

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Esszenciális fémion alapú innovatív diagnosztikai
ágensek: a ligandumtervezéstől a biztonságosabb
és eredményesebb *in vivo* alkalmazásokig**

Váradi Balázs

Témavezető: Prof. Dr. Tircsó Gyula egyetemi tanár

Vállalati konzulens: Dr. Szűcs Zoltán



DEBRECENI EGYETEM

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2025.

I. Bevezetés és célkitűzés

A daganatos betegségek korai felismerése és célzott kezelése napjaink orvostudományának egyik legnagyobb kihívása. A terápiás stratégiákban egyre nagyobb szerepet kapnak a személyre szabott, célzott megközelítések. Ezek közül kiemelendők a kis molekulájú gyógyszerek, az antitest gyógyszer konjugátumok (ADC-k), a sejt- és génterápiák. Ezen módszerek nemcsak a tumoros sejtek szelektív támadását teszik lehetővé, hanem a mellékhatások mérséklését és a betegek életminőségének javítását is.

A korszerű célzott terápiák elengedhetetlen feltétele a pontos és korai diagnózis, amelyben fontos szerepet játszik a molekuláris képalkotás. Az ilyen eljárások az élő szövetekben zajló biológiai folyamatok nem invazív, *in vivo* megjelenítését teszi lehetővé specifikus diagnosztikai molekulák segítségével. A felhasznált jelzőmolekulák általában két fő egységből épülnek fel: egy célba juttató komponensből (pl. monoklonális antitest, antitesttöredékek, peptidok stb.), valamint egy jeladó egységből, amely radioizotópot tartalmaz.

A HER2-pozitív emlőrák az emlődaganatok körülbelül 15 - 20%-át alkotja, és a receptor túlzott expressziója általában intenzívebb klinikai lefolyással jár. A HER2-státusz megbízható, lehetőség szerint egész testre kiterjedő meghatározása alapvető jelentőségű a személyre szabott ellátásban és a célzott terápiás döntésekben.

A mangán izotópjai révén ígéretes a bimodális (PET/MRI - pozitronemissziós tomográfia / mágneses rezonancia képalkotás) képalkotásban. A ^{52}Mn pozitront bocsát ki ($t_{1/2} = 5,59$ nap), így alkalmas a hosszabb idejű PET-vizsgálatokra, különösen lassan keringő, nagy molekulatömegű vektormolekulák (pl. antitestek) alkalmazása során. A

^{55}Mn paramágneses, emiatt az MRI képalkotásban a gadolínium(III)-ion alapú kontrasztanyagok potenciálisan biztonságosabb alternatívájaként tartják számon.

A Mn(II)-alapú diagnosztikai készítmények fejlesztésének kulcsa a stabil és kinetikailag inert kelátok előállítása, amelyek képesek biztosítani a komplexek hosszú távú stabilitását *in vivo* körülmények között. A kelátor szerkezetének optimalizálása, valamint a vektormolekulákhoz való kapcsolhatósága meghatározza a jelzőmolekulák képalkotási hatékonyságát és szelektivitását.

A doktori dolgozatom célja a Mn(II)-ion komplexálására alkalmas kelátorok szerkezetének fejlesztése és finomhangolása volt, melyeket a korszerű molekuláris *in vivo* képalkotási alkalmazások számára szántunk. A kutatás során az alábbi célokat tűztük ki:

Kelátorplatform fejlesztése: olyan kelátorplatform kialakítása, amely Mn(II)-komplexe egyszerre felel meg a PET- és MRI-diagnosztikához szükséges követelményeknek.

Bifunkciós ligandumok (BFL) előállítása és vizsgálata: az ígéretesnek számító kelátorplatform beépítése bifunkciós ligandumok (BFL-ok) szerkezetébe, amelyek különböző donoratomokat tartalmazó oldalláncok segítségével lehetővé teszik a relaxivitás, a termodinamikai stabilitás, az inertség és a ^{52}Mn -izotóppal való jelölhetőség szisztematikus vizsgálatát.

BFL-ok biovektor molekulákkal való konjugációja, [^{52}Mn]/Mn(II) izotóppal való jelölése és konjugátum tesztelése *in vivo*: a legígéretesebb ligandum biovektor molekulához (HER2+ mellrák specifikus antitest vagy affitest) történő kapcsolása, a konjugátum tisztítása és jellemzése, valamint biológiai viselkedésének, képalkotási hatékonyságának és stabilitásának értékelése *in vivo* modellrendszerekben.

Új ligandumcsalád kifejlesztése az ígéretes kelátor szerkezetének finomhangolásán keresztül: annak vizsgálata, hogy a kelátor szerkezetének merevítése, valamint kriptandszerű, keresztkötött ligandumok kialakítása javítja-e a Mn(II)-komplexek stabilitását és kinetikai inertségét. E ligandumok bifunkciós változatainak előállítása és fizikokémiai tulajdonságaik összehasonlító elemzése a diagnosztikai teljesítményt befolyásoló szerkezeti tényezők feltárása érdekében.

II. Alkalmazott vizsgálati módszerek

Szintézis: A kiindulási reagenseket és oldószereket a Sigma-Aldrich, Tokyo Chemical Industry és a Fluorochem cégektől szereztük be és további tisztítás nélkül használtuk fel. A makrociklusos ligandumokat és Mn(II)-komplexeiket standard szintetikus eljárásokkal állítottuk elő, szükség esetén mikrohullámú aktiválással (MW) (CEM Discover). A reakciók követésére és a tisztítási módszerek kidolgozására analitikai HPLC-t alkalmaztunk (Waters Alliance 2690/2695 rendszer Waters 996 PDA diódasoros detektorral); fordított fázisú kolonnákkal: Phenomenex Luna C18(2), YMC-Pack ODS-AQ, Waters XBridge Shield RP18. Esetenként a köztes tisztításokat flash NP-LC-vel (CombiFlash® EZ Prep), illetve a köztes és végtermékek tisztítását preparatív RP-HPLC-vel (YL91100; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) preparatív) végeztük. Az előállított anyagok azonosságának, valamint tisztaságuk jellemzését $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR-rel (Bruker Avance DRX 360 MHz; Bruker Avance I 400 MHz; Bruker Avance II 500 MHz) és HRMS (ESI-QTOF)-fal (Bruker maXis II UHR, Agilent 7100 kapilláris elektroforézis csatolással) igazoltuk. Fehérje- és konjugátumminták

vizsgálatához XBridge Peptide BEH C18 OBD analitikai, tisztításukhoz XBridge Peptide BEH C18 OBD preparatív kolonnákat használtunk.

Egyensúlyi mérések és relaxometria: A ligandumok protonálódási és komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg (Metrohm 785 DMP Titrino). A lassú képződéssel rendelkező rendszereknél (pl. **3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}**) különmintás ¹H-relaxometriát alkalmaztunk a Mn(II)-komplex stabilitásának a meghatározására. Az adatok illesztését PSEQUAD programmal végeztük. A relaxivitás méréseket Bruker minispec mq20 (0,47 T) és mq60 (1,41 T) relaxométerek segítségével rögzítettük 25,0 és 37,0 °C-on; r_{1p} és r_{2p} értékeket a Mn(II) bemért koncentrációja és a mért relaxációs sebességek lineáris kapcsolatából számítottuk. Esetenként relaxometriás titrálást is végeztünk (a minták relaxáció sebességének (R_1, R_2) a pH-függését vizsgálva), melyek során a mért adatokból kivontuk a víz adott körülményekre vonatkozó diamágneses hozzájárulását, és a hígulást figyelembe véve a Mn(II)-ion koncentrációjával normáltuk (r_{1p}, r_{2p}).

Kinetikai vizsgálatok: A **PC2A**-származék komplexek inertségét a szakirodalomban elfogadott, P. Caravan és mtsai. által javasolt körülményeket alkalmazva követtük, ahol a Zn(II)-ion indukált fémioncserét a T_2 -relaxációs idők időbeli változásával követtük (1 mM Mn(II)-komplex; 25 ekv. Zn(II)-ion; 37,0 °C; 1,41 T; pH = 6,0; 50 mM MES). A keresztkötött származékok esetén savasszisztált disszociációt vizsgáltuk a 0,1 - 1,0 M HCl tartományban, 300 µL mintatérfogat, 1 mM komplex és $I = 1,0$ M (HCl+NaCl) mellett; a reakciókat 25,0 °C-on, 1,41 T térerőn, a T_2 -idők követésével monitoroztuk.

A [⁵²Mn]Mn radioizotóp előállítás és tisztítása: A radiokémiai vizsgálatokhoz a ⁵²Mn-izotópot ciklotronban állítottunk elő természetes króm céltárgy protonnyalábbal (14 - 18 MeV-os) történő besugárzásával

($^{52}\text{Cr}(\text{p},\text{n})^{52}\text{Mn}$). A keletkező mangánt anioncserés elválasztással tisztítottuk (AG 1-X8), majd szükség szerint DGA-alapú lépéssel mentesítettük a jelölést zavaró átmenetifém-szennyezőktől (Fe/Zn/Cu). Az eljárások nagy tisztaságú [^{52}Mn]MnCl₂ oldatot eredményeztek.

Ligandumok [^{52}Mn]Mn radioizotóppal való jelölésének optimalizálása és a radioaktívan jelölt komplexek transzkelációja *transz*-CDTA kicserélő ligandummal: A három bifunkciós PC2A-alapú kelátor (**3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**, **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}**, **3,9-PC2AMP^{pBn^{pCO₂H}}**) jelölésoptimalizálása során szisztematikusan változtattuk a pH-t (4 - 8 pH-tartományban), a hőmérsékletet (25 - 95 °C) és a ligandumkoncentrációt (0,3 μM - 1 mM). A reakciókat analitikai RP-HPLC-vel (PDA + Gabi Star RA; kolonna: YMC-Pack ODS-AQ) és iTLC-SG-vel értékeltük ki. A transzkelációs reakciókat a *transz*-CDTA nagy feleslegével váltottuk ki, miközben több időpontban vettünk mintákat, melyeket radio-HPLC-vel értékeltünk ki. A kriptát típusú ligandumok (**3,9-CB⁸⁰²PC** és **3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}**) jelölhetőségét a lassú komplexképződés miatt nagy hőmérsékleten (25 és 90 °C) és pH-n (6 - 8 pH-tartományban), valamint nagyobb ligandumkoncentráció (1 - 5 mM) alkalmazásával végeztük.

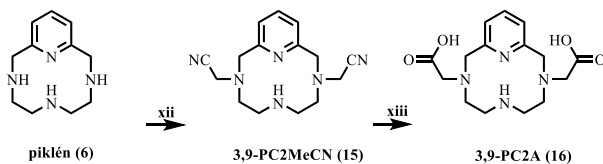
PET/MRI képalkotás: Az *in vivo* képalkotást nőstény CB17 SCID (egerekben végeztük két emlőrák-moddelllel (4T1 tripla negatív egér emlőrák, illetve HER2-pozitív MDA-MB emberi emlőrák), két beültetési hellyel (váll területére és lágyéktáji emlőzsírpárna). A radiofarmakont intravénásan alkalmaztuk. Mindkét csoporton az injektálást követően 4 óra, 1 és 3 nap (HER2- esetén 2 nap is) elteltével felvételeket készítettünk preklinikai nanoScan PET/MRI 1T (Mediso Kft.) készülékkel. Az altatás belégzéses izofluránnal történt, az MRI-n T₁-súlyozott gradiens-echo sorozat szolgált anatómiai referenciaként. A PET-adatokat MLEM rekonstrukciót követően ROI/VOI (vizsgálat

tárgyát képező terület / térfogat) alapú mennyiségi meghatározással elemeztük. A felvételeket standardizált felvételi értékben (SUV) fejeztük ki. Az állatkísérleteket jóváhagyott protokoll szerint, az EU és a hazai állatjólléti előírásoknak (engedélyszám: 16/2020/DEMÁB) megfelelően végeztük.

III. Új tudományos eredmények

III.1. Szintetikus eljárásokat dolgoztunk ki piklén alapú izomer ligandumok (3,6- és 3,9-diszubsztituált) előállítására.

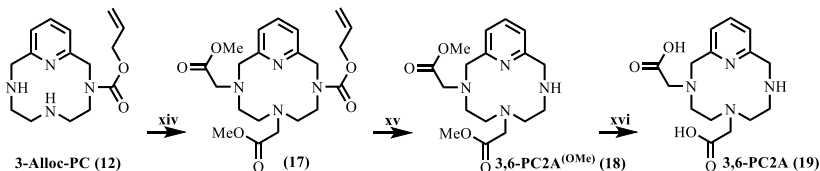
Előállítottuk a két piklén-diacetát izomer ligandumot (**3,6-** és **3,9-PC2A**). Első lépésben a **piklén (6)** makrociklust szintetizáltuk, melynek piridinnel szembeni *transz*-helyzetű nitrogénjének (N6) (protonálásával) szelektív védését vizes közegben pH = 8,55 körüli értéken valósítottuk meg (**1. ábra**). Majd sztöchiometrikus mennyiségű formaldehid-nátrium-bisulfít addíciós vegyület hozzáadásával közel kvantitatívan a 3,9-diszubsztituált terméket kaptuk (a 3,6-izomer termék 7%-ban keletkezett), amelyet NaCN-os szubsztitúcióval nitrilekké (**15**), végül sósavas hidrolízis segítségével a megfelelő diacetátokká alakítottuk (**16**). Az izomer kelátorokat preparatív HPLC-s technikával tisztítottuk.



1. ábra A 3,9-PC2A (16) előállítása:

(xii) $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$, H_2O , pH = 8,55, 60 °C $\rightarrow$ NaCN, RT, 3 h, (xiii) cc. HCl, 100 °C, 3 h.

A **3,6-PC2A (16)** előállításához kidolgozott eljárásunkban a szintetizált **3-Alloc-PC-t (12)** metil-brómacetáttal dialkileztük (K_2CO_3), az Alloc-védőcsoportot $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ /fenilszilánnal hasítottuk le, majd a keletkezett észtert (**18**) savval hidrolizáltuk (**2. ábra**).



2. ábra A 3,6-PC2A (19) előállítása:

(xiv) metil-brómacetát, K_2CO_3 , ACN, 20 h (78%); (xv) $Pd(PPh_3)_4$, fenil-szilán, N_2 -atm., CH_2Cl_2 , 0 °C $\rightarrow$ RT, 15 min (64%); (xvi) 3 M HCl, 100 °C, 23 h (75%).

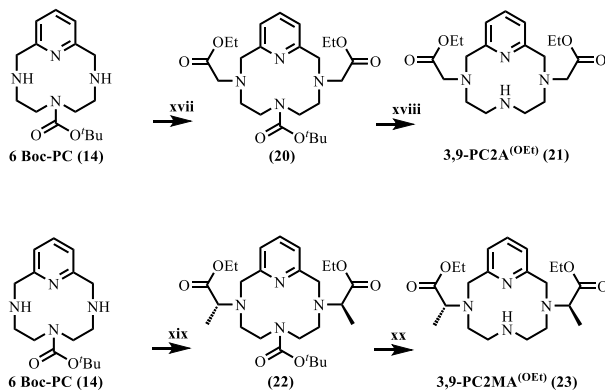
III.2. Megállapítottuk, hogy a 3,6- és 3,9-PC2A Mn(II)-komplexei lényegesen eltérő termodinamikai és disszociációs, de hasonló oldószercsere-kinetikai, és relaxációs tulajdonságokkal rendelkeznek.

Vizsgáltuk az előállított ligandumok Mn(II)-komplexei legfőbb fizikokémiai paramétereit. Eredményeink alapján a $[Mn(3,9-PC2A)]$ -komplex jobb termodinamikai stabilitással ($\log K_{MnL} = 17,09(2)$, és $15,53(1)$ a 3,9- és a 3,6-PC2A-komplexei esetére) és kissé jobb relaxációs tulajdonságokkal rendelkezik (r_{1p} rendre $2,72$ és $2,91 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 3,6- és 3,9-PC2A-komplexe esetére, 25 °C-on, 0,49 T térerőn). Ezen relaxitás értékek alapján mindkét Mn(II)-komplexben található a fémionhoz koordinálódó (belsősférás) vízmolekula. A $[Mn(3,6-PC2A)]$ -komplex jobb kinetikai inertséggel rendelkezik ($k_{obs} = 3,28(3) \times 10^{-4}$ és $5,43(4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ rendre a 3,6-PC2A és 3,9-PC2A komplexek esetére) Zn(II)-ionnal lezajló fémioncsere-reakciók vizsgálata alapján. Az elvégzett vizsgálatok eredményei alapján tehát megállapítottuk, hogy mindkét ligandum megfelelő alapvegyület inert Mn(II)-komplexei szintéziséhez, továbbá biztonságosan alkalmazható intelligens vagy bifunkciós kontrasztanyagok tervezése során. A kapott eredmények alapján végül a 3,9-PC2A ligandum platformot választottuk a bifunkciós ligandumok alapjául, mivel a Mn(II)-komplexei kinetikai

paraméterei a piridinnel szembeni (N9-es) nitrogénatomhoz kapcsolt elektronszívó csoportok segítségével jelentősen javíthatók.

III.3. Négy bifunkciós PC2A-származékot állítottunk elő (3,9-PC2ABn^{pNO₂}, 3,9-PC2ABn^{pCO₂H}, 3,9-PC2MABn^{pCO₂H}, 3,9-PC2AMPipBn^{pCO₂H}), amelyek segítségével információt gyűjtöttünk az oldalláncokban lévő donoratomok kémiai minőségének hatásáról a képződő Mn(II)-komplexek fizikokémiai paramétereire. Emellett vizsgáltuk a konjugációra alkalmas csoportok (Bn^{pCO₂H}, Bn^{pNO₂}) hatását is ezen paraméterekre.

6-Boc-piklénből (14) etil-brómacetáttal és etil-(S)-2-(trifluormetilszulfoniloxi)propionáttal előállítottuk a **PC2A^(OEt)** (21) és a **PC2MA^(OEt)** (23) származékokat (3. ábra). Ezt követően trifluorecetsav / diklórmetán elegyével eltávolítottuk a Boc-védőcsoportot.



3. ábra A 3,9-PC2A^(OEt) (21) és a 3,9-PC2MA^(OEt) (23) előállítása:

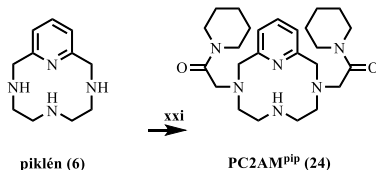
(xvii) etil-brómacetát, CH₃COONa.3H₂O, ACN, 65 °C, 48 h, (88%);

(xviii) TFA : DKM (7 : 15), 0 °C → RT, 24 h (93%);

(xix) etil-(S)-2-(trifluormetilszulfoniloxi)propionát, K₂CO₃, DKM, 0 °C, 72 h (79%);

(xx) TFA : DkM (7 : 15), 0 °C → RT, 24 h (96%).

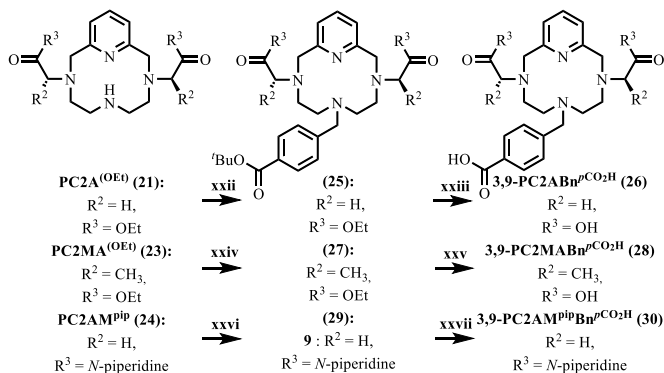
A **PC2AM^{pip}** (**24**) ligandumot a **piklén** (**6**) közvetlen alkilezésével állítottuk elő, acetonitrilben nátrium-acetát-trihidrát bázis jelenlétében (**4. ábra**).



4. ábra A 3,9-PC2AM^{pip} (**24**) előállítása:

(xxi) 2-brom-1-(piperidin-1-il)etán-1-on, CH₃COONa·3H₂O, ACN, 60 °C, 48 h (40%).

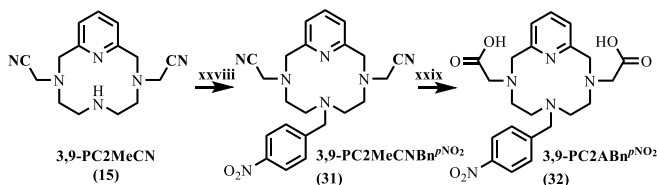
A 6-os helyzetű szekunder-aminokat *tert*-butil-4-(brómmetil)-benzoáttal alkileztük (DIPEA, K₂CO₃ vagy NaI), majd az észtervédőcsoportok eltávolításával létrehoztuk a Bn^{pCO₂H} végcsoporttal rendelkező BFL-at (**5. ábra**).



5. ábra A 3,9-PC2ABn^{pCO₂H} (**26**), a 3,9-PC2MABn^{pCO₂H} (**28**) és a 3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H} (**30**) előállítása:

(xxii) *tert*-butil-4-(brómmetil)benzoát, NaI, DIPEA, ACN, 80 °C, 72 h (93%); (xxiii) NaOH, EtOH, 60 °C, 3 h (86%); (xxiv) *tert*-butil-4-(brómmetil)benzoát, NaI, K₂CO₃, ACN, 80 °C, 72 h (52%); (xxv) NaOH, EtOH, RT → 60 °C, 3 h (87%); (xxvi) *tert*-butil-4-(brómmetil)benzoát, K₂CO₃, ACN, 60 °C, 48 h (84%); (xxvii) TFA : DKM (7 : 15), 0 °C → RT, 12 h (96%).

A **3,9-PC2ABn^{pNO₂}** ligandumhoz az **3,9-PC2MeCN (15)** vegyületet használtuk, melyet *p*-nitrobenzilbromiddal alkileztünk, majd a terméket (**31**) sósavval hidrolizáltuk (**6. ábra**).



6. ábra A 3,9-PC2ABn^{pNO₂} (32) előállítása:

(**xxviii**) *para*-nitro-benzilbromid, NaI, DIPEA, 60 °C, 72 h → (**xxix**) cc. HCl, 110 °C, 3 h (66%).

III.4. Megállapítottuk, hogy a képződő Mn(II)-kelátok relaxometriás és kinetikai paraméterei javulnak a kelátorok BFL szerkezetébe való beépítése során, míg a termodinamikai paraméterek változatlanok maradnak.

A ligandumok és Mn(II)-komplexeinek vizsgálataival rámutattunk, hogy az alap **3,9-PC2A** kelátor bifunkciós ligandummá alakítása javítja a Mn(II)-komplexelek disszociációs kinetikai és relaxometriás tulajdonságait, miközben a komplexek látszólagos stabilitása vagy változatlan maradt (acetát oldalláncok), vagy csak kis mértékben csökkent (alfa-metil-acetát és amidszármazékok). A nitrocsoportot tartalmazó ligandum Mn(II)-kelátja kinetikailag jobb paraméterekkel rendelkezett, azonban a klasszikus körülmények között végrehajtott redukciós reakciók melléktermékekhez vezettek, ezért a konjugációkhoz végül a benzoész-származékot használtuk.

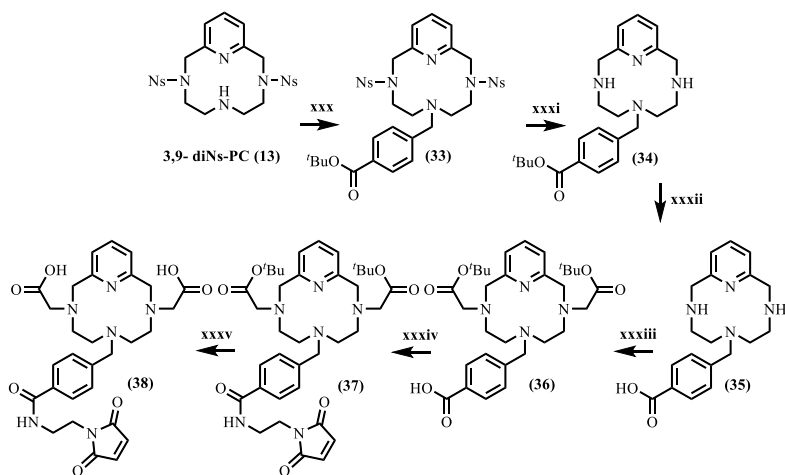
III.5. A $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ -izotóppal történő radiojelzési reakciók vizsgálatai alapján megállapítottuk, hogy a karboxilátcsoportokkal rendelkező makrociklusos BFL-k pillanatszerűen jelölhetők, míg az amid oldalánccal rendelkező ligandum esetében a jelölés az idő vagy a hőmérséklet növelésével érhető el.

A modell bifunkciós ligandumokat ciklotronban előállított és tisztított $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ -izotóppal jelöltük és tanulmányoztuk a jelölt komplexek fizikokémiai sajátosságait. Az acetát származékok 6,0-os pH felett 5 perc alatt hatékonyan jelölhetők már 1 μM ligandum koncentrációt alkalmazva, míg a **3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}** (bisz(amid)-származék) ligandum esetében a közel kvantitatív radiojelzés eléréséhez 4 - 5 óra reakcióidőre vagy melegítésre (50 °C) van szükség. Ugyanakkor ennek a ligandumnak a Mn(II)-komplexe rendelkezik a legjobb inertséggel a **transz-CDTA** kicserélő ligandummal végzett transzkelációs reakciók vizsgálata alapján. Annak ellenére, hogy kinetikailag a **3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}** bisz(amid)-származék teljesített a legjobban, a konjugációhoz a **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** Mn(II)-kötő karboxilát-származékot választottuk, mivel radiokémiai körülmények között az amid-oldalláncok hidrolízisét figyeltük meg (ami a megfelelő diacetát-származék képződését eredményezte). Így az eredményeink alapján a tervezett radiógyógyszer-jelölt előállítására a **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** ligandum tekinthető a legmegfelelőbbnek.

III.6. Szintézismódszert dolgoztunk ki a kiválasztott BFL (3,9-PC2ABn^{pCO₂H}) szelektív konjugációra alkalmas származékának (3,9-PC2ABn^{pMA}) az előállítására.

A kiválasztott **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** kelátor két koordináló acetátot és a fémionhoz nem koordináló, konjugációra szolgáló *p*-benzoesav egységet

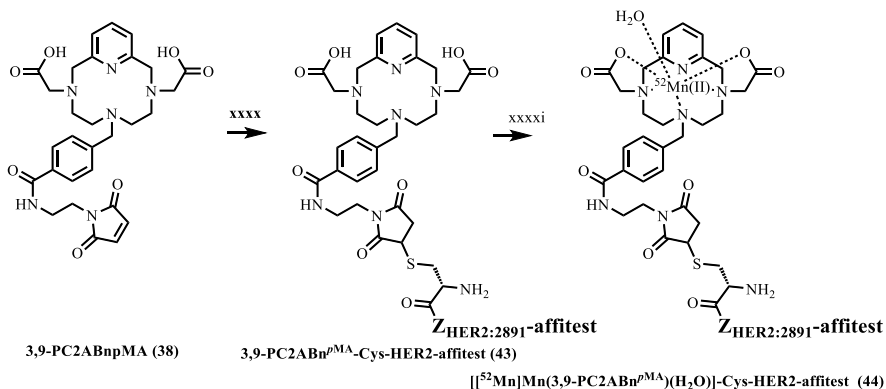
tartalmaz. Mivel a kelátor a konjugációra és a fémionmegkötésre is azonos funkciócsoportokat tartalmaz, a közvetlen biovektor-kapcsolás helyett a *p*-benzooesav egységen maleimid reaktívcsoporthoz alakítottunk ki. Ehhez az acetátcsoporthoz előzetesen védőcsoportokat helyeztünk. A szintézis kulcslépései (7. ábra): a **3,9-diNs-piklén (13)** alkilezése *tert*-butil-4-(brómmetil)-benzoáttal; a nozilátcsoporthoz tiofenollal történő eltávolítása; az acetát oldalláncok *tert*-butil-brómacetáttal történő kialakítása; majd a maleimid reaktívcsoporthoz beépítése a *p*-benzooesav karboxilcsoportjának HBTU/HOBt aktiválásával. Végül a védőcsoportok eltávolítása eredményezte a **3,9-PC2ABn^{pMA} (38)** ligandumot.



7. ábra A **3,9-PC2ABn^{pMA} (38)** előállítása:

- (xxx) *tert*-butil-4-(brómmetil)-benzoát, NaI, DIPEA, ACN, 80 °C, 48 h (93%);
 (xxxii) tiofenol, K₂CO₃, DMF, RT, 24 h (58%); (xxxiii) TFA : DKM (7 : 15), RT, 12 h (93%);
 (xxxiii) *tert*-butil-brómacetát, DIPEA, DMF, 60 °C, 48 h (42%);
 (xxxiv) *N*-(2-aminoetil)-maleimid-hidroklorid, HBTU, HOBt, DIPEA, DKM, RT, 48 h (56%);
 (xxxv) TFA : DKM (7 : 15), 0 °C → RT, 24 h (90%).

III.7. Optimalizáltuk a 3,9-PC2ABn^{pMA} (38) ligandum anti-HER2-affitesttel (43) végzett biokonjugációját, illetve elvégeztük [⁵²Mn]Mn-izotóppal történő jelzését (44).



8. ábra A 3,9-PC2ABn^{pMA} (38) bifunkciós ligandum (BFL) konjugálása anti-HER2 affitesttel és a [⁵²Mn]Mn(3,9-PC2ABn^{pMA})(H₂O)-Cys-HER2-affitest (44) előállítás.

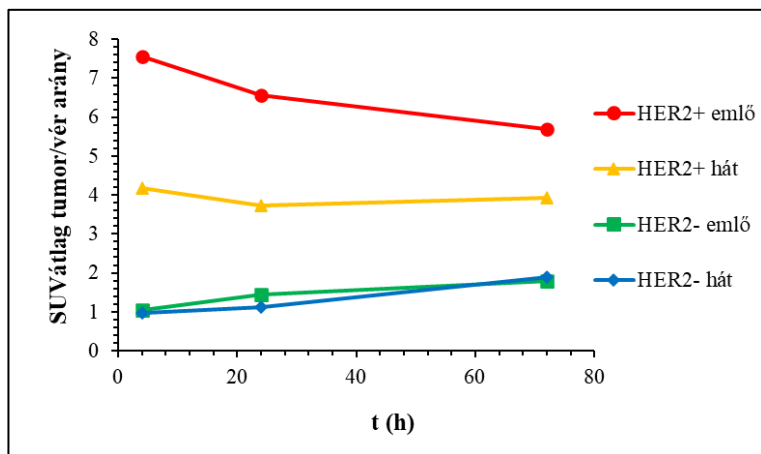
(xxxx) 2 mg redukált Z_{HER2:2891}-Cys affitest, 333 µL 1,0M-os ammónium-acetát oldat (pH = 5,5), 1 mL MQ-víz, 60 µL ACN, 37 °C, 5 d; (xxxxi): 1,68 - 3,36 MBq [⁵²Mn]MnCl₂ radioizotóp oldat, 4,35 µmol HEPES (pH = 7,02) puffer, RT, 15 min.

A Román Akadémia Biokémiai Intézetében előállított és *in vitro* tesztelt affitestet (Z_{HER2:2891}) a konjugáció előtt RP-HPLC-vel tisztítottuk. A tiol-maleimid Michael-addíció kemoszelektivitása miatt pH-optimalizálást végeztünk, mivel az irodalomban alkalmazott 6,5 - 7,5 pH-tartományban maleimid-hidrolízist / amin-addíciót figyeltünk meg (8. ábra). Ezért a reakciót pH = 5,5, 37 °C, argonatmoszféra alkalmazásával hajtottuk végre 2 mg affitesttel a 3,9-PC2ABn^{pMA} (38) feleslegével. Öt nap reakcióidőt követően >98% konverziót sikerült elérnünk. A terméket RP-HPLC-vel izoláltuk, a szerkezetét ESI-qTOF-UHRMS segítségével igazoltuk, majd liofilizáltuk.

III.8. $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}$ -izotóppal való jelöléssel előállítottuk a $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]$ -Cys-HER2-affitest (44) radiofarmakont.

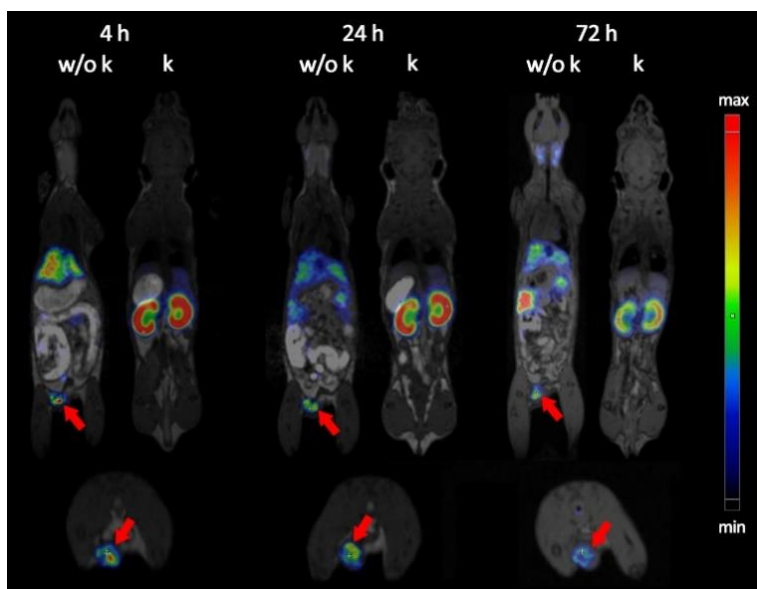
A konjugátum jelölését HEPES pufferben ($\text{pH} = 7,02$) szobahőmérsékleten, 15 perc alatt, a korábban optimalizált körülmények között végeztük (8. ábra). A jelölést követően a mintát megfelelő térfogatra hígítottuk, és tisztítás nélkül használtuk fel az *in vivo* PET/MRI kísérletekhez, mivel a radiofarmakon 100%-os radiokémiai tisztasággal sikerült előállítottuk (radio-HPLC, iTLC).

III.9. A $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]$ -Cys-HER2-affitest (44) radiofarmakon *in vivo* teszteltük, MDA-MB (HER2+) és 4T1 (HER2-) tumorokat hordozó CB17 súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egereken.



9. ábra Tumor(emlő és hát)-vér arány TAC-görbéi, amelyek többszörös időponti MDA-MB (HER2+) és 4T1 (HER2-) daganatot hordozó SCID egerek nanoPET/MRI-képalkotásából származnak a $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]$ -Cys-HER2-affitest radiofarmakon farok-vénás injekcióját követően.

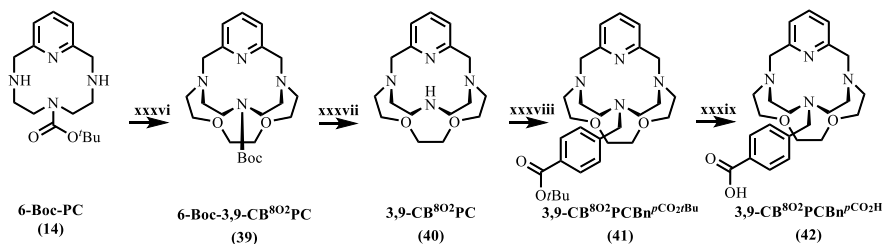
A vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy az előállított radiofarmakon az *in vivo* PET/MRI-kísérletekben figyelemre méltó akkumulációt mutat a HER2-pozitív tumorszövetben már 4 órával az injektálást követően (**10. ábra**). Ezek alapján látható, hogy a konjugátum alkalmas a HER2-pozitív mellrák PET/MRI képalkotással történő detektálására. Megfigyeltük továbbá, hogy a különböző szövetekbe (izom/váll, valamint lágyéktáji mellzsírpárna) ágyazott tumorok specifikus felvétele jelentősen eltér (**9. ábra**). Ezzel rámutattunk arra, hogy a helyi tumorkörnyezet hatással van a konjugátum tumorszövetben történő felhalmozódására. A radiofarmakon nagy mértékben dúsult a vesében, ennek csökkentésére HSA-kötő egység(ek) beépítését tervezzük a későbbiekben.



10. ábra Az MDA-MB (HER2+) daganatot hordozó SCID egér nanoPET/MRI-képalkotása. A $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})]$ -Cys-HER2-affitest radiofarmakon intravénás injektálását követő 4, 24 és 72 órával a bomláskorrigált koronális PET-felvételek (**fent**), amelyek a vese nélküli (**w/o k**) és a vesével (**k**) szeleteket, valamint transzaxiális PET-felvételeket (**lent**) mutatják. Az ortotopikus tumorok helyét **piros nyilak** jelölik.

III.10. A kriptand származékok új szintézismódszerét dolgoztuk ki a Mn(II)-kelátok inertségének javítása érdekében.

A Mn(II)-kelátok inertségének a javítása érdekében merev piklén, biszpiklén és O-piklén makrociklusokra alapozó új kriptát ligadumcsaládot állítottunk elő. A **6-Boc-piklénből (14)** 1,2-bisz(2-jód-etoxi)-etánnal intramolekuláris éterhíd-képzéssel (nátrium-acetát-trihidrát bázis templáló hatása mellett) előállítottuk a **3,9-CB⁸⁰²PC (40)** kriptát vázat, majd a Boc védőcsoportot is eltávolítottuk (**11. ábra**). A további lépések (*tert*-butil-4-(brómmetil)-benzoáttal történő alkilezés és *tert*-butil-észter védőcsoport eltávolítás) új bifunkciós kriptand típusú kelátort (**42**) eredményezett.



11. ábra A **3,9-CB⁸⁰²PC (40)** és a **3,9-CB⁸⁰²PCBnⁿCO₂H (42)** előállítása:

(**xxxvi**) 1,2-bisz(2-jód-etoxi)-etán, CH₃COONa·3H₂O, ACN, 110 °C, 48 h (44%);
 (**xxxvii**) TFA : DKM (7 : 15), 0 °C → RT, 18 h (88%); (**xxxviii**) *tert*-butil-4-(brómmetil)benzoát,
 K₂CO₃, ACN, 80 °C, 24 h (52%); (**xxxix**) TFA : DKM (7 : 15), 0 °C → RT, 24 h (79%).

III.11. Megállapítottuk, hogy az új kriptand típusú ligandumok (3,9-CB⁸⁰²PC és 3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}) Mn(II)-komplexeinek inertsége megközelíti a kereskedelmi forgalomban lévő Gd(III)-alapú kontrasztanyagok inertségét.

Vizsgáltuk a 3,9-PC2A-származékának tekinthető 3,9-CB⁸⁰²PC ligandum és a belőle származtatható 3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H} BFL kelátorok Mn(II)-komplexeinek képződési és disszociációs kinetikai viselkedését, valamint vízcseré- és relaxációs tulajdonságait, továbbá vizsgáltuk radiokémiai jelölhetőségüket is. Megállapítottuk, hogy a kriptát típusú ligandumok Mn(II)-komplexeinek képződési kinetikája kifejezetten lassú, a komplexek képződése még pH = 7,4-en is több napot vesz igénybe. Ugyanakkor ezen Mn(II)-kelátok kimagasló inertséggel rendelkeznek. Bár képződésük lassú, a [⁵²Mn]Mn-radiojelölési kísérletek igazolták, hogy megfelelő feltételek mellett sikeresen és nagy hatékonysággal jelölhetők.

A [Mn(3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H})]⁺-komplexre számított, a savasszisztált disszociációra jellemző sebességi állandó értéke ($k_1 = 1,75 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) kisebb, mint a [Gd(HP-DO3A)], egy kereskedelmi forgalomban lévő Gd(III)-alapú makrociklus alapú kontrasztanyag ($k_1 = 6,8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), valamint az eddig publikált leginertebb Mn(II)-kelát megfelelő értéke ($k_1 = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ez az állandó megközelíti a [Gd(DO3A-BT)] kontrasztanyagra jellemző sebességi állandót ($k_1 = 2,8 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Az előállított BFL ligandum Mn(II)-kelátjának a relaxivitása is összemérhető ($r_{1p} = 4,27 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pH=7,4, 37°C, 0,49 T) a kereskedelmi forgalomban elérhető Gd(III)-alapú kontrasztanyagok, például a DOTAREM ($r_{1p} = 3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), ill. a kereskedelmi forgalomból már kivont MAGNEVIST-re ($r_{1p} = 3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) jellemző értékeivel. A [Mn(3,9-CB⁸⁰²PC)]²⁺ és a [Mn(3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H})]⁺-komplexek savasszisztált disszociációjuk alapján a leginertebb Mn(II)-komplexek

jelenleg. Ezen kimagasló paraméterek alapján ezen új ligandumcsaládot szabadalmi oltalom alá helyeztük.

IV. Az eredmények hasznosíthatóságának lehetőségei

A dolgozatban bemutatott eredmények az alkalmazott koordinációs kémia és az orvosi képalkotás metszetében helyezkednek el. Eredményeink várhatóan az orvosi diagnosztikai és terápiás eljárásokban is közvetetten hasznosulhatnak.

A 3,9-PC2A-alapú bifunkciós platform a PET és az MRI követelményeinek egyaránt megfelel: az acetát oldalláncú kelátok gyors és hatékony [^{52}Mn]Mn(II)-jelölhetőséget és kedvező inertséget biztosít a transzkelációs reakciókkal szemben. A paramágneses Mn(II)-komplexek relaxometriás teljesítménye klinikailag releváns. Olyannyira, hogy a GE (General Electric) jelenleg klinikai kipróbálás második fázisában vizsgálja egy PC2A-származék kelátor Mn(II)-komplexét. A moduláris benzil-karboxilát/maleimid horgony lehetővé teszi antitestek, affitestek és peptidek szelektív kapcsolását, ezért a rendszer gyorsan átültethető más célpontokra is (pl. EGFR, PSMA), megőrizve a jelölhetőséget és a képalkotási teljesítményt.

Az előállított radiofarmakon *in vivo* PET/MRI kísérletekben már 4 órával az injektlás után mérhető, célzott akkumulációt mutatott HER2-pozitív tumorban, ami alátámasztja az előállított radiofarmakon diagnosztikai értékét. A különböző beültetési helyek (vállizom vs. lágyéktáji emlőszírpárna) között tapasztalt felvételi különbségek a tumormikrokörnyezet hatását mutatják a halmozódás mértékére, ami a

jövőbeni diagnosztikai (és akár terápiás) döntések során szintén hasznos lehet. A veseterhelés csökkentése és a biológiai felezési idő növelése érdekében HSA-kötő egységeket, töltés/hidrofobicitás finomhangolást, valamint optimalizált linker-architektúrát tervezünk alkalmazni.

Az új Mn(II)-komplexek és kriptát-ligandumok egyes paraméterek tekintetében kiváló alternatívát kínálhatnak a piacon jelenleg egyeduralgkodó Gd(III)-alapú MRI-anyagokkal szemben. Az új kriptand típusú komplexek inertsége olyannyira kimagasló, hogy az előállított ligandumcsaládra magyar szabadalmat (Szabadalmi szám: P2400001) nyújtottunk be, amelyet 2025-ben nemzetközi szabadalommal fejlesztettünk fel.

Ígéretes irány a PET és MRI érzékenységének közelítése $^{52/55}\text{Mn}$ „kóktél” alkalmazásával: a ^{52}Mn biztosítja a PET-jelet, míg a ^{55}Mn a paramágneses hozzájárulást, azonos kelátkémiával és konjugációval. Biovektorhoz kötve a konjugátum effektív mérete nő, a rotációs korrelációs ideje (τ_R) nő, ami várhatóan relaxivítás-növekedést eredményez MRI-ben. Monoklonális antitestek esetén egyetlen biomolekulán több ($\approx 6 - 7$) kelátor rögzíthető, ami további pozitív hatással bír a relaxivítás értékére (multivalens hatás), miközben HSA-kötő egységek az albuminhoz kapcsolódva növelik a konjugátum effektív méretét és csökkentik a rotációs korrelációs sebességet (azaz τ_R nő), ami tovább növeli a konjugátum relaxivitását. Ezen tényezők összessége hozzájárulhat egy gyakorlatban is alkalmazható, valódi bimodális PET/MRI konjugátum előállításához, amely ugyanazzal a biokonjugátummal képes lehet kvantitatív molekuláris (PET) és nagy felbontású anatómiai (MRI) információt szolgáltatni.



Nyilvántartási szám: DEENK/461/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Váradi Balázs

Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10063879

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

1. **Váradi, B.**, Sajtos, G. Z., Brezovcsik, K., Szűcs, Z., Szedlacsek, S. E., Nagy, G., Tircsó, G.: Mn(II)-alapú diagnosztikai szerek: az alapkutatástól a célzott diagnosztikai eljárásokig.
Sci. Sec. 5 (2), 253-266, 2024. EISSN: 2732-2688.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/112.2024.00208>

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

2. **Váradi, B.**, Brezovcsik, K., Garda, Z., Madarasi, E., Szedlacsek, H., Badea, R. A., Vasilescu, A. M., Puiu, A. G., Ionescu, A. E., Sima, L. E., Munteanu, C. V. A., Călărăș, S., Vágner, A., Szikra, D. P., Ngo, M. T., Nagy, T., Szűcs, Z., Szedlacsek, S. E., Nagy, G., Tircsó, G.: Synthesis and characterization of a novel [52Mn]Mn-labelled affibody based radiotracer for HER2+ targeting.
Inorg. Chem. Front. 10 (16), 4734-4745, 2023. ISSN: 2052-1545.
DOI: <https://doi.org/10.1039/D3QI00356F>
IF: 6.1
3. Garda, Z., Molnár, E., Hamon, N., Barriada, J. L., Esteban-Gómez, D., **Váradi, B.**, Nagy, V., Póta, K., Kálmán, F. K., Tóth, I., Lihi, N., Platas-Iglesias, C., Tóth, É., Tripier, R., Tircsó, G.: Complexation of Mn(II) by Rigid Pycen Diacetates: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Density Functional Theory, and Superoxide Dismutase Activity Studies.
Inorg. Chem. 60 (2), 1133-1148, 2021. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03276>
IF: 5.436





Szabadalmak (1)

4. **Váradi, B.**, Csupász, T., Szilágyi, B., Kapus, I., Sajtos, G. Z., Tircsó, G.: Új kriptát típusú (biciklusos) kelátorok és alkalmazásuk Mn(II)-alapú MRI kontrasztanyagok, Mn-alapú PET diagnosztikai szerek, valamint Cu(II)-izotópra alapozó PET diagnosztikai és terápiás szerek ligandumaiként. 2024
Hatáskör: Magyarország
Bejelentés ideje: -
Ügyiratszám: P2400001 ()
Szabadalmi szám: P2400001
Szabadalom státusza: Gyéb

További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (8)

5. Ngo, M. T., Vágner, A., Nagy, G., Ország, G., Nagy, T., Szoboszlai, Z., Csikos, C., **Váradi, B.**, Trencsényi, G., Tircsó, G., Garai, I.: HER2 expression in different cell lines at different inoculation sites assessed by [52Mn]Mn-DOTAGA(anhydride)-trastuzumab.
Pathol. Oncol. Res. 31, 1-12, 2025. ISSN: 1219-4956.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/pore.2025.1611999>
IF: 2.3 (2024)
6. Ngo, M. T., Vágner, A., Nagy, G., Ország, G., Nagy, T. M., Csikos, C., **Váradi, B.**, Sajtos, G. Z., Kapus, I., Szoboszlai, Z., Szikra, D. P., Trencsényi, G., Tircsó, G., Garai, I.: [52 Mn]Mn-BPPA-Trastuzumab: A Promising HER2-Specific PET Radiotracer.
J. Med. Chem. 67 (10), 8261-8270, 2024. ISSN: 0022-2623.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00344>
IF: 6.8
7. Garda, Z., Szeremeta, F., Quin, O., Molnár, E., **Váradi, B.**, Clémençon, R., Meme, S., Pichon, C., Tircsó, G., Tóth, É.: Small, Fluorinated Mn²⁺ Chelate as an Efficient ¹H and ¹⁹F MRI Probe.
Angew. Chem.-Int. Edit. 63 (43), 1-8, 2024. ISSN: 1433-7851.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.202410998>
IF: 16.9
8. **Váradi, B.**, Lihí, N., Bunda, S., Nagy, A., Simon, G., Kéri, M., Papp, G., Tircsó, G., Esteban-Gómez, D., Platas-Iglesias, C., Kálmán, F. K.: Physico-Chemical Characterization of a Highly Rigid Gd(III) Complex Formed with a Phenanthroline Derivative Ligand.
Inorg. Chem. 61 (34), 13497-13509, 2022. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c02050>
IF: 4.6

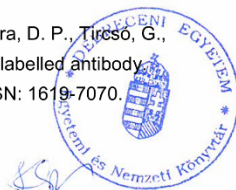




9. Lucio-Martínez, F., Garda, Z., **Váradi, B.**, Kálmán, F. K., Esteban-Gómez, D., Tóth, É., Tircsó, G.,
Platas-Iglesias, C.: Rigidified Derivative of the Non-macrocyclic Ligand H4OCTAPA for
Stable Lanthanide(III) Complexation.
Inorg. Chem. 61 (12), 5157-5171, 2022. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c00501>
IF: 4.6
10. Kálmán, F. K., Nagy, V., **Váradi, B.**, Garda, Z., Molnár, E., Trencsényi, G., Kiss, J., Meme, S.,
Même, W., Tóth, É., Tircsó, G.: Mn(II)-based MRI contrast agent candidate for vascular
imaging.
J. Med. Chem. 63 (11), 6057-6065, 2020. ISSN: 0022-2623.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00197>
IF: 7.446
11. Guillou, A., Galland, M., Roux, A., **Váradi, B.**, Gogolák, R. A., Le Saëc, P., Faivre-Chauvet, A.,
Beyler, M., Bucher, C., Tircsó, G., Patinec, V., Maury, O., Tripier, R.: Picolinate-appended
tacn complexes for bimodal imaging: Radiolabeling, relaxivity, photophysical and
electrochemical studies.
J. Inorg. Biochem. 205, 1-9, 2020. ISSN: 0162-0134.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110978>
IF: 4.155
12. Molnár, E., **Váradi, B.**, Garda, Z., Botár, R., Kálmán, F. K., Tóth, É., Tóth, I., Brücher, E., Tircsó,
G.: Remarkable differences and similarities between the isomeric Mn(II)-cis- and trans-1,2-
diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetate complexes.
Inorg. Chim. Acta. 472 (1), 254-263, 2018. ISSN: 0020-1693.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.071>
IF: 2.433

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (3)

13. Brezovcsik, K., **Váradi, B.**, Tircsó, G., Szűcs, Z.: Examination of bifunctional chelates for efficient
labeling of affibodies with ⁵²Mn.
Nucl. Med. Biol. 108-109, S147-S148, 2022. ISSN: 0969-8051.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0969-8051\(22\)00316-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-8051(22)00316-X)
14. Vágner, A., Ngo, M. T., Nagy, G., Nagy, T., Sajtos, G. Z., **Váradi, B.**, Szikra, D. P., Tircsó, G.,
Garai, I.: In vivo imaging of HER2 receptor status with a novel Mn-52-labelled antibody.
Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 49 (SUPPL1), S282-S282, 2022. ISSN: 1619-7070.





15. **Váradi, B.**, Garda, Z., Madarasi, E., Brezovcsik, K., Vágner, A., Nagy, T., Garai, I., Ngo, M. T., Puiu, A. G., Vasilescu, A. M., Szűcs, Z., Szedlacsek, S. E., Nagy, G., Tircsó, G.: Labelling anti-HER2-affibodies with Mn-52 via pyclyen based bifunctional ligands: from ligand design to in vivo PET/MR experiments.
Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 49 (SUPPL1), S283-S283, 2022. ISSN: 1619-7070.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 60,77

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 11,536

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

Debrecen, 2025.07.31.

