

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

^{44}Sc és ^{68}Ga radioizotópokkal jelölt tumorspecifikus trészerek biodisztribúciójának *in vivo* vizsgálata preklinikai képalkotó eszközökkel

Nagy Gábor

Témavezető: Dr. Trencsényi György



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések.....	4
2. Bevezetés	5
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. A PET technika és a pozitron-bomló izotópok	8
3.2. Radioizotóp generátorok működése és felhasználása	12
3.3. A mikrofluid és kapilláris technikák alkalmazása a radiokémiában.....	18
3.4. A ^{68}Ga - és ^{44}Sc -jelölt biológiai markerek	21
3.5. A preklinikai vizsgálatok és a transzláció jelentősége	26
4. Metodikák.....	29
4.1. Felhasznált vegyszerek, reagensek és eszközök	29
4.2. A ^{44}Sc radioizotóp előállítási módszerei és összehasonlításuk.....	30
4.2.1. $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ radioizotóp generátor elkészítése	30
4.2.2. A ^{44}Sc ciklotronos előállítása és az ezt követő tisztítása	32
4.2.3. A generátorral és a ciklotronnal termelt ^{44}Sc segítségével elért jelölési hatásfokok összehasonlítása.....	33
4.2.4. A ^{44}Sc mérésére alkalmas dóziskalibrátoros csatorna létrehozása	34
4.2.5. A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátor állapotának a monitorozása SPECT/CT segítségével	35
4.3. ^{44}Sc és ^{68}Ga izotópokkal végzett jelzések kapilláris rendszer segítségével	36
4.3.1. A kapilláris rendszer felépítése és működése	36
4.3.2. A kapilláris rendszer beállítása és tesztelése	37
4.3.3. ^{44}Sc jelzések optimalizálása funkcionizálatlan kelátorokkal	37
4.3.4. ^{44}Sc és ^{68}Ga jelölések optimalizálása maleimid származékokkal	38
4.3.5. $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -NODA-GA-c(RGDfK) léptéknövelt előállítása	39
4.3.6. $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -NODA-GA-c(RGDfK) manuális jelölése	40
4.4. AAZTA kelátorral és származékaival végzett kémiai kísérletek	40
4.4.1. Az AAZTA-C9-c(RGDfK) szintézise	41
4.4.2. Az AAZTA-C9-BSA szintézise.....	42
4.4.3. ^{44}Sc -DOTA/AAZTA jelölési körülményeinek és kinetikai stabilitásának a vizsgálata	43
4.4.4. ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK)/BSA jelölések biológiai vizsgálatokhoz	44
4.5. A $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -NAPamiddal végzett kémiai és radiokémiai kísérletek.....	46
4.5.1. A ^{68}Ga -DOTA-NAPamid jelölése biológiai vizsgálatokhoz	46
4.5.2. A ^{44}Sc -DOTA-NAPamid jelölése biológiai vizsgálatokhoz	46
4.5.3. A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid logP értékének meghatározása	46

4.5.4.	A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid kinetikai stabilitásának a vizsgálata	47
4.6.	A biológiai vizsgálatok során alkalmazott eszközök és módszerek.....	47
4.6.1.	A sejtenyésztés körülményei	47
4.6.2.	Az <i>in vitro</i> melanoma kötődési vizsgálatok körülményei	48
4.6.3.	A melanoma sejtek <i>in vitro</i> radiotrészter felvételének körülményei	48
4.6.4.	A kísérleti állatok tartása	48
4.6.5.	A daganatos állatmodellek kialakítása	49
4.6.6.	<i>In vivo</i> PET/MRI vizsgálatok során alkalmazott körülmények.....	49
4.6.7.	A PET adatok kiértékelése.....	50
4.6.8.	Az <i>ex vivo</i> biodisztribúciós vizsgálatok	50
4.6.9.	<i>In vivo</i> blokkolós vizsgálatok	51
4.6.10.	Statisztikai analízis.....	51
5.	Eredmények	51
5.1.	$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ radioizotóp generátor kialakításának az eredményei.....	51
5.1.1.	A ^{44}Ti anyaelem tisztítása	51
5.1.2.	A ^{44}Ti betöltése és az izotópgenerátor használata	53
5.1.3.	A ^{44}Ti leoldása és az izotópgenerátor újratöltése.....	56
5.1.4.	A ciklotronban és a generátorban előállított ^{44}Sc jelzési reakcióinak az eredményei és összehasonlításuk.....	57
5.2.	A kapilláris rendszer segítségével végzett ^{68}Ga és ^{44}Sc jelölések eredményei és összehasonlításuk	60
5.2.1.	A jelölések ismételtetésének a vizsgálata	60
5.2.2.	Különböző kelátorok ^{44}Sc jelöléseinek összehasonlítása a kapilláris rendszer segítségével	60
5.2.3.	A maleimid-konjugált kelátorok jelöléseinek eredményei és összehasonlításuk	61
5.2.4.	A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -NODA-GA-c(RGDfK) manuálisan és a kapilláris rendszerrel történő előállítása és az eredmények összehasonlítás	63
5.3.	Az AAZTA származékokkal végzett kísérletek eredményei	64
5.3.1.	^{44}Sc -AAZTA és DOTA jelölési körülményeinek optimalizálása	64
5.3.2.	A ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK)/BSA-val végzett biológiai vizsgálatok.....	68
5.4.	A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid melanoma markerrel végzett kísérletek eredményei.	70
5.4.1.	A jelölések, a logP vizsgálatok és a kinetikai stabilitás mérések eredményei	70
5.4.2.	Az <i>in vitro</i> vizsgálatok eredményei	71
5.4.3.	Az <i>in vivo</i> és <i>ex vivo</i> biodisztribúciós eredmények	72
6.	Megbeszélés.....	78
6.1.	A ^{44}Sc előállításával kapcsolatos eredmények értelmezése és megbeszélése	79

6.2.	A kapilláris rendszer segítségével nyert eredmények értelmezése és megbeszélése..	82
6.3.	Az ^{44}Sc -AAZTA-val és származékaival végzett vizsgálatok során nyert eredmények értelmezése és megbeszélése	86
6.4.	A $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NAPamiddal végzett vizsgálatok során nyert eredmények értelmezése és megbeszélése	88
7.	Összefoglalás	92
8.	Summary	93
9.	Irodalomjegyzék	94
9.1.	A hivatkozott közlemények jegyzéke	94
9.2.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	103
9.3.	További, nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények	104
10.	Tárgyszavak	105
11.	Köszönetnyilvánítás	106
12.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények másolatai	107

1. Rövidítések

α-MSH	α -melanocita-stimuláló hormon
AAZTA	2,2'-((1,4-bisz(karboximetil)-6-(9-karboxinonil)-1,4-diazepán-6-il)azanedil)diecetsav
AAZTA-C9	2,2'-((6-(10-amino-10-oxodecil)-1,4-bisz(carboximetil)-1,4-diazepán-6-il)azanedil)diecetsav
BSA	Bovine szérum albumin
c(RGDfK)	Ciklo[Arg-Gly-Asp-(D-Phe)-Lys] peptid
DIPEA	Diizopropil-etil-amin
DMEM	Dulbecco módosított sas tápoldat
DMF	Dimetil-formamid
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-N,N',N'',N'''-tetraecetsav
DOTA-GA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1-glutársav-4,7,10-triecetsav
ESI-MS	Elektrospray ionizációs tömegspektrométer
FBS	Fetal bovine szérum
FDG	Fluoro-dezoxi-glükóz
HBTU	O-Benzotriazol-1-il-N,N',N'',N'''-tetrametilurónium-hexafluorofoszfát
HPLC	Nagynyomású folyadékkromatográf
HRMS	Nagyfelbontású tömegspektrometria
ID	Belső átmérő
%ID	Százalékos inkubációs dózis
MEM	Minimális esszenciális médium
NAPamid	Ac-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys peptid
NODA-GA	1,4,7- triazaciklononán-1-glutársav-4,7-diecetsav
NOPO	1,4,7-triazaciklononán-1,4-bisz[metilén(hidroximetil)foszfinsav]-7-[metilén(2-karboxi-etil)foszfinsav]
NOTA	1,4,7-triazaciklononán-N,N',N''-triecetsav
PEEK	Poli(éter-éter-keton)
SUV	Standard felvételi hányados
SUV_{mean}	Átlagos standard felvételi hányados
SUV_{max}	Maximális standard felvételi hányados
T/M	Tumor/izomszövet aránya (SUV értékekkel)
TFP	2,3,5,6-Tetrafluorofenol
UPLC	Ultra-nagy nyomású folyadékkromatográf
VOI	Vizsgálati térfogat

2. Bevezetés

Az elmúlt 30 évben a pozitron emissziós tomográfia (PET) a világ számos területén, így hazánkban is az egyik legfontosabb *in vivo* orvosi képalkotó eljárássá vált. A legnagyobb számban alkalmazott PET radioizotóp a ^{18}F , illetve a leggyakoribb PET radiofarmakon a segítségével előállított [^{18}F]-FDG, amely cukorszármazék révén a daganatos sejtek felgyorsult szénhidrát anyagcseréjének köszönhetően lokalizálhatja a kóros elváltozásokat. A ^{18}F kizárólag ciklotronban történő előállításának, többlépéses jelölési reakcióinak, illetve az [^{18}F]-FDG aspecifikusságának köszönhetően igény támadt más, az ezeket a problémákat orvosló PET radioizotópok és jelölt farmakonok feltérképezésére. Ilyen radioizotóp például a ^{68}Ga és a ^{44}Sc , amelyek közül a ^{68}Ga felhasználásával már közel 20 éve folyik számos preklinikai és klinikai vizsgálat, míg a ^{44}Sc az elmúlt 5 évben került a figyelem középpontjába. Mindkét radioizotóp előállítható ciklotron, illetve radioizotóp generátor segítségével is. A felezési idejük ($t_{1/2}$, ^{68}Ga = 1,13 óra; $t_{1/2}$, ^{44}Sc = 3,97 óra) és a pozitron energiájuk ($E_{\beta\text{-max}}$, ^{68}Ga = 1,9 MeV; $E_{\beta\text{-max}}$, ^{44}Sc = 1,5 MeV) lehetővé teszi diagnosztikaként történő felhasználásukat a nukleáris medicinában, illetve kit alapú jelezhetőségüknek köszönhetően számtalan radiofarmakon radioizotópjaként szolgálhatnak.

Az esetek nagy hányadában a radiofémekkel végzett jelölési reakciók során valamilyen bifunkciós komplexképző ágens (kelátort) alkalmazunk, hogy a radioaktív nuklidot a vizsgálni kívánt molekulához kapcsolhassuk. A $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ esetén igen széles kelátor-paletta áll rendelkezésre (DOTA, NOTA, DOTA-GA, NODA-GA, NOPO stb.) [1], [2], míg a ^{44}Sc -at tekintve kevés az ugyanezen kelátorokkal végzett kísérlet [3], illetve elenyésző számú az új, szkandium(III)-specifikus kelátorok irányában folyó kutatás. Ilyen ígéretesnek tűnő ligandumok lehetnek az AAZTA alapú kelátorok, amelyeknek a gadolíniummal alkotott komplexére ($[\text{Gd-AAZTA}]^-$) 2004-ben MRI kontrasztanyagként történő felhasználással hivatkoznak [4]. Ezen kívül az elmúlt 14 évben számos egyéb átmenetifémekkel és lantanoidával alkotott komplexeit vizsgálták, mint potenciális MRI kontrasztanyag. A megjelent, közel 40 közleményből összesen 5 foglalkozik a kelátor radiokémiai téren történő felhasználásával, illetve a munkánk kezdetén nem volt található olyan közlemény, ahol a ^{44}Sc és AAZTA radiokémiai rendszert vizsgálták volna.

Ennek többek közt az is lehet az oka, hogy egy új radiofém-kelátor rendszer esetén időigényes a jelölési körülmények optimumának a feltérképezése kézi jelölések útján.

Ezen segíthetnek a mikrofluid, vagy kapilláris rendszerek, amelyekben az automatizált folyamatoknak köszönhetően jelentősen növelhető az egységnyi idő alatt elvégezhető jelölési reakciók száma és minimalizálható az eredmények közötti szórást. Ezen túl a felhasznált kis folyadéktérfogatoknak köszönhetően csökkenthető a jelölési reakciók során alkalmazott - az esetek nagy részében drága - biomolekulák mennyisége is. Használatával akár több hónapos mérésorozatot végezhetők el kevesebb, mint egy hét alatt. Az optimalizálást követően pedig úgynevezett „scale-up” átalakítást végrehajtva biológiai vizsgálatokhoz szükséges térfogatú és aktivitású radiofarmakonok is termelhetők.

Ezen radiofarmakonok egy része valamilyen daganatos elváltozás diagnózisában, vagy állapotának a monitorozásában játszik fontos szerepet. Mivel a rákos megbetegedések esetén az áttétek kialakulása igen nagy arányban vezet a daganatos betegek halálához [5], így a metasztatikus folyamatok széleskörű megismerése esszenciálissá vált az onkológia területén. A metasztázisok létrejöttének az egyik fő oka a tumorban kialakuló hipoxia, ami minden – egy bizonyos méretet meghaladó – szolid tumor egyik közös jellemzője és szoros összefüggésben van az angiogenezis folyamatával. Ezen folyamatok tanulmányozása a modern daganatterápia egyik legégetőbb problémája, hiszen a hipoxiás területek gyorsítják a metasztatikus potenciált, illetve olyan fizikai faktorok kialakulását segítik elő, amelyek rezisztensé teszik a daganatsejteket a sugárterápiával és a kemoterápiás szerekkel szemben [6]. A lokális hipoxiás területek környezetében rendre kialakuló angiogenikus folyamatok lehetővé teszik ezen hatások közvetett vizsgálatát. A primer tumorok áttétképzésében fontos szerepe van az $\alpha_v\beta_3$ integrinnek, amelyről tudjuk, hogy daganatos szövetek vérereiben fokozottan expresszálódik és ennek a mértékét többek között RGD alapú peptid-radiotrészerekkel lehet vizsgálni [7], [8].

Egy igen agresszívnek tartott daganatos megbetegedés a malignus melanoma, amely a kiemelkedő metasztatikus potenciáljának köszönhetően magas halálozási arányt okoz a világ számos területén [9]. A jelentős áttétképzési tulajdonsága miatt a korai detektálása létfontosságú a betegek túlélési arányának a növelése érdekében. Ennek köszönhetően számos radioizotóppal jelölt α -melanocita stimuláló hormon (α -MSH) analóg peptid, antitest és melanin specifikus molekula került tesztelésre. Különböző radioizotópokkal (^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a NAPamid és származékai specifikusan kötődnek a melanokortin-1 receptorokhoz (MC1-R) [10]–[14]. Az MC1-R egy G-protein-kapcsolt receptor, amely

túlexpresszáldik a melanin pozitív tumorok és a melanoma metasztázisok több mint 80%-ban, ami így alapvető biomarkere lehet ezen tumorok malignitásának és áttétképzésének a vizsgálatokor.

Az elhangzottak alapján a doktori munkám során a fő célunk az volt, hogy a ^{44}Sc előállítását, jelölhetőségét és különböző biológiai molekulákkal képzett radiotrészereinek a tulajdonságait vizsgáljuk, mind kémiaiilag, mind biológiaiilag. Ehhez, a fent leírt témákat érintve a következő feladatok elvégzését tűztük ki célul:

- Az első célunk egy, a kémiai vizsgálatokhoz és a tájékozódó biológiai mérésekhez elegendő aktivitású ^{44}Sc radioizotópot termelő $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátor megépítése és tesztelése volt. Ezen túl fontosnak tartottuk azt is, hogy a nagyobb aktivitást igénylő vizsgálatokhoz használt, ciklotronban előállított ^{44}Sc jelölési tulajdonságait összehasonlítsuk az izotópgenerátorban termeltével.
- A következő célunk egy kapilláris rendszer felépítése volt, amely segítségével a radiokémiai jelölési reakciók a kézi jelzésekhez képest gyorsabban és megbízhatóbban végezhetők el, a jelölési körülmények változtatásai mellett. Ennek segítségével különböző „referencia” kelátorok jelölését és az eredmények összehasonlítását terveztük elvégezni ^{44}Sc és ^{68}Ga felhasználásával.
- Vizsgálni kívántuk - az előzetes információk alapján - a szkandium(III)-mal történő komplexképzésre alkalmas, a nukleáris medicina területén új kelátornak számító molekula, az AAZTA jelölési körülményeit. Majd a kapott adatok tükrében a kelátort és a radiofémet biológiai markerek (c(RGDfK), BSA) jelölésére és *in vivo* PET/MRI nyomon követésére terveztük használni.
- Ezen túl vizsgálni szeretnénk volna a metasztázisok képzésére hajlamos malignus melanomát ^{68}Ga - és ^{44}Sc -jelölt DOTA-NAPamid felhasználásával. Különös figyelemmel kísérve az *in vivo* PET/MRI mérések során jelentkező biodisztribúciós eltéréseket, amelyeket a radioizotópok cseréje okozhat.

3. Irodalmi áttekintés

"Semmitől sem kell félni a világon, csupán meg kell azt érteni. Most eljött az idő, hogy még többet értsünk, hogy minél kevesebbtől féljünk"

/Maria Skłodowska-Curie/

3.1. A PET technika és a pozitron-bomló izotópok

A pozitronemissziós tomográfia (PET), illetve a kapcsolt modalitású technikái (PET/CT, PET/MRI) napjaink legfontosabb molekuláris képalkotó eljárásai közé tartoznak. A pozitron sugárzás felfedezése és a PET izotópok képalkotásban történő alkalmazása között megközelítőleg 50 évnek kellett elteltie. A képalkotást lehetővé tevő részecskét, az antielektront 1928-ban sejtette meg Paul Dirac, majd 1933-ban Carl David Anderson azonosította első antirészecskeként és nevezte el pozitronnak. A részecskét a kozmikus sugárzás tanulmányozása közben detektálták, amiért 1936-ban Andersont és Victor Franz Hesst Nobel-díjjal jutalmazták [15], [16]. Az első kísérleti berendezést, ami humán képalkotásra használt pozitron-bomló izotópot 1953-ban alkalmazták agytumor kimutatására [17]. A következő években folyamatosan fejlődött a technika, a 70-es és 80-as évekre egyre több kutatási célú berendezés épült, majd a 90-es évekre a rutin orvos diagnosztikában is megjelent [18]. Magyarországon jelenleg négy városban, Budapesten, Debrecenben, Kaposváron és Kecskeméten található PET/CT központ.

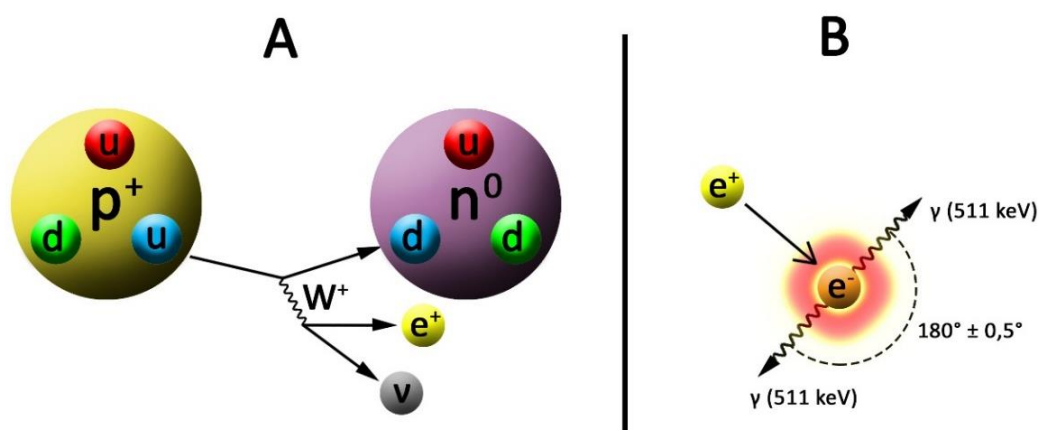
A pozitron-, vagy pozitív béta bomlás (β^+ -bomlás) során – a kedvező neutron-proton arányhoz képest - egy neutronban szegény, instabil mag egyik protonját (p^+) alkotó u-kvark átalakul egy d-kvarkká, amely egy neutront (n^0) eredményezve energetikailag kedvezőbb állapotba juttathatja a magot. A folyamat során egy kölcsönhatásokat közvetítő részecske, egy W^+ bozon keletkezik, amely rövid élettartamának köszönhetően pillanatszerűen bomlik egy pozitronra (β^+ ; e^+) és egy elektron neutrínóra (ν_e). A β^+ -bomlás bruttó folyamata az 1. és 2. egyenletekkel írható le [19].

$$p^+ \rightarrow n^0 + e^+ + \nu_e \quad (1)$$

$${}^A_Z M \rightarrow {}^A_{Z-1} D + e^+ + \nu_e \quad (2)$$

Ahol: **M** az anyaelem vegyjele, **D** a leányelem vegyjele, **A** az adott izotóp tömegszáma, **Z** az adott izotóp rendszáma

A egyenletek alapján látható, hogy a bomlás során a leányelem tömegszáma nem, csak a rendszáma változik. A keletkező neutrínó elektromágneses és erős kölcsönhatásokban nem, csak gravitációs és gyenge kölcsönhatásban vesz részt, így képalkotásban történő felhasználásra jelenleg alkalmatlan, ellentétben a pozitronnal. Amikor a keletkezett pozitron hatásos ütközést szenved el a részecskepárjával, vagyis egy elektronnal, annihiláció történik. Ezen folyamat során a részecskék nyugalmi tömegének megfelelő energia ($E_{e^+} = E_{e^-} = 511 \text{ keV}$) szabadul fel két γ -foton formájában, amelyek a kölcsönhatásban résztvevő részecskék kezdeti impulzusától függően megközelítőleg 180° -ban sugározódnak szét (1. ábra) [18], [19].



1. ábra A pozitron bomlás egyszerűsített Feynman gráfja (A); A e^+ és az e^- annihilációs folyamat (B) [20]

A PET képalkotás során nem a primer folyamatban (1. ábra, A) keletkező pozitront detektáljuk, hanem a szekunder folyamatban (1. ábra, B) keletkező γ -fotonokat, amelyek segítségével nagyobb érzékenység érhető el az egyfoton-emissziós számítógép tomográfiához képest (SPECT = Single Photon Emission Computed Tomography). A PET készülékben lévő, gyűrűszerűen elhelyezkedő szcintillációs kristály detektorok

érzékelik az annihiláció következtében keletkező gamma-fotonokat. A detektorban lévő kristályokat elérő gamma fotonok fényfelvillanásokat váltanak ki, amelyeket a fotoelektron-sokszorozók (PMT) alakítanak elektromos jellé. A PMT-k azonban nem csak elektromos jelet képeznek, hanem fel is erősítik azt, oly módon, hogy lépcsőzetesen gyorsítják az elektronokat és ütközések révén további elektronok keletkezését is generálják [21], [22]. Az analóg-digitális jelátalakító (ADC) digitális jellé alakítja az analóg jelet, ami ezután a koincidencia áramkörbe kerül, biztosítva, hogy csak azok az események legyenek valós jelként értelmezve, amelyeket a szemben elhelyezkedő detektorok egyszerre érzékelnek. A PET vizsgálatok során 2D és 3D adatgyűjtési mód is lehetséges. A 2D mód alkalmazásával kollimátort használnak az adatgyűjtés során, így a térbeli felbontás nagy lesz, azonban a fotonhozam alacsonyabb. A 3D módnál nem használnak kollimátort, így ebben az esetben a fotonhozam és a szórt sugárzás nagy lesz, viszont a térbeli felbontás kicsi. A humán klinikai gyakorlatban használatos nukleáris medicina képalkotó berendezései nagy méretük és az alább taglalt paramétereik miatt nem alkalmasak kisállatok leképezésére, ezért felmerült az igény kisállat PET kamerák megalkotására. A humán felhasználású PET készülékekhez képest a két fő különbség a térbeli felbontásban és az axiális látótér hosszúságában rejlik. Térbeli felbontás az a legkisebb távolság két pontforrás között, amelynél azok még különállónak látszanak. Míg a humán PET készülékek térbeli felbontása 3-5 mm, addig a kisállat PET berendezéseké közel 1 mm. Fontos hatás az is, hogy a felbontás csak az érzékenység rovására növelhető, amely a másodpercenkénti beütésszám [cps] és a forrás aktivitásának [MBq] hányadosaként adható meg [23].

A kapott térbeli felbontást nem csak a képalkotó berendezés paramétereit szabják meg, hanem az alkalmazott izotópok is. Ez annak köszönhető, hogy a különböző tömegszámú radionuklidok által kisugárzott e^+ részecskék energiája más-más, ami eltérő úthosszat (közepes szabad úthossz) eredményez a megfelelő közegben [19]. Ennek köszönhetően, ha kisebb energiájú pozitronokat emittáló radioizotópokat használunk, akkor a bomlás helyéhez képest térben közelebb történik meg az annihiláció, vagyis a képalkotás is pontosabb helymeghatározást szolgáltat a primer folyamat helyéről [22], [24]. A legnagyobb számban használt PET radionuklid, a ^{18}F esetén a maximális pozitron energia 634 keV, ami az egyik legkisebb pozitron energiájú PET radioizotóppá teszi. A ^{68}Ga -nak ugyanez az értéke 1899 keV, ami a képalkotás során már tapasztalható eltérést okoz a képminőségben és lokalizációban is [25], [26]. A konvencionális PET izotópokon (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) kívül manapság már számos pozitron-sugárzó radiofém preklinikai és

klinikai alkalmazásával folynak vizsgálatok [27]. Az 1. táblázatban láthatóak a jelentősebb pozitron-emittáló radionuklidok fontosabb adatai.

1. táblázat A nukleáris medicina területén alkalmazott fontosabb pozitron-bomló radioizotópok főbb fizikai tulajdonságai [24], [28], [29]

Radionuklid	Felezési idő	β^+ bomlás (%)	$E_{\beta \text{ max.}}$ (keV)
^{11}C	20,36 perc	99,8	961
^{13}N	9,97 perc	99,8	1198
^{15}O	2,04 perc	99,9	1735
^{18}F	1,83 óra	96,9	634
^{44}Sc	3,97 óra	94,3	1474
^{52}Mn	5,6 nap	98,2	576
^{64}Cu	12,7 óra	17,5	653
^{68}Ga	67,83 perc	87,7	1899
^{82}Rb	1,26 perc	83,3	3381
^{89}Zr	3,27 nap	22,8	902

A leggyakrabban alkalmazott PET radioizotópnak, a ^{18}F -nak a felezési ideje kedvező a napi rutin betegellátáshoz, a pozitron bomlás statisztikai valószínűsége igen nagy, ráadásul alacsony a maximális pozitron energiája. A hátránya a radiofémekkel szemben, hogy kovalens módon kell kapcsolni a vizsgálni kívánt molekulához, ami adott esetekben komplikáltabbá teszi a jelölési reakciókat. Ezen túl csak ciklotronban állítható elő és nehezebben megvalósítható vele az úgynevezett „radioaktív készlet” (kit) alapú előállítást. A kittek meghatározása a radioaktív készítményekről szóló rendelet alapján a következő [30]:

„Készletek (kittek) radioaktív gyógyszerkészítményekhez: minden olyan készítmény, amelyből a radioaktív gyógyszerkészítmény felhasználásra kész formáját – rendszerint közvetlenül a gyógyászati alkalmazás előtt – feloldással vagy radionuklidok hozzáadásával készítik el.”

Vagyis egy-két lépésben végrehajtható jelölés, amely végeztével a termék azonnali felhasználásra kerülhet, további tisztítási lépések nélkül. A ^{18}F radiofarmakonok esetén ez nehezebben kivitelezhető, ezért a nem fém radioizotópok esetén inkább a szintézis modulok nyertek teret, amelyek a többlépéses szintéziseket automatizáltan hajtják végre [31]. A szintézis modulokkal nyert tapasztalatok viszont ugyanúgy alkalmazhatók radiofémek esetén, illetve ezeken belül is alternatív lehetőséget kínálnak a kapilláris, vagy mikrofluidikai rendszerek, amelyeket a 3.3. pontban részletezek.

3.2. Radioizotóp generátorok működése és felhasználása

A radioaktív készítményekről szóló rendeletben szereplő meghatározás alapján a radioizotóp generátor a következő [30]:

„Radionuklid generátorok: minden olyan rendszer, amely meghatározott anyaradionuklidot (anyaelem) foglal magába; ez az anyaradionuklid leányradionuklidot (leányelem) termel, amelyet elúcióval vagy egyéb módszerrel nyerünk és radioaktív gyógyszerkészítményekben alkalmazunk.”

Az első orvosi célra gyártott, radionuklid generátorként alkalmazott anyaelem-leányelem páros az 1951-ben publikált $^{132}\text{Te}/^{132}\text{I}$ volt, amelyet pár évre rá követett a ma is széles körben alkalmazott $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ izotópgenerátor [32]. 1961-ben már elvégezték az első humán kísérleteket [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] TcO_4^- segítségével, ahol a radiotrészter metabolizációját vizsgálták és összehasonlították az akkoriban alkalmazott jód radioizotópokkal (^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{132}I) [33]. Napjainkig megközelítőleg 50 különböző anyaelem-leányelem párosból készítettek az egészségügyben is használható radionuklid generátorokat [32], [34]. A 2. táblázatban látható azon radionuklid generátorok összefoglalása, amelyek a nukleáris medicina diagnosztikai területén alkalmazhatók SPECT és PET képalkotásra. Itt megfigyelhetjük, hogy a „kényelmes” munkavégzéshez szükséges, hozzávetőleg minimum 1 órás felezési idővel mindössze 4 leányelem (^{44}Sc , ^{68}Ga , ^{72}As , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) rendelkezik.

2. táblázat A SPECT és PET képalkotás során potenciálisan felhasználható radionuklid generátorokat alkotó izotópok főbb tulajdonságai [32], [34]

Generátor	Anyaelem		Leányelem		Felhasználás
	Felezési idő	Emittálás módja	Felezési idő	Emittálás módja	
$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$	60,3 év	EC	3,97 óra	β^+	PET
$^{52}\text{Fe}/^{52\text{m}}\text{Mn}$	8,28 óra	β^+	21,1 perc	β^+	PET
$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$	9,26 óra	EC	9,74 perc	β^+	PET
$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$	270,8 nap	EC	67,83 perc	β^+	PET
$^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$	8,4 nap	EC	1,08 nap	β^+	PET
$^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$	25,6 nap	EC	1,27 perc	β^+	PET
$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	65,92 óra	β^-	6,01 óra	γ	SPECT
$^{128}\text{Ba}/^{128}\text{Cs}$	2,43 nap	EC	3,62 perc	β^+	PET
$^{134}\text{Ce}/^{134}\text{La}$	3,16 nap	EC	6,4 perc	β^+	PET

A különféle radionuklid generátorok viszonylag kis száma azzal magyarázható, hogy több feltételnek is teljesülnie kell, ahhoz, hogy egy napi rutinban használható, hosszú élettartamú rendszer álljon elő. A legfontosabb, hogy az anyaelem (1) és a leányelem (2) felezési ideje ($t_{1/2}^1$, $t_{1/2}^2$) meghatározott mértékben arányuljon egymáshoz. A leányelem aktivitása a 3. és 4. egyenletben leírtak alapján számolható adott időpillanatban.

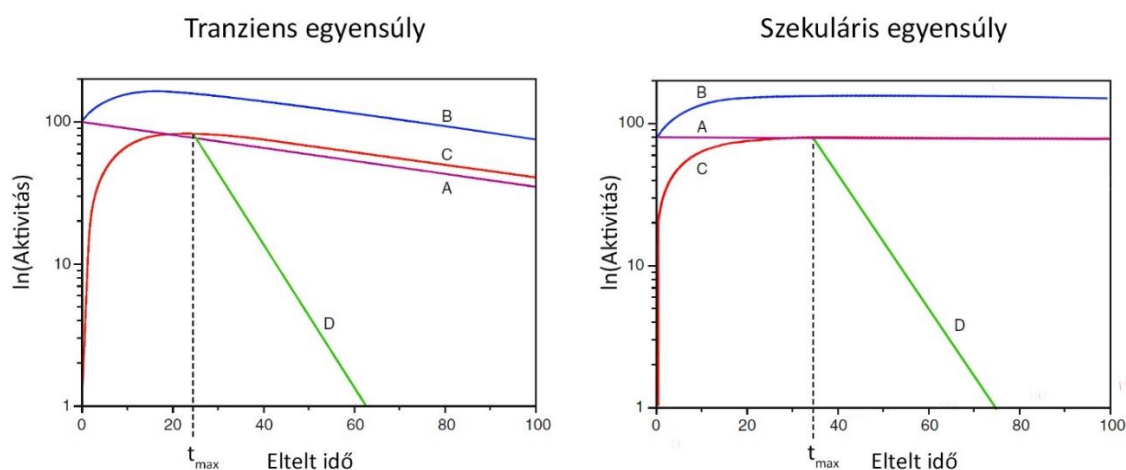
$$\lambda_1 = \frac{\ln 2}{t_{1/2}^1}; \quad \lambda_2 = \frac{\ln 2}{t_{1/2}^2} \quad (3)$$

$$A_2 = \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} A_1^0 (e^{-\lambda_1 \Delta t} - e^{-\lambda_2 t}) + A_2^0 e^{-\lambda_2 \Delta t} \quad (4)$$

Ahol: λ a bomlási állandó, $t_{1/2}$ a felezési idő, A_2 a leányelem t időpontbeli aktivitása, A_1^0 és A_2^0 az anyaelem és a leányelem t_0 időpontbeli aktivitása, λ_1 és λ_2 az anyaelem és a leányelem bomlási állandója, míg a Δt a t és t_0 időpontok között eltelt idő.

Ennek tükrében négy fő eset állhat elő. Az első esetben a leányelem felezési ideje nagyobb, mint az anyaelemé ($t_{1/2}^1 < t_{1/2}^2$), így az anyaelem igen gyorsan elbomlik. A második eset, amikor a vizsgált izotópok megközelítőleg egyenlő felezési idővel rendelkeznek ($t_{1/2}^1 \approx t_{1/2}^2$), így közel megegyező sebességgel bomlanak el. A harmadik és

a negyedik esetben az anyaelem felezési ideje nagyobb, vagy sokkal nagyobb, mint a leányelemé ($t_{1/2}^{(A)} > t_{1/2}^{(B)}$), így adott idő elteltével egy egyensúly alakul ki a rendszerben, [19], [32]. Abban az esetben tranziens egyensúlyról beszélünk, amikor $t_{1/2}^{(A)} > t_{1/2}^{(B)}$, de $t_{1/2}^{(A)} \leq 10 \times t_{1/2}^{(B)}$ feltétel teljesül, vagyis az anyaelem felezési ideje maximum tízszerese a leányelem felezési idejének. Ebben az esetben a generátorról történő kinyerés során a leányelem felezési idejének az időskáláján belül már érzékelhető az anyaelem bomlásából adódó aktivitás csökkenése (2. ábra). Szekuláris egyensúlyról pedig akkor beszélünk, ha $t_{1/2}^{(A)} \gg t_{1/2}^{(B)}$, és $t_{1/2}^{(A)} \geq 10 \times t_{1/2}^{(B)}$, vagyis az anyaelem bomlásának mértéke megközelítőleg elhanyagolható a leányelem felezési idejéhez képest (2. ábra). Leginkább a szekuláris egyensúllyal leírható rendszereket felhasználva tudunk izotópgenerátorokat létrehozni. A kialakítás másik fő szempontja, hogy az anyaelem megköthető legyen egy szilárd hordozón és arról a leányelem, a megfelelő, lehetőleg nem toxikus eluens segítségével szelektíven eluálható legyen.



2. ábra Izotóppárok tranziens és szekuláris egyensúlyának lefutása az eltelt idő és az adott izotóp aktivitásának a függvényében. [az anyaelem aktivitása (A); az anyaelem és a leányelem aktivitásának az összege (B); a leányelem aktivitása (C); az anyaelemtől elválasztott leányelem aktivitása (D); legnagyobb eluálható aktivitáshoz tartozó legkisebb időpillanat (t_{max})] [19]

A PET izotópot termelő generátorok közül a legtöbbet alkalmazott a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ rendszer. Itt kezdetben Al_2O_3 állófázist használtak 0,005 M-os EDTA eluenssel [35], [36], majd később egyéb fém-oxidokkal (pl., Sb_2O_5) és különböző komplexképző eluensekkel is végeztek kutatásokat [37]. Az újgenerációs $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuklid generátorok megközelítőleg 10 éve érhetők el kereskedelmi forgalomban, amelyek állófázisa TiO_2 , SnO_2 , vagy szerves gyanta, eluálásuk pedig többnyire HCl oldattal történik (0,05–1 M).

Manapság ígéretesnek látszik az ITG által gyártott $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátor (3. ábra), amely dodecil-galláttal módosított szilikagél tartalmaz. Mivel nem fém-oxid alapú a generátor, így az eluátumban lévő szennyező fémek mennyisége a specifikáció alapján egy esetben sem haladja meg $10\text{ }\mu\text{g}/\text{GBq}$ koncentrációt [38]. Ezen túl az eluálószer 0,05 M-os HCl oldat, ami megkönnyíti a radiokémiai jelölések során az eluátum puffereklését, így kisebb só koncentráció érhető el a termékelegekben. Az anyaelem közel 271 napos felezési idejének köszönhetően 1-1,5 évig használható a generátor, kielégítő mennyiségű ^{68}Ga -ot termelve, ami 8 órás munkaidő alatt akár háromszor is eluálható.



Generátor specifikációk	
Kolonna állófázis	Dodecil-galláttal módosított szilika gél
Elsődleges borítás	PEEK kolonna
Másodlagos borítás	Ólom konténer (vastagság: 36-50 mm)
Eluens	Steril, 0,005 M HCl oldat
Elúciós térfogat	4 ml
Elúciós hozam	Nem kevesebb, mint 80 %
Elúció sebessége	1-5 ml/perc
Élettartam	12 hónap, vagy 250 elúció
Elérhető méretek	0,3-2,0 GBq

Eluens specifikációk	
Kémiai forma	$^{68}\text{GaCl}_3$ 0,05 M-os HCl-ban
Megjelenés	Tiszta, színtelen oldat
Térfogat	4 ml
Eluátum kémiai tisztaság	$\text{Fe}/\text{Cu}/\text{Nb}/\text{Ni}/\text{Pb}/\text{Zn}/^{68}\text{Ga} \leq 10\text{ }\mu\text{g}/\text{GBq}$
Eluátum lauril-gallát tartalom	$\leq 5\text{ ppm}$
Radiokémiai tisztaság	$\geq 95\%$ $^{68}\text{Ga Ga}^{3+}$ formában
Eluátum radionuklid tisztaság	Az aktivitás min. 99,9 %-a ^{68}Ga
^{68}Ge és γ -emittáló szennyezők	$\leq A$ teljes aktivitás 0,005 %
^{68}Ga specifikus aktivitás	Hordozómentes
Mikrobiológiai státusz	Steril
Bakteriális endotoxinok	$\leq 20\text{ EU/ml}$

3. ábra Az ITG (Németország) $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuklid izotópgenerátor és az eluensének a specifikációi, illetve fontosabb paraméterei

Az eluátum közvetlenül is használható jelzésekhez, de jobb jelölhetőség és nagyobb moláris aktivitás elérése érdekében további tisztítási és töményítési eljárások is szükségesek lehetnek. Az irodalomban leírt főbb $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ tisztítási módszerek három nagy csoportba sorolhatók:

Anioncserés tisztítás: Ezen tisztítás során a generátor eluátumot olyan mennyiségű és koncentrációjú HCl, vagy NaCl oldattal keverjük, hogy a keletkező oldat 5,5 M-os legyen. Ilyen kloridion koncentráció mellett a $[\text{}^{68}\text{GaCl}_4]^-$ forma van jelen az oldatban, így egy erős anioncserélő segítségével adszorbeálni lehet. 5,5 M-os HCl, vagy NaCl oldattal történő mosás és N_2 gázzal való lefűtatást követően víz segítségével eluálható az

ioncserélő oszlop [39], [40]. Az eljárás előnye, hogy igen kis térfogatban áll elő a $^{68}\text{GaCl}_3$ oldat, vagyis az aktivitáskoncentráció magas, viszont a ^{68}Ge -on kívül sok más fémion szennyezőtől (pl.: Zn(II) és Fe(III)) nem tudunk megszabadulni.

Kationcserés tisztítás: Napjainkban a leginkább alkalmazott tisztítási módszer, ahol számos gyantát és töltetet próbáltak már ki, hogy minél tisztább $^{68}\text{Ga(III)}$ oldat álljon elő az eljárás végén. A módszer inkább a kisebb savkoncentrációk mellett (0,1-0,05 M) eluálható generátorok esetén alkalmazható, ahol az adszorbeálható fémionok kationos formában vannak. Ennek köszönhetően az eluátum közvetlenül felvihető a kationcserélő oszlopra, majd megfelelő mosási lépések után a meghatározott összetételű oldószerkeverékekkel eluálható. Zhernosekov és mtsai. [41] AG 50W-X8 kationcserélő gyanta tisztító hatásfokát vizsgálták Ga(III) -ra, Ge(IV) -re, Zn(II) -re, Ti(IV) -re és Fe(III) -ra nézve. Eredményeik alapján az eluátum felvitelét követően a töltetet 80% aceton/0,15 M HCl oldatával kell mosni, majd 97,6% aceton/0,05 M HCl oldattal eluálni. A módszer előnye, hogy 1 ml alatti térfogatban áll elő az aktív $^{68}\text{Ga(III)}$ törzsoldat, a feltüntetett szennyező fémionok nagy részétől mentes lesz, illetve kicsi a savkoncentrációja, ami könnyíti a pufferelést a jelölések során. A hátránya, hogy acetont tartalmaz, ami befolyásolhat egyes jelölési reakciókat, illetve toxikussága miatt szigorú ellenőrzések végrehajtása szükséges az élő szervezetbe történő bejuttatás előtt. A hátrányokat kiküszöbölendő Eppard és mtsai. [42] eltérő kationcserélő gyantákat vizsgáltak etanolt tartalmazó eluens felhasználásával. Azt találták, hogy az AG 50W-X4 kationcserélő bizonyult a leghatékonyabbnak a $^{68}\text{Ga(III)}$ adszorpciójára, deszorpciójára és a szennyező fémionok eltávolítására. Ehhez a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuklid generátorról eluált oldatot az ioncserélőre felvitték, majd a töltetet 80% EtOH/0,15 M HCl oldattal mosták, végül pedig 90% EtOH/0,9 M HCl oldatával eluálták. Ezen módszer előnye az acetont alkalmazóval szemben, hogy a kevésbé toxikus etanolt használja, ami ezen túl a gyökfogó képességének köszönhetően csökkenti az autoradiolízisből adódó kémiai bomlás mértékét. A hátránya, hogy töményebb HCl koncentrációt igényel az eluálás során, ami így nagyobb puffer mennyiséget követel meg a jelölések során a megfelelő pH beállításokhoz.

Frakcionált elválasztás: Egy igen egyszerű módja az eluátumban lévő szennyezők mennyiségének a redukálására. Mivel az ioncserés tisztítási eljárások során a generátorból kinyert teljes térfogatot felhasználjuk, az eluátumban lévő összes szennyező koncentrációját is növelhetjük, ha nem megfelelő a tisztítás. Ennek elkerülésére a

radionuklid generátort frakcionáltan, 1-1 ml-enként eluáljuk, majd kiválasztjuk a legaktívabb frakciót és ezt használjuk jelzési reakciókhoz [43]. A módszer előnye, hogy gyors (mivel kihagyja az ioncsere lépéseit) és közepes a szennyező koncentráció a többi módszerhez képest. Hátránya viszont, hogy az eluálható aktivitás egy nagyobb részét el kell dobni, így kisebb lesz az aktivitáskoncentráció a másik két módszerhez képest.

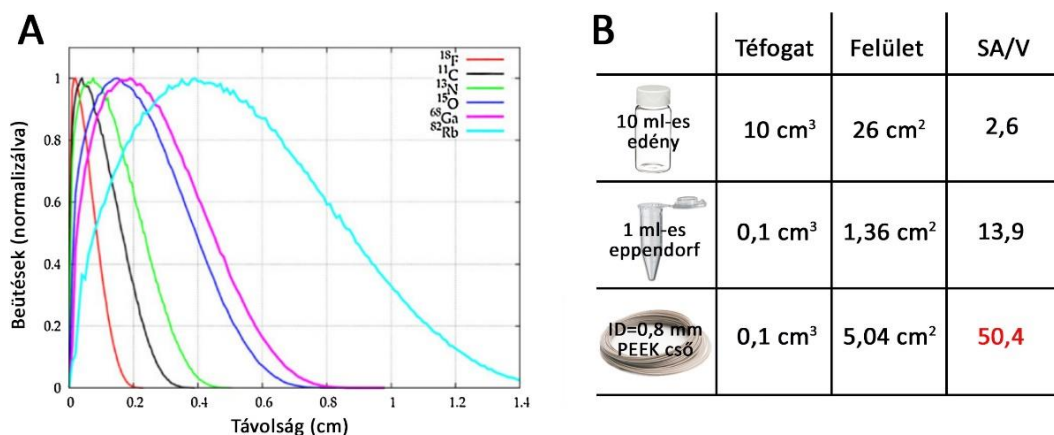
A másik, napjainkban egyre több kutatóközpont érdeklődését felkeltő izotóp a ^{44}Sc , amely egyaránt előállítható ciklotron és $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ radionuklid generátor segítségével. Már 1965-ben megemlítik a ^{44}Ti segítségével létrehozható izotóp generátor elvét, de még csak potenciálisan kifejleszthető rendszerként szerepel [44]. Már 1968-ban megkezdődtek a kísérletek [45], de az első nagy aktivitású (185 MBq), preklinikai vizsgálatokhoz is felhasználható generátor kialakításának és alkalmazásának a menetét csupán 2010-ben írták le [46]. A szükséges ^{44}Ti anyaelemet ciklotronban, $^{45}\text{Sc}(p,2n)^{44}\text{Ti}$ magreakcióval állították elő, majd elválasztották a terméket az inaktív szkandiumtól, hogy növeljék a $^{44}\text{Sc}/^{45}\text{Sc}$ arányt, azaz a specifikus aktivitást. A többlépcsős tisztítási lépéseket követően egy kolonnába töltötték az anyaelemet és kidolgoztak egy eluens összetételt, amivel megfelelő szelektivitással lehet a ^{44}Sc leányelemet eluálni. A radionuklid generátor töltete AG 1-X8 (Biorad) ioncserélő gyanta, míg az eluálószer 0,07 M HCl/0,005 M oxálsav oldata. Az eluens oxálsav tartalma, illetve az esetleges fém szennyezők jelentősen befolyásolhatják a jelölési reakciókat, így elengedhetetlen az eluátum tisztítása, koncentrációja. Ehhez Pruszyński és mtsai. AG 50W-X8 (200-400 mesh, H^+) kationcserélő gyantát alkalmaztak, ami 98%-ban adszorbeálta a felvitt $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ -at. A mosási lépéseket követően 0,25 M, pH = 4, NH_4OAc segítségével eluálták a radioizotópot [47]. Az eljárás során 10% veszteséget írtak le, viszont az aktivitáskoncentráció közel a háromszorosára nőtt a 3 ml-es végtérfogatnak köszönhetően.

A másik előállítási módszer a ciklotronban történő előállítás, amely során a $^{44}\text{Ca}(p,n)^{44}\text{Sc}$ magreakciót hajtják végre. A természetben fellelhető kalcium 2,086%-át alkotja a 44-es tömegszámú Ca radioizotóp [48], aminek köszönhetően nem feltétlenül szükséges izotópdúsított minták besugárzása. Ebben az esetben természetes izotóp összetételű fém kalciumot pasztillává préselnek, majd céltárgyként alkalmaznak (16 MeV, 25 μA), ahol a besugárzást követően a keletkező szkandium izotópok 95,7%-át képi a ^{44}Sc radioizotóp [49]. A másik esetben 96,9%-ban izotópdúsított $^{44}\text{CaCO}_3$ pasztillákat alkalmaznak, amelyek a magreakció után nagyobb radionuklid tisztaságot tudnak garantálni [50].

3.3. A mikrofluid és kapilláris technikák alkalmazása a radiokémiában

A „konvencionális” kémiai reakciók során közel sztöchiometrikus arányokat, vagy egymástól kis mértékben eltérő koncentrációviszonyokat alkalmaznak. Ezzel ellentétben a radiokémiai jelölési reakciókban a radioizotóp koncentrációja (fM-pM) több nagyságrenddel kisebb, mint a jelölendő prekursoré (μM -mM). Az inaktív reagens nagy feleslege miatt a koncentrációja és annak a változása alapesetben konstansnak tekinthető a radioizotóp koncentrációjához képest, ami pszeudo elsőrendű reakciókinetikát eredményez [51]. A leírtaknak megfelelően az inaktív prekursor koncentrációja bizonyos mértékig csökkenthető anélkül, hogy az a jelölés hatásfokának romlását okozná. Ennek ellenére a nukleáris medicina területén használt szintézis modulok nagy holtterfogatainak köszönhetően akár 1-10 mg inaktív hatóanyagot is felhasználnak egy jelzési reakció során. A modulokkal gyártott radiofarmakonok esetén a használt izotópok általában a ^{18}F , ^{11}C és ^{68}Ga , amelyek felezési ideje rendre 109,8 perc, 20,3 perc és 67,8 perc, így a rendszer gyártási ciklusideje kritikus paraméter. Az 5-20 ml-es térfogatoknál már számottevő időt vesz igénybe a folyadékok mozgatása, a reaktorba kerülő elegy felmelegítése, a termék tisztítása és szükség esetén a bepárlása. Ezen túl a kereskedelmi forgalomban kapható modulok nagy részéhez nincs on-line analitika kapcsolva, ami külön minőségellenőrzési folyamatokat tesz szükségessé. Egy másik kritikus paraméter a felület/térfogat arány (surface-area/volume = SA/V), aminek a befolyásoló hatása - különösképpen a nagy aktivitások alkalmazásakor - nem elhanyagolható [52], [53]. Az ilyen aktivitások velejárója az önradiolízis, amely során a molekulába beépült radioizotóp sugárzása - függően annak fajtájától és energiájától - gerjesztheti, ionizálhatja és a kémiai kötéseit hasíthatja a kiindulási, vagy a szomszédos molekuláknak. Ennek hatására reaktív részecskék, például gyökök jönnek létre, amelyek további kölcsönhatásokon keresztül roncsolhatják a jelölt molekulát, így okozva dekompozíciót és adott funkciók elvesztését. Minél kisebb az SA/V értéke, annál nagyobb az adott felülethez tartozó térfogat, ami megnöveli a valószínűségét, hogy az emittált részecske még az oldatban elnyelődik és annak valamely alkotójával kölcsönhat, így okozva kémiai változást a rendszerben. Kapilláris alkalmazása esetén ez az érték megnő, így az említett kölcsönhatás statisztikailag valószínűsége lecsökken. Ahogy azt a 4. ábra „A” részén láthatjuk a ^{68}Ga által kibocsátott pozitron legnagyobb valószínűséggel 0,2 cm távolságot megtéve annihilálódik, de a maximális hatótávolsága vízben akár 0,8 cm is lehet. Ennek tükrében

kijelenthetjük, hogy egy átlagos, 10 ml-es reakcióedényben a „folyadékhenger” belsejéből nem jut ki részecske, a mintában nyelődik el, amit az alacsony SA/V érték (2,6) is sugall. 1 ml-es Eppendorf edény esetén az érték (13,9) már megközelítőleg ötszörös, míg a kapilláris rendszereket tekintve ez az arányszám (50,4) már ötvenszeres, aminek következtében az önradiolízis jelenségével kisebb mértékben kell számolnunk (4. ábra, B).



4. ábra Különbféle PET radioizotópok pozitron hatótávolsága [54] (A), illetve a jelölések során használt eszközök térfogata, belső felülete és SA/V hányadosa (B)

A felsorolt problémák orvoslására kínálnak lehetőséget a mikrofluid és kapilláris rendszerek. George M. Whitesides és Katherine S. Elvira megfogalmazása alapján a mikrofluidika az a tudományág és technológia, amelyben kis térfogatú (10^{-9} - 10^{-18} liter) folyadékokkal végzünk munkát 10-500 μm belső átmérőjű csatornák, vagy csövek segítségével. Ezen túl a Reynolds-szám és a hőtranszferre vonatkoztatott Pécelet-szám (5. és 6. egyenlet) 250 és 1000 között helyezkedik el [55], [56].

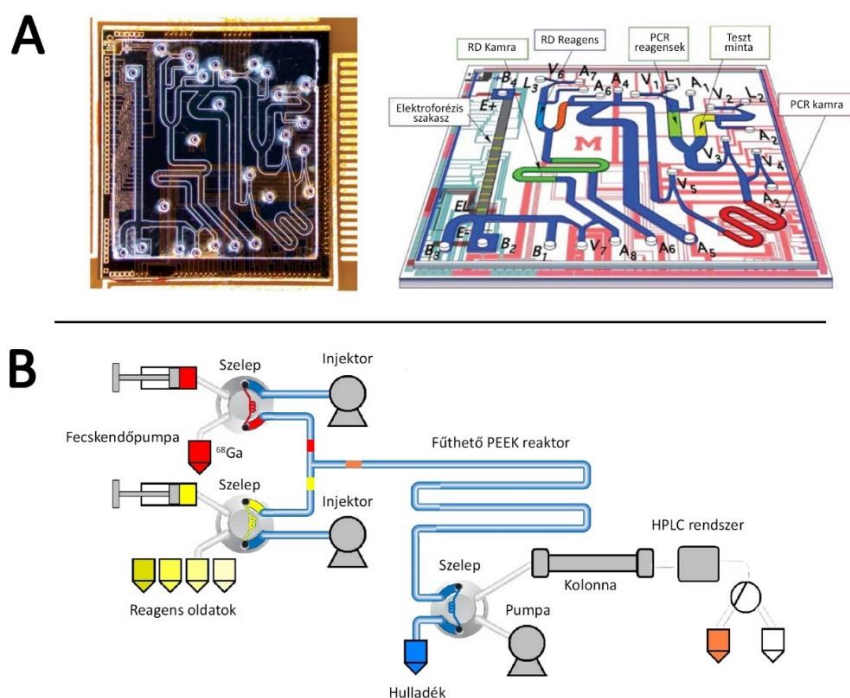
$$Re = \frac{v \cdot l}{\nu} = \frac{\rho \cdot v \cdot l}{\eta} \quad (5)$$

$$Pe_L = \frac{\rho \cdot v \cdot d \cdot C_p}{k} \quad (6)$$

ahol, **Re** a Reynolds-szám, **v** az áramlási sebesség, **l** a rendszer karakterisztikus hossz mérete, **ρ** a közeg sűrűsége, **ν** a kinematikai viszkozitás, **η** a dinamikai viszkozitás, **Pe_L** a hőtranszferre vonatkozó Pécelet- szám, **d** a csatorna vagy kapilláris belső átmérője, **k** a folyadék hővezetőképessége, **C_p** pedig a folyadék specifikus hőkapacitása.

Az így előálló rendszerek számos előnnyel szolgálnak, mint például: kis reagens térfogatok, gyors és reprodukálható lamináris folyadékmozgatás, hatékony keveredés és homogén hő-transzfer. Radiokémiai szempontból pedig igen fontos, hogy nagy aktivitáskoncentráció mellett biztosít csökkentett mértékű önradiolízist [56]–[58]. Egy fontos lehetőség még a mikrofluidikai rendszerek esetén, hogy folyamatos áramoltatás (continuous flow) mellett analitikai berendezésekhez kapcsolhatók [59], [60]. Így a reagensek felszívása, keverése, a reakciókörülmények beállítása, az analitikai vizsgálatok elvégzése és akár a termék formulázása is történhet egy automatizált rendszeren belül.

A mikrofluidikai berendezéseket működésük alapján két fő csoportba sorolhatjuk: mikro-csatorna rendszerek (Micro-Channel System = MCS), illetve mikro-edény rendszerek (Micro-Vessel System = MVS). Az MCS esetében beszélhetünk a folyamatos áramlású, chip, vagy kapilláris rendszerekről, míg az MVS működése a hagyományos reakciók léptécsökkentésén alapszik [51] (5. ábra). Ezen túl külön kezelhetjük az MCS rendszereken belül a chip-alapú reaktoroktól eltérő, kapillárisokat, váltószelepeket és HPLC pumpákat használó típusokat [61], [62]. Habár az első mikrofluidikai közlemény az 1940-es években jelent meg, a terület iránti érdeklődés az 1990-es években kezdett felívelni és a népszerűsége napjainkban is töretlen [63].



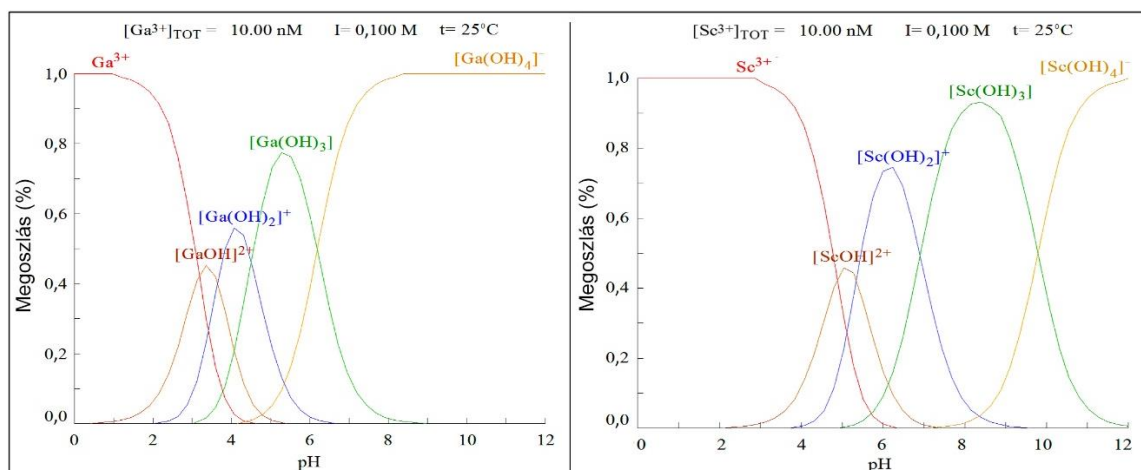
5. ábra Egy MCS chip alapú reaktor fényképe és elvi felépítése [64] (A). Egy HPLC berendezéssel egybekötött kapilláris szintézis rendszer elvi felépítése [61], [65] (B)

A mikrofluidika segítségével előállított ^{18}F -FDG, ^{18}F -FLT és egyéb ^{18}F tartalmú markerekkel egyre több tanulmány foglalkozik [52], [58], [64], [65], de radiofémekkel végzett mikrofluidikai közleményekből igen kevés található. Az ezekben elhangzottak is kecsegtetővé teszik ezen rendszerek használatát, mivel igen gyors, megbízható és anyagtakarékos előállítást tesznek lehetővé, ami elengedhetetlen egy radiofarmakon széleskörű elterjedéséhez [61], [66], [67]. A közlemények kis száma halmozottan igaz a ^{44}Sc radioizotópra, amellyel kapcsolatos, hasonló témájú publikációk nem voltak találhatóak a dolgozat írásakor. Pedig új radiofémek, vagy potenciális fémkötő kelátorok esetén igen gyorsan és anyagtakarékosan végezhetők optimalizálási reakciók [66]. Ezen túlmenően a kézi jelölésekkel összehasonlítva megbízhatóbb adatokat szolgáltatnak az ily módon automatizált rendszerek, így az eredményeik is összehasonlíthatóbbak. Ennek következménye, hogy egy adott radiofém esetén könnyebben választhatjuk ki a fémion megkötésére legalkalmasabb kelátort, amivel a reakciókörülmények, a prekursor felhasználás és a kémiai, illetve radiokémiai hozamok is optimalizálhatók. Ezen túl egyes rendszerek, a megfelelő beállítások mellett preparatív előállítást és a hozzájuk kapcsolt analitikai berendezéseknek köszönhetően on-line minőségellenőrzést is el tudnak végezni.

3.4. A ^{68}Ga - és ^{44}Sc -jelölt biológiai markerek

A nukleáris medicina területén legnagyobb számban használt PET radioizotóp a ^{18}F , amelynek előnyeit és hátrányait már tárgyaltam a 3.1. pontban. A ^{18}F radioizotóppal ellentétben a radiofémek esetében kihasználhatjuk a komplexképző sajátosságukat, amely segítségével egy-két lépéses előállítási reakciók válnak lehetségessé. A fémionok komplexképződési reakcióit sok, a fémionra és a ligandumra jellemző paraméter (pl.: oxidációs állapot, donorumok típusa, „hard-soft” tulajdonság, hidrolitikus tulajdonságok) határozza meg. A szkandium a periódusos rendszer 3. csoportjában, míg a gallium a 13. csoportjában található. Ezen túl mindkét elem a 3. periódusban helyezkedik el és vegyületeikben szinte kizárólag +3 oxidációs állapotban vannak jelen. A szkandium ($[\text{Ar}] 3d^1 4s^2$) a legkisebb rendszámú átmenetifém, így esetében nyílik meg elsőnek a 3d alhéj, míg a galliumot ($[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^1$) nézve ez az alhéj már lezárt. Mind a Sc(III), mind a Ga(III) hard sav, mivel a viszonylag kis ionsugárhoz (Ga^{3+} : 62 pm; Sc^{3+} : 75 pm) nagy töltés társul (+3). A Ga(III) és a Sc(III) fémionok között a számunkra egyik

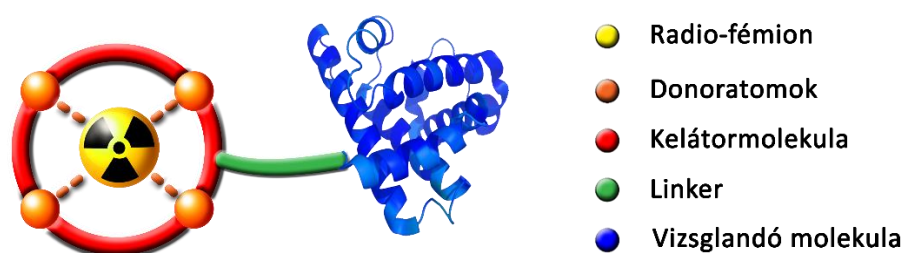
legfontosabb különbség a hidrolitikus tulajdonságokban keresendő. Amennyiben a fémionok lépcsőzetes hidrolízisének a pH függését vizsgáljuk a stabilitási állandók segítségével (6. ábra), akkor eltérés mutatkozik a különböző hidroxo-formák koncentráció eloszlásában.



6. ábra A Sc(III) és Ga(III) fémionok hidroxo komplexeinek stabilitási állandói [68] segítségével ábrázolt lépcsőzetes hidrolízis a pH függvényében (ábrázolás: Medusa szoftver)

A gallium esetén fiziológiás só-koncentrációk mellett a komplexképzéshez leginkább kedvező forma, a Ga^{3+} megközelítőleg pH = 3-ig van jelen 50%-ot meghaladó arányban. Már pH = 2-nél megjelenik a $[\text{GaOH}]^{2+}$ forma, majd tovább növelve a pH-t a többi hidroxo-komplexek is megjelenik. Már pH = 4-nél látható a $\text{Ga}(\text{OH})_3$ csapadék, ami a pH = 5-6-ot elérve közel 100%-ban lesz jelen. Csapadék révén ez a forma nagy mértékben gátolja a komplexképződést. Ennek köszönhető, hogy a galliummal jellemzően a pH = 2-4 tartományban végeznek komplexképzési reakciókat. A szkandium esetén a hidrolízis folyamata egy nagyságrenddel nagyobb hidroxidion koncentrációnál indul el, azt eredményezve, hogy a komplexképzésre alkalmas pH-tartomány kitágul (pH = 2-6). Ezen túl a szintén csapadék $\text{Sc}(\text{OH})_3$ pH = 7 esetén csak megközelítőleg 50%-ban van jelen a többi formához képest. A leírtak mellett hangsúlyozandó, hogy ezen mérések rendre mM-os fémion koncentráció mellett zajlottak, ami akár 10 nagyságrenddel nagyobb érték is lehet, mint a radioizotópok koncentrációja a jelölések során. Ezért a makroszkopikus mérések ugyan hasznos információkkal tudnak szolgálni, de a radiokémiai munka során minden körülmények között indokolt a széleskörű optimalizálás.

A leírt komplexkémiai reakciókat használjuk ki, úgy, hogy az alkalmazott radionuklidot egy megfelelő bifunkciós kelátor segítségével kapcsoljuk a vizsgálni kívánt biológiai trészerekhez. A 7. ábra vázlatosan szemlélteti az általános felépítését egy ilyen molekulának. A radiofém a gyűrűs, vagy nyílt láncú bifunkciós kelátorhoz kötve foglal helyet a donortatomok (O, N, P, S stb.) által koordinálva. A linker köti össze a fémmegkötő centrumot és a nyomon követni kívánt molekulát, illetve a kémiai tulajdonságainak a változtatásával lehetővé teszi a molekula tulajdonságainak a finomhangolását.



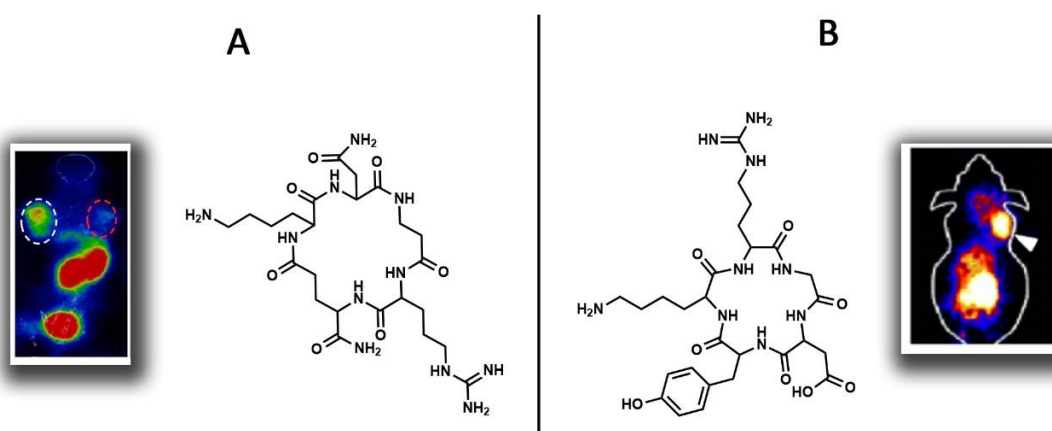
7. ábra A radiofémekkel jelölt molekulák vázlatos felépítése és funkciós részeinek megnevezése

Ennek köszönhetően igen sok molekula vizsgálható a megfelelő bifunkciós kelátor konjugálásával, ami megsokszorozza a különféle ligandumokkal végzett vizsgálatok számát [1]. A ^{68}Ga és ^{44}Sc esetén az egyik legkutatottabb terület a peptidekkel és származékaikkal foglalkozó ág.

Az egyik legelső, és még mindig az érdeklődés középpontjában lévő téma a neuroendokrin tumorok diagnosztikája és terápiája. Ezen tumorsejtek nagy számban expresszálnak specifikus receptorokat, amik közül az egyik legjelentősebb a szomatosztatin receptor, amely targetálására $^{68/67}\text{Ga}$, ^{90}Y és egyéb izotópokkal jelölt radiotrészereket fejlesztettek az elmúlt 25 évben [69], [70]. Ilyen volt a desferal-octreotide, illetve később a DTPA-octreotide peptid származékok, amellyel az ígéretes preklinikai eredmények után a további vizsgálatok megtorpantak, köszönhetően a vérből történő lassú kiürülésének [71], [72]. Ezzel egyidejűleg elindult a gallium(III) szelektív komplexképzésére alkalmas kelátorok kutatása is (DOTA, NOTA, DOTA-GA, NODA-GA, NOPO, TRAP stb.), amelyek maguk után vonták a különféle peptidekkel alkotott származékaik biodisztribúciójának a feltérképezését. Szomatosztatin receptort targetáló

származékok a DOTA-TOC, DOTA-TATE, illetve a DOTA-NOC, amelyek vizsgálata a mai napig folyik [73], [74].

Egy másik, nagy számú közleményt felölelő terület az angiogenikus folyamatokkal foglalkozó ág. Fontossága abban rejlik, hogy a tumorok nagy százalékánál a növekedés magával vonja a lokális hipoxiás és iszkémiás területek kialakulását, amely indukálja a daganatban lévő angiogenikus folyamatok serkentését. Ezen folyamat monitorozása és megismerése lehetőséget adhat olyan tumorelleses szerek kifejlesztésére, amelyek gátolhatják a tumor növekedését. Ezen túl jobb rálátást adhat a metasztatikus folyamatok természetére, hiszen adott daganatok metasztatikus hajlama egy méretet elérve kritikusan megnő. Ezért, többek között az a folyamat felelős, amely során a hipoxiás területek olyan mértékben megnövekednek, amit az angiogenikus folyamatok már nem tudnak ellensúlyozni, emelve az áttétképző hajlamot [74], [75]. Az angiogenezis vizsgálatára alkalmas peptidek közül a két legfontosabb családot az RGD- és az NGR-származékok jelentik (8. ábra), amelyek különböző receptorokhoz kötődve bepillantást engednek ezen biológiai folyamatokba.

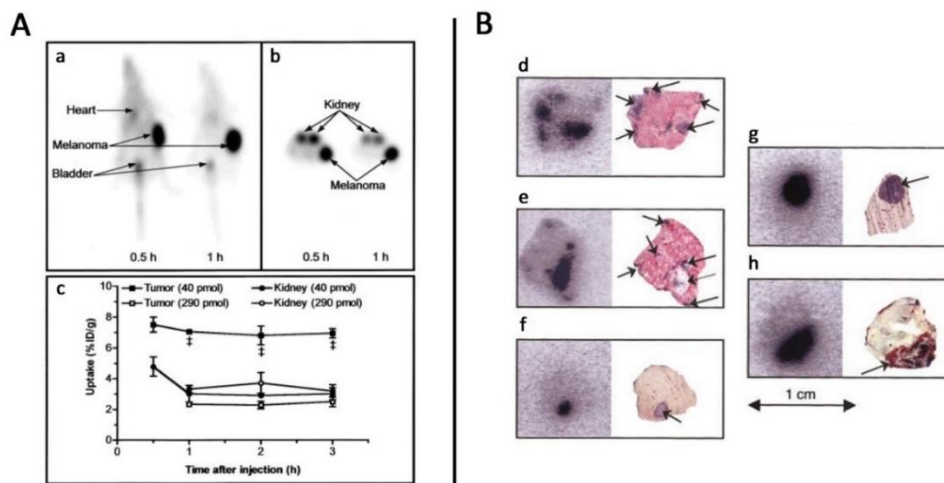


8. ábra A c(KNGRE) peptid szerkezeti képlete és egy jelölt származékával, a ^{68}Ga -DOTA-iNGR-el készült PET felvétel (HT-1080, CD13 pozitív tumor (fehér kör), HT-29, CD13 negatív tumor (piros kör)) [76] (A); a c(RGDfK) peptid szerkezeti képlete és egy jelölt származékával, a ^{68}Ga -NOTA-[c(RGDfK)]₄ segítségével készült PET felvétel (U87MG tumor (fehér nyíl)) [77] (B)

Az RGD (Arg-Gly-Asp) az angiogenezis során a sejtek felületén kifejeződő $\alpha_v\beta_3$ integrinhez specifikusan kötődik. Az $\alpha_v\beta_3$ integrin kis számban expresszálódik a normál epitel és endotél sejtek felszínén, de túlexpresszálódik az aktivált endotél sejtek és a tumoros sejtek esetén, ezzel lehetővé téve az ilyen elváltozások megfigyelését [78].

Különféle kelátorokkal ellátott RGD származékokkal (c(RGDfK), c(RGDyK) stb.) jelenleg is számos kutatás folyik ^{68}Ga -ot és ^{44}Sc -ot felhasználva [8], [79], [80]. Az NGR (Asn-Gly-Arg) peptid nem az $\alpha_v\beta_3$ integrinhez, hanem a CD13 (N-aminopeptidáz) receptorhoz kapcsolódik specifikusan [81], [82]. A CD13 egy membránhoz kötött exopeptidáz, ami túlexpresszálódik a neovaszkuláris endotél sejteken, illetve egyes tumorsejtek esetén [76].

Hasonlóan fontos területként könyvelhetjük el a malignus melanomával kapcsolatos kutatásokat, hiszen a daganat jelentős áttétképző potenciálja miatt a megbetegedések során magas az elhalálozási ráta [83]. Az agresszivitása miatt elengedhetetlen a primer tumor és különösen a metasztázisok korai kimutatása. Napjainkban a α -MSH analóg, melanokortin-1 receptort (MC1-R) célzó molekulák, illetve a melanin-specifikus benzamid származékok tűnnek a legígéretesebbnek [84]–[86]. Az MC1-R egy sejt felszínén lévő G-protein-kapcsolt receptor, amely a bőr pigmentációjának a szabályzásában játszik fontos szerepet. Előzetes kutatások kimutatták, hogy az α -MSH analóg NAPamid és a kelátorral ellátott és ^{68}Ga radioizotóppal jelölt származéka, a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid specifikusan kötődik a melanin pozitív tumorsejtek felszínén túlexpresszálódó MC1-R receptorokhoz [86], [13] (9. ábra).



9. ábra Melanoma-hordozó egér (B6D2F1 nőstény egér, B16F1 melanoma sejtvonallal oltva) PET felvétele ^{68}Ga -DOTA-NAPamid (**a** és **b**); a tumor és a vese trézer felvételének a kinetikája (**c**), (**A**); primer és áttétes melanoma szöveti részletek autoradigráfias képe ^{67}Ga -DOTA-NAPamid alkalmazásával: tüdő melanotikus melanoma metasztázis (**d**), tüdő melanotikus, vagy amelanotikus melanoma metasztázis (**e**), máj melanotikus melanoma metasztázis (**f,g**), primer melanoma környező bőrszövettel (**h**), (pontozott nyíl: amelanotikus-, folytonos nyíl: melanotikus melanoma), (**B**)[13]

A 9. ábra „A” részén látható a tumor és a vese ^{68}Ga -DOTA-NAPamid felvételének a kinetikája, amin megfigyelhető, hogy 1 óra elteltével lecsökken a vese felvétel, illetve az egyéb szervi és szöveti háttér. Mivel a ^{68}Ga felezési ideje is megközelítőleg 1 óra, így a vizsgálat esetén számolni kell a bomlásból adódó aktivitás, és így a jelintenzitás csökkenésével is. Kézenfekvő lenne olyan radiofémekkel jelölni a DOTA-NAPamidot, melyeknek a felezési ideje jobban idomul a megfigyelt kinetikához. Ilyen izotóp lehet a ^{44}Sc , amely hasonló kelátorok segítségével kapcsolható a peptidekhez, mint a ^{68}Ga és közel 4 órás felezési ideje, illetve kisebb β^+ energiája miatt jobb képminőséget szolgáltat. A ^{44}Sc -mal kapcsolatos, közel 200 megjelent közlemény közül mindössze 50 foglalkozik a radiofém valamilyen meglévő, vagy új kelátorral való jelölésével, vagy biológiai molekulához történő kapcsolásával. Ez annak köszönhető, hogy az elmúlt 5-10 évben vált elterjedté, mind a generátor alapú [46], mind a ciklotron alapú [50] előállítása, ami képes volt biztosítani a megfelelő tisztaságú radioaktív prekursor a radiokémiai jelölésekhez.

3.5. A preklinikai vizsgálatok és a transláció jelentősége

Egy új hatóanyag hosszú utat jár be, amíg forgalomban kapható gyógyszer válik belőle, amely folyamat során egy igen fontos lépcsőt jelentenek a preklinikai vizsgálatok. A gyógyszerfejlesztés négy fő részből áll: a kutatás-fejlesztésből, a preklinikai vizsgálatokból, a klinikai vizsgálatokból és végül a felülvizsgálatból és jóváhagyásból [87]. Az FDA (US Food and Drug Administration) is hasonlóan tünteti fel a fázisokat, kiemelve, az úgynevezett „post-market safety monitoring”-ot, vagyis a forgalomba hozatalt követő folyamatos monitorozást (10. ábra). Látható, hogy a 3-6 éves fejlesztési szakasz után megközelítőleg csupán csak 1 év alatt a preklinikai vizsgálatok elvégezhetők. Segítségükkel a teljes gyógyszerfejlesztés időtartamához képest (10-15 év) rövid idő alatt eldönthető egy potenciális gyógyszerkészítményről, hogy alkalmas-e a klinikai fázisba való átléptetésre. A preklinikai vizsgálatok három fő csoportba sorolhatók: *in vitro* (sejtes); *in vivo* (kis- és nagyállat); toxikológiai és egyéb vizsgálatokat.



10. ábra A gyógyszerfejlesztés lépéseinek vázlatos leírása a fejlesztéstől a forgalombahozatalt követő monitorizásig, feltüntetve az adott fázis várható időigényével

Az *in vivo* preklinikai vizsgálatokra úgy tekinthetünk, mint egy híd, ami az *in vitro* vizsgálatokat és a klinikai fázist köti össze. Még ma sem rendelkezünk olyan *in vitro* molekuláris biológiai módszerekkel, amelyek segítségével a különböző (pl. daganatos) megbetegedések lefolyásának minden aspektusát tudjuk vizsgálni. Ez például igaz a tumorok áttétképző hatására, vagy különböző gyógyszermolekulák élő szervezetre gyakorolt hatására, szervezeten belüli megoszlására és anyagcsere-folyamatokba történő bekapcsolódására is. Az említett vizsgálatokhoz *in vivo* kísérletekre, állatmodellekre és állatkísérletekre van szükség.

Az állatkísérletek legfőbb etikai alapköveit W. M. S. Russell és R. L. Burch tette le 1959-ben, amelyet azóta 3R-stratégia néven emlegetnek [88]. A 3 fő alapelve: a Replace (helyettesítés), Reduce (csökkentés) és a Refine (finomítás). A „Replace” során a lehető legnagyobb mértékben próbáljuk helyettesíteni az állatkísérleteket más módszerekkel, mint például sejtvonalak, szövetek, szervek, gerinctelen állatok, vagy kétéltűek lárváinak az alkalmazásával. A „Reduce” irányelve, hogy a kísérleteink száma az elérhető legalacsonyabb legyen, illetve a résztvevő állatok száma ne legyen több a feltétlen szükségesnél. A „Refine” alatt azt értjük, hogy a vizsgálataink alatt törekedjünk a noninvazív technikák, altatás és fájdalomcsillapítás alkalmazására, illetve tartsuk

mindig szem előtt a kísérletben résztvevő állatok komfortját. A modern képalkotó eljárások számos esetben kedvezőbbek a 3R-stratégia tekintetében, mint a hagyományos *in vivo* preklinikai megközelítések, hiszen ugyanazon egyedek vizsgálhatók az egész kísérletsorozat alatt, akár több időpontban is, amely jelentősen csökkenti a szükséges állatok számát [89].

A kisállat képalkotó diagnosztikai berendezések megegyeznek a nukleáris medicina területén, a napi rutin betegellátásban alkalmazott eszközökkel a mérettől és az ezzel kapcsolatos paraméterektől eltekintve. Ugyanúgy megtalálható a segítségül hívható repertoárban a PET, SPECT, MRI, CT, ultrahang és az optikai képalkotás is. A klinikai és a preklinikai berendezések térbeli felbontóképességét nézve jelentős különbség figyelhető meg. Általánosan kijelenthető, hogy MR esetén ~ 1 mm a klinikai és $100\text{ }\mu\text{m}$ -nál kisebb a preklinikai eszköz térbeli felbontóképessége. Ugyanez az érték CT esetén ~ 2 mm és $\sim 100\text{ }\mu\text{m}$, PET-nél ~ 5 mm és ~ 1 mm, míg a SPECT-et nézve ~ 1 cm és ~ 1 mm [90], [91]. Erre a felbontásbeli különbségre szükség is van, hogy a 10-30 cm-es mérettartományban vizsgált kisállatokról megfelelően értékelhető felvételek, képek születhessenek.

4. Metodikák

4.1. Felhasznált vegyszerek, reagensek és eszközök

A kémiai munkám során alkalmazott vegyszerek és reagensek a következőkben felsorolásra kerülnek (zárójelben feltüntetve a tisztaság és egyéb paraméterek, illetve a gyártó/forgalmazó):

1-Oktanol (synth. Sigma-Aldrich); ^{22}Na forrás (Isotope Products Laboratories, M1-643, 1,17 MBq – 2015.06.01.); AAZTA-C9, AAZTA-(tBu)₄ (Bracco); ACN (LC-MS, Scharlau); AG 1-X8 anioncserélő (200-400 mesh, Cl⁻ form, BIO-RAD); AG 50W-X8 kationcserélő(200-400 mesh, H⁺-form, BIO-RAD); Ca (99,99%, Sigma-Aldrich); DCM (analytical, Fisher Chemicals); DGA gyanta (DN-Resin – B, Triskem); DMF (ACS, anal, CARLO ERBA); DOTA (ABX); DOTA/DOTA-GA/NOTA/NODA-GA-Maleimid (Chematech); Ecetsav (99-100%, a.r., ZENCHEM Kft.); Etil-acetát (a.r. ZENCHEM Kft.); EtOH (96%, MOLAR); Gélszűrő (Sephadex, G25), DOTA-NAPamid (TFA form, ABX); víz (Mili-Q); Hangyasav (ROTIPURAN, $\geq 98\%$, p.a., ACS, ROTH); HBTU ($\geq 98,0\%$, T, Sigma-Aldrich), DIPEA ($\geq 99,5\%$, ROTH); HNO₃ (7%, ACS, Sigma-Aldrich); ITLC-SG réteg (Agilent); NaClO₄ (ACS, $\geq 98\%$); NaOH (50%, ROTH), BSA (lyophilized powder, $\geq 96\%$, Sigma-Aldrich); NH₄OAc ($\geq 96\%$, ROTH); n-Hexán (ACS, CARLO ERBA); NODA-GA-c(RGDfK) (ABX); NOTA/NOPO (Chematech); Oxálsav ($\geq 99,5\%$, p.a., ACS, ISO, ROTH); PBS (Roti-CELL, ROTH); Strata SCX kationcserélő (30 mg, 1 ml, Phenomenex); Strata X (RP, 30 mg, 1 ml, Phenomenex); TFA ($\geq 99,9\%$, ROTH); u.p. víz (ROTIPURAN Ultra, ROTH); u.p. HCl (ROTIPURAN Ultra 34%, ROTH); $^{44}\text{TiCl}_3$ (2 M u.p. HCl, Cyclotron Co., Obninsk).

A kémiai munkám során alkalmazott eszközök és berendezések a következők voltak (zárójelben típus, egyéb paraméterek, illetve a gyártó/forgalmazó):

Dóziskalibrátor (ISOMED 2010, MED); Gamma számláló (Wizard 2048 Automatic Gamma Counter, energiaablak: 350-650 keV, Perkin Elmer); ciklotron (GE PETtrace 800, 16 MeV); HPGe gamma spektrométer (Canberra GC 2018, 10-100 kBq); Mediso Any Scan; UPLC (Waters Acquity UPLC I-class, PDA UV detector, RA detektor: Flow Star LB 513, Berthold); MS (Waters Xevo G2 Q TOF); Frakciószedő (Foxy Jr., ISCO); Vortex (VELP Scientifica), Centrifuga (202 MC, Sigma)

A biológiai vizsgálatokhoz a következő anyagokat és eszközöket használtuk (zárójelben típus, egyéb paraméterek, illetve a gyártó/forgalmazó):

B16-F10 sejtvonal (ATCC); A375 sejtvonal (ATCC); DMEM médium (DMEM, High glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate, ThermoFisher); FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich); MEM vitamin (Sigma-Aldrich); RPMI-1640 médium (Sigma-Aldrich); T75 tenyésztőflaska (Sarstedt, Germany); gamma számláló (Perkin-Elmer Packard Cobra, Waltham, MA, USA); Állatok (C57BL/6, BALB/c, CB17 SCID); IVC rendszer (Techniplast, Italy); VRF1 (Akronom); Kisállat altatógép (Tec3 Isoflurane Vaporizer, forannal); SPECT/CT (nanoScan SPECT/CT, Mediso); PET/MRI (naonScan PET/MRI, Mediso); α -MSH ([Nle4, D-Phe7]- α -Melanocyte Stimulating Hormone, Sigma-Aldrich)

4.2. A ^{44}Sc radioizotóp előállításai módszerei és összehasonlításuk

Az generátor anyaelemét, a $^{44}\text{TiCl}_4$ -ot (2 M-os u.p. HCl oldatban) ciklotron besugárzás révén biztosította a Cyclotron Co., Obninsk. A generátor töltése idején csupán Filosofov és mtsai. [13] rendelkeztek az irodalomban közölt $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ radioizotóp generátorral, így az általuk leírtak alapján végzetük el a tisztítási lépéseket és az első betöltést.

4.2.1. $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ radioizotóp generátor elkészítése

A generátor megépítésének a kémiai alapját a Sc(III) és Ti(IV) oxálsavval alkotott komplexének eltérő bruttó töltése és különböző koncentrációjú HCl hatására történő bomlása tette lehetővé [92], [93]. A két fémion esetén pH = 1-4 tartományban, oxálsavas közegben a $[\text{Sc}(\text{C}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ és $[\text{Ti}(\text{C}_2\text{H}_4)_2(\text{OH})_2]^{2-}$ összetételű komplexek vannak jelen [94], [95].

A ^{44}Ti anyaelem tisztítása:

Egy kolonnát (H = 16 cm, ID = 1,6 cm, V = 32,2 cm³) AG 50W-X8 kationcserélő gyantával töltöttünk meg, majd 200 ml víz, 1000 ml 4 M-os u.p. HCl és 50 ml víz segítségével mostuk. A $^{44}\text{TiCl}_3$ mintát (2 M-os u.p. HCl oldatban; gyártó által megadott névleges ^{44}Ti aktivitás: $A_{^{44}\text{Ti}} = 3 \text{ MBq}$; dóziskalibrátorral, ^{68}Ga csatornán mért összaktivitás: $A_{^{44}\text{Ti}} + A_{^{44}\text{Sc}} = 25,41 \text{ MBq}$) felvittük a kolonnára, amit 8 ml 1 M-os u.p. HCl,

9 ml víz és 15,5 ml 1 M-os u.p. HCl bemosás követett. A töltet mosását 45 ml 1 M-os u.p. HCl, 30 ml 2 M-os u.p. HCl, 160 ml 3 M-os u.p. HCl és 200 ml 0,5 M-os oxálsav oldattal végeztük, miközben 10 ml-es frakciókat gyűjtöttünk és mértük az aktivitásukat a szedést követően, illetve 24 óra elteltével (dóziskalibrátor ^{68}Ga -csatorna, gamma számláló).

Másnap elvégeztük a második tisztítási lépést, amihez AG 50W-X8 kationcserélő gyantát használtunk egy kolonnába töltve ($H = 17\text{ cm}$, $ID = 1,6\text{ cm}$, $V = 34,2\text{ cm}^3$). Az előzőekben leírt bemosást követően felvittük az első tisztítási lépés során 2 és 3 M-os u.p. HCl oldattal eluált legaktívabb frakciókat, majd 45 ml 1 M-os u.p. HCl oldattal 180 ml 2 M-os u.p. HCl oldattal, 60 ml 4 M-os u.p. HCl oldattal, 60 ml 6 M-os u.p. HCl oldattal és 30 ml 0,5 M-os oxálsav oldattal mostuk és eluáltuk a rendszert. Ebben az esetben is 10 ml-es frakciókat gyűjtöttünk és ezek aktivitását a szedést követően, illetve 24 óra elteltével mértük dóziskalibrátor (^{68}Ga -csatorna) és gammaszámláló segítségével.

Az első betöltés:

A generátorba történő betöltéshez a ^{44}Ti radioizotópot tartalmazó frakciókat szárazra pároltuk, majd többszörös öblítéssel feloldottuk összesen 20 ml 0,1 M-os oxálsav oldatban. Ezt felvittük egy AG 1-X8 anioncserélővel töltött kolonnára ($H = 5\text{ cm}$, $ID = 0,4\text{ cm}$, $V = 0,63\text{ cm}^3$), amelyet előtte 20 ml 12 M-os u.p. HCl oldattal, 10 ml vízzel és 0,1 M-os oxálsav oldattal kondicionáltunk. A kész izotópgenerátorról a $^{44}\text{Sc(III)}$ radiofémiont szelektíven 10 ml, 0,07 M-os u.p. HCl/0,005 M oxálsav oldattal eluáltuk, amely során az eluátumokat mindig megőriztük és az aktivitásukat mértük. A méréseket 48 óra elteltével gammaszámláló segítségével végeztük el, hogy lássuk az esetleges ^{44}Ti kimosódást, majd sugárvédett helyre tettük az egyéb, ^{44}Ti által esetlegesen kontaminált eszközökkel együtt.

A második betöltés:

Az első generátor használata során észlelt ^{44}Ti veszteség miatt a generátor újratöltése mellett döntöttünk, amihez a generátorról leoldott $^{44}\text{TiCl}_4$ -ot, illetve az eluálások és a jelölési reakciók során megőrzött oldatokat és mosófolyadékokat használtuk fel. Először ezeket liofilizáltuk, majd a beszáradt oldatokat egyre kisebb térfogatú vízben oldottuk fel és újra liofilizáltuk. Ezt addig ismételtük, míg a teljes aktivitást $5 \times 20\text{ ml}$ -ben fel tudtuk oldani (0,1 M oxálsav; 0,521 MBq - ^{68}Ga csatornán), majd megkötöttük 100 mg kondicionált (1 ml 12 M-os u.p. HCl, 10 ml víz) AG 1-X8 anioncserélő gyantán és mostuk 10 ml vízzel. A nagyobb aktivitáskoncentráció elérése

érdekében a gyantát 1 ml 1 M-os, 1 ml 4 M-os és 1 ml cc. u.p. HCl segítségével eluáltuk. Ezt követően leoldottuk a generátoron megkötött $^{44}\text{Ti(IV)}$ anyaelemet 25 ml cc. u.p. HCl segítségével és egyesítettük az első lépésben kapott 3 ml (megközelítőleg 8 M-os) u.p. HCl oldattal. Majd rotációs vákuumbepárló használatával szárazra pároltuk és feloldottuk összesen 4 ml 0,1 M-os oxálsav oldatban. A kromatográfiás oszlopot előtte kimostuk (víz, 0,1 M oxálsav, víz) és félig ($H = 2,5 \text{ cm}$) töltöttük kondicionált (1 ml 12 M u.p. HCl, 10 ml víz) AG 1-X8 anioncserélővel, majd ezt is mostuk 0,1 M-os oxálsavval. Ezt követően a $^{44}\text{Ti(IV)}$ -t tartalmazó oldatot lassan felvittük a félig töltött oszlopra, úgy, hogy az előzőleg betöltött állófázist ne keverjük fel. Az ehhez a lépéshez használt fecskendő mostuk 2 ml 0,1 M oxálsav eluenssel, amit feltöltöttünk az oszlopra, az előzőekben leírt módon. A végső lépésben teletöltöttük a generátortestet a maradék kondicionált AG 1-X8 gyantával, lezártuk és T-csapokkal láttuk el. A generátor eluálását minden esetben 10-10 ml (0,07 M u.p. HCl/ 0,005 M oxálsav) térfogatban végeztük „direkt”, illetve „reverz” módon, majd jelölésekhez 50-100 mg kondicionált AG 50W-X8 kationcserélő gyantán tisztítottuk (felvitelt követően mostuk 1-3 ml víz segítségével, majd eluáltuk 1 ml 0,25 M-os $\text{pH} = 4 \text{ NH}_4\text{OAc}$ pufferrel). A direkt módon történő elúció során a generátort az eredeti töltési irányának megfelelően, míg a reverz folyamatnál ellentétesen eluáltuk. A generátorba töltött ^{44}Ti és az esetleges buborékok helyzetét megfelelő időközönként SPECT/CT segítségével követtük.

4.2.2. A ^{44}Sc ciklotronos előállítása és az ezt követő tisztítása

A Debreceni Egyetem Orvosi Képző Intézetével közreműködve lehetőségünk nyílt ciklotronban előállított, nagy aktivitású (200-400 MBq) ^{44}Sc radioizotóppal is dolgozni. A besugárzás során egy GE PETtrace 800, 16 MeV ciklotront alkalmaztak, amely segítségével egy házi készítésű céltárgyat sugaraztak be. A céltárgy elkészítéséhez 120 mg természetes izotópösszetételű kalciumot (^{40}Ca : 96,941%, ^{42}Ca : 0,647%, ^{43}Ca : 0,135%, ^{44}Ca : 2,086%, ^{46}Ca 0,004%, ^{48}Ca : 0,187%; kémiai tisztaság: 99,99%) 5 tonnás hidraulikus préssel 8 mm átmérőjű présformában kb. 2 mm vastag pasztillává sajtoltak, amit egy 35 mm átmérőjű, 3 mm vastag alumínium korong közepén lévő furatba préseltek. A besugárzás során a ciklotronból kilépő protonnyaláb egy 25 és egy 50 μm vastag Havar (42% Co, 20% Cr, 13% Ni, 3,8% W, 2,4% Mo, 1,6 Mn, 0,2% C, 0,05% Be, Fe) fólián halad keresztül, ahol a fóliák hűtését hélium biztosítja. A légköri nyomáson lévő céltárgy besugárzása 30 μA áramerősség mellett 30-60 percig tartott, ami alatt a

felszabaduló hőmennyiséget a korong hátlapjával érintkező, folyamatosan keringő víz (4 l/perc) vitte el. A besugárzást követően a céltárgy körülbelül egy órát állt, hogy a rövid felezési idejű szennyező izotópok elbomoljanak.

Az előállított ^{44}Sc radioizotópot az alumínium korongba préselt Ca mátrixban kaptuk meg. A besugárzott fém-kalcium kioldásához a korong felületére szorított, O-gyűrűvel ellátott teflon tömböt használtunk, amelyhez két tefloncső csatlakozott. A rendszeren 5 ml, 3 M-os HCl oldatot nyomtunk át hozzávetőleg 1 perc alatt, ami elég volt, hogy a 120 mg kalciumot megközelítőleg teljesen kioldjuk a rendszerből, a ^{44}Sc -ot pedig $^{44}\text{ScCl}_3$ formába hozzuk. A kapott oldatot 70-150 mg DGA (Triskem, alul-felül frittekkel ellátott oszlopba töltve) állófázison (kondicionálás: 1 ml 3 M-os HCl oldat; 1 ml 1 M-os HNO_3 oldat; 1 ml 0,1 M-os HCl oldat; 3 ml 3 M-os HCl oldat) nyomtuk keresztül. Mostuk az oszlopot 3 ml 3 M-os HCl és 3 ml 1 M-os HNO_3 felhasználásával, majd fecskendővel manuálisan lefűjattuk a folyadékot a töltetről. A DGA eluálása frakcionáltan (200-200 μl) történt 2 ml 0,1 M-os HCl oldat felhasználásával. A jelölési reakciókhoz az első és utolsó frakciókat eldobva, a legnagyobb aktivitású frakciókat egyesítettük és használtuk.

4.2.3. A generátorral és a ciklotronnal termelt ^{44}Sc segítségével elért jelölési hatások összehasonlítása

Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy melyik előállítási mód eredményez nagyobb tisztaságú ^{44}Sc oldatot - ennek következtében pedig jelölésre alkalmasabb radioizotópot - összehasonlító méréseket végeztünk DOTA kelátorral. Ehhez csökkenő koncentrációjú (30; 10; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01 μM) DOTA jelöléseket hajtottunk végre a következő recept alapján: 10 μl 0,1 M-os u.p. HCl, $^{44}\text{ScCl}_3$ oldat + 80 μl 0,25 M-os pH = 4, NH_4OAc puffer + 10 μl eltérő koncentrációjú DOTA oldat. Az így összeállított elegyet 15 percig 95 °C hőmérsékleten inkubáltuk kilyukasztott tetővel ellátott 1 ml-es Eppendorf edényben. Minőségellenőrzéshez 10 cm hosszú ITLC-SG (Agilent) vékonyréteget alkalmaztunk, eluensként pedig vizet. A leírt kromatográfiás rendszert használva a kelátorral komplexet nem képző $^{44}\text{Sc(III)}$ a startponton maradt ($R_f = 0,0-0,1$), míg a $^{44}\text{Sc-DOTA}$ komplex a folyadékfronttal mozgott ($R_f = 0,9-1,0$).

4.2.4. A ^{44}Sc mérésére alkalmas dóziskalibrátoros csatorna létrehozása

Az általunk használt dóziskalibrátorban az elérhető radioizotóp csatornák között a ^{44}Sc -csatorna nem volt megtalálható, így a ^{44}Ti tisztítási lépéseket, illetve az első generátorból nyert aktivitási adatokat minden esetben ^{68}Ga -csatornán mértük. A második generátor betöltését követően került sor a ^{44}Sc -csatorna létrehozására, illetve a csatornák közötti szorzófaktorok meghatározására. Jelen értekezésben szereplő aktivitások minden esetben ^{44}Sc -csatornán mért, vagy arra átszámolt adatok és eredmények. Ez alól kivételt képez a ^{44}Ti tisztítása és a generátor betöltése közben mért aktivitások, mivel a dóziskalibrátorban egyszerre került le mérésre az anyaelem és a leányelem, amelyre később, külön szorzófaktorot nem határoztunk meg. A ^{44}Sc csatorna létrehozását és kalibrálását a Dr. Szabó Sándor és Forgács Attila, míg a ^{44}Sc és ^{18}F tartalmú pontforrások és fantomok előkészítését én végeztem. A méréseik során három eltérő módszert dolgoztak ki a kalibrálás elvégzéséhez, amelyeket az alábbiakban részletezek [96]. A három módszer során használt izotópok fontosabb fizikai adatait a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A ^{44}Sc kvantitatív aktivitásmérésének kidolgozása során alkalmazott izotópok felezési ideje ($t_{1/2}$), az emittált részecskék energiája (E), illetve az emittálás valószínűsége (I) [97]

Izotóp	$t_{1/2}$	I_{β^+} (%)	$E_{\beta^+\text{max}}$ (keV)	I_{γ} (%)	E_{γ} (keV)
^{18}F	1,83 óra	96,7	635	-	-
^{22}Na	21,99 év	90,3	546	99,9	1275
^{44}Sc	3,97 óra	94,3	1474	99,9	1157

^{44}Sc mérése HPGe detektor segítségével

A vizsgálatokhoz a Debreceni Egyetem Fizikai Intézetében, a Kísérleti Fizika Tanszéken található nagyfelbontású HPGe gamma spektrométert alkalmaztuk. Az együttműködés során Dr. Raics Péter volt a segítségünkre. Elsőként az ideális geometriai és aktivitás viszonyok kialakítása történt meg pontszerű etalon források segítségével. Ezt követően került sor a ^{44}Sc mérésére a korábban kialakított geometriával, és az előre meghatározott aktivitás tartományban. A kvantitatív eredmények megadására szolgáló hatásfokok, beütésszám és aktivitás között kapcsolatot teremtő szorzótényezőket

meghatároztuk a jellemző gamma-energiáknál. Az 511 keV és 1157 keV esetén kapott adatok segítségével számolható volt a ^{44}Sc abszolút aktivitás.

^{44}Sc mérése ^{22}Na forrásra kalibrált dóziskalibrátor ^{22}Na csatornáján

Egy, a cégünknel rendelkezésre álló, hiteles ^{22}Na forrás segítségével kalibráltuk a dóziskalibrátor ^{22}Na csatornáját (Calibration/Adjustment), majd ezen a csatornán vizsgáltunk különböző aktivitású ^{44}Sc mintákat. A módszer alkalmazhatóságának az alapja, hogy mindkét radioizotóp közel azonos valószínűséggel szenved el pozitron bomlást, illetve emittál hasonló nagyenergiájú γ -fotonokat (3. táblázat).

^{44}Sc mérése gamma kamerán felvett energia spektrumból

A meghatározáshoz egy három fejes MEDISO – AnyScan tomográfot használtunk. Mivel a ^{18}F -nak csak 511 keV-os gamma-fotonja van, így 450-650 keV energiaablak mellett kalibrációs egyenest vettünk fel csökkenő, ismert aktivitású ^{18}F források segítségével. Ugyanezen beállítások mellett több ismert aktivitású ^{22}Na forrás esetén is kalibrációt végeztünk. Ennek segítségével a ^{22}Na ismert aktivitású mintája által generált, 450-650 keV tartományban lévő beütések száma összevethető volt az ugyanilyen aktivitású ^{18}F beütéseinek a számával, így meghatározható volt a két izotóp közötti szorzófaktor, amit kiterjesztettünk a ^{44}Sc mérésére is.

4.2.5. A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátor állapotának a monitorozása SPECT/CT segítségével

A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátort egy egérágyba (MultiCell mouse Imaging Chamber, Mediso Kft., Magyarország) rögzítettük vízszintes helyzetben, majd a FOV (Field Of View) középpontjába pozícionáltuk és statikus méréseket végeztünk a preklinikai nanoScan SPECT/CT (Mediso Kft., Magyarország) készülékkel, ahol a ^{44}Ti alacsony energiás gamma fotonjait mértük (67,86 keV, 78,32 keV) (Multi-pinhole kollimátor (APT62); energia ablakok: 60,3-73,7 és 70,2-85,8 keV). A generátor lokalizációjának meghatározására CT felvételeket készítettünk (Number of projections: 480; Zoom: maxFOV; X-ray power: 50 kVp, 860 μA ; Exposure time: 300 ms). A SPECT adatok rekonstrukcióját 3 dimenzióban (TT3D-Normal Dynamic Range; iteration: 48; resolution: 128; attenuation: AC+SC) Tera-Tomo szoftverrel (Tera-Tomo, Mediso Kft.,

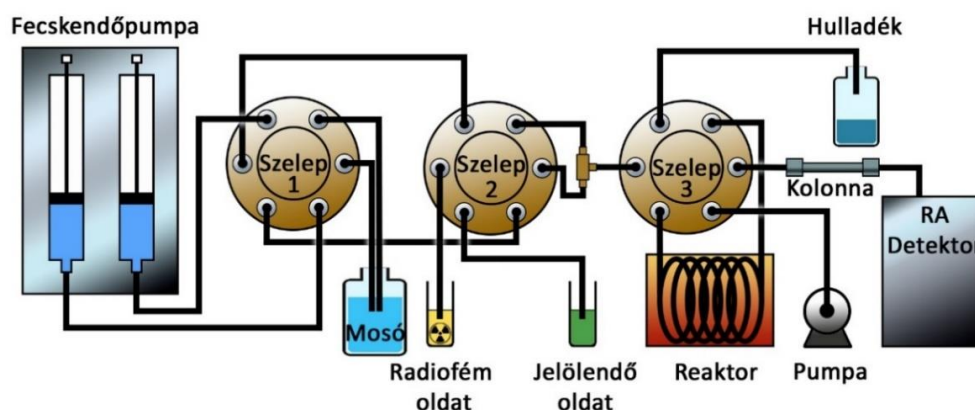
Magyarország) végeztük. A SPECT és a CT képek automatikusan regisztrálásra kerültek a SPECT/CT készülék gyűjtő szoftvere (Nucline) által. A rekonstruált, reorientált és regisztrált képeket az InterView FUSION (Mediso Kft., Magyarország) képelemző szoftverrel elemeztük.

4.3. ^{44}Sc és ^{68}Ga izotópokkal végzett jelzések kapilláris rendszer segítségével

A kapilláris rendszer megtervezését és összeszerelését Dr. Szikra Dezső végezte az előző verzió [61], [67] továbbfejlesztéseként. A kialakított rendszer tesztelését, fejlesztését, a jelzési reakciók kivitelezését és optimalizálását én végeztem.

4.3.1. A kapilláris rendszer felépítése és működése

A kapilláris-rendszer vázlatos felépítését a 11. ábra mutatja be.



11. ábra A kapilláris-rendszer vázlatos felépítése, a főbb alkatrészek kiemelésével

A rendszer alapját három HPLC szelep (**Szelep 1/2/3**; Rheodyne Titan MHP) alkotja, amelyek teflon kapillárisokon keresztül kapcsolódnak (ID: 0,25 mm) és a vezérlésért egy Arduino Mega kártya felelős. A folyadékmozgatást egy dupla-fecskendővel ellátott fecskendőpumpa (**Fecskendőpumpa**) végzi, amelynek segítségével a megfelelő folyadékok (**Radiofém oldat**, **Jelölendő oldat**) összeinjektálhatók egy fűthető PEEK loop-ba (**Reaktor**; ID: 0,15 mm, 25 µl; IDEX). A reaktorból kikerülő reakcióelegy közvetlenül (on-line) kerül egy analitikai kolonnára, ahol az elválasztás

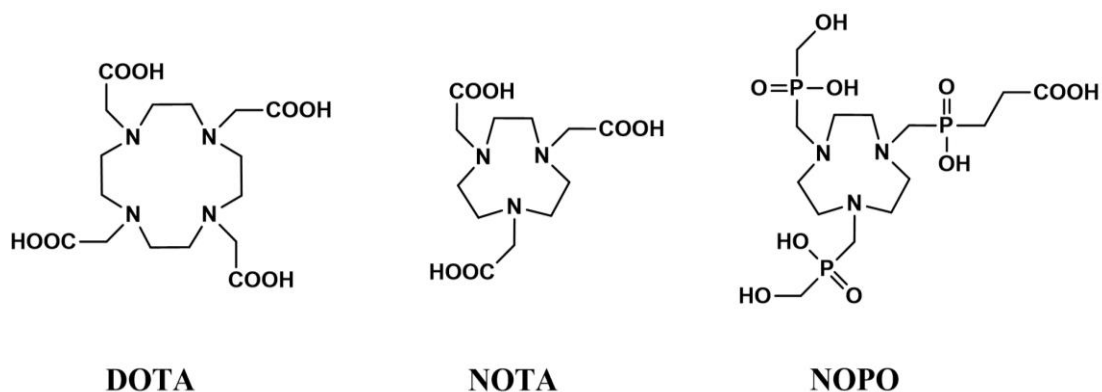
történik (**Kolonna, Pumpa**). Ehhez egy Waters Acquity UPLC I-Class HPLC rendszert és egy Berthold LB517 (20 µl-es MX plasztik szcintillátor cella) radioaktivitás detektort (**RA-Detektor**) alkalmaztunk. A mosási ciklus (**Mosó, Hulladék**) már a reakcióelegy reaktorba jutásakor elkezdődik és az analitikai elválasztás kezdetével véget is ér.

4.3.2. A kapilláris rendszer beállítása és tesztelése

Az reprodukálhatóság ellenőrzéséhez acetofenon és fenil-etanol oldatokat alkalmaztunk, ahol egymást követő injektálások során az UV (220 nm) kromatogramokon kapott csúcsok területének szórását vizsgáltuk. A két injektálás közötti keresztszennyezés csökkentését a mosófolyadék változtatásával és a mosási ciklus idejének növelésével érték el. A jól ismételhető injektálások elérését követően a két ág (11. ábra) szinkronizált folyadékmozgatását optimalizáltuk, amihez szintén acetofenont és fenil-etanolt alkalmaztunk. Az injektálásokat követően a kromatogramokon kapott csúcsok területének az arányából számítható volt, hogy a reaktorba milyen térfogatban jut be a két vegyület.

4.3.3. ^{44}Sc jelzések optimalizálása funkcionizálatlan kelátorokkal

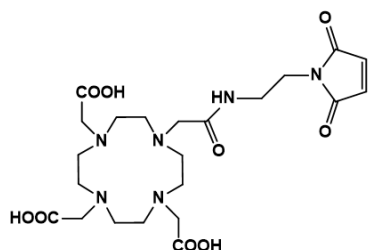
A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátort a 4.2.1. pontban leírt, 2. betöltés utáni protokoll alapján eluáltuk. A 20 ml eluátumot egy kationcserélő tölteten megkötöttük (50 mg, AG 50W-X8), majd 1 ml vizes mosást követően eluáltuk 1 ml 0,5 M-os, pH = 4 NH_4OAc pufferrel 200 µl-es frakciókat szedve. A jelzési kísérletekhez a rendszer 20-20 µl pufferezt $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ oldatot és funkcionizálatlan kelátort (DOTA, NOTA, NOPO; 12. ábra) tartalmazó oldatot (200, 60, 20, 6, 2, 0,6 µM) szívott fel. Ebből injektált 10-10 µl-t a 95 °C-ra fűtött, 25 µl-es PEEK reaktorba, ahol a keverék 5 percet tartózkodott, majd a reakcióidő leteltével egyenesen a kolonnára (Adsorbosphere XL SCX 4,6 × 250 mm) került. Az analitikai elválasztáshoz a következő eluenseket és gradiens módszert alkalmaztuk: áramlási sebesség: 0,6 ml/perc; eluensek: A: víz, B: 0,82 M NaClO_4 /0,05 M oxálsav/10% ACN; gradiens: 0 perc: 100% A, 5 perc: 100% A, 14 perc: 100% B, 19 perc: 100% B, 20 perc: 100% A.



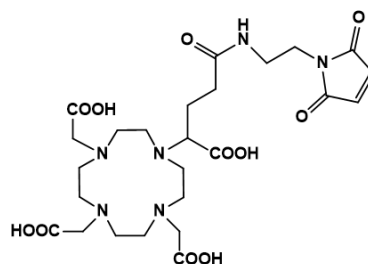
12. ábra A ^{44}Sc radioizotóppal végzett optimalizációs reakcióknál használt funkcionizálatlan kelátorok szerkezeti képletei és elnevezésük

4.3.4. ^{44}Sc és ^{68}Ga jelölések optimalizálása maleimid származékokkal

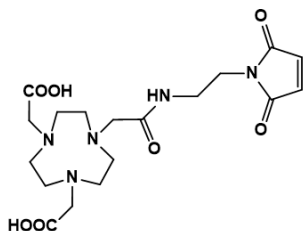
A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátor eluálása és tisztítása a 4.2.1 és 4.2.2. pontban leírtak alapján történt. A $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ jelölőoldat elkészítéséhez frakcionáltan eluáltuk a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátort 0,05 M-os u.p. HCl oldattal, majd a legnagyobb aktivitású frakcióból kivett 100 μl -hez adtunk 900 μl 0,5 M, pH = 4, NH_4OAc puffert. A kapilláris rendszer segítségével elvégzett jelölési reakciók a 4.3.3. pontban leírt módon történtek a részletezett jelölőoldatok felhasználásával. Az analitikai elválasztás a maleimid származékok (13. ábra) esetében egy Kinetex XB-C18; 2,6 μm ; 4,6 $\times$ 50 mm kolonnán történt izokratikus körülmények között. A ^{68}Ga -DOTA-Maleimid, a ^{68}Ga -NOTA-Maleimid, a ^{44}Sc -DOTA-Maleimid, a ^{44}Sc -NOTA-Maleimid, a ^{44}Sc -DOTA-GA-Maleimid és a ^{44}Sc -NODA-GA-Maleimid esetén az eluens oxálsav (0,01 M; pH = 3) volt, 0,6 ml/perc áramlási sebesség mellett. A ^{68}Ga -DOTA-GA-Maleimid és a ^{68}Ga -NODA-GA-Maleimid esetén az oxálsavas (0,01 M; pH = 3) eluens tartalmazott 2,7% ACN-t, hogy gyorsítsa az elválasztást. A jelzési reakciók során eltérő pH és kelátor koncentrációk esetén vizsgáltuk a radiokémiai tisztaságot és a radiokémiai hozamot (RCP, RCY).



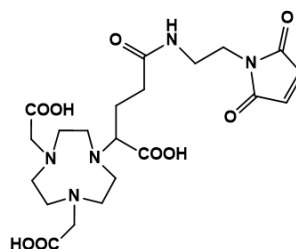
DOTA-Maleimid



DOTA-GA-Maleimid



NOTA-Maleimid



NODA-GA-Maleimid

13. ábra A különböző maleimid származékokkal végzett ^{44}Sc és ^{68}Ga jelölések során alkalmazott vegyületek szerkezeti képlete és neve

4.3.5. $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -NODA-GA-c(RGDfK) léptéknövelt előállítása

Az 4.3.4. pontban a kapilláris rendszer által meghatározott optimális jelzési körülmények között végeztük el a léptéknövelt jelöléseket, azzal az eltéréssel, hogy a reaktor térfogatát 200 μl -re, a felszívott reagensek térfogatát pedig 150-150 μl -re növeltük. A nagy aktivitáskoncentráció eléréséhez ciklotronban előállított szkandiumot használtunk. A ^{44}Sc esetén a tisztításhoz és a töményítéshez a 4.2.2. pontban leírt módszert használtuk, azzal az eltéréssel, hogy a DGA gyantáról eluált frakciókat (első és utolsó frakció kivételével) felvittük egy kondicionált (1 ml 3 M u.p. HCl oldat; 5 ml víz; 1 ml 0,1 M u.p. HCl oldat) erős kationcserélő, Strata SCX oszlopra (30 mg) majd mostuk 1 ml 0,1 M u.p. HCl oldattal és 1 ml víz segítségével. Az elúciót 2 cseppenként ($\sim 40 \mu\text{l}$) 1 M, pH = 4, NH_4OAc pufferrel végeztük és a legaktívabb frakciókat egyesítettük. A $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ radio-fémionnal történő jelölés során a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátort frakcionáltan eluáltuk $5 \times 1 \text{ ml } 0,05 \text{ M u.p. HCl}$ oldat felhasználásával, majd a legaktívabb frakciókat egyesítettük és a ^{44}Sc esetén leírt módon egy kationcserélőn töményítettük. A kapilláris rendszeren történő jelöléshez mindkét esetben a Strata SCX oszlopról eluált, NH_4OAc pufferelt oldatokat, illetve a 0,002 mg/ml koncentrációjú (150 μl) NODA-GA-c(RGDfK)

használtunk. A reakcióelegy 95 °C-on, 15 percet töltött a reaktorban, majd a rendszer egy kolonnára injektálta (Waters Acquity BEH C18 1,7 μ m 2,1 $\times$ 50 mm, eluensek: A: 0,01 M Oxálsav pH = 3; B: 9:1 ACN:víz, 0,6 ml/perc, 6 perces kromatogram) és 30 másodpercenkénti frakciószedés segítségével preparatív módon elválasztotta a jelölt terméket. A $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -NODA-GA-c(RGDfK), ACN tartalmú frakciót N₂ gázáram alatt 60 °C-on szárazra pároltuk, majd feloldottuk 200 μ l PBS-ben.

4.3.6. $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -NODA-GA-c(RGDfK) manuális jelölése

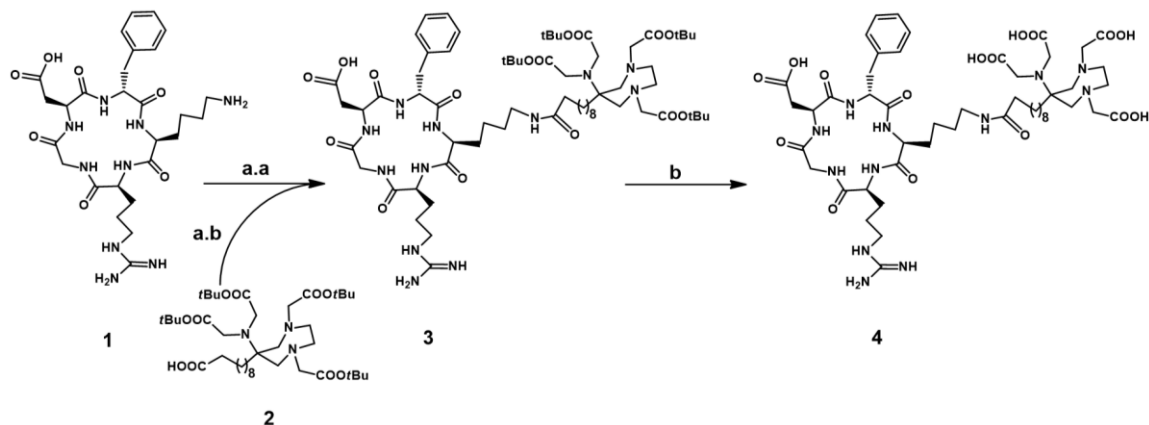
A hagyományos módon végzett jelölések során az izotópok tisztítási és koncentrálási lépései megegyeztek a 4.3.5. pontban leírtakkal. A jelölésre alkalmas 1 M, pH = 4, NH₄OAc pufferelt ^{44}Sc (III) és ^{68}Ga (III) oldatok 90 μ l térfogatához adtunk 10 μ l 0,01 mg/ml koncentrációjú NODA-GA-c(RGDfK) oldatot, majd reagáltattuk 95 °C-on 15 percig. A kész oldatot a lehűlés után felvittük egy kondicionált (1 ml EtOH, 3 ml víz, 1 ml, 1 M, pH = 4, NH₄OAc) Strata X oszlopra, mostuk 1 ml vízzel és eluáltuk 200 μ l EtOH segítségével. Az alkoholos oldatot szárazra pároltuk N₂ gázáram alatt 60 °C-on, majd feloldottuk 200 μ l PBS-ben. A radiokémiai tisztaságot a nyers, illetve a végtermék esetén is HPLC segítségével vizsgáltuk (Waters Acquity BEH C18, 1,7 μ m, 2,1 $\times$ 50 mm kolonna, eluensek: A: Oxálsav (0,01 M, pH = 3); B: 9 : 1, ACN : víz; Gradiens: 0,6 ml/perc, 0 perc: 100% A, 1 perc: 100% A, 2,5 perc: 100% B, 3 perc: 100% B, 3,1 perc: 100% A.

4.4. AAZTA kelátorral és származékaival végzett kémiai kísérletek

Az AAZTA kelátorral végzett kísérletekhez a funkcionizálatlan AAZTA prekuzort és a kapcsolható tBu-védett AAZTA kelátort Dr. Baranyai Zsolt (Bracco, Olaszország) biztosította. Az az AAZTA-(tBu)₄-TFP előállítását Dr. Fekete Anikó végezte.

4.4.1. Az AAZTA-C9-c(RGDfK) szintézise

A szintézis lépéseit, reagenseit és körülményeit az 1. Reakcióegyenlet mutatja be.



1. Reakcióegyenlet Az AAZTA-C9-c(RGDfK) előállítása során alkalmazott reagensek és körülmények: DMF, DIPEA, N₂ atmoszféra, 12 óra (a.a); DMF, HBTU, DIPEA, szobahőmérséklet, 30 perc (a.b); TFA, N₂, szobahőmérséklet, 2 óra (b)

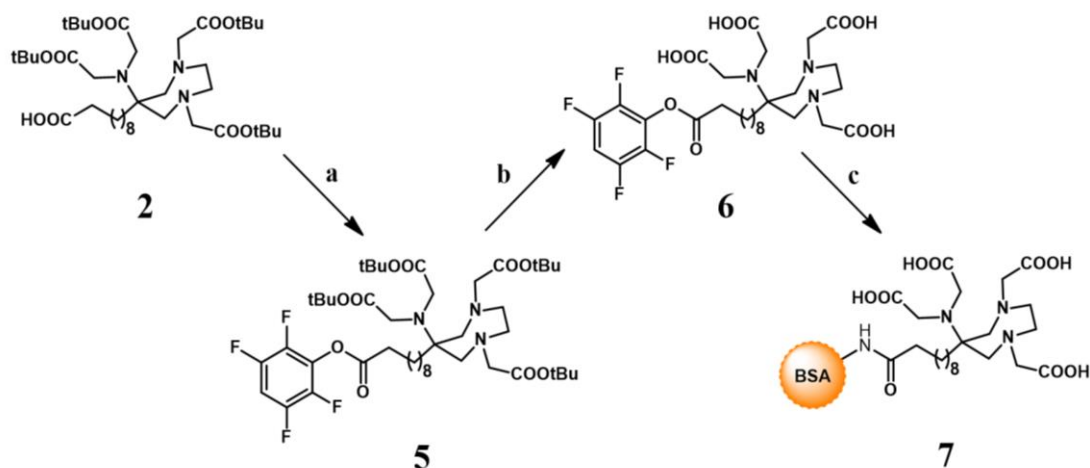
AAZTA-C9-(tBu)₄-c(RGDfK) (3): DMF-ben (46 µl) oldottunk AAZTA-C9-(tBu)₄ (2, 1,23 mg, 1,656 µmol) kapcsolható kelátort, majd adtunk hozzá HBTU-t (0,4 mg, 1,068 µmol) és DIPEA-t (0,46 µl). Az elegyet szobahőmérsékleten 30 percen keresztül kevertettük, majd DMF-ben (25 µl) oldott DIPEA-t (0,46 µl) és c(RGDfK)-t (1, 0,50 mg, 0,828 µmol, ABX GmbH) adtunk hozzá. A keletkező reakcióelegyet nitrogén atmoszféra alatt kevertettük egy éjszakán keresztül. Másnap az oldószer térfogatát csökkentettük rotációs vákuumbepárló segítségével, majd a keletkező, 10 µl nyersterméket tartalmazó oldatot tisztítottuk HPLC segítségével. Kolonna: Waters XSelect CSH C18 2,5 µm, 2,1 × 100 mm; eluensek: A: 0,1% HCOOH, B: 0,085% HCOOH (ACN-ben); gradiens: 0 perc: 100% A, 2 perc 5% B, 20 perc: 95% B; áramlási sebesség: 0,3 ml/perc, termék (3) retenciós ideje: 11,01 perc. ESI-MS: 664,4160 m/z [M + 2H⁺]²⁺ (mért), 664,4238 m/z [M + 2H⁺]²⁺ (számolt); HRMS: 1327,8351 m/z [M + H⁺]⁺ (mért); 1327,8397 m/z (számolt).

AAZTA-C9-c(RGDfK) (4): AAZTA-C9-(tBu)₄-c(RGDfK)-t (3) oldottuk TFA-ban (2 ml), majd szobahőmérsékleten, N₂ atmoszféra alatt 2 órán keresztül kevertettük. A TFA-t vákuum alatt eltávolítottuk és a visszamaradt terméket ecetsavban (98%) oldottuk és újra beszárítottuk vákuum alatt. A leírt TFA-ecetsav lecserélési eljárást még kétszer

megismételtük, majd feloldottuk ACN-ben (500 µl) és 10 µl-re töményítettük. A nyertermék tisztítását HPLC-vel végeztük a fent leírt körülmények között. Az AAZTA-C9-c(RGDfK) terméket (**4**) tartalmazó frakciókat bepároltuk. HPLC retenciós idő: 7,00 perc; ESI-MS: 552,5910 m/z $[M + 2H^+]^{2+}$ (mért), 552,2901 m/z $[M + 2H^+]^{2+}$ (számolt); HRMS: 552,2924 m/z (mért), 552,2907 m/z $[M + 2H^+]^{2+}$ (számolt).

4.4.2. Az AAZTA-C9-BSA szintézise

A szintézis lépéseit, reagenseit és körülményeit a 2. Reakcióegyenlet mutatja be



2. Reakcióegyenlet Az AAZTA-C9-BSA előállításánál alkalmazott reagensek és körülmények: TFP, DCC, DCM, 0 °C, 25 °C, 24 óra (**a**); TFA, anizol, szobahőmérséklet, 48 óra (**b**); DMF, borát-pufferelt izotóniás sóoldat, szobahőmérséklet, 24 óra (**c**)

AAZTA-(tBu)₄-TFP (**5**): AAZTA-(tBu)₄ (**2**, 5,6 mg, 7,55 µmol) és TFP (1,82 mg, 11 µmol) száraz DCM-os (500 µl) keverékéhez 0 °C-on DCC került (2,26 mg, 11 µmol). A hozzáadást követően az oldat felmelegedett szobahőmérsékletre. 24 óra elteltével a reakcióelegy leszűrésre került, majd a szűrletet alatt töményedett. A kapott oldat tisztítása gravitációs kromatográfia segítségével történt (Silicagel 60, Hexán : Etil-acetát 87:13), hogy előálljon a termék (**5**). Hozam: 5 mg, 75%; HRMS: 890,5147 m/z $[M + H^+]^+$ (mért), 890,5148 m/z $[M + H^+]^+$ (számolt).

AAZTA-TFP (6): Az AAZTA-(tBu)₄-TFP (5, 5 mg, 5,6 µmol) terméket feloldottuk TFA-ban (300 µl), majd anizolt (20 µl) adtunk hozzá és 48 órán keresztül kevertettük szobahőmérsékleten. Az elegyet vákuum alatt bepároltuk és vízben oldottuk, egy kondicionált C18 SEP-PAK oszlopra felvittük, majd a mosást követően a terméket 50%-os ACN segítségével eluáltuk. Az oldószert vákuum alatt eltávolítottuk, így megkapva a szilárd terméket (6). Hozam: 2,2 mg, 60%; HRMS 666,2620 m/z [M + H]⁺ (számolt), 666,2644 m/z [M + H]⁺ (mért).

AAZTA-BSA (7): A szilárd AAZTA-TFP-t (6, 1,1 mg, 1,65 µmol) oldottuk DMF-ben (5 µl), majd hozzáadtuk a BSA-t (5,46 mg, 0,08 µmol) tartalmazó borát-pufferelt izotóniás sóoldatot (500 µl, 0,1 M, pH = 9). Szobahőmérsékleten 24 órán keresztül kevertettük, majd egy Sephadex G25 gélszűrő és PBS segítségével tisztítottuk. A kapott AAZTA-C9-BSA (7) további tisztítási és elválasztási lépéseken nem esett át.

4.4.3. ⁴⁴Sc-DOTA/AAZTA jelölési körülményeinek és kinetikai stabilitásának a vizsgálata

A jelölési reakciókhoz az első alkalommal készített ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc izotópgenerátort használtuk, amelynek az elúcióját a 4.2.1 pontban leírtak alapján végzetük 0,07 M HCl/0,005 M oxálsav oldat segítségével. A körülmények optimalizálása során a megfelelő paraméterek (pH, kelátor konc., reakcióhőmérséklet, reakcióidő) változásának a hatásait vizsgáltuk az RCP-re nézve. A RCP értéket minden esetben HPLC segítségével követtük. Kolonna: Waters Symmetry C18 (4,6 × 150 mm, 3,5 µm); eluens: oxálsav (0,01 M, pH = 3); izokratikus elválasztás: 1 ml/perc. A leírt rendszeren a ⁴⁴Sc(III) a folyadékfronttal jelent meg 1,4 percnél, míg a ⁴⁴Sc-DOTA és a ⁴⁴Sc-AAZTA 2,6, illetve 4,0 percnél volt detektálható.

Az jelölési reakciók során a pH, a hőmérséklet, a reakcióidő és a kelátor koncentráció változtatásának a hatását vizsgáltuk a radiokémiai tisztaságra nézve. Először a pH (1-9) hatását térképeztük fel eltérő kelátor koncentrációk (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 és 100 µM) esetén. Ehhez a ⁴⁴Sc(III) tartalmú eluátumot egy kondicionált (1 ml 3 M u.p. HCl, 1 ml víz, 1 ml, 0,07 M HCl/0,005 M oxálsav) kationcserélő oszlopra vittünk fel (50-70 mg; AG 50W-X8; Biorad), majd mostuk 1 ml vízzel és 4 cseppenként frakcionálva eluáltuk NH₄OAc pufferrel (0,25 M; pH = 4). A legaktívabb (elsőtől és

utolsótól különböző) 5 frakciót egyesítettük és ezt az oldatot használtuk a jelzési reakciókhoz. A megfelelő pH-t ecetsavval és különböző töménységű NaOH oldatokkal állítottuk a kívánt értékekre (ez alól kivételt képez a pH = 1, ahol sósav oldatot alkalmaztunk). Az optimalizáláshoz 90 µl NH₄OAc pufferelt ⁴⁴Sc(III) oldathoz (~0,1 MBq) adtunk 10 µl kelátor oldatot (1; 3; 10; 30; 100; 300 és 1000 µM), hogy elérjük a megfelelő koncentrációt. A reakciókat Eppendorf edényekben végeztük 5 perces reakcióidővel, 95 °C-on. A hőmérséklet hatásának a vizsgálatához 25, 40, 55, 70, 85 és 90 °C-on 0,1 µM kelátor felhasználásával, 0,25 M, pH = 4 NH₄OAc pufferelt közegben végeztünk reakciókat. A reakcióidő változtatását is 0,1 µM kelátor és 0,25 M, pH = 4 NH₄OAc puffer alkalmazásával végeztük 25 °C-on.

A kinetikai mérésekhez szükséges ⁴⁴Sc-AAZTA előállítását az előzőekben már leírt módon végeztük 10 µM-os kelátor koncentráció mellett. A kész terméket 1:1 arányban kevertük 100 µl egér plazmával és 37 °C-on inkubáltuk. 10 µl térfogatú mintákat vettünk 0, 1, 2, 4, 8 és 12 óra elteltével és a radiokémiai tisztaságukat az előzőekben már leírt kromatográfiás körülmények között vizsgáltuk.

4.4.4. ⁴⁴Sc-AAZTA-C9-c(RGDfK)/BSA jelölések biológiai vizsgálatokhoz

A vizsgálatokhoz a ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc izotópgenerátor eluálását és tisztítását minden esetben a 4.2.1 és 4.2.2. pontban leírtak alapján végeztük. A ⁴⁴Sc(III) radio-fémion *in vivo* vizsgálatához az AG 50W-X8 kationcserélőről NH₄OAc pufferrel (0,25 M; pH = 4) eluált ⁴⁴Sc(III) oldatot 30 °C-os vízfürdőben szárazra pároltuk N₂ áramoltatás segítségével. A száraz anyagot gyakorlatilag nem tartalmazó (<0,1 mg) edényt átmostuk 200 µl PBS oldattal, hogy kioldjuk a bepárolt radioizotópot. Az így kapott oldat tisztaságát HPLC segítségével a 4.3.5. pontban leírtak alapján ellenőriztük, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a ⁴⁴Sc(III) kémiai formája nem változott meg a bepárlás és újra feloldás következtében.

A ⁴⁴Sc-AAZTA előállításához az AG 50W-X8 kationcserélőről NH₄OAc pufferrel (0,25 M; pH = 4) kapott ⁴⁴Sc(III) oldathoz adtunk 200 µl AAZTA (2 µl, 1 mg/ml) kelátor oldatot, majd szobahőmérsékleten reagáltattuk 5 percig egy Eppendorf edényben. A reakcióidő leteltével az elegyet szárazra pároltuk vízfürdőben, N₂ áramoltatás segítségével. A száraz anyagot gyakorlatilag nem tartalmazó (<0,1 mg) edényt átmostuk

200 µl PBS oldattal, hogy kioldjuk a ^{44}Sc -AAZTA-t. Az így kapott elegy radiokémiai tisztaságát HPLC segítségével meghatároztuk a 4.3.5. pontban leírtak alapján (RCP>95%; moláris aktivitás: 0,266 GBq/µmol), majd a termék-oldatot *in vivo* vizsgálathoz használtuk fel.

A ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) előállításához is 200 µl NH_4OAc pufferelt $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ oldatot használtuk, amihez hozzáadtuk az AAZTA-C9-c(RGDfK)-t (10 µl; 1 mg/ml), majd 95 °C-on, 15 percig reagáltattuk egy Eppendorf edényben. A nyersterméket egy fordított fázisú tölteten tisztítottuk (Strata X, 30 mg) úgy, hogy a kondicionált tölteten (1 ml EtOH, 3 ml víz) átnyomtuk az elegyet, majd mostuk 1 ml vízzel és eluáltuk 200 µl EtOH segítségével. A kapott oldatot szárazra pároltuk vízfürdőben N_2 áramoltatás segítségével, majd az edényt mostuk 200 µl PBS segítségével. A termék radiokémiai tisztaságát HPLC segítségével határoztuk meg a következő körülmények alkalmazásával: Kolonna: Waters XSelect CSH (2,5 µm; 2,1 × 100 mm); eluensek: A: oxálsav (0,01 M, pH = 4); B: ACN; gradiens: B-eluens 5 perc alatt 5%-ról 50%-ra; áramlási sebesség: 0,6 ml/perc). A leírt rendszeren a ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) retenciója 3,8 perc volt (RCP>95%; moláris aktivitás: 0,360 GBq/µmol). Az így előálló terméket használtuk *in vivo* kísérletekhez.

A ^{44}Sc -AAZTA-C9-BSA előállításánál is 200 µl NH_4OAc pufferelt (0,5 M; pH = 7) $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ oldathoz került az AAZTA-C9-BSA oldat (100 µl; 1 mg/ml), majd 40 °C-on reagáltattuk 60 percig egy Eppendorf edényben. Az így keletkező nyersterméket gélszűrő (Sephadex G25) segítségével tisztítottuk. A termék tisztaságát HPLC segítségével határoztuk meg a következő körülmények között: kolonna: Aeris Widedpore C4 (3,6 µm, 150 × 2,1 mm); eluensek: A: 0,1% HCOOH ; B: ACN; gradiens: B-eluens 15 perc alatt 20%-ról 47%-ra; áramlási sebesség: 0,3 ml/perc. A ^{44}Sc -AAZTA-C9-BSA retenció ideje 11,74 perc volt (RCP>95%; moláris aktivitás: 0,485 GBq/µmol).

4.5. A $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -NAPamiddal végzett kémiai és radiokémiai kísérletek

4.5.1. A ^{68}Ga -DOTA-NAPamid jelölése biológiai vizsgálatokhoz

A $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátort frakcionáltan eluáltuk 0,05 M-os u.p. HCl oldattal, majd a legaktívabb frakcióból kivett 375 μl -hez (80-130 MBq) 120 μl NH_4OAc puffert (0,5 M, pH = 4) és 5 μl DOTA-NAPamid oldatot (1 mg/ml, 0,673 M) adtunk, majd 95 °C-on 15 percig inkubáltuk egy Eppendorf edényben. A reakcióidő lejártával az oldatot egy kondicionált (1 ml 96% EtOH, 5 ml víz, 1 ml 0,25 M pH = 4 NH_4OAc) Strata X töltetre vittük fel, majd 1 ml vízzel és 300 μl 96%-os EtOH segítségével mostuk és eluáltuk. A kapott oldatot 95 °C-on szárazra pároltuk N_2 áramoltatás segítségével, majd a száraz edényt mostuk 200 μl PBS oldattal, amit a biológiai vizsgálatokhoz alkalmaztunk. A termék radiokémiai tisztaságát HPLC segítségével határoztuk meg a következőképpen: kolonna: Waters Acquity BEH C18, 1,7 μm , 3,0 $\times$ 50 mm; eluensek: A: oxálsav (0,01 M, pH = 3); B: ACN:víz (9:1); gradiens: 0 perc: 100% A, 1 perc: 100% A, 2,5 perc: 100% B, 3 perc: 100% B, 3,1 perc: 100% A, áramlási sebesség: 0,9 ml/perc.

4.5.2. A ^{44}Sc -DOTA-NAPamid jelölése biológiai vizsgálatokhoz

A ^{44}Sc -DOTA-NAPamid jelöléshez ciklotronban előállított ^{44}Sc -ot alkalmaztunk, aminek a céltárgyból történő kioldását és tisztítását a 4.2.2. pontban leírt módon végeztük, majd a DGA tisztítás után kapott két legnagyobb aktivitású frakciót egyesítettük. A $^{44}\text{ScCl}_3$ (0,1 M u.p. HCl) tartalmú elegyből pipettáztunk ki 375 μl -t (50-80 MBq), adtunk hozzá 120 μl NH_4OAc puffert (0,5 M, pH = 4) és 5 μl DOTA-NAPamid oldatot (1 mg/ml, 0,673 M), majd 95 °C-on 15 percig inkubáltuk egy Eppendorf edényben. A reakcióelegy tisztítása és analitikai ellenőrzése megegyezik a 4.5.1. pontban leírtakkal.

4.5.3. A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid logP értékének meghatározása

10 μl PBS-ben oldott $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid (~5 MBq) termékoldatot 500 μl 1-oktanol és 490 μl víz keverékéhez pipettáztuk egy Eppendorf edénybe, majd egy vortex keverő segítségével rázattuk (600 rpm) 10 percig, majd centrifugáltuk (6000 rpm) 5 percig. Az oktanolos fázisból 100 μl -t, míg a vizes fázisból 1 μl -t pipettáztunk ki egy

mérőedénybe. A vizes fázisból vett mintát 100 µl-re hígítottuk, hogy minimalizáljuk a geometriai eltérésekből és a nagy aktivitáskülönbségből adódó hibát. Az előkészített minták aktivitását gammaszámláló segítségével mértük meg. A leírt meghatározást még kétszer elvégeztük.

4.5.4. A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid kinetikai stabilitásának a vizsgálata

10-10 µl PBS-ben oldott $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid (~5 MBq) termékoldatot 90-90 µl egér plazmához, Na_2EDTA (0,01 M) oldathoz és oxálsav (0,01 M) oldathoz pipettáztunk 37 °C hőmérsékleten. A minták radiokémiai tisztaságát 4 időpontban (0, 30, 60 és 120 perc) ellenőriztük a 4.5.1. pontban leírt kromatográfiás körülmények között.

4.6. A biológiai vizsgálatok során alkalmazott eszközök és módszerek

Az *in vivo*, illetve az *in vitro* vizsgálatok előkészítését és kivitelezését Dr. Trencsényi György és Nagy Tamás hajtották végre a Debreceni Egyetem Orvosi Képző Intézetének a közreműködésével. Az eredmények kiértékelését és értelmezését a segítségükkel végeztem.

4.6.1. A sejtenyésztés körülményei

A melanoma tumort célzó vizsgálatokhoz használt B16-F10 (egér eredetű melanotikus, magas MC1-R expressziójú melanoma) és A375 (humán eredetű amelanotikus, alacsony MC1-R expressziójú melanoma) sejteket DMEM médiumban növesztettük, kiegészítve 10%-os FBS szérummal (magzati borjú szérum), 1%-os nem esszenciális aminosavakat tartalmazó oldattal és 1%-os MEM vitamin oldattal. Az angiogenikus vizsgálatok alapjául szolgáló 4T1 (egér eredetű emlőtumor) sejteket RPMI-1640 + 10% FBS médiumban tenyésztettük. Minden sejtvonal tenyésztése során állandó körülmények között dolgoztunk, amik a következők voltak: 5% CO_2 , 37 °C. Az *in vitro* kísérletekhez, valamint a daganatok indukciójához a sejteket a fagyasztásból történő felvétel után 6-8 passzást követően használtuk fel. A tenyésztést 80%-os konfluenciáig végeztük T75 tenyésztőflaskákban. A kísérleteinkben használt sejtek életképessége mindig 90% fölött volt, melyet trypan kék kizárásos teszttel ellenőriztünk.

4.6.2. Az *in vitro* melanoma kötődési vizsgálatok körülményei

A vizsgálatokhoz B16-F10 sejtvonalat használtunk. A sejtek tenyésztését 24-lyukú lemezen végeztük 24 órán keresztül 5×10^4 /lyuk kiindulási sejtszámmal, majd különböző koncentrációban (20-3200 nM) ^{44}Sc - vagy ^{68}Ga -jelölt DOTA-NAPamid-ot adtunk 200 μl sejtenyésző folyadékba (DMEM). 60 perc inkubálási idő után (CO_2 inkubátorban, 37°C -on) a médiumot eltávolítottuk, a sejteket kétszer mostuk PBS és glicin (0,2 M) segítségével, majd NaOH (1 M) hozzáadásával 10 percig, 37°C -on lizáltuk. A minták radioaktivitását gamma számlálóval mértük.

4.6.3. A melanoma sejtek *in vitro* radiotrészter felvételének körülményei

A B16-F10 és A375 sejteket a tripszinnel történő felvételt követően centrifugáltuk, majd újraszuszpendáltuk 1 ml 1 mM glükózt tartalmazó PBS oldatban (gl-PBS). A mintákat 37°C -on 10 percig inkubáltuk 1×10^6 /ml sejtkoncentrációban gl-PBS oldatban. Ezt követően megközelítőleg 0,4 MBq ^{44}Sc - vagy ^{68}Ga -jelölt DOTA-NAPamid-ot adtunk minden mintához. A radiotrészter hozzáadását követően a sejteket tovább inkubáltuk 37°C -on 30, 60 és 90 percig. Az inkubációs idő leteltével, a mintákat háromszor mostuk jéghideg PBS oldattal, szuszpendáltuk 1 ml hideg PBS oldatban, majd a minták radioaktivitását gamma számlálóval mértük. A radiofarmakon felvétel bomláskorrigált értékét a 10^6 sejtre vonatkoztatott, időegység alatt történő beütéssel fejeztük ki, amit %ID értékben adunk meg. A megjelenített eredmények legalább három független kísérlet $\pm\text{SD}$ adatait tartalmazzák.

4.6.4. A kísérleti állatok tartása

Az állatkísérletekhez 10-12 hetes 20-22 g tömegű felnőtt nőstény C57BL/6 ($n = 30$), BALB/c ($n = 15$) és CB17 SCID ($n = 20$) egereket használtunk. Az egereket steril körülmények között tartottunk IVC (egyedileg szellőztetett ketrecek) rendszerben $26 \pm 2^\circ\text{C}$ hőmérsékleten $50 \pm 10\%$ páratartalommal és automatizált mesterséges megvilágítással 12 órás ciklusokban. A kísérleti állatokat VRF1 típusú szemi-szintetikus táppal etettük, valamint autoklávozott csapvízzel itattuk *ad libitum*. A kísérleteket az Európai Unió és a Magyarországi törvényeknek megfelelően a Debreceni Egyetem

Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának (DEMÁB) engedélyével (8/2016/DEMÁB) végeztük.

4.6.5. A daganatos állatmodellek kialakítása

A kísérleti állatok daganatos sejtekkel történő injektálása minden esetben inhalációs altatásban történt. Az egereket kisállat altatógéppel elaltattuk (indukció: 3% Forane, fenntartás: 1,5% Forane + 0,4 liter/perc O₂ + 1,2 liter/perc N₂O).

Szingenikus melanoma modell: 1×10^5 B16-F10 tumorsejtet 150 µl fiziológiás sóoldatban (0,9% NaCl) injektáltuk C57BL/6 egerek bal váll területén a bőr alá.

Xenograft melanoma modell: az amelanotikus A375 tumor indukálásához CB17 SCID egereket használtunk. 1×10^5 Melur daganatos sejteket injektáltuk 150 µl fiziológiás sóoldatban (0,9% NaCl) SCID egerek bal váll régiójában a bőr alá.

Szingenikus emlőtumor modell: 1×10^5 4T1 sejtet injektáltuk szubkután 150 µl RPMI médiumban BALB/c egerek bal váll területének bőre alá.

A szubkután tumorok növekedésének követése során a tumor méretét a 7. egyenlet alapján számítottuk ki. Az *in vivo* kísérleteket a tumor sejtek szubkután injektálását követően 20±2 nappal végeztük, mikor a tumor térfogata 100-120 mm³ volt.

$$S = \frac{(d_{max}) \cdot (d_{min})^2}{2} \quad (7)$$

Ahol: *S* a tumor méretére utaló érték, *d*_{max} a tumor legnagyobb átmérője (mm), *d*_{min} a tumor legkisebb átmérője (mm)

4.6.6. In vivo PET/MRI vizsgálatok során alkalmazott körülmények

A kisállat PET vizsgálatokra a debreceni Scanomed Kft. Transzlációs Kutató Központjának preklinikai laboratóriumában került sor. A kontroll és tumoros egereket a jelzett származékok injektálása és a vizsgálat alatt inhalációs altatógéppel altattuk. A PET vizsgálatok előtt 15,6±1,2 MBq ⁴⁴Sc- vagy ⁶⁸Ga-jelzett DOTA-NAPamid (melanoma modellek esetén), illetve ⁴⁴Sc-jelzett AAZTA, AAZTA-C9-c(RGDfK) és AAZTA-C9-

BSA trészereket injektáltunk 150 µl fiziológiás sóoldatban a laterális farki vénába. A teljes test PET vizsgálatokat (20 perces statikus vizsgálatok) preklinikai PET/MRI készülékkel végeztük 60, 90 és 240 perccel a radiotrészerek injektálását követően. Az állatok mozgásának megelőzése céljából az egereket speciális MultiCell egérágyban vizsgáltuk és a FOV (Field of View) középpontjába pozícionáltuk. A szövetek és szervek anatómiai lokalizációjának meghatározására T1 súlyozott MRI felvételeket készítettünk (GRE EXT multi-FOV; TR/TE 15/2 ms; FOV 60 mm; excitációk száma: 2). A PET és az MRI felvételek automatikusan regisztrálásra kerültek a PET/MRI készülék szoftvere (Nucline) segítségével.

4.6.7. A PET adatok kiértékelése

A PET adatok rekonstrukcióját 3 dimenziós iteratív (3D-OSEM) algoritmussal (Tera-Tomo) végeztük. A rekonstruált, reorientált és regisztrált képeket az InterView FUSION képelemző szoftverrel elemeztük. A vizsgált területek aktivitáskoncentrációjának meghatározásához manuálisan jelöltük ki a vizsgált területeket, majd a 3D VOI alapján a szoftver kiszámolta a minimum (SUV_{min}), maximum (SUV_{max}) és átlag (SUV_{mean}) SUV értékeket, valamint a standard deviációt. A radiofarmakon akkumuláció mértékét SUV-ban fejeztük ki (8. egyenlet).

$$SUV = \frac{c_{akt}}{(A_{inj}/m)} \quad (8)$$

Ahol: **SUV** a standard felvételi hányados, **c_{akt}** az aktivitáskoncentráció, **A_{inj}** az injektált aktivitás, míg **m** az állat tömege

4.6.8. Az ex vivo biodisztribúciós vizsgálatok

A kontroll és a tumoros kísérleti állatokat az *in vivo* képalkotó vizsgálatok után Forane-nal túlaltattuk, a hasüreget, valamint a mellüreget megnyitottuk és a szívből vért vettünk. Egy-egy darabot eltávolítottunk a gyomorból, agyból, zsírból, lépéből, tumorból, vesékből, májból, belekből és izomból. A minták tömegét és radioaktivitását – ez utóbbit gamma-számlálóval – lemértük és a végeredményt %ID/g szövet értékben fejeztük ki.

4.6.9. *In vivo* blokkolási vizsgálatok

A blokkolási vizsgálatokhoz magas MC1-R expressziójú B16-F10 tumoros egereket használtunk, amelyekbe intravénásan $15,6 \pm 1,2$ MBq ^{44}Sc - illetve ^{68}Ga -jelzett DOTA-NAPamid radiotrészert injektáltunk $200\ \mu\text{g}$ α -MSH blokkolóval együtt. Egy órával az injektálás után *in vivo* PET/MRI és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat végeztünk a fentebb leírt metodikák alapján.

4.6.10. Statisztikai analízis

In vitro sejtes eredményeinkben minden esetben legalább három független kísérlet eredményéből származó átlag $\pm$ szórás (SD) van feltüntetve. A PET felvételek kvantitatív analízise során alkalmazott SUV értékeket szintén átlag $\pm$ szórás (SD) formájában ábrázoltuk. A szignifikancia szinteket ($p = 0,05$) Mann-Whitney U teszttel határoztuk meg.

5. Eredmények

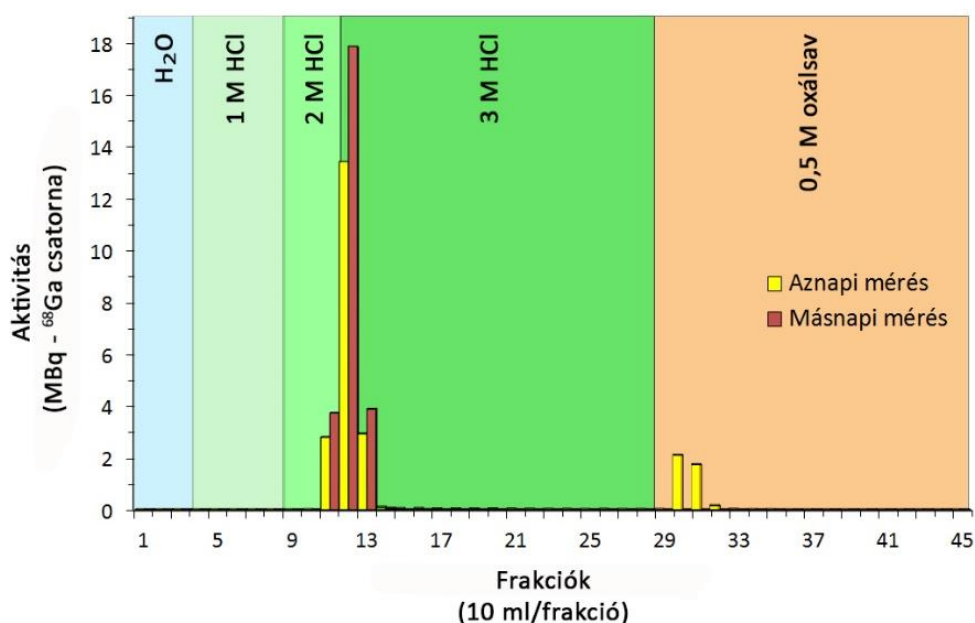
5.1. $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ radioizotóp generátor kialakításának az eredményei

A dóziskalibrátoron történő ^{44}Sc csatorna beállításához a hitelesített, HPGe - gamma spektrométerrel kapott eredményeket használtuk, mivel ezek bizonyultak a legpontosabbnak. A beállított ^{44}Sc csatornán és a ^{18}F csatornán mért aktivitások között a szorzófaktor 0,55 volt, vagyis egy ^{44}Sc minta esetén megközelítőleg kétszer akkora aktivitást látunk a ^{18}F csatornát használva. A kapott faktort a hiteles ^{22}Na sugárforrással és a MEDISO - AnyScan berendezés gamma detektorával végzett vizsgálatok megerősítették.

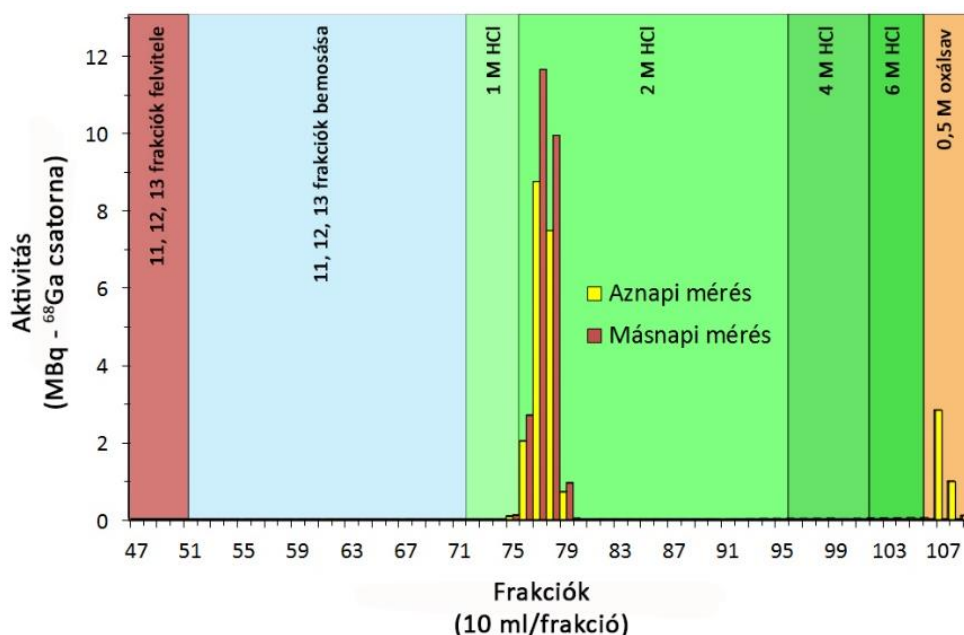
5.1.1. A ^{44}Ti anyaelem tisztítása

Az előállítás első lépése során a ^{44}Ti anyaelemet két oszlopon tisztítottuk. A tisztítás célja az volt, hogy megszabaduljunk a ^{44}Ti ciklotronban történő előállítása során céltárgyként alkalmazott természetes izotóp-összetételű szkandiumtól (^{45}Sc). Ez a

generátorba kerülve jelentős moláris aktivitás romlást eredményezhetett volna. Az oszlop elkészítése során két egymás utáni tisztítást hajtottunk végre, ahol az összes felvitt mosó és eluálószer - 10 ml-enként szedett - frakciójának aktivitását aznap és másnap mértük (14. ábra, 15. ábra). Az aznapi mérés során láttuk, hogy mely frakciók aktívak, vagyis melyek tartalmazhatnak ^{44}Ti és/vagy ^{44}Sc radioizotópot. Mivel 24 óra elteltével a ^{44}Ti ($t_{1/2} = 60,0$ év) aktivitása csak elhanyagolható mértékben csökken, míg a ^{44}Sc ($t_{1/2} = 3,97$ óra) nagy része elbomlik, így a másnapi aktivitásméréssel megállapítható volt, hogy melyik frakciókban és milyen arányban volt jelen a radioaktív $^{44}\text{Sc(III)}$ és $^{44}\text{Ti(IV)}$ radioizotóp. Azok a frakciók, amelyek esetén aktivitásnövekedés volt tapasztalható, ott a frakciók $^{44}\text{Ti(IV)}$ -et (illetve a frakcionálás után képződő $^{44}\text{Sc(III)}$ -at), míg azokban az esetekben ahol 24 óra alatt az aktivitás közel nullára esett le ott $^{44}\text{Sc(III)}$ és $^{45}\text{Sc(III)}$ volt jelen. Az első tisztítási lépés után a $^{44}\text{Ti(IV)}$ a 11-13 (14. ábra) frakciókban volt megtalálható, amiket a második tisztítás során feltöltöttünk az új oszlopra és ismét eluáltuk, ahol a 76-79 (15. ábra) frakciók tartalmazták a $^{44}\text{Ti(IV)}$ -et. A 30-33 (14. ábra) és 107-109 (15. ábra) frakciónál másnap már nem volt detektálható jelentős aktivitás, ami azt jelenti, hogy ezen frakciók tartalmazták a $^{44}\text{Sc(III)}$ -at és a természetes összetételű szkandiumot.



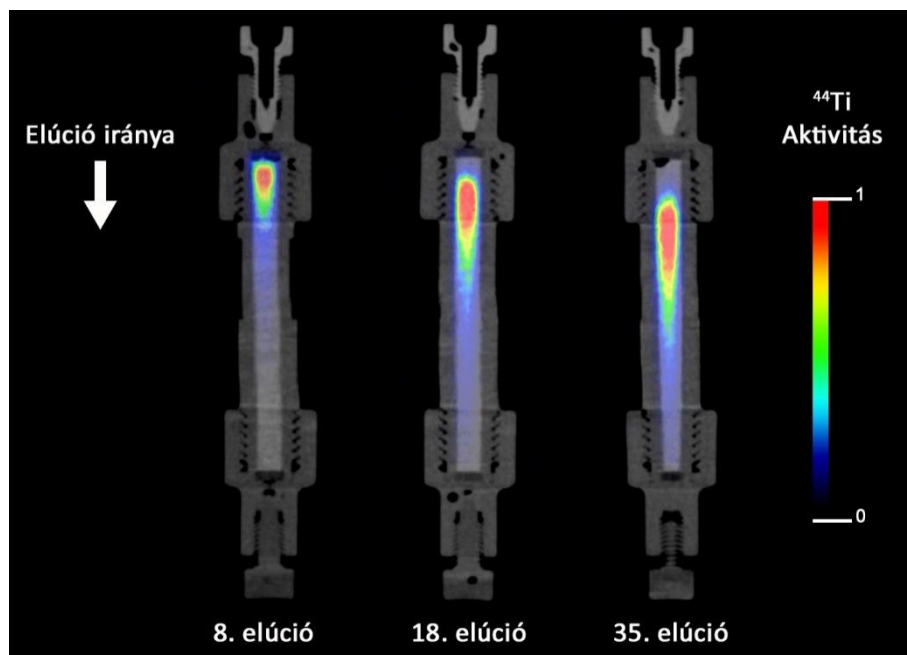
14. ábra A ^{44}Ti AG 50W-X8 kationcserélős tisztítás első lépésének elúciós profilja az alkalmazott eluálószeres feltüntetésével ($^{44}\text{Ti(IV)}$ tartalmú frakciók: 11, 12, 13)



15. ábra Az első lépésben kapott $^{44}\text{Ti(IV)}$ tartalmú frakciók második AG 50W-X8 kationcserélő oszlopon történő tisztításának elúciós profilja, az alkalmazott eluálószerrek feltüntetésével ($^{44}\text{Ti(IV)}$ tartalmú frakciók: 76, 77, 78, 79)

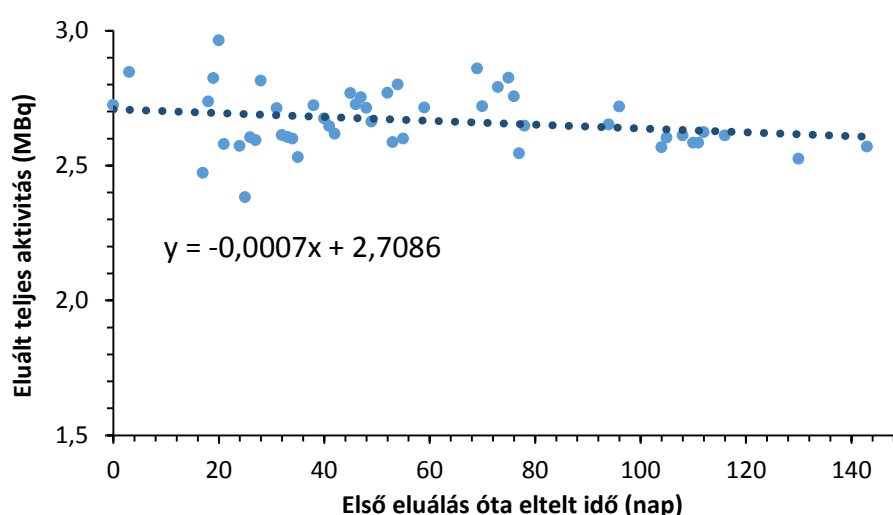
5.1.2. A ^{44}Ti betöltése és az izotópgenerátor használata

A betöltéshez a fent leírt 76-79 frakciókat betöményítettük, hogy az oszlopra történő felvitelük során a folyadékmozgatásból adódó veszteség a lehető legkisebb legyen. Az első betöltés alkalmával az oszlop tetején adszorbeáltuk a $^{44}\text{Ti(IV)}$ -et. Ezt követően a kész izotópgenerátorról SPECT/CT felvételt készítettünk, amit meghatározott számú eluálás után újra elvégeztünk (16. ábra). A kapott képek segítségével monitorozni tudtuk az anyaelem helyzetét, vagyis az izotópgenerátor pillanatnyi állapotát. Az első eluálás alkalmával a Filosofov és mtsai. által publikált leírás alapján [46] jártunk el. Ezek alapján - az izotópgenerátor élettartamának növelése és a $^{44}\text{Ti(IV)}$ kioldódásának csökkentése érdekében - a generátort először előről, „direkt” irányba, majd fordított, „reverz” irányba eluáltuk. Ennek eredményeképpen a reverz módú elúció során számottevő mennyiségű anyaelem kioldódását tapasztaltuk, aminek következtében a továbbiakban csak direkt módon eluáltuk az izotópgenerátort



16. ábra Az első generátor ^{44}Ti eloszlásának változása az elúciók hatására (SPECT/CT)

Megközelítőleg 5 hónap alatt 61 alkalommal eluáltuk a generátort, amiből 49 esetben napi egy, míg 12 esetben napi kettő elúció történt. Az eluálások során a kapott aktivitást másnap mértük, így nyomon tudtuk követni, hogy milyen a $^{44}\text{Ti(IV)}$ veszteségünk (17. ábra). A pontokra illesztett egyenes meredekségéből ($m = -0,0007$) számolható a generátorból eluálható aktivitás csökkenésének a mértéke (9. egyenlet).

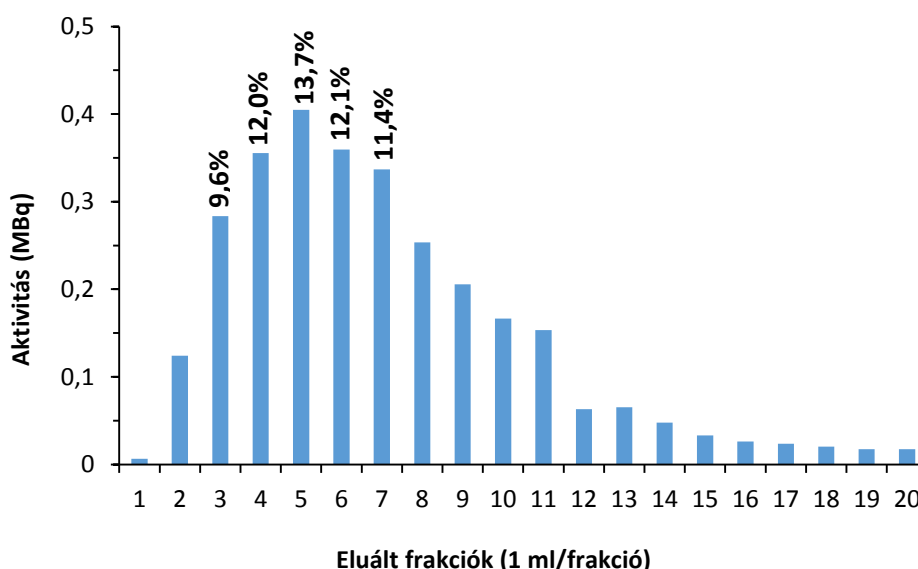


17. ábra Az első töltésű $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátorból eluálásonként kinyert teljes aktivitások értékei az eltelt idő függvényében

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{m} \quad (9)$$

Ahol: $t_{1/2}$ a felezési idő; m pedig az egyenes meredeksége

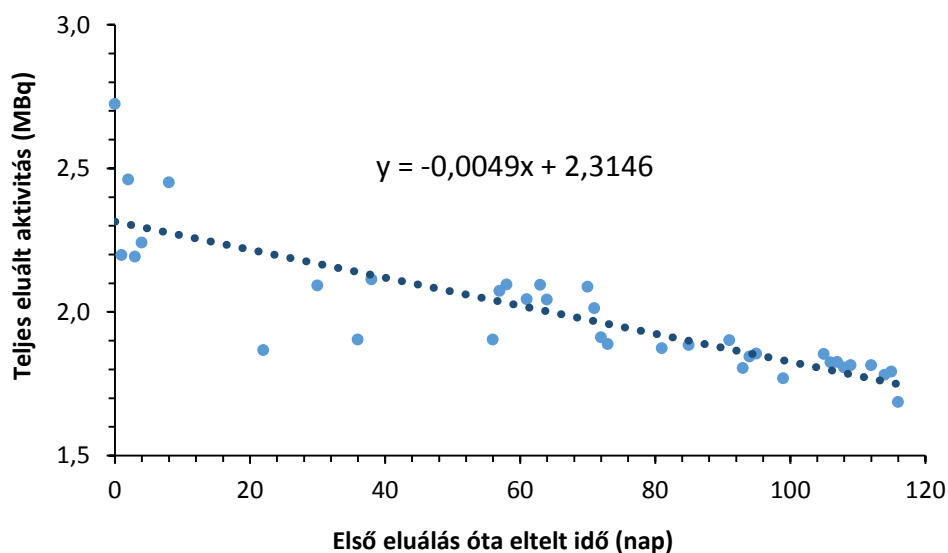
Az így számolt felezési idő 330,1 nap, ami azt jelenti, hogy nem a ^{44}Ti bomlásából ($t_{1/2} = 21900$ nap) adódó csökkenést láttuk, hanem a feltételezett kioldódás folyamatát. Ezek alapján naponta átlagosan 2,1 kBq ^{44}Ti aktivitást veszítettünk az izotópgenerátorból, ami kezdeti aktivitásra nézve hozzávetőleg 0,03%-os veszteséget jelent eluálásonként. Egy GMP kompatibilis ITG $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátor specifikációja alapján a $^{68}\text{Ge}(\text{III})$ áttörés 0,001-0,006% között van [98]. Ennek tükrében az áttörési értékünk nagyon jó, hiszen mindössze csak 5-30-szorosa egy gyári radionuklid generátorénak. A generátor működésének feltérképezése szempontjából elengedhetetlen volt az elúciós profil vizsgálata is. Ehhez a szokásos 10 ml helyett 20 ml eluálószerrel használtunk és 1 ml-es frakciókat szedtünk (18. ábra). Itt látható, hogy az aktivitás nagy része (84,2%) az első 10 frakcióban található, ami igazolta, hogy a generátor eluálásához megfelelő a 10 ml-es térfogat. Ezen túl az is látható, hogy az alkalmazott eluálószerrel a ^{44}Sc „elnyúltan” mosható le a rendszerről, aminek köszönhetően a legnagyobb aktivitású frakció is csupán csak 13,7%-át tartalmazza a teljes aktivitásnak.



18. ábra A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátor frakcionált eluálása során mért aktivitás eloszlása az 1 ml-enként szedett frakciók között (százalékosan jelölve a teljes aktivitáshoz viszonyítva)

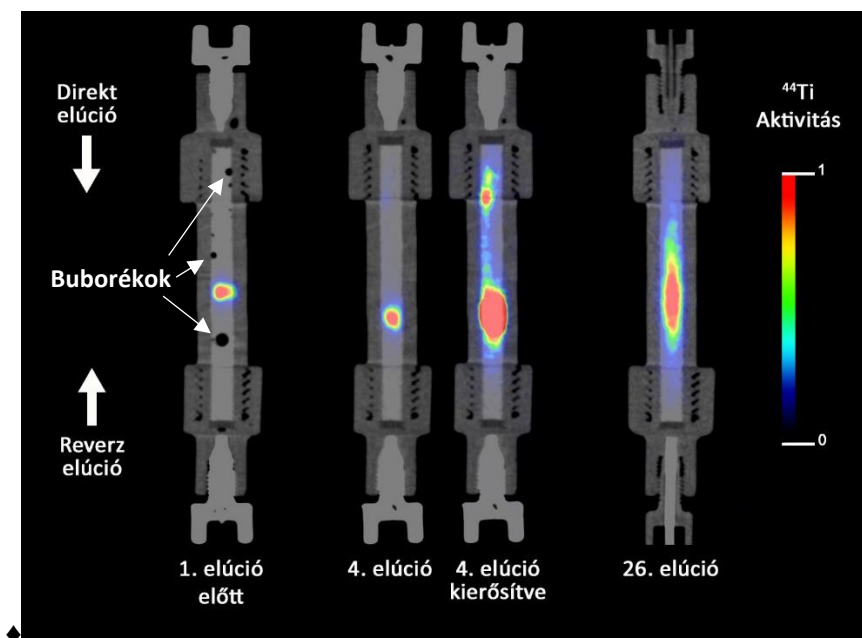
5.1.3.A ^{44}Ti leoldása és az izotópgenerátor újratöltése

Mivel az első $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátor kialakítása során a folyamatos és alkalomszerű $^{44}\text{Ti(IV)}$ veszteség is az anyaelem elhelyezkedéséből és az eluálási módszerből adódott, így 50 elúció után a generátor újratöltése mellett döntöttünk. Az első generátor esetén a reverz elúciónál történt nagymértékű áttörés valószínűleg annak volt köszönhető, hogy az anyaelem az oszlop elején helyezkedett el, közvetlenül a fritt alatti gyantára adszorbeálva. Emiatt a visszafelé történő mosás során a deszorbeálódó $^{44}\text{Ti(IV)}$ -nek jelentősen kevesebb utat kellett megtenni az állófázison, mint a direkt elúció során. Ezért a második betöltés esetén a $^{44}\text{Ti(IV)}$ oldatot az oszlop közepére juttattuk, így a direkt-reverz elúciót újra tudtuk tesztelni. Filosofov és mtsai. eredményével [46] szemben ez esetben sem tapasztaltuk a csökkent mértékű áttörést, sőt az érték megnőtt. A megközelítőleg 4 hónapos használati idő alatt 36 elúciót végeztünk az izotópgenerátoron. A két eltérően töltött generátorunknak a teljes eluátumhoz tartozó aktivitásait összehasonlítva (1. töltés: 17. ábra; 2. töltés: 19. ábra) láthatjuk, hogy a pontokra illesztett egyenes meredeksége a második generátor esetén $m = -0,0049$.



19. ábra A második töltésű $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátorból eluálásonként kinyert teljes aktivitás értékek az eltelt idő függvényében

Ugyanez az érték az első generátornál $m = -0,0007$, vagyis a generátorból történő $^{44}\text{Ti(IV)}$ deszorpció mértéke megközelítőleg hétszeresére nőtt az újratöltést követően. Ezen túlmenően a SPECT/CT felvételek összehasonlítása (1. töltés: 16. ábra; 2. töltés: 20. ábra) után is kijelenthető, hogy az újratöltést követően - a reverz elúcióknak betudhatóan - nagyobb volt a ^{44}Ti hosszanti és mindkét irányú elmozdulása. A második betöltés első SPECT/CT felvételén (16. ábra, 1. elúció előtt) látható, hogy buborékos volt a gyanta, amelyektől ismételt mosásokkal sikerült megszabadulni. Ha megvizsgáljuk a 4. elúcióról készült kierősített képet, akkor láthatjuk, hogy a buborékok kimosása közben valószínűleg felkavarodott a $^{44}\text{Ti(IV)}$ radio-fémiont adszorbeáló szemcsék egy része és a kolonna tetejére vándorolt ($\sim 1 \text{ kBq}$).



20. ábra A második generátor ^{44}Ti eloszlásának változása az elúciók hatására (SPECT/CT), a képen feltüntetésre kerültek az első betöltésnél észlelt buborékok is

5.1.4. A ciklotronban és a generátorban előállított ^{44}Sc jelzési reakcióinak az eredményei és összehasonlításuk

A két eltérő módszerrel termelt ^{44}Sc radioizotóp között az elsődleges különbség a radionuklid tisztaság volt. A generátorból kinyert ^{44}Sc mellett csupán az anyaelem, a ^{44}Ti volt kimutatható. Ennek a mennyisége a 17. ábra és a 19. ábra egyenleteinek a segítségével számolható volt. Ezek alapján az eluátumok ^{44}Ti tartalma az elsőnek töltött generátornál megközelítőleg 0,03%, míg az újratöltött generátor esetén hozzávetőleg

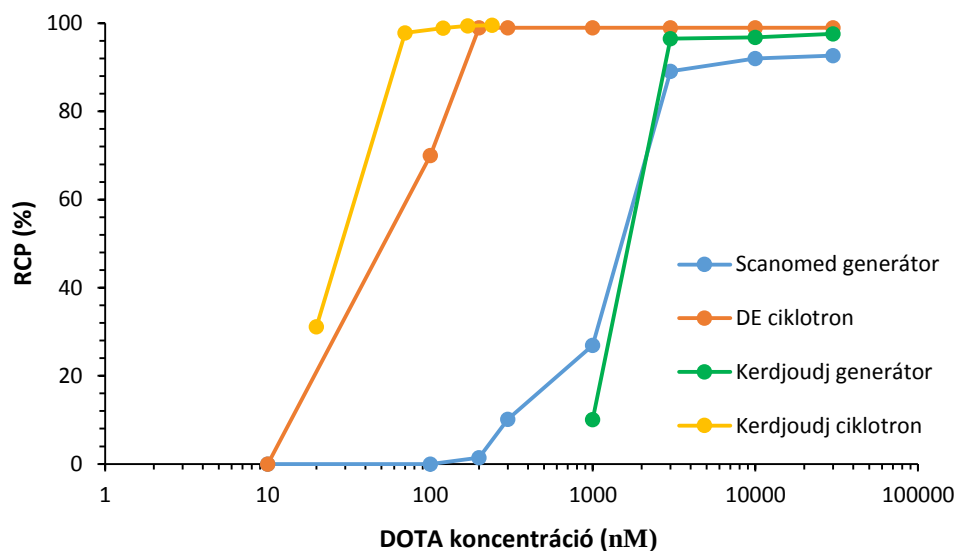
0,21% volt, vagyis a ^{44}Sc -ra nézett radionuklid tisztaság 99,79-99,97% volt. Ezzel ellentétben a ciklotronban termelt ^{44}Sc tartalmazott egyéb szkandium izotópokat, amelyek a természetes izotópösszetételű kalciumban található különböző tömegszámú izotópokkal végbemenő magreakcióknak köszönhető. A 4. táblázat tartalmazza a lehetséges magreakciókat, illetve a gamma-spektrométerrel mért eredményeket. Fontos megjegyezni, hogy a gamma-spektrometriás mérések a besugárzást követően hozzávetőleg 1 órával történtek, hogy a rövid felezési idejű izotópok (^{40}Sc , $^{42\text{m}}\text{Sc}$, ^{42}Sc) elbomoljanak.

4. táblázat A természetes izotóp-összetételű Ca céltárgy p^+ (16 MeV) besugárzását követően végbemenő lehetséges magreakciók [49]; a termelődő szkandium radioizotópok felezési ideje; illetve az általunk használt, ciklotronban előállított ^{44}Sc radionuklid összetétele (a besugárzás vége után 1 órával)

Izotóp	Ca izotóp-összetétel (%)	Végbemenő magreakciók	$t_{1/2}$, Sc izotóp	Minták radionuklid összetétele (%)
^{40}Ca	96,941	$^{40}\text{Ca}(p,n)^{40}\text{Sc}$	182 ms	-
^{42}Ca	0,647	$^{42}\text{Ca}(p,n)^{42\text{m}}\text{Sc}$	61,7 s	-
		$^{42}\text{Ca}(p,n)^{42}\text{Sc}$	681 ms	-
^{43}Ca	0,135	$^{43}\text{Ca}(p,n)^{43}\text{Sc}$	3,89 óra	-
		$^{43}\text{Ca}(p,2n)^{42}\text{Sc}$	681 ms	-
^{44}Ca	2,086	$^{44}\text{Ca}(p,n)^{44}\text{Sc}$	3,93 óra	$94,19 \pm 1,35$
		$^{44}\text{Ca}(p,n)^{44\text{m}}\text{Sc}$	58,6 óra	$1,45 \pm 0,04$
		$^{44}\text{Ca}(p,2n)^{43}\text{Sc}$	3,89 óra	-
^{46}Ca	0,004	$^{46}\text{Ca}(p,n)^{46}\text{Sc}$	83,8 óra	-
^{48}Ca	0,187	$^{48}\text{Ca}(p,n)^{48}\text{Sc}$	43,7 óra	$2,05 \pm 0,41$
		$^{48}\text{Ca}(p,2n)^{47}\text{Sc}$	80,4 óra	$0,86 \pm 0,04$

Ezek alapján a ciklotronban termelt ^{44}Sc radionuklidos tisztasága $94,19 \pm 1,35\%$ a mérés pillanatában, ahol a fennmaradó közel 6%-ot egyéb szkandium és kalcium radioizotópok teszik ki ($^{44\text{m}}\text{Sc}$; ^{48}Sc ; ^{47}Sc). Mivel ezen izotópok hosszú felezési idővel rendelkeznek és kémiai módszerek segítségével nem választhatók el a 44-es tömegszámú nuklidtól, így folyamatos szennyezőként voltak jelen.

Az DOTA jelölhetőségének összehasonlítás során a kapott eredményeket az irodalomban közölt adatokkal is összevetettük (21. ábra). Fontos megemlíteni, hogy Kerdjoudj és mtsai. a Filosofov-féle $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátorról eluált ^{44}Sc -ot használták az összehasonlító kísérleteikhez [3].



21. ábra ^{44}Sc -DOTA jelölési hatásfok összehasonlítása saját és irodalmi adatokkal (Scanomed generátor: a doktori munkám során kialakított $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátor; DE ciklotron: A Debreceni Egyetem Orvosi Képző Intézetének ciklotronjában előállított ^{44}Sc ; Kerdjoudj generátor/ciklotron: A Kerdjoudj és mtsai. által használt, Filosofov-féle $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátor és az általuk használt ciklotron [3])

Megfigyelhetjük, hogy megközelítőleg egy nagyságrendnyi különbség van a generátorból kinyert és a ciklotronnal előállított ^{44}Sc jelölési hatásfoka között. A ciklotronos radioizotóp még 100 nM-os DOTA koncentráció mellett is közel 100%-ban volt jelölhető, míg a generátoros csupán 1000 nM koncentráció mellett közelítette meg ezt az értéket. Azt is láthatjuk, hogy az irodalmi értékek és az általunk kapott eredmények nagy mértékben megegyeznek. Csekély eltérésként kiemelhetjük, hogy a ciklotronos eredményeket nézve Kerdjoudj és mtsai. még 70 nM DOTA koncentráció esetén is közel 100%-os jelölési hatásfokot írtak le, míg esetünkben ezen koncentráció mellett, csupán 70% volt elérhető.

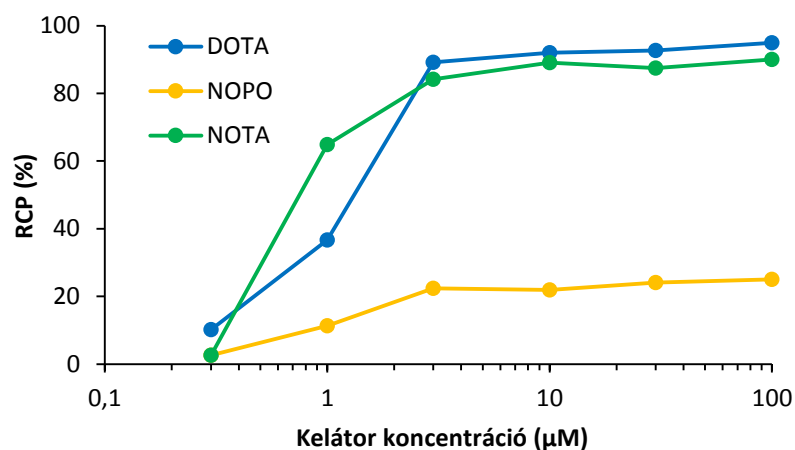
5.2. A kapilláris rendszer segítségével végzett ^{68}Ga és ^{44}Sc jelölések eredményei és összehasonlításuk

5.2.1. A jelölések ismételhetőségének a vizsgálata

Az általunk összeállított (11. ábra) kapilláris rendszer segítségével kapható eredmények ismételhetőségének a teszteléséhez a jelölési kísérletsorozatok inflexiós pontjait használtuk fel, hiszen itt a rendszer igen érzékeny a körülmények változására. Először az ugyanazon eluálásból származó $^{44}\text{Sc(III)}$ és $^{68}\text{Ga(III)}$ törzsoldatok segítségével történő DOTA jelölések RCP értékeinek a szórását vizsgáltuk. Itt azt találtuk, hogy 5 egymást követő jelzés mellett a relatív standard deviáció (RSD) 1-3% volt. Az eltérő napokon, eltérő elúciókból származó $^{44}\text{Sc(III)}$ és $^{68}\text{Ga(III)}$ törzsoldatok felhasználásával történő DOTA jelölések szórása már jóval nagyobb, 10-30% RSD-t adott, ami az oldatok összeállításának és a jelölési körülményekben történő minimális változásoknak tudható be. Fontos kiemelni, hogy ezen eredmények csak az igen érzékeny inflexiós pontok körül tapasztalhatók. Amennyiben jelölés során a radiokémiai tisztaságot nézve az $5\% > \text{RCP} > 95\%$ feltétel teljesült, vagyis a jelölés, vagy közel teljesen, vagy egyáltalán nem ment végbe, akkor az RSD minden esetben 2% alatti érték volt.

5.2.2. Különböző kelátorok ^{44}Sc jelöléseinek összehasonlítása a kapilláris rendszer segítségével

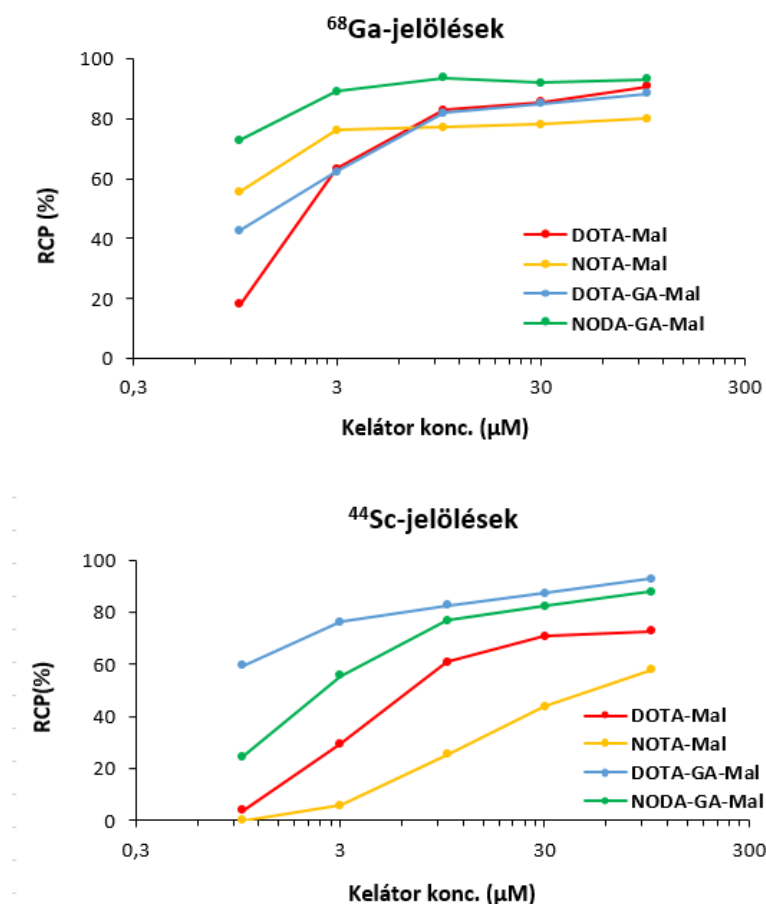
A méréssorozat során a leggyakrabban alkalmazott $^{68}\text{Ga(III)}$ kelátorok (DOTA, NOTA, NOPO) affinitását vizsgáltuk $^{44}\text{Sc(III)}$ -ra nézve. A reakciók során csökkenő koncentrációjú kelátor oldatokkal végeztük el a jelöléseket, pH = 4 pufferelt oldatban, 5 perces reakcióidő és 95 °C mellett. A 22. ábra mutatja be a leírt kísérletek eredményeit, ahol látható, hogy a NOPO nem alkalmas a $^{44}\text{Sc(III)}$ radio-fémionnal történő komplexképzésre, hiszen még 100 μM mellett is épphogy 20%-os jelölhetőség volt tapasztalható. Ezen túl az is megfigyelhető, hogy 3 μM felett a RCP független a NOPO koncentrációtól. A NOTA és a DOTA közel azonos módon volt jelezhető. Látható, hogy 3 μM koncentrációjú reakcióelegyben 80% feletti radiokémiai tisztaság érhető el velük.



22. ábra Eltérő kelátor koncentráció mellett végrehajtott ^{44}Sc -DOTA/NOTA/NOPO jelölések 95 °C, pH = 4 (0,5 M os NH_4OAc) és 5 perces reakcióidő mellett

5.2.3. A maleimid-konjugált kelátorok jelöléseinek eredményei és összehasonlításuk

A funkcionizálatlan kelátorokkal végzett jelzési kísérletek ugyan alkalmasak egy új radioizotóp komplexképzési reakcióinak a felderítésére, azonban a kapott eredmények nem mindig alkalmazhatók közvetlenül az *in vivo* képalkotásban is használt farmakonok esetén. Ez annak köszönhető, hogy a kelátorok biológiai vektorokhoz történő kapcsolása gyakran az egyik fémionhoz koordinálódó funkciós csoport (pl.: karboxil-kar) felhasználásával történik, ami jelentősen befolyásolhatja az optimális jelzési körülményeket. Ennek köszönhető, hogy a 5.2.2. pontban leírt tájékozódó kísérletek kiegészítésre szorultak. Ehhez maleimiddel egyszerűen funkcionizált kelátor származékokat használtunk, mivel az aromás csoportnak köszönhetően a molekulák apolárosabb tulajdonságúak, lehetővé téve fordított fázisú HPLC-s analitikai elválasztást. Ezen túl UV aktívak, ami a kromatográfiás elválasztás kidolgozását megkönnyíti. A felhasznált származékok a következők voltak: DOTA-Maleimid, DOTA-GA-Maleimid, NOTA-Maleimid, NODA-GA-Maleimid. A két radioizotóppal és a különböző kelátorokkal elvégzett jelölési sorozatok eredményeit a 23. ábra mutatja.



23. ábra ⁶⁸Ga(III) és ⁴⁴Sc(III) radio-fémionokkal végzett jelölési sorozatok RCP eredményei a kelátor származékok koncentrációjának a függvényében; kelátor származékok: DOTA-Maleimid, DOTA-GA-Maleimid, NOTA-Maleimid és NODA-GA-Maleimid; Reakciókörülmények: 95 °C, 5 perc, pH = 4

Megfigyelhetjük, hogy míg a ⁶⁸Ga(III) esetén a különböző kelátorokkal funkcionáliszt maleimid származékok megközelítőleg ugyanolyan lefutású görbéket produkáltak, addig a ⁴⁴Sc(III) esetén jelentősebb különbség tapasztalható az egyes kelátorok között. A ⁶⁸Ga(III) jelöléseknél elmondhatjuk, hogy megközelítőleg 6 μM felett már 80%-ot meghaladó, vagy megközelítő RCP-t értünk el mind a négy származék esetén. A görbék alapján azt mondhatjuk, hogy a NODA-GA-Maleimid, vagyis az egyszeresen funkcionáliszt NODA-GA a legalkalmasabb a ⁶⁸Ga(III)-mal történő komplexképzésre a feltüntetett kelátok közül. A DOTA-Maleimid és DOTA-GA-Maleimid eredményeit nézve látható, hogy hasonló a lefutásuk, de azonos kelátor koncentrációk mellett rendre kisebb RCP volt velük elérhető, mint a NODA-GA származékkal. A négy kelátor közül a NOTA-Maleimid teljesített a legrosszabbul, hiszen a 6 μM kelátor koncentrációt, illetve a 70-80%-os RCP-t elérve már további kelátor hozzáadására sem tudtunk jobb eredményt

elérni. Ugyanezen az ábrán (23. ábra) látható, hogy a $^{44}\text{Sc(III)}$ jelöléseknél a DOTA-GA-Maleimid szolgáltatta a legkedvezőbb eredményeket, hiszen már $2\ \mu\text{M}$ felett 80%-ot meghaladó radiokémiai tisztaság volt vele elérhető. A NODA-GA-Maleimid hasonló eredményeket adott, mint a $^{68}\text{Ga-DOTA-GA-Maleimid}$, hiszen $20\ \mu\text{M}$ kelátor koncentráció mellett 80% körüli RCP értéket adott. Ezen kedvező eredményekkel szemben a DOTA-Maleimid és a NOTA-Maleimid segítségével nem voltunk képesek 80% jelölési hatásfokot elérni a leírt körülmények között.

5.2.4. A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc-NODA-GA-c(RGDfK)}$ manuálisan és a kapilláris rendszerrel történő előállítás és az eredmények összehasonlítás

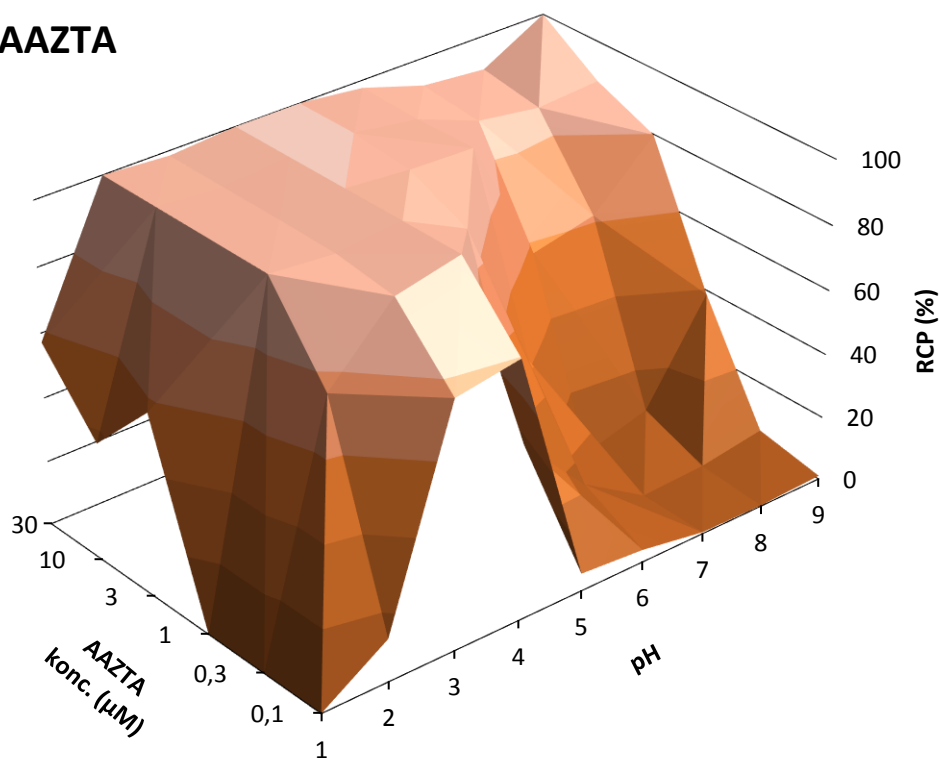
Az előző pontokban alapján kiválasztottuk az ideális kelátort és az optimális jelölési körülményeket és ezeket felhasználtuk a c(RGDfK) jelöléséhez. A 23. ábra alapján a DOTA-GA és a NODA-GA kelátorok bizonyultak a legjobbnak mindkét izotóp esetén. Mivel a NODA-GA-c(RGDfK) az irodalomból jól ismert anyag és kereskedelmi forgalomban is kapható, így ennek jelölését végeztük el ($95\ ^\circ\text{C}$; 15 perc; NH_4OAc pH = 4,1; 1 M). A kapilláris rendszer segítségével végrehajtott preparatív jelölés során a RCY megközelítőleg 65% volt (bomláskorrigált RCY = 80%), míg a kézi jelölés segítségével mindössze 50%-os RCY volt elérhető. A kapilláris rendszeren a legnagyobb veszteség a prekursorok felszívásánál történt, hiszen az injektornak $150\ \mu\text{l}$ folyadékra van szüksége, a reprodukálható folyadékmozgatásokhoz ($100\ \mu\text{l}$), ami megközelítőleg 30%-os veszteséget jelent. Fontos megemlíteni, hogy a manuális jelölés és a minőségellenőrzés teljes időtartama megközelítőleg 60 perc, míg ugyanez a kapilláris rendszert használva 30 percre lecsökkenthető.

5.3. Az AAZTA származékokkal végzett kísérletek eredményei

5.3.1. ^{44}Sc -AAZTA és DOTA jelölési körülményeinek optimalizálása

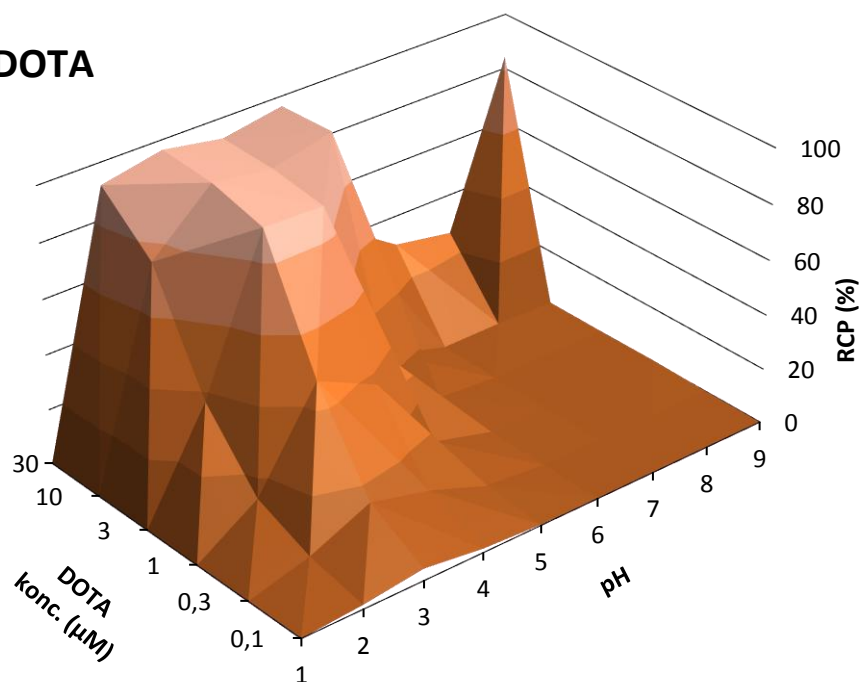
Az AAZTA $^{44}\text{Sc(III)}$ radio-fémionnal való jelölhetőségének a vizsgálatára különböző pH (1-9) esetén meghatároztuk a RCP-t, a kelátor koncentráció (30-0,1 μM) függvényében (95 °C, 5 perc). Összehasonlítás végett ugyanezeket a jelzési kísérleteket elvégeztük DOTA kelátorral is. A 6 eltérő, fél-logaritmikusan csökkenő kelátor koncentráció és az 9 pH-egység változtatásával keltoronként összesen 54 pontot vettünk fel, amit egy 3 dimenziós felületként ábrázoltunk (24. ábra, 25. ábra). Az eredmények segítségével könnyen megadható volt az a legkisebb kelátor koncentráció, amelynél a megfelelő pH mellett végrehajtott jelölési reakció közel 100%-os radiokémiai tisztaságot eredményezett.

^{44}Sc -AAZTA



24. ábra Az RCP értékek a kelátor koncentráció és a pH függvényében a ^{44}Sc -AAZTA rendszer esetén (RCP-Konc.-pH felület)

⁴⁴Sc-DOTA

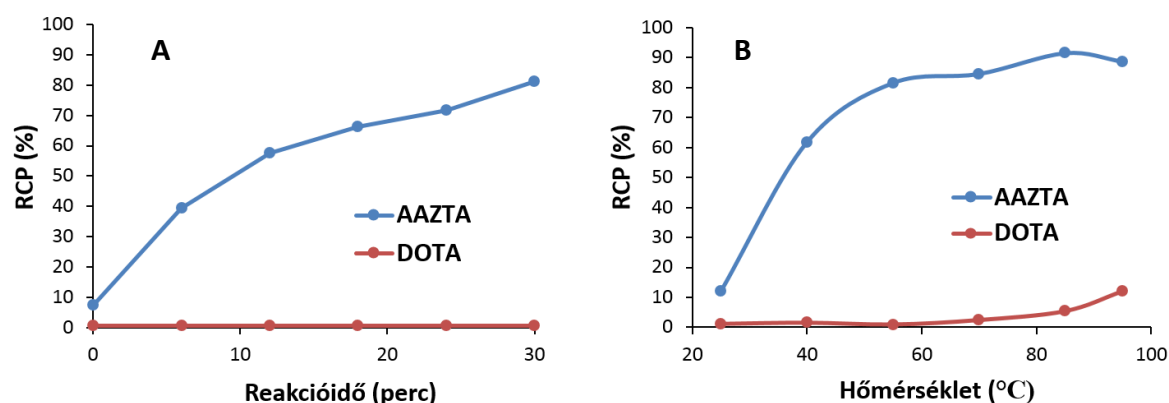


25. ábra Az RCP értékek a kelátor koncentráció és a pH függvényében a ⁶⁸Ga-AAZTA rendszer esetén (RCP-Konc.-pH felület)

Az RCP-Konc.-pH felületeket nézve látható, hogy a DOTA esetén (25. ábra) a jelölés végrehajtására a legideálisabb a pH = 3 és 4, ahol megközelítőleg 3 μM kelátor koncentráció alkalmazásával 95% feletti jelölési érhető el. Ezen túl pH = 2/5/6 esetén még végrehajtható a jelzés, de egy nagyságrenddel nagyobb (30 μM) kelátor koncentráció mellett. Az AAZTA esetén is (24. ábra) a pH = 3 és 4 volt az ideális jelölési pH-tartomány, viszont egy nagyságrenddel kisebb, 0,3 μM kelátor koncentráció mellett. A teljes pH-skálát vizsgálva (2-9) az is látható, hogy 3 μM AAZTA koncentráció mellett mindenhol 90% feletti jelölési hatásfokot tudtunk elérni.

A reakcióhőmérséklet vizsgálata során azt a körülmény-együttest választottuk - az optimalizációs felület felhasználásával -, ahol a RCP megközelítőleg 50% volt (kelátor koncentráció: 0,1 μM; puffer: 0,25 M pH = 4 NH₄OAc; reakcióidő: 5 perc). Mivel átmeneti pontról beszélünk, így a rendszer sokkal érzékenyebb a külső körülmények megváltoztatására, aminek köszönhetően számunkra is egyszerűbb az eredmények értelmezése. A reakcióidő vizsgálatához hasonló körülményeket alkalmaztunk, szintén a megfelelő érzékenység miatt (kelátor koncentráció: 0,1 μM; puffer: 0,25 M pH = 4 NH₄OAc; reakcióhőmérséklet: 25 °C). A hőmérséklet és reakcióidő lefutása igen hasonló

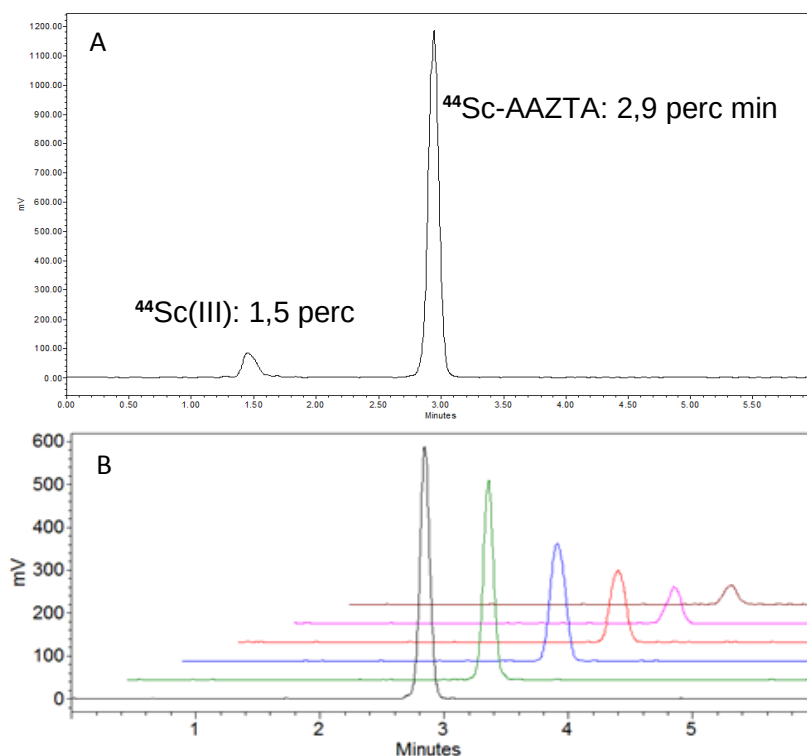
eredményt adott (26. ábra). Mivel a 95 °C-on mért DOTA jelölések esetén 5 percnél is csak 10%-os hozam volt tapasztalható, illetve a szobahőmérsékleten 25 perc után vizsgált minta sem érte el az 5%-os RCP értéket, így a többi pont extrapolált érték.



26. ábra A RCP értékek a reakcióidő (A), illetve a reakcióhőmérséklet (B) függvényében a ^{44}Sc -AAZTA/DOTA jelölések során

A 26. ábra segítségével látható, hogy a leírt reakciókörülmények között az AAZTA mindkét esetben felülmúlta a DOTA-t, hiszen már az 50 °C-ot elérve (5 perc alatt) 80%-nál nagyobb jelölési hatásfokot értünk el. Szobahőmérsékleten igen kis kelátor koncentráció mellett pedig már 10 perc elteltével 50%-os RCP értéket mértünk.

Ezen túl kinetikai vizsgálatokat végeztünk a ^{44}Sc -AAZTA-val egér plazmában, 12 órán keresztül. A méréssorozat folyamán a HPLC kromatogramok kiértékelésével a disszociáció mértékét az AAZTA-hoz nem koordinálódó $^{44}\text{Sc(III)}$ és a ^{44}Sc -AAZTA arányával tudtunk meghatározni. A 27. ábra „A” részén látható kromatogramot úgy kaptuk, hogy 100%-os ^{44}Sc -AAZTA oldatba pipettáztunk a jelölésekhez használt NH_4OAc pufferelt $^{44}\text{Sc(III)}$ oldatot, majd ezt követően rögtön injektáltuk a HPLC rendszerre. Ennek segítségével azonosítottuk a termékhez, illetve a nem koordinálódó $^{44}\text{Sc(III)}$ -hoz tartozó csúcsot és a hozzárendelhető retenciós időket ($^{44}\text{Sc(III)}$: $R_t = 1,5$ perc; ^{44}Sc -AAZTA: $R_t = 2,9$ perc).



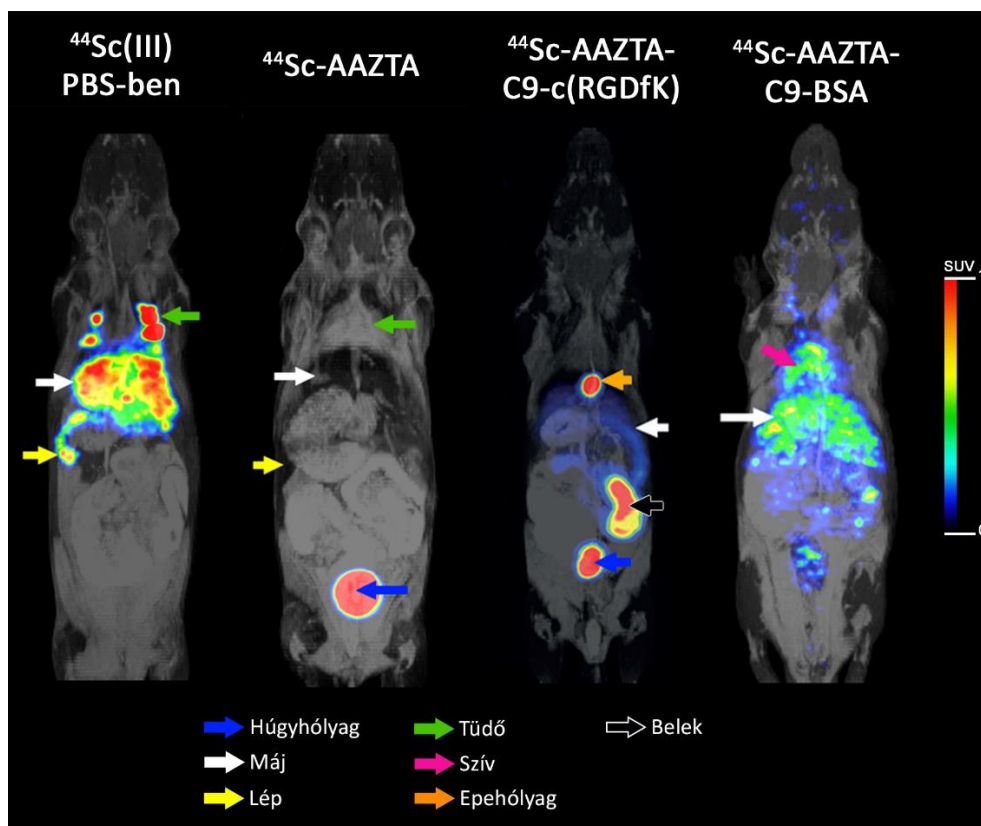
27. ábra A $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ radio-HPLC kromatogramjai. 100%-os radiokémiai tisztaságú $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ -hoz adott NH_4OAc pufferlet $^{44}\text{Sc(III)}$ (A), $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ kinetikai stabilitásának a vizsgálata egérplazmában (B). (0, 1, 2, 4, 8 és 12 óra, 37 °C)

A „B” részen az egérplazmával végzett kinetikai vizsgálat 6 időpontban mért kromatogramja látható egymásra illesztve. Látható, hogy még 12 óra elteltével sem jelenik meg 1,5 perces retenciós időnél csúcs, ami azt jelenti, hogy az előállított $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ 37 °C-on, egérplazmában kinetikailag inert. A csúcs alatti területek értékeit ábrázoltuk az eltelt idő függvényében, majd exponenciális trendvonalat illesztettünk rá. A kapott görbe egyenletéből számolható a csökkenés mértéke, amiből pedig számolható a bomlási állandó és a felezési idő. A kapott egyenlet alapján a bomlási állandóra 0,1662 értéket kaptunk, ami 4,17 órának felel meg felezési időre átszámolva. Ezt összehasonlítva a ^{44}Sc 3,97 órás felezési idejével mindössze 0,2 órás eltérés látható. Mivel ez mindössze 5%-os eltérést jelent, így kijelenthetjük, hogy a csúcsterületek csökkenését az izotóp fizikai bomlása okozza, nem pedig a kémia bomlás.

5.3.2. A ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK)/BSA-val végzett biológiai vizsgálatok

Fontos megemlíteni, hogy az optimalizáló méréseket az AAZTA alapvázú kelátorral végeztük, míg a c(RGDfK)-hoz és BSA-hoz kapcsolás során AAZTA-C9, linkerrel ellátott kelátort használtunk. Az 5.3.1. pontban leírt eredmények alapján kiválasztottuk az ideális jelölési körülményt a ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) és ^{44}Sc -AAZTA-C9-BSA előállításához.

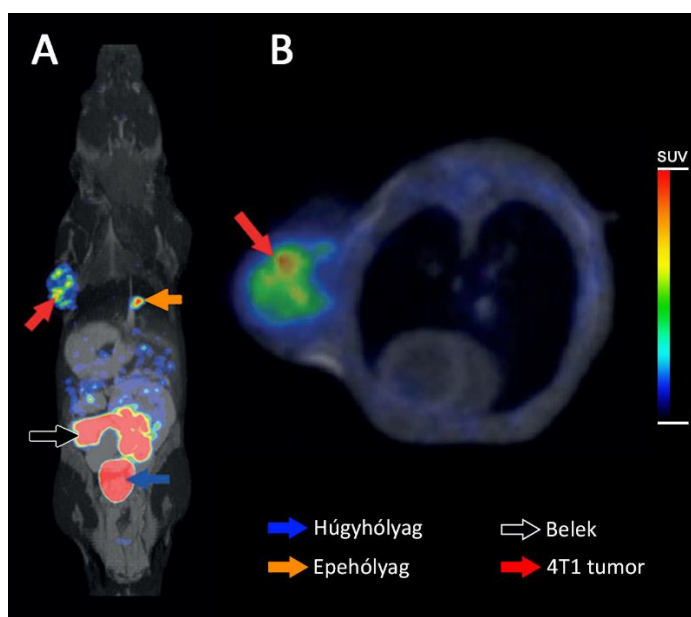
A PBS puffertelt $^{44}\text{Sc(III)}$ „*in vivo* kompatibilis” oldat előállításához meg kellett szabadulni az eluálószerben lévő oxálsavtól, illetve az ioncsere során alkalmazott NH_4OAc sótól, mivel mindkét anyag toxikus. Hasonlóan jártunk el a ^{44}Sc -AAZTA előállításánál is. A ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) és a ^{44}Sc -AAZTA-C9-BSA esetén is a jelölést követő tisztítási lépések (C18 SepPak, gélszűrés) segítségével meg tudtunk szabadulni a toxikus komponensektől. Az így előálló oldatokat a laterális farki vénán keresztül injektáltuk, majd 90 perc elteltével PET/MRI leképzést végeztünk kontroll BALB/c egerek felhasználásával (28. ábra).



28. ábra Koronális PET/MRI képek egészséges kontroll BALB/c egerekről, 90 perccel a feltüntetett anyagok injektálását követően

Az összefoglaló képre tekintve (28. ábra) láthatjuk, hogy a PBS puffertelt $^{44}\text{Sc(III)}$ a májban, a lépben és a tüdőben is megtalálható. HPLC segítségével igazoltuk (4.4.4. pont), hogy a bepárlást és a visszaoldást követően az adott körülmények között irreverzibilis kémiai változás nem történt a $^{44}\text{Sc(III)}$ -mal. A pár perces analitikai vizsgálatot követően azonnal injektáltuk a mintát, hogy minél inkább kizárhassuk az oldatban végbemenő hidrolízist. A látható megoszlás arra utalhat, hogy a beadás után gyors hidrolízis mehet végbe, ami aggregálódáshoz vezet, így pedig a radioizotóp májban dúsul. Ezt látszik alátámasztani, hogy a májon kívül igen jelentős mennyiségű aktivitás volt kimutatható a tüdőben is, ami a kapillárisokban való elakadást jelezheti. A $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ nem dúsul sem a mellkasi, sem a hasi régióban, a veséken keresztül igen hamar a húgyhólyagba jut a vizelettel. Az AAZTA-C9-c(RGDfK) az epehólyagban, a májban, a húgyhólyagban (vizelet) és kis mértékben a belekben is megtalálható. A $^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-BSA}$, fehérjeszármazék révén a vártaknak megfelelően a legnagyobb mértékben a májban található meg, viszont fontos információ, hogy igen sokáig a keringésben marad, amire a szívben látható halmozásból következtethetünk.

Az egészséges kontroll méréseket követően a tumoros állatmodellen vizsgáltuk a $^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-c(RGDfK)}$ -t, hogy bizonyosságot nyerjünk az angiogenesis marker tulajdonságáról. Ehhez 4T1 tumort hordozó BALB/c egereket használtunk, melynek az injektálást követő leképzési és rekonstrukciós protokollját az egészséges kontroll állatoknál alkalmazottakkal megegyezően végeztük el (29. ábra).



29. ábra 4T1 tumor hordozó BALB/c egér koronális (A) és axiális (B) PET/MRI képe a $^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-c(RGDfK)}$ injektálását követően 90 perccel

A 29. ábra alapján kijelenthetjük, hogy hasonló a szervi megoszlás, mint az egészséges kontroll állat esetén (28. ábra), attól eltekintve, hogy a (képen nem jelölt) májban kisebb aktivitás volt kimutatható. Magasabb aktivitást az epehólyagban, a húgyhólyagban, a belekben, illetve a tumorban találtunk. A bal lapocka felett látható 4T1 tumor és a környezetben lévő izomszövet közötti SUV értékekben egy jelentős, 25-szörös különbség volt mérhető.

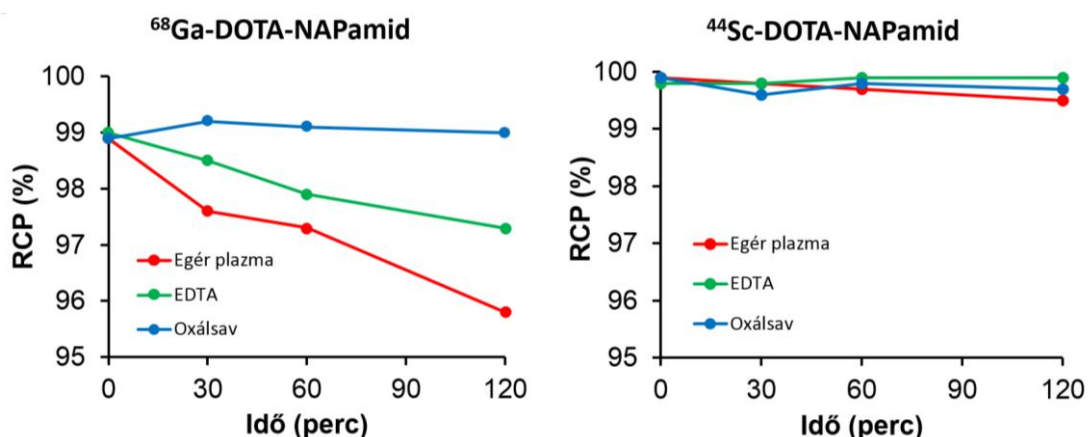
5.4. A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid melanoma markerrel végzett kísérletek eredményei

5.4.1. A jelölések, a logP vizsgálatok és a kinetikai stabilitás mérések eredményei

Mind a $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ és a $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ radio-fémionok esetén az optimális jelölési körülményeket meghatároztuk: 95 °C; 15 perc; pH = 4, 0,5 M-os NH_4Ac puffer. A HPLC-n végzett analitikai elválasztás után kapott kromatogramokon a folyadékfronttal mozgó $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ és $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ retenciós ideje minden esetben 0,33 perc volt, míg a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid és a ^{44}Sc -NAPamid 1,88 percnél, illetve 1,91 percnél volt azonosítható. A radiokémiai tisztaságot és hozamot ezen csúcsok arányából adtuk meg. Mindkét anyag előállítása során, a tisztítást követően a végtermékek radiokémiai tisztasága minden esetben meghaladta a 99%-ot. A bomláskorrigált radiokémiai hozam $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ esetén 80-86% között, míg a $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ esetén 60-70% között volt. A ^{68}Ga -DOTA-NAPamiddal végzett kísérletek során a végtermék moláris aktivitás 19-23 GBq/ μM tartományba esett, míg ugyanez az érték a ^{44}Sc -DOTA-NAPamidnál 15-19 GBq/ μM volt.

A ^{68}Ga -DOTA-NAPamid 1-oktanol/víz megoszlási hányadosa (logP) $-3,5 \pm 0,18$ volt, míg a ^{44}Sc -DOTA-NAPamidot vizsgálva $-3,30 \pm 0,14$ értéket kaptunk.

A kinetikai vizsgálatoknál Na_2EDTA oldathoz, oxálsav oldathoz és egér plazmához kevertük a végtermékeket, majd megfelelő időközönként mintát vettünk és HPLC rendszeren ellenőriztük, hogy a termék intakt maradt-e. Az ezen mérések során kapott RCP eredményeket ábrázoltuk az eltelt idő függvényében (30. ábra).

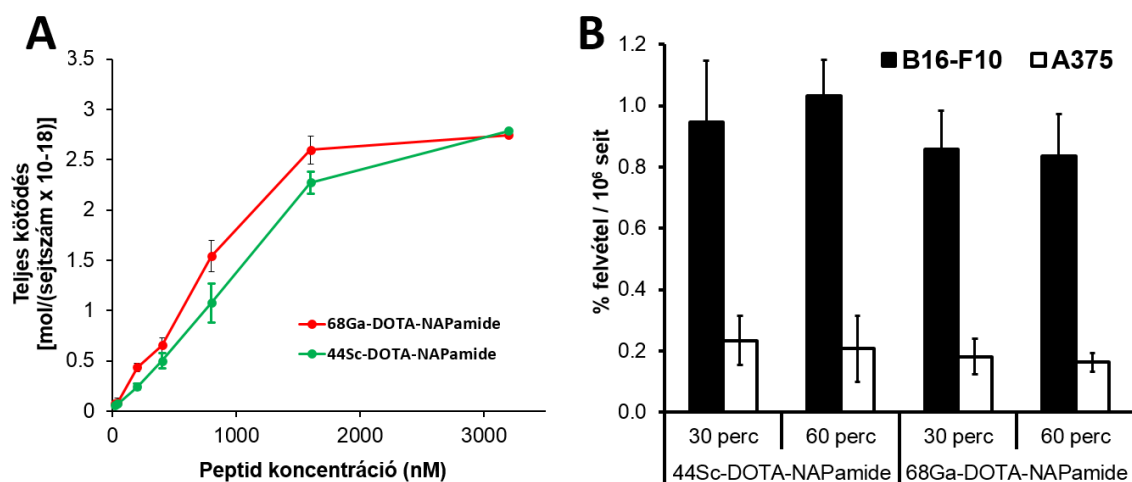


30. ábra A $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid kinetikai stabilitás vizsgálatai során kapott eredmények összefoglalása

A 30. ábra alapján kimondható, hogy az anyagok kinetikai viselkedésében különbség mutatkozik. A ^{68}Ga -jelölt származék tisztasága csak az oxálsavas vizsgálat során nem csökkent le RCP = 99%-os érték alá a 120 perc alatt. Az EDTA hatására két óra elteltével a RCP 97,5% alá csökken, míg ugyanez az érték egér plazmában 96% alatt van. Ezzel ellentétben a ^{44}Sc -jelölt peptid radiokémiai tisztasága két órán belül állandónak tekinthető, jelentős csökkenés egyik esetben sem volt tapasztalható.

5.4.2. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei

Az *in vitro* kötődési vizsgálatok során összefüggést figyeltünk meg az ^{68}Ga - és ^{44}Sc -jelölt peptid koncentrációja és az MC1-R pozitív B16-F10 tumorsejtekhez történő kötődése között, viszont jelentős eltérés nem volt észrevehető a két radiotrészert összehasonlítása során (31. ábra, A). Ezen túl a két anyag specifitását MC1-R pozitív B16-F10 típusú és MC1-R negatív A375 típusú melanoma sejtvonalakat felhasználva vizsgáltuk. (31. ábra, B). A képeket nézve láthatjuk, hogy mindkét vizsgálat során közel azonos eredményeket kaptunk a két radiotrészert összehasonlítva. A 31. ábra „A” részén látható hogy megközelítőleg 1,5 μM jelölt peptid koncentráció mellett érjük el a telítési platót. A „B” oszlopdiagramra tekintve pedig kijelenthető, hogy a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid és ^{68}Ga -DOTA-NAPamid dúsulása a B16-F10 sejtekben jelentősen magasabb volt, mint az MC1-R negatív A375 sejteknél.

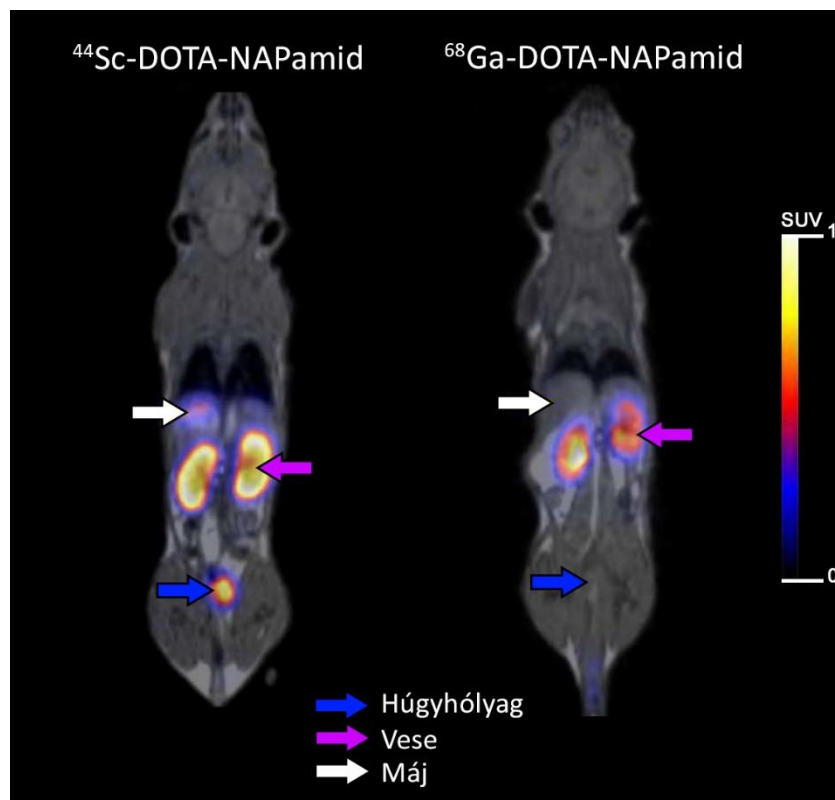


31. ábra A B16-F10 (MC1-R pozitív) és A375 (MC1-R negatív) tumoros sejtvonalakon végzett *in vitro* vizsgálatok eredményei; a teljes kötődés vizsgálata a peptidkoncentráció (moláris aktivitás alapján számolva) függvényében (A); a sejtek által felvett radiofarmakon mennyisége %-ban kifejezve (B)

A különbség megközelítőleg ötszörös mindkét időpontban, így igazolva a két anyag receptor specificitását. Ezen túl az is kijelenthető, hogy a ⁴⁴Sc-jelölt származék, nem jelentős mértékben ugyan (30 perc: 0,95±0,20; 60 perc: 1,03±0,12), de jobban dúsult a B16-F10 sejtekben, mint a ⁶⁸Ga-jelölt analóg (30 perc: 0,86±0,12; 60 perc: 0,84±0,14).

5.4.3. Az *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós eredmények

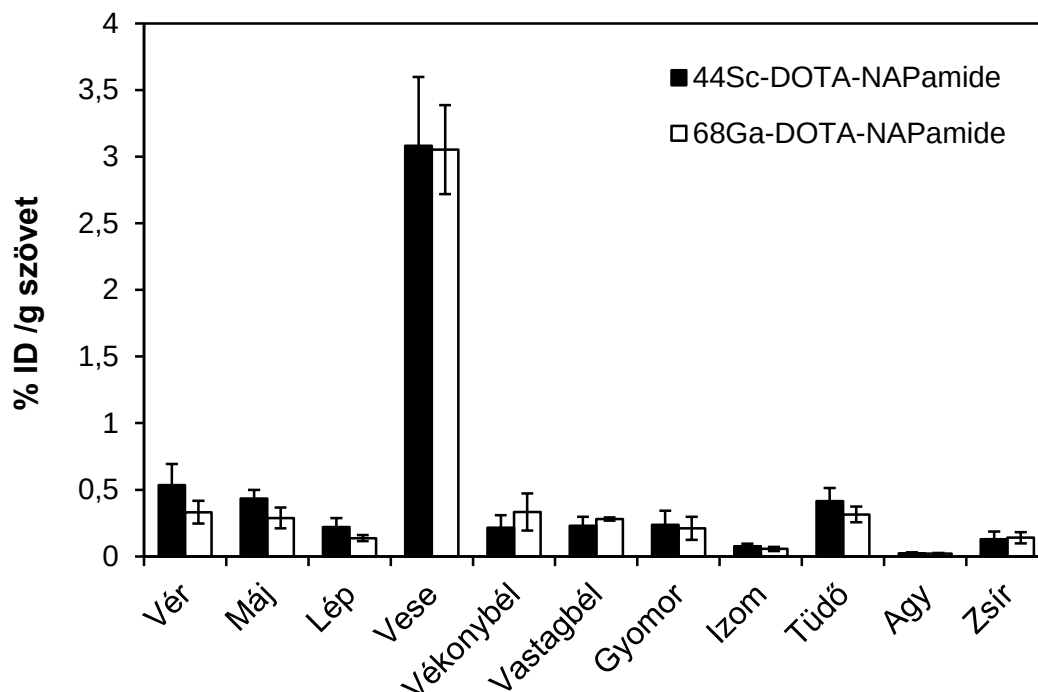
A kontroll, nem tumoros állatokban történt disztribúció vizsgálatához a ⁶⁸Ga- és ⁴⁴Sc-jelölt peptideket (15,6±1,2 MBq) egészséges, C57BL/6 egerekbe injektáltuk, majd 60 perc elteltével teljes test PET/MRI leképezést végeztünk, amit követően *ex vivo* vizsgálatokat hajtottunk végre. A 32. ábra mutatja be a kiértékelt PET/MRI mérések koronális képeit, feltüntetve a nagyobb aktivitást halmozó területeket.



32. ábra Egészséges C57BL/6 egérről készült PET/MRI kép, 60 perccel a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid és a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid injektálását követően

Az ugyanúgy erősített felvételeken látható, hogy mindkét anyag megtalálható a vesékben. A húgyúti rendszer többi részét nézve láthatjuk, hogy a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid esetén a vizeletben és húgyhólyagban a háttérrel hozzávetőleg megegyező halmozás látható, ami a leképzés előtti vizeletürítésnek a következménye. Ezen túl megfigyelhető, hogy a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid esetén a májban is volt kimutatható aktivitás, míg ugyanez a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid esetén nem mondható el.

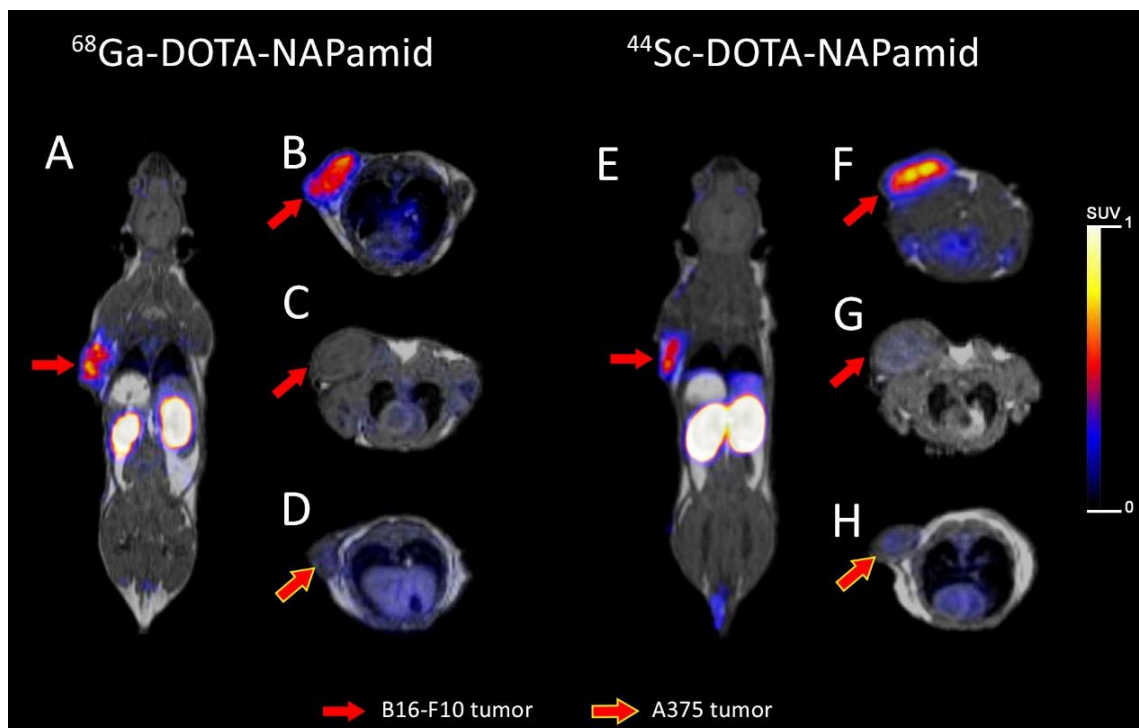
Az ex vivo vizsgálatok során 60 perccel az injektálást követően a feltüntetett szervek eltávolításra kerültek, majd tömegmérés után gamma számlálóval mértük az aktivitásukat. Ezen esetekben is hasonló eredményt kaptunk, bár kisebb eltérések voltak megfigyelhetők, mint a PET/MRI képek esetén (33. ábra).



33. ábra Egészséges C57BL/6 egér *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatának a %ID/g szövet eredményei, 60 perccel a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid és a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid injektálását követően

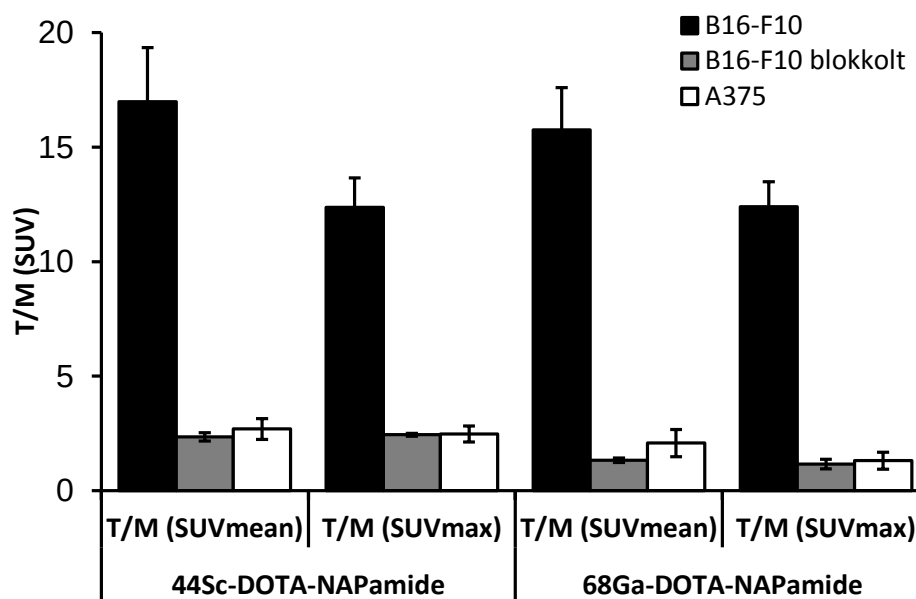
A fenti ábrát nézve láthatjuk, hogy a vizsgált szervek nagy részénél magasabb halmozás figyelhető meg a ^{44}Sc esetén, mint a ^{68}Ga -jelölt származéknál. Ezen túl kijelenthető az is, ami a PET/MRI képeken is látszott, hogy a legnagyobb halmozás a vesékben volt kimutatható. Az elhangzottakat összefoglalva elmondhatjuk, hogy az *ex vivo* szervi megoszlásos és az *in vivo* PET/MRI biodisztribúciós vizsgálatok hasonló eredményeket adtak.

Az MC1-R targetálás hatékonyságát C57BL/6 egerekbe szubkután oltott MC1-R pozitív B16-F10 tumorokon vizsgáltuk 60 és 240 perccel az injektálást követően. Ezen túl a B16-F10 tumorok esetén végeztünk MC1-R blokkolós méréseket, illetve vizsgálatokat az MC1-R negatív A325 tumorokon. Az injektálást követően 60 perccel készült PET/MRI képek összefoglalását és értékelését a 34. ábra mutatja be.



34. ábra *In vivo* tumoros C57BL/6J egerek vizsgálata, 60 perccel a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid és a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid injektálását követően [koronális teljes test (A, E) és axiális (B, F) PET/MRI képek MC1-R pozitív B16-F10 melanoma tumor esetén; axiális PET/MRI képek blokkolt MC1-R pozitív B16-F10 melanoma tumor esetén (C, G); axiális PET/MRI képek MC1-R negative A375 melanoma tumor esetén (D, H)]

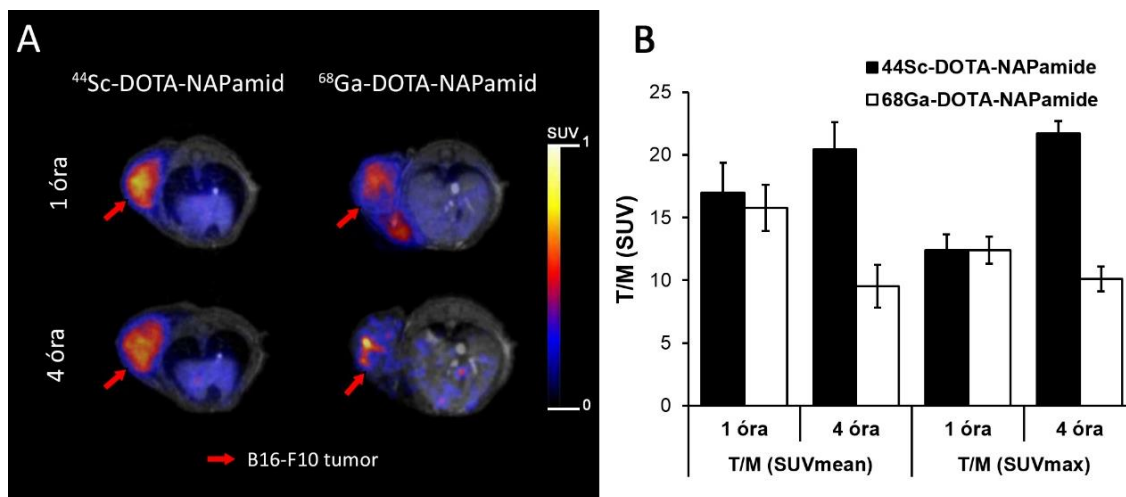
A szubkután növekedő MC1-R pozitív B16-F10 tumorok (34. ábra, A, B, E, F) mindkét radiotrézser esetén tisztán kivehetők, illetve ezen esetekben jelentős aktivitás figyelhető meg a vesékben, amit már az egészséges állatoknál (33. ábra) is láttunk. A blokkolási kísérletek során 200 μg α -MSH blokkolót adtunk a jelölt peptidhez, amit utána injektáltunk, majd a felvételeket ugyanúgy 60 perc elteltével készítettük el. Ahogy a képen is láthatjuk (34. ábra, C, G) a blokkoló lecsökkentette a radiotrézerek halmozódását a receptor pozitív B16-F10 tumorokban. Az MC1-R specificitás vizsgálatához használt A375 tumorral oltott állatokról készült képeken (34. ábra, D, H) láthatjuk, hogy csak elhanyagolható mértékű halmozódás volt tapasztalható a tumorban. A képek kvantitatív kiértékelését követően megerősítést nyertek az előzőekben leírtak (35. ábra).



35. ábra A ⁴⁴Sc-DOTA-NAPamid és a ⁶⁸Ga-DOTA-NAPamid in vivo PET/MRI képeinek kvantitatív kiértékeléséből származó eredmények összefoglalása C57BL/6J egerekbe szubkután oltott B16-F10, blokkolt B16-F10 és A375 típusú tumorok esetén, 60 perccel az injektálást követően

A fenti összesített diagramon látható, hogy az MC1-R pozitív B16-F10 tumort vizsgálva kaptuk a legnagyobb T/M (SUV) értékeket, amelyek közül a ⁴⁴Sc radioizotóppal jelölt származék kis mértékben ugyan, de nagyobb halmozást (T/M (SUVmean): 16,98±2,36; T/M (SUVmax): 12,38±1,28) mutatott a ⁶⁸Ga-jelölt származékkal szemben (T/M (SUVmean): 15,75±1,84; T/M (SUVmax): 12,40±1,09). A kvantitatív analízisnek köszönhetően láthatjuk, hogy a blokkolt tumor és az MC1-R negatív tumor is megközelítőleg 7-10 szer kisebb T/M (SUV) értékeket adtak mindkét radiotrészetre nézve (T/M (SUVmean): 1,33-2,69; T/M (SUVmax): 1,17-2,47), ami igazolja mindkét anyag MC1-R specificitását.

A következő lépésben az injektálástól számított 240 perc elteltével is elvégeztük a PET/MRI vizsgálatot ugyanazon állatokon, hogy betekintést nyerjünk az anyag szervezetből történő kiürülésének a kinetikájába. Ezen túl látni szeretnénk volna, hogy a ⁴⁴Sc-DOTA-NAPamid kinetikai inertsége, illetve a ⁴⁴Sc négyszeres felezési ideje mennyivel javítja a képminőséget és T/M (SUV) arányt. Az adatokból nyert összefoglaló és összehasonlító PET/MRI felvételeket és T/M (SUV) adatokat a 36. ábra tartalmazza.



36. ábra A ^{44}Sc -DOTA-NAPamid és ^{68}Ga -DOTA-NAPamid injektálását követően 1 és 4 órával készült PET/MRI képeinek (axiális, **A**) és kvantitatív eredményeiknek az összehasonlítása T/M (SUVmean) és T/M (SUVmax) alapján (**B**)

A PET/MRI képeken (36. ábra, A) láthatjuk, hogy az injektálás után 1 óra elteltével számottevő különbség nem fedezhető fel a két radiotrészert összehasonlítva. Ezzel ellentétben a 4 óra múlva készült felvételen már szembetűnő az eltérés, hiszen a ^{44}Sc -jelölt származék felvétele szinte változatlan az 1 óráshoz képest, míg a ^{68}Ga jelzett peptidnél jelentős aktivitáscsökkenés volt megfigyelhető. A kvantitatív kiértékelés eredményeit nézve (36. ábra, B) hasonló megfigyelés mondható el, mint a PET/MRI felvételek elemzésénél, vagyis, hogy az injektálást 1 órával követő képalkotás után megközelítőleg azonos T/M (SUVmean) és T/M (SUVmax) értékeket kapunk a jelölt peptidek összehasonlításánál. A 4 órás leképzésnél viszont jelentős különbség olvasható le az oszlopdiagramról is. A ^{68}Ga -jelölt származéknál látható T/M (SUVmean) érték a 60,4%-ára, a T/M (SUVmax) a 81,7%-ára csökkent az 1 órás pontokhoz képest [T/M (SUVmean) 1 óra: 15,75 ± 1,84; T/M (SUVmean) 4 óra: 9,51 ± 1,70; T/M (SUVmax) 1 óra: 12,40 ± 1,09; T/M (SUVmax) 4 óra: 10,13 ± 0,98]. A ^{44}Sc -jelölt peptidnél a T/M (SUVmean) arányszám 120,5%-ára, míg a T/M (SUVmax) 175,4%-ára nőtt (T/M (SUVmean) 1 óra: 16,98 ± 2,36; T/M (SUVmean) 4 óra: 20,46 ± 2,14; T/M (SUVmax) 1 óra: 12,38 ± 1,29; T/M (SUVmax) 4 óra: 21,72 ± 0,96). A vizuális és kvantitatív kiértékelés közötti kiemelendő különbség, hogy a T/M (SUVmax) értékeket nézve egyértelműen látszik, hogy a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid esetén jelentős tumor/háttér arány javulás volt látható, míg a ^{68}Ga -jelölt származéknál csökkenés. Vagyis szervezetből és a tumorból történő kiürülés kinetikájával kapcsolatban kimutatható volt a két radiotrészert között különbség.

6. Megbeszélés

A munkám négy fő kísérletsorozatból épült fel, amelyek együtt és külön-külön is kiértékelhetők, de közös pontjuk a ^{44}Sc radioizotóp, amelynek eltérő előállítási módjait, különböző kelátorokkal való reakcióit, illetve jelölt fehérje- és peptid-származékaival *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* tulajdonságait vizsgáltuk. Ezen vizsgálatok során a következő új eredményekhez és következtetésekhez jutottunk:

1. Az első lépésben létrehoztunk egy $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátort, amelynek vizsgálatuk az elúciós tulajdonságait, a kinyerhető $^{44}\text{Sc(III)}$ jelölőkésztségét, illetve az újratöltésének a metodikáját. A Filosofov és mtsai. [46], [47] által konstruált hasonló izotópgenerátorból kinyerhető ^{44}Sc jelölőkésztségével összevetve hasonló eredményeket kaptunk. Ellentétesen a tapasztalataikkal a direkt-reverz elúciós módszert rosszabbnak találtuk, mint a direkt módszert, a nagy mennyiségű $^{44}\text{Ti(IV)}$ anyaelem deszorpciója miatt. Ezen túl kimutattuk, hogy a Debreceni Egyetem Orvosi Képző Intézetében üzemelő ciklotron segítségével termelt $^{44}\text{Sc(III)}$ jelölőkésztsége (tisztasága) közel egy nagyságrenddel nagyobb, mint a generátorban termeltnek.
2. Sikeresen kifejlesztettünk egy kapilláris szintézis rendszert, amely segítségével reprodukálhatóan, gyorsan, kevés veszteséggel és kis anyagmennyiségek felhasználásával voltunk képesek radiokémiai jelölési reakciókat végrehajtani. Ezen túl a reaktor méretének a növelésével biológiai vizsgálatokhoz elegendő aktivitású terméket tudtunk készíteni. A jó ismételhetőségnek köszönhetően összehasonlító optimalizációs jelölési kísérleteket végeztünk $^{68}\text{Ga(III)}$ és $^{44}\text{Sc(III)}$ radio-fémionok felhasználva. Ezen mérések során azt találtuk, hogy a $^{68}\text{Ga(III)}$ és $^{44}\text{Sc(III)}$ esetén is a DOTA-GA és a NODA-GA kelátorok voltak a legalkalmasabbak komplexképzésre.
3. A következő lépésben a nukleáris medicina területén új komplexképzőként szereplő AAZTA kelátorral végeztünk kísérleteket. Igen hamar kiderült, hogy a ^{44}Sc -AAZTA rendszer túlszárnyalja a fentebb már említett kelátorok eredményeit. 95 °C-on, 5 perces reakcióidő, pH = 3-4 és 0,1 μM AAZTA koncentráció mellett is 80%-ot meghaladó jelölési határfokot mutattunk ki. A ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) peptid származékkal és a ^{44}Sc -AAZTA-BSA fehérje származékkal végzett *in vivo* kísérletek

a várt biodisztribúciós eredményeket adták. Ezen túl az egyik legértékesebb eredményünk, annak a bebizonyítása volt, hogy a ^{44}Sc -AAZTA radiofém-kelátor rendszer lehetővé teszi a szobahőmérsékleten és semleges pH-n történő jelöléseket, ami új teret nyithat a pH és hőérzékeny molekulák, antitestek és fehérjék jelölése és képalkotása esetén.

4. Utolsó méréssorozatként egy melanoma markert, a DOTA-NAPamid peptid származékot jeleztük $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ -mal és $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ -mal, hogy *in vivo* körülmények között hasonlítsuk össze a radiofém biodisztribúcióra és kinetikára gyakorolt hatását. Azt találtunk, hogy a ^{44}Sc -jelölt peptid plazmában kinetikailag inertebb, *in vivo* körülmények között nagyobb arányú tumor halmozást produkál, illetve hosszabb követést tesz lehetővé a kedvező kiürülési tulajdonságai és az izotóp felezési ideje miatt. Ezen kísérletek eredményei is megerősítették a hipotézist, hogy a ^{44}Sc segítségével sok szempontból kedvezőbb tulajdonságú biomarkerek állíthatók elő, mint a ^{68}Ga -ot használva.

A következőkben további megfigyeléseket és hozzáfűzéseket teszek a fenti pontokhoz.

6.1. A ^{44}Sc előállításával kapcsolatos eredmények értelmezése és megbeszélése

A kezdeti célkitűzésünket teljes mértékben sikerült megvalósítani, miszerint a Scanomed Kft. radiokémiai laboratóriumában hozzunk létre egy, a radiokémiai tesztelésekhez és optimalizálásokhoz, illetve tájékozódó biológiai vizsgálatokhoz elegendő aktivitást szolgáltató $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátort. A munkám kezdetén mindössze egy, irodalomban közölt módszert találtunk, ahol Filosofov és mtsai. [46] (2010) állítottak elő ilyen típusú generátort, így a ^{44}Sc radioizotóppal végzett közlemények száma csekély volt. Többek között emiatt is alakítottuk ki a saját rendszerünket, ami Magyarországon elsőként biztosított ^{44}Sc radioizotópot.

A generátor létrehozása során a $\text{Sc}(\text{III})$ és $\text{Ti}(\text{IV})$ fémionok elválasztásához az oxaláttal alkotott komplexeinek az eltérő tulajdonságát használtuk ki. Az alkalmazott körülmények között (0,07 M HCl/ 0,005 M oxálsav) a $[\text{Sc}(\text{C}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ és a $[\text{Ti}(\text{C}_2\text{H}_4)_2(\text{OH})_2]^{2-}$ formák vannak jelen oldatban [94], [95]. A két komplex bruttó

negatív töltése eltér, ami a Ti(IV) nagyobb oxidációs állapotának, illetve a kisebb pH-n kezdődő hidrolízisének köszönhető. Ezen túl a növekvő koncentrációjú HCl oldat hatására a feltüntetett oxalát-komplexek disszociálnak [92], [93]. Ez a folyamat a $[\text{Sc}(\text{C}_2\text{H}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^-$ esetén már a 0,07 M HCl/ 0,005 M oxálsav összetételű oldószer keverékben végbemegy, míg a $[\text{Ti}(\text{C}_2\text{H}_4)_2(\text{OH})_2]^{2-}$ komplexnél csak nagyobb HCl koncentrációknál kerül előtérbe ez a folyamat. A leírt kémiai tulajdonságoknak köszönhetően anioncserélő gyanta segítségével szelektív elválasztást tudunk kivitelezni a $^{44}\text{Ti}(\text{III})$ anyaelem és a $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ leányelem esetén.

Az egyik alapvető eltérés a Filosofov-féle és a mi generátorunk között az eluálható aktivitásban keresendő, hiszen Filosofov és mtsai. egy 180 MBq-es, míg mi egy 3 MBq-es generátort alakítottunk ki. Részünkről ez egy tudatos lépés volt, hiszen a ^{44}Ti költséges előállítása miatt bizonyítani szerettük volna, hogy egy hatvanszor kisebb aktivitású (és költségű) generátor segítségével is képesek vagyunk megfelelő vizsgálatok elvégzésére, amit e doktori értekezés keretein belül igazolni is tudtunk. A kialakítás és az azt követő eluálások szinte teljesen ugyanazokat az eredményeket szolgáltatták, mint Filosofov és mtsai.-nak [46], a $^{44}\text{Ti}(\text{IV})$ áttörés kivételével. A „direkt-reverz” elúciós módszerrel az első elúció során jelentősebb aktivitású ($\sim 0,3$ MBq) ^{44}Ti anyaelem hagyta el a generátort, így ezzel felhagytunk, csak direkt módon eluáltuk a generátort. Ez valószínűleg annak tudható be, hogy a betöltés során a gyanta közvetlen tetejére adszorbeáltuk az anyaelemet, így a fordított elúció során jelentősebb mennyiség távozott, mint a generátor másik oldalán. Ezen túl az eluátum aktivitását minden alkalommal mértük, így közvetetten nyomon tudtuk követni az izotópgenerátor ^{44}Ti szintjét (17. ábra, 19. ábra). Az ábrázolt pontokra illesztett egyenes meredeksége megadta a generátor aktivitás-csökkenésének a mértékét, amely nagyobb volt, mint ami a ^{44}Ti bomlásából adódna. Mivel SPET/CT segítségével is tudtuk monitorozni a $^{44}\text{Ti}(\text{IV})$ kedvezőtlen mozgását a gyantán (16. ábra), így megközelítőleg 60 elúciót követően újratöltöttük a generátort, úgy, hogy az anyaelem az oszlop közepén helyezkedjen el. Az új elrendezéssel is teszteltük a „direkt-reverz” elúciós technikát, de hamar kiderült, hogy nem sikerült csökkenteni a $^{44}\text{Ti}(\text{IV})$ hosszanti irányban történő elmozdulását, illetve deszorpcióját az állófázisról (20. ábra). Itt az első töltésnél használt 10 ml eluálószerhez képest 10-10 ml-t (direkt és reverz), vagyis összesen 20 ml-t használtunk egy elúciónál, ami okozhatta a gyorsabb deszorpciót. A megnövelt elúciós térfogattól függetlenül a hosszanti irányú elmozdulás mindkét kísérletünk során jelen volt, amire a reverz elúció rásegített. Mivel Filosofov és mtsai.-nak azóta nem jelent meg a generátor állapotával, vagy annak

esetleges újratöltésével kapcsolatos közlemény, így ezen eredményinket egyelőre nem tudjuk összehasonlítani. A saját tapasztalataink alapján a generátoruk létrehozását követő, megközelítőleg 50-100 elúció után már náluk is jelentkeznie kéne a ^{44}Ti jelentősebb deszorpciójának.

Fontos megemlíteni, hogy a fent leírt kvantitatív nyomon követéséhez elengedhetetlen volt a műszereinket kalibrálni ^{44}Sc radioizotópra. A kalibrációs faktor bevezetésének alapjául a hitelesített HPGe – gamma spektrométerrel kapott eredmények szolgáltak. Ezen mérésünket a dóziskalibrátor ^{22}Na csatorján, illetve egy MEDISO – AnyScan berendezés segítségével ellenőriztük [96]. Filosofov és mtsai. közleményében található egy említés, miszerint a ^{44}Sc aktivitásokat egy Curie-meter doziméter ^{18}F csatornáján mérték és szorozták egy korrekciós faktorról (0,7) [46]. Arról nem találtunk semmilyen információt, hogy miként jutottak ehhez a korrekciós faktorhoz. Ezen túl más közleményekben rendre gamma spektrométerrel végzik el a termelt ^{44}Sc aktivitás mérését [99]. Esetünkben a dóziskalibrátoron létrehozott ^{44}Sc csatornán mért ^{44}Sc aktivitás értékek megközelítőleg feleakkorák, mint a ^{18}F csatornán mérve ugyanazt a mintát, vagyis a ^{18}F -ra vonatkoztatott korrekciós faktorunk megközelítőleg 0,55. Az általunk és Filosofov és mtsai. által mért, ^{18}F csatornához viszonyított faktorok közötti eltérések valószínűleg geometriai okokra vezethető vissza.

A generátorból kinyert és ciklotronban előállított ^{44}Sc összehasonlítása során elsőnek a radionuklidos tisztaságot érdemes megemlíteni. A generátor esetén az egyetlen radionuklid szennyező a ^{44}Ti lehet, amely az állófázisról történő deszorpció révén juthat az eluátumba. Ennek mértéke megközelítőleg 0,03-0,21% volt, ami így 99,97-99,79%-os radionuklidos tisztaságot eredményezett ^{44}Sc -ra nézve. Ez az érték megegyezik a Filosofov és mtsai. által tapasztaltakkal. Ezzel ellentétben a ciklotronban történő előállítás során 3 másik szkandium izotóp is termelődött ($^{44\text{m}}\text{Sc}$, ^{47}Sc , ^{48}Sc), amelyek ugyanazon elem révén kémiai módszerek segítségével nem elválaszthatók. A ciklotronnal kapott minták radionuklidos tisztasága $94,19 \pm 1,35\%$ volt, ami korrelált az irodalomban található 95,7%-os értékkel [49]. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a generátorból származó ^{44}Sc radionuklidos tisztasága közel 5%-kal nagyobb, mint a ciklotronban termelt párjának.

Ezt követően összehasonlító kísérleteket végeztünk, hogy részletesebb információt kapjunk az előállított $^{44}\text{Sc(III)}$ jelölőkésztségéről, vagyis az egyéb fémionokra nézett szennyezettségéről. Ehhez mind az izotópgenerátorából származó, mind a ciklotronban előállított és általunk feldolgozott ^{44}Sc radioizotóppal jelöléseket végeztünk, amelyek eredményei jól korreláltak a Kerdjoudj és mtsai. közleményében szereplő adatokkal (21.

ábra) [3]. Így kijelenthető, hogy a ciklotronban termelt és tisztított $^{44}\text{Sc(III)}$ segítségével egy nagyságrenddel kisebb kelátor koncentráció mellett is sikeres jelöléseket ($\text{RCP} > 90\%$) tudtunk végrehajtani, a generátorban termelthez $^{44}\text{Sc(III)}$ -hoz képest. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a generátorból eluált oldatban folyamatosan nő a szennyező fémionok koncentrációja. Mivel a legkisebb mérhető mennyiségű fémion szennyező is nagyságrendekkel magasabb koncentrációban van jelen az oldatban, mint a radiofém, így kompetitív folyamatok mehetnek végbe, ami a radioaktív izotóp komplexképződését a háttérbe szoríthatja [100], [101]. A keltortól és a radiofémtől függően a jelzési reakciókat jellemzően a Zn^{2+} , Fe^{3+} és Cu^{2+} fémionok befolyásolják a leginkább [101]. Ezen fémionok ugyan csak ppm-es mennyiségben találhatók meg az eluálószerekben, de az izotópgenerátor többszöri eluálása miatt a szennyezők akkumulálódhatnak, majd később szennyezhetik az eluátumot. A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátor elúciós profilját vizsgálva (18. ábra) látható, hogy a $^{44}\text{Sc(III)}$ nagy térfogatban mosható le a rendszerről, ami okozhatja a frakciók eltérő szennyező tartalmát. Ez a hatás valószínűleg mérsékelhető a generátorház hosszának a növelésével és a belső átmérő csökkentésével.

Vagyis az elhangzottakat összefoglalva: a $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátor előnye, hogy az anyaelem hosszú felezési idejének (60,3 év) köszönhetően és az időközönkénti újratöltés segítségével igen hosszú ideig használható jelentősebb aktivitáscsökkenés nélkül, illetve közel 100%-os radionuklidos tisztaságú ^{44}Sc állítható elő vele. Hátránya viszont, hogy folyamatos újratöltést igényel, illetve a szennyező fémionok koncentrációja az elúciók számával folyamatosan nőhet.

6.2. A kapilláris rendszer segítségével nyert eredmények értelmezése és megbeszélése

A kapilláris rendszer megépítésénél az volt a fő célunk, hogy egy olyan berendezést hozzunk létre, amely segítségével gyorsan, kis térfogatban, jó reprodukálhatósággal tudunk kelátor optimalizálásokat, majd minimális átalakítással preparatív jelöléseket végrehajtani, úgy, hogy közben on-line HPLC-s analitikai vizsgálat folyik. Továbbfejlesztve az előző verziót [61], egy olyan eszközt hoztunk létre, amelyben egy Arduino vezérlés segítségével három HPLC szelep felelős a folyadék utak összekötéséért, amik teflon kapillárisokon keresztül kapcsolódnak. A folyadékmozgatást egy dupla-fecskendővel ellátott fecskendőpumpa végzi, illetve a reakció végeztével a HPLC

folyadékpumpája segítségével kerül a minta az analitikai rendszerre (11. ábra). A kereskedelmi forgalomban lévő szintézis panelekkel és modulokkal összehasonlítva az egyik legfontosabb különbség a reakció térfogata, amely miatt ezen rendszerek preklinikai alkalmazása limitált. A modulok általában 5-20 ml-es folyadékmozgatással, 10-20 ml-es végtérfogattal és igen jelentős ligandum felesleggel működnek [102], [103]. A rendszerünk esetén 10-10 μ l prekursor összeinjektálásával optimalizációs, míg 100-100 μ l összeinjektálásával preparatív jelölési reakciókat tudtunk kivitelezni. Ennek köszönhetően kis mennyiségű ligandum felhasználással, nagy aktivitáskoncentrációban és nagy moláris aktivitás mellett áll elő a minőségellenőrzött termék a szintézis végén.

Az kapilláris rendszert használva, a megfelelő beállítások és finomhangolások végeztével elkezdtük a jelölési reakciók ismételtetésének a vizsgálatát. Azt találtuk, hogy a „RCP – Kelátor koncentráció” görbék inflexiós pontjánál történő jelölések ismétlésével az RSD 1-3% volt, ha a radionuklid ugyanazon elúcióból származott, míg az RSD 10-30%-ra nőtt, ha más napon, más elúcióból történő jelöléseket végeztünk el. Ez azzal magyarázható, hogy az inflexiós pontnak megfelelő kelátor koncentráció mellett a rendszer érzékeny az izotópgenerátorokból kioldódó, változó mennyiségű fémion szennyezőkre [100]. Fontos megjegyezni, hogy az inflexiós ponttól különböző kelátor koncentrációk esetén az RSD rendre 2% alatti volt.

Ezt követően funkcionizálatlan kelátorok jelölését végeztük el $^{44}\text{Sc(III)}$ felhasználásával. A három választott kelátor a DOTA, a NOTA és a NOPO volt, hiszen ezeket igen széles körben alkalmazzák $^{68}\text{Ga(III)}$ -mal történő komplexképzéséhez különböző radiofarmakonokban [104], [105]. A DOTA és NOTA esetén a karboxil-karok számának és a gyűrűméret változásának a hatását tudtuk vizsgálni a $^{44}\text{Sc(III)}$ jelzési hatásokra nézve. A NOPO esetén pedig a foszfinát-csoportok affinitását tudtuk összevetni a karboxil-karokéval. A kapott eredményeket egymással összehasonlítva azt láttuk (22. ábra), hogy a NOTA és a DOTA hasonlóan jól jelölhető volt a $^{44}\text{Sc(III)}$ radiofémionnal (95 °C, 5 perc, pH = 4), hiszen 3 μ M-os kelátor koncentráció mellett megközelítőleg 90%-os RCP volt elérhető velük. A NOPO esetén ugyanilyen kelátor koncentráció mellett mindössze 20%-os jelölési hatások látható, amely további kelátor hozzáadására nem emelkedik, telítésbe megy. A megfelelő ^{68}Ga -jelölt származékok irodalomban megtalálható jelölési eredményeit nézve az mondható el, hogy a ^{68}Ga -DOTA 5 μ M-os kelátor koncentráció mellett 90%-os radiokémiai hozammal volt előállítható [2], ami megközelítőleg a ^{68}Ga -NOTA-ra is igaz (1-50 μ M) [2], [61]. A ^{68}Ga -NOPO előállításánál akár 1,0-0,1 μ M körüli kelátor koncentráció is alkalmazható

[61], [106]. Összehasonlítva a ^{44}Sc -os eredményeinkkel kijelenthető, hogy a DOTA és NOTA kelátorok hasonlóan jól jelölhetők $^{44}\text{Sc(III)}$ radio-fémionnal, mint a $^{68}\text{Ga(III)}$. Ezen túl azt is láttuk, hogy a NOPO viszont nagyságrendekkel rosszabbul teljesített hasonló körülmények között, mint a többi kelátor. Ezek az eredmények valószínűleg annak köszönhetők, hogy a ^{44}Sc -DOTA esetén a fémion mind a 8 koordinációs helyét elfoglalják a kelátor donoratombjai így létrehozva egy kedvezményezett négyzetes antiprizmás szerkezetet [1]. Ugyanez nem mondató el a NOTA és NOPO esetén, hiszen mindkét kelátor mindössze 6 donoratommal rendelkezik, így a létrejövő komplex torzult oktaéderes szerkezetű lesz [1]. A Sc(III) ionsugara 88,5 pm, míg a Ga(III) esetén ez az érték 76,0 pm, ami alapján azt mondhatjuk, hogy mindkét fémion „hard” savnak felel meg [107]. Mivel az általunk vizsgált kelátorokban a koordinálódó csoportok minden esetben „hard” bázisnak felelnek meg, így kijelenthető, hogy a kelátorokkal való jelölhetőségben talált – olykor számottevő - eltérések nem feltétlenül a fémionok és a donoratom „hard-soft” jellegéből adódnak. Ezen túl azt is láttuk, hogy a NOPO nagyságrendekkel rosszabbul teljesített hasonló körülmények között, mint a többi kelátor. A NOPO alacsony jelölhetőségét a foszfinát-karok és a fémion között kialakuló nem kedvezményezett koordinatív kötés kialakulásával magyarázzuk.

A funkcionizálatlan kelátoros vizsgálatok kiegészítésre szorulnak, hiszen a radiofarmakonokban történő felhasználás során a bifunkciós kelátorok egyik – jellemzően – karboxil csoportját funkcionalizálják, ami ennek hatására koordinatív kötés kialakítására alkalmatlanná válik. Ezért a funkcionizálatlan kelátorok jelölését követően a kedvező eredményeket adó DOTA és NOTA kelátorok maleimid származékjaival folytattuk a vizsgálatot, illetve elvégeztük az analógjaiknak (DOTA-GA-maleimidnek , NODA-GA-maleimidnek) is a vizsgálatát (23. ábra). A ^{68}Ga -mal történő jelöléseink során hasonló eredményeket kaptunk mind a négy kelátor származékra, amelyek megegyeztek az irodalomban található hasonlóan monofunkcionalizált származékok eredményeivel [108], [109]. A ^{44}Sc esetén még kevesebb adat áll rendelkezésre az irodalomban és azon esetekben is kevésbé látható koncentráció függéssel kapcsolatos adat. Saját eredményeinkre támaszkodva elmondható, hogy a DOTA-GA-maleimid bizonyult a legjobbnak, míg a vártaknak megfelelően a NOTA-maleimid a legrosszabbnak. A vártakkal ellentétben a második legjobb a NODA-GA-maleimid volt, nem pedig a előre feltételezett DOTA-maleimid, amivel találhatók sikeresen elvégzett jelölések az irodalomban. Ezen adatainkkal ellentmondanak a K. A. Domnanich és mtsai. által közölt eredmények, akik fordítva írták le a két kelátor egymáshoz viszonyított jelölhetőségét

[80]. A kísérletsorozatot a következő napon, más elúcióból megismételtük, de ugyanazokat a lefutású görbéket kaptuk. A K. A. Domnanich és mtsai., illetve a mi eredményeink közötti eltérés két módon magyarázható. Az egyik a ligandum-hatás, ahol a kelátorhoz kapcsolt molekulák (egyszerű csoportok, peptidek, fehérjék, stb.) jelentős hatással vannak a komplexképző tulajdonságokra a sztérikus gátlás és az elektroneloszlás megváltozása révén. Többek között ezért, illetve a kémiai és biodisztribúciós tulajdonságok finomhangolása végett használnak eltérő számú és tulajdonságú funkciós csoportokból felépülő linkereket a bifunkciós kelátor és a vizsgálni kívánt molekula összekötésére [110], [111]. Mi egy kismolekulával, a maleimiddel funkcionizált kelátorokat vizsgáltuk, míg ők RGD és NOC peptidekkel kapcsolt rendszereket néztek. Az ilyen eltérések már befolyásolhatják annyira a komplexképződést, hogy a leírt mértékű eltérések megfigyelhetők legyenek. A másik lehetséges magyarázat a szennyező fémionok változó mennyiségéből adódik. K. A. Domnanich és mtsai. azt is kimutatták, hogy a ^{44}Sc -NODA-GA-RGD/NOC rendszer sokkal érzékenyebb a Cu^{2+} és Fe^{3+} szennyeződésekre [80], mint a ^{44}Sc -DOTA-RDG/NOC, így feltételezhetően szennyező fémionokban szegényebb körülményeket tudunk biztosítani, ami esetünkben növelte a NODA-GA-maleimid jelölhetőségét.

A fentebb leírt kelátor sorrend, illetve a részletezett okok miatt a ^{68}Ga -NODA-GA-c(RGDfK) preparatív jelzését hajtottunk végre a kapilláris rendszeren. Ehhez az összeinjektált folyadéktérfogatokat 10-10 μl -ről 100-100 μl -re növeltük hosszabb csövezés bekötésével, hogy a keletkező reakcióelegy térfogata ideális legyen preklinikai vizsgálatok elvégzésére. Mivel meglehetősen nagy irodalmi háttere van a ^{68}Ga -NODA-GA-c(RGDfK)-nak, így az eredményeinket összevetettük más kutatócsoportokéval. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a kapilláris rendszer akár több nagyságrenddel kevesebb ligandum felhasználásával képes üzemelni, mint egyes szintézismodulok [8], [112]. A Modular-Lab PharmTracer szintézispanelt, vagy kézi jelöléseket használva akár 10-20 μg peptid felhasználása is megtörténik, míg esetünkben ez az érték a 0,6 μg -ot is elérheti. Ezen túl a reakcióidőnk is kevesebb az általános 15-20 perchez képest [8], [112], hiszen jellemzően 5-10 perc a reaktorban töltött idő, míg a teljes előállítás időtartama mindössze 30 perc.

6.3. Az ^{44}Sc -AAZTA-val és származékaival végzett vizsgálatok során nyert eredmények értelmezése és megbeszélése

A Bracco gyógyszergyár által rendelkezésünkre bocsátott AAZTA vizsgálatát először a funkcionalizálatlan kelátoros mérések kivitelezésével kezdtük. Fontos kiemelni, hogy a mérésorozatban manuálisan végeztük a jelöléseket, nem pedig a kapilláris rendszer segítségével. Hogy összehasonlítási alapunk legyen nem csak a ^{44}Sc -AAZTA, hanem a ^{44}Sc -DOTA rendszer teljes jelölési optimalizálását elvégeztük. A kapott optimalizációs felületeket nézve (24. ábra, 25. ábra) kiderült, hogy az AAZTA kiemelkedően jó kelátora a $^{44}\text{Sc(III)}$ -nak, hiszen igen széles pH tartományban képes alacsony kelátor koncentráció mellett is jó jelölési hatásfokot produkálni. Annak ellenére, hogy a DOTA egy alkalmas komplexképzője a $^{44}\text{Sc(III)}$ -nak az AAZTA-hoz képest szűkebb pH tartományba (2-4) jelölhető, illetve több, mint egy nagyságrenddel magasabb kelátor koncentráció mellett szolgáltat ugyanolyan jelölési hatásfokot. Kiemelendő, hogy az AAZTA segítségével képesek vagyunk szobahőmérsékleten és $\text{pH} = 7$ körül jó hozamú jelzéseket végrehajtani, ami nagyon ígéretes, hiszen lehetővé teszi hő- és pH-érzékeny vegyületek (egyes peptidek, fehérjék és antitestek) jelölését. A semleges pH-n történt jelölés főként az Sc(III) hidrolitikus tulajdonságának (6. ábra) köszönhető, miszerint fiziológiás sókoncentráció mellett a hidrolízise nagyobb pH-n kezdődik, mint a Ga(III) esetén.

A DOTA-val szobahőmérsékleten nem voltunk képesek számottevő jelölést elérni 30 percen belül, míg az AAZTA-t használva már 10 perc elteltével jelentős hozam volt produkálható. Ezen túl bebizonyítottuk azt is, hogy fiziológiás körülmények között is kellő kinetikai inertséggel rendelkezik a komplex, hiszen 12 óra elteltével is intakt maradt. Az irodalomban található radio-fémion-kelátor párosok közül mindössze a ^{64}Cu -TETA, az ^{111}In -HBED és SHBED, a ^{89}Zr -DFO, illetve a ^{68}Ga -AAZTA és DATA komplexeknél beszélhetünk $\text{pH} = 7$ és szobahőmérséklet esetén számottevő módon végbemenő jelölési reakciókról [1].

A kapott eredmények alapján megvizsgáltuk, hogy *in vivo* körülmények között, egészséges állatokban milyen a biodisztribúciója a PBS pufferelt $^{44}\text{Sc(III)}$ -nak, a ^{44}Sc -AAZTA-nak, illetve a jelölt peptid és fehérje származékainak (28. ábra). A pufferelt radio-fémion főleg a májon, míg ^{44}Sc -AAZTA a várt módon, igen gyorsan a veséken keresztül ürült ki és a vizeletben dúsult 90 perccel az injektlást követően.

A ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) más RGD tartalmú radiotrészerekhez hasonlóan az epehólyagban, a belekben és a húgyhólyagban volt megtalálható [79], [113]. Ezt okozhatja az adott területek magasabb $\alpha_v\beta_3$ integrin expressziója, az anyag lipofilebb jellege, illetve a hepatobiliáris úton történő kiválasztódás [79]. A 4T1 tumort hordozó BALB/c egérbe történő injektlását követően a szervektől elkülönülő halmozást láthattunk a tumorban (29. ábra). A halmozás mértékét a tumor/izom (SUV) arányában adtuk meg, aminek az értéke megközelítőleg 25 volt, amiről elmondható, hogy más RGD alapú radiotrészerekkel összehasonlítva (^{68}Ga -NODA-GA-c(RGDfK): 12,80 [114]; ^{68}Ga -DOTA-c(RGDfK): 12,37 [114]; ^{68}Ga -NODA-GA-E[c(RGDyK)]₂: 4,6-9,6 [115]; ^{64}Cu -NODA-GA-E[c(RGDyK)]₂: 3,9-12,8 [115]; [^{18}F]4/x-F-cycloRGD: 1,8-4,1 [116]) kimagaslóan nagy. A leírtak segítségével igazolni tudtuk, hogy az előállított ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) hasonló biodisztribúciós tulajdonságokkal rendelkezik, mint az irodalomban már közölt egyéb származékok. A kiemelkedően magas tumor/izom aránynak, a jelöléshez szükséges alacsony ligandum mennyiségnek, illetve a ^{44}Sc kedvező, 4 órás felezési idejének köszönhetően kecsegtető alternatívát kínál az említett radiotrészerek mellett. A felsoroltak mellett nagyon fontos kiemelni, hogy a diagnosztikus jelentőségű ^{44}Sc -nak van terápiás izotóppárja, a ^{47}Sc . Ennek a jelentősége abban rejlik, hogy adott ^{44}Sc -jelölt diagnosztikus radiofarmakon alkalmazását követően a ^{47}Sc -jelölt származékkal ugyanazon biodisztribúció mellett végezhető terápia.

A leírtakon kívül teszteltük a szobahőmérsékleten és pH = 7-en végzett jelölés hatékonyságát, amit AAZTA-C9-BSA segítségével hajtottunk végre. A BSA és AAZTA-C9 kapcsolását követően jelöltük ^{44}Sc (III)-at felhasználva a leírt körülmények között, majd egészséges egérbe injektáltuk. Azért egészséges egeret használtunk, mivel nem célzott vizsgálat végrehajtása volt az elsődleges cél, hanem látni a ^{44}Sc -AAZTA-C9-BSA *in vivo* viselkedését és biodisztribúcióját. A vártaknak megfelelően az aktivitás nagy része a szívben és a májban volt megfigyelhető 90 perccel az injektlást követően, ami a fehérje méretéből adódott.

6.4. A $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NAPamiddal végzett vizsgálatok során nyert eredmények értelmezése és megbeszélése

A munkám ezen részének a célja az volt, hogy feltérképezzük az általunk újonnan előállított ^{44}Sc -DOTA-NAPamid radiotrészernak az MC1-R specifikusságát, megfelelő melanoma állatmodellt használva. Ezt követően a ^{44}Sc -jelölt molekula kémiai tulajdonságait és melanoma specifitását összevetettük az irodalomban már leírt ^{68}Ga -DOTA-NAPamidéval. A ^{44}Sc -DOTA-NAPamid jelölést kidolgoztuk a ^{68}Ga -jelölt származék mintájára, aminek az eredményeképpen rendre $\text{RCP} \geq 99\%$ termékeket tudtunk előállítani, melyeknek a moláris aktivitás minden esetben minimum $15 \text{ GBq}/\mu\text{M}$ volt. A nem bomláskorrigált radiokémiai hozam esetén látható az első eltérés (^{44}Sc -DOTA-NAPamid: 60-70%; ^{68}Ga -DOTA-NAPamid: 80-86%), hiszen a ciklotronban előállított ^{44}Sc tisztítása és töményítése egy extra lépés a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid előállításához képest. Ennek során a céltárgy anyagától (Ca) és a benne található esetleges szennyező fémionoktól (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}) szabadulunk meg. Ezen túl a ^{44}Sc kioldásához használt 3 M-os u.p. HCl oldat a töménységénél fogva koncentráltabban tartalmazza az említett fémionokat, illetve nehezen pufferelehető. Az előállítási körülmények megegyeztek mindkét radiotrészernél (pH = 4, 1 M NH_4OAc ; 95 °C; 15 perc).

A logP vizsgálatok eredményei (^{44}Sc -DOTA-NAPamid: -3,30; ^{68}Ga -DOTA-NAPamid: -3,50) alapján mindkét radiotrészernél hidrofíll jellegű, így a vártaknak megfelelő volt, amikor a későbbi *in vivo* vizsgálatok során a vesén keresztül ürültek a szervezetből. Megemlítendő, hogy a logP értékek alapján a ^{44}Sc -jelölt molekula kis mértékben ugyan, de hidrofóbabb jelleget mutatott. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a Ga(III) jellemzően oktaéderes szerkezetű komplexeket alkot 6 koordinatív kötésen keresztül [117]. Emiatt a DOTA-NAPamid kelátorán lévő összesen 7 donoratomja közül mindössze 6-hoz tud koordinálódni (4 gyűrűnitrogén és 2 deprotonált karboxil-kar), aminek köszönhetően egy karboxil-kar koordinálatlanul marad, illetve a komplex nem lesz töltéssemleges [118]. A Sc(III) hajlamos 7, vagy akár 8 koordinációs kötés kialakítására is [119], [120], aminek köszönhetően a harmadik karboxil-kar is koordinálódhat, így töltéssemlegessé és apolárosabb jellegűvé téve a teljes molekulát, különbséget mutatva a logP értékében.

Az Na_2EDTA -ban, oxálsavban és egér plazmában végzett kinetikai mérések azt mutatták, hogy a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid kinetikailag inertebb, 2 óra elteltével semmilyen

RCP változás nem volt észrevehető esetében, míg a ^{68}Ga -ot tartalmazó komplexet nézve már 1 óra elteltével megközelítőleg 5%-ot esett egér plazmában (30. ábra). A leírtak alapján kijelenthető, hogy hasonló, vagy jobb kémiai tulajdonságokkal bír a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid, illetve a ^{44}Sc megközelítőleg négyszeres felezési ideje is előnyhöz juttatják a ^{68}Ga -DOTA-NAPamiddal szemben.

Az MC1-R specificitást először receptor pozitív B16-F10 tumorsejteken vizsgáltuk *in vitro* körülmények között. A kötődéses vizsgálatok során azt találtuk, hogy megközelítőleg 1600 nM $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NAPamid koncentráció eléréséig gyorsan növekszik a teljes kötődés értéke ($\text{mol/sejt} \times 10^{-18}$), majd 3600 nM-t elérve „steady state” állapotba kerül (31. ábra). Az általunk tapasztalt ígéretes eredményeket alátámasztották a Cheng és mtsai. [12], illetve a Froidevaux és mtsai. [13] által leírtak, miszerint több DOTA- α -MSH analóg közül a DOTA-NAPamid volt a legalkalmasabb MC1-R kimutatására. Ezen túl a specificitás további bizonyításához MC1-R negatív A375 melanoma sejtvonalakon is elvégeztük a méréseket, ahol a vártaknak megfelelően azt láttuk, hogy az MC1-R pozitív B16-F10 sejtek megközelítőleg 5-6-szoros% ID/ 10^6 sejt (0,8-1,0) értékeket adtak az A375 sejtekkel szemben. A magas halmozásokat már Cheng és mtsai. [11], [12] és Tafreshi és mtsai. [121] is leírták, illetve azt is, hogy az A375 sejtvonalnak 500 kötőhely/sejt, míg a B16-F10 sejtvonalnak 22 000 kötőhely/sejt a receptor kötődési kapacitása.

A sejtes vizsgálatokat követően egészséges kontroll és tumort hordozó egerek segítségével vizsgáltuk mindkét anyag biodisztribúcióját. A PET/MRI képalkotással és az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok segítségével igazoltuk a vesén történő kiürülést, amit a magas vese felvétel bizonyított (%ID/g: 2,43-3,97). Ezen túl alacsony felvétel volt megfigyelhető a mellkasi és hasüregi régiókban, megegyezően Froidevaux és mtsai. eredményeivel $^{111}\text{In}/^{67}\text{Ga}$ -DOTA-NAPamid esetén [13], de ellentétben a Cheng és mtsai. által vizsgált ^{18}F - és ^{64}Cu -jelölt NAPamiddal [11], [12], ahol a belekben, a tüdőben, a gyomorban és a májban is jelentős halmozás volt, ami rossz tumor/háttér arányt okozott a PET képalkotás során. A melanoma specificitás vizsgálatához használt α -MSH analógok segítségével a B10-F19 tumoroknál jelentősen magasabb halmozás érhető el, mint az A375 tumorok esetén [11], [12], amit az eredményeink megerősítettek (31. ábra, 35. ábra). Ezen túlmenően a szubkután oltott B16-F10 tumor esetén a magas MC1-R expresszáldásnak köszönhetően kiváló kontraszt érhető el mindkét radiotrészert használatával. A két anyag összehasonlításánál kijelenthető, hogy ugyan kis mértékben, de a ^{44}Sc -DOTA-NAPamiddal magasabb SUV és tumor/izom értékeket kaptunk, mint a

^{68}Ga -DOTA-NAPamiddal. Hasonló megfigyelést írtak le Domnanich és mtsai. is, miszerint ^{68}Ga - és ^{44}Sc -jelölt DOTA- és NODA-GA-RGD származékok vizsgálata során azt találták, hogy a $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ tartalmú komplex tumor halmozása és tumor/háttér aránya is rendre magasabbnak bizonyult, mint a ^{68}Ga -komplex esetén [80]. Az általunk megfigyelt eltéréseket a logP vizsgálatoknál kapott, illetve a kinetikai méréseknél tapasztalt különbségekkel tudjuk magyarázni. A ^{68}Ga -jelölt DOTA-NAPamidot használva a legjobb tumor/szövet kontrasztot az injekciótól számított egy órán belül kaptuk, amit megelőzőleg Froidevaux és mtsai. is igazoltak [13]. A ^{44}Sc -DOTA-NAPamidot nézve azt találtuk, hogy az injekciót követően 4 órával a tumor/izomszövet arány magasabb volt, mint az 1 órás leképezésnél. Ez köszönhető a ^{44}Sc közel 4 órás felezési idejének, az *in vivo* körülmények között tanúsított kinetikai inertségének és a tumorból történő lassú kiürülésnek.

Fontos még kiemelni, hogy a tumor által felvett radiotrésszer mennyisége nem csak az anyag kémiai tulajdonságaitól függ, hanem annak moláris aktivitásától is [10], [13], [122]. A moláris aktivitás a jelölt termék aktivitásának és a jelölési reakció során használt peptid moláris mennyiségének a hányadosa, vagyis azt adja meg, hogy milyen arányban van a mintában jelölt és jelöletlen trésszer. Froidevaux és mtsai. leírták, hogy ^{68}Ga -DOTA-NAPamidot használva, ha az injekciót anyag moláris aktivitását csökkentették, akkor csökkent felvétel volt tapasztalható a tumornál [13]. Ez a hatás annak köszönhető, hogy a moláris aktivitás csökkenésével nő a jelöletlen ligandum koncentrációja, ami statisztikailag nagyobb eséllyel vesz részt receptor-ligandum kölcsönhatásban, mint a jelölt származék. A vizsgálataink során a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid moláris aktivitása 19-23 GBq/ μmol , míg a ^{44}Sc -DOTA-NAPamidé 15-19 GBq/ μmol volt, ami a Froidevaux és mtsai. által alkalmazott kisebb moláris aktivitás értékhez (16,5 GBq/ μmol) volt közelebb. A leírt moláris aktivitásokkal a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid 90 perces leképezésnél a felvételi érték (%ID/g) megközelítőleg 2,1 volt Froidevaux és mtsai.-nak, míg esetünkben ez az érték $3 \pm 0,4$ volt [13]. Ehhez hasonlítottuk a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid felvételi értékét, ami szintén megközelítőleg $3 \pm 0,4$ -nek adódott, így elmondhatjuk, hogy hasonlóan jó eredményeket értünk el a radiotrésszerrel, mint az irodalmi referenciának tekinthető ^{68}Ga -jelölt származékkal.

A nagyon ígéretes eredmények ellenér a blokkolós vizsgálatokat is elvégeztük, hogy teljes bizonyítást nyerjen a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid MC1-R receptor specificitása is. Az α -MSH-t és a $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamidot tartalmazó minta injekcióját követően a jelölt peptid felvétele jelentősen csökkent az MC1-R pozitív B16-F10 tumorokban,

igazolva a specificitást (34. ábra). Az α -MSH hatására történő blokkolást más kutatócsoportok is leírták, illetve azt is, hogy az MC1-R negatív A375 tumorok esetén nem láttak számottevő inhibíciós effektust [11], [12].

A leírtaknak a tükrében látható, hogy a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid irodalmi eredményeit reprodukálni tudtuk, így megfelelő összehasonlítási alapot szolgáltatott a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid vizsgálatához. Kijelenthető, hogy a ^{44}Sc -jelölt peptid rendelkezik a ^{68}Ga -jelölt származék és egyéb, az irodalomban közölt melanoma kimutatására alkalmas vegyületek MC1-R specificitásával. Ezen túlmenően az *in vivo* kinetikai inertsége, tumor/izomszövet aránya kiemelkedő és nem utolsó sorban a ^{44}Sc fizikai felezési idejéből adódóan hosszabb vizsgálatok és követések kivitelezésére is alkalmasabb. Kiemelendő, hogy az általunk előállított, jellemzett és *in vitro*, illetve *in vivo* körülmények között vizsgált ^{44}Sc -DOTA-NAPamid az első melanoma kimutatásra alkalmas ^{44}Sc izotópot tartalmazó PET radiotrészter. Ezen túl itt is megemlíteném, hogy a ^{68}Ga -jelölt származékhoz képest jelentős előny, hogy a diagnosztikát követő terápia tervezésénél nem szükséges más fémion használata (pl., ^{177}Lu), mivel a szkandiumnak van β^- bomló izotópja (^{47}Sc). Ennek segítségével a diagnosztika és terápia teljesen egyező biodisztribúció mellett végezhető el.

7. Összefoglalás

A ^{68}Ga napjaink egyike legelterjedtebben használt izotópgenerátor alapú PET radioizotópja, viszont felhasználását és szállítását limitálja a relatíve rövid, 1 órás felezési ideje. Erre nyújthat alternatív megoldást a ^{44}Sc , amely hasonló komplexképzési reakciókon keresztül kapcsolható biológiai vektorokhoz, viszont felezési ideje megközelítőleg 4 óra. Ezért a munkám során ezen izotópok és komplexeiknek az előállításával, kémiai és biológiai tulajdonságaik a jellemzésével és azok összehasonlításával foglalkoztam.

Először létrehoztunk egy ^{44}Sc -ot termelő izotópgenerátort, ahol anyaelemként a ^{44}Ti radioizotópot használtuk. A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátor működését, illetve újratöltését is teszteltük, ahol azt találtuk, hogy az irodalomban pozitívan megítélt reverz elúció nem kedvezményezett a $^{44}\text{Ti(IV)}$ kioldódása miatt. Ezen túl vizsgáltuk a generátorból kinyert, illetve a ciklotronban előállított $^{44}\text{Sc(III)}$ jelölhetőségét és összehasonlítottuk az irodalomban talált adatokkal, amelyek nagy mértékben korreláltak.

Kifejlesztettünk egy radiokémiai jelölés-optimalizálást segítő kapilláris rendszert, amely segítségével gyorsan és reprodukálhatóan voltunk képesek bizonyos kelátorok $^{44}\text{Sc(III)}$ affinitását vizsgálni. Segítségével kiderült, hogy a NOPO és az egy karboxil-karon egyszerűen funkcionalizált NOTA nem alkalmas $^{44}\text{Sc(III)}$ -mal történő komplex képzésére. A monofunkcionalizált DOTA, DOTA-GA és NODA-GA esetében biztató jelölhetőségi eredményeket kaptunk.

Ezt követően az AAZTA $^{44}\text{Sc(III)}$ -mal történő jelölésének a kidolgozását végeztük el. Azt találtuk, hogy kis kelátor koncentráció, illetve pH = 3-7 mellett magas radiokémiai hozam elérhető el. Ennek okán a $^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-c(RGDfK)}$ és a $^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-BSA}$ előállítását és *in vivo* vizsgálatát is elvégeztük, ahol a várt biodisztribúciós eredményeket kaptuk. Kiemelendő az $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ rendszer azon tulajdonsága, hogy szobahőmérsékleten és pH = 7 esetén is érdemi jelölés hajtható vele végre, ami ígéretes fehérjék, antitestek és egyéb hő- és pH-érzékeny vegyületek nukleáris medicinában történő alkalmazásánál.

A szélesebb spektrum feltérképezéséhez az MC1-R specifikus $^{68}\text{Ga-DOTA-NAPamid}$ mintájára előállítottuk a $^{44}\text{Sc-DOTA-NAPamid}$ ot, amit jellemeztünk és összehasonlítottunk más melanoma markerrel. Eredményül azt kaptuk, hogy az MC1-R specifikus α -MSH analógok közül kiemelkedően jó kémiai, kinetikai, illetve biodisztribúciós tulajdonságai rendelkezik. Hosszabb időtartamú *in vivo* vizsgálatoknál a kiürülés kinetikájából és a ^{44}Sc felezési idejéből adódóan közel kétszeres tumor/izom szöveti hányadost kaptunk. Ezen túl hangsúlyozandó, hogy elsőnek állítottunk elő melanoma tumor kimutatására alkalmas ^{44}Sc -jelölt radiotrészert.

8. Summary

^{68}Ga is one of the most widely used PET radionuclide produced in isotope-generator. In other hand its use and delivery is limited by the relatively short 1 hour half-life. An alternative solution can be provided by ^{44}Sc which has similar complexation properties then that of ^{68}Ga , but has a half-life of 4 hours. Therefore our aim was to map the production, and the chemical and biological behavior of the labeled derivatives and compare the received results.

We successfully constructed a $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ isotope-generator using ^{44}Ti radioisotope as parent nuclide. Beyond that the operation, the elution and the recharging effect of the generator were tested. It was found that the referred and applied direct-revers elution method resulted a considerable $^{44}\text{Ti(IV)}$ loss with every case of milking. In addition, we tested the generator and cyclotron produced $^{44}\text{Sc(III)}$ through labeling reactions. The results found suggest a high correlation to the data in the literature.

A capillary system was developed for radiochemical labeling optimization that quickly and reproducibly provide information in connection with affinity between $^{44}\text{Sc(III)}$ and different chelators. It has been shown that free NOPO and mono-functionalized NOTA were not suitable for $^{44}\text{Sc(III)}$ complexation, but the mono-functionalized DOTA, DOTA-GA, and NODA-GA seemed to be extremely promising.

We had the opportunity to collect information in connection with the labeling properties of the $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ complex. First it has been found that high radiochemical yields can be achieved with extremely low amount of chelator in the pH-range of 3-7. For this reason, a peptide ($^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-c(RGDfK)}$) and a protein ($^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-BSA}$) were also labeled and tested *in vivo*, where the expected results were obtained.

To get a wider view about biological behavior, $^{44}\text{Sc-DOTA-NAPamid}$ was prepared as an analog of the MC1-R specific $^{68}\text{Ga-DOTA-NAPamid}$, which was characterized and compared with other melanoma markers. As a result, $^{44}\text{Sc-DOTA-NAPamid}$ has an outstanding chemical, kinetical and biodistribution properties compared to other MC1-R specific α -MSH analogues. During the four hours long examination nearly two-fold tumor/muscle tissue ratio can be reached compared to the ^{68}Ga -labeled derivative, due to the kinetics of elimination and the half-life of ^{44}Sc . In addition, it should be highlighted that $^{44}\text{Sc-DOTA-NAPamid}$ is the first ^{44}Sc -labeled biomarker for melanoma imaging in literature.

9. Irodalomjegyzék

9.1. A hivatkozott közlemények jegyzéke

- [1] E. W. Price, C. Orvig; "Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals", *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43(1), 260–290
- [2] M. I. Tsionou, C. E. Knapp, C. A. Foley, *et al.*; "Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling", *RSC Advances*, **2017**, 7(78), 49586–49599
- [3] R. Kerdjoudj, M. Pniok, C. Alliot, *et al.*; "Scandium(III) complexes of monophosphorus acid DOTA analogues: a thermodynamic and radiolabelling study with ^{44}Sc from cyclotron and from a $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generator", *Dalton Trans.*, **2016**, 45(4), 1398–1409
- [4] S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, *et al.*; "[Gd-AAZTA] - : A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents", *Inorganic Chemistry*, **2004**, 43(24), 7588–7590
- [5] D. Spano, C. Heck, P. De Antonellis, *et al.*; "Molecular networks that regulate cancer metastasis", *Seminars in Cancer Biology*, **2012**, 22(3), 234–249
- [6] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, *et al.*; "The role of hypoxia in cancer progression angiogenesis metastasis and resistance to therapy", *Hypoxia*, **2015**, 3, 83–92
- [7] A. J. Beer, M. Schwaiger; "Imaging of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ expression", *Cancer and Metastasis Reviews*, **2008**, 27(4), 631–644
- [8] P. A. Knetsch, M. Petrik, C. M. Griessinger, *et al.*; "[^{68}Ga]NODAGA-RGD for imaging $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin expression", *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2011**, 38(7), 1303–1312
- [9] E. M. Dunki-Jacobs, G. G. Callender, K. M. McMasters; "Current management of melanoma", *Current Problems in Surgery*, **2013**, 50(8), 351–382
- [10] Z. Cheng, J. Chen, Y. Miao, *et al.*; "Modification of the structure of a metallopeptide: Synthesis and biological evaluation of ^{111}In -labeled DOTA-conjugated rhenium-cyclized α -MSH analogues", *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 45(14), 3048–3056
- [11] Z. Cheng, L. Zhang, E. Graves, *et al.*; "Small-animal PET of melanocortin 1 receptor expression using a ^{18}F -labeled alpha-melanocyte-stimulating hormone analog.", *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, **2007**, 48(6), 987–994
- [12] Z. Cheng, Z. Xiong, M. Subbarayan, *et al.*; " ^{64}Cu -labeled alpha-melanocyte-stimulating hormone analog for microPET imaging of melanocortin 1 receptor expression", *Bioconjugate Chemistry*, **2007**, 18(3), 765–772

- [13] S. Froidevaux, M. Calame-Christe, J. Schuhmacher, *et al.*; "A gallium-labeled DOTA- α -melanocyte-stimulating hormone analog for PET imaging of melanoma metastases", *Journal of Nuclear Medicine*, **2004**, 45(1), 116–123
- [14] Y. Miao, K. Benwell, T. P. Quinn; "99mTc- and 111In-labeled alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides as imaging probes for primary and pulmonary metastatic melanoma detection.", *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, **2007**, 48(1), 73–80
- [15] P. A. M. Dirac; "Nobel Lecture: Theory of electrons and positrons", *Nobelprize.org. Nobel Media AB 2013.*, **1933**, (i)
- [16] C. D. Anderson; "The positive electron", *Physical Review*, **1933**, 43(6), 491–494
- [17] W. H. Sweet, G. L. Brownell; "Localization of intracranial lesions by scanning with positron-emitting arsenic", *Journal of the American Medical Association*, **1955**, 157(14), 1183
- [18] D. Rich; "A Brief History of Positron Emission Tomography", *Journal of Nuclear Medicine Technology*, **1997**, 25(1), 4–11
- [19] J. Kónya, N. M. Nagy; "Nuclear and Radiochemistry"; London: Elsevier Inc., **2012**
- [20] O. Eriksson; "Imaging Islets of Langerhans by Positron Emission Tomography", (August 2015); Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, **2011**
- [21] J. Varga; "Biológiai izotóptechnika"; Debrecen: Debreceni Egyetemi kiadó, **2011**
- [22] I. Szilvási; "Nukleáris medicina"; Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., **2010**
- [23] G. D. Hutchins, M. a Miller, V. C. Soon, *et al.*; "Small animal PET imaging.", *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, **2008**, 49, 54–65
- [24] L. Jødal, C. Le Loirec, C. Champion; "Positron range in PET imaging: Non-conventional isotopes", *Physics in Medicine and Biology*, **2014**, 59(23), 7419–7434
- [25] A. Wirrwar, H. Vosberg, H. Herzog, *et al.*; "4.5 Tesla magnetic field reduces range of high-energy positrons-potential implications for positron emission tomography", *IEEE Transactions on Nuclear Science*, **1997**, 44(2), 184–189
- [26] G. J. Kemerink, M. G. W. Visser, R. Franssen, *et al.*; "Effect of the positron range of 18F, 68Ga and 124I on PET/CT in lung-equivalent materials", *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2011**, 38(5), 940–948
- [27] S. V Smith, M. Jones, V. Holmes; "Production and Selection of Metal PET Radioisotopes for Molecular Imaging"; Rijeka: InTech, **2011**
- [28] M.-M. Bé, V. Chisté, C. Dulieu; "Table of Radionuclides"; Sèvres: Bureau International des Poids et Mesures, **2006**

- [29] H. Jadvar, J. A. Parker; "Clinical PET and PET/CT"; London: Springer-Verlag, **2005**
- [30] OGYEI; "Radioaktív gyógyszerkészítmények"; 01/2014:0125: Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur. 8.0. -1 - 10, **2014**
- [31] P. A. Schubiger, L. Lehmann, M. Friebe; "PET Chemistry - The Driving Force in Molecular Imaging", 64; Heidelberg: Springer Berlin, **2007**
- [32] F. Rösch, F. F. Knapp; "Radionuclide Generators - Handbook of Nuclear Chemistry", Boston, MA: Springer US, **2011**, 1935–1976
- [33] R. Herbert, P. W. Kulke, R. T. H. Shepherd; "The use of technetium 99m as a clinical tracer element", *Postgraduate Medical Journal*, **1965**, 41(481), 656–662
- [34] K. H. Lieser; "Nuclear and Radiochemistry : Fundamentals and Applications"; Weinheim: Wiley-VCH, **1997**
- [35] M. Greene, W. Tucker; "An Improved Gallium-68 Cow", *The international journal of Applied Radiation and Isotopes*, **1961**, 12(1), 62–63
- [36] Y. Yano, H. Anger; "A Gallium68 Positron Cow for Medical Use", **1964**, 5, 485–488
- [37] H. Arino, W. J. Skraba, H. H. Kramer; "A new 68Ge/68Ga radioisotope generator system", *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, **1978**, 29(2), 117–120
- [38] "ITG - 68Ge/68Ga radionuclide generator". [Online]. Available: http://radiomedix.com/wp-content/uploads/ITG_Ge68Ga68-Generator_160830_V2.0.pdf
- [39] G.-J. Meyer, H. Macke, J. Schuhmacher, *et al.*; "68Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands", *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2004**, 31(8)
- [40] M. Fakhrurazi, A. Fadzil, M. K. Najah, *et al.*; "Purification and concentration of gallium-68 via anion exchange method from a SnO₂ -based column germanium-68/ gallium-68 generator", **2015**, 12(2), 66–80
- [41] K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, *et al.*; "Processing of Generator-Produced 68Ga for Medical Application", *Journal of Nuclear Medicine*, **2007**, 48(10), 1741–1748
- [42] E. Eppard, M. Wuttke, P. L. Nicodemus, *et al.*; "Ethanol-Based Post-processing of Generator-Derived 68Ga Toward Kit-Type Preparation of 68Ga-Radiopharmaceuticals", *Journal of Nuclear Medicine*, **2014**, 55(6), 1023–1028
- [43] W. A. P. Breeman, M. De Jong, E. De Blois, *et al.*; "Radiolabelling DOTA-peptides with 68Ga", *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2005**, 32(4), 478–485

- [44] P. Richards; "Nuclide Generators"; Upton: Brookhaven National Laboratory, **1965**
- [45] M. Y. Mlrza, A. Aziz; "A scandium generator", *Radiochimica Acta*, **1969**, 11(1), 43–64
- [46] D. V. Filosofov, N. S. Loktionova, F. Rösch; "A $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ radionuclide generator for potential application of ^{44}Sc -based PET-radiopharmaceuticals", *Radiochimica Acta*, **2010**, 98(3), 149–156
- [47] M. Pruszyński, N. S. Loktionova, D. V. Filosofov, *et al.*; "Post-elution processing of $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generator-derived ^{44}Sc for clinical application", *Applied Radiation and Isotopes*, **2010**, 68(9), 1636–1641
- [48] G. Audi, O. Bersillon, J. Blachot, *et al.*; "The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties", *Nuclear Physics A*, **2003**, 729(1), 3–128
- [49] H. F. Valdovinos, R. Hernandez, T. E. Barnhart, *et al.*; "Separation of cyclotron-produced ^{44}Sc from a natural calcium target using a dipentyl pentylphosphonate functionalized extraction resin", *Applied Radiation and Isotopes*, **2015**, 95, 23–29
- [50] C. Alliot, R. Kerdjoudj, N. Michel, *et al.*; "Cyclotron production of high purity $^{44}\text{m},^{44}\text{Sc}$ with deuterons from $^{44}\text{CaCO}_3$ targets", *Nuclear Medicine and Biology*, **2015**, 42(6), 524–529
- [51] G. Pascali, P. Watts, P. A. Salvadori; "Microfluidics in radiopharmaceutical chemistry", *Nuclear Medicine and Biology*, **2013**, 40(6), 776–787
- [52] C. Rensch, A. Jackson, S. Lindner, *et al.*; "Microfluidics: A groundbreaking technology for PET tracer production?", *Molecules*, **2013**, 18(7), 7930–7956
- [53] C. Rensch, B. Waengler, A. Yaroshenko, *et al.*; "Microfluidic reactor geometries for radiolysis reduction in radiopharmaceuticals", *Applied Radiation and Isotopes*, **2012**, 70(8), 1691–1697
- [54] J. Cal-González, J. L. Herraiz, S. España, *et al.*; "Positron range estimations with PeneloPET", *Physics in Medicine and Biology*, **2013**, 58(15), 5127–5152
- [55] G. M. Whitesides; "The origins and the future of microfluidics", *Nature*, **2006**, 442(7101), 368–373
- [56] K. S. Elvira, X. C. i Solvas, R. C. R. Wootton, *et al.*; "The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis", *Nature Chemistry*, **2013**, 5(11), 905–915
- [57] A. Lebedev, R. Miraghaie, K. Kotta, *et al.*; "Batch-reactor microfluidic device: first human use of a microfluidically produced PET radiotracer", *Lab on a Chip*, **2013**, 13(1), 136–145
- [58] W.-Y. Tseng, R. M. van Dam; "Compact microfluidic device for rapid concentration of PET tracers", *Lab on a Chip*, **2014**, 14(13), 2293–2302

- [59] L. Matesic, A. Kallinen, I. Greguric, *et al.*; "Dose-on-demand production of diverse ^{18}F -radiotracers for preclinical applications using a continuous flow microfluidic system", *Nuclear Medicine and Biology*, **2017**, 52, 24–31
- [60] S. H. Liang, D. L. Yokell, R. N. Jackson, *et al.*; "Microfluidic continuous-flow radiosynthesis of $[(^{18}\text{F})\text{FPEB}]$ suitable for human PET imaging.", *MedChemComm*, **2014**, 5(4), 432–435
- [61] G. Máté, D. Szikra, J. Šimeček, *et al.*; "Multiparametric labeling optimization and synthesis of ^{68}Ga -labeled compounds applying a continuous-flow microfluidic methodology", *Journal of Flow Chemistry*, **2016**, 6(2), 86–93
- [62] S. Pfaff, C. Philippe, V. Pichler, *et al.*; "Microfluidic ^{68}Ga -labeling: A proof of principle study.", *Dalton Transactions*, **2018**
- [63] A. T. Woolley, R. A. Mathies; "Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips.", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1994**, 91(24), 11348–11352
- [64] J. Ermert; " ^{18}F -labelled intermediates for radiosynthesis by modular build-up reactions: Newer developments", *BioMed Research International*, **2014**, 2014
- [65] C. C. Lee, G. Sui, A. Elizarov, *et al.*; "Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics", *Science*, **2005**, 310(5755), 1793–1796
- [66] Y. Liu, M. Tian, H. Zhang; "Microfluidics for synthesis of peptide-based pet tracers", *BioMed Research International*, **2013**, 2013
- [67] M. Gábor; "Gallium-68 radioizotóppal jelölt komplexek szintézise , vizsgálata és alkalmazásuk kisállat - PET leképezés során", Debreceni Egyetem, **2017**
- [68] Charles F. Baes Jr., R. E. Mesmer; "The Hydrolysis of Cations"; John Wiley & Sons Inc., **1976**
- [69] A. Romer, D. Seiler, N. Marincek, *et al.*; "Somatostatin-based radiopeptide therapy with $[^{177}\text{Lu}\text{-DOTA}]\text{-TOC}$ versus $[^{90}\text{Y}\text{-DOTA}]\text{-TOC}$ in neuroendocrine tumours", *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2014**, 41(2), 214–222
- [70] T. D. Poeppel, I. Binse, S. Petersenn, *et al.*; " $^{68}\text{Ga}\text{-DOTATOC}$ Versus $^{68}\text{Ga}\text{-DOTATATE}$ PET/CT in Functional Imaging of Neuroendocrine Tumors", *Journal of Nuclear Medicine*, **2011**, 52(12), 1864–1870
- [71] R. Mikołajczak, H. R. Maecke; "Radiopharmaceuticals for somatostatin receptor imaging", *Nuclear Medicine Review*, **2016**, 19(2), 126–132
- [72] B. Stolz, P. Smith-Jones, R. Albert, *et al.*; "Biological Characterisation of $[^{67}\text{Ga}]$ or $[^{68}\text{Ga}]$ Labelled DFO-Octreotide (SDZ 216-927) for PET Studies of Somatostatin Receptor Positive Tumors", *Hormone and Metabolic Research*, **1994**, 26(10), 453–459

- [73] A. R. Jalilian; "An overview on Ga-68 radiopharmaceuticals for positron emission tomography applications", *Iranian Journal of Nuclear Medicine*, **2016**, 24(1), 1–10
- [74] I. Velikyan; "Prospective of 68Ga-Radiopharmaceutical development", *Theranostics*, **2014**, 4(1), 47–80
- [75] B. Kaur; "Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis", *Neuro-Oncology*, **2005**, 7(2), 134–153
- [76] M. Zhao, W. Yang, M. Zhang, *et al.*; "Evaluation of 68Ga-labeled iNGR peptide with tumor-penetrating motif for microPET imaging of CD13-positive tumor xenografts", *Tumor Biology*, **2016**, 37(9), 12123–12131
- [77] Z. B. Li, K. Chen, X. Chen; "68Ga-labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin $\alpha\beta_3$ expression", *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2008**, 35(6), 1100–1108
- [78] S. A. Mousa, N. H. E. Darwish, P. J. Davis; "Integrin Antagonists and Angiogenesis"; Elsevier Inc., **2017**
- [79] K. Pohle, J. Notni, J. Bussemer, *et al.*; "68Ga-NODAGA-RGD is a suitable substitute for 18F-Galacto-RGD and can be produced with high specific activity in a cGMP/GRP compliant automated process", *Nuclear Medicine and Biology*, **2012**, 39(6), 777–784
- [80] K. A. Domnanich, C. Müller, R. Farkas, *et al.*; "44Sc for labeling of DOTA- and NODAGA-functionalized peptides: preclinical in vitro and in vivo investigations", *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, **2017**, 1(1), 8
- [81] J. Bábíčková, L. Tóthová, P. Boor, *et al.*; "In vivo phage display - A discovery tool in molecular biomedicine", *Biotechnology Advances*, **2013**, 31(8), 1247–1259
- [82] R. Pasqualini, E. Koivunen, R. Kain, *et al.*; "Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis", *Cancer Research*, **2000**, 60(3), 722–727
- [83] A. A. BroÅ Yna, W. JóÅ Wicks, K. Roszkowski, *et al.*; "Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy.", *Oncotarget*, **2016**, 7(August), 1–10
- [84] F. Gao, W. Sihver, C. Jurischka, *et al.*; "Radiopharmacological characterization of (6)(4)Cu-labeled alpha-MSH analogs for potential use in imaging of malignant melanoma.", *Amino acids*, **2016**, 48(3), 833–847
- [85] H. J. Kim, D. Y. Kim, J. H. Park, *et al.*; "Synthesis and characterization of a 68Ga-labeled N-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivative as potential PET Probe for malignant melanoma", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2012**, 20(16), 4915–4920
- [86] H. Chung, J. H. Lee, D. Jeong, *et al.*; "Melanocortin 1 receptor regulates

- melanoma cell migration by controlling syndecan-2 expression", *Journal of Biological Chemistry*, **2012**, 287(23), 19326–19335
- [87] P. Csermely, T. Korcsmáros, H. J. M. Kiss, *et al.*; "Structure and dynamics of molecular networks: A novel paradigm of drug discovery: A comprehensive review", *Pharmacology and Therapeutics*, **2013**, 138(3), 333–408
- [88] E. Törnqvist, A. Annas, B. Granath, *et al.*; "Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing", *PLoS ONE*, **2014**, 9(7), 1–11
- [89] L. Cunha, I. Horvath, S. Ferreira, *et al.*; "Preclinical imaging: An essential ally in modern biosciences", *Molecular Diagnosis and Therapy*, **2014**, 18(2), 153–173
- [90] E. Lin, A. Alessio; "What are the basic concepts of temporal, contrast, and spatial resolution in cardiac CT?", *Journal of Cardiovascular Computed Tomography*, **2016**, 3(6), 403–408
- [91] A. F. Chatziioannou; "Instrumentation for Molecular Imaging in Preclinical Research", *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2005**, 2, 533–536
- [92] R. I. Waltert; "Anion exchange studies of Sc(III) and V(IV). Separation of scandium, titanium and vanadium", **1958**, 6, 58–62
- [93] G. Bruggerman, A. Kant; "A Scandium Generator", *Radiation, International Journal of Applied*, **1965**, 107(1941), 540–541
- [94] N. Mahé, N. Audebrand; "Structure and thermal behaviour of $\text{ScK}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2$ and $\text{InRb}_{1-x}(\text{H}_3\text{O})_x(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_2 \cdot 0.5(\text{H}_2\text{O})$: Two members of a family of open-framework oxalates with isotypic helical structures and zeolite-like properties", **2006**, 8, 988–999
- [95] D. Mcalister, P. Horwitz, S. Base; "Separation Methods Utilizing Oxalate - HCl on Anion Exchange Resins", **2012**
- [96] A. Forgács, S. Szabó, Á. K. Krizsán, *et al.*; "New proposed methods to prepare Dose Calibrator for Sc44 activity measurements", *Journal of Nuclear Medicine*, **2017**, 58(1), 1323–1323
- [97] M. Bunka, C. Müller, C. Vermeulen, *et al.*; "Imaging quality of 44 Sc in comparison with five other PET radionuclides using Derenzo phantoms and preclinical PET", *Applied Radiation and Isotopes*, **2016**, 110, 129–133
- [98] A. Amor-Coarasa, M. Schoendorf, M. Meckel, *et al.*; "Comprehensive Quality Control of the ITG 68Ge/68Ga Generator and Synthesis of 68Ga-DOTATOC and 68Ga-PSMA-HBED-CC for Clinical Imaging", *Journal of Nuclear Medicine*, **2016**, 57(9), 1402–1405
- [99] R. Walczak, S. Krajewski, K. Szkliniarz, *et al.*; "Cyclotron production of 43 Sc for PET imaging", **2015**, 1–10
- [100] D. Mueller, W. A. P. Breeman, I. Klette, *et al.*; "Radiolabeling of DOTA-like

- conjugated peptides with generator-produced ^{68}Ga and using NaCl-based cationic elution method", *Nature Protocols*, **2016**, 11(6), 1057–1066
- [101] R. Chakravarty, S. Chakraborty, A. Dash, *et al.*; "Detailed evaluation on the effect of metal ion impurities on complexation of generator eluted ^{68}Ga with different bifunctional chelators", *Nuclear Medicine and Biology*, **2013**, 40(2), 197–205
- [102] M. Eder, O. Neels, M. Müller, *et al.*; "Novel preclinical and radiopharmaceutical aspects of [^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A new PET tracer for imaging of prostate cancer", *Pharmaceuticals*, **2014**, 7(7), 779–796
- [103] I. Velikyan, U. Rosenstrom, O. Eriksson; "Fully automated GMP production of [^{68}Ga]Ga-DO3A-VS-Cys40 -Exendin-4 for clinical use Irina", **2017**, 7(3), 111–125
- [104] R. P. Baum, F. Rösch, D. O. De, *et al.*; "Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides", **2013**, 194
- [105] F. Rösch; "Past, present and future of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators", *Applied Radiation and Isotopes*, **2013**, 76, 24–30
- [106] J. Simecek, O. Zemek, P. Hermann, *et al.*; "Tailored Gallium(III) chelator NOPO: Synthesis, characterization, bioconjugation, and application in preclinical Ga-68-PET imaging", *Molecular Pharmaceutics*, **2014**, 11(11), 3893–3903
- [107] R. D. Shannon; "Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chalcogenides", *Acta Crystallographica A*, **1976**, 32, 751–767
- [108] J. Notni, K. Pohle, H. J. Wester; "Comparative gallium-68 labeling of TRAP-, NOTA-, and DOTA-peptides: Practical consequences for the future of gallium-68-PET", *EJNMMI Research*, **2012**, 2(1), 2–6
- [109] T. Ebenhan, N. Chadwick, M. M. Sathekge, *et al.*; "Peptide synthesis, characterization and ^{68}Ga -radiolabeling of NOTA- conjugated ubiquitin fragments for prospective infection imaging with", *Nuclear medicine and biology*, **2014**, 390–400
- [110] C. F. M. E. Are, M. J. McCall, S. V. Deshpande, *et al.*; "Chelate radiochemistry: cleavable linkers lead to altered levels of radioactivity in the liver", **1988**, 102, 99–102
- [111] Y. Kim, C. Yang, J. Wang, *et al.*; "Effects of Targeting Moiety, Linker, Bifunctional Chelator, and Molecular Charge on Biological Properties of ^{64}Cu -Labeled Triphenylphosphonium Cations", **2008**, 2971–2984
- [112] F. Buchegger, D. Viertl, S. Baechler, *et al.*; " ^{68}Ga -NODAGA-RGDyK for $\alpha v \beta 3$ integrin PET imaging", *Nuklearmedizin*, **2011**, 50(6), 225–233
- [113] Z. Q. Zhao, Y. Yang, W. Fang, *et al.*; "Comparison of biological properties of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled cyclic RGD Peptide trimer and dimer useful as SPECT

- radiotracers for tumor imaging", *Nuclear Medicine and Biology*, **2016**, 43(11), 661–669
- [114] T. Läppchen, J. P. Holland, Y. Kiefer, *et al.*; "Preparation and preclinical evaluation of a ^{68}Ga -labelled c(RGDfK) conjugate comprising the bifunctional chelator NODIA-Me", *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, **2018**, 3(1), 6
- [115] J. Oxboel, M. Brandt-Larsen, C. Schjoeth-Eskesen, *et al.*; "Comparison of two new angiogenesis PET tracers ^{68}Ga -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂ and ^{64}Cu -NODAGA-E[c(RGDyK)]₂; in vivo imaging studies in human xenograft tumors", *Nuclear Medicine and Biology*, **2014**, 41(3), 259–267
- [116] M. Ogawa, K. Hatano, S. Oishi, *et al.*; "Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin related tumor imaging", *Nuclear Medicine and Biology*, **2003**, 30(1), 1–9
- [117] K. Kilian; "Ga-DOTA and analogs : Current status and future perspectives", *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, **2014**, 19, S13–S21
- [118] V. López-rodríguez; "PET-Based Human Dosimetry of the Dimeric $\alpha\text{v}\beta 3$ Integrin Ligand a Potential Tracer for Imaging Tumor Angiogenesis Corresponding author First author", **2015**, 1–23
- [119] M. Pniok, V. Kubiček, J. Havlíčková, *et al.*; "Thermodynamic and kinetic study of scandium(III) complexes of DTPA and DOTA: A step toward scandium radiopharmaceuticals", *Chemistry - A European Journal*, **2014**, 20(26), 7944–7955
- [120] S.-M. Gao, W.-P. Guo, L. Jin, *et al.*; "Maximum carbonyl-coordination number of scandium Computational study of $\text{Sc}(\text{CO})_n$ ($n = 1-7$), $\text{Sc}(\text{CO})_7^-$ and $\text{Sc}(\text{CO})_6^{3-}$ ", *International Journal of Quantum Chemistry*, **2013**, 113(8), 1192–1199
- [121] N. K. Tafreshi, X. Huang, V. E. Moberg, *et al.*; "Synthesis and Characterization of a Melanoma-Targeted Fluorescence Imaging Probe by Conjugation of a Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Specific Ligand", *Bioconjugate Chemistry*, **2012**
- [122] M. De Jong, W. A. P. Breeman, B. F. Bernard, *et al.*; "Tumour uptake of the radiolabelled somatostatin analogue [DOTA0, TYR3]octreotide is dependent on the peptide amount", *European Journal of Nuclear Medicine*, **1999**, 26(7), 693–698

9.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények



**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/345/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Gábor
Neptun kód: CVISA9
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057670

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, G.**, Szikra, D. P., Trencsényi, G., Fekete, A., Garai, I., Giani, A. M., Negri, R., Masciocchi, N., Maiocchi, A., Uggeri, F., Tóth, I., Aime, S., Giovenzana, G. B., Baranyai, Z.: AAZTA: an Ideal Chelating Agent for the Development of ⁴⁴Sc PET Imaging Agents. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 56 (8), 2118-2122, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201611207>
IF: 12.102
2. **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 ⁶⁸Ga- and ⁴⁴Sc-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



9.3. További, nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények



**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

További közlemények

3. 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
4. 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-Procainamide (PCA). *J. Cancer.* 8 (5), 774-785, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.17550>
IF: 3.249
5. Garai, I., Barna, S., **Nagy, G.**, Forgács, A.: Limitations and pitfalls of 99mTc-EDDA/HYNIC-TOC (Tekrotyd) scintigraphy. *Nucl. Med. Rev. Cent. East Eur.* 19 (2), 93-98, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5603/NMR.2016.0019>
6. Trencsényi, G., Bakó, F., **Nagy, G.**, Kertai, P., Bánfalvi, G.: Methotrexate induced apoptotic and necrotic chromatin changes in rat myeloid leukemia cells. *Inflamm. Res.* 64 (3), 193-203, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-015-0797-x>
IF: 2.557

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,205

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
15,568**

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



Debrecen, 2018.11.06.

10. Tárgyszavak

^{68}Ga radioizotóp

^{44}Sc radioizotóp

Izotópgenerátor

Ciklotron

Jelölés optimalizálás

Kapilláris rendszer

Maleimid származékok

AAZTA kelátor

c(RGDfK)

α -MSH analóg

MC1-R receptor

DOTA-NAPamid

^{68}Ga radioisotope

^{44}Sc radioisotope

Isotope generator

Cyclotron

Labeling optimization

Capillary System

Maleimid derivatives

AAZTA chelator

c(RGDfK)

α -MSH analogues

MC1-R receptor

DOTA-NAPamide

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Trencsényi Györgynek, aki a gyakorlati munkám elvégzésében, az elméleti háttér mélyebb elsajátításában, illetve a kapott eredmények kiértékelésében és értelmezésében nélkülözhetetlen segítséget nyújtott.

Köszönet illeti Dr. Szikra Dezsőt a radiokémiai és műszaki problémák megoldásában nyújtott segítségével, illetve a munkám során használt kapilláris rendszer megépítéséért.

Köszönöm Nagy Tamásnak és a Debreceni Egyetem Orvosi Képalkotó Intézet dolgozóinak az *in vivo*, *in vitro* és *ex vivo* vizsgálatokban nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom Dr. Szabó Sándornak és Forgács Attilának a ^{44}Sc kvantitatív mérését lehetővé tévő módszer kidolgozásáért és annak a gyakorlatba történő ültetéséért, illetve Dr. Vágner Adriennek a disszertációm megírása közben nyújtott tanácsaiért, észrevételeiért.

Szeretném megköszönni Dr. Garai Ildikónak és a Scanomed Kft. minden dolgozójának a PhD munkám elvégzése és az értekezés megírása közben nyújtott segítségüket.

Természetesen szeretném megköszönni feleségemnek, családomnak és barátaimnak a doktori tanulmányai közben és különösen a disszertációm írása során tanúsított türelmüket, támogatásukat és biztatásukat.

12. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények másolatai