

Mn(II)-alapú diagnosztikai szerek: az alapkutatótól a célzott diagnosztikai eljárásokig

Váradi Balázs^{1,2,3*}, Sajtos Gergő Zoltán^{1,2}, Brezovcsik Károly³, Szűcs Zoltán³,
Szedlacsek Stefan⁴, Nagy Gábor⁵, Tircsó Gyula¹

¹Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Kémiai Intézet, Fizikai Kémiai Tanszék,
Debrecen, Magyarország

²Debreceni Egyetem, Doktori Tanácsok és Iskolák, Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács,
Kémiai Tudományok Doktori Iskola, Debrecen, Magyarország

³Atommagkutató Intézet, Debrecen, Magyarország

⁴Román Akadémia, Biokémiai Intézet, Bukarest, Románia

⁵ScanoMed Kft., Debrecen, Magyarország

*Levelező szerző, e-mail: varadi.balazs@science.unideb.hu

Beérkezett: 2023. december 19.; elfogadva: 2024. március 5.

Összefoglalás

A célzott molekuláris képalkotás egy új, ígéretes módszer a nukleáris medicinában a diagnosztika és a terápia területén. A mangánizotópok sokszínűsége elérhető közelségbe hozta a bimodális képalkotásokat, mivel az ⁵²Mn pozitronot emittáló izotóp a funkcionális PET, míg a paramágneses ⁵⁵Mn-izotóp kelátjai az MR kontrasztanyag-kutatások és a PET-diagnosztikumok kapcsolását tették lehetővé. Jelen közleményben kitérünk a Mn(II)-ion komplexálására leginkább alkalmas kelátorok, illetve az ezekből származtatható kétfunkciós és intelligens Mn(II)-komplexek, valamint a lehetséges biológiai vektormolekulák bemutatására. Ezekre az előzményekre alapozva példákat mutatunk be az *in vivo* kísérletek során jól teljesítő vektormolekulák és az általunk kifejlesztett kelátorok ⁵²Mn-izotóppal jelölt konjugátumainak alkalmazására.

Kulcsszavak: célzott molekuláris képalkotás, 52-mangán(II), bifunkcionális kelátorok, PET/MRI

Mn(II)-based diagnostic agents: From the basic research to targeted diagnostics

Balázs Váradi^{1,2,3}, Gergő Zoltán Sajtos^{1,2}, Károly Brezovcsik³, Zoltán Szűcs³,
Stefan Szedlacsek⁴, Gábor Nagy⁵, Gyula Tircsó¹

¹Department of Physical Chemistry, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

²Doctoral School of Chemistry, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

³Institute for Nuclear Research, Debrecen, Hungary

⁴Romanian Academy, Institute of Biochemistry, Bucharest, Romania

⁵ScanoMed Ltd., Debrecen, Hungary

Summary

Early diagnosis of oncological diseases is crucial for cancer treatment and survival. Imaging of cancerous tissues rely on the availability of targeting biovector molecules capable of carrying diagnostic medical radionuclides, contrast agents (CAs) or optical probes to the diseased tissue for imaging. The production of tissue-specific contrast agents or contrast agents targeted with appropriate vector molecules was fueled by their ability to accumulate in certain tissues or organs, which allows us to reduce the required dose or to visualize specific processes at the cellular/tissue level. Recent developments in antibody engineering and PET (positron emission tomography) radiochemistry have led to new ImmunoPET imaging approaches. In contrast to the antibodies, antibody fragments such as minibodies, diabodies, single-chain variable region fragments (scFvs), nanobodies and affibodies are smaller in size, yet retain the

specificity and affinity of antibodies in addition to more desirable pharmacokinetic profiles. For such imaging studies isotopes with long half-lives are required (^{64}Cu or ^{89}Zr were the ones used more frequently), which brought an attention on the positron emitter ^{52}Mn isotope ($t_{1/2}=5.59$ days). On the other hand Mn(II) complexes have been intensively studied recently as monoaquated chelates of Mn(II) are considered safer alternatives to Gd(III)-based contrast agents (GBCA's) in magnetic resonance imaging (MRI). Therefore the use of Mn(II) complexes also offers the possibility of "marrying" these two diagnostic modalities. In MRI new, safer alternatives are needed, since Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF) in renal patients has been linked to the toxic effect of Gd(III) ion released during dissociation of the applied CA (Gd(III) complexes). Ten years later, it was also confirmed that injected Gd(III) can accumulate in patients with healthy kidney function, while Gd(III) chelates excreted from the body increase Gd(III) concentrations in surface water ("gadolinium anomaly"). Related to this research topic, our current paper summarizes the most suitable chelators designed for complexation of Mn(II) ions. Bifunctional ligands developed for Mn(II) complexation and intelligent/responsive Mn(II)-based probes were also reviewed, furthermore, information on the possible biological vector molecules was also summarized. Based on this information we present examples of the application of vector molecules that have performed outstandingly in *in vivo* experiments and their ^{52}Mn isotopically labeled conjugates that we have developed and tested using animal models.

Keywords: targeted molecular imaging, 52-manganese(II), bifunctional chelators, PET/MRI

Előszó

A Horison-2020 európai uniós kutatási program egyik kiemelt területe az onkológia. Magyarország számára ez még nagyobb jelentőségű, hiszen a tumoros megbetegedések okozta elhalálozás statisztikai értékeiben európai sereghajtók vagyunk, és világviszonylatban is nagyon rosszak a mutatóink. A radiológusgyógyászat egy dinamikus fejlődő tudományág, amely a diagnosztikai eredményeken túl a személyre szabott, célzott radionuklid tumorterápia irányában is biztató eredményeket mutat. A radioaktív bomlás csupán akkor képes kizárólag a rákos szövetek elpusztítására, ha egy igen nagy szelektivitású, specifikus molekula képes eljuttatni a radioaktív izotópot a rákos sejtekhez. Ehhez úgynevezett vektormolekulára van szükség, valamint egy olyan közbenső, „bifunkciós” molekulára, amely egyrészt köti a radioaktív izotópot, másrészt stabilan kötődik a célba juttatásért felelős vektormolekulához is. A szerző ilyen közbenső, komplexképző molekulák szintetizálását és alkalmazásukat tesztjeit mutatja be affibody vektormolekula, radioaktív PET (^{52}Mn) izotópok alkalmazásával. A radioaktív izotópok előállítása és a velük végzett radio-kémiai kutatások lehetőségei erősen limitáltak. A szerző számára a debreceni Atomki biztosította ezt a lehetőséget, mint Magyarország egyetlen, kutatásra dedikált ciklotronnal rendelkező kutatóintézete.

Dr. Szűcs Zoltán tudományos főmunkatárs
Atommagkutató Intézet, Debrecen

A mágneses rezonanciás képalkotás (MRI) 1980-as évek közepén történt bevezetése óta az orvosdiagnosztikai eljárások elengedhetetlen eszközévé vált. A vizsgálatok jelentős részét kontrasztanyagok (KA-k) alkalmazásával végzik, amelyekkel szemben a bizalom a 2000-es évek elején megrendült. Ennek az lehet az oka, hogy a vesebeteg esetében tapasztalt nefrogén szisztémás fibrózis (NSF) megbetegedéseket az alkalmazott KA (Gd(III)-komplexek) disszociációja során kiszabaduló Gd(III)-ion

toxikus hatásával kapcsolták össze. Tíz évvel később az is beigazolódott, hogy az injektált Gd(III) felhalmozódhat egészséges vesefunkciójú páciensek esetében, míg a szervezetből kiürülő Gd(III)-kelátok a felszíni vizek Gd(III)-koncentrációját növelik („gadolinium-anomália”). Ezeknek a problémáknak az összessége olyan intenzív kutatásokat indított el, amelyek célja a Gd(III)-ion esszenciális fémion alapú alternatíváinak megkeresése volt. Mivel az első MRI-vizsgálatokat is Mn(II)-sókkal végezték, sőt az Orviglance (Acelia Pharma) klinikai kipróbálás alatt lévő (2. fázis) kontrasztanyagjelölt sem más, mint MnCl_2 , így a figyelem érthető okokból ismét a Mn(II)-ion és vegyületei felé fordult. A Mn(II)-vegyületek mellett szól továbbá az is, hogy izotópjai sokszínűségének köszönhetően a Mn(II)-vegyületek segítségével könnyen „házasíthatóvá” válik két nagyon fontos diagnosztikai eljárás, az MRI és a pozitronemissziós tomográfia (PET). Erre alapozva világszerte több kutatócsoport vágott bele a Mn(II) komplexálására alkalmas kelátorok fejlesztésébe. A kutatások kezdetben többnyire a nyílt láncú ligandumok előállítását célozták; ilyen céllal kutatócsoportunk is tervezett, fejlesztett és szabadalmaztatott merev gerincű kelátorokat. Mivel a Mn(II)-ion az átmeneti fémionok körében is jellemzően kevésbé stabilis, és labilis kelátokat képez – a Gd(III)-komplexekhez mérten a hátránya pedig még kézenfekvőbb –, a probléma megoldását merev gerincű makrociklusos kelátorok fejlesztésében láttuk, és ez lett Váradi Balázs PhD-hallgató KDP-pályázatának fő célkitűzése. Váradi Balázs pályázata célkitűzéseinek megvalósítása során az egyetemi kurzusokon túl több HPLC-s és tömegspektrometriai tanfolyamon is részt vett. Ezáltal képes elemezni a reakcióelegyeket, HPLC-s módszert beállítani a kívánt termékek tisztítására, és azt preparatív elválasztásra „áthangolni”. Prof. dr. Szedlacsek Stefan E. közreműködő partner jóvoltából részt vett a biovektor-molekulák (affitest) előállításában, tisztításában, kelátorokkal, majd $^{52}\text{Mn(II)}$ -izotóppal való jelölésében (ipari partner) és kipróbálásában *in vivo* kísérletekben.

Prof. dr. Tircsó Gyula egyetemi tanár
Debreceni Egyetem

Bevezetés

Az onkológiai megbetegedések korai diagnosztizálása kulcsfontosságú a rákos megbetegedések kezelése és a túlélés/gyógyulás szempontjából. A célzott molekuláris képalkotás ehhez olyan specifikus molekuláris hordozókat használ, amelyek a rákos sejtek felszínén túlzottan kifejezett/expresszált tumormarkereket felismerve láthatóvá teszik ezeket (diagnózis), illetve képesek lehetnek segíteni a terápiát. Egy ilyen összetett molekula több részből áll, amelyek mindegyikének megvan a maga funkciója. A molekuláris hordozók (antitestek, illetve antitestfragmensek – pl. nanotestek, affitestek –, peptidok stb.) felelnek a célba juttatásért („vektormolekulák”), míg a fémion-alapú radioizotópokat többnyire kelátképző ligandumok segítségével teszik alkalmassá a „szállításra”. Ezt a két alapvető egységet megfelelő „kapoccsal” kötik össze, amelynek akár funkciója is lehet (pl. másodlagos kölcsönhatás kialakítása a szállításhoz szükséges „taxi-molekulákkal” stb.). A radioizotópok/fémionok – és így a komplexképző kelátorok – kiválasztása meghatározó a kiválasztott/elérhető diagnosztikai módszer szempontjából: ezek rendelkezhetnek paramágneses tulajdonságokkal, bocsáthatnak ki pozitronokat vagy gamma-fotonokat, amelyek alapvető eszközei az olyan képalkotó eljárásoknak, mint például a mágneses rezonancia képalkotás (MRI), a pozitronemissziós tomográfia (PET) vagy az egyfoton-emissziós komputertomográfia (SPECT), valamint a közelmúltban elérhetővé vált kapcsolt (bimodális) képalkotási eljárásoknak (pl. MRI/PET).

A mangánizotópok széles palettája kiváló lehetőséget teremt a bimodális képalkotásra – annak ellenére, hogy a modalitások lényegesen eltérő érzékenysége egyelőre megakadályozza a valós bimodális alkalmazásokat. A mangán rendelkezik egy hosszú élettartamú PET-izotóppal, amely alkalmazható a PET-alapú funkcionális képalkotásban (^{52}Mn), míg az ^{55}Mn paramágneses jellege miatt a Mn(II)-kelátok az MRI-ben alkalmazott Gd(III)-komplexek biztonságosabb alternatíváinak tekinthetők, mivel a nagy spinszámú komplexek a Mn(II) öt párosítatlan elektronjának köszönhetően erős paramágneses tulajdonsággal rendelkeznek, amelyhez megfelelően gyors oldószercseré és elektronrelaxációs idő is társul. Az ^{52}Mn -izotóp felezési ideje 5,59 nap, ami összemérhető a ^{89}Zr felezési idejével ($t_{1/2} = 78,4$ óra), és lényegesen hosszabb, mint a ^{64}Cu -izotópé ($t_{1/2} = 12,7$ óra). Ezért az ^{52}Mn használata lehetővé teszi a hosszabb időskálán történő képalkotást, így kompatibilis az antitest vektormolekulára alapozó célzott alkalmazásokkal. Ezen túl az ^{52}Mn 29,4 százalékban bocsát ki pozitronokat – ami nagyobb arány, mint a ^{64}Cu (17,6 százalék) vagy a ^{89}Zr (22,7 százalék) izotópok esetében. A kibocsátott részecske energiája 242 keV, ami kisebb, mint a ^{11}C (960 keV) vagy a ^{18}F (635 keV) értéke, és töredéke a ^{68}Ga esetében tapasztalható értéknek (1899 keV), ami nagy térbeli felbontást tesz lehetővé. Rengeteg pozitív tulaj-

donsága mellett hátrányaként a bomlás során keletkező, nagy energiájú gamma-fotonok (744, 936, 1434 keV) említhetők, amelyek további terhelésnek teszik ki a szervezetet az alkalmazása során.

A célzott diagnosztikai (és terápiás) alkalmazásokhoz a vektormolekulák széles palettája vált elérhetővé. Leggyakrabban monoklonális antitesteket (mAb) használtak ilyen célra, mivel ezek alapvetően képesek felismerni egy specifikus epitópot – a célzott molekula egy részét –, és képesek ahhoz kötődni. A monoklonális antitestek molekuláris szondaként való használatának számos hiányossága azonban – például a csekély érzékenység, a lassú kiürülés vagy a nem specifikus felvétel – olyan, új alternatívákat vizsgáló tanulmányokat indított el, mint az antitesttöredékek (pl. nanotestek, affitestek), illetve peptidok stb. vizsgálata. Mára a vektormolekulák széles palettája vált elérhetővé, és jutott el a klinikai vizsgálatok szakaszába.

Ezek alapján jelen dolgozat célja egyrészt az elmúlt nyolc-tíz évben végzett intenzív kutatások és a Mn(II)-ion komplexálására alkalmas ligandumok megkeresésére fókuszáló tanulmányok összegzése. A vizsgálatok alapján a legjobban teljesítő Mn(II)-kelátorok szerkezetét intelligens/okos kontrasztanyagok szerkezetébe is átültették, valamint a megfelelő vektormolekulákhoz való kapcsolás céljával bifunkciós kelátorok (BFC-k) fejlesztése is elindult – ezeknek a vegyületeknek a bemutatása a dolgozat másodlagos célja. Ugyanakkor nem feledkezhetünk meg a vektorként alkalmazható molekulák összehasonlító jellemzéséről sem, mivel ezek az információk elengedhetetlenek egy diagnosztikai (vagy terápiás) applikációra tervezett konjugátum előállításához. Végül röviden bemutatjuk eddigi eredményeink legjavát, ami a Mn(II)-ion komplexálására alkalmas makrociklusos kelátorok előállításától és a Mn(II)-ionnal képződő kelátok fizikokémiai jellemzésétől (stabilitás, inertség, relaxációs hatás, $^{52}\text{Mn(II)}$ -ionnal való jelölhetőség stb.) a biovektor-molekulákkal való kapcsolásukon és a konjugátumok tisztításán át ezek *in vivo* teszteléséig (egérkísérletek) terjedt.

A Mn(II)-ion és komplexei diagnosztikai alkalmazási lehetőségei (izotópok sajátosságai, előállításuk és alkalmazási lehetőségeik)

PET-kamera

A pozitronemissziós tomográfia (PET) egy olyan funkcionális képalkotó módszer, amelynek alkalmazása során a kamera gyűrűdetektora a felhasznált pozitronsugárzó radioizotóp helyzetét mutatja meg, három dimenzióban. A módszer a két 511 keV energiájú gamma-foton értékelésén alapul, amelyek 180 fokban hagyják el a pozitron annihilációjának helyét. Segítségükkel a jel/zaj-arány nagymértékben javítható, és a bomlás helye is pontosabban meghatározható, mint például a planáris gamma-kamerák esetében. (Sőt a PET-eljárás könnyen összekapcsolható pontos anatómiai képet szolgáltató

módszerekkel, például CT-vel vagy MRI-vel.) A módszer azt tekinti jelnek, ahol a gyűrűdetektor egymással szemben lévő két pontja egyszerre érzékeli a fotonokat.

A vizsgálat során alkalmazott készítmény összetétele a vizsgálni kívánt folyamattól függ. A legtöbb esetben a felhasznált radiofarmakonok fő alegysége a biomolekula, amely a vizsgálni kívánt hely vagy folyamat megtalálásáért felelős, valamint a pozitronsugárzó radioizotóp. A különböző funkciókért felelős „alegységek” összekapcsolása történhet kovalens kötéssel, vagy a fémion alapú radioizotópok esetében bifunkciós kelátorok segítségével, de arra is akad példa, amikor a jelet biztosító ^{18}F -atom koordinatív kötéssel kapcsolódik a fémkomplexhez (pl. Al(III) vagy Ga(III)). Ezeket gondosan kell kiválasztani, hogy a célnak legmegfelelőbbek legyenek. A radioizotópok esetében például figyelembe kell venni a nuklid felezési idejét, amelynek kellően hosszúnak kell lennie a vizsgálat elvégzéséhez, de nem lehet túl hosszú, hogy ne jelentsen többletterhelést a betegnek és a személyzetnek, illetve ne okozzon problémát a radioaktív hulladék kezelése. (Például az FDG-re alapozó vizsgálatnál a ^{18}F 110 perces felezési ideje megfelelő, de egy antitest, többnapos kísérlethez ez a felezési idő már nem megfelelő.) Továbbá a pozitron energiája is meghatározó, mivel minél kisebb a pozitron energiája, annál jobb felbontású PET-képet kaphatunk vele. Ezen túl az egyéb izotópos tulajdonságokat sem szabad figyelmen kívül hagyni, például a pozitron mellett keletkező gamma-fotonokat vagy más bomlásokat, amelyek többletdózist jelenthetnek a vizsgált alanyak vagy a kezelőszemélyzetnek. Összességében elmondható, hogy egy jól összeállított radiofarmakon lehetővé teszi, hogy egy kóros folyamatot azelőtt kimutassunk, mielőtt az anatómiai képalkotó eljárásokkal felismerhető lenne (Brandt et al. 2019; Ladabaum-Minoshima 2008).

Az izotóp fizikai tulajdonságainak összehasonlítása konvencionális PET radioizotópokkal

Az 1. táblázat tartalmazza néhány, a nukleáris medicinában széles körben használt és a nukleáris medicinai kutatások számára jelentős pozitronsugárzó radioizotóp tulajdonságait. Ezek közül betegvizsgálatoknál jelenleg a ^{18}F és a ^{11}C a leggyakrabban használt az orvosi gyakorlatban. Az antitestek jelzésére a hosszabb felezési idejű ^{64}Cu és a ^{89}Zr a leggyakrabban alkalmazott radioizotópok. Ezekkel összehasonlítva az ^{52}gMn tulajdonságait – lásd az 1. táblázatban – látható, hogy felezési ideje megfelelően hosszú (5,59 nap) az antitesttel való munkához (^{89}Zr : 3,3 nap; ^{64}Cu : 12,7 óra), átlagos, illetve maximális pozitronenergiája pedig a legalacsonyabb, összehasonlítva az 1. táblázatban szereplő radioizotópokkal. Ezek alapján az ^{52}gMn -izotóppal készült PET-képek jobb felbontásúak lesznek kisállat-, illetve humán vizsgálatoknál. Hátránya a bomlása során keletkező három nagy

1. táblázat | Pozitronsugárzó radioizotópok tulajdonságai

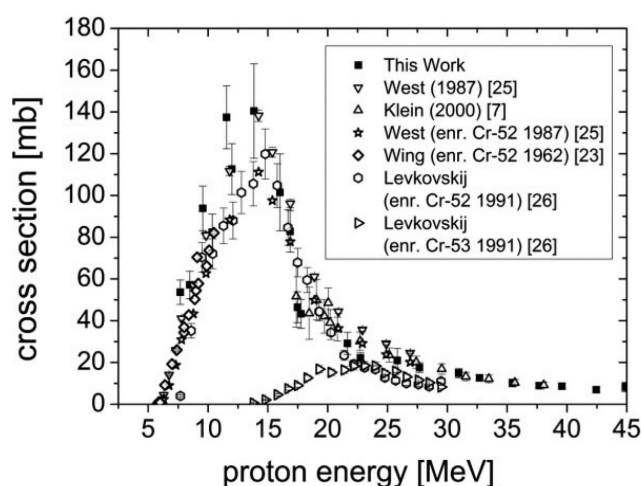
Izotóp	Felezési idő	β^+ (%)	$E_{\beta^+ \text{max}}$ (keV)	$E_{\beta^+ \text{átlagos}}$ (keV)
^{11}C (Conti-Eriksson 2016)	20 perc	99,8	960	386
^{13}N (Conti-Eriksson 2016)	10 perc	99,8	1199	492
^{15}O (Conti-Eriksson 2016)	2 perc	99,9	1732	735
^{18}F (Conti-Eriksson 2016)	110 perc	96,9	634	250
^{64}Cu (Conti-Eriksson 2016)	12,7 óra	17,5	653	278
^{89}Zr (Conti-Eriksson 2016)	3,3 nap	22,7	902	396
^{51}Mn (Brandt et al. 2019; De Nardo et al. 2019)	46,2 perc	97	2185	970
$^{52\text{m}}\text{Mn}$ (Brandt et al. 2019; De Nardo et al. 2019)	21,1 perc	97	2633	1174
$^{52\text{g}}\text{Mn}$ (Brandt et al. 2019; De Nardo et al. 2019)	5,6 nap	29	575	242
^{68}Ga (Michael et al. 2019)	67,7 perc	89	1899	829

Forrás: saját szerkesztés

energiájú gamma-foton (744, 936, 1434 keV), amelyek az alkalmazás során többletdózist okoznak (Brandt et al. 2019).

Az ^{52}gMn -izotóp előállítás

Az ^{52}gMn előállítása történhet természetes izotóp összetételű ^{nat}Cr (összetétele: 83,8% ^{52}Cr , 9,5% ^{53}Cr , 2,4% ^{54}Cr) vagy dúsított ^{52}Cr céltárgyból. Nem dúsított targetanyag használata esetén számolni kell a besugárzás során megjelenő ^{54}Mn szennyezővel, amelynek hosszú a felezési ideje (312,2 nap). Az 1. ábrán látható hatáske-resztszetszét-görbe alapján a besugárzáshoz elegendő akár a 16 MeV energiájú protonnal is (Brandt et al. 2019; Buchholz et al. 2013). A besugárzáshoz használható krómból készült fólia vagy krómporból készült tabletta.



1. ábra | ^{52}gMn hatáske-resztszetszét-görbéje protonnal történő előállítás során, $^{nat}\text{Cr(p,x)}^{52}\text{gMn}$ és $^{53}\text{Cr(p,2n)}^{52}\text{gMn}$ magreakcióra

Forrás: Buchholz et al. 2013

Az ^{52}Mn -izotóp tisztítása

A besugárzást követő feldolgozás első lépése, hogy a targetanyagot fel kell oldani savban. Majd különböző módszerek állnak rendelkezésre, hogy az így készült oldatból az előállított ^{52}Mn radioizotópot elválasszuk a targetanyagtól. A szakirodalom többféle módszert is említ ioncserélő gyanták használatával. Ezeket az ioncserés elválasztásokat kationcserélő gyanta segítségével végzik, amikor is a Mn(II) és a Cr(VI) (Kononova et al. 2019) vagy a Mn(II) és a Cr(III) (Buchholz et al. 2013) elválasztása vizes közegben történik. Anioncserélő gyantán is megvalósítható a Mn(II) és a Cr(III) elválasztása (Fonslet et al. 2017; Lewis et al. 2015; Watanabe et al. 2001; Graves et al. 2015; Topping et al. 2013), eluensként 12M-os sósavat alkalmazva, amelyet gyakran vízmentes alkohollal együtt használnak. Ezenkívül a szakirodalom említ még folyadék-folyadék extrakciós módszert is (Malkhede et al. 1999).

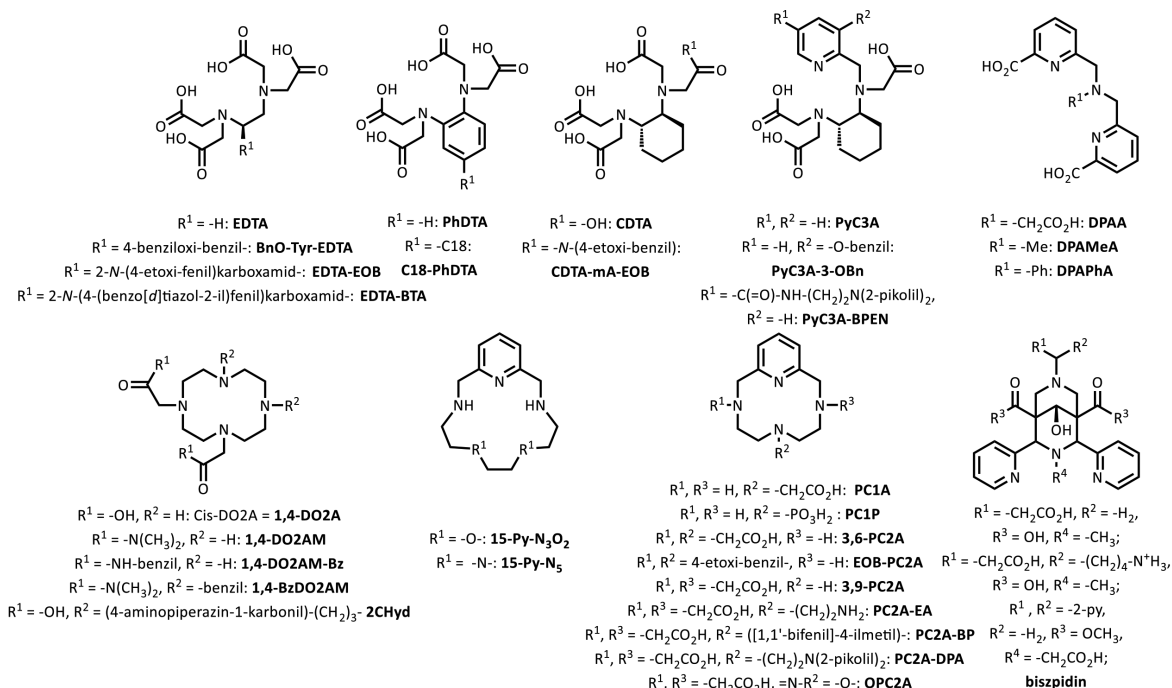
A Mn(II)-ion komplexálására alkalmazott ligandumok szerkezete és a komplexek sajátosságai

A Mn(II)-ion komplexálására javasolt ligandumok köre az elmúlt bő tíz évben végzett intenzív kutatások eredményeként jelentősen bővült. A komplexképző ligandumokat két csoportra szokás osztani, így a lehetséges ligandumok körének áttekintése során is e csoportosítás mentén haladunk majd, és áttekintjük a Mn(II)-ion komplexálására leginkább alkalmas nyílt láncú kelátorokat, valamint a makrociklusos komplexképzőket.

Nyílt láncú ligandumok

Mivel a Mn(II)-ion koordinációs száma a komplexekben leggyakrabban hat vagy hét (Regueiro-Figueroa et al. 2014a), a komplexálására leggyakrabban penta-, illetve hexadentát kelátorokat javasolnak. (Ezzel az MRI szempontjából elengedhetetlen, a fémionhoz koordinálódó vízmolekulával is számolni lehet.) A kelátorok e csoportjába tartoznak az EDTA komplexképző és származékai (2. ábra). A flexibilis etiléndiamin „egységnek” – azaz a ligandum alapvázának/gerincének – a merevítésével később ugyanakkor lényegesen jobb kinetikai paraméterekkel rendelkező komplexeket sikerült előállítani (pl. transz-CDTA, PhDTA stb.) (Kálmán–Tircsó 2012; Pota et al. 2018). A transz-CDTA kelátorra jellemző merev gerinc megjelenik az egyik klinikai kipróbálás első fázisán túljutott Mn(II)-alapú kontrasztanyagjelölt, a PyC3A szerkezetében is (Gale et al. 2018). Ezen túl ennek a ligandumnak a szerkezetét bifunkciós kelátorok, valamint intelligens/okos szerv- vagy szövetspecifikus kontrasztanyagjelöltek szerkezetébe is „átültették” (Chirayil et al. 2021; Chen et al. 2023; Vanasschen et al. 2017).

A nyílt láncú kelátorok egy másik, jelentős számban előállított és vizsgált vegyületcsaládja, a *N*-dipikolinátszármazék komplexképzők is említést érdemelnek. Ezek a ligandumok rendszerint pentagonális bipiramisos koordinációs geometriát alakítanak ki a Mn(II)-ionnal, amely komplexekben a fémionhoz még két vízmolekula is koordinálódik. Amennyiben a két pikolinátcsoport mellett további, koordinálódásra alkalmas donorcsoportok (acetát, alfa-metil-acetát, acetamid, pikolil- stb.) kapcsolódnak a két pikolinátcsoportot tartalmazó nitrogénatomhoz, úgy a kelátok elveszítenek egy koordinálódó



2. ábra

A tanulmányban említett ligandumok szerkezete

Forrás: saját szerkesztés

vízmolekulát, ami kisebb relaxációs hatást, de stabilabb Mn(II)-komplexekeket eredményezett (Forgács et al. 2015; Regueiro-Figueroa et al. 2014b; Mallik et al. 2023). Ennek a vegyületcsaládnak a szerkezetét az utóbbi időben sikeresen építették be micelláris, angiográfias képalkotásra alkalmas, illetve pH-érzékeny kontrasztanyagok szerkezetébe (Forgács et al. 2017a; Uzal-Varela et al. 2020).

A (makro)ciklusos ligandumok

A (makro)ciklusos ligandumok tekintetében a Mn(II) komplexálására ígéretes vegyületek a 12-tagú 1,4,7,10-tetraazaciklododekán (ciklén), a merevebb piklén (3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15), 11,13-trién) kétszeresen helyettesített (acetát, illetve acetamid oldalláncokat tartalmazó származékok) (Rolla et al. 2013; Garda et al. 2016; Csúpász et al. 2022; Kálmán et al. 2021; Garda et al. 2021), a 15-Py-aneN₅ (15-Py-aneN₅ = 3,6,9,12,18-pentaazabicyclo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-trién), valamint a 15-Py-aneN₃O₂ (15-Py-aneN₃O₂ = 3,12,18-triaza-6,9-dioxabicyclo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-trién) makrociklusok oldalláncok nélküli származékai közül kerültek ki (Drahoš et al. 2010). Az itt felsorolt vegyületek közül az 1,4-helyettesített DO2A esetében (2. ábra) voltak olyanok a legfőbb fizikokémiai paraméterek (stabilitás, inertség és relaxációs hatás), hogy elkezdődött az intelligens/okos, illetve szövetspecifikus kontrasztanyagjelöltek (angiográfias ágensek, illetve legújabban a máj fibrogenézisének detektálására alkalmas diagnosztikumok) fejlesztése (Ning et al. 2022; Forgács et al. 2016; Leone et al. 2022; Rolla et al. 2018; Forgács et al. 2017b). A fizikokémiai paraméterek alapján a csoportunk által fejlesztett 3,9-PC2A származékok zászlóvivőnek tekinthetők (2. ábra), amely ligandum-platformot az utóbbi időben intelligens/okos, illetve szövetspecifikus kontrasztanyagjelöltek szerkezetébe is átültettük. Ilyen kelátok segítségével lehetőség nyílt a szervezet érrendszerének MRI-vel történő feltérképezésére (3,9-PC2A-BP) (Kálmán et al. 2020) angiográfias képalkotás során, amely komplex és a vérben nagy koncentrációban jelen lévő humán szérum albumin (HSA) fehérjével való kölcsönhatásán alapul. Ezen túl sikerült előállítanunk pH- (3,9-PC2A-EA), illetve a Zn(II)-ion koncentrációjára érzékeny (3,9-PC2A-DPA) Mn(II)-komplexekeket (Botár et al. 2020; Botár et al. 2022), továbbá Z. R. Lu és munkatársai májszövetspecifikus ágenseket állítottak elő, bár a szerzők ebben az esetben a 3,6-PC2A kelátorra alapozták előállított szövetspecifikus anyaguk ligandumát (3,6-PC2A-EOB) (Hall et al. 2022) (lásd később).

A merev ciklusos biszpindinalapú kelátorokat több diagnosztikai értékkel bíró fémion komplexálására javasolták az elmúlt évtizedekben. Az ezzel a ligandumcsaláddal képződő Mn(II)-komplexekek vizsgálata azonban csak az elmúlt két évben indult el (2. ábra), ezért nem meglepő, hogy a kutatás a jelenlegi állás szerint a Mn(II)-komplexekek szerkezete és fizikokémiai paraméterei (stabilitás és szelektivitás, inertség, relaxációs hatás stb.) kö-

zötti összefüggések feltárására fókuszál (Sy et al. 2022; Ndiaye et al. 2022; Ndiaye et al. 2020). Azonban már most is látható, hogy a ligandumcsalád jelentős hatással lesz a Mn(II)-alapú ágensek jövőjére, mivel az eddig vizsgált származékok között rendkívül inert Mn(II)-komplexekeket is találunk, amihez időnként nem várt szelektivitás is társul az ugyancsak esszenciális Zn(II)-ionnal szemben.

Kétfunkciós és intelligens Mn(II)-komplexekek

A fiziológiás paraméterek változására reagáló, „intelligens” fémkomplexekek új dimenziót nyitnak az MRI-képalakításban. A ligandum „érzékenyítésével” olyan tulajdonságok feltérképezésére nyílik lehetőség egy adott szöveten belül, mint például a pH, a redoxipotenciál, különböző endogén fémionok (Ca(II), Zn(II), Cu(II)) koncentrációja stb. Az egyik példa pH-érzékeny Mn(II)-komplexe a kutatócsoportunkban kifejlesztett [Mn(3,9-PC2A-EA)] (Botár et al. 2020), amely etilamin-oldallánc protonálódása következtében változik a komplex relaxivitása 3,50 és 2,10 mM⁻¹s⁻¹ között a 5,8–7,8 pH-tartományban. pH-érzékeny ágensként triaza-ciklononán származékokat – [Mn(NO₂ASAm)] (Uzal-Varela et al. 2020), [Mn(MPA)] (Shen et al. 2023) – is kipróbáltak az irodalomban. Az etilamin molekularész két pikolilcsoportot tartalmazó származéka (Botár et al. 2022) pedig a Zn(II)-ionok szelektív érzékelésére tette képessé a komplexet egy teljesen más mechanizmus szerint, mivel ennek a kelátoknak az esetében a fémionhoz koordinálódó vízmolekulák száma nem változott. Így a relaxációs hatást a rotációs korrelációs idő növekedése okozta, ami a Mn(L)Zn heterodinukleáris komplex és a HSA közötti kölcsönhatásnak köszönhető. A redoxipotenciál változásának érzékelésére kiaknázható a Mn(II)/Mn(III) redoxipár. Ilyen indítással P. Cravan és munkatársai (Gale et al. 2014) az EDTA ligandum hidroxibenzil-származékait használták a Mn(II) oxidációs potenciáljának finomhangolásához.

A szövetspecifikus vagy megfelelő vektormolekulákkal targetált kontrasztanyagok előállítását az indukálta, hogy ezek bizonyos szövetekben, illetve szervekben képesek dúsulni, ami lehetőséget ad a vizsgálat során szükséges dózis csökkentésére, illetve láthatóvá tehet bizonyos sejt- vagy szövetszintű specifikus folyamatokat. Az irodalomban a legtöbb szövetspecifikus ágens példája a májspecifikus kontrasztanyagokkal kapcsolatos. A tanulmányok többségében ilyen ágens esetén a nyílt láncú EDTA, ritkábban transz-CDTA ligandum-platformokra alapoznak (2. ábra). Az eddig publikált egyetlen makrociklusos kelát a [Mn(3,6-PC2A-EOB)]-komplex (Hall et al. 2022), amely a májsejtekben található szerves aniontraszporter fehérjékre szelektív 4-etoxibenzil funkciós csoportot tartalmazza.

A kardiovaszkuláris képalkotásra használt úgynevezett blood pool ágensek elsősorban a vérben található HSA fehérjéhez kötődve képesek megjeleníteni az érrend-

szert, mivel ezek kiürülése a kelát és a HSA közötti kölcsönhatás eredményeként lassúbb, az így létrejövő makromolekuláris addukt pedig nagy relaxivitással bír. Ilyen megközelítéssel többnyire apoláris molekularésszel funkcionizált komplexképzőket használnak: például a bifenilcsoportot tartalmazó 3,9-PC2A-BP ligandumot (Kálmán *et al.* 2020), de számos példát találunk 1,4-DO2A-bisz(amid) származékaira is – ([Mn(2CHyd)], [Mn(1,4-DO2AM)]²⁺, [Mn(DO2AMGly)], [Mn(DD-DO2A)], [Mn(DH-DO2A)], [Mn(1,4-BzDO2AM)]²⁺, [Mn(1,4-DO2AMBz)]²⁺ (Ning *et al.* 2022; Forgács *et al.* 2016; Leone *et al.* 2022; Rolla *et al.* 2018; Forgács *et al.* 2017b) –, amelyek HSA-hoz kötött formái gyakran tízszer nagyobb relaxivitással rendelkeznek az anyavegyületekhez képest, az adduktum megnövekedett rotációs korrelációs idejének köszönhetően.

A 3,9-PC2A Mn(II)-kötő motívumot pH-érzékeny kontrasztanyagjelölt szerkezetébe is beépítettük ([Mn(3,9-PC2A-EA)]) (Botár *et al.* 2020). A [Mn(3,9-PC2A-EA)]-komplex nagy pH-n heptakoordinált, így nem tartalmaz a fémionhoz koordinálódó vízmolekulát. (Ezért a relaxációsebességet növelő hatása is csekély.) A pH csökkentése az EA oldallánc aminocsoportjának protonálódását idézi elő a komplexben, amelynek helyét egy vízmolekula veszi át a fémion belső koordinációs szférájában, ami a relaxitás növekedését eredményezi. Hasonló elven működnek a szulfonamid oldalláncokat tartalmazó Mn(II)-komplexek, amelyeket C. Platas-Iglesias és munkatársai javasoltak, bár ezeknek a komplexeknek az esetében a kelátok inertségéről nem gyűjtöttek információt. Azonban az NO2A-származékokkal végzett korábbi vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy labilis komplexekről van szó (Uzal-Varela *et al.* 2020). Az NO2A anyaligandum két acetátcsoportját pikolilcsoportokra cserélve G. Liang és munkatársai javítani tudtak a Mn(II)-komplexek inertségén (Shen *et al.* 2023). Ezeknek a vegyületeknek az esetében a legnagyobb problémát a pH-változás hatására bekövetkező relaxitáskülönbségek mértéke okozza, ami további finombeállítást igényel.

Az esszenciális fémionok (pl. Zn(II)) mérésére alkalmas Mn(II)-alapú komplexek irodalma is bővült az elmúlt két év során. Talán nem meglepő, hogy az elsőként előállított ilyen vegyület a PyC3A (2. ábra) ligandumra alapozott (Chirayil *et al.* 2021). A vizsgálatok azonban rávilágítottak, hogy az ezen platformmal képződő Mn(II)-kelát nem rendelkezik megfelelő inertséggel, így kézenfekvőnek tűnt ezt a funkciót a pH-érzékenyítés során már bevált 3,9-PC2A platformra átültetni (Botár *et al.* 2022). Az előállított 3,9-PC2A-DPA komplexképző *in vitro* (fizikokémiai vizsgálatokban) és *in vivo* (egérkísérletekben) is kiválóan teljesített, amit a prosztataszövetben glükózindukált Zn(II) leadásának követésével igazoltunk. Ennek a csoportnak a harmadik képviselője egy olyan heptakoordinált Mn(II)-komplex, amelyet 13,2 nm méretű porózus szilícium-dioxid nanoszférába ágyaztak (Mallik *et al.* 2023). Azt, hogy a nanoszféra

reagáljon a Zn(II)-ionok koncentrációjának változására, úgy érték el, hogy a felületére Zn(II)-ionokkal stabil komplexet képző kelátormotívumot kapcsoltak, amely Zn(II)-ionok jelenlétében képes a BSA-hoz kötődni, ez pedig a relaxitás további növekedését idézi elő.

A bimodális kontrasztanyagok lehetővé teszik, hogy egyszerre több képalkotó készülékkel készítsünk felvételeket, ezáltal az adatok egymásra vetítésével ötvözhetjük az egyes diagnosztikai módszerek előnyeit. Az MRI-vel leggyakrabban kapcsolt technikák a PET, SPECT és az optikai képalkotás. A Mn(II)-alapú ágensek esetében elsősorban a PET-MRI hibrid képalkotásban alkalmazható bimodális komplexek találhatók meg az irodalomban, ugyanis a pozitronemittáló ⁵²Mn-izotóp kézenfekvő jelölt ilyen irányú alkalmazásokra. A kombinált alkalmazás előnye az egyéb PET-ágensek (¹⁸F, ¹¹C, ⁶⁸Ga stb.) használatával szemben, hogy elég egyetlen fajta, speciálisan a Mn(II)-ion gyors komplexálására tervezett ligandumot alkalmazni – hiszen azonos biodisztribúciót kapunk a PET- és MRI-felvételeknél, mivel kémiaiailag ekvivalens a hideg és meleg izotóp komplexe. Ilyen alkalmazásokban azonban égető szükség van úgynevezett bifunkciós kelátorokra (BFC-kre), amelyek a fémion megkötéséért felelős donorcsoportokon túl biológiai vektormolekulához kapcsolható funkciós csoportokat is tartalmaznak. E vegyületek köre az esetek többségében EDTA-ligandumokra korlátozódik, bár ezek Mn(II)-komplexei a [Mn(EDTA)]-komplexnél feltehetően valamivel jobb fizikokémiai paraméterekkel rendelkeznek (Troughton *et al.* 2004; Zhu *et al.* 2014; Loving *et al.* 2013; Wu *et al.* 2015).

A kinetikai vizsgálatok rávilágítottak, hogy a nyílt láncú ligandumok közül a *transz*-CDTA Mn(II)-kelátjai kellően inerte bifunkciós alkalmazásokhoz. Ezt kihasználva Vanasschen és munkatársai klikkreakcióval vektormolekulához kapcsolható CDTA-származékot állítottak elő. A ligandum vizsgálatai alapján a BFC kelátor komplexkémiai tulajdonságai kicsivel jobbnak bizonyultak a CDTA anyavegyülethez képest, és a duális képalkotásra is alkalmasnak találták (Vanasschen *et al.* 2017). Valamivel később, hasonló megfontolásokat követve P. Caravan és munkatársai a PyC3A ligandumot is átalakították BFC-vá (Gale *et al.* 2015). Optikai képalkotásra is alkalmas Mn(II)-komplexeket szintén előállítottak az EDTA-bisz(amid) származékának fluorofórokkal való funkcionizálásával (Sathiyajith *et al.* 2022); ezeknek a komplexeknek a relaxitása MR-képalkotásra is alkalmasá teszi őket.

Ugyanakkor a (makro)ciklusos BFC-k fejlesztése 2020-ig váratott magára, amikor is Tóth É. és munkatársai a biszpidinvázra alapozó kelátorokat állítottak elő (Ndiaye *et al.* 2020). Ennek a hiánynak a pótlására jött létre a KDP-pályázat is, amelynek megvalósítása során egy sor BFC-ligandum előállítása és ezek vektormolekulához kapcsolása volt a pályázat egyik alappillére.

Vektormolekulák mint a célzott diagnosztikai (terápiás és teranosztikai) szerek eszközei

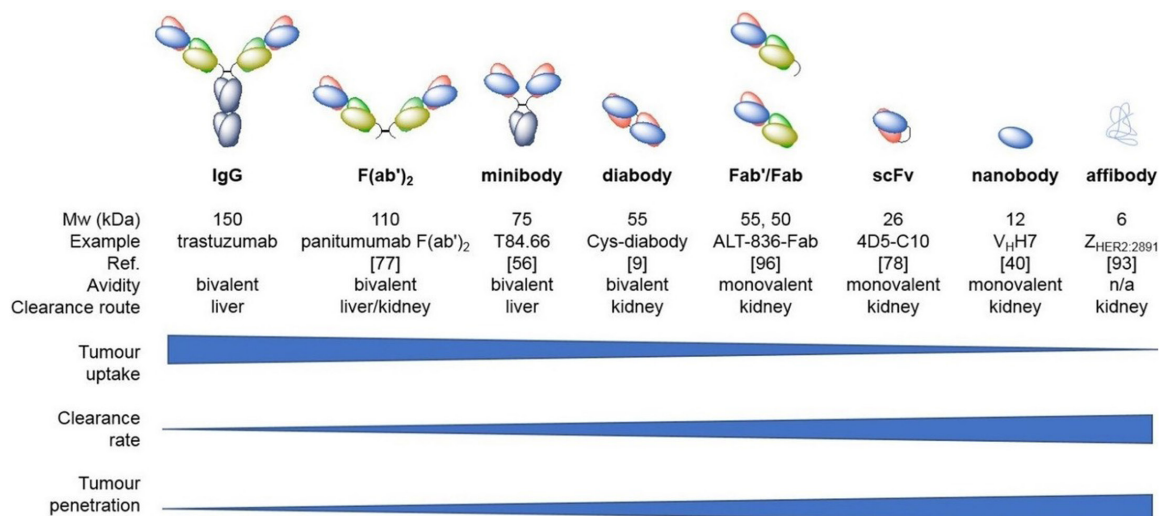
A biológiai vektormolekulák közül a monoklonális antitestek jutottak el a terápiás alkalmazásig. Ezek piaca az előrejelzések szerint 2032-re elérheti a 260 milliárd USD-t (Dey 2023). Csak 2022-ben tizenhárom antitest-alapú készítmény kapta meg az engedélyt az EU-ban, illetve az USA-ban, és ez a szám az elmúlt öt évben egy év kivételével minden esetben meghaladta a tízet (Reichert 2022). Ez a sikertörténet ösztönző hatással van az antitest-alapú diagnosztikumok és terápiás szerek következő generációinak fejlesztésére. Az egyik, robbanásszerű növekedést mutató terület az intakt antitestek alternatíváinak megkeresése, amit a méretük és a hosszú szérumtartózkodási idejük okozta problémák inspirálnak. Antitestfragmentumok kémiai/enzimatis (papain vagy pepszin enzimekkel) emésztéssel vagy géntechnológiával állíthatók elő (King 1998; Saerens–Muyldermans 2012). Az antitestek enzimatis emésztése Fab^{''} és (Fab')₂ fragmentumok előállítására szolgál, amelyek egy, illetve két antigénkötő régióval rendelkeznek (az Fc régió ugyanakkor hiányzik). A Fab^{''} fragmentumok gyorsabb vesekiválasztást és jobb tumorpenetrációt mutathatnak, biokémiai módszerekkel azonban nem állíthatók elő az antitestek valamennyi alosztályából. (Előállításuk ráadásul nagy mennyiségű kiindulási antitestet igényel.) A biotechnológia gyors fejlődése lehetővé tette az antitestek változó régióinak viszonylag egyszerű előállítását és izolálását (például egyláncú, változó régiójú fragmentumok (scFv-k), valamint számos mesterséges diatest, minitest és egy doménnel rendelkező antitestváltozatok). E fragmentumok mindegyike egyedi kötődési és funkcionális jellemzőkkel rendelkezik.

Az egyik leggyakrabban előforduló forma az scFv (Weisser–Hall 2009). Az scFv-k két doménnel (VH és VL) rendelkeznek, amelyek egy rövid és flexibilis peptid-

lánccal kapcsolódnak össze. Ezek a fragmentumok kicsik (26 kDa), és amennyiben a linker legalább tizenkét maradék hosszú, akkor monomerek és monovalensek. A V-domének közötti peptidlinker lerövidítése (<tizenegy maradék) önszerveződést kényszerít ki az scFv-ből, kétértékű diabodyt (55 kDa) hozva létre (McCabe et al. 2012). A linker további lerövidítése (<három maradék) pedig háromértékű tribody (80 kDa) és tetraavalens tetra-body (110 kDa) összerendeződést eredményez. A két változó doménből a diszulfidkötés géntechnológiai módosításával diszulfidstabilizált Fv-fragmentum hozható létre peptidlinker nélkül (dsFv) és peptidlinkerrel (scds-Fv). Ezek megoldhatják az scFv-ekkel kapcsolatos stabilitási és aggregációs problémák egy részét. A minitestek olyan scFv–CH₃ fúziós fehérjék, amelyekben két scFv-t a nehézlánc egyik összetevője köt össze; ezek kétértékű dimerekké (75 kDa) kapcsolódnak össze. A kétértékű, egyláncú változó fragmentumok (bi-scFv-k, 55 kDa) két scFv összekapcsolásával készülnek, és két különböző doménnel rendelkeznek, ami lehetővé teszi számukra, hogy két különböző epitóphoz kötődjenek.

A legkisebb fragmentumok, amelyek még képesek egy antigén szelektív megkötésére – ahogyan azt egy antitest teszi –, egyetlen doménből állnak, és vagy a VH, vagy a VL régióból származnak, vagy tevévelékből történhet az izolálásuk. Ezek az egy doménből álló antitestek (sdAbs, 12–15 kDa) vagy nanotestek számos előnnyel rendelkeznek az scFv-ekkel szemben (nagy stabilitás, könnyű előállítás és a kis méret stb.), így alkalmasak olyan applikációkhoz, mint a radionuklid-alapú képalkotás, amely a fokozott szöveti penetráció és a gyors kiürülés kombinációját igényli.

Az affitestek az előzőekben tárgyalt fragmentumoknál is kisebb méretű (6–7 kDa) mesterséges affinitásfehérjék, amelyek a staphylococcus A fehérje immunglobulin-kötő régiójának B-doménjéből származnak fágmegjelenítéssel (Löfblom et al. 2010). Az affitestek ideálisak az Immuno-



3. ábra Az antitestek különböző fragmentumai

Forrás: Fu et al. 2018

PET-vizsgálatokhoz kis méretű, nagymértékű pH- és hőmérséklet-stabilitásuk, valamint a konjugációhoz szükséges C-terminális végen található cisztein aminosav jelenléte miatt (Frejd–Kim 2017). Gyors kiürülésük és a „célpont” iránti csökkent aviditásuk azonban további kihívásokat jelent. Munkánk során a biológiai vektormolekulák közül a két végletre tartozó antitestek (trastuzumab) és affitestek jelölését végeztük el (lásd később).

Vizsgálati anyag és módszer

$^{52}\text{Mn(II)}$ -alapú affitest/antitest-konjugátumok előállítása

^{52}Mn radioizotóp előállítása

Az ^{52}Mn előállítása ciklotron segítségével történt, természetes Cr–Mg por 14 MeV-os protonokkal történő bombázása révén ($^{52}\text{Cr(p,n)}^{52}\text{Mn}$). A besugárzás után a célanyag magnéziumtartalmát 10%-os (m/m) HNO_3 felhasználásával oldottuk ki, majd a szilárd krómot szűrtük, és két részletben mostuk 3 ml ultratiszta vízzel. Az így kapott krómport 95 °C-on 2 ml cc. HCl-ban feloldottuk, majd szobahőmérsékletre hűlés után abs. EtOH segítségével hígítottuk úgy, hogy a végső összetétel 3% (V/V) HCl legyen abs. EtOH-ban. Ezt egy kondicionált AG 1-X8 anioncserélő oszlopon engedték át, ahol az $^{52}\text{Mn(II)}$ megkötődött az oszlopon. Ezt követően az oszlopot 10 mL 3% (V/V) HCl abs. EtOH segítségével mostuk, majd az $^{52}\text{Mn(II)}$ -t 0,5 mL 0,1 M up. HCl felhasználásával eluáltuk, és szárazra pároltuk. A tisztítási eljárást ezután kétszer megismételtük. A potenciálisan jelen lévő fémion szennyezők (vas, cink, réz) eltávolítására DGA-tisztítást végeztünk. Ehhez a harmadik elválasztás után a mintát szárazra pároltuk, majd 3 M-os HCl-ban feloldottuk, amit követően egy DGA-gyantán nyomtuk át. Az $^{52}\text{Mn(II)}$ -t tartalmazó frakciókat szárazra pároltuk, és 0,1 M up. HCl-ba oldottuk vissza.

BPPA-trastuzumab előállítása

A trastuzumabot (Ontruzant®, Samsung Bioepis) 30 kDa centrifugaszűrőn tisztítottuk. Az antitest konjugálása BPPA-Bn-pMMA-val történt pH 8,0–8,2, 0,1 M NaHCO_3 -ban, hűsszoros, illetve ötszörös kelátor felesleg alkalmazásával. A konjugálás hatékonyságát és a konjugált BPPA/trastuzumab arányt UPLC-RA-MS rendszerrel vizsgáltuk. Az előállított BPPA-trastuzumabot ultraszűrővel tisztítottuk, majd vízben 21 mg/ml-re koncentráltuk.

Az ^{52}Mn -3,9-PC2ABn^{pCOOH} és az ^{52}Mn -BPPA jelölése

Az optimalizálás során vizsgáltuk a pH, a hőmérséklet és a ligandumkoncentráció hatását a 3,9-PC2ABn^{pCOOH} és BPPA kelátorok $^{52}\text{Mn(II)}$ -vel történő jelölésének radiokémiaili hozamára nézve. A radiokémiaili tisztaságra (RCP) gyakorolt hatást különböző ligandumkoncentrációk jelenlétében és a 3–7 pH-tartományban követtük. A reak-

ciókat 25 °C-on és 95 °C-on inkubáltuk öt percre, majd a jelölések előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiás szkennelével követtük. A reakcióelegyből 3 µl-t szilikagéllel impregnált üveg makroszál kromatográfiás papírra (iTLC-SG) cseppentettünk, és a 3,9-PC2ABn^{pCOOH} esetén 0,5 M nátrium-citrát eluensben (pH 5,5), míg a BPPA esetén 3% NH_3 oldatban fejlesztettünk ki.

^{52}Mn /Mn-BPPA-trastuzumab előállítása

10–15 µl 21 mg/ml BPPA-trastuzumab oldatot adtunk 0,1 M pH 7 HEPES oldatával puffertelt $^{52}\text{Mn(II)}$ -hoz. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten inkubáltuk tizenöt percre. Az RCP-t radioTLC-kromatográfiával határoztuk meg. A reakcióelegyet injektálható adagokra porcióztuk, és hígítottuk izotóniás sóoldattal.

$[[^{52}\text{Mn}]/\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})]\text{-Cys-HER2-affibody}$ előállítása

A biodisztribúciós vizsgálatokhoz HEPES (4,35 µmol, pH = 7,02) puffer mellett 3,9-PC2ABn^{pMA}-Cys-HER2-affibody (3,8–7,6 nmol) oldatot adtunk a ^{52}Mn MnCl_2 -ot tartalmazó elegyhez. A jelzési kísérleteket szobahőmérsékleten tizenöt percre végeztük. A reakcióelegyet izotóniás sóoldattal hígítottuk a szükséges térfogatra, és további tisztítás nélkül használtuk fel.

Sejtvonal és állatmodellek

Az állatkísérletet a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Etikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: 16/2020/DEMÁB). A laboratóriumi állatok tartása és kezelése a magyar törvények vonatkozó szakaszainak, valamint az Európai Unió állatjóléti irányelveinek és rendeleteinek megfelelően történt.

Az állatokat 4T1 (tripla negatív egér- emlőrák) és MDA-MB (HER2+, HER2– túlreprezentált emberi emlőrák) sejtvonalak segítségével oltottuk. Valamennyi sejtvonalat a Debreceni Egyetem bocsátotta rendelkezésünkre. A vizsgálatban 14–16 hetes CB17 SCID egereket használtunk. Az egerek steril, IVC ketrecben voltak tartva, a steril táplálékot és vizet ad libitum kapták. A tumor beültetése szubkután a váll területére és intramammárisan, a lágyéktáji mellsírparnára történt. Kilenc-huszonkét nappal a tumorsejtek beoltása után, amikor a xenograft elérte a 6–7 mm-es maximális átmérőt, az egerekbe $2,7 \pm 0,7$ MBq radiotracert injektáltunk intravénásan, a farokvénán keresztül.

PET–MRI leképezés

A leképezés alatt az egereket a testhőmérséklet fenntartása és a mozgás megakadályozása érdekében szkennelőágyra helyeztük. Közvetlenül az injektálás után 90 perces dinamikus egésztest-PET/MRI (nanoScan PET/MRI 1T, Mediso LTD., Magyarország) leképezést, majd 20 perces statikus egésztest-PET/MRI-vizsgálatokat (98,5 mm-es látómező (FOV); 400–600 keV energiaablak) végeztünk 4 óra, 24 óra, 72 óra, 120 óra, 156 óra és 240

óra elteltével. A standardizált felvételi értéket (SUV) a következő képlet segítségével számítottuk ki: $SUV = [ROI\text{-aktivitás (MBq/ml)}] / [\text{beadott aktivitás (MBq)} / \text{állat súlya (g)}]$.

Vizsgálati eredmények

⁵²Mn(II)-alapú affitest/antitest-konjugátumok jellemzése

⁵²Mn-DOTA-TRC105 konjugátummal kapcsolatos eredmények

Legjobb tudomásunk szerint a korábbiakban csak egy tanulmányban számoltak be ⁵²Mn(II)-ionnal jelölt monoklonális antitest alkalmazásáról in vivo kísérletben (Graves et al. 2015). A DOTA Mn(II)-ionnal alkotott bifunkcionális kelátjának alkalmasságát ⁵²Mn-DOTA-TRC105-tel in vivo kísérletekkel vizsgálták 4T1 xenograftot hordozó egerekben, és gyengén koordinált ⁵²Mn(II)-ion (⁵²MnCl₂ és ⁵²Mn(II)-acetát formájában) biodisztribúciójával hasonlították össze. A vizsgálathoz a TRC105 anti-CD105 mAb-t DOTA-NCS-sel konjugálták, majd 4,5–7,5 közötti pH-n és szobahőmérséklettől 55 °C-ig terjedő hőmérsékleten elvégezték a jelöléseket. Az in vivo adatok szerint a ⁵²Mn-DOTA-TRC105 és a „szabad ⁵²Mn” PET-képein egyértelmű különbségek mutatkoztak az eloszlási mintázatban. (Megjegyzés: nincs azonosítható minőségi különbség a ⁵²MnCl₂ és a ⁵²Mn(II)-acetát injektált alanyok között, ami arra utal, hogy az injektálás utáni ionos disszociáció gyors.) A legjelentősebb különbségek között volt a pajzsmirigy felvételének hiánya a ⁵²Mn-DOTA-TRC105 képeken, valamint a daganat felvételének hiánya a ⁵²MnCl₂ képeken. Ezekből azt a következtetést vonták le, hogy a ⁵²Mn-DOTA-kelát stabil, még 120 órával az injektáció után is. A célzott injektálások esetében fokozott jel látható a csontokban, a szabad ion esetében azonban nem. Az immunoPET-ben a csontfelvétel általában a fém-kelát pár instabilitásával társul. Ezt azzal indokolták, hogy a lassan disszociálódó mangán olyan farmakokinetikai profilt mutat, amely különbözik a szabad mangántól. Egy lehetséges magyarázatnak vélték, hogy közvetlen kölcsönhatás lehet a csont és a DOTA-hoz kötött mangán között, nem pedig a kelát instabilitására vonatkozó hidrolízismechanizmus az oka az eltérésnek.

A radiotracer maximális tumorfelvétele 19%ID/g az injektálás utáni 24. órában. A vérből való kiürülés lassú, idővel a csontok és a lép felvétele pedig viszonylag magas (>10%ID/g az injektálást követő 120. órában), ami további vizsgálatot igényel.

A [⁵²Mn]Mn-3,9-PC2ABn^{pMA}-affibodyval kapcsolatos eredmények

3,9-PC2ABn^{pCO₂H} ligandum esetén (Váradí et al. 2023) a pH, a hőmérséklet, a reakcióidő és a ligandumkoncentráció hatását vizsgáltuk a [⁵²Mn]Mn(II)-vel történő jelölés hatásosságára. A pH növelésével az RCP is nőtt; pH

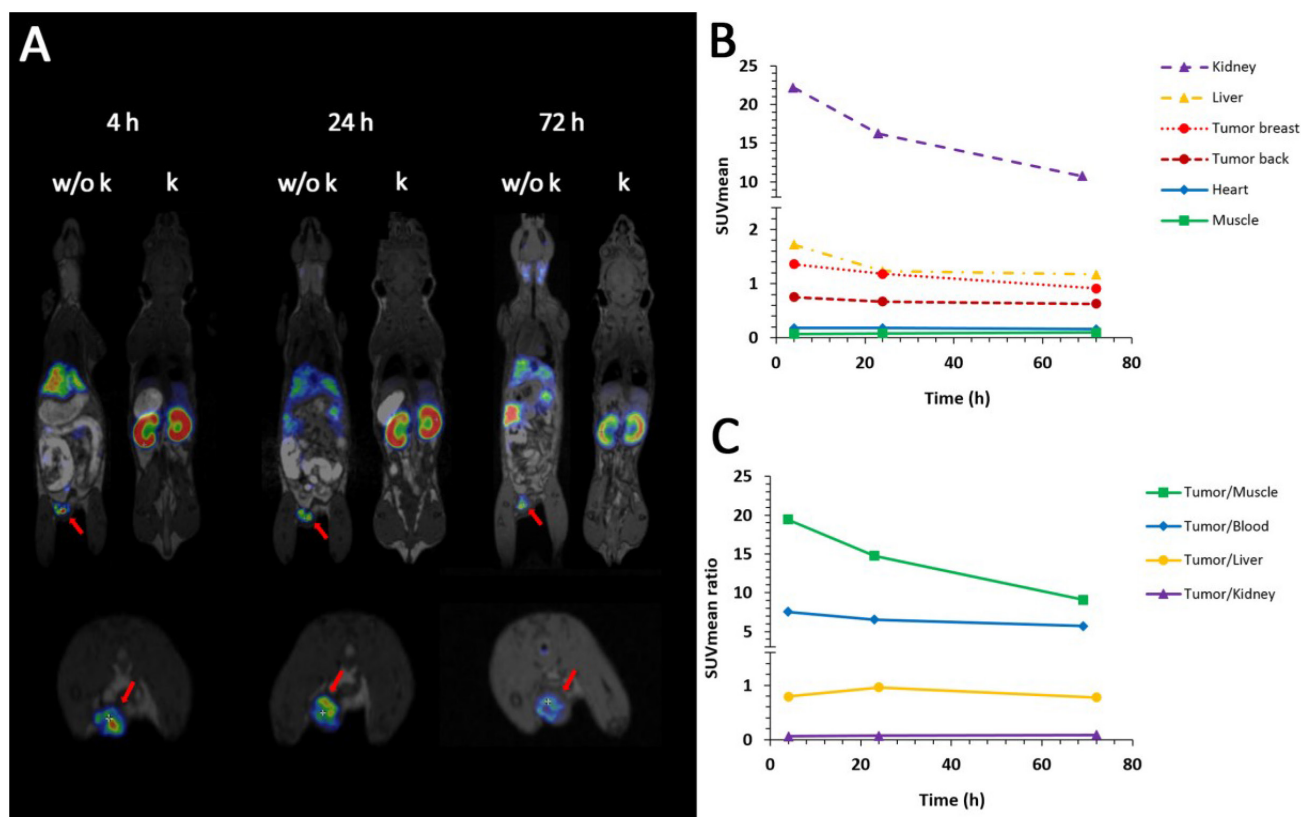
6 felett 1 μM ligandumkoncentráció mellett is RCP > 95% jelölés volt elérhető, míg pH 5-6 esetén ugyanez az eredmény csak egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációnál volt produkálható. A reakcióidő hatását a jelzési görbe inflexiós pontján végeztük, ahol azt tapasztaltuk, hogy a hosszabb reakcióidő nem eredményezett fokozott hozamot, következésképpen a jelölés szobahőmérsékleten is pillanatszerűen megy végbe.

A [⁵²Mn]Mn-3,9-PC2ABn^{pMA}-affibody dinamikus kisállat PET–MRI-vizsgálatai során a vesekéregben figyelemre méltó radiotracer-felhalmozódás volt megfigyelhető (SUV-átlag: 22,19 négy óra alatt), amely az idő múlásával lassan csökkent (SUV-átlag: 16,23 és 10,75 24, illetve 72 órán belül). Ez a jelenség a vizelettel történő kiválasztással és a vese-visszatartással magyarázható, ami az affibodyk hidrofilitásának köszönhető, és az irodalomban is gyakran tapasztalt „mintázat” (Oroujeni et al. 2018; Burley et al. 2019; Han et al. 2022). HER2+ tumort hordozó egerekben az emlőtumor radiotracer-felvétele magasabb volt, mint a többi szerv és szövet esetén, kivéve a májat és a vesét. A heterotopikusan transzplantált HER2+ emlőtumorban sokkal alacsonyabb tumorfelvétel volt megfigyelhető, ami azzal a feltételezéssel magyarázható, hogy a tumor környezete nagyban befolyásolja a tulajdonságait.

A [⁵²Mn]Mn-BPPA-trastuzumabbal kapcsolatos eredmények

A BPPA [⁵²Mn]Mn(II)-vel történő jelölésének (Toàn et al.) hatékonysága a pH növekedésével fokozódott; pH 7 felett 1 μM ligandumkoncentrációval 95% feletti RCP volt elérhető, míg pH 6 alatt egy nagyságrenddel nagyobb ligandumkoncentrációra volt szükség ugyanahhoz a hozamhoz. A reakcióidő növelése nem vezetett szignifikáns RCP-növekedéshez semelyik pH esetén. Az optimalizálás alapján a BPPA-trastuzumab [⁵²Mn]Mn(II)-vel történő jelölését ideális esetben szobahőmérsékleten, pH 7 HEPES pufferrel, tizenöt percig végeztük. A hideg Mn(II)-BPPA-komplex előzetes kinetikai mérései azt mutatták, hogy a komplex stabil a CDTA-val történő transzkelációval szemben, azonban a [⁵²Mn]Mn-BPPA-trastuzumab csökkent stabilitást mutatott szérumban. Radiokémiai tisztasága a tizedik napra 71%-ra csökkent.

A [⁵²Mn]Mn-BPPA-trastuzumab 24 óra elteltével már HER2-specifikusságot mutat, miközben a legtöbb szervben a felvételi értékek fokozatos csökkenése tapasztalható az idő múlásával. A tumor felvétele folyamatosan növekedett az idő múlásával. A háti xenograft 240 órával az injektálás után érte el a maximális felvételt (SUV 1,10±0,12), míg az emlőtumor 168 órákor érte el a csúcst (SUV 1,53±0,16). A tumor/máj és tumor/izom arányokat vizsgálva látható, hogy a HER2+ emlődaganat jelentős különbséget mutatott a HER2– tumorokhoz képest. A felvétel mind a hát-, mind az emlődaganatok-



4. ábra (A) NanoPET/MR-képkalkotás az MDA-MB (HER2+) daganatot hordozó SCID egéren. Reprezentatív bomláskorrigált koronális PET-felvételek (fent), amelyek a vese nélküli (w/o k) és a vesével (k) szeleteket, valamint transzaxiális PET-felvételeket (lent) mutatnak 4, 24 és 72 órával a $[^{52}\text{Mn}] \text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})$ -Cys-HER2-affibody intravénás injekcióját követően. Piros nyilak jelzik a tumorok helyét (ortotópiás). (B) A daganatok (emlő és hát), az izom, a szív, a máj és a vesék időaktivitási görbéinek (TAC) átlaga, amelyek többszörös időpontos kisállat PET-felvételekből származnak a $[^{52}\text{Mn}] \text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})$ -Cys-HER2-affibody konjugátum intravénás beadása után. (C) A tumor(emlő)-szervi arány TAC-görbéi, amelyek többszörös időponti kisállat PET-felvételekből származnak a $[^{52}\text{Mn}] \text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})$ -Cys-HER2-affibody konjugátum farokvénás injekcióját követően.

Forrás: Váradi et al. 2023

ban annyira kifejezett, hogy már 48 órán belül szignifikánsan magasabb volt, mint a májban és más szervekben (ANOVA, $p < 0,001$).

A vizsgálati eredmények értékelése, megvitatása, összefoglalása és következtetések levonása

A PET-kísérletek mind az affibody-, mind az antitest-alapú radiotracer esetén figyelemre méltó halmozódást mutattak a HER2+ tumorszövetben. A $[^{52}\text{Mn}] \text{Mn}$ -DOTA-GA-trastuzumab kiválasztása a várt módon, a májon keresztül történt, amit más monoklonális antitest esetén is kimutattak (Moreau et al. 2012). A magas májhalmozáson kívül hátránynak tekinthető a hosszú keringési idő, ami gátolhatja a gyakorlati felhasználást, hiszen ilyen esetben a radioaktív molekula emelt sugárdózist

jelent a szervezetre nézve a leképezés előtti időszakban, ami antitesteknél napokat is jelenthet. Ezért fordítottuk kutatásunkat a jóval kisebb méretű és kedvezőbb biodisztibúciós tulajdonságokat mutató affibodyk irányába. A $[^{52}\text{Mn}] \text{Mn}$ -3,9-PC2ABn^{pMA}-affibody keringési ideje jelentősen csökkent az antitestszármazékéhoz képest, illetve kiválasztása főként a vesén keresztül történt. A gyakorlati felhasználást itt is gátolja egy a kiürülés során tapasztalt probléma, miszerint az affibody-származék megakadt a vesékéregben, és ott is maradt a vizsgálat időtartama alatt. Ahogyan a jelölt antitestnél a májdózis, úgy a jelzett affibody esetén a vesedózis emelkedett, így további antitestfragmensek vizsgálata szükséges. Ezek közül az úgynevezett nanobodyk jelenthetik a megoldást, amelyek rendelkeznek az affibodyk kedvező biodisztibúciós és biokinetikai tulajdonságaival, de használatukkal csökkenthető a vesét és a májat érő dózis.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetet mondanak a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) K-128201 és 134694 sz. pályázatainak, illetve az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának (KDP-2020). Az ismertett tudományos eredmények a Richter Gedeon Nyrt. által létrehozott Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatásával, „Richter Talentum PhD-ösztöndíj” keretében készültek.



Irodalomjegyzék

- Botár, R., Molnár, E., Garda, Z., Madarasi, E., Trencsényi, G., Kiss, J. ... Tircsó, G. (2022) Synthesis and characterization of a stable and inert MnII-based ZnII responsive MRI probe for molecular imaging of glucose stimulated zinc secretion (GSZS). *Inorganic Chemistry Frontiers*, Vol. 9. pp. 577–583. <https://doi.org/10.1039/D1Q100501D>
- Botár, R., Molnár, E., Trencsényi, G., Kiss, J., Kálmán, F. K. & Tircsó, G. (2020) Stable and Inert Mn(II)-Based and pH-Responsive Contrast Agents. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 142. pp. 1662–1666. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b09407>
- Brandt, M., Cardinale, J., Rausch, I. & Mindt, T. L. (2019) Manganese in PET imaging: Opportunities and challenges. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, Vol. 62. pp. 541–551. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3754>
- Buchholz, M., Spahn, I., Scholten, B. & Coenen, H. H. (2013) Cross-section measurements for the formation of manganese-52 and its isolation with a non-hazardous eluent. *Radiochimica Acta*, Vol. 101. pp. 491–499. <https://doi.org/10.1524/ract.2013.2083>
- Burley, T. A., Da Pieve, C., Martins, C. D., Ciobota, D. M., Allott, L., Oyen, W. J. G. ... Kramer-Marek, G. (2019) Affibody-Based PET Imaging to Guide EGFR-Targeted Cancer Therapy in Head and Neck Squamous Cell Cancer Models. *Journal of Nuclear Medicine*, Vol. 60. p. 353. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.216069>
- Chen, K., Cai, Z., Cao, Y., Jiang, L., Jiang, Y., Gu, H. ... Ai, H. (2023) Kinetically inert manganese (II)-based hybrid micellar complexes for magnetic resonance imaging of lymph node metastasis. *Regenerative Biomaterials*, Vol. 10. <https://doi.org/10.1093/rb/rbad053>
- Chirayil, S., Jordan, V. C., Martins, A. F., Paranawithana, N., Ratnakar, S. J. & Sherry, A. D. (2021) Manganese(II)-Based Responsive Contrast Agent Detects Glucose-Stimulated Zinc Secretion from the Mouse Pancreas and Prostate by MRI. *Inorganic Chemistry*, Vol. 60. pp. 2168–2177. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02688>
- Conti, M. & Eriksson, L. (2016) Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: A review and a discussion. *EJNMMI Physics*, Vol. 3. No. 8. <https://doi.org/10.1186/s40658-016-0144-5>
- Csupász, T., Szűcs, D., Kálmán, F., Holloczki, O., Fekete, A., Szikra, D. ... Tircsó, G. (2022) A New Oxygen Containing Pycen-Type Ligand as a Manganese(II) Binder for MRI and ⁵²Mn PET Applications: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Structural and Radiochemical Studies. *Molecules*, Vol. 27. No. 2. p. 371. <https://doi.org/10.3390/molecules27020371>
- De Nardo, L., Ferro-Flores, G., Bolzati, C., Esposito, J. & Meléndez-Alafort, L. (2019) Radiation effective dose assessment of [⁵¹Mn]- and [⁵²Mn]-chloride. *Applied Radiation and Isotopes*, Vol. 153. 108805. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.108805>
- Dey, K. (2023) Monoclonal Antibody Therapy Market Overview. MRFR. <https://www.marketresearchfuture.com/reports/monoclonal-antibody-therapy-market-2089> [Letöltve: 2023. 12. 15.]
- Drahoš, B., Kotek, J., Hermann, P., Lukeš, I. & Tóth, É. (2010) Mn2+ Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and ¹H/¹⁷O Relaxation Studies. *Inorganic Chemistry*, Vol. 49. pp. 3224–3238. <https://doi.org/10.1021/ic9020756>
- Fonslet, J., Tietze, S., Jensen, A. I., Graves, S. A. & Severin, G. W. (2017) Optimized procedures for manganese-52: Production, separation and radiolabeling. *Applied Radiation and Isotopes*, Vol. 121. pp. 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2016.11.021>
- Forgács, A., Regueiro-Figueroa, M., Barriada, J. L., Esteban-Gómez, D., De Blas, A., Rodríguez-Blas, T. ... Platas-Iglesias, C. (2015) Mono-, Bi-, and Trinuclear Bis-Hydrated Mn2+ Complexes as Potential MRI Contrast Agents. *Inorganic Chemistry*, Vol. 54. pp. 9576–9587. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01677>
- Forgács, A., Tei, L., Baranyai, Z., Tóth, I., Zékány, L. & Botta, M. (2016) A Bisamide Derivative of [Mn(1,4-DO2A)] – Solution Thermodynamic, Kinetic, and NMR Relaxometric Studies. *European Journal of Inorganic Chemistry*, Vol. 2016. pp. 1165–1174. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501415>
- Forgács, A., Pujales-Paradela, R., Regueiro-Figueroa, M., Valencia, L., Esteban-Gómez, D., Botta, M. & Platas-Iglesias, C. (2017a) Developing the family of picolinate ligands for Mn2+ complexation. *Dalton Transactions*, Vol. 46. pp. 1546–1558. <https://doi.org/10.1039/C6DT04442E>
- Forgács, A., Tei, L., Baranyai, Z., Esteban-Gómez, D., Platas-Iglesias, C. & Botta, M. (2017b) Optimising the relaxivities of Mn2+ complexes by targeting human serum albumin (HSA). *Dalton Transactions*, Vol. 46. pp. 8494–8504. <https://doi.org/10.1039/C7DT01508A>
- Frejd, F. Y. & Kim, K.-T. (2017) Affibody molecules as engineered protein drugs. *Experimental & Molecular Medicine*, Vol. 49. e306. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.35>
- Fu, R., Carroll, L., Yahiolu, G., Aboagye, E. O. & Miller, P. W. (2018) Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications. *ChemMedChem*, Vol. 13. pp. 2466–2478. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800624>
- Gale, E. M., Atanasova, I. P., Blasi, F., Ay, I. & Caravan, P. (2015) A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 137. pp. 15548–15557. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b10748>
- Gale, E. M., Mukherjee, S., Liu, C., Loving, G. S. & Caravan, P. (2014) Structure–Redox–Relaxivity Relationships for Redox Responsive Manganese-Based Magnetic Resonance Imaging Probes. *Inorganic Chemistry*, Vol. 53. pp. 10748–10761. <https://doi.org/10.1021/ic502005u>
- Gale, E. M., Wey, H.-Y., Ramsay, I., Yen, Y.-F., Sosnovik, D. E. & Caravan, P. (2018) A Manganese-based Alternative to Gadolinium: Contrast-enhanced MR Angiography, Excretion, Pharmacokinetics, and Metabolism. *Radiology*, Vol. 286. pp. 865–872. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017170977>

- Garda, Z., Forgács, A., Do, Q. N., Kálmán, F. K., Timári, S., Baranyai, Z. ... Tircsó, G. (2016) Physico-chemical properties of Mn(II) complexes formed with cis- and trans-DO2A: Thermodynamic, electrochemical and kinetic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 163. pp. 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.018>
- Garda, Z., Molnár, E., Hamon, N., Barriada, J. L., Esteban-Gómez, D., Várad, B. ... Tircsó, G. (2021) Complexation of Mn(II) by Rigid Pycn Diacetates: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Density Functional Theory, and Superoxide Dismutase Activity Studies. *Inorganic Chemistry*, Vol. 60. pp. 1133–1148. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03276>
- Graves, S. A., Hernandez, R., Fonslet, J., England, C. G., Valdovinos, H. F., Ellison, P. A. ... Severin, G. W. (2015) Novel Preparation Methods of ^{52}Mn for ImmunoPET Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 26. pp. 2118–2124. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00414>
- Hall, R. C., Qin, J., Laney, V., Ayat, N. & Lu, Z.-R. (2022) Manganese(II) EOB-Pylen Diacetate for Liver-Specific MRI. *ACS Applied Bio Materials*, Vol. 5. pp. 451–458. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01259>
- Han, J., Chen, Y., Zhao, Y., Zhao, X., Zhang, J., Wang, J. & Zhang, Z. (2022) Pre-Clinical Study of the ^{18}F -AIF-Labeled HER2 Affibody for Non-Invasive HER2 Detection in Gastric Cancer. *Frontiers in Medicine*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.803005>
- Kálmán, F. K. & Tircsó, G. (2012) Kinetic Inertness of the Mn^{2+} Complexes Formed with AAZTA and Some Open-Chain EDTA Derivatives. *Inorganic Chemistry*, Vol. 51. pp. 10065–10067. <https://doi.org/10.1021/ic300832e>
- Kálmán, F. K., Nagy, V., Várad, B., Garda, Z., Molnár, E., Trencsényi, G. ... Tircsó, G. (2020) Mn(II)-Based MRI Contrast Agent Candidate for Vascular Imaging. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 63. pp. 6057–6065. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00197>
- Kálmán, F. K., Nagy, V., Uzal-Varela, R., Pérez-Lourido, P., Esteban-Gómez, D., Garda, Z. ... Tircsó, G. (2021) Expanding the Ligand Classes Used for Mn(II) Complexation: Oxa-aza Macrocycles Make the Difference. *Molecules*, Vol. 26. p. 1524. <https://doi.org/10.3390/molecules26061524>
- King, D. J. (1998) Applications and engineering of monoclonal antibodies. CRC Press.
- Kononova, O. N., Bryuzgina, G. L., Apchitaeva, O. V. & Kononov, Y. S. (2019) Ion exchange recovery of chromium (VI) and manganese (II) from aqueous solutions. *Arabian Journal of Chemistry*, Vol. 12. pp. 2713–2720. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.05.021>
- Ladabaum, U. & Minoshima, S. (2008) Positron Emission Tomography. *Textbook of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1002/9781444303254.ch133>
- Leone, L., Anemone, A., Carella, A., Botto, E., Longo, D. L. & Tei, L. (2022) A Neutral and Stable Macrocyclic Mn(II) Complex for MRI Tumor Visualization. *ChemMedChem*, Vol. 17, e202200508. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200508>
- Lewis, C. M., Graves, S. A., Hernandez, R., Valdovinos, H. F., Barnhart, T. E., Cai, W. ... Suzuki, M. (2015) ^{52}Mn Production for PET/MRI Tracking of Human Stem Cells Expressing Divalent Metal Transporter 1 (DMT1). *Theranostics*, Vol. 5. pp. 227–239. <https://doi.org/10.7150/thno.10185>
- Loving, G. S., Mukherjee, S. & Caravan, P. (2013) Redox-Activated Manganese-Based MR Contrast Agent. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 135. pp. 4620–4623. <https://doi.org/10.1021/ja312610j>
- Löfblom, J., Feldwisch, J., Tolmachev, V., Carlsson, J., Ståhl, S. & Frejd, F. Y. (2010) Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Letters*, Vol. 584. pp. 2670–2680. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.014>
- Malkhede, D. D., Dhadke, P. M. & Khopkar, S. M. (1999) Solvent-Extraction Separation of Manganese(II) with Calixarene Substituted with an Acetyl Group at the Lower Rim. *Analytical Sciences*, Vol. 15. pp. 781–784. <https://doi.org/10.2116/analsci.15.781>
- Mallik, R., Saha, M., Singh, V., Mohan, H., Kumaran, S. S. & Mukherjee, C. (2023) Mn(II) complex impregnated porous silica nanoparticles as Zn(II)-responsive “Smart” MRI contrast agent for pancreas imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 11. pp. 8251–8261. <https://doi.org/10.1039/D3TB01289A>
- McCabe, K. E., Liu, B., Marks, J. D., Tomlinson, J. S., Wu, H. & Wu, A. M. (2012) An Engineered Cysteine-Modified Diabody for Imaging Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)-Positive Tumors. *Molecular Imaging and Biology*, Vol. 14. pp. 336–347. <https://doi.org/10.1007/s11307-011-0500-8>
- Michael, M., Yury, S. & Elisabeth, E. (2019) Gallium-68: Radiolabeling of Radiopharmaceuticals for PET Imaging – A Lot to Consider. In: Syed Ali Raza, N. & Muhammad Babar, I. (eds) *Medical Isotopes*. Rijeka, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90615>
- Moreau, M., Raguin, O., Vrigneaud, J.-M., Collin, B., Bernhard, C., Tizon, X. ... Denat, F. (2012) DOTAGA-Trastuzumab. A New Antibody Conjugate Targeting HER2/Neu Antigen for Diagnostic Purposes. *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 23. pp. 1181–1188. <https://doi.org/10.1021/bc200680x>
- Ndiaye, D., Cieslik, P., Wadepohl, H., Pallier, A., Mème, S., Comba, P. & Tóth, É. (2022) Mn^{2+} Bispidine Complex Combining Exceptional Stability, Inertness, and MRI Efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 144. pp. 22212–22220. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c10108>
- Ndiaye, D., Sy, M., Pallier, A., Mème, S., De Silva, I., Lacerda, S. ... Tóth, É. (2020) Unprecedented Kinetic Inertness for a Mn^{2+} -Bispidine Chelate: A Novel Structural Entry for Mn^{2+} -Based Imaging Agents. *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 59. pp. 11958–11963. <https://doi.org/10.1002/anie.202003685>
- Ning, Y., Zhou, I. Y., Rotile, N. J., Pantazopoulos, P., Wang, H., Barrett, S. C. ... Caravan, P. (2022) Dual Hydrazine-Equipped Turn-On Manganese-Based Probes for Magnetic Resonance Imaging of Liver Fibrogenesis. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 144. pp. 16553–16558. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c06231>
- Oroujeni, M., Garousi, J., Andersson, K. G., Löfblom, J., Mitran, B., Orlova, A. & Tolmachev, V. (2018) Preclinical Evaluation of ^{68}Ga -DFO-ZEGFR:2377: A Promising Affibody-Based Probe for Noninvasive PET Imaging of EGFR Expression in Tumors. *Cells*, Vol. 7. No. 9. p. 141. <https://doi.org/10.3390/cells7090141>
- Pota, K., Garda, Z., Kálmán, F. K., Barriada, J. L., Esteban-Gómez, D., Platas-Iglesias, C. ... Tircsó, G. (2018) Taking the next step toward inert Mn^{2+} complexes of open-chain ligands: The case of the rigid PhDTA ligand. *New Journal of Chemistry*, Vol. 42. pp. 8001–8011. <https://doi.org/10.1039/C8NJ00121A>
- Regueiro-Figueroa, M., Lima, L. M. P., Blanco, V., Esteban-Gómez, D., De Blas, A., Rodríguez-Blas, T. ... Platas-Iglesias, C. (2014a) Reasons behind the Relative Abundances of Heptacoordinate Complexes along the Late First-Row Transition Metal Series. *Inorganic Chemistry*, Vol. 53. pp. 12859–12869. <https://doi.org/10.1021/ic501869y>
- Regueiro-Figueroa, M., Rolla, G. A., Esteban-Gómez, D., De Blas, A., Rodríguez-Blas, T., Botta, M. & Platas-Iglesias, C. (2014b) High Relaxivity Mn^{2+} -Based MRI Contrast Agents. *Chemistry – A European Journal*, Vol. 20. pp. 17300–17305. <https://doi.org/10.1002/chem.201404673>
- Reichert, J. M. (2022) Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US. *The Antibody Society*. <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies> [Letöltve: 2023. 12. 01.]
- Rolla, G. A., De Biasio, V., Giovenzana, G. B., Botta, M. & Tei, L. (2018) Supramolecular assemblies based on amphiphilic Mn^{2+} -

- complexes as high relaxivity MRI probes. *Dalton Transactions*, Vol. 47. pp. 10660–10670. <https://doi.org/10.1039/C8DT01250D>
- Rolla, G. A., Platas-Iglesias, C., Botta, M., Tei, L. & Helm, L. (2013) ¹H and ¹⁷O NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorganic Chemistry*, Vol. 52. pp. 3268–3279. <https://doi.org/10.1021/ic302785m>
- Saerens, D. & Muyldermans, S. (2012) *Single domain antibodies: Methods and protocols*. Springer.
- Sathiyajith, C., Hallett, A. J. & Edwards, P. G. (2022) Synthesis, photophysical characterization, relaxometric studies and molecular docking studies of gadolinium-free contrast agents for dual modal imaging. *Results in Chemistry*, Vol. 4, 100307. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100307>
- Shen, X., Pan, Y. & Liang, G. (2023) Development of Macrocyclic Mn(II)-Bispyridine Complexes as pH-Responsive Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry*, Vol. 26, e202200786. <https://doi.org/10.1002/ejic.202200786>
- Sy, M., Ndiaye, D., Da Silva, I., Lacerda, S., Charbonnière, L. J., Tóth, É. & Nonat, A. M. (2022) ⁵⁵/52Mn²⁺ Complexes with a Bispyridine-Phosphonate Ligand: High Kinetic Inertness for Imaging Applications. *Inorganic Chemistry*, Vol. 61. pp. 13421–13432. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c01681>
- Toàn, N. M., Vágner, A., Nagy, G., Országh, G., Nagy, T., Váradi, B. ... Garai, I. (2024) [⁵²Mn]Mn-BPPA-trastuzumab: A promising HER2-specific PET radiotracer. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 67. No. 10. pp. 8261–8270. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00344>
- Topping, G. J., Schaffer, P., Hoehr, C., Ruth, T. J. & Sossi, V. (2013) Manganese-52 positron emission tomography tracer characterization and initial results in phantoms and in vivo. *Medical Physics*, Vol. 40, 042502. <https://doi.org/10.1118/1.4793756>
- Troughton, J. S., Greenfield, M. T., Greenwood, J. M., Dumas, S., Wiethoff, A. J., Wang, J. ... Caravan, P. (2004) Synthesis and Evaluation of a High Relaxivity Manganese(II)-Based MRI Contrast Agent. *Inorganic Chemistry*, Vol. 43. pp. 6313–6323. <https://doi.org/10.1021/ic049559g>
- Uzal-Varela, R., Rodríguez-Rodríguez, A., Martínez-Calvo, M., Carniato, F., Lalli, D., Esteban-Gómez, D. ... Platas-Iglesias, C. (2020) Mn²⁺ Complexes Containing Sulfonamide Groups with pH-Responsive Relaxivity. *Inorganic Chemistry*, Vol. 59. pp. 14306–14317. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02098>
- Vanasschen, C., Molnár, E., Tircsó, G., Kálmán, F. K., Tóth, É., Brandt, M. ... Neumaier, B. (2017) Novel CDTA-based, Bifunctional Chelators for Stable and Inert MnII Complexation: Synthesis and Physicochemical Characterization. *Inorganic Chemistry*, Vol. 56. pp. 7746–7760. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00460>
- Váradi, B., Brezovcsik, K., Garda, Z., Madarasi, E., Szedlacsek, H., Badea, R.-A. ... Tircsó, G. (2023) Synthesis and characterization of a novel [⁵²Mn]Mn-labelled affibody based radiotracer for HER2+ targeting. *Inorganic Chemistry Frontiers*, Vol. 10. pp. 4734–4745. <https://doi.org/10.1039/D3QI00356F>
- Watanabe, S., Ishioka, N. S., Osa, A., Koizumi, M., Sekine, T., Kiyomiya, S. ... Mori, S. (2001) Production of positron emitters of metallic elements to study plant uptake and distribution. *Radiochimica Acta*, Vol. 89. pp. 853–860. <https://doi.org/doi:10.1524/ract.2001.89.11-12.853>
- Weisser, N. E. & Hall, J. C. (2009) Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*, Vol. 27. pp. 502–520. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.004>
- Wu, C., Li, D., Yang, L., Lin, B., Zhang, H., Xu, Y. ... Ai, H. (2015) Multivalent manganese complex decorated amphiphilic dextran micelles as sensitive MRI probes. *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 3. pp. 1470–1473. <https://doi.org/10.1039/C4TB02036G>
- Zhu, J., Gale, E. M., Atanasova, I., Rietz, T. A. & Caravan, P. (2014) Hexameric MnII Dendrimer as MRI Contrast Agent. *Chemistry – A European Journal*, Vol. 20. pp. 14507–14513. <https://doi.org/10.1002/chem.201403883>