

# Doktori (PhD) értekezéstézisei

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

Gyuricza Barbara

Témavezető: Dr. Fekete Anikó



DEBRECENI EGYETEM

Kémia Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023

## 1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A pozitron emissziós tomográfia (PET) az onkológiai diagnosztikában alkalmazott egyik leghatékonyabb funkcionális képalkotó technika, amely elősegíti a tumoros elváltozások korai felismerését. A módszer a pozitron elektron annihiláción alapul így az eljáráshoz a bioaktív molekulákat pozitron sugárzó izotóppal szükséges megjelölni.

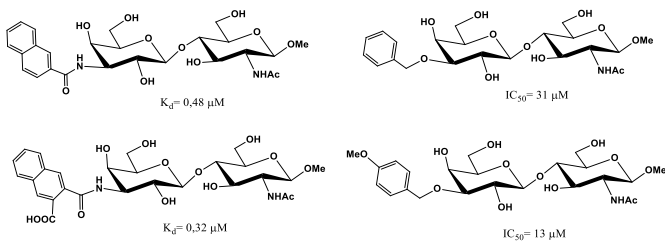
Az elterjedten alkalmazott, 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-dezoxi- $\beta$ -D-glükózt ( $^{18}\text{F}$ )FDG) azonban nem kellően tumor specifikus, mivel a daganatokon kívül megnövekedett  $^{18}\text{F}$ FDG-felvétel jellemző a fertőzésekre és gyulladásokra is, amelyeket ezért tévesen rosszindulatú daganatként diagnosztizálhatnak. Ezért fontos a tumor specifikusabb PET diagnosztikumok fejlesztése, például amelyek működése receptor-ligand kölcsönhatáson alapul. Ebbe a csoportba tartoznak a peptid alapú radiogyógyszerek is, amelyek nagy affinitással és szelektivitással képesek kötődni a tumoros sejteken vagy sejtekben megnövekedett expressziót mutató receptorokhoz. A tumor angiogenezis, azaz az érképződés fontos feltétele a tumor növekedésének és a metasztázisok kialakulásának. Az újonnan képződött angiogenikus erek olyan biomarkerek fejeződnek ki, amelyek a normál ereken csak nagyon kis mennyiségben vagy egyáltalán nem találhatók meg. Ennek megfelelően ezek a receptorok lehetővé teszik a személyre szabott rákellenes terápiák tervezését, valamint olyan tumor-diagnosztikai ágensek fejlesztését, amelyekkel megvalósítható a daganatok detektálása és a terápiára adott válasz nyomon követése. Ezek közé a biomarkerek közé tartoznak az integrinek, az aminopeptidáz N, valamint a galketin-3 fehérje.

Az integrinek közül az  $\alpha_v\beta_3$  integrinek vesznek részt leginkább az angiogenezis folyamatában. Ezek a sejtadhéziós fehérjék aktiválják az

angiogénikus növekedési faktorokat, valamint az apoptózis gátlásával elősegítik a neoplasztikus sejtek túlélését is. Az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) tripeptid szekvenciával jellemezhető peptid analógok specifikusan képesek kötődni az  $\alpha_v\beta_3$  integrinekhez, így az RGD alapú radiogyógyszerek alkalmasak ezen receptor detektálására.

Az aminopeptidáz N (APN/CD13) egy multifunkciós glikoprotein, amely enzimként, receptorként, és jelátviteli molekulaként is részt vesz az érképződés folyamatában. Az angiogénikus erekben megnövekedett APN/CD13 szint korrelál a daganatos sejtek progressziójával és inváziójával. Detektálásuk az aszparagin-glicin-arginin (NGR) tripeptid szekvenciával rendelkező peptid származékokkal lehetséges.

A galektin-3 (Gal-3) a lektinek csoportjába tartozó fehérje, amely a  $\beta$ -galaktozidos kötések ismeri fel a különböző glikokonjugátumokban. Az extracelluláris Gal-3 részt vesz az angiogenezis és az áttétképzés folyamatában, elősegíti a tumoros sejtek adhézióját, invázióját, valamint migrációját. Az intracelluláris Gal-3 az apoptózis folyamatának szabályozásában játszik fontos szerepet. A Gal-3 fehérje természetes liganduma a laktózin. Az irodalomban számos példát találunk nagy affinitású, a C-3' helyzetben aromás csoportot tartalmazó laktózin alapú galektin-3 inhibitor szintézisére (1. ábra), mivel ez a kémiai módosítás növeli a laktózin affinitását a Gal-3 receptor felé.



1. ábra: C-3' helyzetben módosított galektin-3 inhibitorok.

A kutatómunka során olyan peptid és szénhidrát alapú radiofarmakonok előállítását valósítottuk meg, amelyek a fent említett biomarkerekhez nagy affinitással és szelektivitással képesek kötődni. A szénhidrát egység bevezetésével egyrészt javítani szerettük volna a peptid alapú radiofarmakonok farmakokinetikáját, valamint további célunk volt olyan kettős targetálású glikopeptidek előállítása is, amelyek alkalmazása magasabb radiogyógyszer felvételt tesz lehetővé a tumoros sejtek számára.

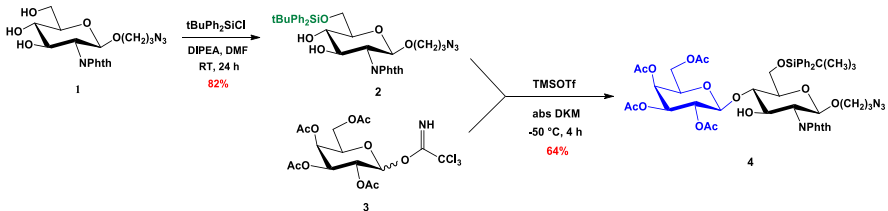
## **2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek**

A kémiai szintézisek során előállított vegyületeket oszlopkromatográfiával és félpreparatív HPLC-vel tisztítottuk, szerkezetüket tömegspektroszkópiával, valamint  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR spektroszkópiával igazoltuk. A radiokémiai jelzésekhez a  $^{68}\text{Ga}$  radionuklidot egyrészt  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  izotópgenerátorból nyertük, másrészt ciklotronban állítottuk elő  $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$  magreakcióval. Az előállított radiofarmakonokat szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk, a radiokémiai tisztaság meghatározását radio-HPLC és radio-iTLC módszerekkel végeztük. Az oktanol/víz megoszlási hányados meghatározása során a minták radioaktivitását gammaszámlálóval mértük meg. A stabilitásvizsgálatokat 0, 60, és 120 perc elteltével radio-HPLC-vel és radio-iTLC-vel vizsgáltuk. A B16F10 melanómás egerekről miniPET II és miniPET III kamerával készítettünk felvételeket. Az *ex vivo* szervi eloszlás vizsgálatnál a különböző szervekből és szövetekből vett minták radioaktivitását gammaszámlálóval határoztuk meg.

### 3. Az értekezés új tudományos eredményei

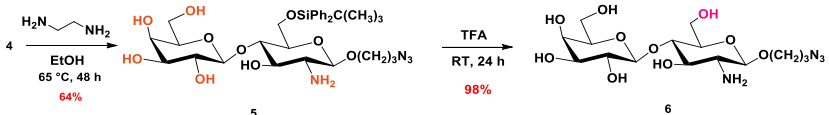
#### 3.1. NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> prekursor szintézise

A kutatómunkánk során először a **6**-os laktózin származék szintézisét valósítottuk meg. Kiindulási vegyületnek az irodalomból már 3-azido-propil-2-dezoxi-2-*N*-ftálimido- $\beta$ -D-glükopiranozidot (**1**) választottuk, melynek primer hidroxil csoportját *tert*-butil-difenil-szilil csoporttal védtük, az így kapott **2**-es glikozil akceptort 4-es hidroxil csoportját regioszelektíven glikozileztük a **3**-as glikozil donorral (2. ábra).



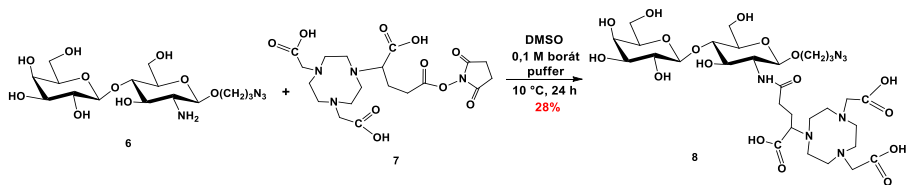
2. ábra

Ezt követően a **4**-es diszaharidról az acetil és a ftálimido védőcsoportokat etiléndiaminnal, míg a *tert*-butil-difenil-szilil védőcsoportot savas hidrolízissel távolítottuk el. Így állítottuk elő a funkcionalizált **6**-os laktózin származékot (3. ábra).



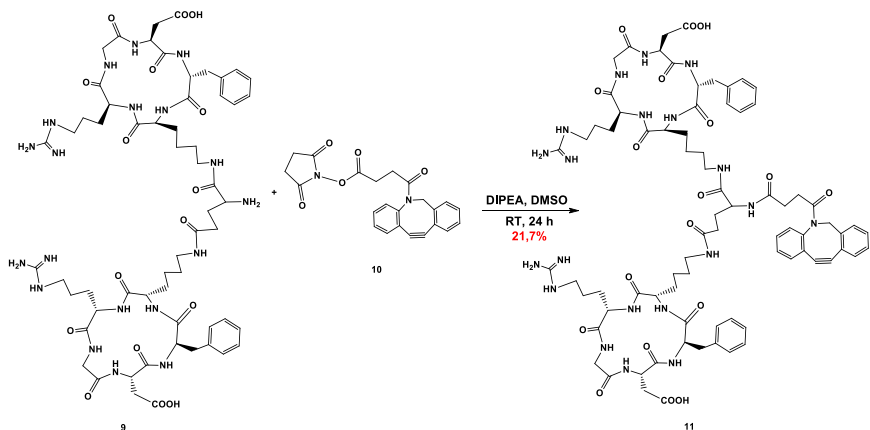
3. ábra

A következő lépésben megvalósítottuk a **6**-os vegyület konjugálását a NODAGA-NHS észterhez (**7**) (4. ábra).



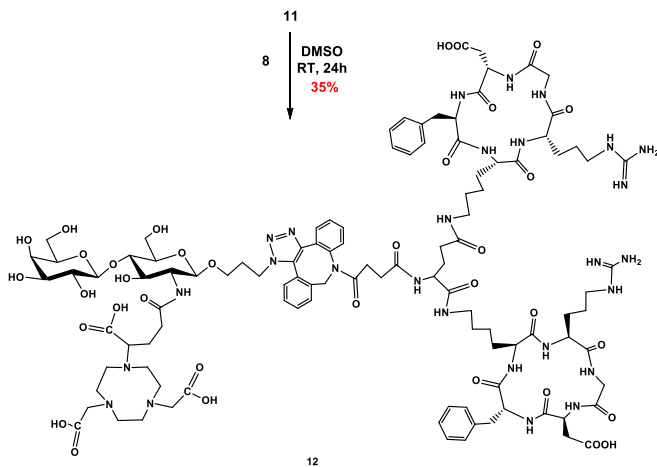
4. ábra

A kelátorhoz konjugált **8**-as laktózin származékot rézmentes gyűrűfeszítés indukálta klikk reakcióval (SPAAC) terveztük kapcsolni a ciklikus RGD dimer peptidhez. Ezért az E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (**9**) peptidet dibenzociklooktin-*N*-szukciminidil észterrel (DBCO-NHS, **10**) funkcionizáltuk (5. ábra).



5. ábra

Ezután a **11**-es peptidet SPAAC reakcióval konjugáltuk hozzá az **8**-as azidopropil glikozidhoz. A reakció eredményeként megkaptuk a **12**-es NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> glikopeptidet (6. ábra).



6. ábra

### 3.2. A NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> glikopeptid radiokémiai vizsgálata.

A 12-es prekursor radiokémiai jelzését <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generátor elúciójával nyert [<sup>68</sup>Ga]GaCl<sub>3</sub> oldattal valósítottuk meg, melynek pH-ját 3 M-os NH<sub>4</sub>OAc pufferrel (pH 4) állítottuk be, majd a prekursor 1 mg/ml koncentrációjú törzsoldatát adtuk hozzá a reakcióelegyhez. Először a különböző ligand koncentrációknak és a különböző reakcióhőmérsékleteknek a jelzések hozamára gyakorolt hatását vizsgáltuk. A radiojelzések hozamát a reakcióelegyek radio-HPLC-vel meghatározott radiokémiai tisztaság értékével adtuk meg. A reakcióelegyeket 95 °C-on 15 percig inkubáltuk és a legmagasabb radiojelzési hozamot a 32 μM-os ligand koncentrációnál tapasztaltuk (1.táblázat).

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

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

A továbbiakban már a 32 μM-os ligand koncentrációt alkalmaztuk a radiokémiai vizsgálatokhoz. A reakció hőmérsékletének változtatása szobahőmérsékletről 95 °C-ra jelentős változást eredményezett a radiokémiai hozam szempontjából (2. táblázat).

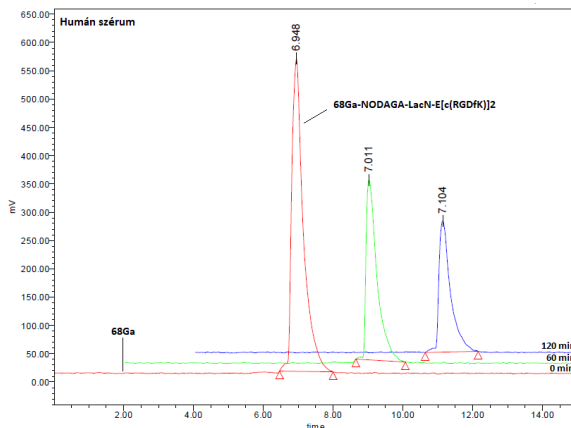
2. táblázat: A radiojelzés hatékonyságának vizsgálata különböző reakcióhőmérsékleten 32 M ligand koncentráció és 15 perces inkubációs idő mellett (n=3)

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

Ezt követően optimális reakciókörülmények között megvalósítottuk a [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> radiofarmakon előállítását. A jelzett glikopeptidet szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk Oasis HLB 1cc oszlopon. Majd a tisztított radioligand radiokémiai tisztaságát radio-HPLC-vel határoztuk meg, ami meghaladta a 99%-ot.

A  $^{68}\text{Ga}$ -jelzett vegyület minőségellenőrzését radio-TLC-vel is elvégeztük és ez alapján is >99%-os radiokémiai tisztaságot határoztunk meg. Tehát a két radioanalitikai módszer jól korrelált egymással.

Meghatároztuk az előállított radiofarmakon oktanol/víz hányadosát is, az alacsony  $\log P$  érték (-2,58) alapján a radiojelzett glikopeptid hidrofíl. Elvégeztük a radioligand *in vitro* stabilitás vizsgálatát humán szérumban, 0,01 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , valamint 0,01 M oxálsav oldatok jelenlétében. 0, 60, és 120 perc után mintákat vettünk az elegyekből, majd radio-HPLC-vel meghatároztuk a radiokémiai tisztaságukat. Mindhárom esetben 2 óra elteltével is intakt maradt a radiofarmakon (7. ábra).



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

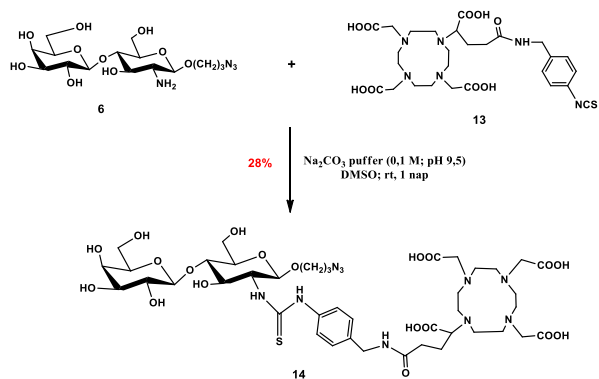
Az előzetes biológiai vizsgálatok során a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> glikopeptid csak alacsony mértékben halmozódott fel a B16F10 tumorban. Az alacsony tumorfelvételt valószínűleg az okozta, hogy a merev DBCO egység túlságosan közel helyezkedett el a targetáló peptidhez, ami jelentősen csökkentette a jelzett vegyület  $\alpha\beta_3$  integrinhez történő affinitását.

Ezért a további glikopeptidek előállítására során egy oligoetilén-glikol (PEG<sub>4</sub>) egységet is beépítettünk a DBCO csoport és a peptid közé.

### **3.3. A DOTAGA-LacN és cKNGRE alapú prekursorok előállítása**

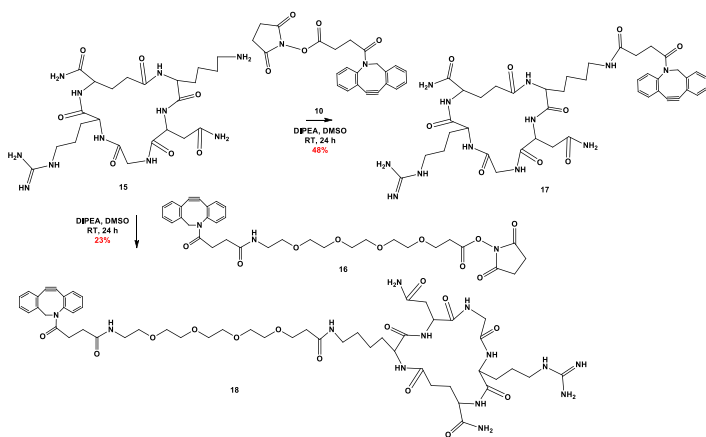
A következő kutatási szakaszban olyan radiofarmakonok előállítását terveztük, melyek az aminopeptidáz N (APN/CD13) receptor pozitív tumoros sejtek detektálására alkalmasak. Ezen kívül előállítottunk egy csak laktóزامint tartalmazó radiotracert is, amely alkalmas lehet a galektin-3 fehérje kimutatására. A célvegyületek szintézisét a NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> (**12**) vegyület előállításához hasonló stratégiával valósítottuk meg. Szénhidrát egységként a korábban már előállított **6**-os laktóзамin származékot alkalmaztuk. A NODAGA-NHS (**7**) bifunkcionális komplexképzőt azonban p-SCN-Bn-DOTAGA (**13**) kelátorra cseréltük, mivel a DOTA makrociklus nagyobb gyűrűmérete lehetővé teszi a terápiás radioizotópok (pl. <sup>177</sup>Lu, <sup>213</sup>Bi) koordinálást is, így radionuklid terápiára alkalmas radiofarmakonokhoz is juthatunk. Vektormolekulának pedig a ciklikus cKNGRE peptidet (**15**) választottuk.

Először **6**-os laktóзамin származék amino csoportja és a p-SCN-Bn-DOTAGA (**13**) komplexképző izotiocianát csoportja között tiokarbamid kötést alakítottunk ki (8. ábra).



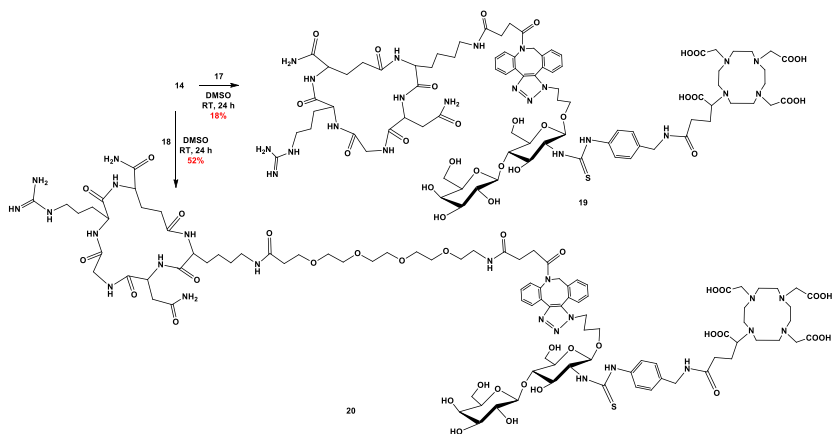
8. ábra

A következő lépésben a **15**-ös cKNGRE peptid funkcionálizálását valósítottuk meg a DBCO-NHS (**10**), valamint a PEG<sub>4</sub>-DBCO-NHS (**16**) észterekkel (9. ábra).



9. ábra

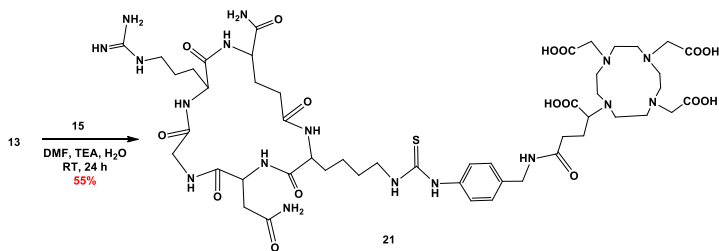
A **19**-es és **20**-as glikopeptidok szintézise során a kelátor konjugált **14**-es laktózámin származékot SPAAC klikk reakcióval kapcsoltuk hozzá a **17**-es és **18**-as peptidokhoz (10. ábra).



10. ábra

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

A cKNGRE alapú glikopeptidek biológiai vizsgálataihoz alkalmazott referencia vegyületet, nevezetesen a DOTAGA-cKNGRE (21) Stéfánné Dr. Dénes Noémi állította elő (11. ábra).



11. ábra

### 3.4. A DOTAGA-LacN és a cKNGRE alapú prekursorok radiokémiai vizsgálata

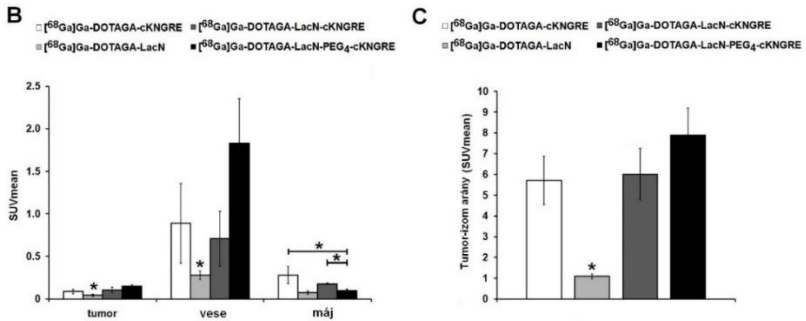
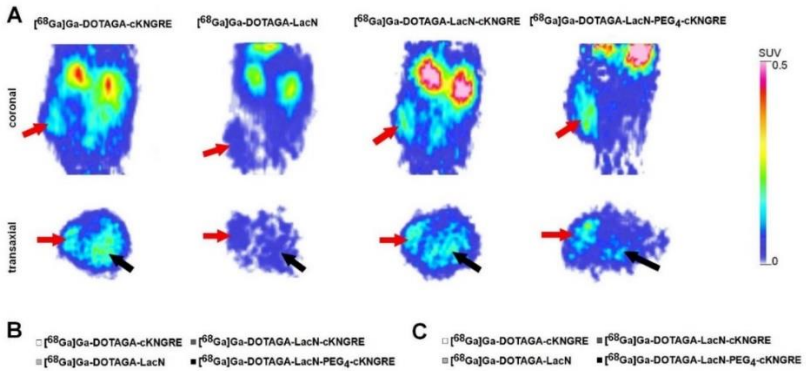
A **14-es**, a **19-es** és a **20-as** prekursorok radiokémiai jelzése a **12-es** glikopeptid jelzéséhez hasonló módon történt. A jelzésekhez szükséges  $^{68}\text{Ga}$  izotópot  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  izotópgenerátor elúciójával nyertük. A  $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  oldat pH-ját  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (3 M, pH 4) pufferrel 4-esre állítottuk, majd a **14-es**, **19-es** és **20-as** prekursorok törzsoldatát (1 mg/ml) adtuk hozzá külön-külön. A reakcióelegyeket 15 percig  $95\text{ }^\circ\text{C}$ -on melegítettük, majd jelzett komplexeket SPE Oasis HLB 1cc oszlopon tisztítottuk. A tisztított radioligandok radiokémiai tisztasága mindhárom esetben meghaladta a 95%-ot. Meghatároztuk a radiojelzett vegyületek moláris aktivitás értékeit is amelyek a következők voltak:  $3,02 \pm 0,23\text{ GBq}/\mu\text{mol}$  a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN}$  esetében,  $4,69 \pm 0,15\text{ GBq}/\mu\text{mol}$  a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE}$  esetében és végül  $4,33 \pm\text{ GBq}/\mu\text{mol}$  a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-PEG4-cKNGRE}$  radiofarmakon esetében. A referenciaként alkalmazott DOTAGA-cKNGRE prekursor radiokémiai jelzését Stéfánné Dr. Dénes Noémi valósította meg.

Meghatároztuk a radiofarmakonok  $\log P$  értékeit, amelyek a következők voltak:  $-3,34$ -et a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN}$  esetében,  $-3,68$ -at a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE}$  esetében,  $-3,69$ -et a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-PEG}_4\text{-cKNGRE}$  esetében, és  $-4,13$ -at a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-cKNGRE}$  esetében. Az alacsony  $\log P$  értékek alapján az előállított radioligandok hidrofíl sajátosságúak. Ezt követően megvalósítottuk a radiojelzett vegyületeket *in vitro* stabilitás vizsgálatát a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-LacN-E}[\text{c(RGDfK)}]_2$  esetében alkalmazott módszerrel azonos módon. A minták radiokromatogramjai alapján

a vizsgált körülmények között mind a 4 radioligand 2 óra elteltével is nagymértékű stabilitással volt jellemezhető.

### **3.5. A DOTAGA-LacN és a cKNGRE alapú radiofarmakonok biológiai vizsgálata**

Az előállított [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN, [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, valamint [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE radiofarmakonok biológiai vizsgálatát szubkután injektált B16F10 melanomás egereken vizsgáltuk. Ez a tumortípus fokozottan fejezi ki mind az aminopeptidáz N, mind a galektin-3 receptorokat. A radioligandok képalkotó hatékonyságát *in vivo* miniPET és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokkal igazoltuk. A 12/A ábra a bomláskorrigált PET felvételeket mutatja be. A vizsgált radiofarmakonok közül a szubkután növekvő B16F10 tumorok egyértelműen vizualizálhatók voltak a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE, és [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE glikopeptidekkel, valamint a referenciaként alkalmazott [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cKNGRE radiofarmakkal. Azonban a csak laktózamint tartalmazó [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN radioliganddal végzett vizsgálat mérsékelt tumorfelvételt eredményezett.



12. ábra: A: B16F10 melanoma tumoros egerekről a radiofarmakonok intravénás beadása után 70 perccel készült bomláskorrigált koronális és axiális miniPET felvételek. Piros nyíl: B16F10 tumor. Fekete nyíl: máj. B: A tumor, a vese, valamint a máj SUV<sub>mean</sub> értékeinek kiértékelése. C: Tumor/izom arány.

A radiofarmakonok máj- és vesefelvétele között is különbséget figyeltünk meg. A [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE és [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN-PEG<sub>4</sub>-cKNGRE glikopeptidek alacsonyabb májfelvétellel voltak jellemezhetőek, mint a referencia vegyületként alkalmazott, csak peptidet tartalmazó [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cKNGRE (12/B. ábra).

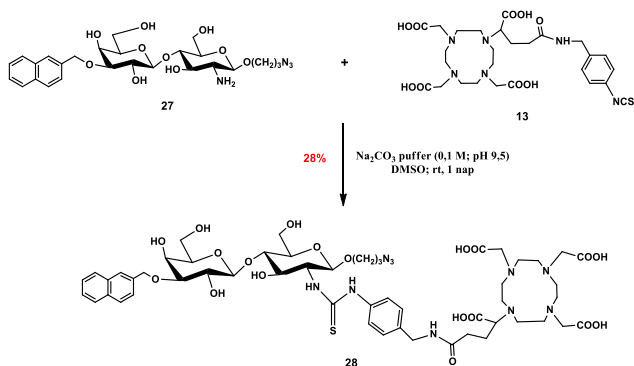
A glikoziláció és az oligoetilén-glikol (PEG<sub>4</sub>) egység beépítése jelentősen nem növelte a tumor radiofarmakon felvételét, de javította a peptid alapú radiofarmakonok farmakokinetikai tulajdonságait, mert a referencia vegyülethez képest csökkent két radiojelzett glikopeptid akkumulációja a májban, ami a

szervezet sugárterhelése szempontjából előnyös tulajdonság. Továbbá a  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-cKNGRE}$  és  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-LacN-PEG}_4\text{-cKNGRE}$  radioligandok esetében magasabb volt a tumor/izom arány, ami kontrasztosabb PET felvételeket eredményezett.

### 3.6. DOTAGA-LacN(NAP) és cRGDFK alapú prekursorok szintézise

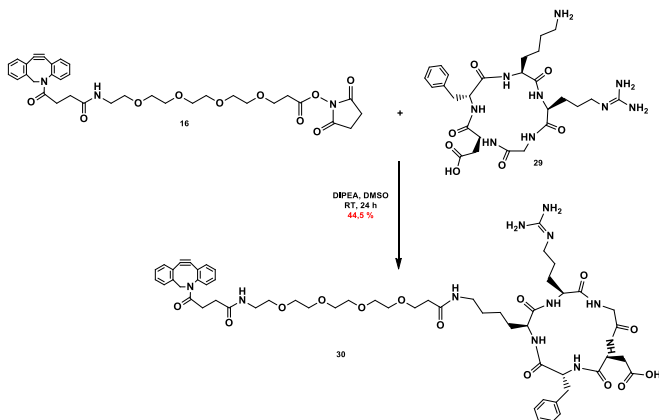
A kutatómunka haramadik szakaszában a laktózin egység affinitását terveztük növelni a galektin-3 receptor felé a galaktóz egység C-3' helyzetébe történő aromás csoport bevezetésével. A választásunk (2-naftil)-metil csoportra esett, melyet sztannilén acetálon keresztül alakítottunk ki.

A **27**-es (2-naftil)metilezett laktózin származék előállítását Szűcs Ágnes valósította meg a szakdolgozata elkészítése során. A **27**-es vegyületet tiokarbamid kötésen keresztül konjugáltuk a **13**-as DOTAGA kelátorral (13. ábra). Az előállított **28**-as vegyületet egyrészt  $^{68}\text{Ga}$  izotóppal jelöltük, másrészt ez a molekula képezte az előállítani kívánt heterodimer vegyület egyik építőegységét is.



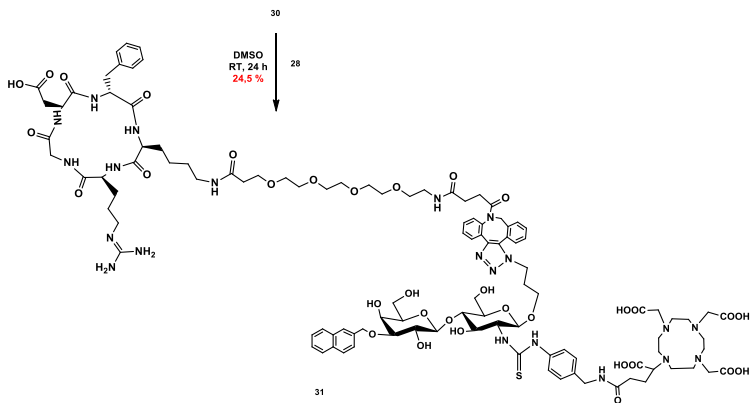
13. ábra

A heterodimer vegyület előállításához szükséges ciklikus RDG peptid származékot egy oligoetilén-glikolt tartalmazó DBCO egységgel funkcionalizáltuk (14. ábra).



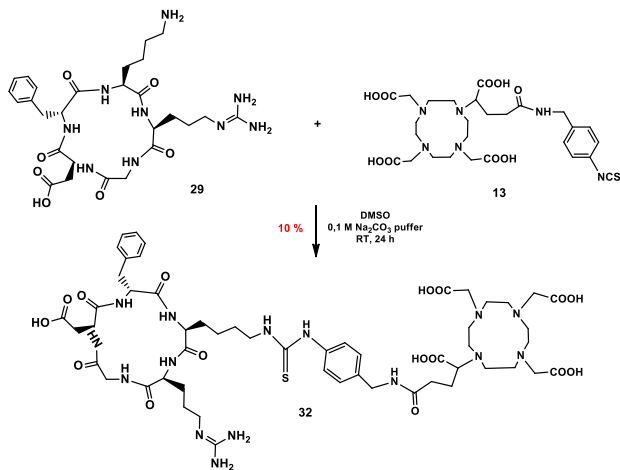
14. ábra

Ezt követően a kelátor-konjugált **28**-as laktózin származékot a korábban már alkalmazott rézmentes klick reakcióval hozzákapcsoltuk a **30**-as cRGDFK származékhoz és kaptuk a **31**-es glikopeptidet (15. ábra).



15. ábra

A biológiai vizsgálatokhoz ebben az esetben is előállítottunk egy referencia vegyületet, a DOTAGA-cRGDFK (**32**) molekulát (16. ábra).



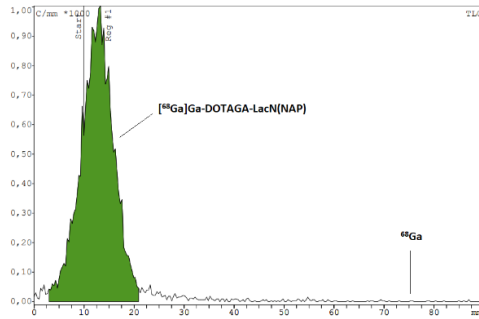
16. ábra

### 3.7. A DOTAGA-LacN(NAP) és cRGDFK alapú prekursorok radiokémiai vizsgálatai

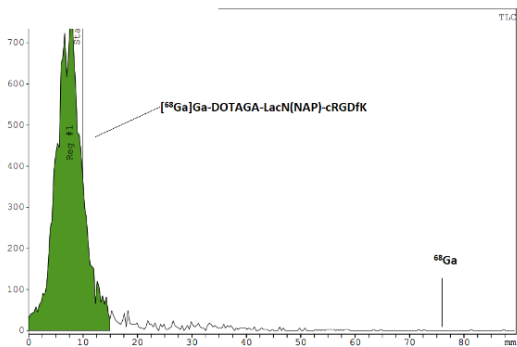
Az előállított **28**-as, **31**-es és **32**-es prekursorok radiokémiai jelzése a **12**-es prekuzorral esetében alkalmazott módszerhez hasonló körülmények között történt, annak kivételével, hogy a jelzésekhez szükséges <sup>68</sup>Ga radionuklidot <sup>68</sup>Zn(p,n)<sup>68</sup>Ga magreakcióval ciklotronnal állítottuk elő. A jelzett komplexeket SPE Oasis HLB 1cc oszlopon tisztítottuk. A radiofarmakonok radiokémiai tisztaságát analitikai radio-HPLC-vel vizsgáltuk, amely mindhárom esetben meghaladta a 97%-ot.

Meghatároztuk a radioligandok oktanol/víz megoszlási hányadosait, amelyek a következők voltak: -2,63 a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)

esetében, -2,27 a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDFK) esetében, és -3,03 a [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cRGDFK esetében. Megvalósítottuk az előállított radiojelzett vegyületek *in vitro* stabilitás vizsgálatát a korábban említett körülmények között és a radiofarmakonok 2 óra elteltével is stabilak maradtak (17. és 18. ábra). Az elegyekből vett minták összetételét radio-TLC-vel vizsgáltuk.



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

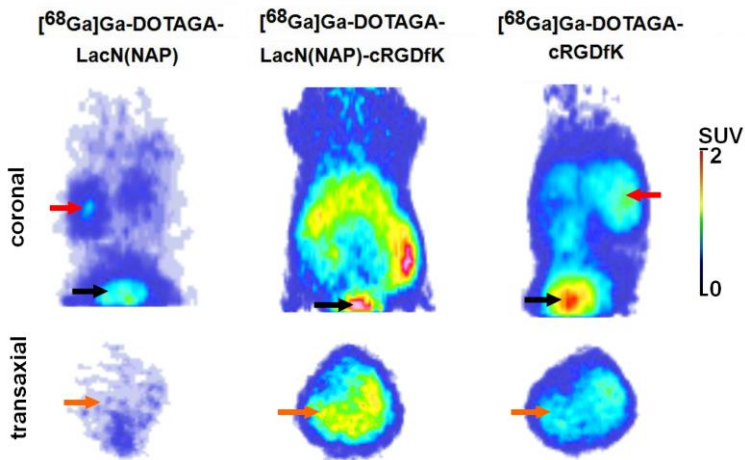


18. ábra: A tisztított [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDFK stabilitás vizsgálata humán szérumban 2 óra elteltével.

### 3.8. A DOTAGA-LacN(NAP) és cRGDfK alapú radiofarmakonok biológiai vizsgálata

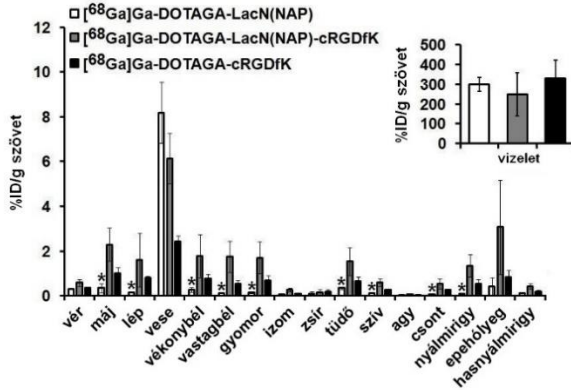
Az előállított [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP), [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDfK, valamint [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTAGA-cRGDfK radiofarmakonokat biológiai vizsgálatát B16F10 egér melanóma modellen végeztük, ugyanis ez a tumortípus fokozottan fejezi ki mind az  $\alpha_v\beta_3$ , mind pedig a galektin-3 receptorokat.

A radioligandok farmakokinetikai tulajdonságait először egészséges C57BL/6 egerek *in vivo* miniPET és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatával határoztuk meg. A 19. ábrán a bomláskorrigált PET felvételek láthatók. A PET felvételek kvalitatív elemzése során egyértelműen azonosítható a húgyúti rendszer, tehát a kapott eredmény jól korrelál a korábban meghatározott  $\log P$  értékekkel.



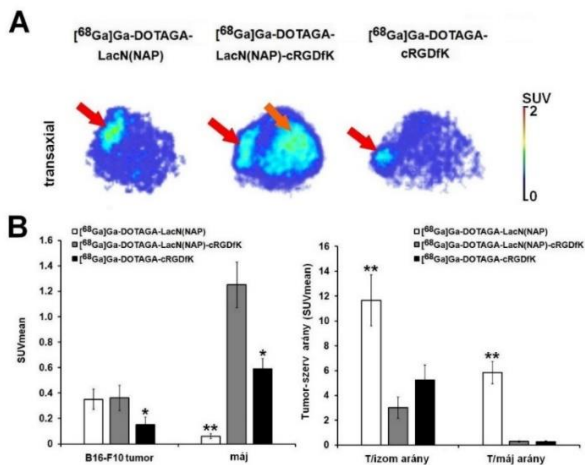
19. ábra: Egészséges C57BL/6 egerekről a radiofarmakonok intravénás beadása után 70 perccel készült bomláskorrigált miniPET felvételek.

Az RGD peptidet tartalmazó radioligandok esetén nagyobb mértékű májfelvételt is tapasztaltunk, amely főként a heterodimer esetében volt jelentősebb. A miniPET felvételek eredményei összhangban voltak az *ex vivo* szervi eloszlás vizsgálat eredményeivel (20. ábra).



20. ábra: Egészséges C57BL/6 egerek *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálata

Ezt követően a radiofarmakonok biológiai hatékonyságát B16F10 melanóma sejtekkel szubkután injektált C57BL/6 egér modellel igazoltuk. A 21. ábra a bomláskorrigált *in vivo* miniPET felvételeket mutatja be.



21. ábra: A: B16F10 melanoma tumoros C57BL/6 egerekről a radiofarmakonok intravénás beadása után 70 perccel készült bomláskorrigált in vivo miniPET felvételek B: A radiogyógyszerek felvételének kvantitatív SUV analízise.

A PET felvételek kvalitatív elemzése során egyértelműen kijelenthető, hogy mindhárom radioligand alkalmas a B16F10 tumor detektálására. Azonban a cRGD peptid származékot tartalmazó radiojelzett vegyületekkel készült PET felvételek kiértékelését nehezítette a májban történő magas radiofarmakon felhalmozódás. A PET felvételek kvantitatív elemzése során a referenciaként alkalmazott [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cRGDFK esetében szignifikánsan alacsonyabb radiofarmakon-felvételt tapasztaltunk. Az előállított [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) és [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDFK radioligandok átlagos standardizált felvételi értékei (SUV<sub>mean</sub>) értékei között azonban nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, de a radiojelzett glikopeptid esetében mértük a legmagasabb májfelvételi értéket.

A tumor/háttérarányok kiértékelése alapján [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) radiofarmakon 2-3-szor nagyobb tumor/izom aránnyal és körülbelül 21-szer nagyobb tumor/máj aránnyal volt jellemezhető, mint a két

másik radioligand. A B16F10 tumoros egerek *ex vivo* biodisztribúciós analízise során kapott eredmények összhangban voltak a fenti *in vivo* eredményekkel, amelyek megerősítették a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) kiemelkedő képalkotó tulajdonságait.

#### **4. Az értekezés eredményeinek hasznosíthatósága**

Szintetikus módszert dolgoztunk ki kelátor-konjugált, laktózin és peptid tartalmú prekursor molekulák szintézisére, amelyeket sikeresen jelöltünk pozitron sugárzó <sup>68</sup>Ga izotóppal.

Az elvégzett radiokémiai és biológiai vizsgálatok alapján az újonnan előállított radioligandok nagymértékű szérumbiztonsággal rendelkeznek, ezért PET alkalmazásuk során radiotoxicitással nem kell számolni, ami szervezet sugárterhelése szempontjából elengedhetetlen kritérium.

Az [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-cKNGRE radiofarmakon farmakokinetikai tulajdonságait glikozilációval és pegilálással sikeresen javítottuk így ezek a kémiai módosítások kontrasztosabb PET felvételeket eredményeztek.

A kutatómunka során előállítottuk a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP)-cRGDFK heterodimer vegyületet, amely egyaránt képes kötődni az  $\alpha_v\beta_3$  és galektin-3 receptorokhoz. Az elvégzett biológiai vizsgálatok során a radiojelzett glikopeptid alkalmasnak bizonyult a B16F10 melanóma kimutatására, azonban a PET felvételek kiértékelését nehezítette a radiofarmakon magasabb májfelvétele.

Végül sikeresen megvalósítottuk a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) radiofarmakon szintézisét és preklinikai vizsgálatát. Az egészséges C57BL/6 egereken elvégzett *in vivo* miniPET és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok alapján a radiofarmakon a vesén keresztül ürül, ami előnyös tulajdonság az

esetleges klinikai felhasználás szempontjából. A B16F10 tumoros egerekkel elvégzett *in vivo* miniPET és *ex vivo* szervi eloszlás vizsgálatok alapján a [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) jelentős mértékben akkumulálódott a tumorban, valamint magas tumor/izom és tumor/máj aránnyal volt jellemezhető.

A [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTAGA-LacN(NAP) radiofarmakon az első szénhidrát alapú galektin-3 fehérjét célzó PET diagnosztikai ágens, amely kiválóan vizualizálta B16F10 melanoma tumorokat a PET képalkotás során.



Nyilvántartási szám: DEENK/51/2023.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gyuricza Barbara

Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

- Gyuricza, B.**, Szűcs, Á., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Képes, Z., Szűcs, D., Szikra, D. P., Trencsényi, G., Fekete, A.: The Synthesis and Preclinical Investigation of Lactosamine-Based Radiopharmaceuticals for the Detection of Galectin-3-Expressing Melanoma Cells. *Pharmaceutics*. 14, 1-16, 2022. EISSN: 1999-4923.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14112504>  
IF: 6.525 (2021)
- Gyuricza, B.**, Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Dénes, N., Szűcs, Á., Berta, K., Kis, A., Szűcs, D., Forgács, V., Szikra, D. P., Kertész, I., Trencsényi, G., Fekete, A.: Synthesis of <sup>68</sup>Ga-Labeled cNGR-Based Glycopeptides and In Vivo Evaluation by PET Imaging. *Pharmaceutics*. 13 (12), 1-14, 2021. EISSN: 1999-4923.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13122103>  
IF: 6.525
- Gyuricza, B.**, Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Szűcs, D., Vágner, A., Szikra, D. P., Fekete, A.: Synthesis of Novel, Dual-Targeting <sup>68</sup>Ga-NODAGA-LacN-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> Glycopeptide as a PET Imaging Agent for Cancer Diagnosis. *Pharmaceutics*. 13 (6), 1-13, 2021. EISSN: 1999-4923.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13060796>  
IF: 6.525

## További közlemények

### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (5)

- Kálmán-Szabó, I., Bunda, S., Lihi, N., Szaniszló, Z., Szikra, D. P., Péli-Szabó, J., Fekete, A., Gyuricza, B., Szűcs, D., Papp, G., Trencsényi, G., Kálmán, F. K.: <sup>61</sup>Cu-Labelled radiodiagnostics of melanoma with NAPamide-targeted radiopharmaceutical. *Int. J. Pharm.* 632, 1-9, 2023. ISSN: 0378-5173.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122527>  
IF: 6.51 (2021)





5. Képes, Z., Arató, V. Z., Péli-Szabó, J., **Gyuricza, B.**, Szücs, D., Hajdu, I., Fekete, A., Bruchertseifer, F., Szikra, D. P., Trencsényi, G.: Therapeutic Performance Evaluation of 213Bi-Labelled Aminopeptidase N (APN/CD13)-Affine NGR-Motif ([213Bi]Bi-DOTAGAcKNGRE) in Experimental Tumour Model: a Treasured Tailor for Oncology. *Pharmaceutics*. 15 (2), 1-15, 2023. EISSN: 1999-4923.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15020491>  
IF: 6.525 (2021)
6. Forgács, V., Fekete, A., **Gyuricza, B.**, Szücs, D., Trencsényi, G., Szikra, D. P.: Methods for the Determination of Transition Metal Impurities in Cyclotron-Produced Radiometals. *Pharmaceuticals (Basel)*. 15 (2), 1-24, 2022. EISSN: 1424-8247.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15020147>  
IF: 5.215 (2021)
7. Szücs, D., Csupász, T., Péli-Szabó, J., Kis, A., **Gyuricza, B.**, Arató, V. Z., Forgács, V., Vágner, A., Nagy, G., Garai, I., Szikra, D. P., Tóth, I., Trencsényi, G., Tirscsó, G., Fekete, A.: Synthesis, physicochemical, labeling and in vivo characterization of a DO3AM-based hypoxia sensitive 44Sc-labeled PET probe. *Pharmaceuticals (Basel)*. 15 (6), 1-16, 2022. EISSN: 1424-8247.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15060666>  
IF: 5.215 (2021)
8. Forgács, V., Németh, E., **Gyuricza, B.**, Kis, A., Péli-Szabó, J., Mikecz, P., Mátyus, P., Helyes, Z., Horváth, Á. I., Kálai, T., Trencsényi, G., Fekete, A., Szikra, D. P.: Radiosynthesis and preclinical investigation of 11C labelled 3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl)propanal oxime ([11C]SZV 1287). *ChemMedChem*. 15 (24), 2470-2476, 2020. ISSN: 1860-7179.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.202000389>  
IF: 3.466

#### Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (13)

9. Szücs, D., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., **Gyuricza, B.**, Szikra, D. P., Trencsényi, G., Tóth, I., Fekete, A.: 68Ga és 205/206Bi jelzett, albuminkötő egységgel módosított DOTA-konjugált NAPamid szintézise és preklinikai vizsgálata.  
In: Őszi Radiokémiai napok 2022. Szerk.: Jósza István, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 57-60, 2022. ISBN: 9786156018137
10. **Gyuricza, B.**, Szücs, Á., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Szücs, D., Szikra, D. P., Trencsényi, G., Fekete, A.: 68ga izotóppal jelölt, (2-naftil)-metilezett laktózamin alapú radiofarmakonok előállítására és biológiai vizsgálata.  
In: Vegyészkonferencia 2022. Szerk.: Keglevich György, Kurtán Tibor, Magyar Kémikusok Egyesülete, Eszterházy Károly Katolikus Egyetem, 82, 2022. ISBN: 9786156018113





11. Szűcs, D., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., **Gyuricza, B.**, Szikra, D. P., Trencsényi, G., Tóth, I., Fekete, A.: Albuminkötő egység beépítésének a hatása 68Ga és 205/206Bi jelzett NAPamid alapú radiofarmakonok farmakokinetikai tulajdonságaira.  
In: 55. Komplexkémiai Kollokvium : Előadás-összefoglalók, MKE Komplexkémiai Szakcsoport, Debrecen, E18, 2022.
12. **Gyuricza, B.**, Szűcs, Á., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Szűcs, D., Szikra, D. P., Trencsényi, G., Fekete, A.: Galektin-3 receptor detektálása melanoma sejtekben 68Ga-jelzett (2-naftil) metilezett laktóz-amin alapú radioligandokkal.  
In: 55. Komplexkémiai Kollokvium : Előadás-összefoglalók, MKE Komplexkémiai Szakcsoport, Debrecen, E23, 2022.
13. **Gyuricza, B.**, Szűcs, Á., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Szűcs, D., Szikra, D. P., Trencsényi, G., Fekete, A.: Melanoma kimutatása PET képképzéssel laktózámin-alapú Gal-3 radioligandok segítségével.  
In: Őszi Radiokémiai napok 2022. Szerk.: Jósza István, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 102-103, 2022. ISBN: 9786156018137
14. **Gyuricza, B.**, Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Szűcs, D., Vágner, A., Szikra, D. P., Fekete, A.: 68Ga jelzett kettős targetálású glikopeptid alapú radiofarmakon szintézise.  
In: Őszi Radiokémiai napok 2021. Szerk.: Jósza István, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 39-44, 2021. ISBN: 9786156018076
15. **Gyuricza, B.**, Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Szűcs, D., Vágner, A., Szikra, D. P., Fekete, A.: 68GA-NODAGA-LACN-E[C(RGDFK)]<sub>2</sub> glikopeptid alapú radiofarmakon szintézise.  
In: II. Fiatal Kémikusok Fóruma Szimpózium Absztraktfüzet. Szerk.: Bodor Zsanett, Ádám Adél, Bana Péter, Hegedűs Marica, Simon Fruzsina ; ill. Ziegenheim Szilveszter, MKE Fiatal Kémikusok Fóruma, S. I., 45, 2021.
16. **Gyuricza, B.**, Pinkóczy, J., Péli-Szabó, J., Kis, A., Trencsényi, G., Szikra, D. P., Fekete, A.: [Al18F]<sup>2+</sup>-dal történő radiofluorozási reakció vizsgálata.  
In: Őszi Radiokémiai napok 2019 / Kasztovszky Zsolt, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 60-65, 2019. ISBN: 9789639970984
17. Szűcs, D., **Gyuricza, B.**, Péli-Szabó, J., Kis, A., Nagy, T., Trencsényi, G., Szikra, D. P., Fekete, A.: 44SC jelzett DOTA-NI és 68Ga jelzett trisz(hidroxipiridinon)-ni radiógyógyszerek szintézise és preklinikai vizsgálata.  
In: MONT XXI. Kongresszus: absztraktyűjtemény, Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság, Debrecen, 23, 2019.
18. **Gyuricza, B.**, Pinkóczy, J., Péli-Szabó, J., Kis, A., Trencsényi, G., Szikra, D. P., Fekete, A.: Reakciókörülmények hatásának vizsgálata [Al18F]<sup>2+</sup>-dal történő radiofluorozás jelzési hatékonyságára.  
In: MONT XXI. Kongresszus: absztraktyűjtemény, Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság, Debrecen, 67, 2019.





19. **Gyuricza, B.:** 68Ga-NOPO-Nitroimidazol radiofarmakon előállítása tumor hipoxia kimutatására PET technikával.  
In: XXIII. Korányi Frigyes Tudományos Fórum : absztraktfüzet. Szerk.: Egyed Bálint, Korányi Frigyes Szakkollégium, Budapest, 190, 2018.
20. **Gyuricza, B.,** Trencsényi, G., Szikra, D. P., Fekete, A.: 68Ga-NOPO-nitroimidazol radiológyszer szintézise és preklinikai vizsgálata.  
In: Őszi Radiokémiai Napok 2018 Balatonszárszó, 2018. október 10-12.. Szerk.: Homlok Renáta, Kovácsné Tóth Zita, Kasztovszky Zsolt, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, 66-70, 2018. ISBN: 9789639970939
21. **Gyuricza, B.,** Fekete, A., Trencsényi, G., Szikra, D. P.: Synthesis of novel 68Ga-labelled 2-nitroimidazole-NOPO radiotracer for tumor hypoxia imaging = [Tumor hipoxia kimutatására alkalmas Ga-68 jelzett 2-nitroimidazol-NOPO radiofarmakon szintézise].  
*Nucl. Med. Rev.* 20 (2), 115, 2017. ISSN: 1506-9680.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5603/NMR.2017.0020>

#### Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (2)

22. Arató, V. Z., **Gyuricza, B.,** Dénes, N., Péli-Szabó, J., Fekete, A., Trencsényi, G., Kertész, I.:  
Preclinical evaluation of APN/CD13 and/or Gal-3 selective 68Ga-labelled PET radioligands.  
In: Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences 15th of May 2021  
Book of Abstracts. Eds.: Csiszár Beáta, Hankó Csilla, Kajos Luca Fanni, Mező Emerencia,  
Doctoral Student Association of the University of Pécs, Pécs, 117, 2021. ISBN:  
9789634296539
23. **Gyuricza, B.,** Pinkóczy, J., Péli-Szabó, J., Kis, A., Trencsényi, G., Szikra, D. P., Fekete, A.:  
Investigation of [Al18F]2-radiofluorination in different labelling conditions.  
In: Book of abstract. Eds.: EFMC Young Scientists Network, EFMC Young Scientists  
Network, Belgium, 1, 2020.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 46,506**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 19,575**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudósterbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudomány-metriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

