémiai jelzések alacsonyabb hőmérsékleten, valamint kisebb ligand koncentráció mellett is jó hatásokkal megvalósíthatók. Az előállított **6**-os laktózamin származék szabad amino csoportját dimetil-szulfoxid és 0,1 M-os borát puffer elegyében konjugáltuk a NODAGA-NHS észterhez (**7**) amid kötés kialakításán keresztül, így állítottuk elő a **8**-as vegyületet (30. ábra)



30. ábra

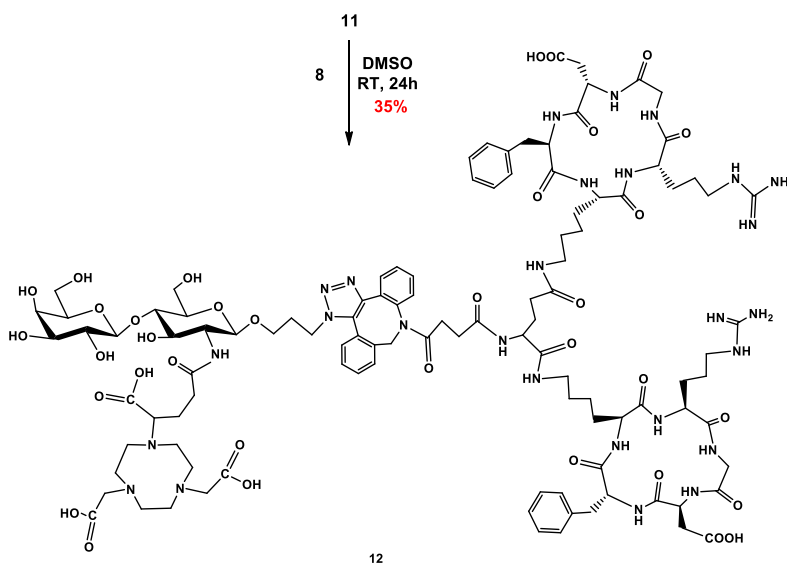
Annak érdekében, hogy a radiokémiai jelzést ne zavarják az esetleges fémszennyeződések, a E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (**9**) peptidet rézmentes, gyűrűfeszültség indukálta klikk reakció segítségével terveztük hozzákapcsolni a kelátor konjugált **8**-as laktózamin származékhoz. Ennek a bioortogonális, 1,3-dipoláris azid-alkin cikloaddíciós (SPAAC) reakciótípusnak a kifejlesztése Bertozzi és munkatársai nevéhez fűződik [127]. A reakció hajtóerejét a rézionok helyett a ciklooktinban fellépő gyűrűfeszültség biztosítja. A klikk reakció kivitelezéséhez a glikopeptid előállításához szükséges peptidet egy dibenzociklooktin (DBCO) származékkal funkcionizáltuk. Ennek megfelelően az

E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (**9**) dimer peptidet dimetil-szulfoxidban konjugáltuk a kereskedelmi forgalomban kapható DBCO-*N*-szukciminidil észterrel (**10**), bázisként diizopropil-etilamint alkalmaztunk és kaptuk a **11**-es vegyületet (31. ábra).



31. ábra

Ezután a dibenzociklooktin egységet tartalmazó **11**-es peptidet SPAAC reakcióval dimetil-szulfoxidban a **8**-as laktózin szarmazékhoz kapcsoltuk. A reakció eredményeként megkaptuk a **12**-es NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> glikopeptidet (32. ábra).

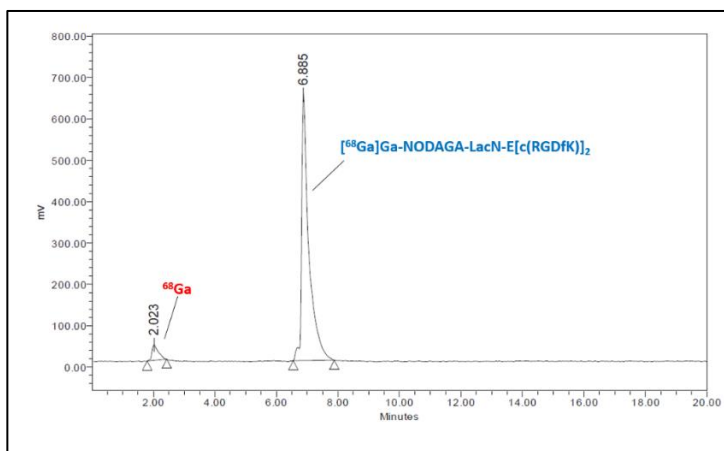


32. ábra

Ezt követően az előállított **12**-es prekursor molekula radiokémiai vizsgálatát valósítottuk meg.

#### 4.2.2. Radiokémia

A **12**-es prekuzort pozitron sugárzó,  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátorból nyert  $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ -dal jelöltük. Pufferként 3 M-os ammónium-acetátot (pH 4) alkalmaztunk, majd az adott prekursor 1 mg/ml-es vizes oldatát adtuk a pufferált  $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  oldathoz. A radiokémiai jelzés optimalizálását a ligand koncentráció és a reakció hőmérséklet változtatásával valósítottuk meg. A radiojelzések hozamát a nyers reakcióelegyek analitikai radio-HPLC kromatogramjai alapján meghatározott radiokémiai tisztaság értékével adtuk meg. Az elvégzett radiokémiai jelzéseket minden esetben háromszor ismételtük meg. A legmagasabb radiokémiai jelzési hozamot a 32  $\mu\text{M}$ -os ligand koncentrációnál tapasztaltuk, míg a reakcióidő 15 perc, a reakcióhőmérséklet pedig 95 °C volt (33. ábra).



33. ábra: A 32  $\mu\text{M}$ -os ligand koncentrációjú reakcióelegy HPLC kromatogramja

Az alacsonyabb prekursor koncentrációk mellett lassabb radiojelzési kinetikát tapasztaltunk, azonban a legkisebb ligand koncentráció (10  $\mu\text{M}$ ) esetében is közel 85%-os jelzési hatékonyságot állapítottunk meg.

2. táblázat A radiojelzés hatékonyságának vizsgálata különböző ligand koncentrációk mellett (15 perc, 95 °C, n = 3)

<b>Ligand koncentráció (μM)</b>	<b>Jelzési hozam (%)</b>
10	85,96 ± 5,02
17	90,80 ± 1,51
23	92,82 ± 1,13
32	95,02 ± 0,62

Az előző kísérletsorozat során a 32 μM-os prekursor koncentráció bizonyult leghatékonyabbnak, ezért ezt a ligand koncentrációt alkalmaztuk a további radiokémiai vizsgálatokhoz. A reakcióhőmérséklet változtatása szobahőmérsékletről 95 °C-ra jelentős különbséget eredményezett a radiokémiai jelzés hatékonyságában. A vizsgált körülmények közül a 95 °C-os reakcióhőmérsékletet, valamint a 15 perces inkubációs időt találtuk legmegfelelőbbnek a [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> glikopeptid előállítására, ugyanakkor a 60 °C-on történő radiokémiai jelzés is megfelelő jelzési hatékonyságot eredményezett (~92%). Szobahőmérsékleten nem tapasztaltunk radiojelzést, míg 37 °C-on minimális, 8,53 %-os radiokémiai tisztaságot állapítottunk meg a radio-HPLC-vel végzett mérés során. Az eredményeket a 3. táblázat foglalja össze.

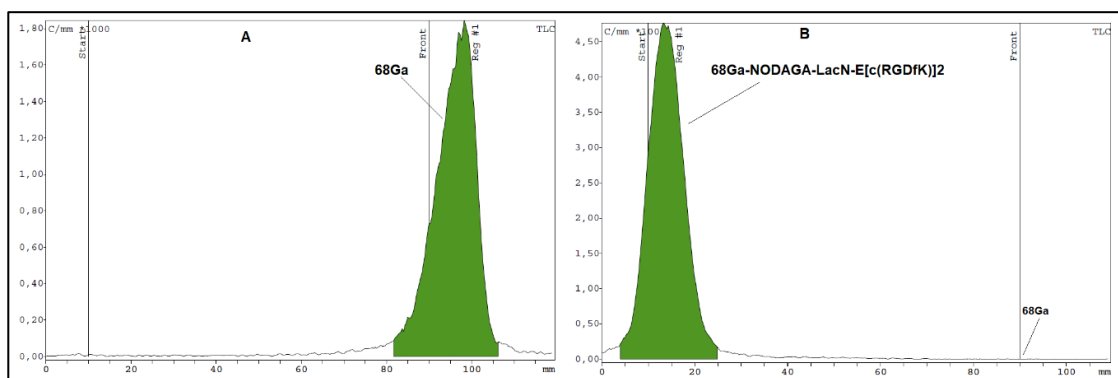
3. táblázat A radiojelzés hatásosságának vizsgálata különböző hőmérsékleten 32 M ligand koncentráció mellett, 15 perces inkubációs idővel (n=3)

<b>Hőmérséklet (°C)</b>	<b>Jelzési hozam (%)</b>
<i>szobahőmérséklet</i>	0
37	8,53 ± 1,06
60	92,84 ± 0,96
80	94,26 ± 0,72
95	95,02 ± 0,62

Ezután az optimalizációs kísérletek során meghatározott körülmények között állítottuk elő a [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> radiofarmakont a további

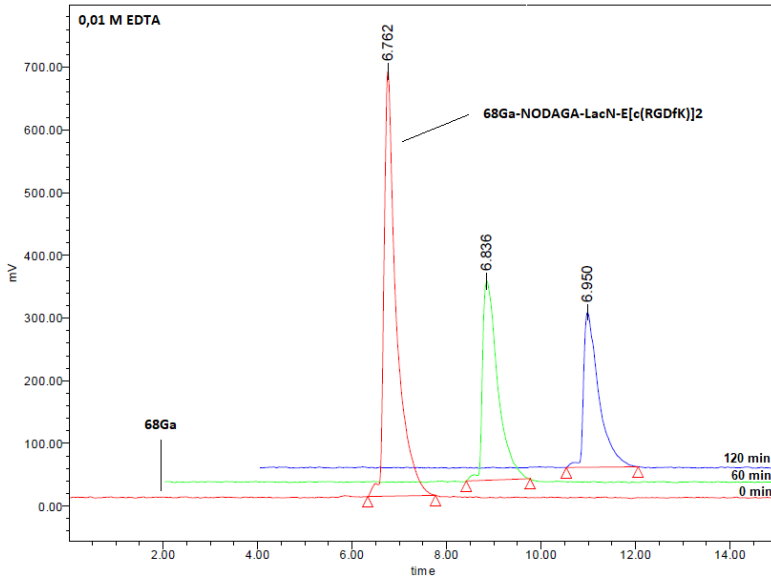
radiokémiai vizsgálatokhoz, majd a jelölt komplexet szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk fordított fázisú Oasis HLB 1cc oszlopon. A tisztított radiotracer radiokémiai tisztaságát fordított fázisú radio-HPLC-vel határoztuk meg. A radiokromatogram alapján megállapított radiokémiai tisztaság érték meghaladta a 99%-ot.

A  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett vegyület minőség ellenőrzését az analitikai radio-HPLC-s módszeren kívül, radio-TLC-vel is vizsgáltuk (34. ábra). A vékonyréteg kromatográfiás módszer során iTLC réteget alkalmaztunk álló fázisként és eluensként pedig 0,5 M-os citrát puffert (pH =5,5) használtunk. A tisztított jelzett komplex radiokémiai tisztasága ebben az esetben is meghaladta a 99%-ot. Tehát a két radioanalitikai módszer eredménye jól korrelált egymással.

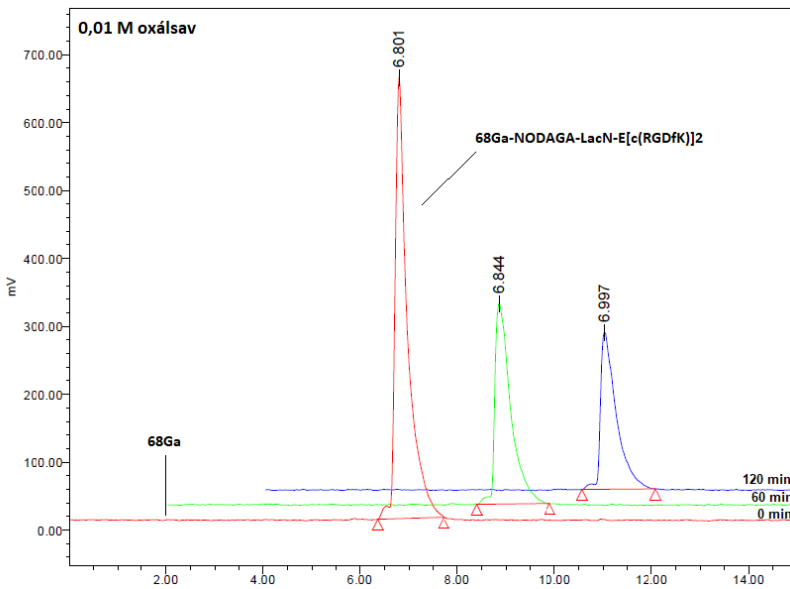


34. ábra: A jelzett glikopeptid radiokémiai tisztaságának vizsgálata; A:  $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  oldat radioTLC kromatogramja, B:  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-LacN-E}[c(\text{RGDfK})]_2$  radioTLC kromatogramja

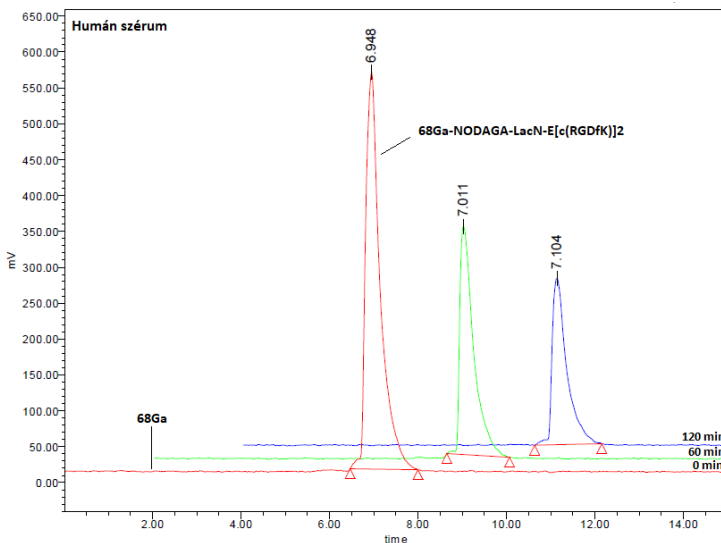
Ezenkívül meghatároztuk a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-LacN-E}[c(\text{RGDfK})]_2$  glikopeptid oktanol/víz megoszlási hányadosát ( $\log P$ ), melynek értéke -2,58, ami alapján a radiojelzett vegyület hidrofíl. A jelzett komplex stabilitását a következő körülmények között vizsgáltuk. A  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-LacN-E}[c(\text{RGDfK})]_2$ -t humán szérummal,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (0,01 M), valamint oxálsav (0,01 M) oldatokkal inkubáltuk szobahőmérsékleten külön-külön és az elegyekből mintát vettünk különböző időpontokban (0, 60, 120 perc), amelyeket radio-HPLC-vel analizáltunk (35-37. ábra).



35. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-LacN-E}[\text{c}(\text{RGDfK})]_2$  vegyület stabilitás vizsgálata 0,01 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  oldatban.



36. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-LacN-E}[\text{c}(\text{RGDfK})]_2$  vegyület stabilitás vizsgálata 0,01 M oxálsav oldatban.



37. ábra: A tisztított [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> vegyület stabilitás vizsgálata humán szérumban.

A radio-HPLC kromatogramok alapján egyértelműen kijelenthető, hogy mindhárom vizsgált körülmény között 2 óra után sem tapasztaltuk az előállított [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> radiotracer degradálódását, ugyanis a radiokromatogramok alapján meghatározott radiokémiai tisztaság értékek meghaladták a 99%-ot.

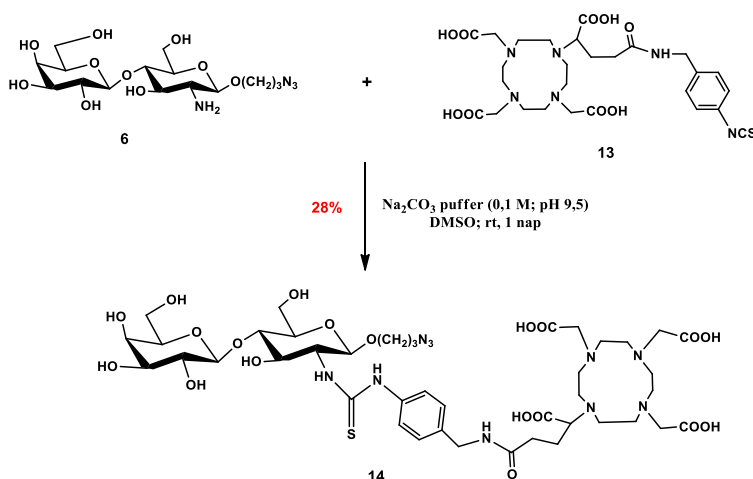
Az elvégzett előzetes biológiai vizsgálatok során az előállított [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> alacsony tumorfelvételt mutatott, ezért ennek a vegyületnek a további preklinikai vizsgálatát nem valósítottuk meg. Az alacsony tumorfelvételt valószínűleg az okozta, hogy a merev dibenzociklooktén gyűrű túl közel van a targetáló peptid molekula részéhez, ami jelentősen csökkentette az előállított jelzett molekula affinitását az  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorhoz, ezért a további vegyületek szintézise során oligoetilén-glikol (PEG<sub>4</sub>) láncot építettünk be a peptid és dibenzociklooktén gyűrű közé. A fejezetben leírt kutatási eredményekről egy nemzetközi folyóiratban közölt közleményben számoltunk be [128].

### 4.3. $^{68}\text{Ga}$ -jelzett ciklikus NGR alapú radiofarmakonok szintézise és preklinikai vizsgálata

#### 4.3.1. Kémiai szintézis

Ez a fejezet az aminoszintézis N (APN/CD13) receptor pozitív tumorok detektálására alkalmas NGR alapú radiofarmakonok előállítását mutatja be. A jelölendő vegyületek szintézisét úgy dolgoztuk ki, hogy alkalmasak legyenek a laktózámmal történő glikoziláció, valamint a pegilálás hatásának a vizsgálatára. A célvegyületek előállítását az előző fejezetben leírt szintézis stratégiához hasonló módon valósítottuk meg. A szénhidrát egység bevezetéséhez ismét a **6-os** laktózámmal származékot alkalmaztunk. A radiokémia jelzésekhez szükséges komplexképzőt azonban ebben az esetben kereskedelmi forgalomban kapható p-SCN-Bn-DOTAGA (**13**) bifunkciós kelátorra cseréltük. Ennek oka, hogy a DOTA makrociklus nagyobb gyűrűmérete lehetővé teszi a terápiás radiofémek (pl.:  $^{90}\text{Y}^{3+}$ ;  $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ) komplexálását is, így, ha az előállított prekursorokat ilyen radioaktív izotóppal jelöljük, akkor célzott radioterápiára is alkalmas radiofarmakonokat kaphatunk. Vektor molekulának pedig egy ciklikus NGR származékot választottunk, nevezetesen a cKNGRE-t (**15**).

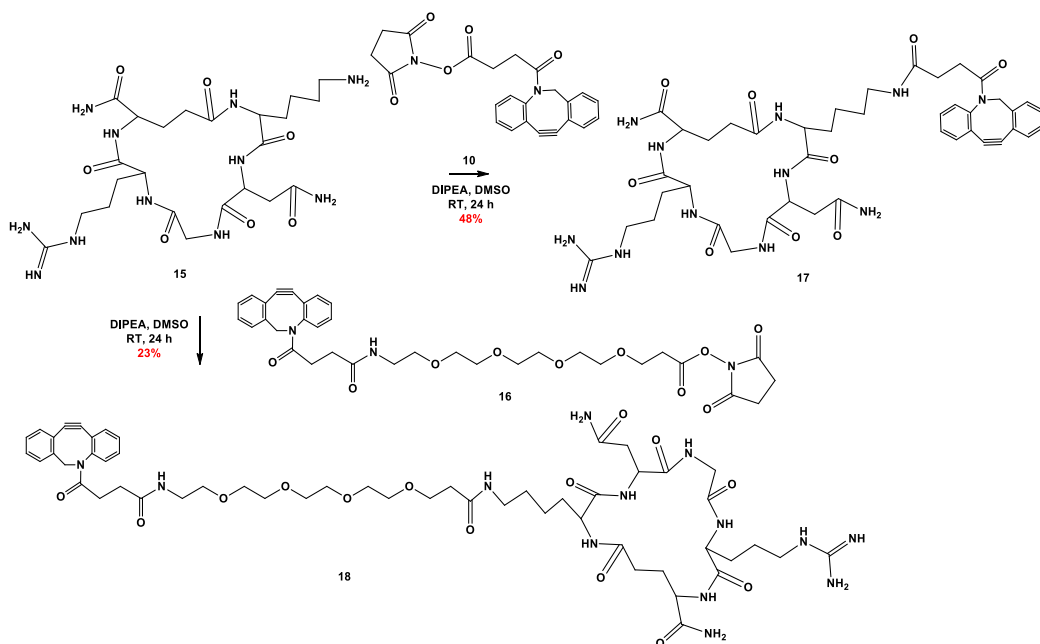
Az első lépésben a **6-os** diszacharid amino csoportját reagáltattuk a p-SCN-Bn-DOTAGA (**13**) komplexképző izotiocianát csoportjával, melynek során tiokarbamid kötést alakítottunk ki DMSO és 0,1 M-os nátrium-karbonát puffer elegyében. A reakció eredményeként megkaptuk a **14-es** vegyületet (38. ábra).



38. ábra

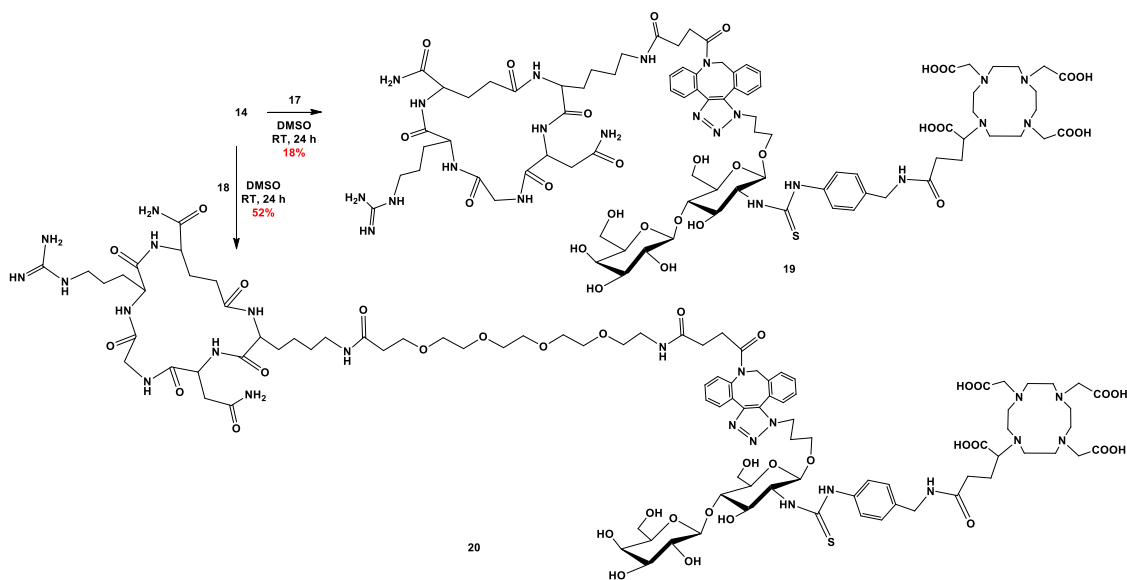
Ezután a cKNGRE (**15**) peptidet kereskedelmi forgalomban kapható DBCO-NHS (**10**), valamint pegilált PEG<sub>4</sub>-DBCO-NHS (**16**) észterrel reagáltattuk DMSO-ban,

bázisként pedig DIPEA-t alkalmaztunk, így állítottuk elő a **17**-es, valamint a **18**-as vegyületeket (39. ábra).



39. ábra

A **19**-es és a **20**-as glikopeptidek szintézise során a **14**-es kelátor-konjugált laktózin származékot rézmentes, gyűrűfeszülés indukálta klikk reakcióval kapcsoltuk hozzá a DBCO csoporttal funkcionizált **17**-es, valamint **18**-as peptidekhez (40. ábra).

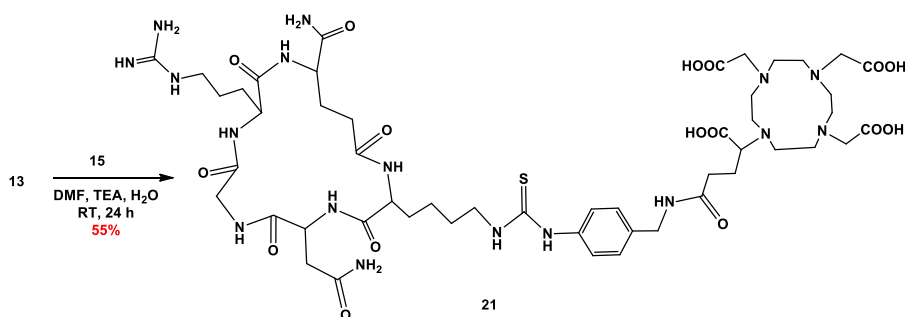


40. ábra

A **14**-es, a **17**-es, valamint a **19**-es vegyületek előállítását Berta Katalinnal valósítottam meg TDK pályamunkájának [129] elkészítése során társtémavezetőjeként.

#### 4.3.1.1. A referencia vegyület előállítása

A cNGR alapú glikopeptidek biológiai vizsgálatához referencia vegyületeként a DOTAGA-cKNGRE-t (**21**) alkalmaztuk, amelyet Stéfánné Dr. Dénes Noémi [130] állított elő a következő módon: a p-SCN-Bn-DOTAGA (**13**) komplexképzőt és a cKNGRE (**15**) peptidet DMF és H<sub>2</sub>O 3:1 arányú keverékében oldotta fel, bázisként pedig trietil-amint (TEA) alkalmazott (41. ábra).



41. ábra

#### 4.3.2. Radiokémia

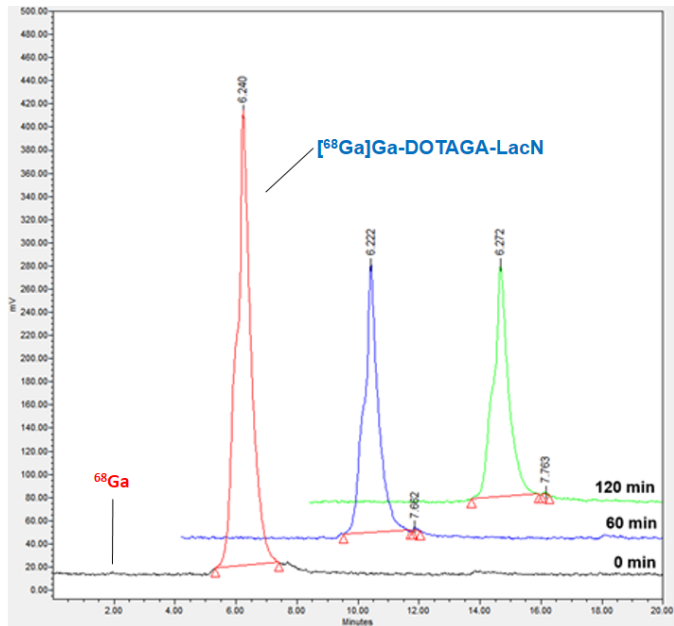
A **14**-es, **19**-es, **20**-as, valamint a **21**-es prekursorok radiojelzéséhez a <sup>68</sup>Ga fémizotópot szintén <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generátorból nyertük. A radiokémiai jelzéseket a következő körülmények között valósítottuk meg: 200 µl NH<sub>4</sub>OAc puffert (3 M, pH =4), és 20 µl **14**-es, **19**-es, **20**-as prekursor törzsoldatot (1 mg/ml) adtunk 1000 µl [<sup>68</sup>Ga]GaCl<sub>3</sub> eluátumhoz (~ 80 MBq, 0,1 M HCl-ban) külön-külön. A reakcióelegyeket 15 percig 95 °C-on inkubáltuk. Az ily módon előállított [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, valamint [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE radiofarmakonokat szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk fordított fázisú Oasis HLB 1cc oszlopon. Az előállított radiogyógyszerek radiokémiai tisztaságát analitikai radio-HPLC-vel határoztuk meg. Mindhárom radiotracer esetében több mint 95%-os radiokémiai tisztaságot állapítottunk meg. A radiojelzett molekulák moláris aktivitásai a következők

voltak:  $3,02 \pm 0,23$  GBq/ $\mu$ mol a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTAGA-LacN esetében,  $4,69 \pm 0,15$  GBq/ $\mu$ mol a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTAGA-LacN-cKNGRE esetében és végül  $4,33 \pm$  GBq/ $\mu$ mol a  $^{68}\text{Ga}$ -DOTAGA-LacN-PEG4-cKNGRE radiofarmakon esetében.

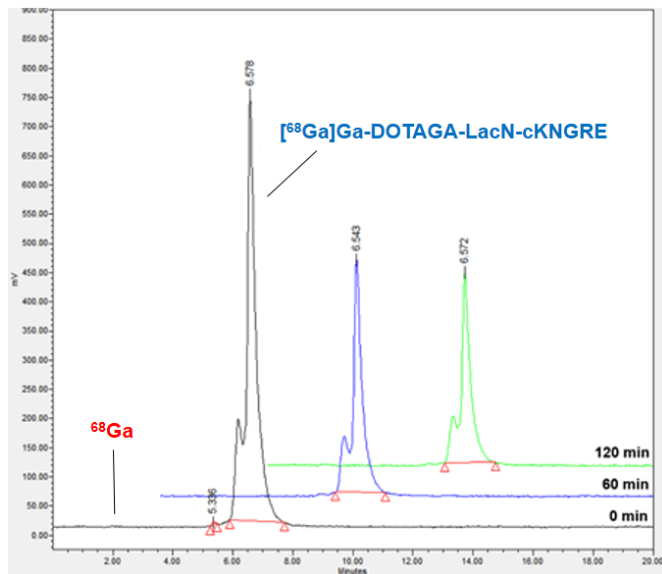
A referenciaként alkalmazott [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cKNGRE radiofarmakon szintézisét Stéfánné Dr. Dénes Noémi [130] végezte a következő módon: 160  $\mu$ l 1 M-os nátrium-acetát puffert elegyített 3  $\mu$ l, 6 mM-os **21**-es prekursor törzsoldattal, majd ezt az elegyet hozzáadta az 1000  $\mu$ l [ $^{68}\text{Ga}$ ]GaCl<sub>3</sub> eluátumhoz (~80 MBq, 0,1 M HCl-ban). A reakcióelegyet 5 percig melegítette 95 °C-on, majd a radiojelzett peptidet szilárd fázisú extrakcióval tisztította, fordított fázisú Oasis HLB 1cc oszlopon. A radiofarmakon radiokémiai tisztaságát HPLC-vel határozta meg, mely nagyobb volt, mint 95 % és a moláris aktivitása  $8,51 \pm 0,09$  GBq/ $\mu$ mol volt.

Ezután meghatároztuk az előállított radiofarmakonok oktanol/víz megoszlási hányadosait és a következő log*P* értékeket kaptuk: -3,34-et a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN esetében, -3,68-at a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE esetében, -3,69-et a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-PEG4-cKNGRE esetében, és -4,13-at a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cKNGRE esetében. Az alacsony log*P* értékek alapján a jelzett komplexek hidofil sajátosságúak.

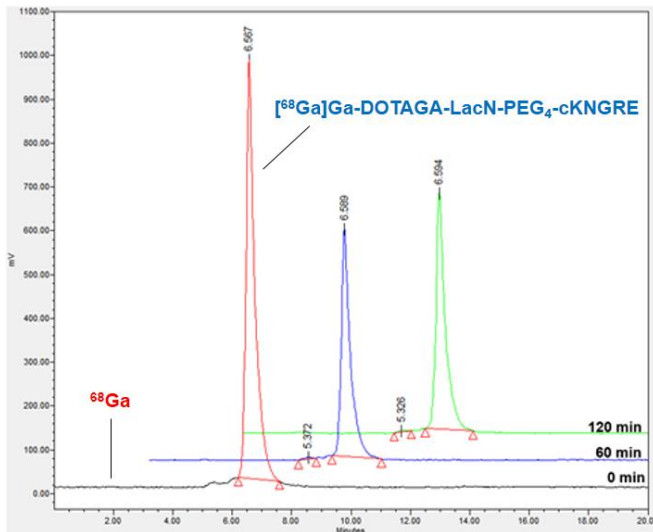
Továbbá megvalósítottuk a radiojelzett molekulák stabilitás vizsgálatát humán szérumban, Na<sub>2</sub>EDTA (0,01 M), valamint oxálsav (0,01 M) oldatok jelenlétében. Az összekevert mintákat 0, 60, és 120 perc elteltével elemeztük analitikai radio-HPLC-vel, és azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált körülmények között mind a négy radiotracer 2 óra elteltével is nagymértékű stabilitással volt jellemezhető (42-45. ábra).



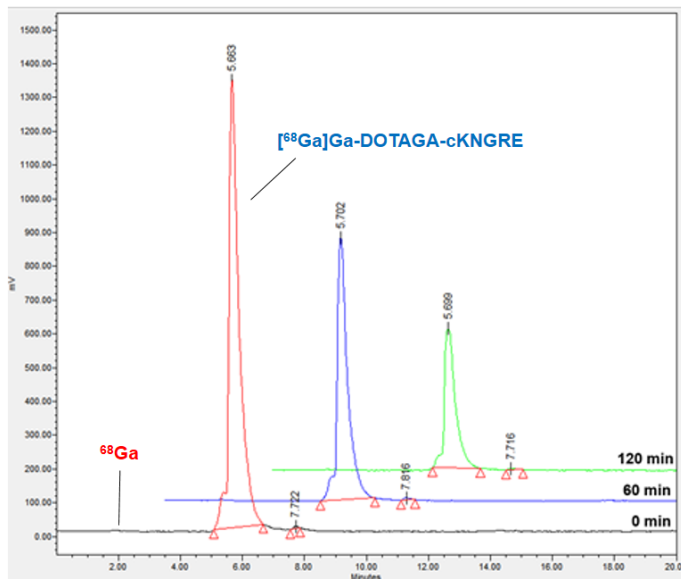
42. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN}$  radiotracer stabilitás vizsgálata humán szérumban



43. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE}$  stabilitás vizsgálata humán szérumban.



44. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-PEG}_4\text{-cKNGRE}$  stabilitás vizsgálata humán szérumban.



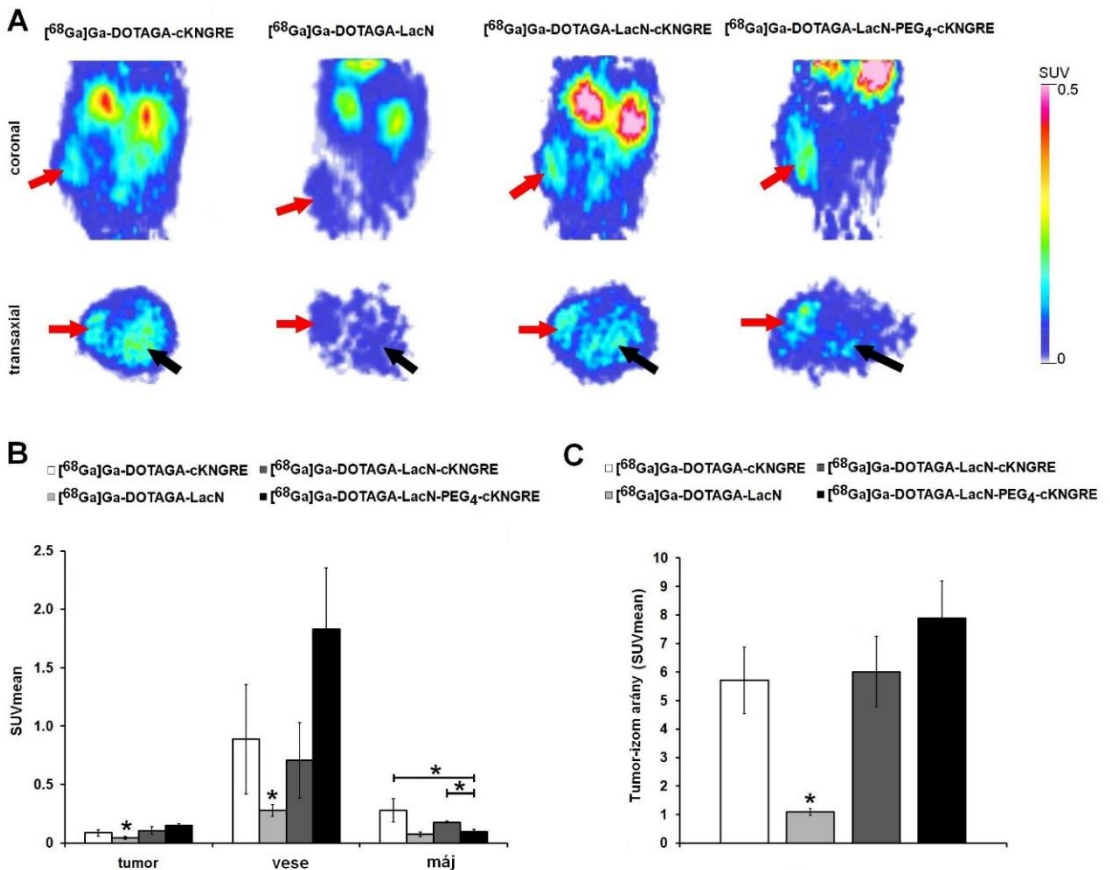
45. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cKNGRE}$  stabilitás vizsgálata humán szérumban

### 4.3.3. Biológia

A B16F10 egér melanóma sejtvonalon fokozottan expresszálja az aminopeptidáz N [131] és a galektin-3 receptorokat [132], ezért az előállított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN}$ ,

[<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE, valamint [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cKNGRE vegyületek biológiai hatékonyságát szubkután injektált B16F10 egér melanoma modellen vizsgáltuk *in vivo* PET képalkotással és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokkal.

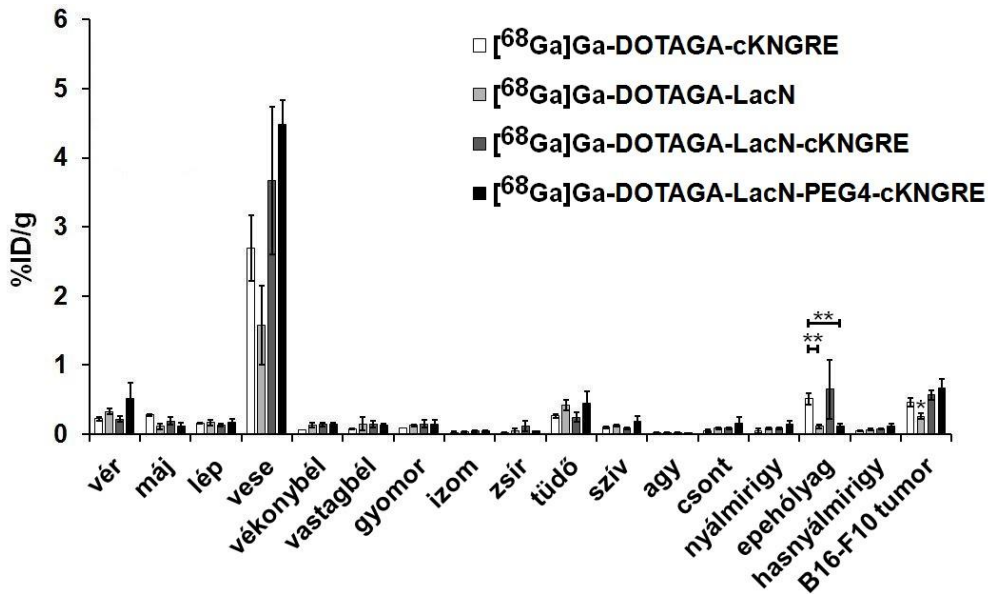
A 46. ábra a bomláskorrigált PET felvételeket mutatja be. A vizsgált radiofarmakonok közül a szubkután növekvő B16F10 tumorok egyértelműen azonosíthatók voltak a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE, valamint [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cKNGRE radiofarmakonok használatával, azonban [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN, vagyis a csak laktóزامint tartalmazó vegyülettel végzett vizsgálat mérsékelt tumorfelvételt eredményezett. Ezt a megfigyelést erősítette meg az átlag standardizált felvételi értékek (SUV<sub>mean</sub>), valamint a tumor/izom (T/M) arányok kvantitatív elemzése, melynek során a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN (SUV<sub>mean</sub>: 0,04 ± 0,01; T/M arány: 1,09 ± 0,12) dúsulása a tumorban szignifikánsan alacsonyabbnak ( $p \leq 0,05$ ) bizonyult, mint a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE (SUV<sub>mean</sub>: 0,09 ± 0,03; T/M arány: 5,71 ± 1,17), a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (SUV<sub>mean</sub>: 0,11 ± 0,03; T/M arány: 6,01 ± 1,24), és a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cKNGRE (SUV<sub>mean</sub>: 0,15 ± 0,01; T/M arány: 7,89 ± 1,31) radiológyszereké (46. ábra).



46. ábra: A: Bomláskorrigált koronális és axiális miniPET felvételek. Piros nyíl: B16F10 tumor. Fekete nyíl: máj. B: A tumor, a vese, valamint a máj  $\text{SUV}_{\text{mean}}$  értékeinek kiértékelése. C: Tumor/izom arány.

A radiofarmakonok máj- és vesefelvétele között azonban különbségek mutatkoztak. Az NGR peptidet tartalmazó radioligandok májfelvételi értékei a következő módon alakultak: a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-PEG}_4\text{-cKNGRE}$  májfelvételi értéke ( $\text{SUV}_{\text{mean}}$ :  $0,10 \pm 0,02$ ) szignifikánsan alacsonyabb ( $p \leq 0,05$ ) volt, mint a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cKNGRE}$  ( $\text{SUV}_{\text{mean}}$ :  $0,28 \pm 0,10$ ) és a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE}$  ( $\text{SUV}_{\text{mean}}$ :  $0,18 \pm 0,01$ ) májfelvételi értékei.

Az *in vivo* PET képalkotás eredményei jól korreláltak az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálat eredményével (47. ábra).



47. ábra: B16F10 tumoros egerek ex vivo szervi eloszlás vizsgálata 90 perccel a  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett DOTAGA-cKNGRE, DOTAGA-LacN, DOTAGA-LacN-cKNGRE és DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE radiofarmakonok injektálását követően. A %ID/g szöveti értékek átlag $\pm$ SD-ben vannak feltüntetve. A szignifikancia szintek:  $p \leq 0,05$  (\*) és  $p \leq 0,01$  (\*\*).

Az előállított NGR tartalmú radiofarmakonok APN/CD13 receptorhoz közel azonos módon kötődtek, ezért azt mondhatjuk, hogy a glikoziláció és a PEGilálás jelentősen nem növelte meg a tumor radiofarmakon-felvételét, de ugyanakkor jelentősen javította a jelzett vegyületek farmakokinetikai tulajdonságait, mert a referencia vegyülethez képest csökkent a  $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE és a  $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE vegyületek akkumulációja a májban, ezáltal csökkentve annak sugárterhelését. Továbbá növelte a tumor-izom arányt, ami kontrasztosabb PET képalkotást tett lehetővé.

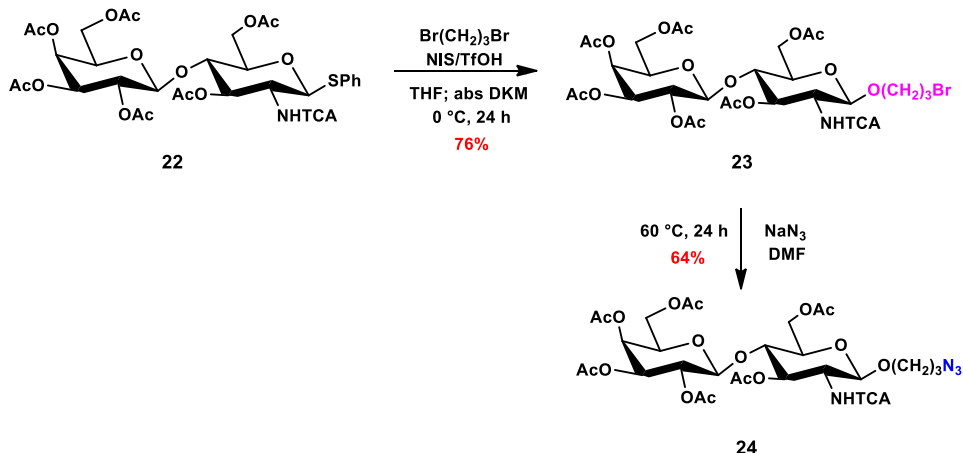
A csak laktózin vektor molekulát tartalmazó radiofarmakon esetén a tumorfelvétel alacsony volt, ezért ez a jelzett vegyület ugyan nem alkalmas Gal-3 expressziójának a kimutatására, de jelzi, hogy a Gal-3 receptorhoz nagyobb affinitással kötődő laktózin származék esetén van realitása a Gal-3 pozitív tumorok kimutatásának ilyen típusú radiofarmakonokkal.

A  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett laktózin és NGR alapú radiofarmakonok szintéziséről és preklinikai vizsgálatáról egy közleményben számoltunk be [130].

## 4.4. <sup>68</sup>Ga-jelzett 3'-(2-naftil)metilezett laktózin alapú radiofarmakonok szintézise és preklinikai vizsgálata

### 4.4.1. Kémiai szintézis

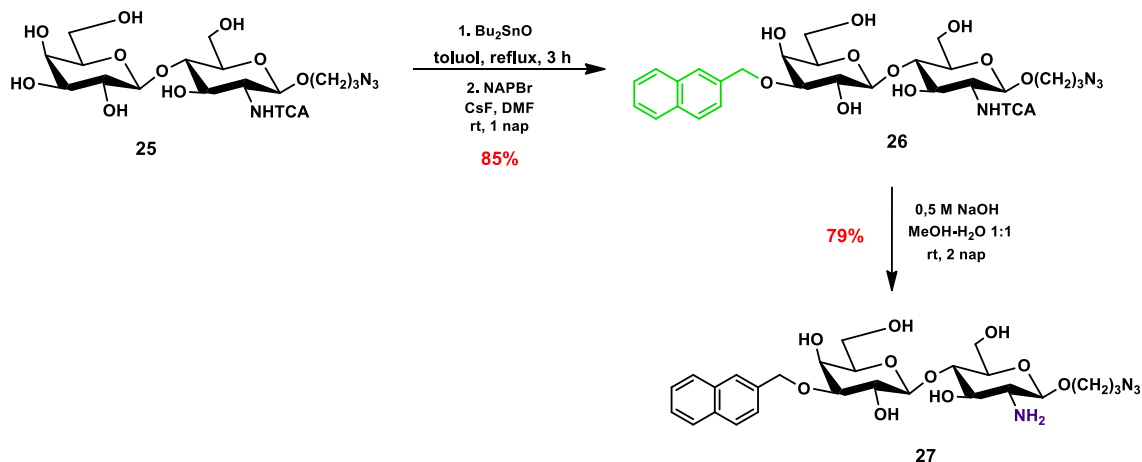
Az előző fejezetben leírt biológiai eredmények alapján a kutatómunkánk következő célja egy a Gal-3 receptorhoz nagyobb affinitással kötődő laktózin származék előállítása volt. Sörme és munkatársai [65] által végzett röntgen kristallográfiás vizsgálatok alapján egy olyan laktózinak a szintézisét terveztük, amely C-3' helyzetben aromás csoportot tartalmaz. A választásunk a (2-naftil)-metil csoportra esett, amelyet sztanillén acetálon keresztül alakítottunk ki, ezt a módszert is Sörme és munkatársai javasolták egyik cikkükben 3'-*O*-benzilezett *N*-acetil-laktózin származékok előállítására [64]. A kutatócsoportunkban a **27**-es 3'-(2-naftil)metilezett laktózin származék előállítását Szűcs Ágnes [133] végezte. A szintézis kiindulási vegyülete a tiofenil-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-galaktopiranozil)-(1→4)-(3,6-di-*O*-acetil-2-*N*-triklóracetil-2-dezoxi-β-D-glükopiranozil) (**22**) [134] volt, melyet Dr. Bajza István (GlycOptim Ltd.) bocsátott rendelkezésünkre. Először a 3-brom-propil aglikonnal rendelkező **23**-as diszacharid szintézisét valósította meg NIS/TfOH promotor rendszer jelenlétében. A következő lépésben nukleofil szubsztitúciós reakcióban kialakította a **24**-es 3-azido-propil glikozidot (48. ábra).



48. ábra

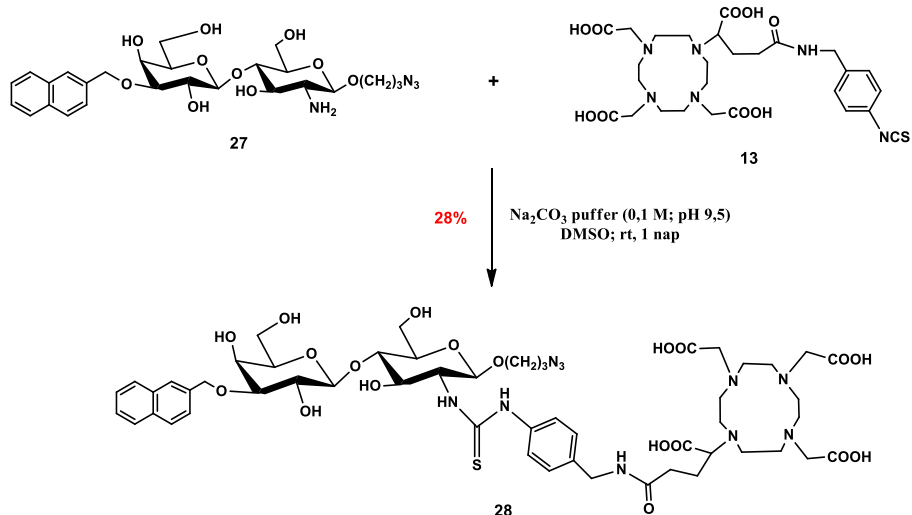
A **24**-es védett laktózin származékról az acetyl védőcsoportokat Zemplén-féle dezacetilezéssel távolította el, majd az így előállított **25**-ös laktózin származék galaktóz

egységének 3'-as hidroxil csoportját sztannilén acetálon keresztül regioszelektíven (2-naftil)-metilezte (**26**), végül az *N*-triklóracetil védőcsoportot lúgos hidrolízissel távolította el (49. ábra).



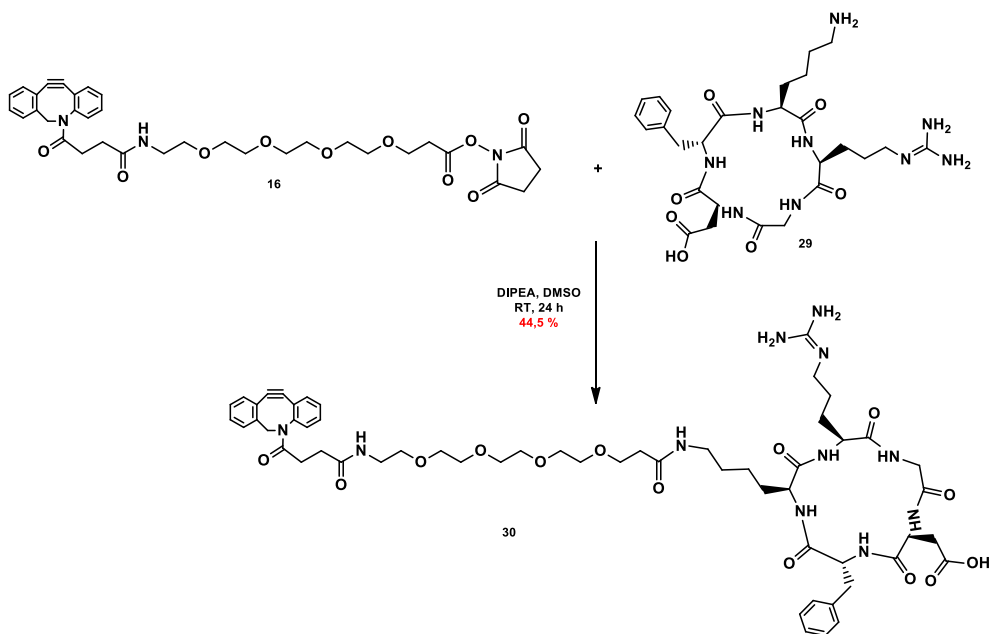
49. ábra

Ezután a **27**-es (2-naftil)metilezett laktózin származék amino csoportja és a p-SCN-Bn-DOTAGA (**13**) komplexképző izotiocianát csoportja között tiokarbamid kötést alakítottunk ki DMSO és 0,1 M-os nátrium-karbonát puffer elegyében, melynek eredményeként megkaptuk a **28**-as vegyületet. Ezt a kelátorhoz konjugált **28**-as laktózin származékot egyrészt  $^{68}\text{Ga}$  izotóppal jelöltük és elvégeztük a jelzett vegyület biológiai vizsgálatát, másrészt ez a vegyület biztosította az előállítani kívánt heterodimer radiofarmakon egyik építőegységét is (50. ábra).



50. ábra

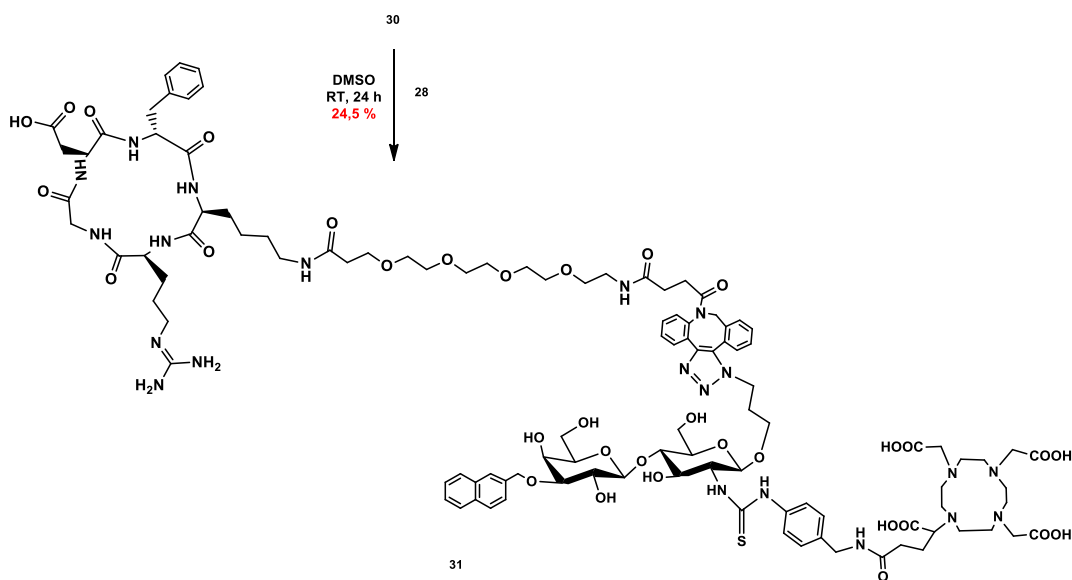
A heterodimer molekula másik építőegysége egy pegilált DBCO egységgel funkcionizált cRGDFK peptid volt. A cRGDFK (**29**) peptidet DMSO és DIPEA elegyében a PEG<sub>4</sub>-DBCO-*N*-szukcinimidil észterhez (**16**) kapcsoltuk jó hozammal és nyertük a **30**-as vegyületet (51. ábra).



51. ábra

Ezután a heterodimer vegyületet a következő módon állítottuk elő: a korábban előállított kelátor-konjugált **28**-as laktózin származékot rézmentes, gyűrűfeszültség

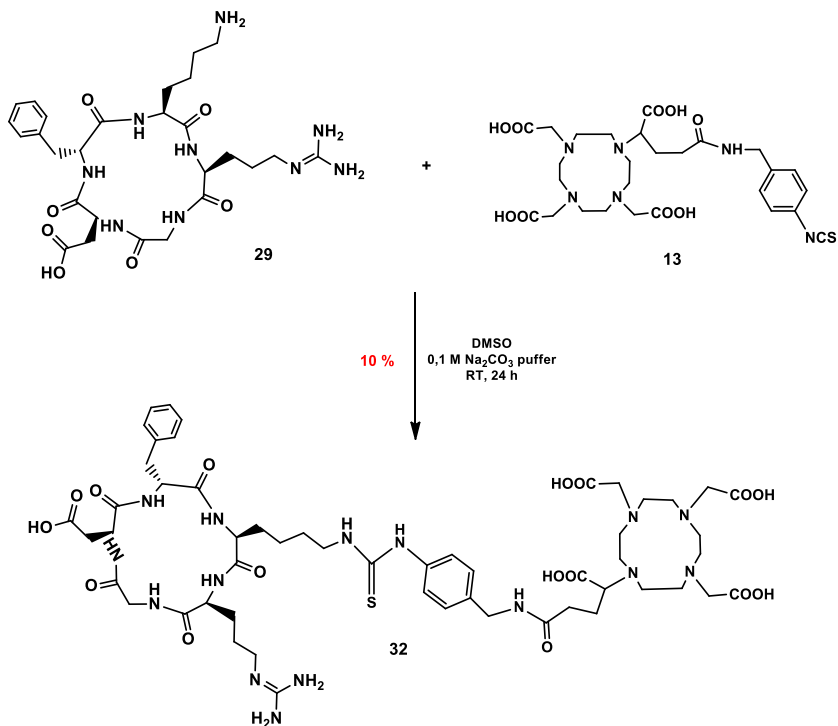
indukálta klick reakció segítségével kapcsoltuk a pegilált és DBCO egységgel funkcionizált **30**-as cRGDfK peptidhez és így kaptuk a **31**-es glikopeptidet (52. ábra).



52. ábra

#### 4.4.1.1. A referencia vegyület előállítása

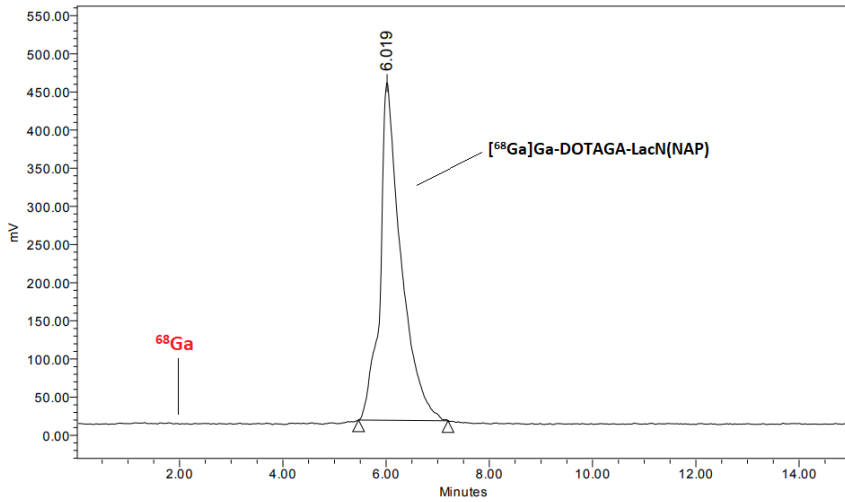
A biológiai vizsgálatokhoz megvalósítottuk egy referencia vegyület szintézisét is, melynek során cRGDfK (**29**) peptidet DMSO és 0,1 M nátrium-karbonát puffer elegyében közvetlenül konjugáltuk a p-SCN-Bn-DOTAGA (**13**) kelátorhoz, így nyertük a DOTAGA-cRGDfK (**32**) vegyületet (53. ábra).



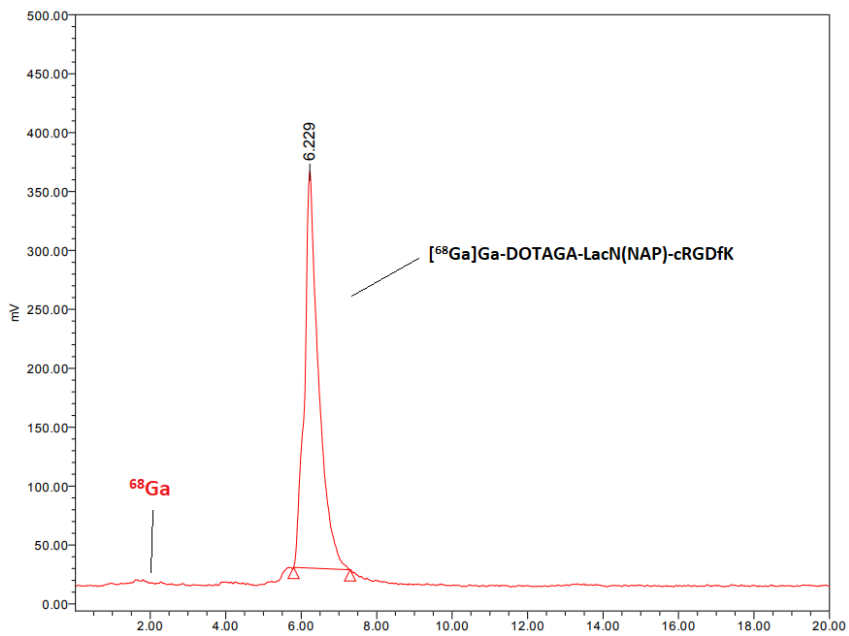
53. ábra

#### 4.4.2. Radiokémia

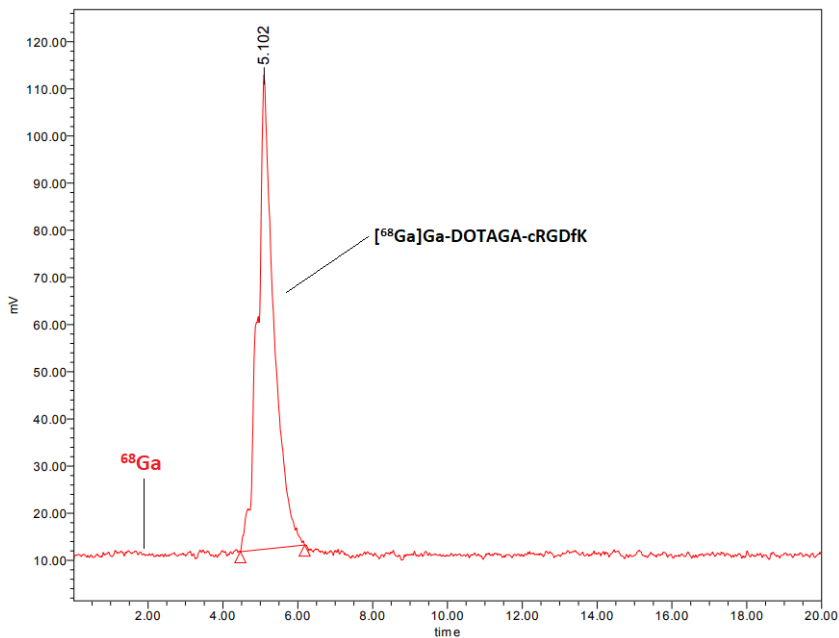
A **28**-as, **31**-es, valamint **32**-es prekurzorok radiokémiai jelzése azonos módon történt. A radiojelzésekhez szükséges  $^{68}\text{Ga}$  izotópot  $^{68}\text{Zn}(p, n)^{68}\text{Ga}$  magreakció segítségével ciklotronban állítottuk elő, majd szilárd fázisú extrakciós tisztítást követően használtuk fel a radiokémiai jelzésekhez. A kapott  $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  oldatot (100-200 MBq) 1:1 arányban elegyítettük az  $\text{NH}_4\text{OAc}$  pufferrel (3 M, pH=4), így a reakcióelegy pH-ját 4-esre állítottuk be. Ezt követően adtuk az elegyhez a prekurzorok vizes vagy vizes-alkoholos törzsoldatát (1 mg/ml). Az így kapott reakcióelegyeket  $95\text{ }^\circ\text{C}$ -on 15 percig melegítettük, majd az előállított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK}$ , valamint a refenciaként alkalmazott  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDfK}$  radiofarmakonokat szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk Oasis<sup>®</sup> HLB 1cc oszlopon. A radiogyógyszerek radiokémiai tisztaságát analitikai fordított fázisú HPLC-vel határoztuk meg. A radiokémiai tisztaság mindhárom radiojelzett vegyület esetében meghaladta a 97%-ot (54.-56. ábra).



54. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  radiokromatogramja



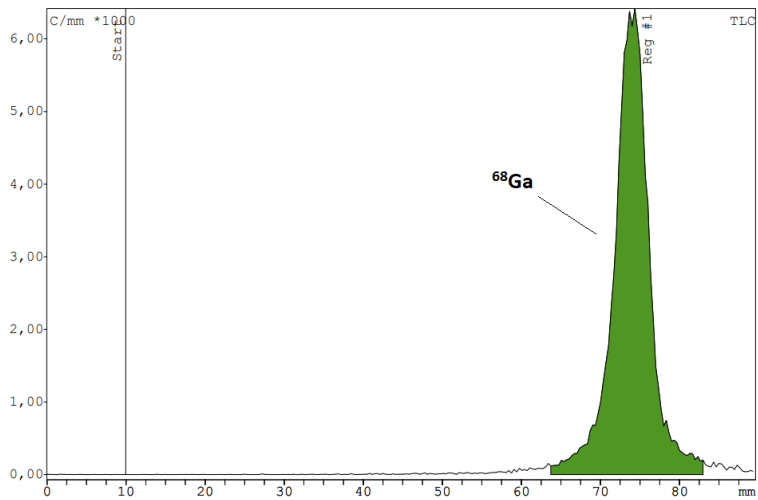
55. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK}$  radiokromatogramja



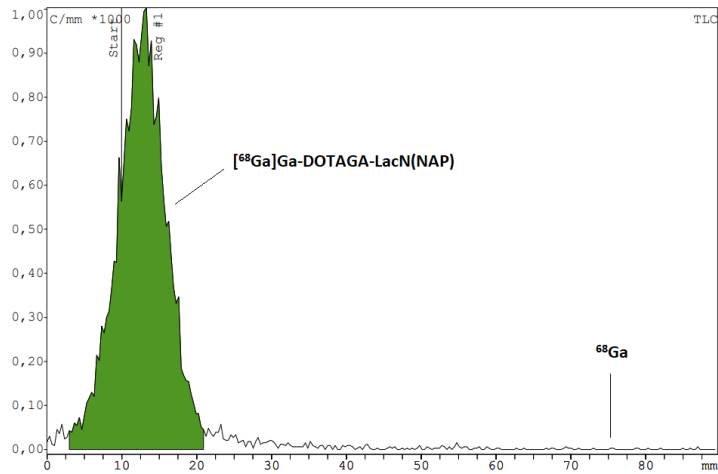
56. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDFK}$  radiokromatogramja

Meghatároztuk a jelzett vegyületek oktanol/víz megoszlási hányadosát. A kiszámított  $\log P$  értékek a következők voltak: -2,63 a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  esetében, -2,27 a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDFK}$  esetében, és -3,03 a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDFK}$  esetében. Az alacsony  $\log P$  értékek az előállított radiofarmakonok hidrofílségére utalnak.

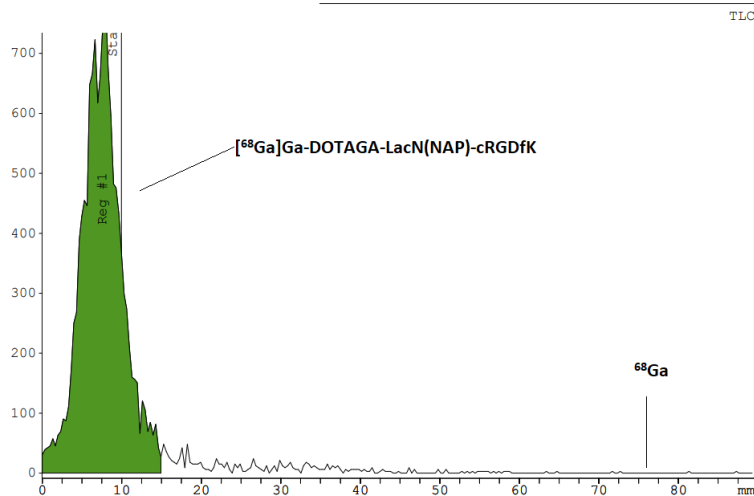
Megvalósítottuk az előállított radiojelzett komplexek stabilitás vizsgálatát humán szérumban, 0,01 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , valamint 0,01 M oxálsav oldatok jelenlétében. A különböző körülmények között 2 óra elteltével is stabilak maradtak a radiofarmakonok. Az elegyekből vett mintákat radio-TLC-vel analizáltuk (57.-60. ábra).



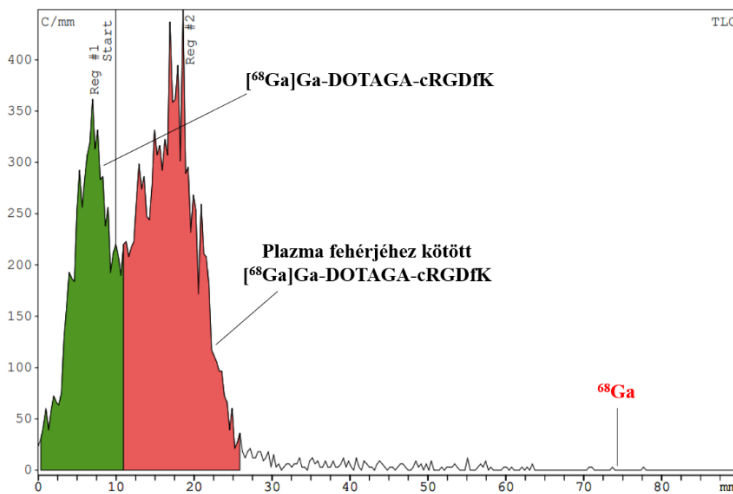
57. ábra: A  $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  oldat radio-TLC kromatogramja.



58. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  stabilitás vizsgálata humán szérumban 2 óra elteltével.



59. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDFK}$  stabilitás vizsgálata humán szérumban 2 óra elteltével.



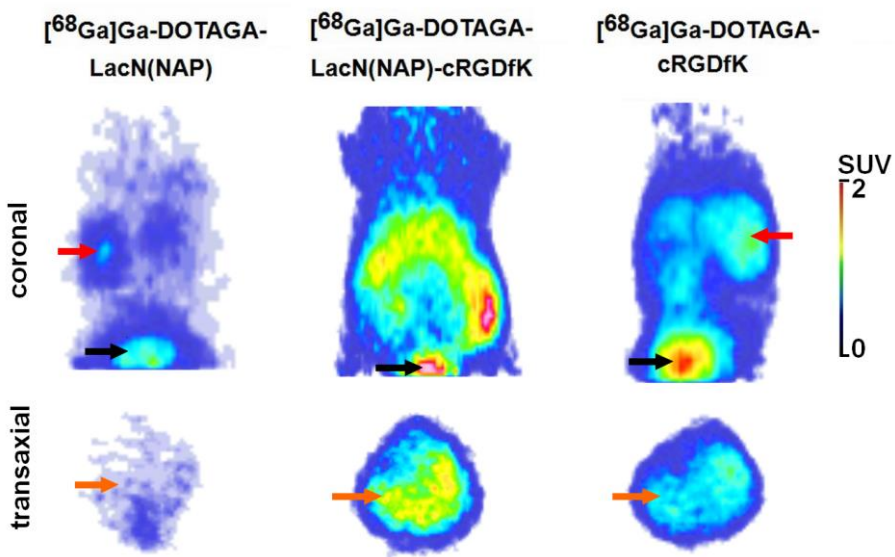
60. ábra: A tisztított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDFK}$  stabilitás vizsgálata humán szérumban 2 óra elteltével.

#### 4.4.3. Biológia

A B16F10 egér melanóma sejtvonal fokozottan expresszálja az  $\alpha_v\beta_3$  integrin [135] és a galektin-3 receptorokat [132], ezért az előállított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDFK}$ , valamint  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDFK}$  vegyületek biodisztribúciójának meghatározásához egészséges kontroll, és B16F10 egér

melanóma sejttel szubkután injektált C57BL/6 egereket alkalmaztunk és az *in vivo* miniPET és *ex vivo* szervi eloszlás vizsgálatokat 80 és 100 perccel a radiofarmakonok injektálását követően végeztük el.

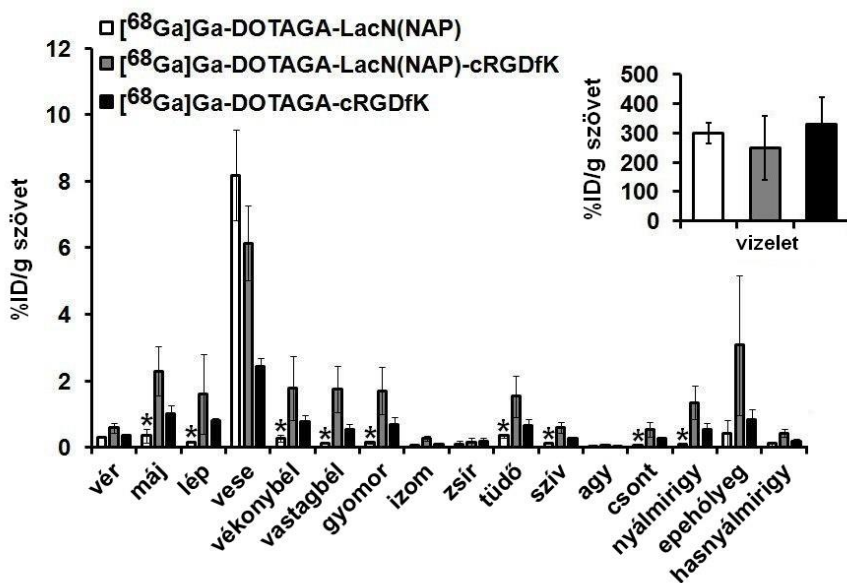
Az egészséges egerek reprezentatív bomláskorrigált PET felvételei a 61.-es ábrán láthatók. A PET felvételek kvalitatív elemzését követően a húgyúti rendszer egyértelműen azonosítható. A kapott eredmény összhangban van a meghatározott  $\log P$  értékekkel, tehát az előállított radiogyógyszerek hidrofil tulajdonságúak. Azonban az RGD peptidet tartalmazó radiofarmakonok esetében nagymértékű májfelvételt is tapasztaltunk, amely főként a heterodimer esetében volt kiemelkedő (61. ábra).



61. ábra: A  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK}$  és  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDfK}$  felhalmozódásának *in vivo* értékelése egészséges kontroll C57BL/6 egerekben. A reprezentatív, bomláskorrigált koronális (felső sor) és transzaxiális (alsó sor) PET-felvételeket 80 perccel a radiofarmakonok intravénás beadása után készítettük. Piros nyilak: vese; fekete nyilak: hólyag (vizelet); narancssárga nyilak: máj.

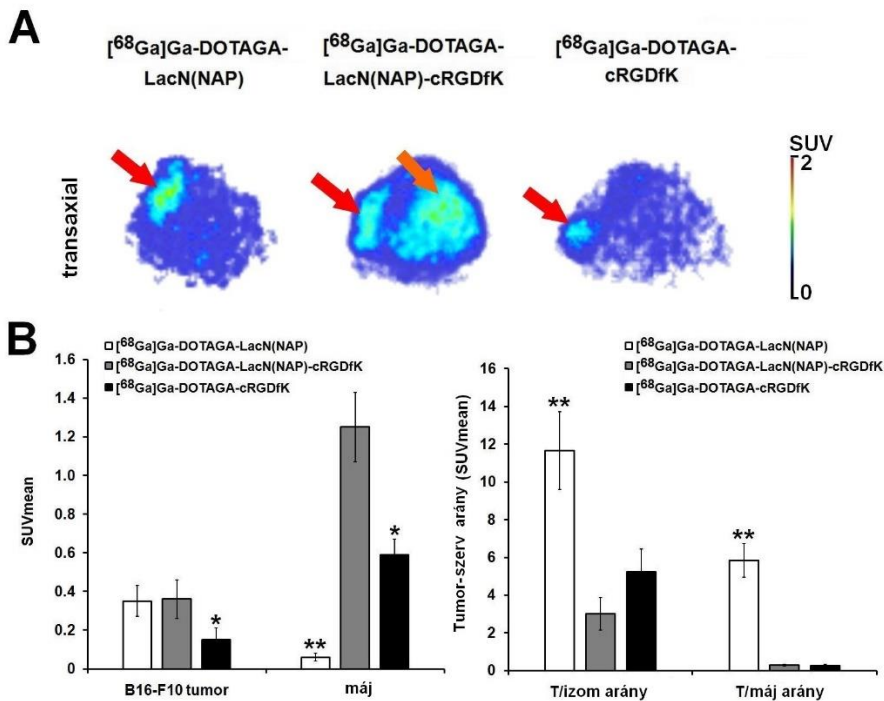
Az *in vivo* PET felvételek eredményei jól korreláltak az elvégzett *ex vivo* szervi eloszlás vizsgálatok eredményeivel (62. ábra), amelyet a PET képalkotást követően végeztünk el és a radioligandok szervi és szöveti eloszlását gammaszámlálóval határoztuk meg. Az *in vivo* SUV értékekhez hasonlóan mindhárom radiojelzett vegyület esetében jelentős volt a vese (%ID/g: 2-8) és a vizelet (%ID/g: 300) radiofarmakon-felvétele. A nem célzott, hasi, mellkasi és egyéb szervek %ID/g adatainak összehasonlítása során a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  esetében szignifikánsan ( $p \leq 0,01$ ) a legalacsonyabb

értékeket tapasztaltunk, míg a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK}$  heterodimer felhalmozódása volt a legmagasabb a legtöbb vizsgált szövetben. Ez a magas radiofarmakon felhalmozódás a gyomorban ( $\%ID/g: 1,70 \pm 0,71$ ), a májban ( $\%ID/g: 2,30 \pm 0,73$ ) az epehólyagban ( $\%ID/g: 3,07 \pm 2,10$ ) és a belekben ( $\%ID/g: 1,70 \pm 0,70$ ) azt jelzi, hogy a heterodimer az emésztőrendszeren keresztül is kiválasztódik a szervezetből (62. ábra).



62. ábra: A  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett DOTAGA-LacN(NAP), DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK és DOTAGA-cRGDfK vegyületek *ex vivo* biodisztribúciója C57BL/6 egerekben ( $n=5/\text{radiogyógyszer}$ ) 100 perccel a radioaktív anyagok intravénás beadása után. A  $\%ID/g$  szöveti értékek átlag $\pm$ SD-ben vannak feltüntetve. A  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  és a két másik vizsgált radiotracer közötti szignifikancia szint:  $p \leq 0,01$  (\*).

Az előállított  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK}$ , valamint  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDfK}$  vegyületek biológiai hatékonyságát szubkután injektált B16F10 egér melanoma modellen vizsgáltuk *in vivo* PET képalkotással és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokkal. A 63. ábra a bomláskorrigált miniPET felvételeket mutatja be.



63. ábra: A <sup>68</sup>Ga-jelzett DOTAGA-LacN(NAP), DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK és DOTAGA-cRGDfK vegyületek felhalmozódásának *in vivo* értékelése szubkután B16F10 tumorokban. Reprezentatív, bomláskorrigált transzaxiális PET-felvételek B16F10 tumoros egerekről 80 perccel a radiofarmakonok intravénás injektálása után, és 10±1 nappal a szubkután történő tumoros sejtek beoltása után (A). A radiógyógyszerek felvételének kvantitatív SUV-analízise a B16F10 tumorokban (n=5/radiofarmakon) 80 perccel az injektálást követően, és 10±1 nappal a tumoros sejtek szubkután beadása után (B). Szignifikanciaszintek: p≤0,05 (\*) és p≤0,01 (\*\*). SUV: standardizált felvételi érték; T/M: a tumor SUV<sub>mean</sub> / az izom SUV<sub>mean</sub>. T/L: a daganat SUV<sub>mean</sub>/SUV<sub>mean</sub> a májban. Az SUV-értékeket átlag±SD-ben adjuk meg. Piros nyilak: B16-F10 tumor; narancssárga nyíl: máj.

A PET felvételek kvalitatív elemzését követően mindhárom radiofarmakon alkalmasnak bizonyult a B16F10 egér melanoma kimutatására. A PET képek kiértékelése azonban nehézkes volt a RGD peptidet tartalmazó radioligandok esetében, a májban való nagymértékű radiofarmakon felhalmozódás miatt. A B16F10 tumorok kvantitatív SUV elemzése azt mutatta, hogy a referenciaként alkalmazott [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cRGDfK vegyület szignifikánsan (p ≤ 0,05) alacsonyabb SUV<sub>mean</sub> értékkel (SUV<sub>mean</sub>: 0,15 ± 0,06) jellemezhető. Az előállított [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) és [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK radiofarmakonok SUV<sub>mean</sub> értékei között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (SUV<sub>mean</sub>: 0,35 ± 0,08; és SUV<sub>mean</sub>: 0,36 ± 0,10). A máj SUV<sub>mean</sub> értékei jól korreláltak az *in vivo* kvalitatív elemzéssel, mivel a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-

LacN(NAP)-cRGDfK esetében mértük a legmagasabb SUV értékeket ( $SUV_{\text{mean}}: 1,25 \pm 0,18$ ). Ehhez képest szignifikánsan alacsonyabb akkumulációt figyeltünk meg a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  ( $SUV_{\text{mean}}: 0,06 \pm 0,02$ ;  $p \leq 0,01$ ) és a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDfK}$  ( $SUV_{\text{mean}}: 0,59 \pm 0,08$ ;  $p \leq 0,05$ ) radiofarmakonok alkalmazása során. A tumor háttérarányok értékelése alapján a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  radioligand 2-3-szor nagyobb T/M és körülbelül 21-szer nagyobb T/L (tumor/máj arány) arányt mutatott, mint a két másik radiofarmakon.

A B16F10 tumort hordozó egerek *ex vivo* analízise során kapott eredmények összhangban voltak a fenti *in vivo* eredményekkel, amelyek megerősítették a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  kiemelkedő képalkotó tulajdonságait.

**4. Táblázat:** A  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett DOTAGA-LacN(NAP), DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK és DOTAGA-cRGDfK felhalmozódásának *ex vivo* értékelése a kísérleti szubkután B16-F10 tumorokban 100 perccel a radiofarmakonok beadása után, és  $10 \pm 1$  nappal a tumorsejtek beoltása után. A %ID/g szöveti értékek átlag $\pm$ SD-ben vannak feltüntetve. A  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$  és a két másik radiotracer T/M és T/L arányai közötti szignifikancia szint:  $p \leq 0,01$  (\*\*). T/M:  $SUV_{\text{mean}}$  a tumorban/ $SUV_{\text{mean}}$  az izomban. T/L: a tumor  $SUV_{\text{mean}}$  / $SUV_{\text{mean}}$  a májban.

Tumor	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK}$	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDfK}$
<b>B16-F10 (n=5)</b>	$0,81 \pm 0,27$	$0,80 \pm 0,23$	$0,35 \pm 0,12$
<b>B16-F10/izom arány</b>	$13,97 \pm 2,58^{**}$	$3,43 \pm 1,09$	$4,54 \pm 1,24$
<b>B16-F10/máj arány</b>	$2,66 \pm 0,04^{**}$	$0,45 \pm 0,11$	$0,35 \pm 0,14$

A kapott biológiai eredmények alapján az előállított csak 3'-O-(2-naftilmetilezett) laktózamin alapú  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett radiofarmakon nagy szelektivitással képes detektálni a galectin-3 receptor pozitív melanoma tumorokat PET képalkotással, a jelzett cRGD alapú, valamint heterodimer vegyületekhez képest. Ebben a fejezetben leírt eredményekről is egy közleményben számoltunk be [136].

## 5. Anyagok és Módszerek

A kísérletek során alkalmazott oldószereket és reagenseket további tisztítás nélkül használtuk fel. A 2,2'-(7-(1-karboxi-4-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-4-oxobutil)-1,4,7-triazanonán-1,4-diil)diecetsav (NODAGA-NHS észter) és 2,2',2''-(10-(1-karboxi-4-((4-izotiocianátobenzil)amino)-4-oxobutil)-1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7-triil)triecetsav (p-SCN-Bn-DOTAGA) bifunkciós kelátorokat a Chematechtől szereztük be. A ciklikus arginin-glicin-aszpragaginsav tripeptid szekvenciát tartalmazó E[c(RGDfK)<sub>2</sub>] és cRGDfK peptideket, valamint a ciklikus lizin-aszparagin-glicin-arginin-glutaminsav (cKNGRE) peptid a CASLO ApS-től vásároltuk meg. A többi reagenst a Sigma-Aldrichtől rendeltük meg. A reakciók egyik részének a végbemenetelét vékonyréteg kromatográfiával vizsgáltuk, melyet Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) szilikagélen végeztük. A detektálás UV fényben, valamint 5%-os kénsav etanolos oldatával történt. Az oszlopkromatográfiás tisztításhoz szilikagél 60-at (Merck 63-200 mesh.) alkalmaztunk. A félpreparatív tisztítást UV detektorhoz kötött Waters LC Modul 1 HPLC rendszeren, fordított fázisú Luna C18 10 µm (250 x 10 mm) oszlopon acetonitril/víz gradienssel hajtottuk végre. Az A eluens: 0,1%-os HCOOH, B eluens: 95%-os acetonitril (ACN) volt. A DOTAGA-cKNGRE szemipreparatív tisztítása KNAUER HPLC rendszeren, fordított fázisú Supelco-Discovery® Bio Wide Pore C18 10 µm (150 x 10 mm) oszlopon, acetonitril/víz gradienssel történt. Ebben az esetben az A eluens: 0,1% trifluoecetsav (TFA), B eluens: 0,1%-os TFA tartalmú ACN/víz (95:5) elegye volt. Az előállított vegyületek szerkezetét NMR-rel, valamint tömegspektroszkópiával igazoltuk. Az <sup>1</sup>H (400 MHz) és <sup>13</sup>C (128 MHz) NMR spektrumokat Bruker DRX-400 spektrométer (Bruker) segítségével vettük fel. A <sup>1</sup>H NMR mérések során a belső standardként TMS-t (0,000 ppm), míg a <sup>13</sup>C NMR mérések során kloroformot (77,00 ppm) alkalmaztunk. Az LC-MS méréseket Waters Acquity UPLC Iclass rendszerhez kapcsolt maXis II UHR ESI-QTOF MS Bruker) tömegspektrométerrel valósítottuk meg. A HPLC-s rendszerhez HPLC-MS minőségű acetonitrilt, metanolt (Fisher Solutions), valamint ioncserélt vizet (Milli-Q 18,2 MΩcm<sup>-1</sup>, Merck) használtunk. A radiokémiai jelzésekhez alkalmazott ultratiszta sósavat, nátrium-acetátot, ammónium-acetátot, valamint vizet a Merck KGaA

vállalattól szereztük be. A NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> glikopeptid, a DOTAGA-LacN és a cKNGRE alapú prekursorok radiokémiai jelzéséhez a <sup>68</sup>Ga izotópot <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga izotópgenerátorból (Eckert-Ziegler, eluens: 0,1 M u.p. HCl) nyertük. A DOTAGA-LacN(NAP) és a cRGDfK peptid alapú prekursorok radiokémiai jelzéséhez GE PETtrace ciklotronnal (Debreceni Egyetem, Orvosi Képző Intézet Nukleáris Medicina Tanszék) előállított <sup>68</sup>Ga izotópot használtunk. A radiofarmakonokat szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk Oasis HLB 1cc oszlopon (Waters). A radioanalitikai HPLC méréseket UV, valamint ATOMKI 120 CsI szcintillációs detektorhoz kapcsolt Waters 2695 Alliance HPLC rendszeren, fordított fázisú Luna C18 3 μm (150 x 4,6 mm) oszlopon, acetonitril/víz gradienst alkalmazva valósítottuk meg (A eluens: 0,01 M-os oxálsav (pH 3), B eluens: 95%-os ACN). A [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cKNGRE radiotracer esetében a radioanalitikai méréseket UV, valamint ATOMKI CsI szcintillációs detektorhoz kapcsolt KNAUER HPLC rendszeren, fordított fázisú, Halo C18 5 μm (100 x 3,0 mm) oszlopon, acetonitril/víz gradienst alkalmazva kiviteleztük (A eluens: 0,1% TFA, B eluens: 0,1% TFA tartalmú ACN/víz 95:5elegye). A radio-TLC mérésekhez iTLC-SG (Agilent Technologies) vékonyréteget alkalmaztunk, melyeket MiniGita TLC-Scanner segítségével detektáltunk. A kapott eredményeket a GINA-Star TLC szoftverrel értékeltük ki. A humán plazmát a Sigma-Aldrichtől szereztük be.

## 5.1.Kémiai szintézisek

### 5.1.1. 3-Azido-propil-6-O-terc-butil-difenilszilil-2-ftálimido-2-dezoxi-β-D-glükopiranozid (2)

A szintézis kiindulási anyaga az irodalomból már ismert vegyület, nevezetesen a 3-azido-propil-2-ftálimido-2-dezoxi-β-D-glükopiranozid (1) volt, melynek szintézisét a korábban már közölt módszer alapján valósítottuk meg [44]. 100 mg (0,25 mmol) 1-es vegyületet 2 ml *N,N*-dimetil-formamidban oldottunk, majd 80 μl (0,31 mmol) tBuPh<sub>2</sub>SiCl-ot és 220 μl (1,27 mmol) *N,N*-diizopropiletilamint adtunk hozzá. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán át kevertettük, majd diklórmetánnal hígítottuk. Ezt követően 5% NaCl oldattal extraháltuk, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottuk, majd

bepároltuk. A nyerste­r­mé­ket osz­lo­p­kro­ma­to­grá­fiá­val tisztí­to­ttuk (szilika­gél: 15 g, eluens: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOAc 8:2). A kapott színtelen szirup **2** tömege 132 mg (82%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, kloroform-d) δ 7,88–7,79 (m, 2H), 7,76–7,66 (m, 6H), 7,50–7,32 (m, 6H), 5,20 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-1), 4,41–4,33 (m, 1H), 4,12 (dd, J = 11,0, 8,4 Hz, 1H), 3,96 (dd, J = 5,2; 2,6 Hz, 1H), 3,81 (ddd, J = 9,9, 6,1, 5,2 Hz, 1H), 3,69 (t, J = 8,9 Hz, 1H), 3,59 (dt, J = 9,8, 5,1 Hz, 1H), 3,47 (ddd, J = 9,9, 7,5, 5,0 Hz, 2H), 3,17–3,10 (m, 2H), 1,80–1,57 (m, 2H), 1,07 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (kloroform-d): 135,74-127,80 (aromás C), 98,26 (C-1), 74,50, 74,43 és 71,82 (C-3, C-4 és C-5), 66,04 (CH<sub>2</sub>) 65,26 (C-6), 56,36 (C-2), 48,15 és 28,96 (CH<sub>2</sub>), 26,91 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19,32 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS ESI számított: C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Si, 653,2402 [M+Na]<sup>+</sup>. Mért: 653,2403 [M+Na]<sup>+</sup>.

*5.1.2. 3-Azido-propil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-6-O-terc-butil-difenilszilil-2-dezoxi-2-ftálimido-β-D-glükopiranozid (4)*

280 mg (0,81 mmol) 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galaktopiranozil triklóracetimidátot (**3**) [106], valamint 425,2 mg (0,675 mmol) akceptort (**2**) oldottunk 7 ml száraz DKM-ban argon atmoszférában. A reakcióelegyet -50 °C-ra hűtöttük, majd 55 μl (0,30 mmol) TMSOTf promotert adtunk a reakcióelegyhez, melyet 4 órán át kevertettünk -50 °C-on. Ezt követően a reakcióelegyet DKM-nal hígítottuk, vízzel mostuk, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottuk, majd bepároltuk. A nyerste­r­mé­ket osz­lo­p­kro­ma­to­grá­fiá­val tisztí­to­ttuk (szilika­gél: 70 g, eluens: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOAc 9:1→ 8:2). A tisztított színtelen szirup **4** tömege 412 mg (64%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, kloroform-d) δ 7,92–7,82 (m, 2H, aromás CH), 7,79–7,69 (m, 6H, aromás CH), 7,49–7,33 (m, 6H, aromás CH), 5,35 (d, J = 3,0 Hz, 1H, H-4'), 5,22 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-1), 5,21 (dd, J = 10,5, 8 Hz, 1H, H-2'), 4,97 (dd, J = 10,5, 3,5 Hz, 1H, H-3'), 4,70 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1'), 4,48–4,42 (m, 1H, H-3), 4,17 (dd, J = 10,5, 8,5 Hz, 1H, H-2), 4,13–4,05 (m, 2H, H-6'a, H-6'b), 4,01–3,96 (m, 1H, H-6a), 3,95–3,92 (m, 1H, H-5'), 3,89–3,80 (m, 4H, H-4, H-6a, O-CH<sub>a</sub>, OH), 3,61–3,56 (m, 1H, H-5), 3,49 (ddd, J = 10, 7, 5 Hz, 1H, O-CH<sub>b</sub>), 3,18 (t, J = 6,5 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2,13, 1,98, 1,97 és 1,70 (4s, 12H, 4xCOCH<sub>3</sub>), 1,78–1,68 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 1,11 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (kloroform-d): 170,55, 170,20, 170,02 és 169,22 (CH<sub>3</sub>CO), 136,08-127,81 (aromás C), 101,39 (C-1) 98,02 (C-1'), 81,29 (C-4), 74,84 (C-5), 71,36 (C-5'), 70,94 (C-3'), 69,58 (C-

3), 68,86 (C-2'), 66,96 (C-4'), 65,85 (O-CH<sub>2</sub>) 62,04 (C-6), 61,38 (C-6'), 56,31 (C-2), 48,26 (N-CH<sub>2</sub>), 29,03 (C-CH<sub>2</sub>), 26,99 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20,69, 20,63, 20,51 és 20,41 (CH<sub>3</sub>CO), 19,52 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS ESI számított: C<sub>47</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub>Si, 983,3353 [M+Na]<sup>+</sup>. Mért: 983,3358 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 5.1.3. 3-Azido-propil-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-6-O-tert-butil-difenilszilil-2-amino-2-dezoxi-β-D-glükopiranozid (5)

100 mg (0,1 mmol) **4**-es vegyületet oldottunk 5 ml etanolban, majd 100 μl (1,5 mmol) etilén-diamint adtunk hozzá. A reakcióelegyet két napig refluxáltattuk 65 °C-on, majd bepároltuk. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk (szilikagél: 5 g, eluens: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9:1 → 8:2). A színtelen szirup **5** tömege 44 mg (63,8%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Metanol-d<sub>4</sub>) δ 7,82–7,78 (m, 4H), 7,54–7,25 (m, 6H), 4,57 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 4,35–4,20 (m, 2H), 4,04–3,88 (m, 3H), 3,85–3,75 (m, 2H), 3,70 (dd, J = 11,5, 4,5 Hz, 1H), 3,65–3,56 (m, 2H), 3,55–3,42 (m, 6H), 3,34–3,32 (m, 1H), 2,74 (dd, J = 10,0, 8,0 Hz, 1H), 1,91 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 1,07 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (Metanol-d<sub>4</sub>): 136,05–128,63 (aromás C), 104,90 és 103,96 (C-1 és C-1'), 78,18, 77,20, 76,90, 75,58, 74,96, 72,53 és 70,29 (C-2', C-3, C-3', C-4, C-4', C-5 és C-5'), 67,41 (CH<sub>2</sub>) 63,40 és 62,58 (C-6, C-6'), 58,16 (C-2), 49,85 és 30,23 (CH<sub>2</sub>), 27,39 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). HRMS ESI számított: C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>Si, 663,3062 [M+H]<sup>+</sup> és 685,2881 [M+Na]<sup>+</sup>. Mért: 663,3049 [M+H]<sup>+</sup> és 685,2828 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 5.1.4. 3-Azidopropil-β-D-galaktopiranozil-(1→4)-2-amino-2-dezoxi-β-D-glükopiranozid (6)

22 mg (0,03322 mmol) **5**-ös vegyületet oldottunk 1 ml trifluor-ecetsavban. Miután a reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettük, bepároltuk. A kapott nyersterméket méretkizárásos oszlopkromatográfiával (Sephadex LH-60) tisztítottuk. Az így előállított **6**-os termék tömege 13,8 mg (98%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Deutérium-oxid) δ 4,78 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 4,46 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 4,07–3,95 (m, 2H), 3,92 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 3,88–3,61 (m, 11H), 3,54 (dd, J = 10,0, 7,7 Hz, 1H), 3,45 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,08 (dd, J = 10,6, 8,4 Hz, 1H), 1,93 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 0,96 (d, J = 9,2 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (Deutérium-oxid): 103,05 és 98,55 (C-1 és C-1'), 78,25, 75,41, 75,07, 72,45, 70,92, 70,73

és 68,49 (C-2', C-3, C-3', C-4, C-4', C-5 és C-5'), 67,55 (CH<sub>2</sub>) 61,07 és 59,70 (C-6, C-6'), 55,46 (C-2), 47,91 és 28,13 (CH<sub>2</sub>). HRMS ESI számított: C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>, 447,1703 [M+Na]<sup>+</sup>. Mért: 447,1757 [M+Na]<sup>+</sup>.

#### 5.1.5. NODAGA-LacN (8)

2,5 mg (0,00589 mmol) **6**-os vegyületet oldottunk 450 µl borát pufferben (0,1 M; pH 8,4) és 10 °C-ra hűtöttük, majd hozzáadtunk 5,4 mg (0,0073 mmol) NODAGA-NHS (**7**) észtert, melyet előzetesen 100 µl száraz dimetil-szulfoxidban oldottunk fel. A reakcióelegyet hagytuk felmelegedni szobahőmérsékletre és egy éjszakán át kevertettük, végül bepároltuk. A nyerterméket félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk, fordított fázisú Luna C18(2) 100 Å 10 µm (250 x 10 mm) oszlopon. Az áramlási sebesség 4 ml/perc volt. Az eluensek a következők voltak: A eluens: 0,1% HCOOH, B eluens: 95% ACN. Gradiens: 0 perc 100% A; 2 perc 100% A; 32 perc 100% B; 40 perc 100% B. A kapott 1 mg (28%) tömegű terméket 11,7 és 12,8 perc között gyűjtöttük. HRMS ESI számított: C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub> 782,3420 [M+H]<sup>+</sup>. Mért: 782,3466 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 5.1.6. DBCO-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (11)

8 mg (0,006 mmol) ciklikus cRGDfK dimer peptidet (E[c(RGDfK)]<sub>2</sub>) (**9**) 150 µl száraz DMSO-ban oldottuk, majd 10,5 µl (0,06 mmol) DIPEA bázist adtunk hozzá. Ezt követően hozzácepegettünk 5 mg (0,012 mmol) dibenzocikloooktin-*N*-hidroxiszukcinimidil észtert (DBCO-NHS) (**10**), melyet előzetesen 150 µl száraz DMSO-ban oldottunk fel. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy napon át kevertettük, vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. A nyerterméket félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk. A tisztítás paraméterei azonosak voltak a **8**-as vegyületnél leírt HPLC-és módszerrel. A 2,09 mg (21,7%) tömegű terméket 15,6 és 16,8 perc között gyűjtöttük, vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. HRMS ESI számított: C<sub>78</sub>H<sub>100</sub>N<sub>20</sub>O<sub>18</sub> 803,3840 [M+H]<sup>2+</sup>. Mért: 803,3815 [M+H]<sup>2+</sup>.

#### 5.1.7. NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (12)

2 mg (0,0012 mmol) **11**-es vegyületet oldottunk 150  $\mu$ l DMSO és 150  $\mu$ l PBS puffer (pH 7,2) elegyében. Ezt követően 1 mg (0,0016 mmol) NODAGA-LacN-Pr-N<sub>3</sub> (**8**) oldottunk fel 200  $\mu$ l DMSO-ban, majd ezt az oldatot hozzácsepegtettük a **11**-es vegyület oldatához. A reakcióidő 1 nap volt, ezután a reakcióelegyet vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. A nyersterméket a **8**-as vegyületnél leírt HPLC-és módszerrel tisztítottuk. A kapott tiszta fehér por állagú anyag tömege 1 mg (35%), melyet 14,7 és 15,3 perc között gyűjtöttünk, majd vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. HRMS ESI számított: C<sub>108</sub>H<sub>151</sub>N<sub>27</sub>O<sub>35</sub>, 1216.0325 [M+2Na]<sup>2+</sup>. Mért: 1216.0313 [M+2Na]<sup>2+</sup>

#### 5.1.8. DOTAGA-LacN (**14**)

6 mg (0,014 mmol) **6**-os vegyületet 900  $\mu$ l nátrium-karbonát pufferben (0,1 M; pH 9,5) oldottuk, majd hozzácsepegtettük a 10 mg (0,014 mmol) p-NCS-Bn-DOTAGA (**13**) komplexképző 100  $\mu$ l száraz DMSO-val készült oldatát. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettük, vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. A nyersterméket félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk. A tisztítási körülmények megegyeztek a **8**-as vegyületével. A tiszta, fehér por állagú 4,04 mg (28%) tömegű terméket 9,9 és 10,7 perc között gyűjtöttük, vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Deutérium-oxid)  $\delta$  7,38 (d, J = 8,0 Hz, 2H) 7,29 (d, 15 J = 8,5 Hz, 2 Hz), 4,67-4,50 (m, 1H), 4,47 (d, J = 7,8 Hz, 1H) 4,37 (d, J = 3,1 Hz, 2H), 3,98 (d, J = 12,3, 4,4 Hz, 2H), 3,94-2,93 (m, 3H), 2,64-2,43 (m, 2H), 2,11-1,75 (m, 4H) HRMS ESI számított: C<sub>42</sub>H<sub>66</sub>N<sub>10</sub>O<sub>19</sub>S<sub>1</sub> 1047,4304 [M+H]<sup>+</sup>, és 524,2191 [M+H]<sup>2+</sup>. Mért: 1047,4395 [M+H]<sup>+</sup>, és 524,2252 [M+H]<sup>2+</sup>.

#### 5.1.9. DBCO-cKNGRE (**17**)

7,25 mg (0,012 mmol) **15**-ös vegyületet oldottunk 150  $\mu$ l száraz dimetil-szulfoxidban, majd 10,5  $\mu$ l (0,06 mmol) DIPEA bázist adagoltunk hozzá. Ezt követően 5 mg (0,012 mmol) DBCO-NHS észter (**10**) 150  $\mu$ l DMSO-ban készült oldatát csepegtettük a reakcióelegyhez. A reakcióidő szobahőmérsékleten egy nap volt. Ezután a reakcióelegyet vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. A nyersterméket félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk. A tisztítási körülmények megegyeztek az **8**-as vegyületek tisztítása során alkalmazott

paraméterekkel. A tiszta, fehér por állagú 5 mg (48%) tömegű terméket 18,7 és 19,3 perc között gyűjtöttük, vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. HRMS ESI számított:  $C_{42}H_{54}N_{12}O_9$  872,4293  $[M+2H]^+$ , és 436,7186  $[M+2H]^{2+}$ . Mért: 872,4024  $[M+2H]^+$ , és 436,7118  $[M+2H]^{2+}$ .

#### 5.1.10. DBCO-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (18)

4,48 mg (0,0077 mmol) cKNGRE (15) peptidet oldottunk 150  $\mu$ l száraz DMSO-ban, majd 6,8  $\mu$ l (0,0385 mmol) DIPEA bázist, és 5 mg (0,0077 mmol) dibenzociklooktin-PEG<sub>4</sub>-N-hidroxiszukcinimidil észtert (DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS) (16) adtunk hozzá 150  $\mu$ l száraz DMSO-ban oldva. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettük, majd vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. A nyerterméket a **8**-as vegyületnél leírt félpreparatív HPLC-és módszerrel tisztítottuk. A fehér por állagú, 2 mg (23,24%) tömegű vegyületet 14,2 és 15 perc között gyűjtöttük, vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. HRMS ESI számított:  $C_{53}H_{75}N_{13}O_{14}$  1119,5713  $[M+2H]^+$ , és 560,2896  $[M+2H]^{2+}$ . Mért: 1119,5415  $[M+2H]^+$ , és 560,2762  $[M+2H]^{2+}$ .

#### 5.1.11. DOTAGA-LacN-cKNGRE (19)

3,5 mg (0,0033 mmol) DOTAGA-LacN-ot (14) oldottunk 200  $\mu$ l száraz DMSO-ban, majd 2,5 mg (0,00287 mmol) DBCO-cKNGRE (17) peptidet adtunk hozzá, melyet 300  $\mu$ l száraz DMSO-ban oldottunk fel. Miután egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettük a reakcióelegyet, vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. A nyerterméket fordított fázisú félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk, melynek körülményei megegyezettek a **8**-as vegyületnél leírtakkal. A fehér por állagú, 1 mg (18%) tömegű anyagot 13,6 és 14,5 perc között gyűjtöttük, vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. HRMS ESI számított:  $C_{84}H_{120}N_{22}O_{28}S_1$  959,9274  $[M+H]^{2+}$ , és 640,6216  $[M+H]^{3+}$ . Mért: 959,9204  $[M+H]^{2+}$ , és 640,6193  $[M+H]^{3+}$ .

#### 5.1.12. DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (20)

1 mg (0,95  $\mu\text{mol}$ ) **18**-as vegyületet oldottunk 200  $\mu\text{l}$  száraz DMSO-ban, majd 1 mg (0,89  $\mu\text{mol}$ ) **14**-es vegyület 300  $\mu\text{l}$  DMSO-ban készült oldatát csepegtettük hozzá. A reakcióidő szobahőmérsékleten egy nap volt. A reakcióelegyet vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. A nyersterméket fordított fázisú HPLC-vel tisztítottuk. A tisztítás körülményei megegyeztek a **8**-as vegyületnél leírt HPLC-és módszerrel. A fehér por állagú, 1 mg tömegű (52%) terméket 13,2 és 14,2 perc között gyűjtöttük, majd vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. HRMS ESI számított:  $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_{23}\text{O}_{33}\text{S}_1$  722,6682  $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ , és 542,2531  $[\text{M}+\text{H}]^{4+}$ . Mért: 722,6637  $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ , és 542,2535  $[\text{M}+\text{H}]^{4+}$ .

#### 5.1.13. DOTAGA-cKNGRE (**21**)

A referencia vegyület prekursorát, a DOTAGA-cKNGRE-t (**21**) Dénes Noémi [111] állította elő a következő módon: 7,2 mg (11,5  $\mu\text{mol}$ ) p-SCN-Bn-DOTAGA (**13**) kelátort és 5,8 mg (9,95  $\mu\text{mol}$ ) cKNGRE (**15**) peptidet oldott 750  $\mu\text{l}$  DMF-ben, majd hozzáadott 6,5  $\mu\text{l}$  trietilamint és 250  $\mu\text{l}$  vizet. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán át kevertette, majd vízzel hígította és liofilizálta. A nyersterméket fordított fázisú félpreparatív HPLC-vel tisztította, Supelco Discovery<sup>®</sup> Bio Wide Pore C18 10  $\mu\text{m}$  (150 x 10 mm) oszlopon. Az áramlási sebesség 4 ml/perc volt. A eluens: 0,1% TFA, B eluens: 0,1% TFA ACN/víz 95:5%-os elegyében. Gradiens: 0 perc 10% B, 5 perc 10% B, 30 min 90% B. A tiszta, fehér por állagú, 6,6 mg (55%) tömegű terméket 11,1 és 11,5 perc között gyűjtötte, majd vízzel hígította és liofilizálta. HRMS ESI számított:  $\text{C}_{50}\text{H}_{79}\text{N}_{17}\text{O}_{16}\text{S}_1$  603,7884  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ , és 402,8615  $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ . Mért: 603,7916  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ , és 402,8632  $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ .

#### 5.1.14. DOTAGA-LacN(NAP) (**28**)

A 3-azido-propil-(3-O-(2-naftil)metil- $\beta$ -D-galaktopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2-amino-2-dezoxi- $\beta$ -D-glükopiranozid) (**27**) előállítását Szűcs Ágnes végezte [114]. 9,5 mg (0,017 mmol) **27**-es vegyületet oldottunk 600  $\mu\text{l}$  száraz DMSO-ban és 900  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pufferben (0,1 M, pH 9,5). Ezután 11 mg (0,017 mmol) p-SCN-Bn-DOTAGA kelátort oldottunk 200  $\mu\text{l}$  DMSO-ban és ezt az elegyet hozzácsepegtettük a **27**-es vegyületet oldatához. Két

éjszakán át kevertettük a reakcióelegyet, majd vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. A nyersterméket fordított fázisú félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk. A tisztítás paraméterei megegyeztek a **8**-as vegyület tisztítása során alkalmazottakéval. A tiszta fehér por állagú **28**-as vegyület tömege 10 mg (50%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Metanol- $d_4$ ):  $\delta$  7,90 (ddd,  $J = 13,6, 6,3, 2,7$  Hz, 5H), 7,61 (dd,  $J = 8,5, 1,7$  Hz, 1H), 7,57 – 7,45 (m, 2H), 7,38 – 7,24 (m, 8H), 4,98 – 4,88 (m, 1H), 4,57 – 4,24 (m, 1H), 4,09 (d,  $J = 3,2$  Hz, 1H), 4,02 – 2,86 (m, 33H), 2,59 (dd,  $J = 20,5, 13,0$  Hz, 2H), 2,05 – 1,95 (m, 2H), 1,87 (d,  $J = 8,3$  Hz 2H). HRMS ESI számított:  $\text{C}_{53}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{19}\text{S}_1$ , 1187.4930  $[\text{M}+\text{H}]^+$  és 594.2504  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ . Mért: 1187.4861  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 594.2491  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ .

#### 5.1.15. DBCO-PEG<sub>4</sub>-cRGDfK (30)

4,65 mg (0,0077 mmol) cRDGfK peptidet (**29**) oldottunk fel 200  $\mu\text{l}$  DMSO-ban, majd 6,8  $\mu\text{l}$  (0,0385 mmol) DIPEA bázist adtunk hozzá. Ezt követően a reakcióelegyhez 5 mg (0,0077 mmol) DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS észter 200  $\mu\text{l}$  DMSO-val készült oldatát adagoltuk. A reakcióidő 1 nap. Ezután a reakcióelegyet vízzel hígítottuk, majd liofilizáltuk. A nyersterméket a **8**-as vegyületnél leírt félpreparatív HPLC-s módszerrel tisztítottuk. A tiszta fehér por állagú 3,9 mg (44,5%) tömegű vegyületet 17,4 és 18,3 perc között gyűjtöttük, majd vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. HRMS ESI számított:  $\text{C}_{57}\text{H}_{74}\text{N}_{11}\text{O}_{14}$ , 569.7826  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ . Mért: 569.7839  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ .

#### 5.1.16. DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK (31)

2 mg (0,0017 mmol) DBCO-PEG<sub>4</sub>-cRGDfK peptidet (**30**) oldottunk 150  $\mu\text{l}$  DMSO-ban. Ezt követően 2,5 mg (0,002 mmol) DOTAGA-LacN(NAP)-ot oldottunk 150  $\mu\text{l}$  DMSO-ban, majd ezt az elegyet hozzácsepegtettük a **30**-as vegyület oldatához. A reakcióelegyet egy nappig kevertettük, majd vízzel hígítottuk, és liofilizáltuk. A nyersterméket a **8**-as vegyületnél említett HPLC-s módszerrel tisztítottuk. A tiszta, fehér por állagú anyag tömege 1 mg (24,5%), melyet 17,7 és 18,3 perc között gyűjtöttünk, vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. HRMS ESI számított:  $\text{C}_{110}\text{H}_{148}\text{N}_{21}\text{O}_{33}\text{S}_1$ , 776.0204  $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ . Mért: 776.0251  $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ .

### 5.1.17. DOTAGA-cRGDfK (32) szintézise

10 mg (0,0165 mmol) cRGDfK peptidet oldottunk 900  $\mu$ l 0,1 M-os  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pufferben (pH 9,55). Ezt követően 12 mg (0,0165 mmol) p-NCS-Bn-DOTAGA kelátort oldottunk fel 100  $\mu$ l DMSO-ban, majd hozzácepegtettük a peptid oldatához. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettük, majd vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. A nyersterméket a 8-as vegyületnél leírt HPLC-s módszerrel tisztítottuk. A tiszta, fehér por állagú anyag tömege 2 mg (10%), melyet 13,8 és 14,1 perc között gyűjtöttünk, vízzel hígítottuk és liofilizáltuk. HRMS ESI számított:  $\text{C}_{54}\text{H}_{78}\text{N}_{15}\text{O}_{16}\text{S}_1$ , 613.7853  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$  és 409.5262  $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ . Mért: 613.7855  $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ , 409.5277  $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$ .

## 5.2. Radiokémia

### 5.2.1. A 12-es vegyület $^{68}\text{Ga}$ izotóppal történő radiokémiai jelzésének a vizsgálata különböző prekursor koncentrációk alkalmazása során

A  $^{68}\text{Ga}$  izotópot a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generátor 0,1 M ultra tiszta HCl-val történő fracionált elúciójával nyertük. A legnagyobb aktivitású frakciót használtuk fel a radiokémiai szintézisek során. Az egyes jelzési reakciókhoz 100  $\mu$ l  $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$  oldatot használtunk fel (6-8 MBq 0,1 M HCl-ban), majd 20  $\mu$ l  $\text{NH}_4\text{OAc}$  pufferrel (3 M, pH 4) állítottuk be a reakcióelegyek pH-ját. Ezt követően a NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (12) törzsoldatból (1mg/ml) 3, 5, 7, és 10  $\mu$ l-t adtunk a pufferelt  $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$  oldatokhoz külön-külön. A reakcióelegyek ligand koncentrációi a következők voltak: 10, 17, 23 és 32  $\mu$ M. A jelzési reakciókat 95 °C-on 15 percig melegítettük. A reakciók végbemenetelét radio-HPLC-vel ellenőriztük, Waters 2695 Alliance HPLC rendszeren. Analitikai oszlopként a fordított fázisú Luna C18 3  $\mu$ m (150 x 4,60 mm) kolonnát használtuk. A eluens: 0,01 M oxálsav (pH 3); B eluens: 95% ACN. Gradiens: 0 min 100% A, 1 perc 100% A, 10 perc 100% B, 12 perc 100% A.

### 5.2.2. A 12-es vegyület $^{68}\text{Ga}$ izotóppal történő radiokémiai jelzése különböző hőmérsékleten

100  $\mu\text{l}$   $^{68}\text{GaCl}_3$  (6-8 MBq 0,1 M HCl-ban) oldatot Eppendorf csőbe pipettáztunk, majd 20  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$  pufferrel (3 M, pH 4) állítottuk be a minták pH-ját. Mindegyik elegyhez 10  $\mu\text{l}$  32  $\mu\text{M}$ -os prekursor oldatot adtunk. A jelzési reakciókat szobahőmérsékleten, 37, 60, 80, és 95  $^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk 15 percig. Ezt követően a jelzési hozamokat az 5.2.1 részben leírt radioanalitikai HPLC-s módszerrel határoztuk meg.

### 5.2.3. *A NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (12) $^{68}\text{Ga}$ izotóppal történő optimalizált radiokémiai jelzése*

1000  $\mu\text{l}$   $^{68}\text{GaCl}_3$  oldatot (60-80 MBq 0,1 M HCl-ban) 200  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$  oldattal (3 M, pH 4) puffereltünk, majd a NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (**12**) törzsoldatból (1 mg/ml) 100  $\mu\text{l}$ -t (42 nmol) adtunk hozzá. A reakcióelegyet 95  $^\circ\text{C}$ -on 15 percig melegítettük. Ezután a kapott radiojelzett peptidet szilárd fázisú extrakcióval (SPE) tisztítottuk OASIS HLB 1cc oszlopon. A SPE oszlopot előzetesen 5 ml EtOH-lal (96%) és 10 ml vízzel aktiváltuk. Az oszlopra felvitt radiotraceret 1 ml vízzel mostuk. Ezt követően radiojelzett terméket 2 x 250  $\mu\text{l}$  salsol:EtOH 1:1 arányú keverékével eluáltuk. A termék radiokémiai tisztaságát radio-HPLC-vel határoztuk meg, melynek során az 5.2.1 részben leírt paramétereket alkalmaztuk. A tisztított radiojelzett peptid radiokémiai tisztasága >99%. A radiokémiai tisztaságot radio-TLC módszerrel is meghatároztuk, melynek során iTLC vékonyréteget alkalmaztunk, az eluens pedig 0,5 M-os citrát puffer (pH 5,5) volt.

### 5.2.4. *A DOTAGA-LacN (14), DOTAGA-LacN-cKNGRE (19) és a DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (20) prekursorok radiokémiai jelzése $^{68}\text{Ga}$ izotóppal*

1000  $\mu\text{l}$   $^{68}\text{GaCl}_3$  oldatot (80 MBq) 200  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$  pufferrel (3 M, pH 4) elegyítettünk, majd a **14**, **19**, és **20** vegyületekből készült 1 mg/ml-es törzsoldatokból 20  $\mu\text{l}$ -t adtunk az elegyhez külön-külön. A reakcióelegyeket 95  $^\circ\text{C}$ -on 15 percig melegítettük, majd az előállított radiotraceret szilárdfázisú extrakcióval tisztítottuk Oasis HLB 1cc oszlopon. Az SPE oszlopot 5 ml 96%-os EtOH-lal és 10 ml vízzel aktiváltuk. 1 ml vízzel mostuk az oszlopra felvitt radiojelzett vegyületeket, majd a tisztított termékeket 2 x 250  $\mu\text{l}$  salsol-EtOH 1:1 arányú elegyével eluáltuk. A legnagyobb radioaktivitású frakciót nitrogén

gázáram segítségével koncentráltuk, majd 100 µl salsollal hígítottuk és ezt az oldatot használtuk fel a preklinikai vizsgálatokhoz. Az előállított radiotracernek minőségellenőrzését radio-HPLC-vel végeztük. A mérés körülményei megegyeztek az 5.2.1 részben leírt HPLC-s módszerrel.

#### 5.2.5. DOTAGA-cKNGRE (21) radiokémiai jelzése $^{68}\text{Ga}$ izotóppal

1000 µl  $^{68}\text{GaCl}_3$  oldathoz, 160 µl NaOAc puffert (1 M) és 3 µl 6 mM-os DOTAGA-cKNGRE törzsoldatot adtunk, majd a reakcióelegyet 95 °C-on 5 percig melegítettük. Ezt követően a radiotraceret aktivált (5 ml EtOH, 10 ml víz) SPE oszlopra (Oasis HLB 1cc) vittük fel, majd az oszlopot 1 ml vízzel mostuk. A radiojelzett terméket 300 µl salsol:EtOH 1:2 arányú elegyével eluáltuk. Az előállított radiojelzett peptid radiokémiai tisztaságát radio-HPLC-vel határoztuk meg KNAUER HPLC rendszeren, fordított fázisú Halo C18 5 µm (100 x 3,0 mm) kolonnát alkalmazva. Az áramlási sebesség 0,7 ml/perc volt. A eluens: 0,1% TFA, B eluens: 0,1% TFA ACN/víz 95:5% arányú elegyében. Gradiens: 0 perc 4% B, 2 perc 4% B, 5 perc 10% B, 10 perc 30% B, 13 perc 43% B.

#### 5.2.6. DOTAGA-LacN(NAP) (28), DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK (31) és DOTAGA-cRGDfK (32) prekursorok radiokémiai jelzése $^{68}\text{Ga}$ izotóppal

A jelzésekhez felhasznált  $^{68}\text{Ga}$  radionuklidot ciklotronban állítottuk elő  $^{68}\text{Zn}(p, n)^{68}\text{Ga}$  magreakció segítségével, melynek során a 20 mg-os préselt cink korongot 12 MeV protonnyalábbal, 50 µA-es áramerősséggel, 10 percig sugaraztuk be (~ 3 GBq). Kihozatal után a besugarazott cink korongot 5 ml 5 M-os HCl-ban oldottuk fel, majd ezt követően ZR gyantán (0,3 ml) kötöttük meg. A gyantát 5 ml 5 M-os HCl-val mostuk, hogy eltávolítsuk a  $^{68}\text{Zn}$  szennyezőt. Ezt követően az előállított  $^{68}\text{Ga}$  radioizotópot 5 ml 2 M-os HCl-val eluáltuk, majd TK200 gyantára vittük fel az eluátumot. Ez a lépés az aktivitás koncentrációját biztosítja. A TK200 gyantát először 5 ml 2 M-os HCl-val mostuk. A  $^{68}\text{Ga}$  radionuklidot frakcionáltan eluáltuk 0,05 M-os HCl-val, ezt követően használtuk fel a radiojelzésekhez. 400 µl  $^{68}\text{Ga}$  (130-200 MBq) oldatot elegyítettünk 400 µl  $\text{NH}_4\text{OAc}$  pufferrel (3 M, pH 4), majd **28**, **31**, és **32** vegyületekből készült 1 mg/ml-es törzsoldatokból 20 µl-t adtunk a pufferezt  $^{68}\text{Ga}$  oldatokhoz külön-külön. A

reakcióelegyeket 95 °C-on 15 percig melegítettük, majd a radiotraceret Oasis HLB 1cc SPE oszlopra vittük fel külön-külön, melyeket előzetesen 5 ml EtOH-lal és 10 ml vízzel kondicionáltunk. Ezután az oszlopot 1 ml vízzel mostuk, a radiojelzett vegyületeket pedig 250 µl EtOH-lal eluáltuk. Ezt követően a tisztított radiotraceret nitrogén gázáram segítségével koncentráltuk, majd 100 µl salsollal hígítottuk a biológiai vizsgálatokhoz. A radiofarmakonok radiokémiai tisztaságát radio-HPLC-vel határoztuk meg. A mérési körülmények megegyeztek az 5.2.1 részben alkalmazott paraméterekkel. A radiojelzett vegyületek moláris aktivitás értékei a következők voltak:  $4,75 \pm 0,057$  GBq/µmol ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)}$ ),  $11,63 \pm 0,17$  GBq/µmol ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK}$ ), valamint  $5,49 \pm 0,19$  GBq/µmol ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cRGDfK}$ ).

#### 5.2.7. *Oktanol/víz megoszlási hányados meghatározása:*

A tisztított radiofarmakonok oldatából 50 µl (2-3 MBq) mennyiséget elegyítettünk 450 µl vízzel, és 500 µl 1-oktanollal. A keveréket rázógép segítségével ráztattuk 5 percig, majd centrifugáltuk (9000 rpm, 5 perc). Minden egyes radiotracer esetében 3 x 20 µl mennyiségű mintát vettünk, majd a minták radioaktivitását gamma számlálóval határoztuk meg.

#### 5.2.8. *Stabilitás vizsgálat*

A tisztított radiotraceret 50 µl (4-5 MBq) térfogatú oldatához 50 µl humán szérumot, oxálsav oldatot (0,01 M), valamint Na<sub>2</sub>EDTA (0,01 M) oldatot adtunk külön-külön. A mintákat radio-HPLC-vel analizáltuk 0, 60, és 120 perc elteltével. Az analitikai mérések paraméterei azonosak voltak az 5.2.1 részben leírtakkal.

### 5.3. **Biológia**

#### 5.3.1. *Állattartás*

A 12 hetes C57BL/6 hím egereket IVC rendszerben (Techniplast, Akronorm Ltd, Budapest, Magyarország)  $26 \pm 2$  °C-on,  $55 \pm 10\%$ -os páratartalomban tartottuk, a

cirkadián ritmusnak megfelelő, 12 órás mesterséges megvilágításban, konvencionális állatházban. Minden állat számára félszintetikus takarmány (SDS VRF-1, Animalab Ltd., Budapest, Magyarország) és sterilizált csapvíz állt a rendelkezésre ad libitum. Az állatok emberi gondozásban részesültek. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi és Állatjóléti Bizottsága engedélyezte (8/2016/DEMÁB). A kísérleti állatok tartása és kezelése a magyar és az Európai Unió törvényeinek, irányelveinek, valamint előírásainak megfelelően történt.

### 5.3.2. B16-F10 tumor indukciója

A subcután B16-F10 (egér melanoma) tumor indukciójához a C57BL/6 egereket 3%-os izoflurán (Forane, AbbVie) gázzal, dedikált inhalációs kisállat anesztéziás készülék (Tec3 Isoflurane Vaporizer, Eickemeyer, Egyesült Királyság) segítségével altattuk el. Az egerek bal vállába szubkután injektáltunk 150  $\mu$ l steril fiziológiás sóoldatban szuszpendált 3 x 10<sup>6</sup> B16-F10 sejtet. Az *in vivo* és *ex vivo* vizsgálatokat az oltás után 10  $\pm$  1 nappal végeztük. A tumorok térfogata 80  $\pm$  2 mm<sup>3</sup> volt.

### 5.3.3. *In vivo* PET képalkotás és kép analízis

Az *in vivo* biodisztribúciós vizsgálatokhoz a B16-F10 tumoros egereket 3%-os izoflurán gázzal elaltattuk, majd a laterális farokvénán keresztül 150  $\mu$ l fiziológiás sóoldatban oldott 6,6 $\pm$ 0,3 MBq aktivitású [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cKNGRE, [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP), [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK, valamint [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cRGDfK radiofarmakont injektáltunk az egerekbe külön-külön. Az intravénás injektálást követően (70-80 perc) 20 perces statikus PET felvételeket készítettünk a tumoros területről miniPET-II és miniPET-III készülékkel. A képrekonstrukciót követően a vizsgálat tárgyát képező területet (VOI) manuálisan rajzoltuk körbe a BrainCAD szoftver segítségével, majd meghatároztuk a kvantitatív standardizált felvételi értékeket (SUVs).

#### 5.3.4. Statisztikai elemzés

Az adatokat átlag  $\pm$  SD-vel adtuk meg. A szignifikancia kiszámítása kétmintás t-próbával, kétirányú ANOVA, és Mann-Whitney U-próbával történt.

#### 5.3.5. *Ex vivo* szervi eloszlás vizsgálat

A B16F10 melanomás egereket a tumor indukcióját követően 10-14 nappal vizsgáltuk. A vizsgálatához a kísérleti állatokat 3%-os izoflurán gázzal altattuk el, majd a laterális farokvénán keresztül 150  $\mu$ l fiziológiás sóoldatban oldott  $6,6 \pm 0,3$  MBq aktivitású [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cKNGRE, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP), [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK, valamint [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cRGDfK radiofarmakont injektáltunk az egerekbe külön-külön. A 90 perces inkubálási időt követően az állatokat izoflurán gázzal altattuk túl, majd a tumoros egerek hasüregét és mellüregét sebészi ollóval nyitottuk meg. Vérmintát vettünk a szívből, valamint vizeletmintát vettünk a húgyhólyagból. A következő szervekből és szövetekből metszettünk le egy kis darabot: tüdő, máj, bal vese, szív, lép, gyomor, vékony-és vastagbél, hasüregi zsír. Lemértük az előkészített minták tömegét, majd radioaktivitásukat kalibrált gamma számlálóval határoztuk meg. Az így kapott adatokat %ID/g-ban adtuk meg, amely a százalékos injektált dózis és a szövet tömegének a hányadosa.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az  $\alpha_v\beta_3$  integrinek, valamint az aminopeptidáz N fontos szerepet töltenek be az angiogenezis, valamint az áttétképzés folyamatában. Az RGD (arginin-glicin-aszparaginsav) tripeptid szekvenciát tartalmazó peptid származékok nagy affinitással és szelektivitással képesek kötődni az  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorhoz, míg az aminopeptidáz N receptorhoz az NGR (aszparagin-glicin-arginin) peptid analógok képesek specifikusan kötődni. Ennek köszönhetően a pozitronsugárzó radionukliddal jelzett származékaik alkalmasak a tumor angiogenezis detektálására PET képalkotással. A galektin-3 a lektinek csoportjába tartozó fehérje, mely képes felismerni a különböző glikokonjugátumokban található  $\beta$ -galaktozidos kötéseket. A galektin-3 különböző jelátviteli utakon befolyásolja a daganatok progresszióját. Az extracelluláris galektin-3 részt vesz a metasztázis, valamint az érépződés folyamatában, elősegíti a tumoros sejtek adhézióját, migrációját, valamint invázióját. Az intracelluláris galektin-3 pedig az apoptózis, vagyis a programozott sejthalál folyamatát szabályozza. Ezért a galektin-3 jó prognosztikus, valamint diagnosztikus markere lehet azoknak a tumor típusoknak, amelyek nagyobb mértékben expresszálják ezt a fehérjét, ilyenek például a melanóma, a vastagbél- vagy prosztatatarák. A galektin-3 természetes liganduma a laktózamin és galaktóz egységének C-3' helyzetben történő megfelelő kémiai módosítása növeli a receptorhoz való affinitást.

A kutatás során egyrészt glikozilációval, valamint a pegilálással terveztük javítani a peptid alapú radiogyógyszerek farmakokinetikáját, másrészt olyan radiofarmakonok előállítását terveztük, amelyek specifikusan képesek kötődni a galektin-3 receptorhoz. Ennek megfelelően RGD, NGR, valamint laktózamin tartalmú prekursorok előállítását hajtottuk végre. A radiofarmakonok tumor akkumulációjának a növelése érdekében heterodimer vegyületek szintézisét is kidolgoztuk.

Először az azidopropil aglikonnal rendelkező, **6**-os laktózamin származék szintézisét valósítottuk meg, melyet NODAGA-NHS (**7**) észterrel konjugáltunk. Ezt követően a kelátor-konjugált laktózamin származékot (**8**) rézmentes, gyűrűfeszültség indukálta klikk reakcióval kapcsoltuk az előzetesen DBCO egységgel funkcionizált  $E[c(RGDfK)]_2$  dimer peptidhez (**11**). Ezt követően megvalósítottuk az előállított NODAGA-LacN-

$E[c(\text{RGDfK})]_2$  prekursor (**12**)  $^{68}\text{Ga}$  izotóppal történő radiokémiai jelzésének optimalizálását. A legmagasabb radiokémiai hozamot a  $32\ \mu\text{M}$ -os ligandkoncentrációnál tapasztaltuk, a reakcióidő 15 perc, a reakcióhőmérséklet pedig  $95\ ^\circ\text{C}$  volt. Meghatároztuk az előállított radiofarmakon oktanol/víz megoszlási hányadosát is, mely alapján az előállított radioligand hidrofilitásának bizonyult. Megvalósítottuk a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-LacN-E}[c(\text{RGDfK})]_2$  vegyület stabilitásvizsgálatát is humán szérumban,  $0,01\ \text{M}$  oxálsav, valamint  $0,01\ \text{M}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$  oldatok jelenlétében. A vizsgált körülmények között két óra elteltével is stabil maradt a radiofarmakon. Az előzetes biológiai vizsgálatok során az előállított radiojelölt molekula alacsony tumorfelvételt mutatott, ami azzal magyarázható, hogy valószínűleg a peptidhez nagyon közel lévő DBCO egység drasztikusan lecsökkentette a vegyület affinitását  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptorhoz, ezért a későbbiekben oligoetilén-glikol ( $\text{PEG}_4$ ) láncot alakítottunk ki a peptid és DBCO egység között.

A kutatás következő részében NGR peptidet tartalmazó radiofarmakonokat állítottunk elő aminopeptidáz N receptort fokozottan expresszáló tumorok detektálására. Ennek során először a **6**-os laktózamin származékot tiokarbamid kötéssel keresztül  $p\text{-SCN-Bn-DOTAGA}$  kelátorhoz (**13**) kapcsoltuk. Ezután a kapott vegyületet (**14**) rézmentes SPAAC klick reakció alkalmazásával konjugáltuk először DBCO-NHS észterrel (**10**), majd a pegilált-DBCO-NHS észterrel (**16**) funkcionizált cKNGRE pentapeptidekhez (**17**, **18**). Ezt követően megvalósítottuk az előállított DOTAGA-LacN (**14**), DOTAGA-LacN-cKNGRE (**19**) és DOTAGA-LacN- $\text{PEG}_4$ -cKNGRE (**20**) prekursor molekulák  $^{68}\text{Ga}$  radionukliddal történő radiokémiai jelzését. Meghatároztuk az előállított radioligandok oktanol/víz megoszlási hányadosát, az alacsony  $\log P$  értékek alapján a jelzett vegyületek hidrofilek. A  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-LacN-E}[c(\text{RGDfK})]_2$  glikopeptiddel azonos módon végeztük el ezeknek a radiojelölt komplexeknek a stabilitás vizsgálatát is. A vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy az alkalmazott három különböző körülmény esetében a jelzett molekulák 2 óra elteltével is intaktak maradtak. Az előállított radiogyógyszerek hatékonyságát B16F10 egér melanóma modellen vizsgáltuk. A  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE}$ ,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-PEG}_4\text{-cKNGRE}$ , valamint a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cKNGRE}$  felhasználásával készült miniPET felvételeken a tumorok

egyértelműen azonosíthatóak voltak, míg a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN esetében mérsékelt tumorfelvétel volt tapasztalható. A radiogyógyszerek máj- és vesefelvétele között azonban különbségeket fedeztünk fel. A glikoziláció, valamint a pegilálás ugyan nem növelte jelentős mértékben a tumorfelvételt, azonban jelentősen javította a peptid alapú radioligandok farmakokinetikai tulajdonságait. A jelölt peptid származékhoz képest csökkent a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, valamint a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE glikopeptidek akkumulációja a májban, ami a szervezet sugárterhelése szempontjából előnyös. Ezen kívül a magasabb tumor/izom arány kontrasztosabb PET felvételt eredményezett a két <sup>68</sup>Ga-jelzett glikopeptid esetében.

Ezt követően a laktózamin affinitását növeltük a galektin-3 fehérjéhez egy aromás csoport 3'-pozícióba történő bevezetésével. Ennek megvalósításához először egy (2-naftil)metilezett laktózamin származék (**27**) előállítását történt. Ezt a vegyületet a korábban már alkalmazott DOTAGA kelátorhoz (**13**) kapcsoltuk. Ezt a molekulát (**28**) egyrészt <sup>68</sup>Ga izotóppal jelöltük és vizsgáltuk képalkotó tulajdonságait a Gal-3 pozitív tumorok detektálása során, másrészt ez a molekula képezte az előállítani kívánt heterodimer vegyület egyik építőegységét is. A heterodimer vegyület (**31**) másik építőegységét a pegilált DBCO egységet tartalmazó cRGDfK peptid (**30**) biztosította, melyet előállítás után a kelátor konjugált (2-naftil)metilezett laktózamin származékhoz (**28**) konjugáltunk a korábban már sikeresen alkalmazott SPAAC klikk reakció segítségével. A biológiai vizsgálatokhoz ebben az esetben is megvalósítottuk egy referencia vegyület előállítását, melynek során a cRGDfK peptidet tiokarbamid kötéssel keresztül közvetlenül konjugáltuk a p-SCN-Bn-DOTAGA komplexképzőhöz. Ezután megvalósítottuk az előállított DOTAGA-LacN(NAP) (**28**), DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK (**31**), és DOTAGA-cRGDfK (**32**) prekursorok radiokémiai jelzését <sup>68</sup>Ga radioizotóppal. Ezt követően meghatároztuk az előállított radiofarmakonok oktanol/víz megoszlási hányadosát, mely alapján mindhárom radiojelzett vegyület hidrofílnak volt. A radiofarmakonok képalkotó és farmakokinetikai tulajdonságait *in vivo* PET, valamint *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokkal tanulmányoztuk B16F10 egér melanoma modellen. A miniPET felvételek alapján mindhárom radiojelzett vegyület alkalmas volt a B16F10 melanóma kimutatására. Az RGD peptidet tartalmazó radioligandok esetében azonban

nagymértékű felhalmozódást tapasztaltunk a májban, ami nehezítette a PET felvételek kiértékelését. A B16F10 tumorok kvantitatív SUV értékeinek elemzése során azt az eredményt kaptuk, hogy a referencia vegyületként alkalmazott [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cRGDfK radiofarmakon szignifikánsan alacsonyabb SUV<sub>mean</sub> értékkel jellemezhető, mint a másik két újonnan előállított radiogyógyszer SUV<sub>mean</sub> értékei. A [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) és a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK radiofarmakonok SUV<sub>mean</sub> értékei között azonban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget. A tumor háttérarányok kiértékelése során a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) 2-3-szor nagyobb tumor/izom aránnyal és körülbelül 21-szer nagyobb tumor/máj aránnyal volt jellemezhető, mint a másik két radiofarmakon. Ez azt jelenti, hogy a csak 2-naftilmetilezett laktózaminnal targetált radiofarmakon kiváló specifitással képes detektálni a B16F10 melanoma sejteket PET képalkotással. A kapott *in vivo* PET eredmények jól korreláltak az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokkal és megerősítették a galektin-3 kimutatására alkalmas [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) kiemelkedő képalkotó tulajdonságait.

A kutatómunkám során sikeresen dolgoztunk ki szintézis-stratégiát laktózamin tartalmú, RGD és NGR alapú radiofarmakonok előállítására. A laktózamin egység bevezetése javította az NGR peptid alapú radiogyógyszerek farmakokinetikai tulajdonságait, mert csökkentette azok májfelvételét. Végezetül az általunk kifejlesztett, új <sup>68</sup>Ga-jelzett, 3'-O-(2-naftil)metil-laktózamin alapú radiogyógyszer, a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) alkalmasnak bizonyult a Gal-3 pozitív melanoma tumorok kimutatására nagy szelektivitással.

## 7. SUMMARY

Aminopeptidase N and  $\alpha_v\beta_3$  integrins play an important role in the process of tumor angiogenesis and metastasis. RGD (arginine-glycine-aspartic acid) containing peptides can selectively bind to  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptors, while the NGR (asparagine-glycine-arginine) peptide analogues have high affinity to aminopeptidase N. For this reason, the radiolabelling of this peptide derivatives with positron emitting radionuclides enables the detection of tumor angiogenesis with PET imaging. The galectin-3 protein is a  $\beta$ -galactoside binding lectin, which regulates tumor progression through different signalling pathways. The extracellular galectin-3 is involved in the progression of tumor angiogenesis and metastasis, also promotes the adhesion, migration, and invasion of neoplastic cells. The intracellular galectin-3 regulates the apoptosis. Therefore, galectin-3 may be a good prognostic and diagnostic marker for galectin-3 positive tumor types, such as melanoma, or colorectal cancer. Lactosamine is one of the natural ligands of galectin-3. The proper chemical modification in the C-3' position of galactose unit increases the lactosamine affinity to galectin-3 receptor.

The aim of the research was to improve the pharmacokinetic properties of peptide-based radiopharmaceuticals by pegylation and glycosylation, as well as to prepare lactosamine-based radioligands capable of binding to the galectin-3 protein. Accordingly, the synthesis of NGR, RGD and lactosamine derivative-containing precursors was performed. To enhance the accumulation of radiopharmaceuticals in the tumor cells, heterodimeric radioligands were developed.

First, the azido-propyl aglycon-containing lactosamine derivative (**6**) was synthesized, then was conjugated to the NODAGA-NHS (**7**) bifunctional chelator. In the next step the E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (**9**) was functionalized with DBCO unit (**10**). The synthesis of the glycopeptide (**12**) was achieved by the following process: the chelator conjugated lactosamine (**8**) was coupled by copper free, strain promoted click reaction (SPAAC) to the functionalized peptide (**11**). Subsequently, the NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> precursor was radiolabelled with <sup>68</sup>Ga isotope. The ideal conditions of the radiolabelling were investigated. The highest radiochemical yield was measured at 32  $\mu$ M ligand

concentration and at 95 °C. The reaction time was 15 minutes. Octanol/water partition coefficient was also determined. According to the low  $\log P$  value the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> radioligand was hydrophilic. Furthermore, the stability of the radiolabelled glycopeptide was investigated in human serum, 0.01 M oxalic acid and 0.01 M Na<sub>2</sub>EDTA. The radiopharmaceutical was intact under the investigated conditions for two hours. According to the preliminary *in vivo* miniPET results, the radioligand was showed low tumor accumulation. It could be explained by the fact that the rigid DBCO unit was very close to the RGD peptide, which probably drastically reduced the affinity of the radiolabelled glycopeptide to the  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor. In the further experiments we used a PEG<sub>4</sub>-DBCO unit to avoid this problem.

In the next part of the research, NGR-based radioligands were synthesized for the detection of aminopeptidase N positive tumors. First, the previously produced lactosamine derivative (**6**) was reacted with p-SCN-DOTAGA (**13**). The obtained compound (**14**) was conjugated with SPAAC reaction to the DBCO-cKNGRE (**17**) and DBCO-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (**18**) peptides, respectively. Subsequently, the DOTAGA-LacN (**14**), DOTAGA-LacN-cKNGRE (**19**) and DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE (**20**) was radiolabelled with  $^{68}\text{Ga}$  radionuclide. The octanol/water partition coefficient was determined. According to the low  $\log P$  value the radioligands were hydrophilic. Stability studies of the radiolabelled compounds was performed in the same way as for [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> glycopeptide. All the three radiopharmaceuticals were stable under the examined conditions for two hours. The biological efficacy of the radioligands was tested on B16F10 melanoma-bearing mice. According to the *in vivo* miniPET results, the B16F10 tumors were clearly identified with [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE, and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cKNGRE. While [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN showed only moderate tumor accumulation. However, we found differences the accumulation of the radioligands in the liver and kidney. Glycosylation and pegylation were not affected significantly to the tumor uptake of radiopharmaceuticals, but it improved the pharmacokinetics of the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE radiotracers. Compared to the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cKNGRE compound, the liver uptake

of the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE radioligands was decreased. In addition, the higher tumor to muscle (T/M) ratio resulted in PET imaging with better contrast using the two radiolabelled glycopeptides.

The last part of this research we increased the affinity of lactose amin for the galectin-3 receptor. Therefore, an aromatic group, namely 2(naphtyl)methyl was introduced into the C-3' position of the galactose unit. Firstly, the 2(naphtyl)methyl substituent containing lactosamine derivative (**27**) was synthesized. Then, this compound was conjugated the previously used DOTAGA chelator. The DOTAGA-LacN(NAP) (**28**) was radiolabelled and its biological properties were investigated. On the other hand, it was coupled with SPAAC reaction to the DBCO-PEG<sub>4</sub>-cRGDfK (**30**) peptide. For the biological studies a reference compound was prepared: cRGDfK peptide was conjugated to the DOTAGA chelating agent via thiourea bond. The obtained DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK (**31**), and DOTAGA-cRGDfK (**32**) were also radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$  radioisotope. In addition, the octanol/water partition coefficients of the labeled complexes were determined. According to the low  $\log P$  value the radioligands were hydrophilic. The imaging and pharmacokinetic properties of the radiopharmaceuticals were studied by *in vivo* miniPET and *ex vivo* biodistribution studies on a B16F10 mouse melanoma model. Based on the miniPET images, all three radiolabeled compounds were suitable for the detection of B16F10 tumor. However, the liver uptake of the cRGD based radioligands were elevated, that made difficult the evaluation of the PET images.

The quantitative SUV analysis of B16F10 tumors revealed that the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cRGDfK was characterized by significantly lower  $\text{SUV}_{\text{mean}}$  value, than the lactosamine-containing radiopharmaceuticals. However, we not found significant difference between the  $\text{SUV}_{\text{mean}}$  values of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK. According to the evaluation of the tumor/background ratio, the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) radiopharmaceutical was characterized by 2-3-fold higher tumor to muscle (T/M) ratio and approximately 21-fold higher tumor to liver (T/L) ratio compared to the other two radioligands. The obtained results correlated well with the *ex vivo* biodistribution studies, which confirmed the remarkable imaging properties of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) for the vizualisation of galectin-3 protein.

In this research, we have successfully developed a synthesis strategy to produce lactosamine containing RGD and NGR based radiopharmaceuticals. The introduction of the lactosamine unit improved the pharmacokinetic features of the NGR-based radiopharmaceuticals by reducing the liver uptake. Furthermore, our novel  $^{68}\text{Ga}$ -labeled 3'-(2-naphtyl)methyl lactosamine-based radiopharmaceutical, namely the [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) had been found suitable for the detection of galectin-3 positive melanoma with high selectivity.

## 8 IRODALOMJEGYZÉK

- [1] P. Carmeliet; Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, **2005**, 438, 932-936.
- [2] N. Nishida; H. Yano; T. Nishida; T. Kamura; M. Kojiro; Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk Management*, **2006**:2 (3), 213-219.
- [3] H. R. Rezvani; N. Ali; L. J. Nissen; G. Harfouche; H. de Verneuil; A. Taïeb; F. Mazurier; HIF-1 $\alpha$  in Epidermis: Oxygen Sensing, Cutaneous Angiogenesis, Cancer, and Non-Cancer Disorders. *Journal of Investigate Dermatology*, **2011**, 131, 1793-1805.
- [4] M. Simons; Angiogenesis Where do we stand now? *Circulation*, **2005**, 111, 1556-1566.
- [5] Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **2000**, 6, 389–395.
- [6] F. Nussenbaum; I. M. Herman; Tumor angiogenesis: Insights and Innovations. *Journal of Oncology*, **2010**, 2010, 132641, 24 p.
- [7] D. Ribatti; B. Nico; E. Crivellato; A. M. Roccaro; A. Vacca; The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*, **2007**, 21, 44-52.
- [8] M. V. Backer; J. M. Backer; Imaging Key Biomarkers of Tumor Angiogenesis. *Theranostics*, **2012**, 2, 502-515.
- [9] C. L. Schreiber; B. D. Smith; Molecular Imaging of Aminopeptidase N in Cancer an Angiogenesis. *Contrast Media & Molecular Imaging*, **2018**
- [10] Y. Takenaka; T. Fukumori; A. Raz; Galectin-3 and metastasis. *Glycoconjugate Journal*, **2004**, 19, 543-549.
- [11] G. C. Jayson; R. Kerbel; L. M. Ellis; A. L. Harris; Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *The Lancet*, **2016**, 388, 518-529.
- [12] W. Cai; X. Chen; Anti-Angiogenic Cancer Therapy Based on Integrin  $\alpha_v\beta_3$  Antagonism. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2006**, 6, 407-428.
- [13] A. R. Ramjaun; K. Hodivala-Dilke; The role of cell adhesion pathway in angiogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2009**, 41, 521-530.
- [14] F. Danhier, A. Le Breton. V. Pr at; RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta (3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol. Pharmaceutics*, **2012**, 9, 2961-2973.
- [15] Z. Liu; F. Wang; X. Chen; Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Cancer Therapy. *Drug Dev. Res.*, **2008**, 69(6), 329-339.
- [16] K. M. Hodivala-Dilke; A. Reynolds; L. Reynolds; Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in balancing act. *Cell Tissue Res.*, **2003**, 314, 131-44.
- [17] S. Takayama; S. Ishii; T. Ikeda; S. Masamura; M. Doi; M. Kitajima; The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin alpha(v)beta(3) expression. *Anticancer Res.*, **2005**, 25, 79-83.
- [18] L. Vellon; J. A. Menendez; H. Liu; R. Lupu; Up-regulation of  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression is a novel molecular response to chemotherapy-induced cell damage in a heregulin-dependent manner. *Differentiation*, **2007**, 75, 819-830.
- [19] H. M. Sheldrake; L. H. Patterson; Function and antagonism of  $\beta_3$  integrins in the development of cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **2009**, 9, 519-540.

- [20] S. M. Albelda; S. A Mette; D. E. Elder et al. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the  $\beta_3$  subunit with tumor progression. *Cancer Res.*, **1990**, *5*, 6757-6764.
- [21] Y. Luan; W. Xu; The Structure and Main Functions of Aminopeptidase N. *Current Medicinal Chemistry*, **2007**, *14*, 639-647.
- [22] P. Mina-Osorio; The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine*, 2008, *14*, 361-371.
- [23] I. Saiki; H. Fujii; J. Yoneda et al. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion an extracellular matrix degradation. *Int. J. Cancer*, **1993**, *54*, 137-143.
- [24] G. Máté; I. Kertész; K. N. Enyedi; et. al. In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-c(NGR). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2015**, *69*, 61-71.
- [25] R. Pasqualini; E. Koivunen; R. Kain; J. Lahdenranta; M. Sakamoto; A. Stryhn; R. A. Ashmun; L. H. Shapiro; W. Arap; E. Ruoslahti; Aminopeptidase N Is a Receptor for Tumor-homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis. *Cancer Research*, **2000**, *60*, 722-727.
- [26] A. Corti; F. Curnis; Tumor Vasculature Targeting Through NGR Peptide-Based Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2011**, *12*, 1128-1134.
- [27] L. Zhu; Z. Ding; X. Li; H. Wei; Y. Chen; Research Progress of Radiolabeled Asn-Gly-Arg (NGR) Peptides for Imaging and Therapy. *Molecular Imaging*, **2020**, *19*, 1-11.
- [28] J. Hirabayashi; K. I. Kasai; The family of metazoan metal-independent  $\beta$ -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, **1993**, *3*, 297-304.
- [29] I. Camby; M. Le Mercier; F. Lefranc; R. Kiss; Galectin-1: A Small Protein With Major Functions. *Glycobiology*, **2006**, *16*, 137r-157r.
- [30] D. I. Liao; G. Kapadia; H. Ahmed; G. R. Vasta; O. Herzberg; Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate  $\beta$ -galactoside-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 1428-1432.
- [31] A. Paz; R. Haklai; G. Elad-Sfadia; E. Ballan; Y. Kloog; Galectin-1 Binds Oncogenic H-Ras to Mediate Ras Membrane Anchorage and Cell Transformation. *Oncogene*, **2001**, *20*, 7486-93.
- [32] X. You; Q. Liu; J. Wu; Y. Wang; J. Dai; D. Chen; et al. Galectin-1 Promotes Vasculogenic Mimicry in Gastric Cancer by Upregulating Emt Signaling. *J. Cancer*, **2019**, *10*, 6286-97.
- [33] V. L. J. L. Thijssen; R. Postel et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *PNAS*, **2006**, *103*, 15975-15980.
- [34] L. Johannes, R. Jacob; H. Leffler; Galectins at a Glance. *J. Cell Sci.*, **2018**, *131*, jcs208884.
- [35] Y. St-Pierre; Towards a Better Understanding of the Relationships Between Galectin-7, P53 and Mmp-9 During Cancer Progression. *Biomolecules*, **2021**, *11*, 879.
- [36] K. Polyak; Y. Xia; J. L. Zweier; K. W. Kinzler; B. Vogelstein; A Model for P53-Induced Apoptosis. *Nature*, **1997**, *389*, 300-305.

- [37] I. Kuwabara; Y. Kuwabara; R. Y. Yang; M. Schuler; D. R. Green; B. L. Zuraw; et al. Galectin-7 (Pig1) Exhibits Pro-Apoptotic Function Through Jnk Activation and Mitochondrial Cytochrome C Release. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 3487–97.
- [38] T. Advedissian; F. Deshayes; M. Viguier; Galectin-7 in Epithelial Homeostasis and Carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18, 2760.
- [39] N. V. Sewgobind; S. Albers; R. J. Pieters; Functions and Inhibition of Galectin-7, an Emerging Target in Cellular Pathophysiology. *Biomolecules*, **2021**, 11, 1720.
- [40] S. Ueda; I. Kuwabara; F. T. Liu; Suppression of tumor growth by galectin-7 gene transfer. *Cancer Research*, **2004**, 20, 247-255.
- [41] S. Moisan; M. Demers; J. Mercier; T. Magnaldo; E. F. Potoworowski; Y. St-Pierre; Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia*, **2003**, 17, 751-759.
- [42] M. Kaur; T. Kaur; S. S. Kamboj; J. Singh; Roles of Galectin-7 in Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2016**, 17, 455-461.
- [43] P. Moar; R. Tandon; Galectin-9 as a Biomarker of Disease Severity. *Cell Immunol.*, **2021**, 361, 104287.
- [44] Y. Li; J. Feng; S. Geng; S. Geng; H. Wei; G. Chen; et al. The N- and C-Terminal Carbohydrate Recognition Domains of Galectin-9 Contribute Differently to Its Multiple Functions in Innate Immunity and Adaptive Immunity. *Mol. Immunol.*, **2011**, 48, 670–7.
- [45] K. Schaefer; N. E. Webb; M. Pang; J. E. Hernandez-Davies; K. P. Lee; P. Gonzalez P; et al. Galectin-9 Binds to O-Glycans on Protein Disulfide Isomerase. *Glycobiology*, **2017**, 27, 878–87.
- [46] A. Hafiz; D. M. M. AlSadek; Galectin-3 as a Potential Target to Prevent Cancer Metastasis. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, **2015**, 9, 113-121.
- [47] L. Song; Jian-wu Tang; L. Owusu; Ming-Zhong Sun; J. Wu; J. Zhang; Galectin-3 in cancer. *Clinica Chimica Acta*, **2014**, 431, 185-191.
- [48] J. Ochieng; B. Green; S. Evans; O. James; P. Warfield; Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1379, 97-106.
- [49] J. Seetharaman; A. Kanigsberg; R. Slaaby; H. Leffler; S. H. Barondes; J. M. Rini; X-ray crystal structure of human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 13047-13052.
- [50] R.-Y. Yang; D. K. Hsu; F.-T. Liu; Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1996**, 93, 6737-6742.
- [51] J. Dumic; S. Dabelic; M. Flögel; Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1760, 616-635.
- [52] Y. Zeng; K. G. Danielson; T. J. Albert; I. M. Shapiro; M. V. Risbud; HIF-1 $\alpha$  Is a Regulator of Galectin-3 Expression in the Intervertebral Disc. *Journal of Bone and Mineral Research*, **2007**, 22, 1851-1861.
- [53] H. M. Lin; R. G. Pestell; A. Raz; H. R. Kim; Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene*, **2002**, 21, 8001-8010.
- [54] A. I. Markowska; F. T. Liu; N. Panjawani; Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J. Exp. Med.*, **2010**, 207, 1981-1993.

- [55] A. I. Markowska; K. C. Jefferies; N. Panjwani; Galectin-3 Protein Modulates Cell Surface Expression and Activation of Vascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **2011**, 286 (34), 29913-29921
- [56] N. D'Haene; S. Sauvage; C. Maris; I. Adanja; M. Le Mercier; C. Decaestecker; L. Baum; I. Salmon; VEGFR1 and VEGFR2 Involvement in Extracellular Galectin-1-and Galectin-3-Induced Angiogenesis. *PLoS one*, **2013**, 8, e67029.
- [57] E. Yang; J. S. Shim; H. J. Woo; K. W. Kim; H. J. Kwon; Aminopeptidase N/CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro-angiogenic protein galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2007**, 363, 336-341.
- [58] I. Kuwabara; F. T. Liu; Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J. Immunol.* **1996**, 156, 3939-3944.
- [59] H. Inohara; S. Akahani; K. Kohts; A. Raz; Interaction between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer Research*, **1996**, 56, 4530-4534.
- [60] L. G. Yu; Circulating galectin-3 in the bloodstream: An emerging promoter of cancer metastasis. *World J. Gastrointest. Oncol.*, **2010**, 2 (4), 177-180.
- [61] E. M. Rapoport; O. V. Kurmyshkina; N. V. Bovin; Mammalian Galectins: Structure, Carbohydrate Specificity, and Functions. *Biochemistry (Moscow)*, **2008**, 73, 393-405 V. L.
- [62] H. Van Hattum; H. M. Branderhorst; E. E. Moret; U. J. Nilsson; H. Leffler; R. J. Pieters; Tuning the preference of thiogalactoside-and lactoseamin-based ligands to galectin-3 over galectin-1. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1350-1354.
- [63] P. Sörme; Y. Qian; P.-G. Nyholm; H. Leffler; U. J. Nilsson; Low Micromolar Inhibitors of Galectin-3 Based on 3'-Derivatization of N-acetyllactosamine. *ChemBioChem*, **2002**, 3, 183-189.
- [64] P. Sörme; B. K-Knutsson; U. Wellmar; B-G. Magnusson; H. Leffler; U. J. Nilsson; Design and Synthesis of Galectin Inhibitors. *Methodes in Enzymology*, **363**, 157-169.
- [65] P. Sörme; P. Arnoux; B. Kahl-Knutsson; H. Leffler; J. M. Rini; U. J. Nilsson. Structural and Thermodynamic Studies on Cation- $\pi$  Interactions in Lectin-Ligand Complexes: High-Affinity Galectin-3 Inhibitors through Fine-Tuning of an Arginine-Arene Interaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 1737-1743.
- [66] L. Mao; Y. Wang; Y. Liu; X. Hu; Multiple Intermolecular Interaction Modes of Positively Charged Residues with Adenine in ATP-Binding Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 14216-14217.
- [67] S. Rensing; M. Arendt; A. Springer; T. Grawe; T. Schrader; Optimization of a synthetic arginine receptor. Systematic tuning of noncovalent interactions. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 5814-5821
- [68] H. Blanchard; X. Yu; P. M. Collins; K. Bum-Erdene; Galectin-3 inhibitors: a patent review (2008-present). *Expert Opin. Ther. Patents*, **2014**, 24.
- [69] Campo; M. F. Marchiori; L. C. Rodrigues; M. D. Baruffi; Synthetic glycoconjugates inhibitors of tumor-related galectin-3: an update. *Glycoconj. J.*, **2016**, 33, 853-876.
- [70] V. Denavit; D. Laine; T. Tremblay; J. St-Gelais; D. Giguere; Synthetic Inhibitors of Galectins: Structures and Syntheses. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **2018**, 30, SE21-SE40.

- [71] I. Iurisci; N. Tinari; C. Natoli; D. Angelucci; E. Cianchetti; S. Iacobelli; Conteration of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, **2000**, 6, 1389-1393.
- [72] X. C. Xu; A. K. El-Naggar; R. Lotan; Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am. J. Pathol.*, **1995**, 147, 815-22.
- [73] J. Zou; V. V. Glinsky; L. A. Landon; L. Matthews; S. L. Deutscher; Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion. *Carcinogenesis*, **2005**, 26, 309-318.
- [74] C. Yi-Chen; H-Ya. Lin; Z. Tu; Y-H. Kuo; S-Te. D. Hsu; C-H. Lin; Dissecting the Structural-Activity Relationship of Galectin-Ligand Interactions. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19, 392.
- [75] A. Klyosov; E. Zomer; D. Platt; DAVANT<sup>®</sup> (GM-CT-01) and Colon Cancer: Preclinical and Clinical (Phase I and II) Studies. *Glycobiology and Drug Design*, **2012**, 1102, 89-130.
- [76] A. C. MacKinnon; M. A. Gibbons; S. L. Farnworth; H. Leffler; U. J. Nilsson; T. Delaine; A. J. Simpson; S. J. Forbes; N. Hirani; J. Gaudie; T. Sethi; Regulation of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-driven Lung Fibrosis by Galectin-3. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **2012**, 185, 537-546.
- [77] H. S. Krishnan; L. Ma; N. Vasdev; S. H. Liang; <sup>18</sup>F-Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chem. Eur. J.*, **2017**, 23, 15553-15577.
- [78] M. Guillaume; A. Luxen; B. Nebeling; M. Augentini; J. C. Clark; V. W. Pike; Recommendations for Fluorine-18 Production. *Appl. Radiat. Isot.*, **1991**, 42, 749-762.
- [79] O. Jacobson; D. O. Kiesewetter; X. Chen; Fluorine-18 Radiochemistry, Labeling Strategies and Synthetic Routes. *Bioconjugate Chemistry*, **2015**, 26, 1-18.
- [80] D. W. Kim; H. J. Jeong; S. T. Lim; M. H. Sohn; J. A. Katzenellenbogen; D. Y. Chi; Facile nucleophilic fluorination reactions using *tert*-alcohols as a reaction medium: significantly enhanced reactivity of alkali metal fluorides and improved selectivity. *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 957-962.
- [81] T. Furuya; C. A. Kuttruff; T Ritter; Carbon-fluorine bond formation. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, **2008**, 11, 803-819.
- [82] H. H. Coenen; J. Ermert; <sup>18</sup>F-labelling innovations and their potential for clinical application. *Clinical and Translational Imaging*, **2018**, 6, 169-193.
- [83] S. Liu; Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2008**, 60, 1347-1370.
- [84] M. W. Brechbiel; Bifunctional Chelates for Metal Nuclides. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2008**, 52, 166-173.
- [85] I. Velikyán; <sup>68</sup>Ga-Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. *Molecules*, **2015**, 20, 12913-12943.
- [86] P. Mikecz; A. Fekete; Gy. Tóth, J. Környei; T. Bali; T. Cservényák; K. Borbély; 2020 onkológiai PET-radiológyszerei a klinikumban és a kutatásban. *Magy. Onkol.*, **2020**, 64, 104-111.

- [87] L. Emmett; K. Willowson; J. Violet; J. Shin; A. Blanksby; J. Lee; Lutetium <sup>177</sup>PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspect of therapy. *Journal of Medical Radiation Sciences*, **2017**, *64*, 52-60.
- [88] A. Morgenstern; F. Bruchertseifer; C. Apostolidis; Bismuth-213 and Actinium-225 – Generator Performance and Evolving Therapeutic Applications of Two Generator-Derived Alpha-Emitting Radioisotopes. *Current Radiopharmaceuticals*, **2012**, *5*, 221-227.
- [89] H. R. Maecke; M. Hofmann; U. Haberkorn; <sup>68</sup>Ga-Labeled Peptides in Tumor Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*, **2005**, *46*, 172S-178S.
- [90] F. Roesch; P. J. Riss; The renaissance of the Ge/Ga radionuclide generator initiates new developments in Ga radiopharmaceutical chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2010**, *10*, 1633-1668.
- [91] W. A. P. Breeman; E. de Blois; H. S. Chan; M. Konijnenberg; D. J. Kwekkeboom; E. P. Krenning; <sup>68</sup>Ga-labeled DOTA-Peptides and <sup>68</sup>Ga-labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current Status of Research, Clinical Applications, and Future Perspectives. *Semin. Nucl. Med.*, **2011**, *41*, 314-321.
- [92] G. J. Meyer; H. R. Mäcke; J. Schumacher; W. H. Knapp; M. Hofmann; <sup>68</sup>Ga-labelled DOTA-derivatised peptid ligands. *Eur. J. Nucl. Med.*, **2004**, *31*, 1097-1104.
- [93] M. Asti; G. De Pietri; A. Franternali; E. Grassi; R. Sghedoni; F. Fiorini; F. Roesch; A. Versari; D. Slavo; Validation of <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator processing by chemical purification for routine clinical application of <sup>68</sup>Ga-DOTATOC. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, *35*, 721-724.
- [94] W. A. P. Breeman; M. de Jong; E. de Blois; B. F. Bernard; M. Konijnenberg; E. P. Krenning; Radiolabelling DOTA-peptides with <sup>68</sup>Ga. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2005**, *32*, 478-485.
- [95] M. Lin; G. J. Walegorski; C. G. Lepera; Production of curie quantities of <sup>68</sup>Ga with a medical cyclotron via the <sup>68</sup>Zn (p,n) <sup>68</sup>Ga reaction. *Applied Radiation and Isotopes*, **2018**, *133*, 1-3.
- [96] N. A. Gharibkandi; J. M. Conlon; S. J. Hosseinimehr; Strategies for improving stability and pharmacokinetic characteristics of radiolabeled peptides for imaging and therapy. *Peptides*, **2020**, *133*, 170385.
- [97] M. Fani; H. R. Maecke; S. M. Okarvi; Radiolabeled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics*, **2012**, *2*, 481-501.
- [98] S. M. Okarvi; Peptide Based Radiopharmaceuticals: Future Tools for Diagnostic Imaging of Cancers and Other Diseases. *Medicinal Research Reviews*, **2004**, *24*, 357-397.
- [99] B. J. Evans; A. T. King; A. Katsifis; L. Matesic; J. F. Jamie; Methods to Enhance the Metabolic Stability of Peptide-Based PET Radiopharmaceuticals. *Molecules*, **2020**, *25*, 2314.
- [100] J. M. Harris; R. B. Chess. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2003**, *2*, 214-221.
- [101] F. M. Veronese. Peptid and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials*, **2001**, *22*, 405-417

- [102] X. Chen, R. Park, Y. Hou, V. Khankaldyyan, I. Gonzales-Gomez, M. Tohme, J. R. Bading, W.E. Laug, P.S. Conti; MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with  $^{18}\text{F}$ -labeled PEGylated RGD peptide, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2004**, 31, 1081–1089.
- [103] R. Haubner; H-J. Wester; F. Burkhart; R. Senekowitch-Schmidtke; W. Webster; S. L. Goodman; H. Kessler; M. Schwaiger; Glycosylated RGD-Containing Peptides: Tracer for Tumor Targeting and Angiogenesis Imaging with Improved Biokinetics. *The Journal of Nuclear Medicine*, **2001**, 42, 326-336.
- [104] R. Haubner; H-J. Wester; W. A. Weber; C. Mang; S. I. Ziegler; S. L. Goodman; R. Senekowitch-Schmidtke; H. Kessler; M. Schwaiger; Noninvasive Imaging of  $\alpha_v\beta_3$  Integrin Expression Using  $^{18}\text{F}$ -labeled RGD-containing Glycopeptide and Positron Emission Tomography. *Cancer Research*, **2001**, 61, 1781-1785.
- [105] H. Cai; P. S. Conti; RGD-based PET tracers for imaging receptor integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression. *J. Label Comp. Radiopharm.*, **2013**, 56, 264-279.
- [106] J. L. Sutcliffe-Goulden; M. J. O'Doherty; P. K. Marsden; I. R. Hart; J. F Marshall; S. S. Bansal; Rapid solid phase synthesis and biodistribution of  $^{18}\text{F}$ -labelled linear peptides. *Eur. J. Nucl. Med.*, **2002**, 29, 754-759.
- [107] F. C. Gaertner; H. Kessler; H.-J. Wester; M. Schwaiger; A. J. Beer; Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2012**, 39, 126-138.
- [108] L. M. Kenny; R. C. Coombes; I. Oulie; K. B. Contractor; M. Miller; T. J. Spinkes et. al. Phase I trial of the positron-emitting Arg-Gly-Asp (RGD) peptide radioligand  $^{18}\text{F}$ -AH111585 in breast cancer patients. *J. Nucl. Med.* **2008**, 49, 879-886.
- [109] J. M. Jeong; M. K. Hong; Y. S. Chang; Y. S. Lee; Y. J. Kim; G. J. Cheon et. al. Preparation of a promising angiogenesis PET imaging agent:  $^{68}\text{Ga}$ -labeled c(RGDyK)-isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7,-triacetic acid and feasibility studies in mice. *J. Nucl. Med.*, **2008**, 49, 830-6.
- [110] S. Fanti; M. Farsad; L. Mansi; PET-CT beyond FDG: a quick guide to image interpretation 1.st. ed. Berlin, *Springer*, **2010**
- [111] C. Decristoforo; I. H. Gonzalez; J. Carlsen; M. Rupprich; M. Huisman; I. Virgolini; H. J. Wester; R. Haubner;  $^{68}\text{Ga}$ -and  $^{111}\text{In}$ -labelled DOTA-RGD peptides for imaging of  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2008**, 35, 1507.
- [112] Z-B. Li; K. Chen; X. Chen;  $^{68}\text{Ga}$ -labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2008**, 35, 1100-1108.
- [113] Z. Liu; G. Niu; J. Shi; S. Liu; F. Wang; S. Liu; X. Chen;  $^{68}\text{Ga}$ -labeled cyclic RGD dimers with Gly<sub>3</sub> and PEG<sub>4</sub> linkers: promising agents for tumor integrin  $\alpha_v\beta_3$  PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2009**, 36, 947-957.
- [114] J. Notni; K. Pohle; H-J. Wester; Be spoilt for choice with radiolabelled RGD peptides: Preclinical evaluation of  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP(RGD)<sub>3</sub>. *Nuclear Medicine and Biology*, **2013**, 40, 33-41.
- [115] Z. Liu; G. Niu; F. Wang; X. Chen;  $^{68}\text{Ga}$ -labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2009**, 36, 1483-1494.

- [116] J. Zhang; G. Niu; L. Lang; F. Li; X. Fan; X. Yan; S. Yao; W. Yan; L. Huo; L. Chen; Z. Li; Z. Zhu; X. Chen; Clinical Translation of a Dual Integrin  $\alpha_v\beta_3$ - and Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Targeting PET Radiotracer,  $^{68}\text{Ga}$ -BBN-RGD. *J. Nucl. Med.*, **2017**, *58*, 228-234.
- [117] J. Zhang; X. Lu; N. Wan; Z. Hua; Z. Wang; H. Huang; M. Yang; F. Wang;  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NGR as a novel molecular probe for APN-positive tumor imaging using MicroPET. *Nucl. Med. Biol.*, **2014**, *41*, 268-275.
- [118] Y. Shao; W. Liang; F. Kang. et al.  $^{68}\text{Ga}$ -labeled cyclic NGR peptide for microPET imaging of CD13 receptor expression. *Molecules*, **2014**, *19*, 11600-11612.
- [119] Y. Gai; Y. Jiang; Y. Long; L. Sun; Q. Liu; C. Qin; Y. Zhang; D. Zeng; X. Lan; Evaluation of an integrin  $\alpha_v\beta_3$  and aminopeptidase N dual-receptor targeting tracer for breast cancer imaging. *Mol. Pharm.*, **2020**, 349-358.
- [120] S. R. Kumar; S. L. Deutscher;  $^{111}\text{In}$ -Labeled Galectin-3-Targeting Peptide as a SPECT Agent for Imaging Breast Tumors. *J. Nucl. Med.*, **2008**, *49*, 796-803.
- [121] S. L. Deutscher; S. D. Figueroa; S. R. Kumar; Tumor targeting and SPECT imaging properties of an  $^{111}\text{In}$ -labeled galectin-3 binding peptide in prostate carcinoma. *Nuclear Medicine and Biology*, **2009**, *36*, 137-146.
- [122] K. Bratteby; E. Torkelsson; E. T. L'Estroade et al. *In Vivo Veritas*:  $^{18}\text{F}$ -Radiolabeled Glycomimetics Allow Insights into the Pharmacological Fate of Galectin-3 Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*, 747-755.
- [123] C. D'Alessandria; S. Braesch-Andersen; K. Bejo; S. Reder; B. Blechert; M. Schwaiger; A. Bartolazzi; Noninvasive *In Vivo* Imaging and Biologic Characterization of Thyroid Tumors by ImmunoPET of Galectin-3. *Cancer Research*, **2016**, *76*, OF1-OF10
- [124] U. Ellervik; G. Magnusson; A High Yielding Chemical Synthesis of Sialyl Lewis x Tetrasaccharide and Lewis x Trisaccharide; Examples of Regio- and Stereodifferentiated Glycosylations. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 9314-9322.
- [125] F. A. W. Koeman; J. W. G. Meissner; H. R. P. Ritter; J. P. Kamerling; J. F. G. Vliegthart; Synthesis of structural elements of the capsular polysaccharide of *Streptococcus Pneumoniae* Type 14. *J. Carbohydr. Chem.*, **1994**, *13*, 1-26.
- [126] M. A. Green; M. J. Welch; Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. *Nucl. Med. Biol.*, **1989**, *16*, 435-448
- [127] N. J. Agard; J. A. Prescher; C. R. Bertozzi; A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15046-15047.
- [128] B. Gyuricza; J. P. Szabó; V. Arató; D. Szücs; A. Vágner; D. Szikra; A. Fekete. Synthesis of Novel, Dual-Targeting  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> Glycopeptide as a PET Imaging Agent for Cancer Diagnosis. *Pharmaceutics*, **2021**, *13*, 796.
- [129] Berta Katalin pályamunka  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett c(NGR) peptid alapú glikopeptid szintézise, valamint *in vivo* és *ex vivo* vizsgálata. **2021** (Társtémavezetők: Gyuricza Barbara és Nagy Adrienn)
- [130] B. Gyuricza; J. P. Szabó; V. Arató; N Dénes; Á Szücs; K. Berta; A Kis; D. Szücs; V. Forgács; D. Szikra; I. Kertész; Gy. Trencsényi; A. Fekete; Synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled cNGR-Based Glycopeptides and *In Vivo* Evaluation by PET Imaging. *Pharmaceutics*, **2021**, *13*, 2103.

- [131] L. Guzman-Rojas; R. Rangel; A. Salameh; J. K. Edwards; E. Dondossola; Y. G. Kim; A. Saghatelian; R. J. Giordano; M. G. Kolonin; F. I. Staquicini; E. Koivunen; R. L. Sidman; W. Arap; R. Pasqualini; Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. *PNAS*. 2012; 109, 5, 1637-1642.
- [132] Y.G. Wang; S. J. Kim; J. H. Baek; H. W. Lee; S. Y. Jeong; K. H. Chun; Galectin-3 increases the motility of mouse melanoma cells by regulating matrix metalloproteinase-1 expression. *Exp. Mol. Med.*, **2012**, 44, 387-393.
- [133] Szűcs Ágnes szakdolgozat Galektin-3 fehérje detektálására alkalmas <sup>68</sup>Ga jelzett radiofarmakonok szintézise. **2020** (Témavezető: Fekete Anikó)
- [134] I. Bajza; G. Dékány; K. Ágoston; I. F. Perez; J. Boutet; M. Hederos; F. Horváth; P. Kovács-Pénzes; L. Kroeger; C. Roehrig et al. A Method for Preparation of the Tetrasaccharide lacto-N-neotetraose (LNnt) Containing N-acetyllactosamine. Patent WO 2011100980 A1, 25 August 2011.
- [135] R. Smolarczyk; T. Cichoń; K. Graja; J. Hucz; A. Sochanik; S. Szala; Antitumor effect of RGD-4C-GG-D(KLAKLAK)<sub>2</sub> peptide in mouse B16(F10) melanoma model. *Acta Biochimica Polonica*, **2006**, 53, 801-805.
- [136] B. Gyuricza; Á. Szűcs; J. P. Szabó; V. Arató; N Dénes; Z. Képes; D. Szücs; D. Szikra; Gy. Trencsényi; A. Fekete. The Synthesis and preclinical investigation of lactosamine-based radiopharmaceuticals for the detection of galectin-3-expressing melanoma cells. *Pharmaceutics*, **2022**, 14, 2504.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Berényi Ervinnek**, a DE Orvosi Képző Intézet Nukleáris Medicina igazgatójának, és **Dr. Trencsényi Györgynek** a DE ÁOK Orvosi Képző Intézet Nukleáris Medicina Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tették PhD kutatómunkám elvégzését és az értékezésem elkészítését a Nukleáris Medicina Tanszéken.

Szeretném hálámat kifejezni témavezetőmnek **Dr. Fekete Anikónak**, aki a kutatómunkám során mindvégig támogatott, és értékes szakmai tanácsokkal látott el.

Köszönettel tartozom **Dr. Szikra Dezsőnek** a szakmai segítségéért és  $^{68}\text{Ga}$  izotóp előállításáért, **Péliné Szabó Juditnak**, **Dr. Arató Viktória Zsófiának**, **Nagy Tamásnak** és végül de nem utolsó sorban **Dr. Kis Adriennek** a preklinikai vizsgálatok elvégzéséért. Külön köszönet illeti **Dr. Trencsényi Györgyöt** aki a PET felvételek kiértékelésében nyújtott segítséget.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Gáspár Attilának** és a Sanomed Kft. munkatársainak, **Dr. Nagy Gábornak** és **Dr. Vágner Adriennek** a MS mérésekben, **Dr. Herczeg Mihálynak** pedig az NMR spektroszkopiai mérések során nyújtott segítségéért.

Hálával tartozom **Stefánné Dr. Dénes Noéminek**, aki megvalósította a referenciaként alkalmazott DOTAGA-cKNGRE vegyület előállítását és radiokémiai jelzését, valamint szeretném megköszönni **Szűcs Ágnesnek** a (2-naftil)-metilezett laktózamin származék előállítását. Köszönöm **Szűcs Dániel** PhD hallgatónak a kutatómunka során nyújtott segítségét és kellemes munkahelyi légkör megteremtését.

Köszönettel tartozom a Nukleáris Medicina munkatársainak, akik munkájukkal és szakmai támogatásukkal segítettek a kutatómunkámat.

Végül de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, akikre életem során bármikor számíthattam és a PhD képzésem alatt mindvégig támogattak.

Köszönöm a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítványának, hogy a Rövid távú kutatás támogatás keretében finanszírozták a publikációim megjelenését.