

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Kismolekulák és peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából

Stéfánné Dénes Noémi

Témavezetők:
Prof. Dr. Hunyadi János
Dr. Kertész István



**DEBRECENI EGYETEM
PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI
DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2021

Kismolekulák és peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Stéfánné Dénes Noémi okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és
Allergológiai doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Hunyadi János, az MTA doktora
Dr. Kertész István, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Halmos Gábor, PhD
Dr. Tömböly Csaba, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Halmos Gábor, PhD
Dr. Tömböly Csaba, PhD
Prof. Dr. M. Nagy Noémi, az MTA doktora
Dr. Bánóczy Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2021. november 3. 13:00.

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A melanoma malignum az egyik legagresszívabb bőrdaganat, amely előrehaladott állapotban rendkívül rossz prognózissal rendelkezik. Ezt a negatív tulajdonságát a fokozott metasztatikus és angiogén hajlama, valamint a különböző kezelésekkel szemben mutatott rezisztenciája okozza. Az angiogenezis indukciója kritikus pont a legtöbb humán daganat - beleértve a melanoma malignumot is - kialakulásában. A rosszindulatú daganatok döntő hányadában (a szolid daganatok több mint 90%-ban), beindul az új erek képzésnek folyamata. A melanoma esetében a primer tumor korai felismerése, majd műtéti úton történő eltávolítása, és a folyamatos szűrővizsgálatok ellenére a betegek és a betegség előrehaladott stádiumában lévők száma folyamatosan növekszik. A kórfolyamat agresszivitása abból adódik, hogy képesek gyorsan növekedni a helyi kapillárisok felé, majd távoli metasztázisokat képezni több szervben (pl.: tüdő, agy, vese, máj és belek), még akkor is, ha az elsődleges daganat mérete nem látványos. A metasztázisok jelenléte nagymértékben csökkenti a várható élettartam hosszát, ezért ezen áttétek korai felismerése és lokalizálása döntő fontosságú a betegek életkilátásai szempontjából. A betegek életének meghosszabbítása szempontjából az orvosi képalkotó technikák kulcsszerepet játszhatnak. A nem invazív képalkotó módszerek közül a pozitron emissziós tomográfia (PET) nagy érzékenysége és felbontása miatt

hasznos módszer a rosszindulatú daganatok kimutatására, valamint a stádium meghatározására. A primer daganatok és áttétek képkalkotására a leggyakrabban alkalmazott radiogyógyszer a [^{18}F]-fluor-2-dezoxi-D-glükóz (^{18}F -FDG). A ^{18}F -FDG egy glükóz-analóg, amely magas metabolikus aktivitással rendelkező sejtekben, például daganatokban halmozódik fel. A széles körű használat ellenére a ^{18}F -FDG bizonyos korlátokkal rendelkezik: nem specifikus a rosszindulatú melanómára, ráadásul gyulladáscsökkentő elváltozások és a központi idegrendszer sejtjei is halmozzák, ami megnehezíti a PET-képeken az egészséges és beteg szövetek elkülönítését. A ^{18}F -FDG ezen korlátai a melanoma diagnosztikájának javítása céljából specifikus nyomjelzők szintézisét és jellemzését igényli, amelyek növelik a PET képek alkalmazásának hatékonyságát.

A generátor alapú radioizotópok kényelmes alternatívái a ciklotronnal előállítható izotópoknak. Ilyen PET-izotóp a ^{68}Ga , amely közel ideális fizikai tulajdonságokkal rendelkezik (89% β^+ ; $t_{1/2} = 68$ perc; $E_{\text{av}}(\beta^+) = 740$ keV), a radionuklidhoz könnyű helyszíni hozzáférhetőség biztosítható a kereskedelemben kapható $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátorokon keresztül. A ^{68}Ga fizikai és kémiai tulajdonságai lehetővé teszik a hatékony radiojelölést kis molekulatömegű vegyületek alkalmazásakor, döntően peptideknél, viszont antitesteknél és fehérjéknél a rövid felezési ideje miatt inkább az indirekt jelölés megvalósítása során lehet hasznos. Az előbbi területen

már jól bevált radiojelölési módszerek állnak a rendelkezésre, amelyek számos, a klinikai gyakorlatban-, illetve kutatásban alkalmazott vegyületet eredményeztek már. Azonban a különböző daganatok, valamint élettani folyamatok hatékony, rövid időn belüli és minél pontosabb feltérképezése még több specifikus radiofarmakon fejlesztését indokolja, amely komoly kihívás napjaink PET radiokémiája számára.

Kutatómunkánk fő célkitűzése olyan specifikus kölcsönhatások alapján dúsuló radioligandumok fejlesztése, amelyek a melanoma diagnosztikáját tehetik hatékonyabbá, illetve magukban hordozzák a teranosztikus analógok kidolgozásának lehetőségét:

- A melanoma malignum daganatokban található melanin kimutatására alkalmas kismolekulák előállítás, radiojelölése PET izotóppal (^{68}Ga -mal) és fizikai-kémiai-biológiai karakterizálása.
- A metasztázis képzésben kulcsszerepet betöltő élettani folyamat, az angiogenezis megjelenítése, a fokozottan kifejeződő receptorokon keresztül.

A kitűzött célokat két nagyobb projekt során végeztük:

Projekt 1: A melanin pigmenthez specifikusan kötődő benzamid-analógot, a prokainamidot konjugáltuk makrociklusos és nyíltláncú kelátorokkal, majd az előállított vegyületeket radiojelöltük ^{68}Ga -mal,

ezt követően pedig *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* biológiai körülmények között teszteltük PET képalkotás segítségével. A méréseink során egészséges, kontroll egereket; melanint termelő B16-F10 sejtvonalakat, majd ebből létrehozott tumoros egereket; valamint melanint nem termelő Melur és A375 sejtvonalakat, továbbá szintén ezen sejtek felhasználásával indukált tumoros állatmodelleket alkalmaztuk.

Projekt 2: Különböző molekuláris célpontok kimutatására alkalmas PET radioligandumokat fejlesztettünk, amelyek alkalmasak az angiogenezis megjelenítésére.

- a) Az Aminopeptidáz N (CD13) receptor célzására alkalmas ^{68}Ga -NODAGA-YEVGHRC fejlesztése és tesztelése.
- b) A VEGFR-1 receptor kimutatására képes ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-COOH és ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-NH₂ előállításuk és vizsgálataik.
- c) Egy olyan heterodimer származék előállítása, amely egyik alegysége az Aminopeptidáz N-t, míg másik része a VEGFR-1-es receptorát célozza, ezzel elősegítve a PET képalkotás minőségének javulását. Ez a radioligandum a ^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG.

A második projekt során előállított peptid-származékokat kelátorral konjugáltuk, ^{68}Ga -mal radiojelöltük, minőségellenőrzési

protokollt dolgoztunk ki, majd pedig *in vivo* és *ex vivo* PET mérések során teszteltük képalkotási tulajdonságaikat B16-F10 melanoma tumoros és egészséges állatokon.

2. Anyagok és módszerek

2.1 Kismolekulák nyomjelzése PET képzés céljából

2.1.1 *4-Amino-N-(2-dietilaminoetil)benzamid-hidroklorid*

konjugálási reakciója NODAGA-NHS-észter kelátorral

Az első melanoma szelektív, kis molekulatömegű ligandum előállítása során 4-amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidrokloridból indultunk ki, amelyet egy makrociklusos NODAGA-NHS-észter kelátorral konjugáltunk, acetonitril/nátrium-karbonát puffer (pH = 9,5) 3:1 arányú elegyében, a pH-t 2%-os NaOH-dal 8,5 és 9 közötti értékre állítottuk be. A termékként kapott NODAGA konjugált benzamid-analógot (NODAGA-PCA) félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk, összegyűjtöttük a frakciókat, és fagyasztva szárítottuk.

2.1.2 *HBED-CC-trisz(*t*Bu)tetra-fluor-fenil-észter szintézise, majd konjugálása a 4-amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidrokloriddal*

A HBED-CC-PCA – a második melanoma szelektív kismolekula – szintézisének első lépéseként *N,N'*-bisz[2-hidroxi-5-(karboxi-etil)-benzil]-etilén-diamin-*N,N'*-diecetsav trisz-terc-butil-észtert és 2,3,5,6-tetrafluor-fenolt feloldottuk acetonitrilben. Ezután, *N*-(3-dimetil-amino-propil)-*N'*-etil-karbodiimid-hidrokloridot és *N,N*-

diizopropil-etil-amint adagoltunk az elegyhez. A reakcióoldatot szobahőmérsékleten 2 órán át kevertettük, majd bepároltuk. Az elegyet újra oldottuk, majd szilícium-oxiddal töltött oszlopra vittük fel. A terméket etil-acetát/metanol 4:1 arányú elegyével nyertük vissza az állófázisról. A HBED-CC-trisz(tBu)tetra-fluor-fenil-észtert tartalmazó szerves fázisokat egyesítettük és bepároltuk. Ezt követően a kapott terméket a 4-amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidrokloriddal konjugáltuk, a védőcsoportokat (-tBu) TFA-val hasítottuk le. Ebben az esetben - és a NODAGA-PCA-nál is -, a tiszta terméket analitikai RP-HPLC azonosítottuk, valamint ESI-MS és ¹H-NMR segítségével végeztük a szerkezetazonosításukat. A jelölési reakciókhoz 3 mmol/dm³ koncentrációjú törzsoldatot készítettünk ultratiszta víz segítségével.

2.1.3 NODAGA-PCA és HBED-CC-PCA radioizotópos jelölése ⁶⁸Ga-mal

A NODAGA-PCA és a HBED-CC-PCA vegyületek radioizotópos jelöléséhez Obninsk típusú, TiO₂ állófázist tartalmazó ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátort használtunk, amelyet 5 mL 0,1 mol/dm³ ultratiszta HCl-dal frakcionáltan eluáltunk. Az aktivitás koncentrációra legtöményebb (≈350 MBq) frakciót összegyűjtöttük (1 mL), majd 0,16 mL ultratiszta NaOAc-tal (1 mol/dm³) puffereltük, a reakcióelegy pH-ját 4,5-re állítottuk be 0,06 mL 2%-os NaOH-dal. Ezután 5 μL 3 mmol/dm³ koncentrációjú prekuzort (NODAGA-PCA

vagy HBED-CC-PCA) adtunk a reakcióelegyhez, amit 5 percig, 95 °C-on inkubáltunk. A reakcióoldatot szobahőmérsékleten hagytuk lehűlni, majd ezután egy előre aktivált OASIS HLB 1 cc 30 mg töltetű oszlopra vittük át (aktiválás: 5 mL 96% EtOH, majd 10 mL vizes mosás; gyártói ajánlás). A radioaktivitás immobilizálása után az oszlopot 2 mL vízzel mostuk, az esetleges fémszennyeződések és a nem komplexált szabad ^{68}Ga eltávolítása céljából. A ^{68}Ga radiojelölt prokainamid származékokat 0,5 mL izotóniás nátrium klorid oldat/96% etanol 2:1 arányú elegyével nyertük vissza az oszlopról. A radioizotóppal jelölt terméket tovább hígítottuk 2 mL 0,9%-os NaCl oldattal, hogy az alkoholtartalmat 10% alá csökkentsük, ezután pedig steril szűrőn szűrtük. Minden egyes esetben a végtermék radiokémiai tisztaságát (%) analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztük, UV- és radiodetektor együttes alkalmazásával.

2.1.4 Félpreparatív és analitikai HPLC

A különböző kelátorral konjugált prokainamid származékok tisztítása KNAUR HPLC rendszer segítségével történt, félpreparatív Supelco Discovery[®] Bio Wide Pore C18 oszlopon (hossz és belső átmérő: 150 mm * 10 mm; részecske méret: 10 μm), 4,4 mL/perc áramlási sebesség alkalmazásával. A csúcsokat 254 nm-en detektáltuk UV detektor segítségével.

A radioaktív izotóppal jelzett vegyületek minőségellenőrzéséhez a fentiekben ismertetett KNAUER HPLC-t használtuk, ebben az esetben az UV detektor elé egy radiodetektort kapcsoltunk és együttesen használtuk a továbbiakban őket; a csúcsoakat továbbra is 254 nm-en detektáltuk, a kolonnát egy analitikai Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlopra cseréltük le (hossz és belső átmérő: 250 mm * 4,6 mm; részecske méret: 10 µm), az áramlási sebességet 1,2 mL/percre csökkentettük.

2.1.5 A ⁶⁸Ga-mal jelzett kismolekulák oktanol/PBS megoszlási hányadosának (LogP) meghatározása

A ⁶⁸Ga-NODAGA-PCA és a ⁶⁸Ga-HBED-CC-PCA származékok megoszlási hányados (LogP) értékeit is vizsgáltuk, amely számadat a vegyület adott pH értéken való vízdékonyságára utal. A megoszlási hányados értékének meghatározását – mindkét prokainamid származék esetében oktanol/PBS-sel végeztük, a radioaktivitást Perkin Elmer Packard Cobra gamma-számlálóval határoztuk meg, az eredményt cpm-ben kaptuk meg, amelyből pedig kiszámoltuk a radiojelölt kismolekulák LogP értékeit.

2.1.6 A ⁶⁸Ga-mal jelzett kismolekulák in vitro stabilitásának meghatározása

A ⁶⁸Ga-NODAGA-PCA és ⁶⁸Ga-HBED-CC-PCA vegyületek stabilitását 37 °C-on patkány- és egér szérumban teszteltük,

különböző időpontokban, majd pedig radioHPLC-vel mértük a radioligandumok radiokémia tisztaságát.

2.1.7 In vitro telítés kötődési vizsgálatok

Az *in vitro* kötődési vizsgálatokhoz melanint termelő B16-F10 sejtvonalat használtunk. A sejteket 24 lyukú lemezekben tenyésztettük 24 óra időintervallum alatt. Különböző koncentrációjú (20-1600 nmol/dm³) ⁶⁸Ga-NODAGA-PCA és ⁶⁸Ga-HBED-CC-PCA vegyületeket adtunk minden egyes üreghez. Az egy órás inkubációs idő után (CO₂ inkubátorban, 37 °C-on) a tápközeget eltávolítottuk, a sejteket kétszer mostuk mind PBS-sel, mind glicin oldattal, majd ezt követően NaOH-al lizáltuk őket 10 percig 37 °C-on. Végül gamma számlálóval megmértük a minták radioaktivitását.

2.1.8 Sejtfelvétel és kiáramlási vizsgálatok

A B16-F10, A375 és MELUR sejteket egyrétegű sejtenyészatként szaporítottuk szövettenyésztő lombikokban (2*10⁵ sejt/lombik) 24 órán át. Ezután pedig sejtfelvétel és kiáramlási vizsgálatokat végeztünk rajtuk.

2.1.9 Az alkalmazott tumor modellek

A mérések során C57BL/6J és a CB17 SCID típusú egereket alkalmaztunk. Az *in vivo* tumor modellek indukciójához felnőtt nőstény CB17 SCID (n = 30) és C57BL/6J (n = 20) egerek álltak a

rendelkezésünkre. Az amelanotikus tumor modellek indukálásakor $1 \cdot 10^5$ amelanotikus MELUR vagy A375 tumorsejteket injektáltunk az egér bal váll régiójába a bőr alá 0,9%-os NaCl oldatban (100 μ L). A melanint termelő melanoma létrehozása céljából a C57BL/6J egereket B16-F10 tumorsejtekkel ($1 \cdot 10^5$ sejt; 100 μ L NaCl-ban) injektáltuk, szubkután a bal váll területén. Az *in vivo* és az *ex vivo* kísérleteket 21 ± 2 nappal a tumorsejtek szubkután történő injektálását követően történtek.

2.1.10 PET/CT és PET/MRI képalkotás

A kontroll és a daganatos állatokba $7,0 \pm 0,2$ MBq ^{68}Ga -NODAGA-PCA-t vagy ^{18}F FDG-t injektáltunk a farokvénán keresztül 20 ± 2 nappal a B16-F10, vagy Melur sejtek beültetése után, ezt követően az egész test PET-vizsgálat (10 perc felvételi idő) a MiniPET-II szkennel segítségével történt.

Az állatok PET/MRI vizsgálata a debreceni ScanoMed Kft. Transzlációs Kutató Központjának Preklinikai Laboratóriumában történt. A kontroll és tumoros állatokba a laterális farokvénán keresztül $10,3 \pm 0,3$ MBq ^{68}Ga -NODAGA-PCA és ^{68}Ga -HBED-CC-PCA radioizotópjelzett vegyületet injektáltunk. A teljes test PET vizsgálatok (20 perces statikus PET vizsgálat) a preklinikai nanoScan PET/MRI készüléken lettek elvégezve.

2.1.11 Ex vivo biodistribúciós vizsgálatok

Az *in vivo* PET/MRI képalkotást követő napon a kontroll és a tumoros egerekbe intravénásan $10,3 \pm 0,3$ MBq ^{68}Ga -NODAGA-PCA és ^{68}Ga -HBED-CC-PCA radioizotópjelzett vegyületeket injektáltunk. A ^{68}Ga -mal jelölt prokainamid származékok beadását követően az egereket túlaltattuk, 3%-os izofluránnal. Mindegyik szervből és szövetből mintákat vettünk, a súlyukat analitikai mérleggel-, a radioaktivitásukat gamma számlálóval mértük, és kiszámítottuk a DAR (Differenciális abszorpciós arány) értéket.

2.2 Peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából

2.2.1 APRPG-NH₂ és az APRPG-COOH peptidek előállítása peptid-szintézissel

Az APRPG-NH₂ és az APRPG-COOH peptidek előállítását Prof. Dr. Mező Gábor, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport vezetője készítette, az általunk megtervezett szerkezet alapján.

Az APRPG-NH₂ peptid előállítása Rink-Amid MBHA gyantán történt, míg az APRPG-COOH peptid 2-ClTrt gyantán, SPPS-módszerrel szintetizálták, a szokásos Fmoc-kémia alkalmazásával. A nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztították, majd a tisztítási lépést követően a termékeket (APRPG-NH₂ és APRPG-COOH) analitikai RP-HPLC és elektronporlasztásos ionizációs-tömegspektrometria módszerekkel tesztelték és azonosították.

Az NGR-APRPG és az YEVGHRC peptideket a Bankpeptide Biological Tech Co., LTD (Hefei, Kína) szintetizálta megrendelésünkre.

2.2.2 A NODAGA-APRPG-COOH, NODAGA-APRPG-NH₂, NOTA-NGR-APRPG és a NODAGA-YEVBHRC peptid-származékok előállítás

A NODAGA-APRPG-COOH peptid prekursor előállításához a makrociklusos NOTA családjába tartozó *p*-SCN-Bn-NODAGA, az amin funkciós csoportra szelektív kelátort választottuk.

A NODAGA-APRPG-NH₂ előállításakor a kelátor, és maga a konjugációs reakció lépései is megegyeztek az előző bekezdésben leírtakkal, mindössze a kimért anyagmennyiségek és a lineáris peptid karboxil terminálisa különbözött.

A NODAGA-YEVBHRC peptid-származék előállításához szintén egy makrociklusos kelátort, a Maleimid-NODAGA-t alkalmaztuk. Ebben az esetben a cisztein oldalláncon keresztül végeztük el a konjugációt. A heterodimer vegyület (NOTA-NGR-APRPG) amelyet előállításával, egy olyan peptid-származék állt a rendelkezésünkre, amely két különböző típusú peptid-alegységgel (ciklikus NGR és aciklusos APRPG) rendelkezik egy molekulán belül, ez a konstrukció feltételezésünk szerint elősegítheti a

képkalkotás minőségi javulását olyan tumorok esetében, ahol az APN és a VEGFR-1 egyidejűleg fejeződik ki.

Mindegyik előállított vegyület esetében a nyersterméket félpreparatív RP-HPLC KNAUER készülékkel, félpreparatív Supelco Discovery Bio Wide Pore C18 oszloppal) felszerelve tisztítottuk. Az izolálást követően a termékeket tartalmazó frakciókat egy lombikba gyűjtöttük, majd liofilizáltuk. Az anyagot ESI-MS és analitikai RP-HPLC-vel jellemeztük. Ezt követően a 3 mmol/dm³ koncentrációjú törzsoldatot készítettünk a vegyületekből.

2.2.3 Az előállított peptid-származékok radiojelölése ⁶⁸Ga-mal

A radiojelöléshez GalliaPharm® ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátort (Eckert-Ziegler, Berlin, Németország) alkalmaztunk. A frakcionált elúciót követően, a legmagasabb aktivitáskoncentrációval rendelkező 1 mL-t puffereltünk 0,16 mL (1 mol/dm³) ultra tiszta nátrium-acetáttal, amellyel a reakcióelegy pH-ját ~4-4,1-re állítottuk bemindegyik vegyület esetében, majd 5 µL-t adtunk a reakcióhoz a törzsoldatokból. Ezt követően 95 °C-on 5 perces inkubáció mellett, kevertetés nélkül zajlott le a radiojelölési reakció a NODAGA-YEVGHRC és a NOTA-NGR-APRPG peptid-származékok esetében. Méréseink közben az derült ki, hogy a NODAGA-APRPG-COOH és a NODAGA-APRPG-NH₂ peptidek vélhetőleg érzékenyebbek a radiolízisre, ezért az említett módszer alacsony radiokémiai tisztasággal rendelkező

termékeket eredményezett. A melléktermékek keletkezését kiküszöbölendő a radioizotópos jelölést szobahőmérsékleten, 5 percig végeztük, illetve 0,1 mL abszolút EtOH-t adtunk a reakcióelegyhez gyökfogy tulajdonsága miatt. Ezt követte az OASIS HLB 1 cc 30 mg-os oszlopon a vegyületek tisztítási-formulázási lépései. A ^{68}Ga -mal jelölt peptid-származékokat 0,2 mL izotóniás sóoldat/96% etanol 2:1 arányú oldatával eluáltuk az oszlopról. Minden egyes esetben a végtermék radiokémiai tisztaságát (%) analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztük és határoztuk meg, UV- és radiodetektor együttes alkalmazásával. A radioligandumok oktanol/PBS megoszlási hányadosának (logP) értékeit, valamint az *in vitro* stabilitásukat is meghatároztuk a 2.1.5 és a 2.1.6 fejezetekben leírtak alapján.

2.2.4 Alkalmazott biológiai rendszerek és körülmények

Az angiogenezis kimutatására alkalmas vegyületeink receptor-kötődési tulajdonságait B16-F10 tumort hordozó egereken teszteltük. A sejtenyésztési folyamat során B16-F10 sejteket DMEM (Dulbecco módosított sas tápoldat) tápközegben, 10% FBS (magzati borjú fehérje) szérummal növesztettük, amihez 1% (v/v) MEM-et (nem esszenciális aminosav), 1% MEM vitamint, 1% antibiotikus és antimiotikus oldatot adagoltunk. Az *in vivo* kísérletsorozathoz - amely során a ^{68}Ga -mal jelölt peptid-származékjaink képalkotási tulajdonságait teszteltük -, 12 hetes hím, C57BL/6 egereket (n = 60)

az Animalab Ltd.-től (a The Jackson Laboratory viszonteladója) vásároltuk. A tumor létrehozásához $5 \cdot 10^6$ B16-F10 egér eredetű melanint termelő sejteket 150 μ L sóoldatban injektáltuk az egerek bal vállának régiójába.

2.2.5 In vivo állatkísérlet és kvantitatív PET-elemzés

A B16-F10 tumor indukciót követő 8. vagy 9. napon történt meg a képalkotó vizsgálat mindegyik peptid-származék esetében dedikált kisállat kamera segítségével. A tumort hordozó ($n = 40$) és az egészséges, kontroll ($n = 20$) egerek érzéstelenítését követően $5,5 \pm 0,7$ MBq $^{68}\text{Ga-NODAGA-APRPG-COOH}$, $^{68}\text{Ga-NODAGA-APRPG-NH}_2$, $^{68}\text{Ga-NODAGA-YEVGHRC}$ és a $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR-APRPG}$ vegyületeket injektáltunk a laterális farokvénán keresztül. 90 perces inkubációt követően az állatokat 3% izofluránnal (Forán) elaltattuk speciális inhalációs altatógép segítségével. Az altatást fenntartva statikus PET-vizsgálatot ($t = 20$ perc) végeztünk a MiniPET-II. kamera használatával. A felvételek rekonstrukciója BrainCad szoftver alkalmazásával történt.

2.2.6 Ex vivo biodisztribúciós vizsgálatok

Az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat a már fentebb említett módon hajtottuk végre (2.1.11 fejezet), itt azonban a $^{68}\text{Ga-NODAGA-APRPG-COOH}$, $^{68}\text{Ga-NODAGA-APRPG-NH}_2$, $^{68}\text{Ga-NODAGA-}$

YEVGHRC és a ^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG vegyületeket injektáltunk, majd az eredményeket ID%-ban fejeztük ki.

3. Eredmények és megbeszélés

3.1 Melanoma malignum kimutatására használt vegyületek képkalkotási tulajdonságainak értelmezése

A bőrrák legagresszívebb formája a melanoma malignum, amelynek előfordulási gyakorisága az utóbbi évtizedek megfigyelései alapján folyamatosan növekszik, ezért a hatékony diagnosztika kifejlesztése egyre nagyobb népegészségügyi jelentőséggel bír. A szakirodalom áttanulmányozása alapján feltételeztük a munkánk kezdetén, hogy a ^{68}Ga -mal jelzett prokainamid vegyületek hatékony diagnosztikai hozzáadott értékkel rendelkezhetnek a melanin pigmentet termelő melanoma tumorok kimutatása kapcsán.

A prokainamid-típusú vegyületek diagnosztikai hatékonyságának bizonyítása érdekében két különböző szerkezetű kelátorral konjugált származékot állítottunk elő. Munkánk során a 4-amino-*N*-(2-dietilaminoetil)-benzamid-hidroklorid alapvázat NODAGA-NHS észter makrociklusos kelátorhoz, illetve aciklusos HBED-CC-trisz(tBu)tetra-fluoro-fenil-észterhez kapcsoltuk.

A NODAGA-4-amino-*N*-(2-dietilaminoetil)-benzamid radiojelölését ^{68}Ga -mal valósítottuk meg (^{68}Ga -NODAGA-PCA). A teljes szintézis 15 percet vett igénybe, beleértve a végső formulázási lépést is, amely kényelmes szintézis időkeretet biztosított a rövid felezési idejű radioizotóppal történő munkavégzéshez. A radiojelölt

vegyület radiokémiai tisztasága meghaladta a 98%-ot, a moláris aktivitása 15-17 GBq/ μ mol érték között mozgott. Ezért ez a radioszintézis módszer lehetővé tette számunkra, hogy a biológiai alkalmazásokhoz robusztus módon előállítsuk a melaninra specifikus ^{68}Ga -NODAGA-PCA-t, illetve a radioligandum minőségi paraméterei alkalmasak voltak a preklinikai vizsgálatok eredményes elvégzéséhez.

A ^{68}Ga -NODAGA-PCA melanin-specifitását *in vitro* körülmények között bizonyítottuk melanin pozitív B16-F10 és melanin negatív Melur sejtvonal felhasználásával. A radioligandum dúsulása a melanint tartalmazó B16-F10 sejtekben szignifikánsan magasabb volt, mint az amelanotikus Melur esetében, a vizsgált (30, 90 perc) időpontokban. *In vitro* méréseink során megfigyeltük, hogy a ^{68}Ga -NODAGA-PCA dúsulása időfüggő folyamat, vagyis, az eltelt idővel arányosan monoton növekvő dúsulást találtunk a B16-F10 sejtekben. Azonban ez a különbség méréseink során nem bizonyult szignifikánsnak. Sejtes kísérleteink megerősítették továbbá a ^{68}Ga -NODAGA-PCA melanin-specifitását. A melanin pozitív B16-F10 sejtvonalban a ^{68}Ga -NODAGA-PCA radioligandum felvétel értékei magasabbak voltak a 30. és 90. percben, mint a szakirodalomban korábban megjelent hasonló, radiofém-felölt molekulák (pl.: ^{68}Ga -SCN-DOTA-PCA) *in vitro* paraméterei 2 óra alatt ($0,56\% \pm 0,02\%$), ugyanakkor elmaradnak a ^{18}F -ral jelölt származékoktól (pl.: FBZA-

dal (*N*-[2-(diethylamino)-etil]-4-¹⁸F-fluor-benzamid)). A farmakon-felvételi vizsgálatokat követően arra voltunk kíváncsiak, hogy az egyszer megkötődött aktivitás milyen stabilitással rendelkezik a sejten belül. Ezért vizsgáltuk a ⁶⁸Ga-NODAGA-PCA vegyület kiáramlását is mindkét sejtvonal (B16-F10, Melur) esetében. A B16-F10 és Melur sejtek kiáramlási vizsgálatához 30 vagy 90 inkubációs idő után, még további 10 percig inkubáltuk a sejteket, de a médium nem tartalmazott radiojelölt vegyületet. Megállapítottuk, hogy a kötött ⁶⁸Ga-NODAGA-PCA mennyisége a 10 perc extra időtartam után csökkent. Feltételeztük, hogy a sejtek melanin tartalmának telítése után a „felesleges” radiojelölt vegyület a koncentráció-gradiens megváltozása miatt kiürül a sejtekből. Mindazonáltal a melanin pozitív B16-F10 és melanin negatív Melur sejtvonalak felvételi aránya nem különbözött szignifikánsan a kezdeti arányoktól. Számos tanulmány arról számolt be, hogy a benzamid-származékok sejt felvétele passzív diffúzióval történik, és a nagy vízdékonyság csökkenti a sejthártyán való átjutás sebességét. Tesztelve ezeket az elméleteket, megmértük a logP értékeket is. A ⁶⁸Ga-NODAGA-PCA logP-je $-2,79 \pm 0,10$ volt, ami arra utal, hogy a radioligandum erősen hidrofíli. Méréseink szerint ez a tulajdonság lehet az alapja a melanint nem termelő sejtek alacsony farmakon-felvételeinek. Ugyanakkor a radioligandum jövőbeli hasznosítása érdekében érdemes lenne

alaposabban tisztázni a sejtbe való bejutás transzportfolyamatait a benzamid-származékok tekintetében.

Egészséges állatokon végzett *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok azt mutatták, hogy a ^{68}Ga -NODAGA-PCA a vizeletkiválasztó útvonalon ürül ki a szervezetből. Erre a tényre a logP érték alapján előre számítottunk is. A radiojelölt vegyület dúsulása egészséges szövetekben és szervekben alacsony volt, még a májban való dúsulás is elhanyagolhatónak tekinthető 90 perces inkubációs idő után. Ezek az eredmények jól korreláltak az *in vitro* méréseink megállapításával, valamint más tanulmányok eredményeivel, ahol a ^{68}Ga -NODAGA-PCA-dal strukturálisan hasonló radioaktívan jelzett benzamidokat vizsgáltak.

A ^{68}Ga -NODAGA-PCA melanin-specifitását *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós mérésekkel támasztottuk alá bőr alatt növekvő melanotikus B16-F10 (C57BL/6 egerekben) és amelanotikus Melur tumorok alkalmazásával (SCID egerekben) 20 ± 2 nappal a tumorsejt beoltása után. 10 perces statikus PET képeket készítettünk 90 perccel a radioaktív injekció intravénás beadását követően. A szubkután növekvő B16-F10 tumorok egyértelműen láthatóvá váltak a miniPET képeken alacsony háttér aktivitással, majd a PET képek kvantitatív elemzése után azt találtuk, hogy a ^{68}Ga -NODAGA-PCA akkumulációja a melanint tartalmazó B16-F10 tumorban szignifikánsan ($p \leq 0,01$) nagyobb volt, mint az amelanotikus Melur

daganat esetében. Ezek az *in vivo* eredmények egyeznek az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok tapasztalataival, amelyek megerősítették a ^{68}Ga -NODAGA-PCA melanin-specifitását. Eredményeink az irodalomban található mérésekkel összhangban vannak; a PET-izotópokkal (^{18}F , ^{68}Ga) jelzett benzamid-származékok relatíve magas felhalmozódást mutattak a B16-F10 daganatokban, kiváló tumor/háttér értékekkel. Munkánk során a ^{68}Ga -NODAGA-PCA hatékonyságát B16-F10 sejtek okozta tüdő metasztázisokban is vizsgáltuk, egérmodellen. Az általunk is használt szingenikus C57BL/6 állatmodellt széles körben alkalmazzák a preklinikai melanoma kutatásokban. Tanulmányunkban tüdő metasztázisokat indukáltunk 1×10^5 B16-F10 melanoma sejteket tartalmazó intravénás injekció beadását követően. A miniPET/CT képek elemzésével a metasztatikus tumorelváltozások a tüdőben jól láthatóvá váltak a ^{68}Ga -NODAGA-PCA injektálást követő 90 perc után, alacsony háttér dúsulással. A PET képek kvantitatív kiértékelése után a B16-F10 metasztázisokban körülbelül 6-8-szor nagyobb ^{68}Ga -NODAGA-PCA halmozást figyeltünk meg, mint a háttér (tüdő vagy izom) esetében.

Bár a szubkután növekvő B16-F10 daganatokban (SUVátlag: $0,35 \pm 0,09$, SUVmax: $2,03 \pm 0,87$) vagy tüdő metasztázisokban (SUVátlag: $0,15 \pm 0,04$, SUVmax: $0,42 \pm 0,06$) csak mérsékelt akkumulációt találtunk a ^{68}Ga -NODAGA-PCA-dal, azonban a más szervekben halmozódó alacsony aktivitás kiváló minőségű képek felvételét tette

lehetővé alacsony háttéraktivitással, és magas tumor/izom vagy tumor/tüdő arányokkal.

Egyes tanulmányokban a benzamid-, illetve nikotinamid-alapú radioligandumok akkumulációját kísérleti melanoma daganatokban ^{18}F -FDG-vel is összehasonlították, PET képalkotás segítségével, mivel a ^{18}F -FDG-t – korlátjai ellenére is - gyakran használták ezen típusú rosszindulatú daganatok diagnosztizálására, stádium meghatározásra és terápiás ellenőrzésére. A kísérleti daganatok kimutatására szolgáló ^{18}F -FDG intravénás injektálása után mi is magas felvételi értéket találtunk mind a szubkután növekvő amelanotikus Melurban, mind a melanin-pozitív B16-F10 tumorban, valamint a tüdő metasztázisokban. A PET képek kvantitatív elemzése után a B16-F10 melanoma tumorok szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb ^{18}F -FDG felvételt mutattak a ^{68}Ga -NODAGA-PCA-nál. Ezen megállapítás ellenére, amikor a daganatok ^{68}Ga -NODAGA-PCA felvételi értékeit összehasonlítottuk a háttér (izom vagy tüdő) aktivitással, akkor körülbelül kétszer vagy háromszor magasabb kontrasztértéket kaptunk, mint a ^{18}F -FDG-nél.

A HBED-CC-4-amino-*N*-(2-dietilaminoetil)-benzamid radiojelölése szintén ^{68}Ga -mal valósult meg. Hasonlóan, mint a ^{68}Ga -NODAGA-PCA esetében, a radiojelölés ideje kb.15-20 percet vett igénybe, beleértve a tisztítási és az újra formulázási lépéseket is. Az ezt követő minőségellenőrzési mérések megerősítették, hogy a

vegyület radiokémiai tisztasága ennél a vegyületnél is megbízható, nagyobb, mint 98%. Meglepetésünkre a nem királis állófázison különvált a termék három sztereoizomerje is, ami jól látható a radiokromatogramon. A radiojelölt származék moláris aktivitása 13-16 GBq/ μ mol között mozgott. Mindkét melanin specifikus vegyület esetében hasonló bomláskorrigált hozamokat (kb. 65-68%) kaptunk. A ^{68}Ga -HBED-CC-PCA vegyület radiojelölésénél és a minőségellenőrzési mérések során kapott eredmények biztosították számunkra, hogy gyorsan és egyszerűen, kiváló radiokémiai tisztasággal, valamint magas moláris aktivitással állítsuk elő a radioligandumokat a preklinikai alkalmazásokhoz. A patkány szérumban végzett 2 órás inkubálás után az eredeti vegyület kb. 75%-a maradt intakt a ^{68}Ga -HBED-CC-PCA esetében. Érdekes módon ez a megállapítás nem támasztja alá Eder és munkatársai megfigyelését, miszerint a HBED-CC alkalmazása NODAGA kelátor helyett növelheti a radioaktív ligandum metabolikus stabilitását. A ^{68}Ga -HBED-CC-PCA ugyanakkor még mindig elegendően stabil molekula, alkalmas a biológiai mérésekhez.

A ^{68}Ga -mal jelölt különféle kelátorral konjugált prokainamid származékok melanin-specifikusságának vizsgálatához melanin-pozitív (B16-F10) és melanin-negatív melanoma sejtvonalakat (MELUR, A375) alkalmaztunk egyrétegű és szuszpenziós sejttenyészet formájában. Korábbi vizsgálatok ugyanis kimutatták,

hogy a transzportfolyamatok (felvétel/kiáramlás) különbözhetnek, ha a sejteket *in vitro* vizsgálatokhoz egyrétegben vagy szuszpenzióban használják fel. Méréseink során mi is különbségeket állapítottunk meg a melaninra specifikus radiojelölt vegyületek felvétele között, amikor a szuszpenziós technikát összehasonlítottuk az egyrétegű technikával. Nagyobb ^{68}Ga -NODAGA-PCA és ^{68}Ga -HBED-CC-PCA felvételt találtunk minden egyes időpontban, amikor a melanoma sejteket egyrétegben alkalmaztuk. Ezen *in vitro* adatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az egyrétegű sejtenyészet fiziológiai tulajdonsága a tapadó melanoma sejtek számára közelebb áll az élő rendszeréhez. Amikor mindkét *in vitro* módszerrel megvizsgáltuk a ^{68}Ga -HBED-CC-PCA felvételét, szignifikánsan ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) nagyobb felvételt találtunk a melanint termelő B16-F10 sejtekben, mint az amelanotikus MELUR vagy A375 sejtek esetében, továbbá ez a halmozás az idő múlásával növekedett, és 10 perc kiáramlás után is megmaradt a B16-F10 sejteknél. A relatíve alacsony felvételi értékek ellenére is, ezek az eredmények megerősítették az új vegyület melanin-specifitását. A ^{68}Ga -NODAGA-PCA logP értéke $-2,79 \pm 0,10$ -nek és a ^{68}Ga -HBED-CC-PCA-é logP értéke $-2,19 \pm 0,12$ -nek adódott. A ^{68}Ga -NODAGA-PCA-hoz viszonyítva ez azt jelenti, hogy a ^{68}Ga -HBED-CC-PCA kissé erősebb lipofil karakterrel rendelkezik, de mégis erősen hidrofil.

Ezekkel a paraméterekkel rendelkező radioligandumoktól általában az várható el – és egészséges egerek felhasználásával végzett szervi megoszlás vizsgálatok ezt alá is támasztották -, hogy a ^{68}Ga -NODAGA-PCA és a ^{68}Ga -HBED-CC-PCA vegyületek, egymáshoz hasonlóan, főleg a vizeletrendszeren keresztül ürülnek ki a szervezetből. Továbbá, jellemző rájuk a véráramból történő gyors kiürülés is, hiszen 90 perc inkubációs idő után alacsony halmozást figyeltünk meg más szervekben és szövetekben. Ezek az *in vivo* és *ex vivo* eredmények jól korrelálnak számos olyan vizsgálattal, ahol más radioaktívan jelzett (^{18}F , ^{68}Ga , ^{125}I) benzamid-származék szervezeten belüli viselkedését, megoszlását vizsgálták.

A ^{68}Ga -HBED-CC-PCA vegyület target-specificitását szubkután melanoma tumort hordozó egér modellen vizsgáltuk, és összehasonlítottuk a ^{68}Ga -NODAGA-PCA-nál kapott eredményekkel. A melanotikus B16-F10 (C57BL/6 egerekben) és az amelanotikus A375 és Melur tumorokat (SCID egerekben) 21 ± 2 nappal a tumorsejt beoltása után vizsgáltuk. 20 perces statikus PET/MRI képeket készítettünk, 90 perccel a radiojelölt vegyület injektálását követően. A melanint tartalmazó B16-F10 tumorok egyértelműen láthatóvá váltak PET/MRI képalkotással, alacsony háttér aktivitással mindkét vegyület esetében. Ezzel szemben, amikor az amelanotikus MELUR és A375 daganatokat használtuk PET képalkotáshoz, nagyon alacsony ^{68}Ga -HBED-CC-PCA és ^{68}Ga -

NODAGA-PCA felvételt találtunk, amely megerősítette, hogy a radiojelölt vegyületek akkumulációja függ a sejtek melanin tartalmától. Az *in vivo* PET/MRI képek kvantitatív SUV-elemzése és az *ex vivo* DAR adatok feldolgozása után, azt az eredményt kaptuk, hogy a ^{68}Ga -HBED-CC-PCA és a ^{68}Ga -NODAGA-PCA felvétel melanotikus B16-F10 daganatban szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb volt, mint az amelanotikus MELUR vagy A375 daganatoknál. *In vivo* és *ex vivo* adataink jól korreláltak más kutatási tapasztalatokkal, ahol ^{18}F -ral és ^{68}Ga -mal jelölt melanin-specifikus benzamid-származékokat vizsgáltak melanint tartalmazó B16-F10 tumorok esetében, és viszonylag magas halmozást, valamint kiváló tumor/háttér arányt írtak le eredményeikben. A ^{68}Ga -HBED-CC-PCA (SUVátlag: $0,13 \pm 0,01$, SUVmax: $0,56 \pm 0,11$) és a ^{68}Ga -NODAGA-PCA (SUVátlag: $0,46 \pm 0,06$, SUVmax: $1,93 \pm 0,25$) vegyületek mérsékelt halmozódását figyeltük meg a szubkután növekvő B16-F10 daganatokban, azonban ennek ellenére azt tapasztaltuk, hogy az egészséges szövetek alacsony aktivitása miatt, magas kontrasztú, kiváló minőségű képeket eredményezett alkalmazásuk. Összevetve egy hasonló szerkezeti elemeket tartalmazó vetélytárssal azt tapasztaltuk, hogy az újonnan előállított vegyületeink magasabb tumor/izom arányt mutattak (a ^{68}Ga -NODAGA-PCA és a ^{68}Ga -HBED-CC-PCA T/M SUVmax értéke $40,7 \pm 4,23$, illetve $11,43 \pm 1,24$ volt), mint a ^{68}Ga -SCN-DOTA-PCA-é ($9,47 \pm 2,36$).

A munkánk során szignifikáns különbségeket találtunk a ^{68}Ga -NODAGA-PCA és a ^{68}Ga -HBED-CC-PCA molekulák *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* felvétele között, amennyiben melanint tartalmazott a lézió, illetve, ha nem. Eredményeink minden esetben arra mutatnak, hogy a prokainamid molekula megkötődése melanin-függő, azonban az alkalmazott bifunkcionális kelátképző tulajdonságai befolyásolják a jelzett vegyület mennyiségét a melanin-pozitív melanoma sejtekben és tumorokban – vélhetőleg a transzportfolyamat sebességére van hatásuk. Érdeemes mégis erőfeszítéseket fordítani – ahogy mi is próbálkoztunk – az ideális kelátor kiválasztására, hiszen a végső radiojelölt vegyületnek ellenállónak kell lennie a különböző endogén ligandumok, például a transferrin vagy a laktoferrinnel szemben is. Ezért a megfelelő kelátképző kiválasztása nagyban függ az alkalmazott izotóptól, annak termodinamikai- és kinetikai stabilitásától az adott kelátorral. Figyelembe véve, hogy a kelátorok farmakokinetikai módosító szerepet is betölthetnek, a különböző BFC alkalmazása a teljes molekula akkumulációs viselkedésre is hatással lehet, mint ahogyan pozitív módon befolyásolta a HBED-CC-PSMA (prostatata-specifikus membrán antigén) vegyület biológiai viselkedését az a tény, hogy aciklikus komplexképzőt (HBED-CC) alkalmaztak a konjugálási lépés során. Ugyanakkor az eredményeink bebizonyították, hogy HBED-CC univerzálisan nem feltétlenül jobb kelátor, mint a NOTA család különböző elemei, hiszen a mi

ligandumunk kisebb *in vitro* stabilitással, és vélhetőleg kisebb transzportsebességgel rendelkezett, mint a NODAGA-s párja. Előbbi kelátor esetében problémát jelenthet az is, hogy a HBED-CC galliummal történő komplexképződése során három diasztereoizomert képez. A képződött izomerek aránya függ a hőmérséklettől, a pH-tól és a komplexképződés során a kelátor koncentrációjától. Nemrégiben arról számoltak be, hogy a standard jelölési protokoll alkalmazásakor (pH ~ 4, hőmérséklet 95 °C) a ⁶⁸Ga-PSMA-HBED-CC esetében főleg a termodinamikailag kedvezőbb diasztereoizomer forma képződött; azonban a többi izomer mérhető mennyisége megtalálható volt a beteg számára elkészített végső készítményben, amelyek elválasztására jelenleg nem nagyon van lehetőség. Ez a tulajdonság lehet az egyik limitáló tényező a HBED-CC széleskörű alkalmazása előtt a klinikai gyakorlatban, mert nagy jelentősége lehet a diasztereoizomerek esetleg eltérő biológiai viselkedésének. Ezért arra a következtetésre lehet jutni, hogy a biológiai alkalmazáshoz a BFC kiválasztása során a termodinamikai stabilitás és a kinetikai inertség kritikus szintjének elérése szükséges, de a határérték után a fő hangsúly az ideális farmakokinetikai tulajdonságok, valamint az egységes tiszta termék meglétére korlátozódik.

3.2 Angiogenezis kimutatására használt vegyületek képkalkotási tulajdonságainak értelmezése

A daganatok térbeli növekedésének egyik alapvető folyamata között szerepel az angiogenezis (új érképződés), amely fontos szerepet játszik többek között a tumorok metasztázis képzésében is. Többféle molekuláris célpont szabályozza az új érképződést, ilyenek a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorok (VEGF), az integrinek (pl.: $\alpha_v\beta_3$), a mátrix metalloproteinázok (MMP), vagy az aminopeptidáz N (CD13). Ezeket a molekuláris célpontokat PET-képkalkotással láthatóvá lehet tenni. Például ^{68}Ga -mal jelölt specifikus peptid-származékkal célozhatjuk meg őket. Így ez a módszer, alkalmas lehet a tumorok kimutatására, valamint azok terápiás reakciójának követésére egyaránt.

Kutatócsoportunkban korábban számos ^{68}Ga -mal jelölt NGR-alapú (Asn-Gly-Arg) peptid-motívumot magában hordozó vegyületet állítottunk elő (^{68}Ga -NOTA-cNGR, ^{68}Ga -NODAGA-cNGR, ^{68}Ga -NODAGA-cNGR (MG1) vagy ^{68}Ga -NODAGA-cNGR (MG2)), amelyek specifikus kötődést mutattak az APN/CD13 receptorhoz. Azonban az NGR szekvencia hajlamos nem enzimátikus deamidálódásra, amely szukcinimid gyűrű képződéssel jár, illetve annak hidrolízissel történő tovább alakulásával. Éppen ezért fontos az új, javított kémiai stabilitással rendelkező szekvenciák utáni kutatás –

amelyek kiküszöbölhetik a stabilitásból eredő hiányosságokat, és még kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező radiofarmakonok előállítását tehetik lehetővé -, az angiogenezis kimutatása céljából.

Munkánk során négy új, ^{68}Ga -mal jelölt radiofarmakon előállítását, valamint hatékonyságának tesztelését végeztük kísérletes tumormodell APN és VEGFR-1 expressziójának kimutatására. Kiemelt figyelmet fordítottunk arra, hogy az angiogenezis megjelenítésére ne csak az előzetes munkáinkban használt APN molekuláris célpontot vegyük figyelembe, hanem egy másik receptort is, ezzel elősegítve a minél hatékonyabb radiofarmakon fejlesztést, a komplexebb biológiai tesztelés és képalkotás által. Továbbá, látva a ligandum fejlesztésben sikeresnek mutató multimerizációs koncepció sikerességét, egy olyan heterodimer peptid-származékot is előállítottunk, amely egyszerre célozza meg az APN és a VEGFR-1 receptorokat - egy vegyületen belül. Ennek az analógnak az egyik alegysége az NGR peptid-motívumot hordozza magában az APN/CD13 kimutatása céljából, míg a másik alegysége - az APRPG -, a VEGFR-1 receptor megjelenítésére tervezett specifikus rész. Egy további vegyülettel – az YEVGHRC peptid-származékkal - az APN receptort céloztuk. A harmadik és a negyedik vegyület az APRPG-COOH és APRPG-NH₂ voltak, amelyek a VEGFR-1 receptor kimutatására alkalmas peptid-származékok.

A heterodimer NGR-APRG-t és az YEVGHRC peptideket a Bankpeptide Biological Tech Co., LTD (Hefei, Kína) állította elő számunkra, az általunk megadott szerkezeti képletek alapján. Az NGR-APRPG heterodimer peptid-származékot *p*-SCN-Bn-NOTA kelátorral reagáltattuk, amely eredményeként a NOTA-NGR-APRPG-t kaptunk. Az YEVGHRC peptid-származéknál a ciszteintiol csoportján történt meg a kelátorral való konjugálási lépés, amely a NODAGA-YEVGHRC ligandumot eredményezte.

A két APRPG peptid-származékot az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport tagjai, Prof. Dr. Mező Gábor Úr vezetésével állították elő. Az APRG-NH₂ és az APRPG-COOH peptideket SPPS módszerrel Fmoc stratégiával építették fel, előbbit Rink-Amid-MBHA gyantán, míg utóbbit 2-ClTrt gyantán – az oldallánc egyetlen aminosava a Fmoc-Arg-(pbf)-OH részén volt védve –, a Fmoc védőcsoportot 2% DBU és 2% piperidin DMF-es keverékével távolították el. Az aminosavak kapcsolására DIC/HOBt kapcsolószert alkalmaztak. A már védőcsoport nélküli, nyers peptideket a gyantákról 95% TFA, 2,5% víz és 2,5% TIS elegyével hasították le. A lineáris APRPG-COOH és APRPG-NH₂ peptideket - már az intézetünkben –, *p*-SCN-Bn-NODAGA kelátorral konjugáltuk az alanin-alegységen lévő szabad aminocsoporton keresztül, így megkapva a NODAGA-APRPG-COOH és a NODAGA-APRPG-NH₂ ligandumokat. Az előállított vegyületeket (NOTA-NGR-

APRPG, NODAGA-YEVGHRC, NODAGA-APRPG-COOH, NODAGA-APRPG-NH₂) sikeresen jelöltük ⁶⁸Ga-mal, a legtöbb esetben 95%-ot meghaladó radiokémiai tisztasággal, kivétel a ⁶⁸Ga-NODAGA-APRPG-NH₂ vegyületnél, ahol a radiokémiai tisztaság a 90%-ot érte el. A vegyületek specifikus aktivitása 14,68 – 19,47 GBq/μmol között mozgott.

Az előállított négy új peptid-származék megoszlási hányados értékeit meghatároztuk, az eredmények alapján megállapítható, hogy eltérő mértékben ugyan, de a vegyületeink erős hidrofil tulajdonságokkal rendelkeznek. A vizsgálatok során a következő logP értékeket kaptuk: ⁶⁸Ga-NOTA-NGR-APRPG: -3,981; a ⁶⁸Ga-NODAGA-APRPG-NH₂: -3,024; a ⁶⁸Ga-NODAGA-APRPG-COOH: -2,370 és a ⁶⁸Ga-NODAGA-YEVGHRC: -4,421. A radioligandumok stabilitását patkány- és eger szérumban 2 órás inkubálás mellett, 37 °C-on vizsgáltuk. A mérés vége után a kiindulási vegyületek több mint 80%-a intakt maradt. Ezek alapján a ⁶⁸Ga-NOTA-NGR-APRPG, a ⁶⁸Ga-NODAGA-APRPG-NH₂, a ⁶⁸Ga-NODAGA-APRPG-COOH és a ⁶⁸Ga-NODAGA-YEVGHRC alkalmas vegyületeknek bizonyultak a biológiai vizsgálataink elvégzésére.

A ligandumok biológiai tesztelésekor - a kontroll állatokon végzett *in vivo* és *ex vivo* szervezeten belüli eloszlás vizsgálatok során –, megállapítottuk, hogy a vesék nagy halmozást mutattak a ⁶⁸Ga-

NOTA-NGR-APRPG, a ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-NH₂, a ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-COOH és a ^{68}Ga -NODAGA-YEVBHRC radioligandumok beadását követően. Mivel az analógok logP értékei között jelentős különbség mutatkozott, így eltérő viselkedést vártunk a vegyületek szervezetből való kiürülésével kapcsolatban is. A ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-COOH partíciós koefficiense (logP: -2,37), kevésbé hidrofil jellegre utal, amelyet az *ex vivo* szervezeten belüli eloszlás vizsgálatok alá is támasztottak, mivel a radioligandum injektálását követően szignifikánsan ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) magasabb ID%/g értéket kaptunk a vérben, a lépben, a gyomorban, a tüdőben, a szívben és a zsírban, mint a ^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG, a ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-NH₂ és a ^{68}Ga -NODAGA-YEVBHRC vegyületeknél. Ennek következtében a ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-COOH radioligandum esetében az egyes szervek és szövetek megnövekedett aktivitása alacsonyabb minőségű leképzést tett lehetővé a magasabb háttér miatt. A partíciós koefficiens értékekkel magyarázható az is, hogy a ^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG és a ^{68}Ga -NODAGA-YEVBHRC ID%/g értékei a vese esetében szignifikánsan magasabbak lettek (^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG-nél az ID%/g értéke 3,048, míg a ^{68}Ga -NODAGA-YEVBHRC-é 5,785) a többi szerv és szövethez képest (30. E ábra).

A további biológiai vizsgálatokban a ^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG, a ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-NH₂, a ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-COOH

és a ^{68}Ga -NODAGA-YEVBHRC vegyületek képalkotási tulajdonságait (SUV_{átlag}, ID%/g) hasonlítottuk össze B16F10 sejtekből szubkután indukált egér tumormodellel, amelyen a vegyületek APN/CD13 és VEGFR-1 kötődését teszteltük. Korábbi tanulmányokból már ismert, hogy a B16-F10 tumorsejtek APN/CD13 és VEGFR-1 pozitivitást mutatnak, amelyet molekuláris biológiai módszerekkel és PET képalkotással bizonyítottak. Az *in vivo* PET képalkotás során az újonnan előállított négy új ^{68}Ga -mal jelölt vegyülettel látható vált a szubkután létrehozott B16-F10 tumor a C57BL/6 egereken mindegyik esetben, tehát ezen vegyületek alkalmasak voltak a daganattal társul új érképződés kimutatására, azonban jelentős különbséggel. Ugyanis, a vizsgált radioligandumok közül a ^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG heterodimer vegyület rendelkezett a legjobb képalkotási tulajdonságokkal az általunk mért *in vivo* és *ex vivo* mérések alapján. A heterodimer vegyület szignifikánsan magas SUV_{átlag} értéket ($0,193 \pm 0,05$) mutatott a vizsgált körülmények között a többi három vegyülettel szemben, ahogy azt a multimerizációs koncepció alapján korábban feltételeztük. Ez a kiemelkedő eredmény vélhetőleg annak köszönhető, hogy a vegyület egyidőben két alegységével, két különböző molekuláris célponthoz is képes kötődni, ezáltal hatékonyabb eszköz lehet az angiogenezis kimutatására. Ezen eredménynek köszönhetően elmondható, hogy a multimerizációs eljárás felhasználásával sikeresen előidézttük a PET

képalkotás minőségi javulását. A többi vegyület esetében a következő felvételi értékeket kaptuk a B16-F10 tumorokban, amely értékek szignifikánsan alacsonyabbnak ($p \leq 0,01$) adódtak a heterodimer vegyülethez képest: $^{68}\text{Ga-NODAGA-YEVGHRC}$ (SUVátlag: $0,03 \pm 0,01$); $^{68}\text{Ga-NODAGA-APRPG-NH}_2$ (SUVátlag: $0,04 \pm 0,003$); a $^{68}\text{Ga-NODAGA-APRPG-COOH}$ a SUVátlag értéke $0,097 \pm 0,01$ volt. Bár korábbi vizsgálatok azt mutatták ki, hogy a YEVGHRC peptid-funkcionalizált liposzómák hatékonyan célozták meg az APN/CD13-pozitív tumorokat. Vizsgálatunkban a radioaktívan jelölt YEVGHRC-t tartalmazó vegyület nem mutatott megfelelő célzási hatékonyságot. Az *in vivo* és az *ex vivo* eredmények jól korreláltak egymással, $^{68}\text{Ga-NOTA-NGR-APRPG}$ és a $^{68}\text{Ga-NODAGA-APRPG-COOH}$ vegyületeknél találtunk jelentős ID%/g felvételi értékeket, míg az előzőnél ID%/g: $1,33 \pm 0,31$, utóbbinál ID%/g: $1,35 \pm 0,12$. A két másik radioligandum esetében számottevően alacsonyabb felvételt tapasztaltunk méréseink eredményeként: $^{68}\text{Ga-NODAGA-YEVGHRC}$ (ID%/g: $0,13 \pm 0,06$), $^{68}\text{Ga-NODAGA-APRPG-NH}_2$ (ID%/g: $0,23 \pm 0,05$).

Jelen munkában, a tudomásunk szerint mások által még nem használt, négy új PET radioligandum hatékonyságát vizsgáltuk angiogenezis kimutatása céljából. Annak ellenére, hogy a NGR-APRPG, APRPG-COOH és APRPG-NH₂ és az YEVGHRC még nem optimalizált vektorok, mégis az állatmodellen kialakított B16-F10

tumoron a radioligandumok kisebb-nagyobb halmozását találtuk, sőt a heterodimer (^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG) vegyület kimagasló specifikus kötődését figyeltük meg. Úgy gondoljuk, hogy ezek a vegyületek ígéretes jelöltek lehetnek a további fejlesztés szempontjából, amely során optimalizálnánk a származékok farmakokinetikai tulajdonságait.

4. Az értekezés új tudományos eredményei

- Sikeresen előállítottunk két, különböző kelátorral konjugált prokainamid-származékot, amelyeket hatékonyan radiojelöltünk ^{68}Ga -mal, majd biológiai rendszerekben karakterizáltuk (^{68}Ga -NODAGA-PCA és ^{68}Ga -HBEDD-CC PCA).
- *In vitro* körülmények között megállapítottuk, hogy a származékok sejtekbe jutási sebessége és azokból történő kiürülésük eltérő, amely különbséget a két különböző kelátor alkalmazása eredményezhet.
- Kontroll és tumoros állatmodelleken igazoltuk a radioligandumok melanin-specifitását *in vivo* és *ex vivo*.
- Bebizonyítottuk, hogy a radioligandumok alkalmasak lehetnek melanin pozitív melanoma PET képalkotására.
- Előállítottunk négy, eltérő szekvenciájú, makrociklusos kelátort tartalmazó peptid-származékot angiogenesis kimutatására, amelyeket hatékonyan radiojelöltünk ^{68}Ga -mal.
- Kontroll és tumoros állatmodelleken igazoltuk a radiojelölt peptid-származékok receptor-specifitását *in vivo* és *ex vivo*. A vegyületek molekuláris célpontjai eltérőek voltak.
- Megállapítottuk, hogy a radiojelölt peptid-származékok alkalmasak lehetnek angiogenesis kimutatására PET

képkötés során, illetve alkalmas vezérmolekulák lehetnek a további ligandum-fejlesztéshez.

5. Összefoglalás

A ^{68}Ga egy generátor-izotóp, amely könnyű, gyors és egyszerű elérhetőséget biztosít PET-radiofarmakonok fejlesztéséhez. Munkánk során specifikus kölcsönhatások alapján dúsuló kis molekulatömegű vegyületek és peptid-származékok előállításával, karakterizálásával, valamint preklinikai körülmények közötti tesztelésével foglalkoztunk. Reményeink szerint eredményeink hozzájárulnak a melanoma malignum és tumornövekedéshez kötött angiogenesis minél hatékonyabb kimutatásához.

Első projektünkben két új (^{68}Ga -NODAGA-PCA és ^{68}Ga -HBED-CC-PCA), a melanoma malignum kimutatására alkalmas vegyületet állítottunk elő, majd a sikeres radiojelölésüket követően széles spektrumú preklinikai biológiai vizsgálatoknak vetettük alá a radioligandumokat *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* körülmények között. Ezek alapján egyértelműen megállapíthatóvá vált, hogy az újonnan előállított radiojelölt vegyületek a melanoma malignumban található melaninhoz specifikusan kötődnek mind sejt- és állatmodell esetén, feleslegük a vizeletkiválasztó rendszeren keresztül ürül ki a szervezetből, továbbá nem kötődnek melanint nem termelő melanoma sejtvonalakhoz és tumorokhoz. Bebizonyosodott, hogy az alkalmazott kelátképzők tulajdonságai befolyásolják a radioligandum felvételét a melanint tartalmazó sejtvonalakban és tumorokban, amely folyamatot feltehetően a transzport sebeségében okozott változás eredményezett.

További projektünkben pedig az angiogenezis során fokozottan jelenlévő receptorokat céloztuk különböző, ^{68}Ga -mal jelölt vegyületekkel. Az Aminopeptidáz N kimutatására a ^{68}Ga -NODAGA-YEVGHRC-t; a VEGFR-1-re a ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-COOH és ^{68}Ga -NODAGA-APRPG-NH₂ vegyületeket alkalmaztuk, míg a ^{68}Ga -NOTA-NGR-APRPG heterodimert a képalkotás paramétereinek további javulása érdekében használtuk a két receptort egyidejűleg kifejező sejtvonalon. Sikeresen előállítottuk, radiojelöltük és karakterizáltuk az előbb felsorolt vegyületeket, kontroll és B16F10 tumoros állatmodellen, valamint vizsgáltuk a PET képalkotási tulajdonságaikat. Mindegyik származékot alkalmasnak ítéltük meg a tumorok megjelenítésére, azonban a heterodimer vegyület képalkotási tulajdonságai – az általunk előzetesen vártak megfelelően –, kimagasló volt.

Mindkét munkaszakaszban sikeres, és a preklinikai PET képalkotás során hatékonynak bizonyuló radioligandumokat állítottunk elő. Ezen vegyületek további felhasználásának lehetősége ígéretes jövő előtt áll, azonban a bennük rejlő potenciált a származékok további optimalizálásával és a farmakokinetikai tulajdonságaik fejlesztésével lehet leginkább realizálni.

6. Közlemények listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/353/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dénes Noémi

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10057296

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dénes, N.**, Kis, A., Péli-Szabó, J., Józsa, I., Hajdu, I., Arató, V. Z., Enyedi, K. N., Mező, G., Hunyadi, J., Trencsényi, G., Kertész, I.: In vivo preclinical assessment of novel 68Ga-labelled peptides for imaging of tumor associated angiogenesis using positron emission tomography imaging.
Appl. Radiat. Isot. 174, 1-10, 2021.
IF: 1.27 (2019)
2. Trencsényi, G., **Dénes, N.**, Nagy, G., Kis, A., Vida, A., Farkas, F., Péli-Szabó, J., Kovács, T., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hunyadi, J., Kertész, I.: Comparative preclinical evaluation of 68Ga-NODAGA and 68Ga-HBED-CC conjugated procainamide in melanoma imaging.
J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 139, 54-64, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.049>
IF: 2.831
3. Kertész, I., Vida, A., Nagy, G., Emri, M., Farkas, A., Kis, A., Angyal, J., **Dénes, N.**, Péli-Szabó, J., Kovács, T., Bai, P., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Experimental Melanoma Tumors Using The Novel Radiotracer 68Ga-NODAGA-Procaïnamide (PCA).
J. Cancer. 8 (5), 774-785, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.17550>
IF: 3.249

További közlemények

4. Kis, A., **Dénes, N.**, Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Beke, L., Matolay, O., Enyedi, K. N., **Méhes, G.**, Mező, G., Bai, P., Kertész, I., Trencsényi, G.: In Vivo Molecular Imaging of the Efficacy of Aminopeptidase N (APN/CD13) Receptor Inhibitor Treatment on Experimental Tumors Using 68Ga-NODAGA-c(NGR) Peptide.
BioMed Res. Inter. 2021, 1-11, 2021.
IF: 2.276 (2019)





5. Kis, A., **Dénes, N.**, Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Jószai, I., Enyedi, K. N., Rácz, S., Garai, I., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo assessment of aminopeptidase N (APN/CD13) specificity of different 68 Ga-labelled NGR derivatives using PET/MRI imaging.
Int. J. Pharm. 589, 1-11, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119881>
IF: 4.845 (2019)
6. Kis, A., Péli-Szabó, J., **Dénes, N.**, Vágner, A., Nagy, G., Garai, I., Fekete, A., Szikra, D. P., Hajdu, I., Matolay, O., Méhes, G., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo Imaging of Hypoxia and Neoangiogenesis in Experimental Syngeneic Hepatocellular Carcinoma Tumor Model Using Positron Emission Tomography.
Biomed Res. Int. 2020, 1-10, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/4952372>
IF: 2.276 (2019)
7. Nagy, G., **Dénes, N.**, Kis, A., Péli-Szabó, J., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hajdu, I., Szikra, D. P., Trencsényi, G.: Preclinical evaluation of melanocortin-1 receptor (MC1-R) specific 68 Ga- and 44 Sc-labeled DOTA-NAPamide in melanoma imaging.
Eur. J. Pharm. Sci. 106, 336-344, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.026>
IF: 3.466

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,213

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 7,35

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.06.07.

