

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Radiojelzett ciklodextrinek szerepe kísérletes daganatok
metasztázisainak *in vivo* PET képalkotásában**

Kálmán-Szabó Ibolya

Témavezető: Dr. Trencsényi György



DEBRECENI EGYETEM

**PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGIOLÓGIAI DOKTORI
ISKOLA**

Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. Pozitron emissziós tomográfia (PET)	9
2.1.1. Laboratóriumi kisállat PET	10
2.2. Nukleáris medicinában alkalmazott radionuklidok	11
2.3. Melanoma malignum	13
2.3.1. Melanoma malignum általános jellemzői	13
2.4. Melanoma malignum diagnosztikai jellemzői	14
2.4.1. Prostaglandin E2 receptor	14
2.4.2. Melanokortin 1 receptor	16
2.5. Targetáló molekulák	20
2.5.1. Ciklodextrinek	20
2.5.2. NAP-, HOLD-, MARS-, FOLD-amid	21
3. Célkitűzés	23
4. Metodikák	24
4.1. Vegyszerek és eszközök	24
4.2. Kísérleti sejtvonala és fenntartása	26
4.3. Kísérleti állatok	26
4.4. <i>In vivo</i> melanoma tumormodell	27
4.5. Felhasznált radiofarmakonok	27
4.5.1. [¹⁸ F]FDG szintézise	27
4.5.2. ⁵² Mn-DOTAGA-RAMEB szintézise.	28
4.5.3. DOTA-NAPamid radiojelzése ⁶⁸ Ga radionukliddal	29
4.5.4. DOTAGA-RAMEB radiojelzése ⁶⁸ Ga izotóppal	29
4.5.5. [⁶¹ Cu]Cu-KFTG-NAPamid szintézise	29
4.5.6. ^{205/206} Bi és ²¹³ Bi előállítás, majd DOTA-konjugált peptidek radiojelzése	30
4.6. LogP értékek meghatározása	32
4.7. <i>In vivo</i> és <i>ex vivo</i> vizsgálatok	32
4.7.1. [⁵² Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB PET vizsgálata B16-F10 melanoma tumoros egérmodellben	32
4.7.2. [⁵² Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB <i>ex vivo</i> biodisztribúciós vizsgálata B16-F10 melanoma tumor egérmodellben	33
4.7.3. [⁶¹ Cu]Cu-KFTG-NAPamid PET vizsgálata B16-F10 melanoma egérmodellben	33
4.7.4. [⁶¹ Cu]Cu-KFTG-NAPamid <i>ex vivo</i> biodisztribúciós vizsgálata B16-F10	33

melanoma egérmodellben	
4.7.5. [²¹³ Bi]Bi-DOTA konjugált NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid <i>ex vivo</i> biodisztribúciós vizsgálatai B16-F10 melanoma egérmodellben	33
4.8. Adatfeldolgozás	34
5. Eredmények	35
5.1. [⁵² Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB tumorcélzó képességének vizsgálata PGE2 receptor pozitív B16-F10 melanoma egérmodellben	35
5.2. [⁶¹ Cu]Cu-KFTG-NAPamid tumorcélzó képességének vizsgálati eredményei	41
5.3. ²¹³ Bi-DOTA-NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid biodisztribúciós vizsgálatának eredményei MM egérmodellben	45
5.4. Mellkasi B16-F10 melanoma metasztázisok vizsgálata	49
5.5. Az elvégzett vizsgálatok korlátai, limitáció	51
6. Megbeszélés	52
6.1. [⁵² Mn]Mn-DOATAGA-RAMEB	52
6.2. [⁶¹ Cu]Cu-KFTG-NAPamid biológiai viselkedésének értékelése	56
6.3. [²¹³ Bi]Bi-DOTA-konjugált amidszármazékok vizsgálati eredményeinek értékelése	56
6.4. Mellkasi B16-F10 melanoma metasztázisok vizsgálata	58
6.5. Új tudományos eredmények	59
7. Összefoglalás	60
8. Summary	61
9. Irodalomjegyzék	62
9.1. A hivatkozott közlemények jegyzéke	62
9.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	73
10. Tárgyszavak	77
11. Köszönetnyilvánítás	78
12. Függelék	79

Rövidítések jegyzéke

ARRIVE	Animal Research: Reporting of <i>In Vivo</i> Experiments (Állatkísérletek: <i>In vivo</i> kísérletek jelentése)
A375	humán melanoma malignum sejtvonal
BPPA	6-(3,7-Diaza-1,5(2,6)-dipiridinaciklooctafán-3-ilmetil)pikolinsav
B16-F10	egér melanoma sejtvonal
BxPC-3	Epitheliális morfológiát mutató sejtvonal, amelyet egy 61 éves, adenokarcinómában szenvedő női beteg hasnyálmirigy-szövetéből izoláltak
C57BL/6J	az emberi betegségek modelljeként használt egértörzs
CD	ciklodextrin
CT	computer tomográfia
DCM	diklórmetán
DEMÁB	Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle tápfolyadék (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	dimetil-szulfoxid
DM-α-CD	dimetil-alfa-ciklodextrin
DNS	dezoxirobinukleinsav
DOTA	1,4,7,10- tetraazaciklododekán-N,N',N'',N'''-tetraecetsav
DOTAGA	2,2',2''-(10-(2,6-dioxotetrahydro-2H-pirán-3-yl)-1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7-triyl)triacetsav
DOTA-TOC	DOTA-[Tyr3]-oktreotid
DTPA	dietilén-triamin-pentaecetsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FBS	magzati borjúsérum
[¹⁸F]FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-deoxi-d-glükóz
GPCR	G-fehérje-kapcsolt receptor

HBTU	hexafluorfoszfát benzotriazol tetrametil urónium
HB-β-CD	2-hidroxi-butyl-p-ciklodextrin 7
HCl	sósav
HE-β-CD	2-hidroxi-etil-béta-ciklodextrin
HEPES	(4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetánszulfonsav)
HNO₃	salétromsav
HP-β-CD	2-hidroxi-propil-béta-cickodextrin
HP-γ-CD	2-hidroxi-propil-gamma-ciklodextrin
ID	injektált dózis
IgG1	immunglobulin 1-es alosztálya
KFTG	<i>p</i> Bna-CB-15aneN ₅
LET	lineáris energia transzfer
logP	oktanol/PBS megoszlási hányados
MC1-R	melanokortin 1-receptor
MM	Melanoma Malignum
MiniPET-II	kisállat PET-kamera
NH₄OAc	ammónium-acetát
NODAGA	1,4,7-triazaciklononán,1-glutársav-4,7-diecetsav
NOTA	1,4,7- triazaciklononán-N,N',N''-triecetsav
NP	nanorészecske
PBS	foszfát puffer
PET	pozitron emissziós tomográfia
PGE₂	prostaglandin E ₂
RAMEB	random metilezett béta ciklodextrin
ROI	regions of interest
RP-HPLC	fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia

SD	szórás
siRNS	rövid interferáló ribonukleinsav
SPE	szilárd fázisú extrakció
SPECT	egyfoton emissziós számítógépes tomográf
SUV	standardizált szövetfelvételi érték
TATM	trifluormetánszulfonil- β -D-mannóz
Tf	transzferrin
TFA	trifluoecetsav
TLC	vékonyréteg kromatográfia
TRIS	2-amino-2-(hidroxi-metil)-1,3-propándiol
u.p. HCl	ultratiszta sósav
UV	ultraibolya
VOI	hasznos térfogat
WHO	Egészségügyi Világszervezet
α-MSH	melanocita stimuláló hormon
α-CD	alfa-ciklodextrin
β-CD	béta-ciklodextrin
γ-CD	gamma-ciklodextrin

1. Bevezetés

A WHO (Egészségügyi Világszervezet) jelentése szerint 2020-ban világszerte közel 10 millió halálesetet okoztak a különböző tumoros megbetegedések. Az elmúlt évtizedekben a több mint 120 féle ráktípus gyógymódjának megtalálására fordított jelentős kutatási erőfeszítések ellenére a rendelkezésre álló terápiás lehetőségek gyakran korlátozottak, ezért az elváltozások korai diagnosztikája képalkotó technikákkal, mint például a pozitronemissziós tomográfia (PET), kulcsfontosságú a hosszú távú túléléshez. A PET technikához olyan radionuklidokra van szükség, amelyek több követelménynek is megfelelnek, mint például: (i) a sugárzás energiája olyan tartományban legyen, amely elég magas ahhoz, hogy kijusson a beteg testéből, de elég alacsony ahhoz, hogy a detektorok által érzékelhető legyen (PET esetén 511 keV); (ii) az adott radionuklid felezési idejének ($t_{1/2}$) elég hosszúnak kell lennie, hogy a radiofarmakon előállítás után a vizsgálni kívánt elváltozás vagy biológiai folyamat vizsgálható legyen, de elég rövidnek kell lennie ahhoz, hogy elkerüljük a vizsgált szövetek és szervek jelentős károsodását; (iii) a radionuklidoknak olcsónak és könnyen hozzáférhetőnek kell lenniük.

A rosszindulatú melanoma jelentős közegészségügyi probléma, amelynek előfordulása és az ebből eredő halálozás folyamatosan növekszik a kaukázusi népesség körében, ezért időben történő felismerése rendkívül fontos¹⁻³, így az elmúlt évtizedekben az ezirányú kutatások dinamikusan fejlődtek^{4,5}. A melanoma folyamatosan növekvő incidenciája^{6,7} mellett komoly kockázatot jelent jelentős áttétképző képessége^{8,9}, amely folyamat a betegség igen korai stádiumában elindul és sokszor a még kis méretű primer tumor mellett már számos szervben megjelennek a metasztázisok (például: agy, máj tüdő, stb.). Éppen ezért fontos a betegség korai felismerése, hiszen az áttétek kialakulása jelentősen csökkenti a betegek túlélési esélyeit¹⁰⁻¹². A PET technika máig leggyakrabban alkalmazott ágense a 2-^[18F]fluoro-2-deoxi-d-glükóz (^[18F]FDG), amely glükózszármazékként rendkívül jó potenciállal rendelkezik a megnövekedett metabolikus aktivitással rendelkező elváltozások diagnosztikájában^{13,14}. Ugyanakkor, a ^[18F]FDG alkalmazásának megvannak a maga hátrányai is, hiszen a gyulladásoz folyamatok során is jelentős akkumulálódást mutat, valamint a központi idegrendszer sejtjei is jelentősen halmozzák, amely nagymértékben megnehezíti a kapott képek elemzését/értelmezését, a beteg és egészséges szövetek elkülönítését. Ezeken túl, a ^[18F]FDG általános tumordiagnosztikumnak minősül^{15,16}, hiszen nem specifikus egyetlen ráktípusra sem, így egyenletesen oszlik el a szervezetben.

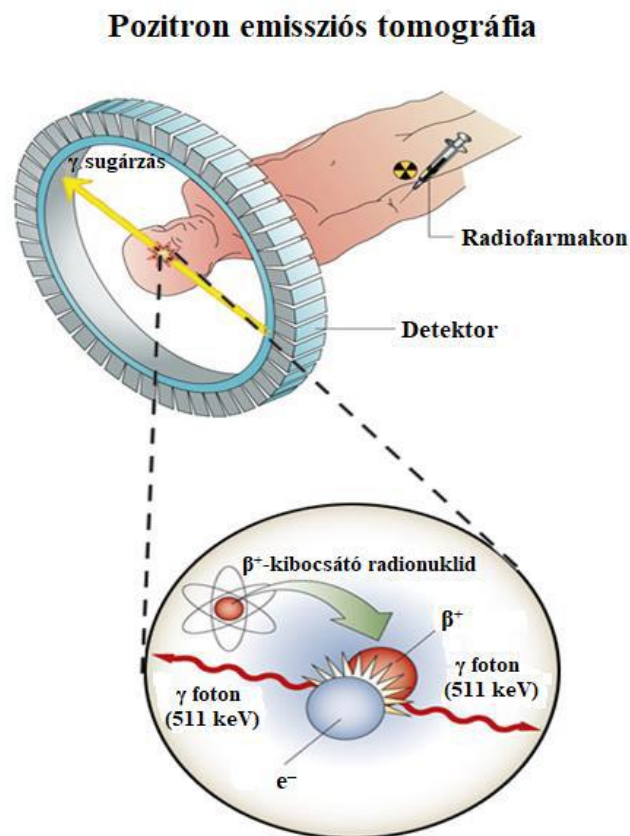
A szerv, vagy szövetspecifikusság eléréséhez olyan nyomjelzők (target molekulák) alkalmazására van szükség, amelyek nagy affinitást mutatnak az adott típusú elváltozásokhoz, a bejuttatott radiofarmakont stabilan és hosszabb időn keresztül képesek a célsejtekhez kötni, így növelve a PET technika hatékonyságát.

Doktori munkám során ^{52}Mn , ^{61}Cu és ^{213}Bi izotópokkal jelölt radiofarmakonokat állítottunk elő és vizsgáltuk azok tumorcélzó képességét és diagnosztikai potenciálját PET alkalmazások tekintetében. Az előállított anyagok DOTAGA (^{52}Mn), DOTA (^{213}Bi) és 15aneN₅-alapú (^{61}Cu) kelátorokat tartalmaztak a radioaktív fémionok megkötésére. A tumorspecifikusság eléréséhez a ^{52}Mn esetében RAMEB, ^{61}Cu esetében NAPamid, míg a ^{213}Bi esetében NAP-, FOLD-, HOLD- és MARSamid molekulákat alkalmaztunk.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Pozitron emissziós tomográfia (PET)

A PET az egyik legmodernebb funkcionális képalkotó eljárás, amikor pozitront (e^+) sugárzó izotópokkal megjelölt molekulák felhasználásával ábrázoljuk a szervezetben aktuálisan zajló biokémiai folyamatokat. Az izotóp bomlásakor pozitront (β^+) bocsát ki, amely a szövetekben az úgynevezett annihiláció során egy elektronnal találkozik és megsemmisül, amely folyamat során két, egymással ellentétes irányban mozgó gamma-fotonná (energiájuk 511keV) alakul. Ezeket a fotonokat detektáljuk a vizsgált test körül kör alakban elhelyezett kamerák segítségével, majd számítógépes jelátalakítást követően kialakul a PET kép. Az annihiláció helyének meghatározásában annak van döntő szerepe, hogy a folyamat során képződő fotonpár tagjainak becsapódása a detektorokba némi időkülönbséget mutat, így ez alapján számíthatóvá válik a pozitron szervezetbeni megsemmisülésének helye.

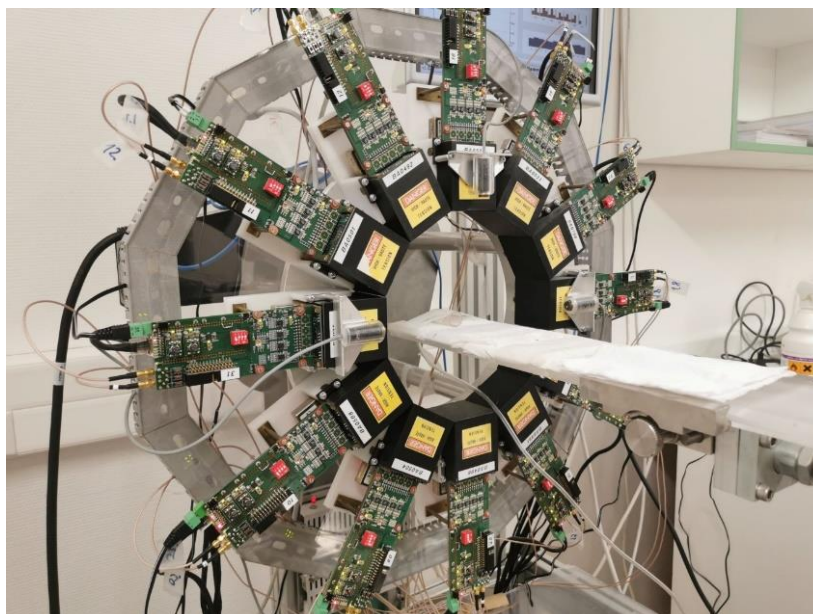


1. ábra. A PET képalkotás elvi ábrája¹⁷.

2.1.1. Laboratóriumi kisállat PET

Olyan képalkotó módszer, mely alkalmas kistestű laboratóriumi állatokban aktuálisan zajló biokémiai folyamatok leképezésére. A PET rendkívüli érzékenysége miatt alkalmas a más technikákkal már nem mérhető koncentrációban jelenlevő anyagok vizsgálatára akár receptorszinten is. Ezen berendezések felépítésükben megegyeznek a humán betegellátásban használt készülékekkel, csak kisebb méretűek. Mivel a PET nem-invazív technika, egy radioaktív ágens biológiai eloszlása egyetlen élő állatban is meghatározható, majd a folyamat napokig vagy hetekig ismételhető ugyanazt az egyedet felhasználva. Mivel ugyanaz az egyed használható minden időpontban, önmaga kontrolljaként szolgál, kiküszöbölve ezzel az állatok közötti anatómiai és egyéb különbségeket. A hagyományos invazív módszerekkel ellentétben, az egy vizsgálatsorozathoz szükséges állatok mennyisége is csökkenthető, így a vizsgálatok gazdaságosabbá tehetők. Ez összhangban van a kísérletekhez felhasznált laboratóriumi állatok számának csökkentésére irányuló „Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. törvény, valamint az állatkísérletekről szóló 40/2013. (II. 14.) kormányrendelettel.

Számos pozitronnal jelölt vegyületet állítottak elő az elmúlt évtizedekben¹⁸, ezáltal kitérítve a PET vizsgálat által mérhető biológiai folyamatok listáját¹⁹. A specifikus enzimek, fehérjék, receptorok és gének szintjén működő folyamatok non-invazív módon történő megjelenítése radiotracer alkalmazásával, tették a PET technikát mára széles körben alkalmazhatóvá és elfogadottá, nemcsak a laboratóriumi állatokon végzett kísérletekben, de a humán felhasználás területén is. Ezen módszer fontos előnye az, hogy áthidaló vizsgálatokat tesz lehetővé az állatmodell és a humán tanulmányok között. Ugyanakkor sarkalatos pontja az állatkísérletekben megszerzett tudásnak, hogy az adott vizsgálatokhoz alkalmazott kísérleti állatmodell mennyire megbízhatóan vetíti előre a humán eredményeket. Mivel a PET diagnosztika lehetőséget teremt arra, hogy ugyanazon kísérleteket különböző élőlényeken is hasonló módon végezhessük el, biztosítja a közvetlen összehasonlítás lehetőségét és az állatmodell adatainak megfelelő értelmezését. Napjainkban a magas kezdeti felszerelési költség, a PET szkennerek, és a PET nyomjelzők magas ára miatt a laboratóriumi kisállat PET vizsgálatokat kevés kutató intézet engedheti meg magának. Ugyanakkor, rendkívüli érzékenységének, ezáltal jó diagnosztikai potenciáljának köszönhetően, felhasználása iránt gyorsan növekszik az érdeklődés a biológiai tudományok, valamint a gyógyszerészet és a biotechnológia területén is.



2. ábra. A Debreceni Egyetem, Nukleáris Medicina Tanszék MiniPET-II készüléke

2.2. Nukleáris medicinában alkalmazott radionuklidok

Az 1. táblázat a PET mérések során leggyakrabban alkalmazott izotópokat mutatja be. Mivel a 4 leggyakrabban alkalmazott PET izotóp (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O és ^{18}F) felezési ideje viszonylag rövid (sorrendben 20,4, 10, 2,5 és 109 perc), így nagy mennyiségben és lehetőleg gyors radiokémiai módszerekkel szükséges előállítani ezeket a molekulákat

1. táblázat. A PET technikában leggyakrabban alkalmazott radioaktív izotópok vegyjele, felezési ideje és a gyártásukhoz szükséges laboratóriumi felszereltség

<i>Izotóp jele</i>	<i>Felezési idő ($t_{1/2}$)</i>	<i>Előállítás helye</i>
^{15}O	2,5 perc	ciklotron
^{13}N	9,9 perc	ciklotron
^{11}C	20,4 perc	ciklotron
^{18}F	109,7 perc	ciklotron
^{62}Cu	9,74 perc	generátor
^{64}Cu	764,4 perc	ciklotron
^{68}Ga	68 perc	generátor
^{82}Rb	1,25 perc	generátor
^{124}I	6019,2 perc	ciklotron

Ciklotronnal nem rendelkező PET-diagnosztikai központokba a ^{18}F -jelzett nyomjelzők szállítása ugyan megvalósítható napjainkban, azonban viszonylag rövid felezési ideje miatt csak korlátozott távolságon belül.

A ciklotronban történő radionuklid előállítás igen költséges, így nem sok kutató- és egészségügyi intézetben található meg ez a lehetőség, ezért gyakran a PET vizsgálatokban alkalmazott béta-sugárzó izotópok előállításának egy lehetséges alternatívájaként alkalmazzák a radionuklid generátorokat, melyek biztosítják a PET vizsgálatok kivitelezését ciklotronnal nem rendelkező helyeken is (3. ábra). A generátor egy zárt rendszer, amelyben egy hosszabb felezési idővel rendelkező anyaelem bomlása során rövidebb felezési idejű leányelem képződik, így biztosítható a radionuklid előállítás helyi szinten. A generátorban egy hordozón megkötve található az anyaelem, amelyről a leányelem meghatározott időközönként, megfelelő oldószerrel eluálható. Általában a generátorok „relatív alacsony” költségű, viszonylag rugalmas alternatívát jelenthetnek a speciális PET tracer helyszíni kinyeréséhez²⁰.



3. ábra. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor (Eckert&Ziegler-Németország)

2.3. Melanoma malignum

2.3.1. Melanoma malignum általános jellemzői

A melanoma malignum (MM) az egyik legagresszívabb bőrdaganat, amely a melanocitáknak nevezett pigmenttermelő sejtekből alakul ki. Ez a betegség előrehaladott állapotban rendkívül rossz prognózissal rendelkezik a fokozott metasztatikus²¹ és angiogén tulajdonsága²², valamint a kezelésekkkel szemben mutatott rezisztenciája miatt. Az angiogenezis kritikus pont a legtöbb humán tumor kialakulásában²³ (a daganatok több mint 90%-a így viselkedik), amely alól a MM sem kivétel, így a rosszindulatú elváltozás kialakulását követően relatíve rövid időn belül megindul az új erek kialakulásának folyamata. Ebből kifolyólag, a primer tumor korai felismerése és annak eltávolítása műtéti úton kulcsfontosságú, amelyet a folyamatos szűrővizsgálatok biztosíthatnak. Annak ellenére, hogy világszerte igyekeznek növelni a szűrővizsgálatokba bevont emberek számát, a betegség előrehaladott stádiumában diagnosztizáltak száma folyamatosan növekszik, ami napjainkban körülbelül 130,000-re tehető éves szinten, amelyért elsősorban a túlzásba vitt napozás, illetve a napfénynek való kitettség tehető felelőssé. Az elmúlt évtizedekben sokat lehetett hallani az elvékonyodó ózonrétegről, aminek hozadéka a földfelszínt érő UV sugárzás erősségének növekedése²⁴.

A bőr felső rétegében található melanocyták, termelik a melanin pigmentet (három fajtáját különböztetjük meg: eumelanin, pheomelanin és neuromelanin), melynek feladata a bőr védelme az erős sugárzás ellen és attól függően, hogy adott földrajzi területen milyen a beérkező sugárzás mennyisége, gondoskodik az egyes rasszok bőrszínéért. Röviden megfogalmazva, minél nagyobb az UV-sugárzásnak való kitettség, annál több melanin termelődik, tehát annál sötétebb lesz az egyes emberek bőrszíne. Ez a folyamat játszódik le napozás hatására is, ezért barnulunk. Probléma akkor jelentkezik, ha a nagyenergiájú UV sugárzás képes a sejtekben DNS-károsodást előidézni, amely mutációkhoz vezet, indikálva a kontroll nélküli sejtnövekedést^{25,26}.

A kórfolyamat agresszivitása abból ered, hogy a tumorsejtek gyorsan növekednek a kapillárisok felé, majd metasztázisokat képeznek, még úgy is, ha a primer daganat mérete kicsi. A metasztázisok jelenléte drámaian csökkenti a várható élettartam hosszát (az 5 éves túlélés 5-19%)²³, ezért a betegség korai felismerése és lokalizálása az orvosi képalkotó módszerek segítségével, döntő fontosságú a betegek életkilátásai szempontjából^{27,28}.

A MM az előzőekben vázoltak miatt a kísérletes onkológiai kutatások fókuszába került. A korai felismerés azért is fontos, mert a MM talán az egyetlen rosszindulatú ráktípus, amelyet

korai szakaszban eltávolítva, a teljes felépülés szinte bizonyos²⁹. A 0. stádiumban fölfedezett elváltozás, amikor még nem érintettek a nyirok- és vérerek, sebészeti eltávolítását követően a kiújulás esélye mindössze 3-5%³⁰.

A terápia tekintetében azt mondhatjuk, hogy az elmúlt évek jelentős fejlődést hoztak a különböző módszerek terén a MM patogenezise molekuláris szintű megértésének köszönhetően. Az új módszerek között említhetjük a célzott terápiákat, amelyek citosztatikus anyagokat felhasználva akadályozzák a sejtsztódását, de ide tartoznak az immunterápiák is, ahol a szervezet immunválaszát fokozzák a kialakult tumorra szemben^{27,31}.

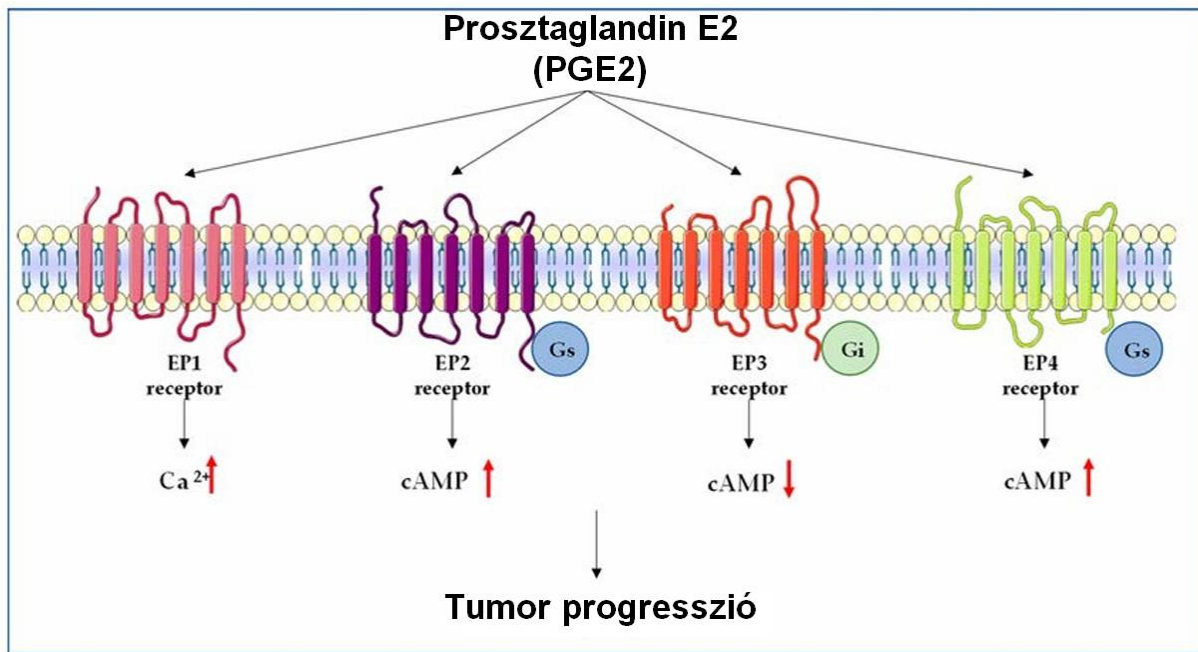
2.4. Melanoma malignum diagnosztikai jellemzői

2.4.1. Prostaglandin E2 receptor

A prosztoglandin E2 receptor, más néven EP2, a prosztoglandin E2 (PGE2) receptora, amelyet az emberi PTGER2 gén kódol. Ez az egyik a négy azonosított EP receptor közül, a továbbiak az EP1, EP3 és EP4 (4. ábra).

Ismert tény, hogy a PGE2 az egyik legfontosabb lipidmediátor, amely részt vesz a krónikus gyulladásos folyamatokban és közvetlen szerepe van a tumorok kialakulásában azáltal, hogy szabályozza a tumorsejtek növekedését és migrációját, az immunszuppressziót, az apoptózist, az áttétképzést, és az angiogenezist is. A PGE2 szintézisében szerepet játszó enzimek expressziója egyenes arányban áll a tumor növekedésével és az áttétképzéssel is³².

Mivel a prosztoglandin E2 és receptorai szoros kapcsolatban állnak a tumorgenezissel³²⁻³⁷, egyértelmű, hogy a PGE2-receptor szerepe kulcsfontosságú az azt expresszáló tumorok diagnosztikájában. Ezen túlmenően a ciklodextrin molekulák képesek a PGE2-vel komplexeket képezni, ebből kifolyólag tökéletes molekuláris célpontoknak tűnnek a PGE2-receptor pozitív malignus daganatokat célzó tumorszelektív radiotracerok kifejlesztéséhez³⁸⁻⁴². Korábbi eredményeink megerősítik azt a feltevést, hogy a ⁶⁸Ga-val jelölt, random metilezett béta-ciklodextrin (RAMEB) ([⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB) hatékonyan alkalmazható a PGE2-pozitív B16-F10 melanomás daganatok *in vivo* azonosítására⁴³, azonban melanoma malignum áttétek diagnosztikájában még nem alkalmazták, így ilyen kísérletet is terveztünk méréseink során. A PGE2-t expresszáló BxPC-3 xenograftok magas [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB felvétele bizonyította, hogy különböző radionuklidok alkalmazása a targetáló molekulában nincs jelentős hatással a ciklodextrinek PET képalkotó tulajdonságára.

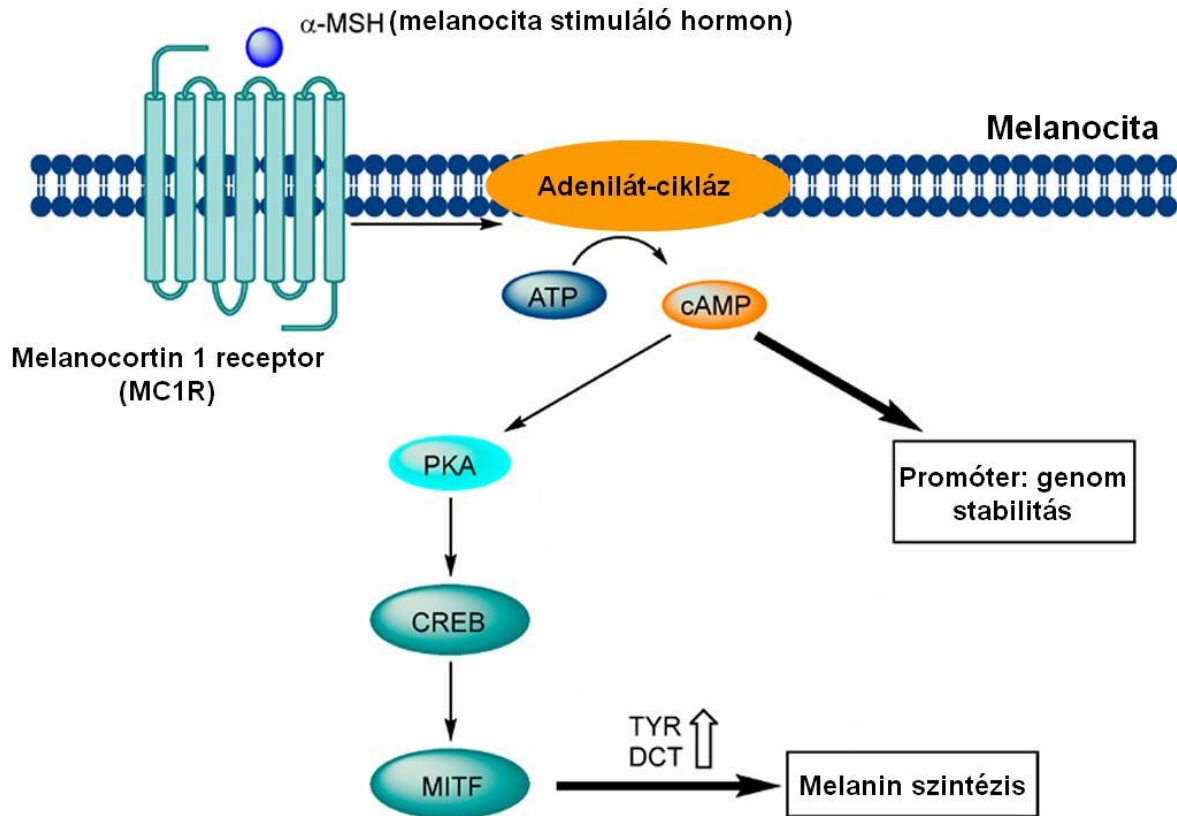


4. ábra. Az EP-receptorok sematikus ábrázolása. A PGE2 aktivitását négy G-fehérje-kapcsolt receptorral (GPCR), nevezetesen az EP1-EP4 receptorokkal való kölcsönhatás közvetíti. Minden egyes EP-receptor külön jelátviteli útvonallal rendelkezik⁴⁴.

Ezen ígéretes kezdeti eredmények ellenére azonban a rövid élettartamú ⁶⁸Ga- vagy ^{205/206}Bi-izotópok alkalmazásának hátránya az, hogy nem használhatóak hosszabb kémiai szintézisek, illetve nagyobb időintervallumot lefedő PET mérések során⁴⁵⁻⁴⁷. Ezen hiányosság kiküszöbölésére a hosszú felezési idejű mangán-52 (⁵²Mn; $t_{1/2}=5,59$ nap, $\beta^+=242$ KeV) alkalmasabb PET-radionuklidnak tűnik a PGE2-receptor pozitív tumorok diagnosztikájában⁴⁸⁻⁵⁰. A ⁵²Mn felezési ideje nemcsak a lassabb kinetikájú molekulák (pl. a liposzómákkal komplexképző ciklodextrinek) *in vivo* monitorozását teszi lehetővé⁵¹⁻⁵³, de elegendő időt biztosít a távoli laboratóriumokba történő szállításhoz is, valamint kiterjedtebb kutatás elvégzéséhez ⁵²Mn radionukliddal történő szintézis célravezető lehet. Mindezen túl, a ⁵²Mn-vel jelölt DOTA-komplexekkel és DOTA-TRC105-tel (kiméra humán/murina immunglobulin G (IgG1)) végzett korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy az ⁵²Mn ideális a PET-képzésben való felhasználásra^{54,55}. A fentieket figyelembe véve feltételeztük, hogy az ⁵²Mn pozitron sugárzó radionukliddal jelzett ciklodextrinek alkalmasak lehetnek a melanoma malignum PET-diagnosztikájában.

2.4.2. Melanokortin 1 receptor

A melanokortinok döntő szerepet játszanak a stresszválasz, a gyulladás és a bőr pigmentációjának szabályozásában. A melanokortin1-receptor egy G-protein-kapcsolt fehérje, amely elsősorban a bőr pigmentációjának szabályozásában és gyulladáscsökkentő hatás kialakulásának jelátvitelében játszik döntő szerepet.⁵⁶



5. ábra. Az MC1-R jelátviteli útvonala a melanocitákban⁵⁶

A MC1-R expressziója alacsonyabb szintű a melanocitákban, azonban a melanomasejtek gyakran túlexpresszálják. Ez teszi a MC1-R-t az MM diagnózisának és terápiájának potenciális célpontjává⁵⁷. Korábbi *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok is beszámoltak arról, hogy a radioaktívan jelzett α -MSH analógok nagyfokú felvételét mutatták a B16-F10 tumorokban, ami a szignifikáns MC1-R expresszióval magyarázható. A receptor kötődési kapacitást kiszámították, amelyre megközelítőleg 22 000 kötőhely/sejt⁵⁸ értéket kaptak.

Az elmúlt évtizedben számos melanomaspecifikus radiojelzett molekulát (pl. antitestek)⁵⁹, α -MSH receptor (alfa-melanocita-stimuláló hormon) ligandumot⁶⁰ és benzamid származékokat⁶¹ fejlesztettek ki a melanoma PET képalkotására, amelyek a melanokortin-1 receptort (MC1-R) - mint G-fehérje-kapcsolt sejtmembrán receptor - célozzák^{53,54}. Az α -MSH analógok, például a NAPamid peptid, specifikusan kötődnek az MC1-R receptorokhoz. Az *in vivo* preklinikai PET-képalkotáshoz több ⁶⁴Cu-, ⁶⁴ ⁶⁸Ga-, ⁴⁴Sc-, ⁶⁵ ¹⁸F-, ⁶⁶, ¹¹¹In- és ^{99m}Tc-jelzett⁶⁷ NAPamid analógról számoltak be, mint potenciális melanoma-specifikus radiofarmakon.

A széles körben használt ⁶⁴Cu-izotópon kívül más rézizotópok is jelentős figyelmet kaptak a nukleáris gyógyászatban és a radiokémiában a MM diagnosztikai és terápiás alkalmazásával kapcsolatban⁶⁸.

Az *in vivo* molekuláris képalkotásra alkalmas réz izotópok közül (⁶⁰Cu ($t_{1/2} = 23,7$ perc, β^+), ⁶¹Cu ($t_{1/2} = 3,33$ óra, β^+), ⁶²Cu ($t_{1/2} = 9,67$ perc, β^+) és ⁶⁴Cu ($t_{1/2} = 12,70$ h, β^+ és β^-)), a relatív hosszú felezési idejű és előnyös fizikai paraméterekkel rendelkező ⁶¹Cu-t alkalmaztuk, amely ciklotronban (β^+ : 1159 keV; γ : 511 keV) előállítható. Ennek az izotópnak nagy előnye, hogy viszonylag hosszú felezési ideje lehetővé teszi szállítását olyan nem túl távoli PET-képalkotó klinikai központokba, ahol nem áll rendelkezésre ciklotron.^{69,70} Emellett előállítása olcsóbb is, mint a legtöbb pozitron kibocsátó izotópé.

Az elmúlt évtizedekben jelentős energiát fordítottak olyan kelátorok tervezésére és szintézisére, amelyek rendkívül stabil és inert komplexeket képeznek a Cu(II)-ionnal. Ezek a makrociklusos fémkötő ligandumok többnyire a 12 tagú ciklén (1,4,7,10-tetraazaciklododekán) és a 14 tagú ciklám (1,4,8,11-tetraazaciklotetradekán) származékai. Ezek a származékok, az úgynevezett keresztkött ligandumok csoportjába tartoznak, ahol a makrociklusban egymással szemben elhelyezkedő N-donor atomok még egy metilén hídral össze vannak kapcsolva, így növelve magának a ligandumnak és a kialakuló komplexnek a stabilitását^{71,72}. Az így előállított komplex vegyületek vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy ez a módosítás a képződő réz(II)komplexek rendkívül nagy inertségét eredményezte az *in vivo*

lejátszódó disszociációval szemben, amikor a fémion kiszabadulhat a kötő molekulából.⁷³ Bár a keresztkötött Cu(II)-kelátok inertsége figyelemre méltó, szintézisük gyakran különlegesen extrém körülményeket igényel (pl. szerves oldószer, magas hőmérséklet, hosszú reakcióidő stb.).⁷³ A nagy stabilitás és inertség mellett további fontos paraméter a gyors komplexképződés⁷⁴, ami jelentős tényező a rövidebb felezési idejű izotópokkal történő jelölés esetén. Fontos tényező még a redukcióval szembeni ellenállás⁷⁵, hogy az *in vivo* alkalmazás során ne vesszen el a diagnosztikai potenciál azáltal, hogy a központi fémion redukcióját követően szétesik az alkalmazott radiofarmakon. Összeségében azt mondhatjuk, hogy a valódi feladat egy ésszerű egyensúly megtalálása a különböző tulajdonságok között a széleskörű alkalmazás érdekében, különösen a hosszú/rövid élettartamú radioizotópokkal végzett munkában. Vizsgálataink során úgy találtuk, hogy lehetséges megoldást nyújthat ennek a problémának a megoldására a CB-15aneN₅ ligandumcsalád⁷⁶ alkalmazása. Korábbi eredmények bizonyították, hogy a CB-15aneN₅ és bifunkciós származéka – *p*NO₂Bn-CB-15aneN₅ – megfelelő termodinamikai stabilitással⁷⁷, gyors képződési reakcióban alakít ki komplexet a réz(II)ionnal, továbbá a kialakult kelátok megfelelően nagy inertséggel rendelkeznek az *in vivo* felhasználáshoz. Ezekből az eredményekből kiindulva gondoltuk úgy, hogy ennek a kelátorcsaládnak az alkalmazása lehetőséget teremt a MM diagnosztikájára, amennyiben ellátjuk azokat a megfelelő, például NAPamid, biovektorokkal⁷⁸. Mivel a *p*NO₂Bn-CB-15aneN₅ ligandum nitrobenzil linker csoportját redukálnunk kellett volna a kapcsolási reakciók előtt, hogy aminocsoportokat alakítsunk ki, ezért inkább úgy döntöttünk, hogy a nitrobenzilcsoportot benzoecsoporttal helyettesítjük, ami alkalmasabb volt a konjugáláshoz. Ezt az „új” kelátort (*p*Bna-CB-15aneN₅, másnéven KFTG) természetesen szintén teszteltük az *in vivo* vizsgálatok előtt⁷⁹.

A [[⁶¹Cu]Cu(*p*Bna-CB-15aneN₅)]²⁺ komplex kiváló kémiai tulajdonságai miatt célul tűztük ki, hogy újonnan szintetizált radiofarmakonnal tervezünk *in vivo* kísérleteket, amelyben a ⁶¹Cu(II)-izotópot alkalmazzuk (könnyű és olcsó előállítású ciklotronban cinkből, jó fizikai paraméterei, mint például bomlási felezési ideje, $t_{1/2} = 3,3$ óra) NAPamid fehérjével, mely melanoma specifikussága irodalmi adatokban szerepel.⁸⁰

A melanokortin 1 receptor (MC1-R) a legtöbb primer és metasztatikus melanómasejten overexpressziót mutat^{62,81,82}, ezért béta-sugárzó radioizotóppal jelzett MC1-R ligandumok alkalmasak a melanoma diagnózisára, illetve a metasztázisok azonosítására pozitronemissziós tomográfiával. Számos preklinikai vizsgálat igazolta az MC1-R-t célzó, radioaktívan jelzett (⁶⁸Ga, ¹¹¹In, ¹⁸F, ²¹³Bi, ⁶⁴Cu, ⁴⁴Sc, ^{99m}Tc) amid származékok (NAP,- HOLD,- MARS, -

FOLDamid) diagnosztikus alkalmazhatóságát a kísérleti melanomás daganatok kimutatásában^{15,58,64,65,67,81-86}. A ⁶⁸Ga izotóppal jelzett NAPamid ([⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid) B16-F10 melanomás tumorokban való nagyfokú felvétele és a gyenge háttéraktivitása^{80,87} igazolja ezen radiofarmakon melanoma specifikusságát.

A diagnosztikai alkalmazások mellett azonban szükség van olyan MC1-R célzott terápiás radiotracerek kifejlesztésére, melyek α -, β -sugárzással vagy Auger-elektron emisszióval elpusztítják a melanoma sejteket. A jelenleg létező MC1-R-irányított ReO ciklizált DOTA-[Cys3,4,10,D-Phe7] alfa-MSH3-13 (CCMSH) molekulák, köztük a ¹⁸⁸Re-(Arg11)CCMSH, a [²¹²Pb]Pb-DOTA-DOTA-Re (Arg11)CCMSH, [¹⁷⁷Lu]Lu, - és [⁹⁰Y]Y-DOTA-Re(Arg11)CCMSH, - és [⁹⁰Y]Y-DOTA-Re(Arg11)CCMSH sikeresnek bizonyultak az MM terápiás eszköztárában a következő okok miatt: meghosszabbították a betegek átlagos túlélési idejét, csökkentették a daganatok növekedési rátáját és remissziót eredményeztek, továbbá a peptidok fémkomplexekkel történő kapcsolása ellenállóvá tette azokat az *in vivo* lebomlással szemben⁸⁸⁻⁹⁰.

A fentebb említett izotópok mellett, az alfa-sugárzó bizmut-213 (²¹³Bi, $t_{1/2} = 45,6$ perc, $E_{\alpha} = 8,4$ MeV) is potenciális jelölt terápiás szempontból, hiszen nagy lineáris energiaátvitellel (LET) (≈ 100 keV/ μm) és rendkívül rövid α úttal (40-80 μm) rendelkezik, illetve Actinium-225/Bismuth-213 (²²⁵Ac/²¹³Bi) generátorrendszerből nyerhető⁹¹. A ²¹³Bi-radioizotópok komplexálására kifejlesztett kelátorok pedig, amelyek a jól ismert DOTA és a DTPA ligandumok származékai, alkalmasak a ²¹³Bi(III)-at stabil és inert formában kötni⁹². Ezen tulajdonságok alapján, a ²¹³Bi-jelzett ágensek mind diagnosztikai, mind terápiás területen egyaránt jól alkalmazható radiofarmakonoknak tekinthetők.

Az MM-specifikus radioizotópok hatékonysága nagymértékben változik a LET-érték függvényében. Tekintettel a LET-érték (lineáris energia transzfer) és az alfa-sugárzás rövid úthosszára (2-10 sejt), az α -sugárzók erőteljes pusztító hatást fejtenek ki a tumorsejtekre és a kapcsolódó mikrokozmoszra anélkül, hogy szignifikáns káros toxicitást okoznának a szomszédos egészséges szövetekben⁹³.

A nagy energiájú LET révén az alfa-sugárzás kettősszál- és klaszter DNS-töréseket okoz, valamint az apoptotikus mechanizmusokhoz kapcsolódó intracelluláris folyamatok széles körét aktiválja, mint az autofágia és nekrozis⁹⁴. Sem a sejtek sejtciklusbeli állapota, sem az oxigénellátás szintje nem befolyásolja az alfa-sugárzók tumorsejt-ölő hatását⁹⁵. Ezért ezek az alfa-sugárzó radionuklidok alkalmazhatóak lehetnek a célzott rákkezelésben. Ezzel szemben,

bármennyire is elterjedtek a β -sugárzók a nagy tömegű tumorok eliminálásában, az a tény, hogy jelentős az egészséges szövetek károsodása is, továbbra is problémássá teszi azok alkalmazását a rutinszerű terápiában⁹⁶. Az alfa- és béta-sugárzók mellett szóba jöhetnek még az úgynevezett Auger-elektron emitterek is, amelyek szintén magas LET-értékkel és ultrarövid úthosszal jellemezhetők, ugyanakkor alkalmazásukhoz nélkülözhetetlen azok sejtfelszínre, vagy sejtmagjába való bejutása a megfelelő citotoxikus hatás eléréséhez⁹⁷.

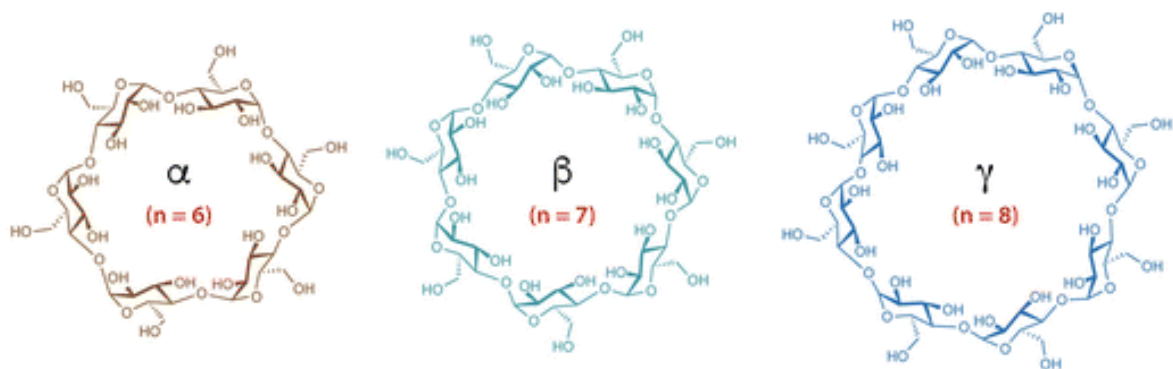
2.5. Targetáló molekulák

Egy potenciális target peptidnek, illetve más erre a célra alkalmazott molekulának számos feltételnek kell megfelelni, úgymint: nagy affinitással és szelektíven kell kötődjön olyan sejtfelszíni receptorhoz, melyből a tumorsejtek legalább háromszor annyit fejeznek ki, mint az egészségesek.

2.5.1. Ciklodextrinek

A ciklodextrinek (CD) gyűrűs oligoszacharidok, amelyek a természetben is gyakran előfordulnak és α -1,4 glikozid kötésekkel keresztül összekapcsolódó glükóz monomerekből állnak.^{98,99} Három fő típusuk van, a tartalmazzott glükóz alegységek száma szerint: az α -CD hat, a β -CD hét, a γ -CD pedig nyolc glükóz molekulát tartalmaz (6. ábra). A gyűrű alakú ciklodextrinek külső felülete hidrofíl, ezért vízben jól oldódnak, a belső rétegük pedig hidrofób¹⁰⁰. Mind a nem-toxikus természetüknek^{101,102}, mind a vízoldható tulajdonságuknak¹⁰³ köszönhetően biotechnológiai^{103,104} és gyógyszerészeti alkalmazásuk elterjedt, mint oldékonyságot könnyítő segédanyag, vagy gyógyszerivő rendszer^{105,106}, illetve nukleinsav szállító^{107,108}.

Az első CD-alapú transzferrin (Tf) targetált nanorészecskéket (NP) siRNS szállítóként alkalmazták.¹¹⁰ A nem-targetált, és a Tf-targetált siRNS NP-ket ciklodextrint tartalmazó polikation felhasználásával szintetizálták, majd ⁶⁴Cu radiojelzést követően végeztek méréseket. A MicroPET a Tf-targetálás elhanyagolható hatását tárta fel a ligandum célba juttatása, valamint NP-k a biológiai eloszlásának befolyásolása terén.



6. ábra. Az α -, a β - és a γ -ciklodextrin kémiai szerkezete¹⁰⁹.

Az NP-k *in vivo* eloszlásának javítását is tanulmányozták CD-ek segítségével¹¹¹. Ritkaföldfém-olajsav NP-eket hoztak létre és azokat módosították α -CD-ek segítségével, hogy növeljék azok vízdékonyságát. Ezeket a komplexeket aztán ^{18}F -ral jelölték, hogy mikroPET-képeket készíthessenek. A jelölést követően az *ex vivo* és *in vivo* megoszlást egereken 5 és 120 perc elteltével vizsgálták. Az *ex vivo* mérések az NP-k gyors felhalmozódását mutatta a májban ($\sim 90,8\%$ injektált dózis (ID)/g) és lépben ($\sim 62,5\%$ ID/g) 5 perc elteltével, majd a beadást követően 120 perccel már a májfelvétel csökkentést mutatott $\sim 57,6\%$ ID/g-ra, míg a lépben további felhalmozódás $18,9\%$ ID/g-kal volt tapasztalható. Az *in vivo* mikroPET képek jó egyezést mutattak az *ex vivo* biológiai eredményekkel, és intenzív jelet adtak már 5 perccel a beadása után.

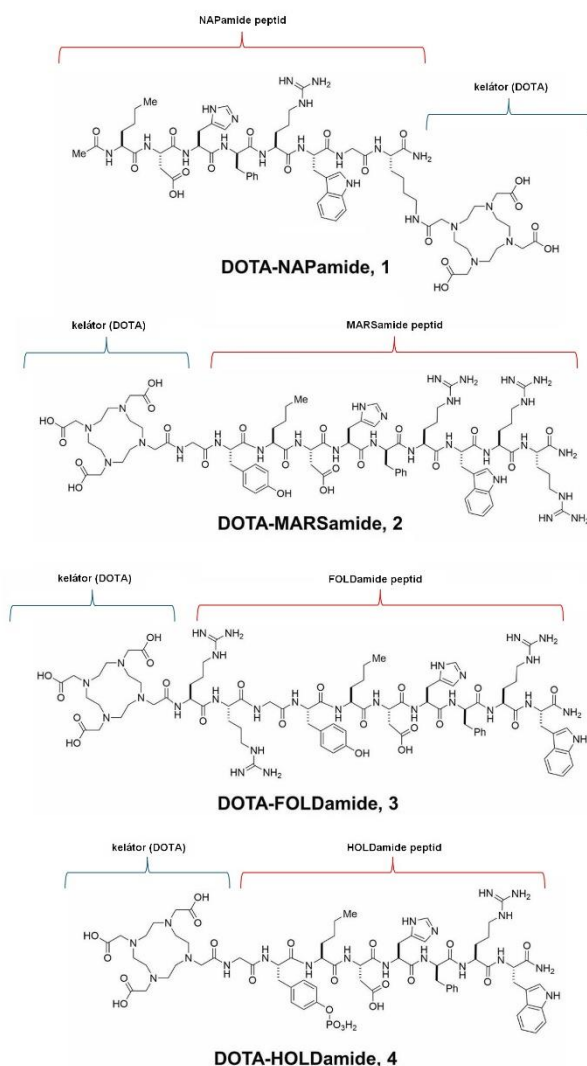
A CD-alapú nanorészecskék alkalmazásán túl természetesen lehetőség van a CD-eket kelátképzőkkel is kapcsolni, majd azokat radioaktív fémionnal jelölve kapjuk a megfelelő PET tracet. Míg a CD-alapú nanorészecskéket, általában $^{64}\text{Cu}^{110}$ vagy ^{18}F izotóppal¹¹² jelölték, addig a kelátorral konjugált CD-re kiváló példa a ^{68}Ga -cal jelölt p-NCS-benzil-NODA-GA^{113,114}.

2.5.2. NAP-, HOLD-, MARS-, FOLD-amid

A NAP-, HOLD-, MARS-, FOLD-amid molekulák (7. ábra) mindegyikét azzal a céllal állították elő, hogy MSH analógnaként alkalmazhatóak legyenek a MM diagnosztikájában, továbbá, hogy a megfelelő kelátorokhoz kötve, majd azokat terápiás izotópokkal komplexálva alkalmasak legyenek az MM terápiájára. A NAPamid peptiddel korábban végzett kutatások azt mutatták, hogy nemcsak maga a peptid, de a DOTA molekulával konjugált változat is jelentős

MC1-R célzó képességgel rendelkezik⁸⁰. Ezenkívül számos radiokatív fémionnal jelölt, réz-64 (⁶⁴Cu), gallium-68 (⁶⁸Ga), fluor-18 (¹⁸F), indium-111 (¹¹¹In), scandium-44 (⁴⁴Sc) és technécium-99m (^{99m}Tc), valamint NAPamiddal kapcsolt ágenst is előállítottak és bizonyították azok alkalmazhatóságát az MM diagnosztikája terén^{80,84,86}. Míg a DOTA-NAPamid molekulát mondhatni részletesen tanulmányozták, addig a szerkezetileg analóg DOTA-MARSamid, DOTA-FOLDamid és a DOTA-HOLDamid konjugátumok részletes jellemzése nem történt meg.

A diagnosztikai alkalmazások mellett már jelen vannak az irodalomban a terápiás alkalmazásra szánt radiofarmakonok is, amelyek ¹⁸⁸Re, ²¹²Pb, ¹⁷⁷Lu és ⁹⁰Y radioizotópokkal jelölve, bizonyították képességüket a MM gyógyításában⁸⁸⁻⁹⁰.



7. ábra. DOTA-NAPamid, -MARSamid, -FOLDamid, -HOLDamid kémiai szerkezete¹¹⁵

3. Célkitűzés

Doktori munkám célkitűzései a következők voltak:

- Célunk volt az általunk szintetizált új, mangán-52-vel jelzett random-metilált béta-ciklodextrin ($[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOTAGA-RAMEB}$) *in vivo* tumor-targetáló képességét és biológiai viselkedését tanulmányozni és a kapott eredményeket összehasonlítani a már irodalomból ismert melanocortin-1 receptor (MC1-R) specifikus $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NAPamid}$ és PGE2-receptor szelektív $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ radiofarmakonokkal.
- Vizsgálni kívántuk az általunk melanoma kimutatására fejlesztett MC1-R specifikus $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ tumorcélzó képességét B16-F10 melanoma modellen és mellkasi áttétein.
- Tanulmányozni akartuk újonnan szintetizált és ^{213}Bi -vel jelzett MC1-R ligandumok (DOTA-NAPamid, HOLDamid, MARSamid és FOLDamid) biológiai eloszlását és experimentális melanoma tumor célzó tulajdonságait.
- Továbbá, információt szeretnénk volna gyűjteni a PGE2 specifikus $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOTAGA-RAMEB}$; illetve melanocortin-1-receptor (MC1-R) specifikus $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NAPamid}$ és $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ targetáló képességéről mellkasi melanoma metasztázisokat esetében.

4. Metodikák

4.1. Vegyszerek és eszközök

Radiofarmakonok előállításánál használt anyagok és a gyártó cégek:

- QMA Sep-Pak (Plus Light) (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- AG neutralizáló oszlop (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, USA)
- C18 Sep-Pak Plus (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Alumina Sep-Pak (Plus) (MI-026) töltet (tisztító oszlopsor) (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Kriptofix 2.2.2.-t (Merck, Darmstadt, Németország)
- vízmentes acetonitril (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 14 mg/ml koncentrációjú K_2CO_3 -oldat (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- 20 mg TATM (ABX GmbH, Radeberg, Németország)
- 1 M HCl oldat (Normapur)
- injekcióhoz való víz (B.Braun)
- 10%-os NaCl-injekció (Pharmamagist Kft)
- $^{68}Ge/^{68}Ga$ -generátor (50 mCi, Gallia-Pharm, Eckert and Ziegler Németország)
- 0,1 M ultra tiszta HCl (Merck, Darmstadt, Németország)
- c[KNGRE]-NH₂ (MTA ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport)
- 0,1 M NaHCO₃ puffer (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- *p*-SCN-Bn-NOTA (Macrocycles Inc., Dallas, TX, USA)
- 96%-os EtOH (Merck, Darmstadt, Németország)
- izotóniás sóoldat (Fresenius Kabi Hungary Kft, Budapest, Magyarország)
- NODAGA-[c(RGD)₂] (ABX GmbH, Radeberg, Németország)
- 1 M –os nátrium acetát oldat (Sigma-Aldrich St. Louis, MissouriUSA)
- 2%-os NaOH oldat (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- Oasis HLB 30 mg töltetértogatú extrakciós oszlop (Waters, Milford, Massachusetts, Egyesült Államok)
- Light C18 Sep-Pak oszlop (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- 6-deoxy-6-monoamino-(2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (NH₂-HPBCD) (Cyclolab Kft. Budapest, Magyarország)
- *p*-NCS benzyl-NODA-GA (NODAGA) (Chematech, Dijon, Franciaország)

- 6-Monodeoxy-6-monoamino-randomly-methylated-beta-cyclodextrin hydrochloride (NH₂-RAMEB) (Cyclolab Kft. Budapest, Magyarország)
- ²²⁵Ac/²¹³Bi generátor (180 MBq) (ITU, Németország)
- ⁵²Mn, ⁶¹Cu, ^{205/206}Bi izotópkeverék (Debreceni Egyetem, Magyarország)
- Az ABX (Radeberg, Németország) szállította a DOTA-NAPamidot
- DOTA-MARSamid (DOTA-Gly-Tyr-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Arg-Arg-Arg-NH₂) és a DOTA-FOLDamid vegyületeket (DOTA-Arg-Arg-Arg-Gly-Tyr-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-NH₂) (Simmelweis Egyetem Budapest, Magyarország)
- DOTA-HOLDamid gyantához kötött peptid formában (DOTA (tBu)₃-Gly-pY-OBzl-Nle-Asp(OtBu)-His(Trt)-(D-Phe)-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-(Rink Amide MBHA gyanta) (Kongens Lyngby, Dánia)

Sejttenyésztés során használt oldatok:

- DMEM + GlutaMAXTM-I (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- FBS, Qualified (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- MEM Non-essential Amino Acid Solution ((Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- MEM Vitamin Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- Antibioitic Antimycotic Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- Trypsin-EDTA Solution (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA)
- PBS pH 7.2 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Tumor indukció során használt oldatok:

- Aerrane folyadék inhalációs gőz képzéséhez (Baxter Hungary, Budapest)
- fiziológiás sóoldat (0,9 % NaCl)

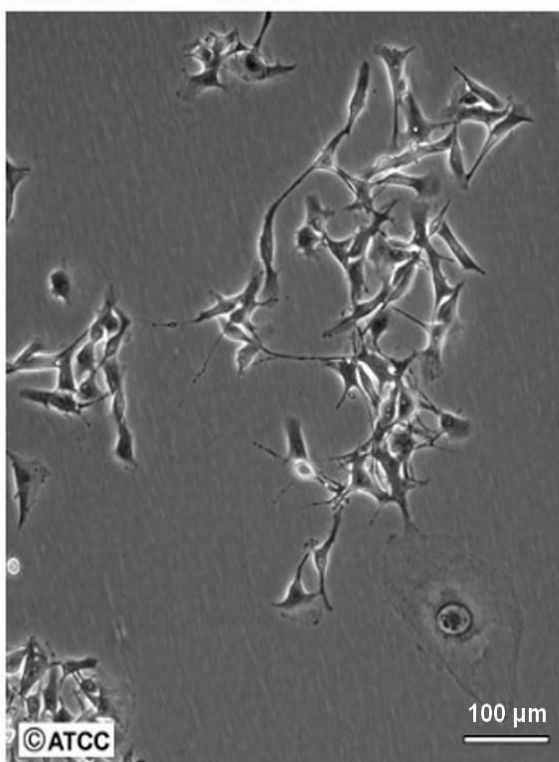
PET vizsgálat során altatásra használt oldat:

- izoflurán (Forane), AbbVie, Budapest, Magyarország; OGYI-T-1414/01

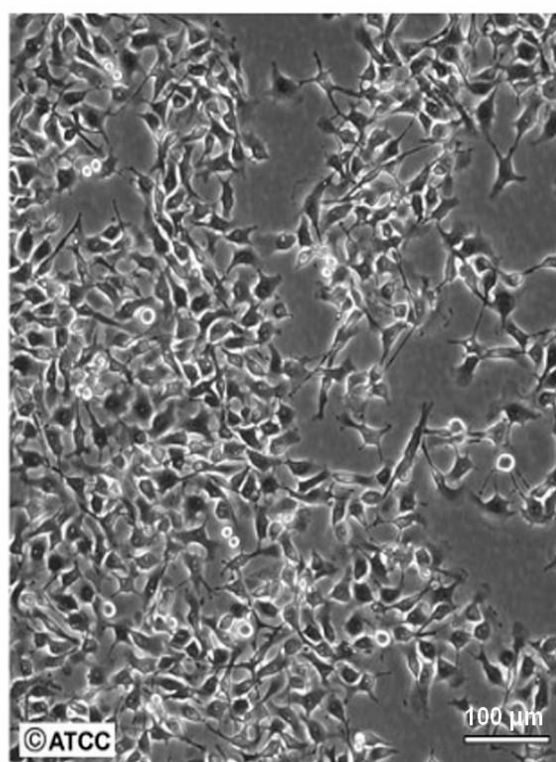
4.2. Kísérleti sejtvonala és fenntartása

A B16-F10 (egér eredetű melanotikus melanoma) sejtvonala beszerzése az ATCC-től (Virginia, USA) történt (8. ábra). A sejttenyésztéshez 10% magzati szarvasmarha szérumot (FBS) tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) tápoldatot alkalmaztunk, melyet 1% antimikotikum-antibiotikum, továbbá MEM nem esszenciális aminosav oldatot (1 (V/V)%); Gibco™) és MEM vitamin oldatot (1 (V/V)%); Gibco™) adtunk.

ATCC azonosító: CRL-6475 TM
Elnevezés: B16-F10



alacsony denzitás



magas denzitás

8. ábra A B16-F10 sejtvonala fénymikroszkópos képe (ATCC)

4.3. Kísérleti állatok

A kísérleteinkben használt C57BL/6J egereket (Charles River Laboratories (Animalab Ltd., Budapest, Hungary)) hagyományos laboratóriumi körülmények között tartottuk. A kísérleti egerek egyedileg szellőztetett ketrecekben voltak, 24 ± 2 °C hőmérsékleten, $55 \pm 10\%$ -os páratartalom mellett. Mesterséges megvilágítást alkalmaztunk az állatházban 12 órás cirkadián ciklussal. Steril félszintetikus takarmányt (Akronom Ltd., Budapest, Magyarország) és ivóvizet

ad libitum biztosítottunk az állatoknak. Az Egyesült Királyság Állatkísérleti Etikai Bizottság kritériumainak megfelelően, a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével (regisztrációs szám: 16/2022/DEMÁB) történt az állatok beszerzése és tartása.

4.4. *In vivo* melanoma tumormodell

Tíz hetes nőstény C57BL/6J egereket ($n = 65$) használtunk a vizsgálatok során. Az MC1-R pozitív-, illetve PGE2-R pozitív melanoma tumorindukcióhoz, C57BL/6J egerekbe szubkután (s.c.) a bal váll területére, illetve a metasztázis modell esetén intravénásan a laterális farki vénába 1×10^6 MC1-R-pozitív B16-F10 tumorsejtet injektáltunk 100 μ l 0,9% sóoldatban. *In vivo* PET vizsgálatot, majd *ex vivo* kísérleteket végeztünk 14 ± 1 nappal a tumorsejtek beadását követően, 115 ± 10 mm³-es tumortérfogat mellett.

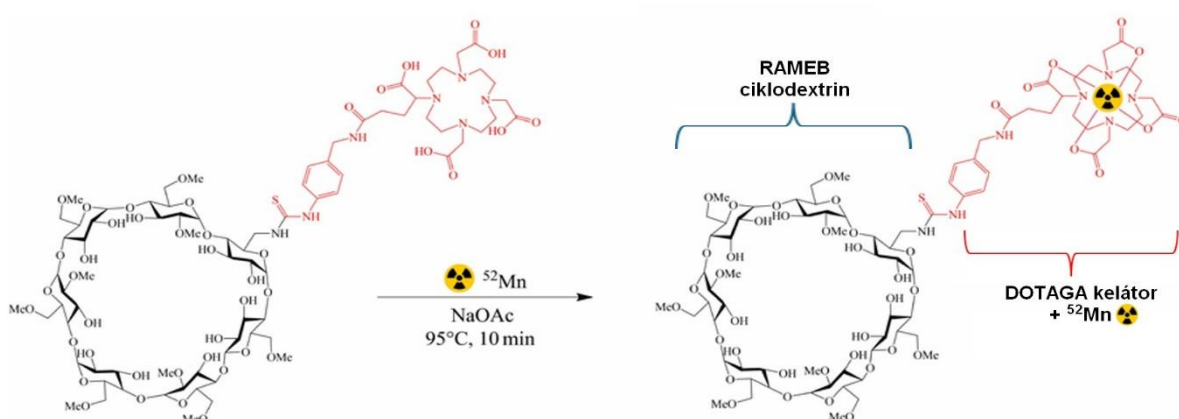
4.5. Felhasznált radiofarmakonok

4.5.1. [¹⁸F]FDG szintézise

Az [¹⁸F]FDG előállítása intézetünkben rutinszerűen történik, elsősorban onkológiai betegek diagnosztikai vizsgálatának kivitelezése céljából. Az előállításhoz szükséges ¹⁸F-ion gyártása ciklotronban, ¹⁸O-cal dúsított víz protonnyaláb általi bombázásával történik. Az így előállított ¹⁸F-iont egy automatizált FDG gyártó panelre helyezik, ahol a prekursor (vízmentes acetonitrilben oldott trifluormetánszulfonil- β -D-mannóz (TATM)) jelölése nukleofil szubsztitúcióval történik. A szubsztitúciós reakció 85 °C-on játszódik le. A reakció terméke a 1,3,4,6(TA-[¹⁸F]FDG) védő acetilcsoportokat tartalmaz, melyeket savas hidrolízissel távolítanak el, sósav felhasználásával. A hidrolízist zárt reakcióedényben magas hőmérsékleten (120 °C) és nagy nyomás alatt végzik. A folyamat végterméke, a 2-[¹⁸F]fluor- β -D-dezoxiglükóz, amelyet fiziológiás sóoldattal hígítanak a kívánt koncentrációra.

4.5.2. ^{52}Mn -DOTAGA-RAMEB szintézise.

100 μl 0,1 M HCl-oldatban lévő ^{52}Mn -t összekevertünk 2 M nátrium-acetát pufferrel (V=500 μl) azért, hogy beállítsuk a pH-t (7,0). Ezt követően a DOTAGA-RAMEB-et (c=3 mM, V=10 μl) a reakcióelegyhez adtuk egy reakcióüvegben, amelyet 10 percig 95°C-on történő melegítést követően szobahőmérsékletűre hűtöttünk.



9. ábra. A DOTAGA-RAMEB prekursor mangán-52-vel (^{52}Mn) történő radiojelzésének sematikus ábrázolása¹¹⁶

A formulázáshoz az oldatot ultraszűrő oszlopra Light C18 Sep-Pak Cartridge-re (Waters Kft. Budapest, Magyarország) vittük fel, majd 1 ml vízzel mostuk. A radioaktívan jelzett terméket (^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB, 9. ábra) 300 μl 96%-os EtOH-val eluáltuk. A teljes eluátumot 95°C-on nitrogénáramlattal közel szárazra pároltuk, majd izotóniás NaCl-oldatban újra feloldottuk.

Azonnali vékonyréteg-kromatográfiát (iTLC-SG, Varian) végeztünk 0,5 M nátrium-citrát oldatot, pH=5,5, mobilfázisként használva a radiojelzés sikerességének és hozamának meghatározásához. A formulázott termékből (^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB) 3 μl -t cseppentettünk az iTLC-SG csíkokra az aljától 2 cm-re, és az oldószerrel a csíkok aljától 10 cm-re engedjük felfutni. A radioaktívan jelölt RAMEB a felviteli ponton maradt, míg a szabad ^{52}Mn az oldószerfronttal együtt vándorolt. Az egyes sávok elemzése a MiniGITAA TLC készülék segítségével (Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt, Németország) történt. A radioaktívan jelzett terméket steril szűrés után izotóniás (0,9%-os) sóoldattal hígítottuk a biológiai kísérletek elvégzése előtt.

4.5.3. DOTA-NAPamid radiojelzése ⁶⁸Ga radionukliddal

A ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátort 5 ml 0,05 M u.p. HCl-lel eluáltuk, majd bemértünk 375 µl ⁶⁸Ga-oldatot (80-130 MBq) a legnagyobb aktivitású aliquotból, amelyet összekevertünk 120 µl NH₄OAc pufferrel (0,5 M, pH=4) és 5 µl DOTA-NAPamid törzsoldattal (1 mg/ml, 0,673 M) és a reakciót 15 percig 95 °C-on inkubáltuk. Az említett idő elteltével az oldatot átvittük egy előkondicionált (1 ml 96%-os EtOH, 5 ml H₂O; 1 ml 0,25 M, pH = 4 M NH₄OAc) Strata-X oszlopra, majd 1 ml vízzel mostuk. A puffer eltávolítása után 300 µl 96%-os EtOH-lal eluáltuk. Az oldószeret elpárologtattuk 95 °C-on nitrogénáramoltatás mellett. A száraz terméket 200 µl PBS-ben oldottuk. A termék RCP-jét radio-HPLC-vel határoztuk meg egy Waters Acquity BEH C18, 1,7 µm, 3 × 50 mm-es oszlopon. Eluensek: A = oxálsav (0,01 M, pH = 3), B = ACN:H₂O (9:1), áramlás: 0,9 ml/perc, gradiens: 0. perc: 100% A, 1. perc: 100% A, 2,5. perc: 100% B, 3. perc: 100% B, 3,1. perc: 100% A

4.5.4. DOTAGA-RAMEB radiojelzése ⁶⁸Ga izotóppal

A ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátorból kinyert 1 ml ⁶⁸Ga eluátumot nátrium-acetáttal puffereltük (1 M, 160 µl), hogy a megfelelő pH-értéket beállítsuk (pH = 4,3-4,5). Az így előkészített mintához hozzáadtuk a DOTAGA-RAMEB vizes oldatát (5 µl, 3 mM), majd a rendszert 95 °C-on tartottuk 10 percig és ezt követően egy Light C18 Sep-Pak oszlopra vittük fel, amit 2 ml vízzel mostunk. A ⁶⁸Ga jelölt terméket ([⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB) 96%-os EtOH/izotóniás NaCl oldat 1:2 arányú elegyével eluáltuk. A radiokémiai tisztaság meghatározása radiodetektorral kombinált RP-HPLC rendszerrel történt. A terméket 0,9%-os NaCl oldattal hígítottuk azért, hogy az etanol-tartalmat 10% alá csökkentsük, majd sterilre szűrés következett az állatkísérletek előtt.

4.5.5. [⁶⁴Cu]Cu-KFTG-NAPamid szintézise

A KFTG-NAPamide előállításához, HBTU-t (7 mg, 0,018 mmol) 1 ml vízmentes DMF-ben (dimetil-formamid), DIPEA-t (3 µL, 0,017 mmol) és *bis*(Boc)-KFTG-t (5 mg, 0,007 mmol) 1 ml vízmentes DMF-ben adtunk a védett rezinhez kötött NAPamidhoz (30 mg, 0,0045 mmol). Az így kapott keveréket 3 óras, szobahőmérsékleten történő rázatást követően mostuk vízmentes DMF-fel. Az anyag hidrolízise 1 ml 95 % TFA-val történt. A 6 óras rázatást követően a TFA-t eltávolítottuk és a visszamaradt nyers-terméket szemipreparatív RP-HPLC-vel

tisztítottuk, amihez Luna C18(2) 100 Å10 µm (250 × 10 mm) kolonnát használtunk 4 ml/min áramlási sebesség mellett. Az eluensek a következők voltak: A: 0,1% HCOOH, B: 95% acetonitril, gradiens: 0. perc: 100% A, 2. perc: 100% A, 32. perc: 100% B, 40. perc 100% B. A terméket az elválasztás 15. és 16. perce között gyűjtöttük. A liofilizálást követően fehér por formájában kaptuk meg a KFTG-NAPamidot (1,3 mg, 20 %-os kitermelés). A HRMS-ESI (electrospray ionization high-resolution mass spectrometry) mérés 728,9174 [M+H]²⁺ és 486,2832 [M+H]³⁺ mőtömegeket eredményezett, míg az ezekhez a részecskékhez tartozó számolt értékek: 728,9204 [M+H]²⁺ és 486,2829 [M+H]³⁺.

A ⁶¹Cu előállítására cink fóliával történt (Sigma Aldrich, 99,999%, 10x10x0,1 mm, 0,25 mm vastag), amelyet 15,5 MeV proton nyalábbal sugároztunk be (30 perc, 20 µA) egy GE PETtrace ciklotron segítségével. A kapott ⁶¹Cu aktivitás a Ga-tól történő megtisztítás után 250-330 MBq tartományba esett. A besugárzott cink lemezt 2 ml 7 M-os HNO₃-ban oldottuk, majd az erősen savanyú oldatot 5 ml ammonium-formiát oldattal kevertük össze (*c* = 2,5 M) azért, hogy a pH-értékét körülbelül 2-esre állítsuk. Az oldatot ezután CU rezin kolonnára vittük (6 x 9 mm). Miután a kolonnát 10 ml vízzel mostuk, a kolonnán marad aktivitást 0,5 mL 7 M HCl oldattal mostuk le és szárazra pároltuk. A kapott szilárd anyagot vagy 0,01 M HCl vagy HEPES pufferben oldottuk (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH = 7).

A jelölési kísérletek során úgy jártunk el, hogy 5 µl 1 mg/ml koncentrációjú KFTG-NAPamid oldatot adtunk körülbelül 100 MBq-nyi ⁶¹Cu izotóphoz 50 µl 1 M HEPES pufferben (pH = 7) és melegítettük az oldatot 95 °C-on 15 percig, zárt Eppendorf csőben. Ezt követően az oldatot 1 ml vízzel hígítottuk és egy Waters light C18 SPE kolonnára vittük. A vízzel történő mosást követően a jelölt konjugátumot 500 µL salin-etanol 1:1 oldószer keverékkel eluáltuk. Az oldatot ezután közel szárazra pároltuk és salin oldattal hígítottuk. Radiokémiai tisztaságot radio-TLC-s technikával ellenőriztük, ammonium-acetát – metanol 1:1 arányú elegyével. A minta moláris aktivitása 52-58 MBq/nmol-nak adódott.

4.5.6. ^{205/206}Bi és ²¹³Bi előállítása, majd DOTA-konjugált peptidek radiojelzése

^{205/206}Bi előállítására és tisztítására volt az első lépés. Természetes Pb-fóliát (99,995%-os, 0,9 x 0,9 cm-es, 0,25 mm) GE PETtrace ciklotronban 16 MeV-os protonnyalábbal bombáztunk (60 perc, 10 µA). A besugárzott Pb céltárgyat 7 M szuprapur HNO₃-ban (2 ml) feloldottuk, és bepároltuk 1 ml végtérfogatra, ahol Pb(NO₃)₂ kicsapódását figyeltük meg. A kapott oldatot, azért, hogy a szilárd fázistól elválasszuk, 10 ml ultratiszta vízzel kevertük, majd Millipore 0,22

µm-es szűrővel szűrtük. Ezután felvittük egy 150 mg TK 200 gyantával öntöltött oszlopra (előkondicionálva 1 ml 0,7 M s.p. HNO₃, 1 ml 7 M s.p. HNO₃ és 5 ml 0,7 M s.p. HNO₃). A oszlopot 5 ml 0,7 M s.p. HNO₃-mal mostuk, és a ^{205/206}Bi izotópokat 7 M s.p. HNO₃-mal eluáltuk 1 ml térfogatú frakciókban. A ^{205/206}Bi izotópokat (~30 MBq) tartalmazó frakciókat szárazra pároltuk, majd 200 µl 0,1 M u.p. HCl-ben oldottuk fel.

Actinum-225/Bizmut-213 (²²⁵Ac/²¹³Bi) generátor elúciója: a ²²⁵Ac/²¹³Bi generátort (180 MBq) az Institute for Transurán Elemek Intézete (Németország) (ITU) szállította. Az elúció előtt az oszlopot 0,01 M sósavval mostuk. Az elúció során 600 µl ²¹³Bi-ot nyertünk, 0,1 M nátrium-jodid / 0,1 M HCl keverék segítségével. Elúció után az oszlopot 0,01 M HCl-ben tároltuk.

A DOTA-konjugált peptidekből 1 mg/ml törzsoldatot készítettünk. Az *in vivo* vizsgálatok esetén 5 µL DOTA-NAPamid (3,4 nmol)/DOTA-HOLDamid (3,2 nmol), illetve 10 µL DOTA-MARSamid (5,6 nmol) és DOTA-FOLDamid (5,6 nmol) oldatokhoz 600 µl ²¹³Bi-t (96,01±17,49 MBq) és 135 µl 2 M TRIS puffert (0,34 M) és 50 µl 20%-os aszkorbinsavat (72 mM) adtunk (pH=8,7).

A *LogP*-értékek és a stabilitás meghatározásához 20 µL ^{205/206}Bi-t adtunk a radioaktívan jelölt peptidek nátrium-citrát pufferben lévő (pH 5,5, 30-35 µmol) törzsoldatának keverékéhez (pH=5,5, 30-35 µmol; 10,1 nmol DOTA-NAPamid, 9,6 nmol DOTA-HOLDamid, 8,4 nmol DOTA-MARSamid és -FOLDamid). A reakciókat 5 percig inkubáltuk 95 °C-on. Szobahőmérsékletre hűtve az elegyet 400 µl 1 M ammónium-acetátot (NH₄OAc; pH=4) adtunk hozzá, majd etanollal és vízzel előkondicionált szilárdfázisú extrakciós (SPE) oszlopon keresztül vezettük (Oasis HLB 1 cc (30 mg); Waters). Az oszlopot ezután 1 ml vízzel mostuk. A radiojelzett termék cseppenkénti elúcióját az oszlopról 200 µL etanollal végeztük. Ezt követően 60 °C-on szárazra pároltuk. A terméket feloldottuk 200 µl foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) az *in vivo* mérésekhez, illetve 30 µl PBS-ben a *LogP*-értékek és a stabilitás meghatározásához. A radiokémiai tisztaságot azonnali vékonyréteg-kromatográfiával határoztuk meg, szilikagéllel impregnált (iTLC-SG; Varian) radio-TLC segítségével, ahol 0,1 M nátrium-citrát oldatot (pH=5,5) használtunk mobilfázisként.

4.6. LogP értékek meghatározása

Radioizotóppal konjugált vegyületeink oktanol/PBS megoszlási hányadosát minden esetben meghatároztuk, amely a molekulák vízdékonyságára utalnak a szervezeten belüli pH-értéken vizsgálva (pH=7,4). A logP értéke a vizsgált, radioizotóppal jelölt vegyületek célszervezetben várható viselkedéséről, farmakokinetikai tulajdonságairól nyújtanak előzetes információt. A vizsgált anyaginkból minden esetben 10 µl-t kevertünk 1-oktanol (500 µl) és PBS (490 µl, pH 7,4) „elegyével” egy centrifugacsőben. Az elegyet ezután 20 percig kevertettük rázógép (Vortex) alkalmazásával, majd ezután 5 percig centrifugáltuk 20000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on, a két fázis teljes szétválásáig. A fázisokból 3 x 100 µl térfogatú részeket kémcsövekbe mértünk, majd meghatároztuk azok radioaktivitását Perkin Elmer Packard Cobra kalibrált gamma-számlálóval. A mérési eredményeket átlagolva kaptuk meg a LogP-értéket.

4.7. *In vivo* és *ex vivo* vizsgálatok

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (16/2020/DEMÁB) etikai jóváhagyásával végeztük. A tanulmánytervezés és az állatkísérletek összhangban voltak az ARRIVE irányelvvel¹¹⁷.

4.7.1. [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB PET vizsgálata B16-F10 melanoma tumoros egérmodellben

A PET-képkalkotó méréseket a Nukleáris Medicina Tanszék preklinikai laboratóriumának MiniPET-II szkennereivel végeztük (Debreceni Egyetem, Debrecen, Magyarország).

A képkalkotó protokollt a B16-F10 tumorral rendelkező egerek $6,90 \pm 1,19$ MBq [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB (i.v.) injekciójával kezdtük, amelyet 60 perccel az injekció beadása után PET-képkalkotás követett. Huszonnégy órával az első felvétel után, 20 perces PET-vizsgálatokat végeztünk valamennyi vizsgált egéren 80 perccel a $10,07 \pm 0,07$ MBq [⁶⁸Ga]Ga-DOTANAPamid intravénás beadása után. Egy nappal később $3,50 \pm 0,16$ MBq [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB-et adtunk be az egereknek, és az injekció beadása után 1 órával, 4 órával és 3 nappal 20 perces statikus PET-vizsgálatokat végeztünk. Az izoflurán-indukált anesztéziát minden képkalkotási időszak alatt fenntartottuk [3%-os izoflurán (Forane), AbbVie, Budapest, Magyarország; OGYI-T-1414/01].

4.7.2. [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálata B16-F10 melanoma tumor egérmodellben

A biodisztribúciós vizsgálatokhoz 30, 60, 90 és 240 perccel a $3,50 \pm 0,16$ MBq [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB iv. beadását követően egészséges kontroll egerekbe, feláldoztuk őket, és a főbb szerveket begyűjtöttük, hogy kalibrált gammaszámláló (PerkinElmer) segítségével meghatározzuk a radioaktivitásukat. A B16-F10 tumorok radioaktivitásának *ex vivo* méréséhez a tumoros egereknél ugyanezt az eljárást alkalmaztuk 60 perccel az injekció beadását követően.

4.7.3. [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid PET vizsgálata B16-F10 melanoma egérmodellben

Az *in vivo* képalkotó vizsgálatokhoz B16-F10 tumort hordozó egereket intravénásan $10,3 \pm 0,3$ MBq [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamiddel injektáltunk be az oldalsó farokvénán keresztül, és dinamikus PET-vizsgálatokat végeztünk, 1,5%-os izoflurán (Forane, AbbVie) altatásban (Tec3 Isoflurane Vaporizer, Eickemeyer Veterinary Equipment, Egyesült Királyság).

4.7.4. [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálata B16-F10 melanoma egérmodellben

8 ± 1 nappal a tumorsejtek beoltása után B16-F10 tumort hordozó egereknek $10,3 \pm 0,3$ MBq [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamidot adtunk be intravénásan, majd 30-, 60-, 90- és 180 perces inkubációs idő után az egereket 5%-os izofluránnal túlaltattuk. Szövetmintákat vettünk a kiválasztott szervekből, és a minták súlyát, valamint radioaktivitását kalibrált gammaszámlálóval (Hewlett Packard Cobra II Autogama Gamma Counter, USA) mértük.

4.7.5. [²¹³Bi]Bi-DOTA konjugált NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatai B16-F10 melanoma egérmodellben

Az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat 90 perccel a $3,81 \pm 0,32$ MBq [²¹³Bi]Bi-DOTA konjugált NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid intravénás beadása után végeztük el. Az eutanáziát 5%-os izofluránnal végeztük, majd szövetmintákat vettünk az egészséges kontroll és a B16-F10 tumorral rendelkező kísérleti állatokból. A különböző szervek radioaktivitását gamma-számlálóval (Packard, Cobra II) mértük, majd tömegegységre viszonyítva kiszámoltuk az értékeket. A radiofarmakon-felhalmozódásokat ezt követően %ID/g szövetben fejeztük ki.

4.8. Adatfeldolgozás

Minden PET-felvételt a BrainCad képelemző szoftverrel (verzió: 1.124) értékeltünk ki. A képrekonstrukciót követően a koronális képeken a tumorok és a főbb szövetek/szervek esetén gondosan meghatároztuk az érdeklődési területeket (ROI), és a ROI-kban lévő radioaktivitáskoncentrációkat, melyeket SUVmean és SUVmax értéként (g/ml) mutattunk be. A T/M SUVmean és T/M SUVmax értékeket a tumorok és a háttérben lévő izomszövet aktivitásából számítottuk.

A biodisztribúciós vizsgálatok esetén a szervek mért gammasugárzás értékeit rögzítettük, majd a bomláskorrigált radioaktivitáskoncentrációkat a beadott dózis százalékában fejeztük ki a szövet grammjára vetítve (% ID/g). Az adatokat átlag \pm standard eltérés (SD) formában adtuk meg.

A statisztikai elemzésekhez a MedCalc 18.5 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) szoftvercsomagot használtuk, és minden statisztikai adatot átlag \pm SD-ben adtuk meg. A statisztikai szignifikancia értékelésére Mann-Whitney U-tesztet, a kétoldali t-tesztet (kétmintás T-próba) és a kétirányú ANOVA-t alkalmaztuk, a 0,05-nél kisebb p-értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

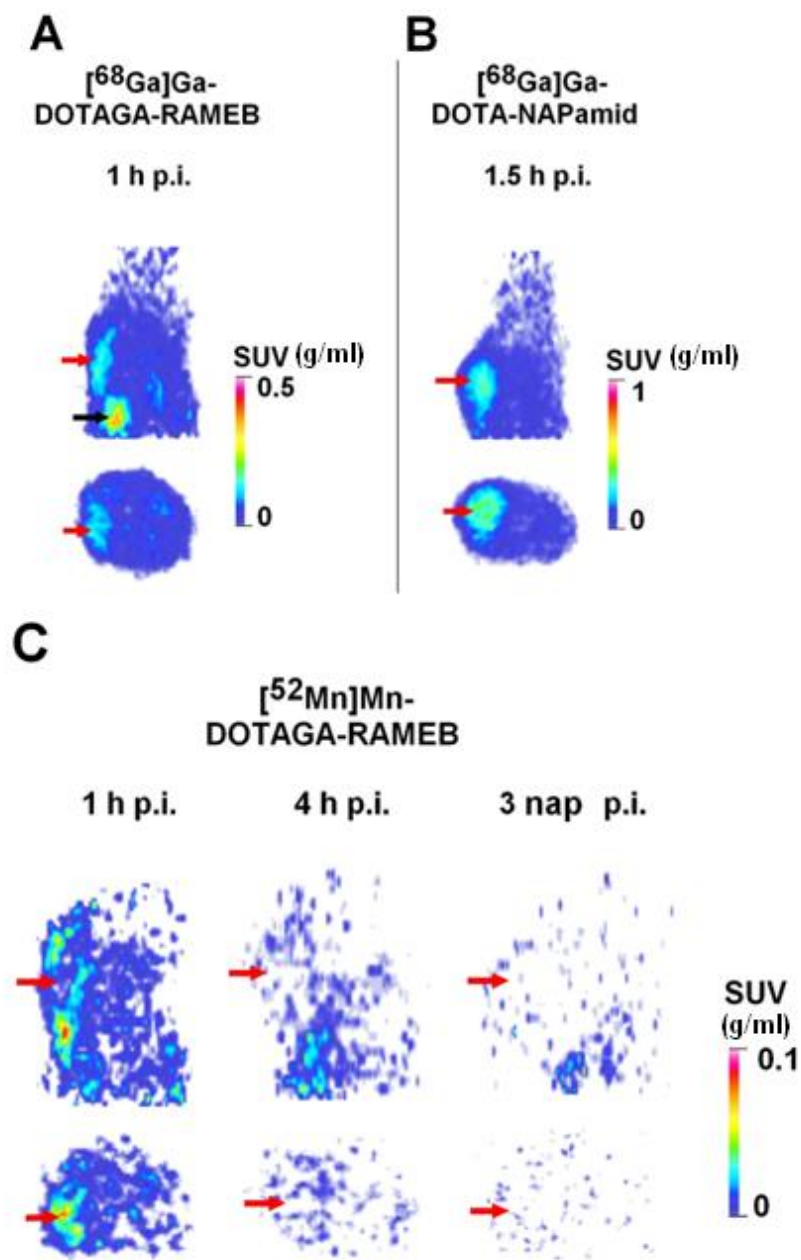
5. Eredmények

5.1. [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB tumorcélzó képességének vizsgálata PGE2 receptor pozitív B16-F10 melanoma egérmodellben

A 10. ábrán reprezentatív bomláskorrigált PET-felvételek láthatók, amelyek összehasonlításából megállapítható, hogy a B16-F10 melanoma tumorok azonosításában mindhárom radiotracer ([⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB, [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamide, és [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB) jól teljesített. Míg a tumorok a [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid beadása esetén voltak a legjobban azonosíthatóak, addig a ciklodextrin-származékok esetében kevésbé intenzív jelerősséget tapasztaltunk, különösen az ⁵²Mn-jelölt farmakon későbbi időpontokban történt PET felvételeinek elemzése során. A [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB beadása után 1 órával heterogén tumorfelvételi mintázatot észleltünk, míg a másik két radiofarmakon felhalmozódása homogén eloszlást mutatott a vizsgált tumorokban. Mint az összes radiofarmakon esetében, a vesében és a húgyhólyagban is jelentős nyomjelzőanyag-felhalmozódás volt megfigyelhető. A többi egészséges hasi és mellkasi szervet illetően nem észleltünk radioaktivitást.

A vizuális megfigyeléseket megerősítette a PET-adatok kvantitatív értékelése. Az MC1 R pozitív B16-F10 tumorokban a jelzőanyagok standardizált felvételi értékeit (SUV) és a tumor-izom (T/M) arányokat a 2. táblázat tartalmazza. A három radiofarmakont összehasonlítva az SUVmean- és SUVmax-értékek a NAPamid-származék esetében voltak a legmagasabbak (az SUVmean- és SUVmax értékek $0,37\pm 0,07$, illetve $0,56\pm 0,09$ voltak), amelyek szignifikánsan különböztek a két radionukliddal jelzett ciklodextrin molekula értékeitől ($p\leq 0,01$; 2. táblázat). A második legnagyobb jelerősséget a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB vizsgálata során tapasztaltuk (SUVmean: $0,16\pm 0,04$; SUVmax: $0,24\pm 0,05$), míg a [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB mutatta a legkisebb tumorban mérhető értéket.

A B16-F10 tumorok 1 órával a ⁵²Mn-ciklodextrin i.v. beadása után egyértelműen azonosíthatóak voltak (az SUVmean $0,6\pm 0,01$, SUVmax $0,09\pm 0,02$), azonban a későbbi időpontokban alig volt kimutatható aktivitás (4 óránál SUVmean $0,02\pm 0,01$, SUVmax $0,03\pm 0,01$, három napnál pedig SUVmean $0,01\pm 0,01$ és SUVmax $0,01\pm 0,01$).



10. ábra A melanokortin-1 receptor (MC1-R) pozitív B16-F10 melanoma tumorok *in vivo* értékelése $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTAGA-RAMEB (A panel), $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-NAPamid (B panel) és $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}$ -DOTAGA-RAMEB (C panel) pozitronemissziós tomográfias (PET) képalkotással. Reprezentatív bomláskorrigált koronális (felső sor) és transzaxiális (alsó sor) PET-felvételek mutatják a melanoma tumor felvételét a nyomjelzők intravénás beadása után. A piros nyilak a bőr alatt növekvő B16-F10 melanoma tumorokat jelzik. A fekete nyíl (A panel) a bal vesére mutat. p.i.: Injekció beadása után; SUV: standardizált felvételi érték (g/ml).

A kvantitatív PET-adatok szignifikáns különbségeket mutattak a két ciklodextrin radiotracer nyomjelző felvételének értékei ($p \leq 0,01$) és a különböző vizsgálati időpontokban mért ^{52}Mn -

jelzett vegyület tumorfelhalmozódása között ($p \leq 0,01$ és $p \leq 0,05$). A [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB tumorfelvételi értékeihez képest a három különböző időpontban (1 óra, 4 óra és 3 nap) a ^{68}Ga radionukliddal jelzett ciklodextrin molekula lényegesen nagyobb radioaktivitást mutatott a B16-F10 tumorokban ($p \leq 0,01$). Az [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB összes felvételi értékéhez képest (1 óra, 4 óra és 3 nap) a ^{68}Ga -jelölt ciklodextrin molekula lényegesen nagyobb radioaktivitást mutatott a B16-F10 tumorokban ($p \leq 0,01$). A [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB esetében az injekció beadása után 1 órával regisztrált SUVmean és SUVmax adatok jelentősen eltértek a 4 órás és 3 napos inkubációs idő után mért SUV-értékektől ($p \leq 0,01$). Habár a későbbi időpontok (4 óra és 3 nap) SUVmean értékei összehasonlíthatóak voltak ($p \leq 0,01$), alacsonyabb szignifikancia szinten ($p \leq 0,05$) jelentős különbséget rögzítettünk az SUVmax értékek között.

2. táblázat. A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB, [^{68}Ga]Ga-DOA-NAPamid és [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB in vivo kvantitatív PET-adatainak elemzése a szubkután növekvő B16-F10 tumorokban. A radiotracer-akkumulációt SUV-értékekben fejezzük ki. Az adatokat átlag \pm SD, n=3 egér/PET-farmakon/időpont. PET: Pozitronemissziós tomográfia; SUV (g/ml): standardizált felvételi érték; SD: standard eltérés; T/M: tumor-izom arány.

	[^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB	[^{68}Ga]Ga-DOA-NAPamid	[^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB		
	1 óra	1,5 óra	1 óra	4 óra	3 nap
SUVmean (g/ml)	0,16 \pm 0,04	0,37 \pm 0,07	0,06 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
SUVmax (g/ml)	0,24 \pm 0,05	0,56 \pm 0,09	0,09 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
T/M arány (SUVmean)	4,03 \pm 0,44	9,25 \pm 1,07	5,34 \pm 1,07	2,04 \pm 0,37	1,04 \pm 0,03
T/M arány (SUVmax)	4,11 \pm 0,35	9,30 \pm 1,24	4,51 \pm 1,20	1,50 \pm 0,24	1,02 \pm 0,02

Amint az a 2. táblázatban látható, a tumor/háttér (T/M) átlagos arányai szignifikánsan különböztek a [^{68}Ga]Ga-DOA-NAPamid és a radiojelzett ciklodextrin származékok között ($p \leq 0,01$), a maximális érték 9,3 \pm 1,24 volt az MC1-R-t célzó NAPamid esetében. A két ciklodextrin-alapú radiofarmakon átlagos tumor-háttér arányát összehasonlítva a ^{52}Mn -ciklodextrin esetében magasabb 1 órás átlagértéket mértünk (T/M SUVmean: 5,34 \pm 1,07), mint a ^{68}Ga -jelzettnél (T/M SUVmean: 4,03 \pm 0,44); ez azonban statisztikailag nem volt szignifikáns. Ezzel szemben az ^{52}Mn -vegyület 4 órás (T/M SUVmean: 2,04 \pm 0,37) és 3 napos (T/M

SUVmean: $1,04 \pm 0,03$) arányaihoz képest a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB esetében az értékek jelentősen megemelkedtek ($p \leq 0,01$).

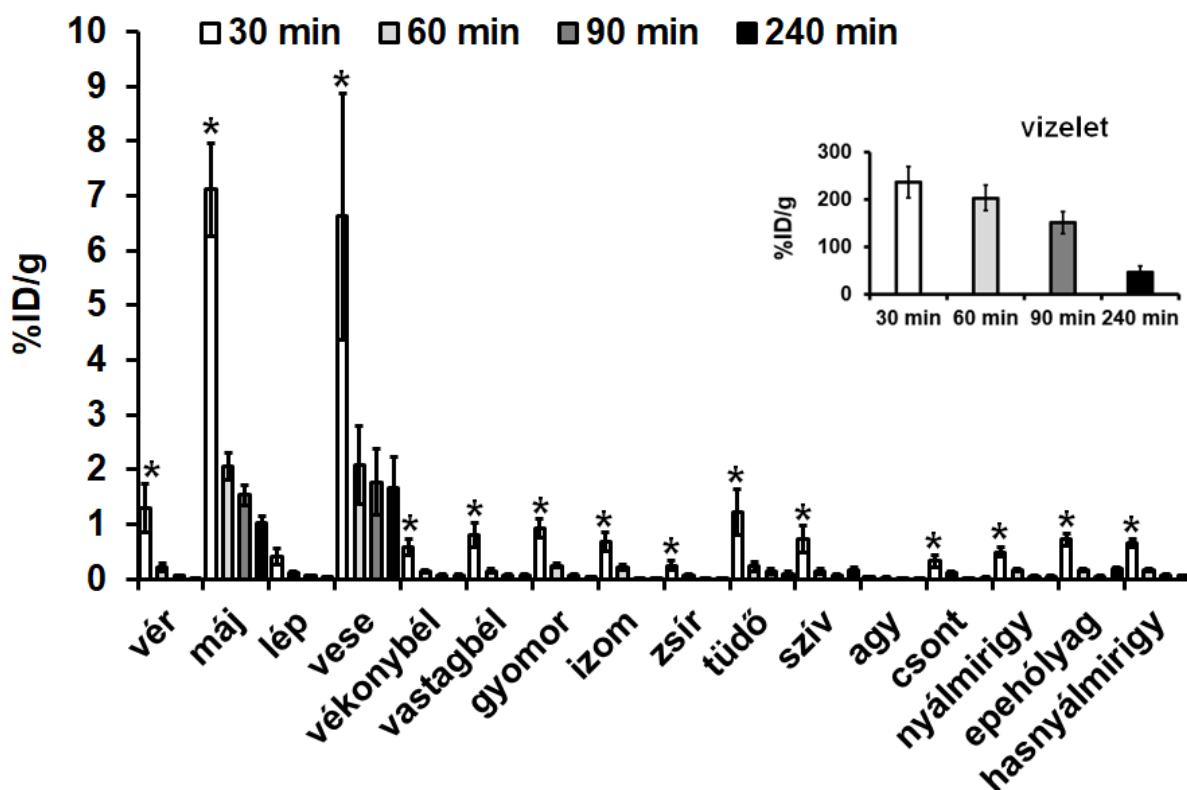
Az újonnan szintetizált [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB 1 órás átlagos T/M értékei $5,34 \pm 1,07$ -ig emelkedtek, majd 3 nappal az i.v. injekció beadása után $1,04 \pm 0,03$ -ra csökkentek. Bár ez jelentősen különbözött a későbbi képalkotási időpontokban mért tumor/izom arányoktól ($p \leq 0,01$; T/M SUVmean $2,04 \pm 0,37$ és $1,04 \pm 0,03$ 4 órával, illetve 3 nappal az injekció beadása után), szignifikáns különbséget csak a két későbbi időpont között észleltünk $p=0,05$ értéken.

Hasonló tendenciát találtunk a vizsgált nyomjelzők T/M SUVmax értékei esetében is, azonban a T/M SUVátlag adatokkal ellentétben az ^{52}Mn -ciklodextrin molekula a későbbi felvételi időpontokban is hasonló tumor-izom arány SUVmax értéket mutatott, mely nem mondható szignifikáns különbségnek ($p \leq 0,05$), (a 4 órás SUVmean és SUVmax $2,04 \pm 0,37$, illetve $1,50 \pm 0,24$ volt, a 3. nap SUVmean és SUVmax értékei pedig $1,04 \pm 0,03$ és $1,02 \pm 0,02$). A számított tumor-izom arányokat a 2. táblázat tartalmazza.

[^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB biodisztribúciós vizsgálatának eredményei a 11. ábrán és a 3. táblázatban láthatóak. A kontroll vizsgálatok során a legnagyobb jelzőanyag-felhalmozódást 30 perccel a beadást követően regisztráltuk minden szerv és szövet esetében. Bár a 30 perces *ex vivo* adatok szignifikánsan különböztek a többi vizsgálati időpont (60, 90 és 240 perc; $p \leq 0,01$) adataitól, a 60, 90 és 240 perccel a nyomjelző beadása után mért %ID/g értékek között nem találtunk jelentős különbségeket. Általánosságban elmondható, hogy a vizsgált egészséges szövetek/szervek radioaktivitás-koncentrációja az idő múlásával fokozatosan csökkent (11. ábra és 3. táblázat).

3. táblázat A [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB *ex vivo* biodisztribúciós adatai (%ID/g) egészséges kontroll egerekben (n=3 állat/időpont). A kivett szervek/szövetek aktivitását kalibrált gammaszámlálóval határoztuk meg 30, 60, 90 és 240 perccel a 3,50±0,16 MBq [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB intravénás beadása után. *Szignifikancia a 30 perces adatok és a három másik vizsgálati időpont között, p≤0,01. Az adatokat átlag±SD-ben adjuk meg. SD: szórás.

[⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB (%ID/g)				
	30 perc	60 perc	90 perc	240 perc
vér	1,30±0,44*	0,22±0,07	0,06±0,02	0,01±0,01
máj	7,12±0,85*	2,05±0,25	1,54±0,18	1,03±0,12
lép	0,42±0,14*	0,11±0,04	0,06±0,02	0,04±0,01
vese	6,62±2,25*	2,09±0,71	1,78±0,60	1,66±0,56
vékonybél	0,59±0,14*	0,14±0,03	0,07±0,02	0,07±0,02
vastagbél	0,80±0,22*	0,15±0,04	0,07±0,02	0,07±0,02
gyomor	0,93±0,17*	0,25±0,04	0,08±0,01	0,04±0,01
izom	0,68±0,16*	0,21±0,05	0,02±0,01	0,01±0,01
zsír	0,25±0,09*	0,07±0,02	0,02±0,01	0,02±0,01
tüdő	1,22±0,41*	0,23±0,08	0,14±0,05	0,10±0,03
szív	0,73±0,25*	0,15±0,05	0,07±0,03	0,16±0,05
agy	0,04±0,01*	0,03±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01
combcsont	0,33±0,11*	0,11±0,04	0,01±0,01	0,03±0,01
nyálmirigy	0,50±0,09*	0,16±0,03	0,05±0,01	0,05±0,01
húgyhólyag	0,73±0,11*	0,16±0,02	0,05±0,01	0,19±0,03
hasnyálmirigy	0,66±0,07*	0,17±0,02	0,08±0,02	0,06±0,01



11. ábra. Az $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOTAGA-RAMEB}$ időfüggő *ex vivo* biodisztribúciója egészséges kontroll egerekben. A 30 perces adatok és a három másik vizsgált időpont közötti szignifikancia szintje: $p \leq 0,01$ (*). A boncolást követően a radioaktivitás mintázatát vizsgáltuk 30, 60, 90 és 240 perccel a $3,50 \pm 0,16$ MBq $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOTAGA-RAMEB}$ intravénás beadása után ($n=3$ állat/időpont). A felvételi értékeket átlag $\%ID/g \pm SD$ -ben fejeztük ki.

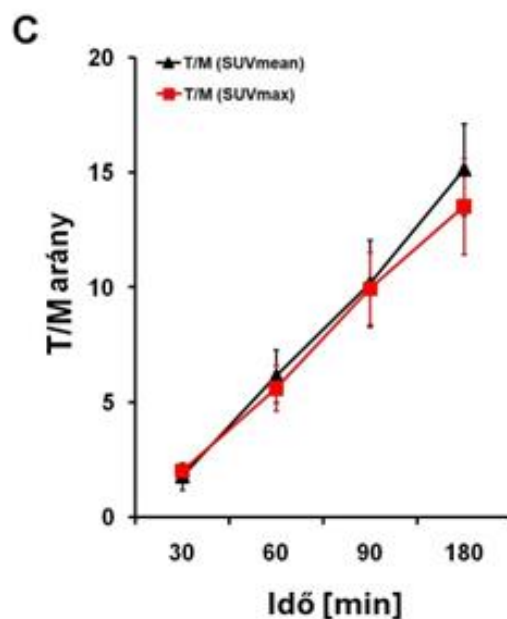
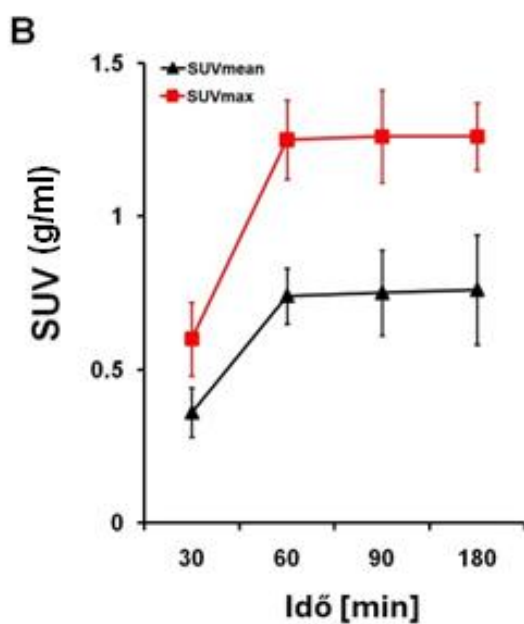
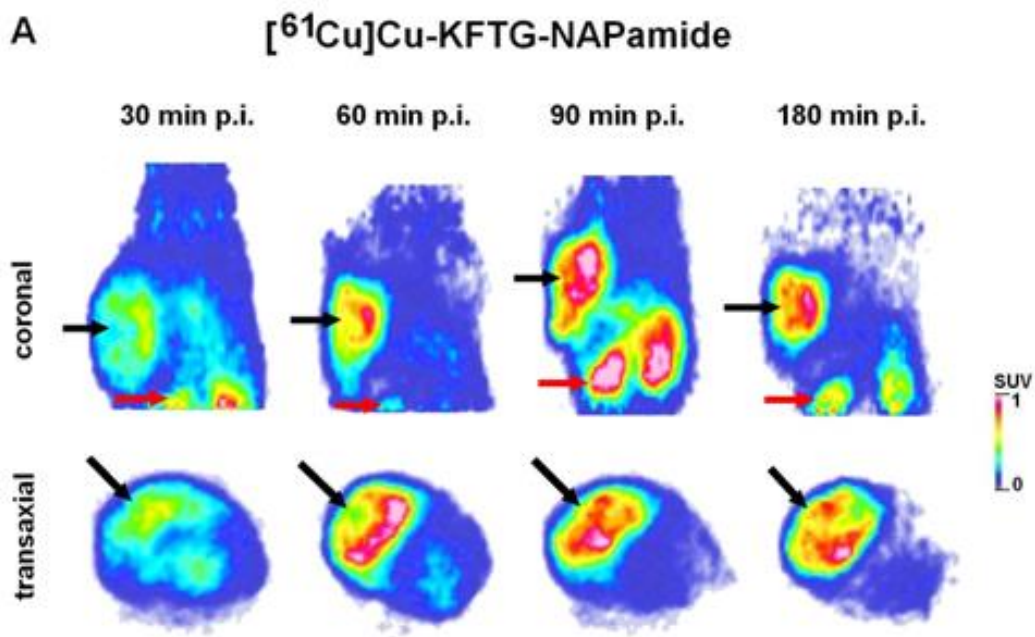
Az összes szerv közül a legmagasabb jelzőanyag-visszatartást a májban és a vesében mutattuk ki minden mérési ponton. A legmagasabb felvételi értékek a májban $7,12 \pm 0,85$, illetve a vesében $6,62 \pm 2,25$ $\%ID/g$ voltak 30 perccel a radioaktív jelzőanyag beadása után. A vér ($\%ID/g$: $1,30 \pm 0,44$) és a tüdő ($\%ID/g$: $1,22 \pm 0,41$) viszonylag magas 30 perces radioaktivitása a kísérlet végéig meredeken csökkent.

Az intratumorális $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOTAGA-RAMEB}$ felvétel *ex vivo* meghatározására a legmegfelelőbb időpontot az *in vivo* PET-elemzések alapján választottuk ki. Mivel mind a tumor SUV értékei, mind a tumor-háttér arány 60 perccel a radiotracer beadását követően volt a legmagasabb, a B16-F10 tumort hordozó egerekkel ugyanebben a vizsgálati időpontban végeztünk *ex vivo* méréseket. A máj és a vesék kivételével a tumorok esetében szignifikánsan magasabb $\%ID/g$ értékeket regisztráltunk ($0,82 \pm 0,09$) az összes vizsgált szervhez/szövethez képest ($p \leq 0,01$). Az *ex vivo* T/M arányok ($3,91 \pm 0,12$) hasonlóak voltak az *in vivo* adatokhoz.

5.2. [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid tumorcélzó képességének vizsgálati eredményei

A [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid tumorcélzó képességét a [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid *in vivo* preklinikai PET-képalkotással és *ex vivo* biodisztribúcióval vizsgáltuk MC1 receptor pozitív B16-F10 egér tumor modellben. A bomláskorrigált PET-képek minőségi elemzése után megállapítottuk, hogy a tumor minden vizsgált időpontban jól azonosítható volt (12. ábra „A”). A kvantitatív SUV-elemzés figyelemre méltó radiofarmakon felhalmozódást mutatott a radiotracer beadása utáni 30. percben (SUVmean: 0.4 ± 0.1 ; SUVmax: $0,6 \pm 0,1$), amely 60. percig növekedett (SUVmean: 0.7 ± 0.1 ; SUVmax: $1,3 \pm 0,1$), majd szignifikáns növekedést a következő időpontokban már nem tapasztaltunk: 90. perc (SUVmean: $0,8 \pm 0,1$; SUVmax: $1,3 \pm 0,2$) és 180. perc (SUVmean: $0,8 \pm 0,2$; SUVmax: $1,3 \pm 0,1$) (12. ábra „B”). A tumor-háttér (izom) arányban (T/M) a növekedés folyamatos volt az idő függvényében (12. ábra „C”, a kísérleti adatok a 4. táblázatban láthatók).

A korábban leírt jelentős MC1-R pozitivitás szerint a B16-F10 tumorok esetében, azt is megállapítottuk, hogy a szubkután transzplantált B16-F10 tumorok egyértelműen kimutathatóak voltak, kiváló képalkotási kontraszt és magas T/M arány mellett az MC1-R-specifikus [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid radiotracerrel. Ez a T/M arány magasabb, mint a korábbi α -MSH analógokkal ([⁶⁸Ga]Ga-CCZ01048¹¹⁸, illetve a ⁶⁴Cu-NOTA-GGNle-CycMSH_{hex}¹¹⁹) melanoma tumort hordozó egereken végzett, PET vizsgálatok eredményei mutattak. A %ID/g felvétel a tumorban alacsonyabb, mint amely értékeket az említett radiofarmakonok esetében megfigyeltek. Fontos azonban kiemelni, hogy az e radiofarmakonjelöltek közötti közvetlen összehasonlítás nem triviális, mivel építőelemeik és célpontjaik némileg eltérőek.



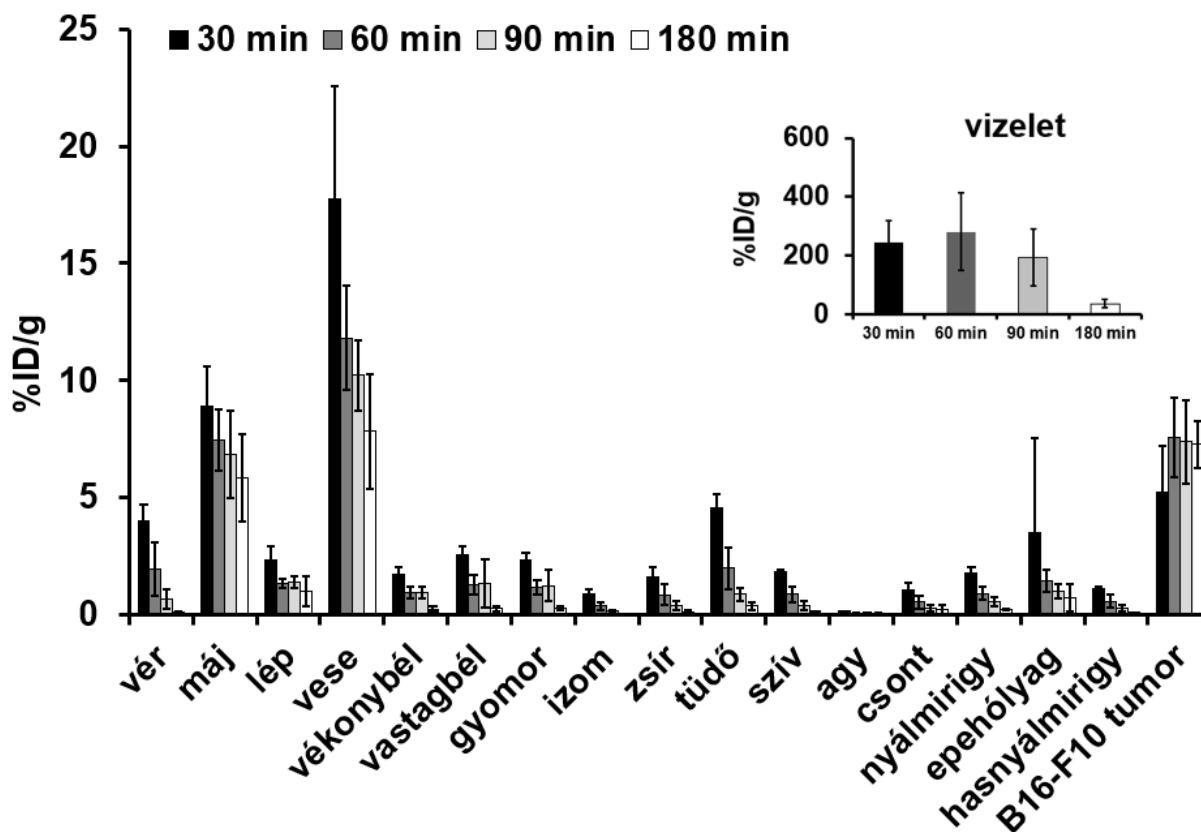
12. ábra. *In vivo* PET-képekalkotás és a melanomás daganatok kvantitatív képelemzése $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu}$ jelölésű KFTG-NAPamid radiotracerrel. Reprezentatív transzaxiális (A) PET-felvételek B16-F10 melanomás tumort hordozó C57BL/6J egerekről 30, 60, 90 és 180 perccel a $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ beadása után. A $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ kvantitatív felhalmozódásának elemzése a kísérleti melanomás daganatokban (B, C). A képeket és az adatokat 14 ± 1 nappal a tumorsejtek beoltása után nyertük. $n = 5$ állat/időpont. Fekete nyilak: B16-F10 tumorok, piros nyilak: vesék. SUV: standardizált felvételi érték. Az SUV-értékek átlag \pm SD-ben vannak feltüntetve. T/M:tumor-izom arány.

4. táblázat. A [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid *ex vivo* biodisztribúciós adatai. Az *ex vivo* biodisztribúciós adatok kvantitatív elemzése (n = 5 állat/időpont) 30, 60, 90 és 180 perccel a radiotracer intravénás beadása után. A %ID/g értékeket átlag ± SD-ben adjuk meg.

Tumor	[⁶¹ Cu]Cu-KFTG-NAPamid			
	30 min	60 min	90 min	180 min
B16-F10	5,2 ± 2,0	7,6 ± 1,7	7,4 ± 1,8	7,3 ± 1,0
B16-F10 T/M	6,1 ± 1,1**	22 ± 3**	52 ± 10**	315 ± 24**

A [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid biodisztribúciójának meghatározásához *ex vivo* vizsgálatokat is végeztünk (13. ábra). Az *ex vivo* %ID/g adatok kvantitatív elemzése után azt találtuk, hogy a [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid jelenléte egészséges szervekben/szövetekben az idő előrehaladtával folyamatosan csökkent. A logP-érték (logP = -1,99) alapján nem volt meglepő, hogy a vesék mutatták a legnagyobb radiotracer-halmozást, ami megerősíti, hogy a komplex az állatból főként a vizelettel ürül. Emellett, viszonylag magas májakkumuláció (kb. 6-9 %ID/g) is megfigyelhető volt, hasonlóan a Cheng és munkatársai által kapott eredményekhez, amikor is a ⁶⁴Cu-DOTA-NAPamide rendszert tanulmányozták. Az általuk kapott eredmények azt mutatták, hogy körülbelül 11%ID/g maximum értékkel halmozza mind a máj, mind a vese az adott radiofarmakont⁶⁴. Ennek a jelenségnek az lehet a magyarázata, hogy a májba kerülve radiotrészter a jelenlévő peptidázok hatására bomlik, így a ⁶¹Cu felszabadul. Az MC1-R pozitív B16-F10 tumorok *ex vivo* %ID/g adatai (13. ábra és 4. táblázat) jól korreláltak az *in vivo* SUV-mérések adataival.

A [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid, valamint a korábban vizsgált radioaktívan jelzett NAPamid származékok *in vivo* és *ex vivo* adatainak összehasonlítása során arra a következtetésre jutottunk, hogy a [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid körülbelül 3-5-ször magasabb felhalmozódást mutat a B16-F10 tumorokban, mint azt a ⁶⁸Ga- és ⁴⁴Sc-mal jelölt DOTA-NAPamid-származékok esetén tapasztalták⁸⁰. Ezen túlmenően, az *ex vivo* tumorfelvétel körülbelül 1,5-szer magasabb %ID/g értéket adott a [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamiddal elvégzett vizsgálatok során (60 perc %ID/g: 7.6 ± 1,7), mint azt a [⁶⁴Cu]Cu-DOTA-NAPamid esetén tapasztalták (60 perc %ID/g: 3,7 ± 0,3) (13. ábra).



13. ábra. A $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ *ex vivo* biodisztribúciós adatai. Az *ex vivo* biodisztribúciós adatok kvantitatív elemzése ($n = 3$ állat/időpont) 30, 60, 90 és 180 perccel a radiotracer intravénás beadása után. A %ID/g értékek átlag \pm SD értéként vannak feltüntetve.

Említést érdemel még, hogy megvizsgáltuk a $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ stabilitását is plazmában, annak kiderítésére, hogy i.v. injekciót követően a vérben található különböző komponensek indukálják-e a radiofarmakon bomlását. Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgálat 6 órás időablakában a $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ plazmastabilitása kiválóan mondható, hiszen ezen időtartam alatt a bomlás kevesebb mint 4%-os aktivitás csökkenést eredményezett.

5.3 ²¹³Bi-DOTA-NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid biodisztribúciós vizsgálatának eredményei MM egérmodellben

Az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat 90 perccel a vizsgált radioaktív anyagok iv. beadása után végeztük mind az egészséges kontroll, mind a B16-F10 tumort hordozó C57BL/6 egerek esetében is, hogy meghatározzuk a [²¹³Bi]Bi-DOTA-konjugált NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid molekulák szervezeten belüli eloszlását és tumorcélzó potenciálját. Az *ex vivo* adatok jelentős felhalmozódást mutattak ki a vesékben és a vizeletben valamennyi radiotracer esetében (a részletes értékek az 5. táblázatban találhatóak). A gyors veseürítés megerősítette a vizsgált radiogyógyszer hidrofil sajátosságát. A kísérletek során mérsékelt radiotracer-felhalmozódást mértünk a NAPamid, a HOLDamid és a MARSamid esetében a májban (NAPamid, HOLDamid, MARSamid: $1,03 \pm 0,23$, $0,30 \pm 0,05$, $1,51 \pm 0,17$) a tüdőben (NAPamid, HOLDamid, MARSamid: $0,25 \pm 0,09$, $0,13 \pm 0,06$, $0,71 \pm 0,11$), és a lépben. (NAPamid, HOLDamid, MARSamid: $0,51 \pm 0,26$, $0,10 \pm 0,03$, $0,36 \pm 0,08$) egyaránt.

Ezenkívül alacsony %ID/g felvételi értékeket tapasztaltunk az agyban, a szívben, a csontban, az izomban, a zsírszövetben és egyéb hasi szervekben a [²¹³Bi]Bi-DOTA konjugált NAPamid, HOLDamid és MARSamid esetében is, az 5. táblázatban feltüntetett adatok szerint. A [²¹³Bi]Bi-DOTA-FOLDamid *ex vivo* biodisztribúciós adatait elemezve, szignifikánsan ($p < 0,01$) magasabb felhalmozódást figyeltünk meg a vizsgált szervek többségében, összehasonlítva a három másik radiojelöléssel ellátott vegyülethez képest (lásd az 5. táblázatot). Ennek a pontos okát még nem állapítottuk meg. Feltételezzük, hogy ez a viselkedés a [²¹³Bi]Bi-DOTA-FOLDamid fiziko-kémiai tulajdonságaival és szerkezetével van összefüggésben.

A gyors vizeletkiválasztást akadályozhatja egy relatíve erős kölcsönhatás kialakulása a vérben található plazmafehérjékkel. A megemelkedett [²¹³Bi]Bi-DOTA-FOLDamid felhalmozódás a májban (%ID/g: $12,86 \pm 2,45$), a vékonybélben (%ID/g: $0,68 \pm 0,12$), a vastagbélben (%ID/g: $1,85 \pm 0,25$) és a gyomorban (%ID/g: $0,72 \pm 0,21$) egyértelműen a gyomor-bélrendszeren keresztül történő kiválasztásra utalnak. Bár a pontos mechanizmus a fokozott májfelvétel mögött még tisztázásra vár, a máj érrendszerének, valamint a metabolikus tényezőknek a lehetséges szerepe is feltételezhető. Egy másik hipotézis szerint a magasabb máj akkumulációt retikuloendothelialis (RES) májsejtek jelenléte okozhatja.

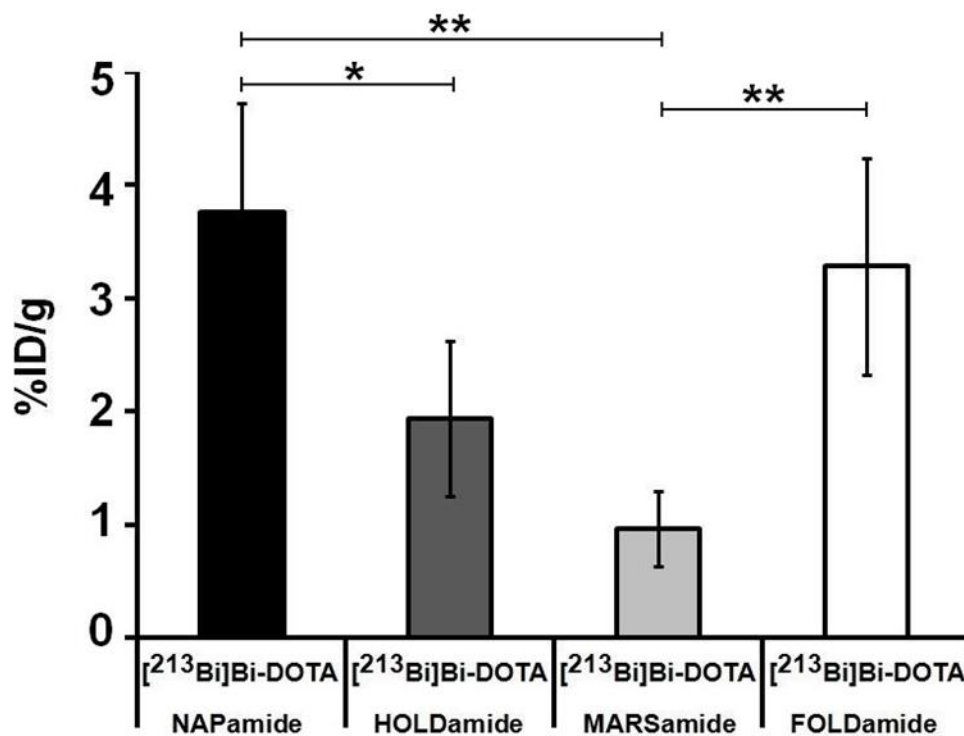
5. táblázat. [²¹³Bi]Bi-radiojelzett DOTA-NAPamid, HOLDamid, MARSamid és FOLDamid *ex vivo* biodisztribúciós adatai egészséges, kontroll egerekben 90 perccel a 4 MBq [²¹³Bi]Bi-DOTA konjugált MC1 receptorspecifikus α -MSH analóg radiofarmakonok beadása után. (%ID/g szövet átlag \pm SD-ben van megadva, n=5 állat/radiotracer, szignifikancia szint $p\leq 0,01$ (**). DOTA: 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraecetsav; MC1-R: melanocortin-1 receptor; α -MSH: alpha-melanocita stimuláló hormon; SD: szórás).

[²¹³Bi]Bi-	DOTA-NAPamid	DOTA-HOLDamid	DOTA-MARSamid	DOTA-FOLDamid
vér	0,17 \pm 0,02	0,10 \pm 0,03	0,23 \pm 0,02	1,41 \pm 0,08**
vizelet	27,00 \pm 9,90	13,46 \pm 2,04	15,23 \pm 3,25	12,26 \pm 2,07
máj	1,03 \pm 0,23	0,30 \pm 0,05	1,51 \pm 0,17	12,86 \pm 2,45**
lép	0,51 \pm 0,26	0,10 \pm 0,03	0,36 \pm 0,08	4,29 \pm 1,27**
vese	5,77 \pm 1,25	2,85 \pm 0,69	6,09 \pm 1,21	23,87 \pm 4,26**
vékonybél	0,10 \pm 0,01	0,12 \pm 0,10	0,15 \pm 0,04	0,68 \pm 0,12**
vastagbél	0,06 \pm 0,02	0,08 \pm 0,04	0,21 \pm 0,05	1,85 \pm 0,25**
gyomor	0,14 \pm 0,03	0,10 \pm 0,03	0,13 \pm 0,03	0,72 \pm 0,21**
izom	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,44 \pm 0,12**
zsír	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02
tüdő	0,25 \pm 0,09	0,13 \pm 0,06	0,71 \pm 0,11	3,11 \pm 0,19**
szív	0,08 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,14 \pm 0,03	0,91 \pm 0,12**
agy	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
csont	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,03	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01
nyálmirigy	0,17 \pm 0,08	0,09 \pm 0,05	0,10 \pm 0,02	0,20 \pm 0,08
epehólyag	0,27 \pm 0,01	0,03 \pm 0,06	0,12 \pm 0,03	0,95 \pm 0,17**
hasnyálmirigy	0,07 \pm 0,02	0,01 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	0,40 \pm 0,10**

Az *ex vivo* mérések kimutatták a [²¹³Bi]Bi-DOTA-FOLDamid viszonylag fokozott pulmonális felhalmozódását (%ID/g: 3,11 \pm 0,19). Hajdu és munkatársai szerint a markáns tüdő nyomjelzőanyag-akkumuláció a komplex hidrofilitása miatt következik be¹¹³, amelyet a ⁶⁸Ga-NODAGA-HPBCD (logP = -3,07) esetében is tapasztaltak.

Valamennyi jelölt vegyület esetében alacsony agyi felvételt tapasztaltunk (%ID/g: 0,01 \pm 0,01), ami feltételezésünk szerint a vér-agy gát akadályozó szerepének tudható be, vagyis a radiofarmakonok nem jutnak be az adott szervbe.

Az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok második részében, 14 ± 1 nappal a tumorindukció után, vizsgáltuk a $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA}$ radiotrészekek MC1-R specificitását. $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA}$ -val konjugált NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid trészek i.v. injektálása után 90 perccel végeztük a méréseket, a B16-F10 melanóma tumorral rendelkező egerek boncolása után. Ezen *ex vivo* kísérleti adatok alapján magas nyomjelző-felhalmozódást regisztráltunk a tumorban, a $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-NAPamid}$ és a $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-FOLDamid}$ esetén, $3,76 \pm 0,96$, illetve $3,28 \pm 0,95$ érték. A $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-HOLDamid}$ és a $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-MARSamid}$ esetében lényegesen alacsonyabb értékeket kapunk ($1,93 \pm 0,68$ és $0,96 \pm 0,33$; $p < 0,01$). Ezek az *ex vivo* biodisztribúciós adatok a 14. ábrán láthatóak. A elemzés adatai alapján a $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-NAPamid}$ és a $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-FOLDamid}$ magasabb kontrasztú képeket eredményeznek a másik két származékhoz képest.

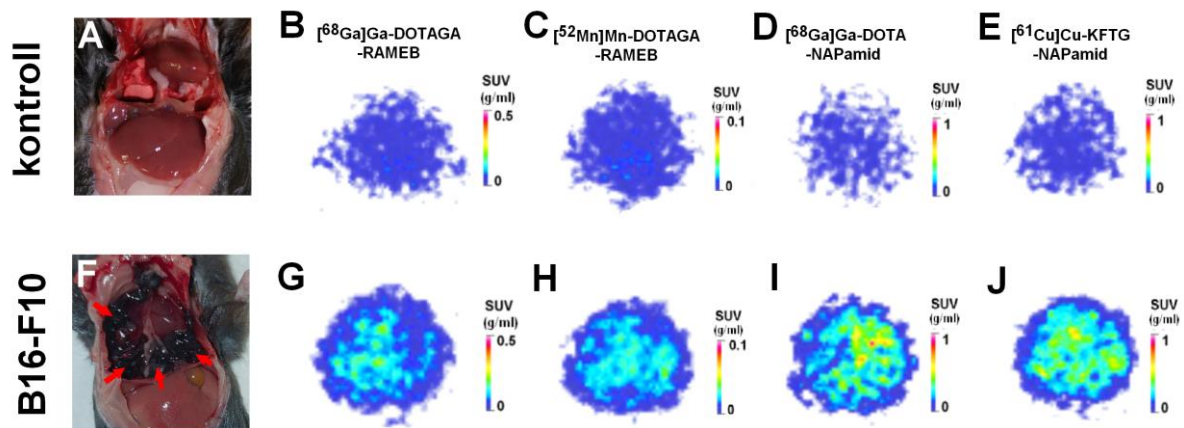


14. ábra. $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA}$ konjugált NAPamid, HOLDamid, MARSamid és FOLDamid *ex vivo* akkumulációja (ID/g%-ban kifejezve) B16-F10 tumorokban ($n = 5$ állat/radiofarmakon) 90 perccel az intravénás injektálás után. A kísérletet 14 ± 1 nappal a tumorsejtek beoltása után végeztük. %ID/g szöveti értékek: átlag \pm SD. $n = 5$ állat/radiogyógyszer. Szignifikancia szintek: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**). DOTA: 1,4,7,10-tetraazaciklododekán. 1,4,7,7,10-tetraecetsav; SD: standard eltérés.

Tekintettel arra, hogy a NAPamid a legjobb tumor felhalmozódás mellett viszonylag jelentéktelen hepatikus felvétellel bír (%ID/g: $1,03 \pm 0,23$), ami fokozott tumor-háttér arányhoz vezet, a ^{213}Bi -val kapcsolt NAPamid alkalmazása nagyobb felbontású képeket biztosítana. A korábbi eredmények szerint a vizsgált vegyületek közötti különbségek a receptorkötő képességből, kémiai, valamint farmakokinetikai tulajdonságaiból adódnak. Bár a mögötte álló pontos mechanizmus még nem tisztázott, a jövőbeni, vizsgálatok indokoltak ezen kérdés teljeskörű megválaszolásához. Feltételezzük, hogy a receptor kötőhelyeinek telítődése magyarázatot adhat a mérsékelt tumorfelvételre.

5.4. Mellkasi B16-F10 melanoma metasztázisok vizsgálata

Vizsgálataink utolsó részében a PGE2 specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB; illetve melanokortin-1-receptor (MC1-R) specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamid targetáló képességét vizsgáltuk mellkasi melanoma metasztázisokat hordozó egerekben (15. ábra). A bomláskorrigált PET felvételek alapján megállapítható, hogy az egészséges kontroll C57BL/6J egerek mellkasában patológiás halmozás nem volt felfedezhető (15. ábra, B-E); ezzel szemben a daganatos egerek mellkasában mind a négy vizsgált radiofarmakon kifejezett dúsulást mutatott (15. ábra, G-J). A kvalitatív elemzés alapján a melanokortin-1-receptor specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid (15. ábra, I) és [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamid (15. ábra, J) magasabb halmozódást eredményezett, mint a PGE2 specifikus radiojelzett RAMEB ciklodextrinek (15. ábra, G és H).



15. ábra. Reprezentatív transzaxiális bomláskorrigált PET felvételek egészséges kontroll (A-E) és intravénásan injektált B16-F10 mellkasi metasztázisokról (F-J) C57Bl6 egerekben [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB (B, G), [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB (C, H), [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid (D, I) és [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamid alkalmazásával 60 perces inkubációs időt követően. A 20 perces statikus PET felvételek 14 nappal a tumoros sejtek intravénás injektálása után készültek. Piros nyilak: mellkasi B16-F10 metasztázisok.

A PET képpalkotás adatait (SUV (g/ml)) elemezve a kvantitatív eredmények (6. táblázat) jól korreláltak a vizuális megfigyeléseinkkel, amely szerint a legmagasabb SUVmean és SUVmax értékeket a melanokortin-1-receptor specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamid mutatta a mellkasi B16-F10 metasztázisokban, míg a [^{68}Ga]Ga-

DOTAGA-RAMEB és [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB alacsonyabb felvételi értékeket eredményezett.

6. táblázat. Intravénásan injektált B16-F10 mellkasi metasztázisok *in vivo* kvantitatív SUV (g/ml) analízise C57Bl6 egerekben [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB, [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB, [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid alkalmazásával 60 perces inkubációs időt követően és 14 nappal a tumoros sejtek intravénás injektálása után. Átlag ± SD. n = 5 állat/radiofarmakon.

	SUVmean	SUVmax
[⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB	0,17±0,03	0,26±0,04
[⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB	0,10±0,03	0,14±0,05
[⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid	0,44±0,09	0,68±0,12
[⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid	0,40±0,07	0,62±0,11

7. táblázat. Intravénásan injektált B16-F10 mellkasi metasztázisok *ex vivo* kvantitatív (%ID/g) analízise C57Bl6 egerekben [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB, [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB, [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid alkalmazásával 60 perces inkubációs időt követően és 14 nappal a tumoros sejtek intravénás injektálása után. Átlag ± SD. n = 5 állat/radiofarmakon.

	%ID/g
[⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB	1,37±0,25
[⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB	0,86±0,11
[⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid	9,63±1,09
[⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid	10,21±1,34

In vivo vizsgálatainkat *ex vivo* biodisztribúciós mérésekkel is kiegészítettük, amelyek során a PET felvételeket követően az egereket túlaltattuk, a mellkasi áttéteket eltávolítottuk és az aktivitás-koncentrációjukat (%ID/g) kalibrált gamma-számlálóval meghatároztuk. A 7. táblázat %ID/g adatai szoros korrelációt mutattak az *in vivo* SUV adatokkal, alátámasztva azt, hogy a melanoma specifikus radiofarmakonok ([⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid) magasabb aktivitást mutatnak a B16-F10 mellkasi áttétekben.

5.5. Az elvégzett vizsgálatok korlátai, limitáció

A kísérleteink során kapott eredmények azt mutatták, hogy a [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB potenciális radiofarmakon alkalmas a rosszindulatú melanoma tumorok PET diagnosztikájára. Ugyanakkor az ágens gyors eliminációs kinetikája és vesefelvétele kizárhatja hosszabb folyamatok vizsgálatára történő alkalmazását.

A [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB vizsgálati eredményeinél a magas máj aktivitás korlátozza a melanoma metasztatikus lézióinak diagnosztikáját, azonban a radiotracer kémiai szerkezetének változtatásával, egy esetleges kelátor cserével befolyásolható lenne a LogP érték, mely a vesén keresztül történő kiválasztódást erősítené.

Korábbi eredményeink megerősítik azt a hipotézist, hogy a ⁶⁸Ga-val jelölt véletlenszerűen metilált béta-ciklodextrin (RAMEB) ([⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB) hatékonyan alkalmazható PGE2-pozitív B16F10 melanoma tumorok *in vivo* azonosítására. Ezen ígéretes kezdeti eredmények ellenére azonban a rövid élettartamú ⁶⁸Ga izotóp használata azzal a korlátozással jár, hogy az előállított radiofarmakonok nem alkalmasak hosszabb képalkotási időszakokra. Ezen hiányosságok kiküszöbölésére a hosszú élettartamú mangán-52 (⁵²Mn; $t_{1/2}=5,59$ nap, $\beta^+=242\text{KeV}$) tűnik megfelelő alternatív PET-radionuklidnak. A ⁵²Mn felezési ideje nemcsak a lassabb kinetikájú molekulák (pl. liposzómákkal komplexben lévő ciklodextrinek) *in vivo* monitorozását teszi lehetővé, hanem elegendő időt biztosít a távoli laboratóriumokba történő szállításhoz is. Ezenkívül a ⁵²Mn radioaktív szintézisével longitudinális vizsgálatok is elvégezhetők.

6. Megbeszélés

6.1. [⁵²Mn]Mn-DOATAGA-RAMEB

Tekintettel a melanomával összefüggő magas mortalitásra, a tumorszelektív radioaktív PET képalkotó radiogyógyszerek segítségével történő korai betegségdiagnosztika a jelenlegi kutatások előterében áll. Megfelelő fizikai tulajdonságai és hosszú biológiai felezési ideje miatt az ⁵²Mn a közelmúltban nagyobb figyelmet kapott a nukleáris medicina területén, mint potenciális izotóp az onkológiai képalkotó PET-radiogyógyszerek kifejlesztéséhez^{120,121}. Az 5,56 napos felezési idejével az izotóp megkönnyíti a hosszabb farmakokinetikájú rendszerekkel történő munkát, hosszabb felvételi időt tesz lehetővé¹²². A mai napig számos ⁵²Mn-jelzett PET-nyomjelzőt, köztük a [⁵²Mn]Mn-PyC3A, [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-bevacizumab vagy [⁵²Mn]Mn-BPPA-trastuzumab izotópot sikeresen alkalmaztak preklinikai vizsgálatokban^{48,123,124}. Ezért az új ⁵²Mn-jelzett RAMEB *in vivo* diagnosztikai képességét MC1-R pozitív melanoma modellekben vizsgáltuk, és összehasonlítottuk más, a melanoma PET-képalkotásban használt, jól bevált tumorspecifikus PET-radiogyógyszerekkel ([⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB).

A korábbi irodalmi eredményekkel összhangban a mi MC1-R pozitív B16-F10 melanomákban jelentős [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid felhalmozódást találtunk, amely megerősítette a vizsgált anyagunk receptorspecifikusságát és a radioaktív anyag magas diagnosztikus potenciálját MC1R pozitív melanoma képalkotásában^{48,58,64,80}. Korábbi PET/MRI-vizsgálatokban ugyanezekkel a preklinikai modellrendszerekkel a [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid MC1-R-szelektivitást és kiemelkedő tumorcélzó képességet mutatott^{48,80}. Ezenkívül a ⁶⁸Ga-tól eltérő radionuklidok, köztük a réz-64/61, a fluor-18, a bizmut-213 vagy a szkandium-44 is hasonlóan felhasználhatók az MC1-R-affin NAPamid vegyületek radiojelzésére, valamint a melanoma kimutatására. Hasonlóképpen, a bizmut-213-mal jelölt alternatív alfa-MSH-analógok (HOLDamid, FOLDamid, MARSamid) ígéretes vektorjelölteknek számítanak a malignus melanoma kezelésében.

A NAPamid-származék mellett az *in vivo* eredmények rámutattak arra, hogy mind a ⁶⁸Ga-, mind az ⁵²Mn-jelzett ciklodextrin molekulákkal egyértelműen körülhatárolhatók a sc. növekvő tumorok, ami bizonyítja a vizsgált radiotracerek potenciális alkalmazhatóságát a rosszindulatú melanoma *in vivo* PET-képalkotásában. Tekintettel a RAMEB PGE2-receptorokkal való komplexképzéshez, megfigyelésünk a vizsgált daganatok PGE2-pozitivitására is utalhat. Bár a B16-F10 tumorok teljes receptorprofilja még feltárássra vár, korábbi immunhisztokémiai

eredmények erős PGE2-pozitivitásról számoltak be az ilyen tumortípusok esetében⁴³. Ezen túlmenően Kim és munkatársai B16-F10 sejtekkel kapcsolatos eredményei, amelyek szerint a timosaponin AIII alkalmazásával összefüggésben csökkent PGE2- és EP-receptor-szintet jeleztek, mely adatok szintén a PGE2 és receptorainak jelenlétére utalnak a melanoma tumorsejteken¹²⁵. Bár a vizsgált melanóma PGE2-expressziója összefüggést sugallhat a radioaktívan jelzett ciklodextrinek felhalmozódásával, további kutatásokra van szükség a radiotracer felvétel és a melanómasejtek receptor-expressziója közötti kapcsolat feltárásához.

A jelen eredményekkel összhangban Szabó és munkatársai szintén jelentős tumorfelvételt mutattak ki ⁶⁸Ga-jelzett ciklodextrin-származékok ([⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB és [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD) esetében egy kísérleti melanoma-modellen végzett proof-of-concept vizsgálatban⁴³. Az ⁵²Mn-jelzett RAMEB és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB hasonló felhalmozódása a B16-F10 tumorokban, amelyet 1 órával a radiofarmakonok i.v. beadása után mértek, azt jelzi, hogy a radionuklid típusa nem befolyásolja a ciklodextrinek tumor-célzó képességét ([⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB: 0,06±0,01 és 0,09±0,02 az SUV_{mean} és SUV_{max}; [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB SUV_{mean}: 0,06±0,02 és SUV_{max}: 0,10±0,03).

Mindazonáltal a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB felvételeknél szignifikánsan magasabb tumorfelvételt regisztráltunk (SUV_{mean}: 0,16±0,04; SUV_{max}: 0,24±0,05) a NODAGA-kelátorral kapcsolt radiotracer vizsgálata során készített PET-felvételekhez képest ([⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB SUV_{mean}: 0,06±0,02; SUV_{max}: 0,10±0,03); ami valószínűleg a szerkezeti eltéréseknek vagy az alkalmazott kelátorok (NODAGA vs. DOTAGA) eltérő stabilitásának tulajdonítható. Az SUV-értékek közötti különbségek ellenére arra következtethetünk, hogy a linker cseréje (NODAGA a DOTAGA-ra) nincs érdemi hatással a ciklodextrin alapú nyomjelzők tumorcélzására.

Feltételezzük, hogy a későbbi felvételi időpontokban tapasztalt szignifikánsan alacsonyabb [⁵²Mn]Mn-DOATAGA-RAMEB felhalmozódás a tumorsejtek felszíni receptorainak a tumor növekedése és fejlődése során bekövetkező időbeli változásával függhet össze (0,02±0,01 és 0,03±0,01 SUV_{mean} és SUV_{max} 4 óra, illetve 0,01±0,01 és 0,01±0,01 és SUV_{max}, 3 nap). A PGE2/EP2-expresszió változásai, a tumor környezetében kialakuló hipoxia és a krónikus gyulladás magyarázhatja az ⁵²Mn-jelzett vegyületek felvételi kinetikáját.

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy az ⁵²Mn-ciklodextrinnel végzett képalkotás képes ábrázolni az EP-receptorok számában és a PGE2-koncentrációban a tumor mikrokörnyezetében bekövetkező változásokat. A tumorról kapcsolatos biomarkerek (receptorok, oldható molekulák) alaposabb vizsgálata hosszú távon új célpontok feltárásához vezethet mind a diagnosztikai, mind a terápiás alkalmazások számára. Ezen kívül a hipoxia és a nekrozis,

különösen a központi régiókban, felelős lehet a [⁵²Mn]Mn-DOATAGA-RAMEB heterogén eloszlásáért. Még ha a [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB aktivitása minden vizsgált időpontban jelentősen csökkent is a ⁶⁸Ga-jelzett megfelelőjéhez képest, az ⁵²Mn-jelölésnek lehetnek bizonyos előnyei a ⁶⁸Ga-cal szemben. A hosszabb detektálási időt lehetővé tevő, hosszú élettartamú ⁵²Mn lehetővé teheti a tumorról kapcsolatos lassabb patofiziológiai folyamatok vizsgálatát, valamint a korai időpontban készült felvételeken esetleg nem látható elváltozások jobb azonosítását. Mivel az [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB gyors eliminációs kinetikája és kiemelkedő vesefelvétel kizárhatja e nyomjelző ilyen célokra való felhasználását, farmakokinetikájának javítása - például albuminkötő rész beépítésével - segíthet meghosszabbítani biológiai élettartamát és ezáltal tumorban való hosszabb idejű felhalmozódását. Ezen kívül az [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB ígéretes az MC1 R-t nem kifejező melanómás daganatok PET-alapú vizualizációjában.

Amint korábban említettük, a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és az [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB nyomjelző felvételének mértéke között megfigyelt eltérések (10. ábra) részben a PGE2-koncentráció változásának és a PGE2-receptorok jelenlétének is tulajdoníthatóak a tumor mikrokörnyezetében. Megjegyzendő, hogy a két molekula PGE2-kötési affinitása közötti különbségekkel is foglalkozni kell. Annak ellenére, hogy mind az MC1-R célzott NAPamid, mind a PGE2-szelektív ciklodextrinek alkalmazhatóak lehetnek a melanoma képződésére, a felvételi értékek alapján a NAPamid molekula jobbnak tűnik. A melanómás daganatokban az EP2-hez képest erősebb MC1-R jelenlét magyarázhatja a [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid fokozott aktivitását. Emellett a NAPamid-alapú nyomjelző hosszabb tumorretenciója hozzájárulhat az alfa-MSH analóg jelentősebb felvételéhez.

Az *in vivo* PET-eredményekkel összhangban az [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB gyors veseürülését az injekció beadása után 30 perccel vérben detektált alacsony aktivitás, a jelentős vesefelvétel és a hólyagban lévő jelentős radioaktivitás bizonyítja. A mi eredményeinkhez hasonlóan a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB, a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB⁴⁰ és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD¹¹³ biodisztribúciós adatai is a vizelettel történő eliminációt mutatták. A viszonylag magas hepatikus felvétel alapján feltételezzük a gasztrointesztinális rendszer lehetséges szerepét a nyomjelző kiválasztásában is, azonban a jövőbeni vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy erre a megfigyelésre meggyőző magyarázatot adjunk. A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD (0,99±0,13 %ID/g) korábbi adatainak megfelelően viszonylag magas visszatartást találtunk a tüdőben a korai időpontokban (1,22±0,41 %ID/g). Bár a pontos okot még nem sikerült teljesen feltárni, Hajdu és munkatársai hipotézise alapján a [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB hosszan tartó felhalmozódása a vízzel telt tüdőterületeken akadályozhatja

a nyomjelző visszatérését a szisztémás keringésbe, ami a felvételi értékek növekedéséhez vezet. Összhangban a többi radioaktívan jelölt RAMEB-molekulával ($[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTAGA-RAMEB}$) kapott eredményekkel, a többi vizsgált szerv/szövet viszonylag alacsony nyomjelzőanyag-akkumulációt mutatott⁴⁰.

Az *in vivo* PET-adatokkal összhangban az $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOTAGA-RAMEB}$ emelkedett tumorfelvétele tovább igazolta a farmakon tumorcélzó képességét, valamint a PGE2- és EP-receptorok lehetséges jelenlétét a tumor mikro környezetében. A B16-F10 tumorok *ex vivo* biodisztribúcióját értékelve Szabó és munkatársai szintén jelentős felhalmozódást detektáltak a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-HP}\beta\text{CD}$ és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ esetében, ami hasonló volt a mi eredményeinkhez. Mindazonáltal a kísérletükben tapasztalt ($0,82\pm 0,09$ %ID/g) jelentősen alacsonyabb RAMEB-retenció ($0,32\pm 0,10$ %ID/g) feltehetően annak tulajdonítható, hogy az *ex vivo* felvételi méréseket különböző időpontokban végezték. Míg mi 60 perces *ex vivo* adatokat értékeltünk, addig Szabó és munkatársai 90 perccel a radiotracer iv. beadása után detektálták eredményeiket, és feltételezzük, hogy a 60 és 90 perc közötti jelentős nyomjelző kimosódás magyarázhatja a nyomjelző koncentrációk között megfigyelt különbségeket. A $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOTAGA-RAMEB}$ magas tumorfelhalmozódása, elhanyagolható háttéraktivitás mellett (a vesék és a máj kivételével) optimális tumor-háttér arányt eredményezett, ami a kép kiértékelése szempontjából döntő jelentőségű. Mindazonáltal a vese- vagy máj malignitások azonosítását akadályozhatja a megfelelő szervek fiziológiásan magas felvétele. Összességében az *ex vivo* adatok is megerősítették az ^{52}Mn -jelzett RAMEB tumorspecifikusságát a melanoma képképzésében. Bár úttörő eredményeink biztatóak lehetnek, a farmakokinetikai optimalizálásra összpontosító vizsgálatokra van szükség.

A fentieket figyelembe véve kimutattuk a ^{52}Mn -vel jelölt, újonnan szintetizált ciklodextrin PET képképző molekula diagnosztikai alkalmazásának megvalósíthatóságát kísérleti melanoma tumorok felhasználásával. Mivel a ^{68}Ga - és az ^{52}Mn -jelölt ciklodextrin PET nyomjelzők ígéretes radiotracerek a melanoma kimutatására, további, más radionuklidokkal jelölt ciklodextrin alapú radiojelzett vegyületeket kell létrehozni és értékelni.

6.2. [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid biológiai viselkedésének értékelése

[⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamiddel (az első ⁶¹Cu alapú radiofarmakon ezen az alkalmazási területen) végzett kísérleteink alapján, megállapítható, hogy ez a radiofarmakon kiváló képességekkel rendelkezik a rosszindulatú melanoma tumorok nem-invazív PET diagnosztikájában. Az alap komplex ([Cu(KFTG)]⁺) gyors képződése, nagy inertsége és mérsékelt SOD-aktivitása már önmagában is előrevetítette annak alkalmazhatóságát *in vivo* körülmények között, amit csak javított a NAPamid ismert affinitása a melanoma tumorokhoz.

A biológiai vizsgálatok előtt, annak érdekében, hogy információt szerezzünk a [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid plazma-stabilitásáról, a hatóanyag dekelációját vizsgálták humán plazmában. A vizsgálat 6 órás időtartama alatt kevesebb, mint 4 %-os aktivitásvesztést tudtunk detektálni, ami figyelembe véve a kapott diagnosztikai eredményeket kiválónak mondható.

Az *in vivo* és *ex vivo* eredményekből arra lehet következtetni, hogy a [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid radiotracer az MC1-R pozitív kísérleti melanomás daganatokhoz nagy affinitással kötődik, amit az SUV és a %ID/gértékek is alátámasztanak. Emellett a háttérből való gyors elimináció és a vesén keresztüli kiválasztás révén a [⁶¹Cu]Cu-KFTG-NAPamid kiváló képkontrasztot biztosít, ami jelentősen megkönnyíti a PET képek kiértékelését, így az MC1-R pozitív tumorok azonosítását is.

6.3. [²¹³Bi]Bi-DOTA-konjugált amidszármazékok vizsgálati eredményeinek értékelése

A korábbi kutatási eredmények egyértelműen alátámasztották a radioaktívan jelzett α -MSH analógok nagyobb arányú *in vivo* felvételét B16-F10 melanomában az A375 tumorokhoz képest, amelyek alacsony MC1-R expresszióval jellemezhetőek^{58,80}. Tafreshi és munkatársai az MC1-R receptort expresszáló MM-szelektív optikai diagnosztikumokat fejlesztettek ki fluoreszcens MC1-R-affin peptidomimetikus ligandum, az MC1RL-800 előállításával¹²⁶. A *in vivo* tumorspecifikusságának felmérésére i.v. beadását követően A375 és A375/MC1R tumoros egerekbe, fluoreszcens képalkotást végeztek. A receptor-pozitív tumorok szignifikánsan megnövekedett felvételi értékei alapján az alacsony számú receptort hordozó tumor felvételi értékéhez képest ($p < 0,05$), Tafreshi és munkatársai bizonyították MC1-R-nek a diagnosztikai célpont értékét.

A Nagy és munkatársai által végzett vizsgálatban az MC1-R specifikus, ⁴⁴Sc-gyel és ⁶⁸Ga-cal jelölt DOTA-konjugált NAPamid kötődési potenciálját *in vitro* és *in vivo* is igazolták, MC1-

R pozitív A375 melanoma sejtvonalakban, valamint B16-F10 tumoros C57BL/6 J egerek és A375 tumort hordozó CB17 SCID egerekben⁸⁰. Az *in vitro* eredmények alapján – igazolták az MC1-R overexpressziót - mind a ⁶⁸Ga-, mind a ⁴⁴Sc-jelzett NAPamid felvételét a B16-F10 sejtekben, ami meghaladta az A375 sejtekét ($p < 0,01$).

Vizsgálataik részeként a [⁴⁴Sc]Sc-DOTA-NAPamid megemelkedett felvételét [⁴⁴Sc]Sc-DOTA-NAPamid és a [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-NAPamid s.c. fejlődő MC1-receptor pozitív B16-F10 tumorok kiemelkedő PET-képkontrasztot biztosítottak. A transzlációs adatok azonban megnövekedett tumor standardizált felvételi értékeket és T/M arányt mutattak a [⁴⁴Sc]Sc-DOTA-jelzett származék alkalmazása esetén, ami megerősítette annak alkalmazhatóságát melanoma kimutatására. Az *in vivo* és *ex vivo* eredményekkel összhangban, az összes vizsgált anyag fokozott renális felhalmozódása a mi vizsgálatunkban is megfigyelhető volt. Hasonló módon a korábbi ⁴⁴Sc és a ⁶⁸GaDOTA-NAPamiddal végzett kísérletek csekély radioaktivitásról számoltak be a mellkasban és szinte valamennyi hasi szervben⁸⁰. Azonban emelkedett ²¹³Bi-HOLDamid-felhalmozódást regisztráltunk a belekben, a gyomorban és a májban, ami megfelelt a korábbi ¹⁸F-kötésű NAPamid-származékokkal végzett vizsgálatok eredményeivel⁵⁸.

Bár a jelen kísérletsorozatban nem vizsgáltuk az idő vagy a peptidok mennyiségének hatását a biodisztribúcióra, a jelenlegi szakirodalmi adatok alapján néhány szempontot érdemes megemlíteni^{88,118}. A peptidok szerkezete, illetve hossza esetleg befolyásolhatja a vizsgált peptidok *ex vivo* nyomjelzőanyag-felvételi profilját. Például egy peptid rövidebb szekvenciájú megfelelője fokozott eliminációval ürülhet a célszervekből és -szövetekből. Ez a gyors kiürülés alacsony háttéraktivitáshoz és így magasabb tumor-háttér arányhoz vezethet, amely nagyban megkönnyíti a PET felvételek vizuális értékelhetőségét. A rövidebb molekulák csak azt az aminosav-motívumot tartalmazhatják, amely a receptorhoz való kötődésért és a tumorcélzásért felelős, mivel a nem specifikus peptidszegmensek hiánya valószínűleg csökkentheti a nem specifikus kötődést. Ezen kívül, a más időpontokban elvégzett *ex vivo* mérések további információt szolgáltatnának az érintett nyomjelzők farmakokinetikájáról. Ezért a vizsgált radiokomplexek felvételi kinetikájának jobb megértése érdekében, több, a kémiai szerkezetre is összpontosító, vagyis kiterjedtebb vizsgálatokat kell végezni. Eredményeink alapján megfigyeltük, hogy a B16-F10 MM-ák minden vizsgált radiotracerrel egyértelműen azonosíthatóak voltak. A vizsgált anyagok specifikus tumorfelhalmozódása ²¹³Bi-jelölt amid-származékok esetén azt jelzi, hogy ezek a vegyületek nagy affinitást mutatnak az MC1-R-t expresszáló melanomához. Ezért ezek az újonnan szintetizált tumor-célzó radiotracerok kiválóak MC1-R pozitív malignus daganatok *in vivo* diagnosztikájában. A ²¹³Bi-jelölt alfa-

sugárzó molekulák alkalmasak lehetnek a MM célzott radionuklid-kezelésében. Az alfa-emissziós, receptor-irányított amidszármazékok integrálása a standard humán protokollokba, hozzájárulhatna a személyre szabott MM-kezeléshez.

6.4. Mellkasi B16-F10 melanoma metasztázisok vizsgálata

Megvizsgáltuk a PGE2 specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB; illetve a melanokortin-1-receptor (MC1-R) specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamid targetáló képességét mellkasi melanoma metasztázisokat hordozó egerekben.

Eredményeink azt mutatták - a vártak megfelelően -, hogy a primer tumorokhoz hasonlóan a metasztázisokban is jelentős dúsulást mutatnak az általunk vizsgált radiofarmakonok. Egyértelműen megállapítható volt, hogy a B16-F10 melanoma sejtek ismertén magas MC1-R expressziójának megfelelően a [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamid mutatott kiemelkedően magasabb aktivitást, mint a radiojelzett RAMEB ciklodextrinek. Ezt a magas receptor expressziót igazolták Cheng és munkatársai által már 2007-ben publikált *in vitro* sejtes és *in vivo* vizsgálatok is, amelyekben radionukliddal jelzett α -MSH analógok nagyfokú dúsulását mutatták a B16-F10 tumorokban⁵⁸. Feltételezéseink szerint a RAMEB által targetált PGE2 molekula és receptorai a metasztázisokban – akárcsak a primer tumorokban – bár jelen vannak, és autokrin módon termelődnek és hatnak, azonban az MC1-R receptor expressziójához képest kisebb mennyiségben találhatók meg a tumorban. Ezzel magyarázható az alacsonyabb [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB akkumuláció. Véleményünk szerint, mivel a PGE2 szintézisében szerepet játszó enzimek mennyisége a tumor növekedésével változik, és a PGE2 receptorok expresszióját befolyásolják intratumorális gyulladások, a hipoxia és az angiogenezissel összefüggő folyamatok, így feltételezhető az is, hogy igen jelentős különbségeket mérhetünk a RAMEB-alapú radiofarmakon akkumulációt tekintve egy azonos kísérleti állat azonos tumora esetén két egymást követő napon³². Mindezek mellett megállapítható, hogy a PGE2 specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB; illetve az MC1-R specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamid radiofarmakonok alkalmasak a B16-F10 mellkasi metasztázisok kimutatására.

6.5. Új tudományos eredmények

- Sikeresen előállítottunk két a melanoma malignum diagnosztikájában alkalmazható radiformakont ($[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOATAGA-RAMEB}$, $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$), valamint a terápás célra alkalmazható ^{213}Bi -mal jelölt DOTA-NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid származékokat.
- Az előállított radiogyógyszerek mindegyikénél bizonyítottuk, hogy azok nagy affinitással kötődnek a melanoma tumorokhoz.
- Bebizonyítottuk, hogy a ($[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOATAGA-RAMEB}$ radiofarmakon sikeresen alkalmazható a kísérleti melanoma tumorok diagnosztikájában.
- Igazoltuk, hogy az általunk szintetizált $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ kiváló képkontrasztot biztosít, ami jelentősen megkönnyíti a PET képek kiértékelését, így az MC1-R pozitív tumorok azonosítását is, köszönhetően a háttérből történő gyors kiürülésének, valamint a vesén keresztüli kiválasztásának.
- A ^{213}Bi -DOTA-NAPamid, HOLDamid, FOLDamid és MARSamid radiofarmakon vizsgálatának eredményeivel igazoltuk, hogy azok mindegyike képes a MM tumorok azonosítására. Azt találtuk, hogy a négy vizsgált származék közül a $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-NAPamid}$ rendelkezik a legjobb tulajdonságokkal.
- Az elvégzett kísérletek eredményei alapján megállapítottuk, hogy a ^{213}Bi -jelölt alfa-sugárzó molekulák alkalmasak lehetnek a MM célzott radionuklid-kezelésében, ami hozzájárulhatna a személyre szabott terápiához a humán diagnosztikában.
- A PGE2 specifikus $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-DOTAGA-RAMEB}$, valamint az MC1-R specifikus $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NAPamid}$ és $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ összehasonlító vizsgálatának eredményeiből, amelyet mellkasi melanoma metasztázisokat hordozó egereken végeztünk, megállapítottuk, hogy a metasztázisokban is jelentős dúsulást mutatnak a vizsgált radiofarmakonok. Továbbá, azt is kijelenthetjük, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NAPamid}$ és $[^{61}\text{Cu}]\text{Cu-KFTG-NAPamid}$ radiotrészerek jelentősen magasabb aktivitást mutattak, mint a radiojelzett RAMEB ciklodextrinek.

7. Összefoglalás

Doktori munkám során célul tűztük ki, hogy olyan a gyakorlatban is alkalmazható radiotrészereket fejlesztünk, amelyek alkalmasak a melanoma malignum PET diagnosztikájára, így előállítottunk és tanulmányoztunk számos ^{52}Mn , ^{61}Cu és ^{213}Bi izotóppal jelölt DOTAGA (^{52}Mn), DOTA (^{213}Bi) és 15aneN₅-alapú (^{61}Cu) radiofarmakont, amelyeket a tumorspecifikusság eléréséhez ^{52}Mn esetében RAMEB, ^{61}Cu esetében NAPamid, míg a ^{213}Bi esetében NAP-, FOLD-, HOLD- és MARSamid molekulákkal konjugáltunk. Az előállított radiofarmakonok diagnosztikai potenciálját ezután B16-F10 melanoma tumoros egérmodellen vizsgáltuk, majd a kapott eredményeket összehasonlítottuk az irodalomból már ismert radiofarmakonok megfelelő eredményeivel. Vizsgálatainkhoz tíz hetes nőstény C57BL/6J egereket használtunk, amelyekben a bal váll területén hoztuk létre az MC1-R pozitív és PGE2-R pozitív tumorokat a tumorsejtek szubkután injektálásával, míg a metasztázis modell esetén intravénásan a laterális farki vénába juttattuk be a tumorsejteket. Az *in vivo* méréseket a tanszék MiniPET-II szkennerével hajtottuk végre, míg az *ex vivo* vizsgálatokhoz egy kalibrált PerkinElmer gammaszámlálót alkalmaztunk.

A kísérleteink során kapott eredmények azt mutatták, hogy a [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB potenciális radiofarmakon alkalmas a rosszindulatú melanoma tumorok PET diagnosztikájára. Ugyanakkor az ágens gyors eliminációs kinetikája és vesefelvétele kizárhatja hosszabb folyamatok vizsgálatára történő alkalmazását.

A ^{61}Cu [Cu]-KFTG-NAPamid farmakonnal végzett vizsgálataink eredményéből kiderült, hogy az ágens nagy affinitással kötődik az MC1-R pozitív kísérleti melanomás daganatokhoz és kiváló képkontrasztot biztosít, ami megkönnyíti a PET képek kiértékelését.

A ^{213}Bi -vel jelölt, DOTA-konjugált, MC1-R-affinitású α -MSH-analógok vizsgálata azt mutatta, hogy mind a négy radiotrészter specifikus kötődést mutat az MC1-R B16-F10 tumorokhoz. A legmagasabb felvételi értékeket a NAP- és a FOLDamid származékok esetében mértük, így ezek akár jelentős szerepet is játszhatnak az MM tumorok PET képalkotásában.

Végezetül, a PGE2 specifikus [^{68}Ga]Ga- és [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB, valamint a MC1-R specifikus [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamid ágensekkel elvégzett vizsgálataink, amelyek mellkasi B16-F10 melanoma metasztázisok azonosítására irányultak, azt mutatták, hogy mind a négy anyag kifejezett dúsulást mutatott, míg az a kontroll állatokban nem volt megfigyelhető. A NAPamid származékok esetén magasabb halmozódást tudtunk detektálni, melyek az sc tumor vizsgálat eredményeivel korrelálnak.

8. Summary

During my doctoral work, our objective was to develop radiotracers with practical applicability for the PET imaging of malignant melanoma. To this end, we synthesized and characterized several radiopharmaceuticals labeled with the isotopes ^{52}Mn , ^{61}Cu , and ^{213}Bi , based on DOTAGA (^{52}Mn), DOTA (^{213}Bi), and 15aneN₅ (^{61}Cu) chelators. In order to achieve tumor specificity, we conjugated the radiocomplexes with RAMEB (^{52}Mn), NAPamide (^{61}Cu), and NAP-, FOLD-, HOLD- and MARSamide (^{213}Bi), respectively. The diagnostic potential of the agents was evaluated *in vivo* using a B16-F10 melanoma-bearing mouse model, and the results were compared to corresponding data of radiopharmaceuticals reported in the literature. For our studies, we used ten-week-old female C57BL/6J mice. MC1-R and PGE2-R positive tumors were established subcutaneously at the left shoulder region, while in the metastasis model, tumor cells were administered intravenously via the lateral tail vein. *In vivo* imaging was performed using a MiniPET-II scanner, while *ex vivo* studies were conducted by means of a calibrated PerkinElmer gamma counter at our department.

Based on the results of our experiments, one can conclude that, the [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB compound is a potential radiopharmaceutical suitable for the PET diagnosis of malignant melanoma tumors, however, its rapid elimination kinetics and high renal uptake may limit its capability in studies requiring prolonged imaging.

The results obtained with the [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamide revealed that this agent shows high affinity to MC1-R-positive experimental melanoma tumors and provides excellent image contrast and significantly facilitates PET image evaluation.

From the results of the study on ^{213}Bi -labeled, DOTA-conjugated, MC1-R-affine α -MSH analogues, we can conclude that all four radiotracers show specific binding to MC1-R in B16-F10 tumors. The highest uptake values were gained for NAP- and FOLDamide derivatives, suggesting that these molecules could play a significant role in the PET imaging of MM tumors.

Finally, our studies conducted with the PGE2-specific [^{68}Ga]Ga- and [^{52}Mn]Mn-DOTAGA-RAMEB, as well as the MC1-R-specific [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamide and [^{61}Cu]Cu-KFTG-NAPamide radiotracers, aimed at identifying thoracic B16-F10 melanoma metastases, demonstrated that all four compounds exhibited significant accumulation, which was not observed in control animals. Based on previous results, it was not surprising that higher accumulation was detected for the NAPamide derivatives, which correlates with the results of sc tumor studies.

9. Irodalomjegyzék

9.1. A hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Cabaço, L. C., Tomás, A., Pojo, M. & Barral, D. C. The Dark Side of Melanin Secretion in Cutaneous Melanoma Aggressiveness. *Front. Oncol.* **12**, 887366 (2022).
2. Naik, P. P. Cutaneous Malignant Melanoma: A Review of Early Diagnosis and Management. *World J. Oncol.* **12**, 7–19 (2021).
3. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
4. Wróbel, S., Przybyło, M. & Stępień, E. The Clinical Trial Landscape for Melanoma Therapies. *J. Clin. Med.* **8**, 368 (2019).
5. Gosman, L. M., Țăpoi, D.-A. & Costache, M. Cutaneous Melanoma: A Review of Multifactorial Pathogenesis, Immunohistochemistry, and Emerging Biomarkers for Early Detection and Management. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 15881 (2023).
6. Paulson, K. G. *et al.* Age-Specific Incidence of Melanoma in the United States. *JAMA Dermatol.* **156**, 57 (2020).
7. Arnold, M. *et al.* Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol.* **158**, 495 (2022).
8. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 7–34 (2019).
9. Zbytek, B. *et al.* Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev. Dermatol.* **3**, 569–585 (2008).
10. Dumitraș, D.-A. *et al.* Inhibition of Tumor Growth and Modulation of Antioxidant Activity of Rhodoxanthin Isolated from *Taxus baccata* Aril against B16F10 Murine Malignant Melanoma. *Antioxidants* **11**, 2264 (2022).
11. Shevtsov, M., Kaesler, S., Posch, C., Multhoff, G. & Biedermann, T. Magnetic nanoparticles in theranostics of malignant melanoma. *EJNMMI Res.* **11**, 127 (2021).

12. Vercellino, L. *et al.* Translating Molecules into Imaging—The Development of New PET Tracers for Patients with Melanoma. *Diagnostics* **12**, 1116 (2022).
13. Aide, N. *et al.* PET/CT variants and pitfalls in malignant melanoma. *Cancer Imaging* **22**, 3 (2022).
14. Filippi, L., Bianconi, F., Schillaci, O., Spanu, A. & Palumbo, B. The Role and Potential of 18F-FDG PET/CT in Malignant Melanoma: Prognostication, Monitoring Response to Targeted and Immunotherapy, and Radiomics. *Diagnostics* **12**, 929 (2022).
15. Lei, J., Yingfeng, T., Hongcheng, S. & Zhen, C. PET probes beyond 18F-FDG. *J. Biomed. Res.* **28**, 435 (2014).
16. Gambini, J. *et al.* ^{99m}Tc -HYNIC-Aoc-cycMSH as a melanoma imaging agent: first patient experience. *J. Nucl. Med.* **61**, 1361 (2020).
17. Stéfánné Dénes, N. Kismolekulák és peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából. in (DEBRECENI EGYETEM, PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA, 2021).
18. Fowler, J. S. *et al.* Mapping Human Brain Monoamine Oxidase A and B with ^{11}C -Labeled Suicide Inactivators and PET. *Science* **235**, 481–485 (1987).
19. Phelps, M. E. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **41**, 661–681 (2000).
20. Dash, A. & Chakravarty, R. Radionuclide generators: the prospect of availing PET radiotracers to meet current clinical needs and future research demands. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **9**, 30–66 (2019).
21. Janczak, M. The role of radiopharmaceuticals in diagnosis of melanoma malignum. *Nucl. Med. Rev. Cent. East. Eur.* **12**, 83–88 (2009).
22. Ahmed, B., Qadir, M. I. & Ghafoor, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **30**, 291–297 (2020).
23. Sandru, A., Voinea, S., Panaitescu, E. & Blidaru, A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J. Med. Life* **7**, 572–576 (2014).

24. Radiation: Ultraviolet (UV) radiation and skin cancer. *WHO* (2017).
25. Uong, A. & Zon, L. I. Melanocytes in development and cancer. *J. Cell. Physiol.* **222**, 38–41 (2010).
26. Apalla, Z., Nashan, D., Weller, R. B. & Castellsagué, X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol. Ther.* **7**, 5–19 (2017).
27. McIvor, J., Siew, T., Campbell, A. & McCarthy, M. FDG PET in early stage cutaneous malignant melanoma. *J. Med. Imaging Radiat. Oncol.* **58**, 149–154; quiz 266 (2014).
28. Rodriguez Rivera, A. M., Alabbas, H., Ramjaun, A. & Meguerditchian, A.-N. Value of positron emission tomography scan in stage III cutaneous melanoma: A systematic review and meta-analysis. *Surg. Oncol.* **23**, 11–16 (2014).
29. Grant-Kels, J. M. Melanoma and pigmented lesions, part 1. *Clin. Dermatol.* **27**, 1–2 (2009).
30. Ranieri, J. M., Wagner, J. D., Wenck, S., Johnson, C. S. & Coleman, J. J. The Prognostic Importance of Sentinel Lymph Node Biopsy in Thin Melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* **13**, 927–932 (2006).
31. Luke, J. J., Flaherty, K. T., Ribas, A. & Long, G. V. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 463–482 (2017).
32. Finetti, F. *et al.* Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology* **9**, 434 (2020).
33. Wang, D. & DuBois, R. N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 181–193 (2010).
34. Mizuno, R., Kawada, K. & Sakai, Y. Prostaglandin E2/EP Signaling in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 6254 (2019).
35. Santiso, A., Heinemann, A. & Kargl, J. Prostaglandin E2 in the Tumor Microenvironment, a Convuluted Affair Mediated by EP Receptors 2 and 4. *Pharmacol. Rev.* **76**, 388–413 (2024).
36. Wang, M.-T., Honn, K. V. & Nie, D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 525–534 (2007).
37. Jara-Gutiérrez, Á. & Baladrón, V. The Role of Prostaglandins in Different Types of Cancer. *Cells* **10**, 1487 (2021).

38. Tong, D. *et al.* The roles of the COX2/PGE2/EP axis in therapeutic resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **37**, 355–368 (2018).
39. Sauer, R.-S. *et al.* A Novel Approach for the Control of Inflammatory Pain: Prostaglandin E2 Complexation by Randomly Methylated β -Cyclodextrins. *Anesth. Analg.* **124**, 675–685 (2017).
40. Csige, K. *et al.* In vivo investigation of Gallium-68 and Bismuth-205/206 labeled beta cyclodextrin for targeted alpha therapy of prostaglandin E2 receptor-expressing tumors in mice. *Int. J. Pharm.* **625**, 122132 (2022).
41. Hirayama, F., Kurihara, M. & Uekama, K. Improving the aqueous stability of prostaglandin E2 and prostaglandin A2 by inclusion complexation with methylated-.BETA.-cyclodextrins. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **32**, 4237–4240 (1984).
42. O’Callaghan, G. & Houston, A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets? *Br. J. Pharmacol.* **172**, 5239–5250 (2015).
43. Szabó, J. P. *et al.* In vivo assessment of tumor targeting potential of ⁶⁸Ga-labelled randomly methylated beta-cyclodextrin (RAMEB) and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) using positron emission tomography. *Int. J. Pharm.* **630**, 122462 (2023).
44. Finetti, F., Paradisi, L., Bernardi, C., Pannini, M. & Trabalzini, L. Cooperation between Prostaglandin E2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Cancer Progression: A Dual Target for Cancer Therapy. *Cancers* **15**, 2374 (2023).
45. Eppard, E. *et al.* Clinical Translation and First In-Human Use of [⁴⁴ Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Theranostics* **7**, 4359–4369 (2017).
46. Martiniova, L., De Palatis, L., Etchebehere, E. & Ravizzini, G. Gallium-68 in Medical Imaging. *Curr. Radiopharm.* **9**, 187–207 (2016).
47. Ahenkorah, S. *et al.* Bismuth-213 for Targeted Radionuclide Therapy: From Atom to Bedside. *Pharmaceutics* **13**, 599 (2021).

48. Csikos, C. *et al.* In Vivo Preclinical Assessment of the VEGF Targeting Potential of the Newly Synthesized [52Mn]Mn-DOTAGA-Bevacizumab Using Experimental Cervix Carcinoma Mouse Model. *Diagnostics* **13**, 236 (2023).
49. Huo, J., Huo, S. & Ma, C. Nuclear Data Sheets for A = 52. *Nucl. Data Sheets* **108**, 773–882 (2007).
50. Pyles, J. M., Omweri, J. M. & Lapi, S. E. Natural and enriched Cr target development for production of Manganese-52. *Sci. Rep.* **13**, 1167 (2023).
51. Brandt, M., Cardinale, J., Rausch, I. & Mindt, T. L. Manganese in PET imaging: Opportunities and challenges. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **62**, 541–551 (2019).
52. Gawne, P. J. *et al.* Microwave-assisted synthesis of [52Mn]Mn-porphyrins: Applications in cell and liposome radiolabelling. *Nucl. Med. Biol.* **114–115**, 6–17 (2022).
53. Chaple, I. F. & Lapi, S. E. Production and Use of the First-Row Transition Metal PET Radionuclides^{43,44} Sc,⁵² Mn, and⁴⁵ Ti. *J. Nucl. Med.* **59**, 1655–1659 (2018).
54. Graves, S. A. *et al.* Novel Preparation Methods of⁵² Mn for ImmunoPET Imaging. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2118–2124 (2015).
55. Fonslet, J., Tietze, S., Jensen, A. I., Graves, S. A. & Severin, G. W. Optimized procedures for manganese-52: Production, separation and radiolabeling. *Appl. Radiat. Isot.* **121**, 38–43 (2017).
56. Mun, Y., Kim, W. & Shin, D. Melanocortin 1 Receptor (MC1R): Pharmacological and Therapeutic Aspects. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 12152 (2023).
57. Szabó, I. *et al.* Targeting the Melanocortin 1 Receptor in Melanoma: Biological Activity of α -MSH–Peptide Conjugates. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 1095 (2024).
58. Cheng, Z. *et al.* Small-Animal PET of Melanocortin 1 Receptor Expression Using a 18F-Labeled -Melanocyte-Stimulating Hormone Analog. *J. Nucl. Med.* **48**, 987–994 (2007).
59. Thompson, S. *et al.* ¹⁶⁶Ho and ⁹⁰Y labeled 6D2 monoclonal antibody for targeted radiotherapy of melanoma: Comparison with ¹⁸⁸Re radiolabel. *Nucl. Med. Biol.* **41**, 276–281 (2014).
60. Gao, F. *et al.* Radiopharmacological characterization of ⁶⁴Cu-labeled α -MSH analogs for potential use in imaging of malignant melanoma. *Amino Acids* **48**, 833–847 (2016).

61. Kim, H.-J. *et al.* Synthesis and characterization of a ⁶⁸Ga-labeled N-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivative as potential PET Probe for malignant melanoma. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 4915–4920 (2012).
62. Rosenkranz, A. A., Slastnikova, T. A., Durymanov, M. O. & Sobolev, A. S. Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor. *Biochem. Mosc.* **78**, 1228–1237 (2013).
63. Chung, H., Lee, J., Jeong, D., Han, I.-O. & Oh, E.-S. Melanocortin 1 Receptor Regulates Melanoma Cell Migration by Controlling Syndecan-2 Expression. *J. Biol. Chem.* **287**, 19326–19335 (2012).
64. Cheng, Z., Xiong, Z., Subbarayan, M., Chen, X. & Gambhir, S. S. ⁶⁴Cu-Labeled Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone Analog for MicroPET Imaging of Melanocortin 1 Receptor Expression. *Bioconjug. Chem.* **18**, 765–772 (2007).
65. Nagy, G. *et al.* 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).
66. Ren, G. *et al.* PET of Malignant Melanoma Using ¹⁸F-Labeled Metallopeptides. *J. Nucl. Med.* **50**, 1865–1872 (2009).
67. Miao, Y., Benwell, K. & Quinn, T. P. ^{99m}Tc- and ¹¹¹In-labeled alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides as imaging probes for primary and pulmonary metastatic melanoma detection. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **48**, 73–80 (2007).
68. Dong, C. *et al.* The Coppery Age: Copper (Cu)-Involved Nanotheranostics. *Adv. Sci.* **7**, 2001549 (2020).
69. Boschi, A., Martini, P., Janevik-Ivanovska, E. & Duatti, A. The emerging role of copper-64 radiopharmaceuticals as cancer theranostics. *Drug Discov. Today* **23**, 1489–1501 (2018).
70. Williams, H. A., Robinson, S., Julyan, P., Zweit, J. & Hastings, D. A comparison of PET imaging characteristics of various copper radioisotopes. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **32**, 1473–1480 (2005).

71. Weisman, G. R. *et al.* Synthesis and transition-metal complexes of new cross-bridged tetraamine ligands. *Chem. Commun.* 947 (1996) doi:10.1039/cc9960000947.
72. Weisman, G. R., Rogers, M. E., Wong, E. H., Jasinski, J. P. & Paight, E. S. Cross-bridged cyclam. Protonation and lithium cation (Li⁺) complexation in a diamond-lattice cleft. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 8604–8605 (1990).
73. Hubin, T. Synthesis and coordination chemistry of topologically constrained azamacrocycles. *Coord. Chem. Rev.* **241**, 27–46 (2003).
74. Ferdani, R. *et al.* Synthesis, Cu(ii) complexation, ⁶⁴Cu-labeling and biological evaluation of cross-bridged cyclam chelators with phosphonate pendant arms. *Dalton Trans* **41**, 1938–1950 (2012).
75. Woodin, K. S. *et al.* Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 4829–4833 (2005).
76. Shircliff, A. D. *et al.* An ethylene cross-bridged pentaazamacrocycle and its Cu²⁺ complex: constrained ligand topology and excellent kinetic stability. *Chem. Commun.* **56**, 7519–7522 (2020).
77. Csupász, T. *et al.* Exceptionally fast formation of stable rigidified cross-bridged complexes formed with Cu(II) isotopes for molecular imaging. *Inorg. Chem. Front.* **9**, 1217–1223 (2022).
78. Jadvar, H., Chen, X., Cai, W. & Mahmood, U. Radiotheranostics in Cancer Diagnosis and Management. *Radiology* **286**, 388–400 (2018).
79. Kálmán-Szabó, I. *et al.* ⁶¹Cu-Labelled radiodiagnostics of melanoma with NAPamide-targeted radiopharmaceutical. *Int. J. Pharm.* **632**, 122527 (2023).
80. Nagy, G. *et al.* 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).
81. Salazar-Onfray, F. *et al.* Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *Br. J. Cancer* **87**, 414–422 (2002).
82. Siegrist, W. *et al.* Characterization of receptors for alpha-melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer Res.* **49**, 6352–6358 (1989).

83. Puig-Butille, J. A. *et al.* Capturing the biological impact of CDKN2A and MC1R genes as an early predisposing event in melanoma and non melanoma skin cancer. *Oncotarget* **5**, 1439–1451 (2014).
84. Cheng, Z. *et al.* Modification of the Structure of a Metallopeptide: Synthesis and Biological Evaluation of ¹¹¹In-Labeled DOTA-Conjugated Rhenium-Cyclized α -MSH Analogues. *J. Med. Chem.* **45**, 3048–3056 (2002).
85. Froidevaux, S. *et al.* A gallium-labeled DOTA-alpha-melanocyte- stimulating hormone analog for PET imaging of melanoma metastases. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **45**, 116–123 (2004).
86. Shi, H. & Cheng, Z. MC1R and melanin-based molecular probes for theranostic of melanoma and beyond. *Acta Pharmacol. Sin.* **43**, 3034–3044 (2022).
87. Csikos, C. *et al.* Evaluation of the therapeutic efficacy of ²¹³Bi-labelled DOTA-conjugated alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues in melanocortin-1 receptor positive preclinical melanoma model. *Int. J. Pharm.* **644**, 123344 (2023).
88. Miao, Y., Owen, N. K., Fisher, D. R., Hoffman, T. J. & Quinn, T. P. Therapeutic efficacy of a ¹⁸⁸Re-labeled alpha-melanocyte-stimulating hormone peptide analog in murine and human melanoma-bearing mouse models. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **46**, 121–129 (2005).
89. Miao, Y. *et al.* Melanoma therapy via peptide-targeted {alpha}-radiation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 5616–5621 (2005).
90. Miao, Y., Hoffman, T. J. & Quinn, T. P. Tumor-targeting properties of ⁹⁰Y- and ¹⁷⁷Lu-labeled alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues in a murine melanoma model. *Nucl. Med. Biol.* **32**, 485–493 (2005).
91. Morgenstern, A., Bruchertseifer, F. & Apostolidis, C. Bismuth-213 and Actinium-225 – Generator Performance and Evolving Therapeutic Applications of Two Generator-Derived Alpha-Emitting Radioisotopes. *Curr. Radiopharm.* **5**, 221–227 (2012).
92. Ahenkorah, S. *et al.* Bismuth-213 for Targeted Radionuclide Therapy: From Atom to Bedside. *Pharmaceutics* **13**, 599 (2021).

93. Dekempeneer, Y. *et al.* Targeted alpha therapy using short-lived alpha-particles and the promise of nanobodies as targeting vehicle. *Expert Opin. Biol. Ther.* **16**, 1035–1047 (2016).
94. Lacoeyille, F., Arlicot, N. & Faivre-Chauvet, A. Targeted alpha and beta radiotherapy: An overview of radiopharmaceutical and clinical aspects. *Médecine Nucl.* **42**, 32–44 (2018).
95. Pouget, J.-P. *et al.* Clinical radioimmunotherapy—the role of radiobiology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 720–734 (2011).
96. Marcu, L., Bezak, E. & Allen, B. J. Global comparison of targeted alpha vs targeted beta therapy for cancer: In vitro, in vivo and clinical trials. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **123**, 7–20 (2018).
97. Fourie, H. *et al.* Estimating the Relative Biological Effectiveness of Auger Electron Emitter 123I in Human Lymphocytes. *Front. Phys.* **8**, 567732 (2020).
98. Stella, V. J. & He, Q. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* **36**, 30–42 (2008).
99. Jansook, P., Ogawa, N. & Loftsson, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* **535**, 272–284 (2018).
100. Del Valle, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* **39**, 1033–1046 (2004).
101. Lai, W.-F. Cyclodextrins in non-viral gene delivery. *Biomaterials* **35**, 401–411 (2014).
102. Bellringer, M. E., Smith, T. G., Read, R., Gopinath, C. & Olivier, Ph. β -Cyclodextrin: 52-Week toxicity studies in the rat and dog. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 367–376 (1995).
103. Loftsson, T., Hreinsdóttir, D. & Másson, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int. J. Pharm.* **302**, 18–28 (2005).
104. Jambhekar, S. S. & Breen, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. *Drug Discov. Today* **21**, 363–368 (2016).
105. Adeoye, O. & Cabral-Marques, H. Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: A mini review. *Int. J. Pharm.* **531**, 521–531 (2017).
106. Morin-Crini, N. *et al.* History of Cyclodextrins. in *The History of Cyclodextrins* (eds. Crini, G., Fourmentin, S. & Lichtfouse, E.) vol. 52 1–93 (Springer International Publishing, Cham, 2020).

107. Lai, W.-F. Design of cyclodextrin-based systems for intervention execution. in *Delivery of Therapeutics for Biogerontological Interventions* 49–59 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-816485-3.00005-2.
108. Malhotra, M. *et al.* Cyclodextrin-siRNA conjugates as versatile gene silencing agents. *Eur. J. Pharm. Sci.* **114**, 30–37 (2018).
109. Hammoud, Z. *et al.* Cyclodextrin-membrane interaction in drug delivery and membrane structure maintenance. *Int. J. Pharm.* **564**, 59–76 (2019).
110. Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A. & Davis, M. E. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality *in vivo* imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15549–15554 (2007).
111. Qian, L., Guan, Y. & Xiao, H. Preparation and characterization of inclusion complexes of a cationic β -cyclodextrin polymer with butylparaben or triclosan. *Int. J. Pharm.* **357**, 244–251 (2008).
112. Gomes, P. M. O., Silva, A. M. S. & Silva, V. L. M. Pyrazoles as Key Scaffolds for the Development of Fluorine-18-Labeled Radiotracers for Positron Emission Tomography (PET). *Molecules* **25**, 1722 (2020).
113. Hajdu, I. *et al.* Radiochemical synthesis and preclinical evaluation of ^{68}Ga -labeled NODAGA-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (^{68}Ga -NODAGA-HPBCD). *Eur. J. Pharm. Sci.* **128**, 202–208 (2019).
114. Trencsényi, G. *et al.* In vivo preclinical evaluation of the new ^{68}Ga -labeled beta-cyclodextrin in prostaglandin E2 (PGE2) positive tumor model using positron emission tomography. *Int. J. Pharm.* **576**, 118954 (2020).
115. Kálmán-Szabó, I. *et al.* In Vivo evaluation of newly synthesized ^{213}Bi -conjugated alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) peptide analogues in melanocortin-1 receptor (MC1-R) positive experimental melanoma model. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **229**, 115374 (2023).
116. Képes, Z. *et al.* ^{52}Mn -labelled Beta-cyclodextrin for Melanoma Imaging: A Proof-of-concept Preclinical Study. *In Vivo* **38**, 2591–2600 (2024).

117. Percie Du Sert, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **18**, e3000410 (2020).
118. Zhang, C. *et al.* Selective Cyclized α -Melanocyte-Stimulating Hormone Derivative with Multiple N-Methylations for Melanoma Imaging with Positron Emission Tomography. *ACS Omega* **5**, 10767–10773 (2020).
119. Guo, H. & Miao, Y. Cu-64-Labeled Lactam Bridge-Cyclized α -MSH Peptides for PET Imaging of Melanoma. *Mol. Pharm.* **9**, 2322–2330 (2012).
120. Napieczynska, H. *et al.* Imaging neuronal pathways with ^{52}Mn PET: Toxicity evaluation in rats. *NeuroImage* **158**, 112–125 (2017).
121. Topping, G. J., Schaffer, P., Hoehr, C., Ruth, T. J. & Sossi, V. Manganese-52 positron emission tomography tracer characterization and initial results in phantoms and in vivo. *Med. Phys.* **40**, 042502 (2013).
122. Saar, G. *et al.* Anatomy, Functionality, and Neuronal Connectivity with Manganese Radiotracers for Positron Emission Tomography. *Mol. Imaging Biol.* **20**, 562–574 (2018).
123. Bunda, S. *et al.* Diagnosis of Melanoma with ^{61}Cu -Labeled PET Tracer. *J. Med. Chem.* **67**, 9342–9354 (2024).
124. Zhou, I. Y. *et al.* Positron Emission Tomography-Magnetic Resonance Imaging Pharmacokinetics, In Vivo Biodistribution, and Whole-Body Elimination of Mn-PyC3A. *Invest. Radiol.* **56**, 261–270 (2021).
125. Kim, K. M., Im, A.-R., Kim, S. H., Hyun, J. W. & Chae, S. Timosaponin AIII inhibits melanoma cell migration by suppressing COX-2 and in vivo tumor metastasis. *Cancer Sci.* **107**, 181–188 (2016).
126. Tafreshi, N. K. *et al.* Synthesis and Characterization of a Melanoma-Targeted Fluorescence Imaging Probe by Conjugation of a Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Specific Ligand. *Bioconjug. Chem.* **23**, 2451–2459 (2012).

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/151/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kálmán-Szabó Ibolya
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Képes, Z., Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., Sass, T., Esze, R., Opposits, G., Jósza, I., Szikra, D. P., Fenyvesi, F., Hajdu, I., Trencsényi, G.: 52Mn-labelled Beta-cyclodextrin for Melanoma Imaging: a Proof-of-concept Preclinical Study.
In Vivo. 38 (6), 2591-2600, 2024.
DOI: <http://doi.org/10.21873/invivo.13735>
IF: 1.8 (2023)
2. Kálmán-Szabó, I., Bunda, S., Lihi, N., Szaniszló, Z., Szikra, D. P., Péli-Szabó, J., Fekete, A., Gyuricza, B., Szűcs, D., Papp, G., Trencsényi, G., Kálmán, F. K.: 61Cu-Labelled radiodiagnostics of melanoma with NAPamide-targeted radiopharmaceutical.
Int. J. Pharm. 632, 1-9, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122527>
IF: 5.3
3. Kálmán-Szabó, I., Képes, Z., Fekete, A., Vágner, A., Nagy, G., Szűcs, D., Gyuricza, B., Arató, V. Z., Varga, J., Kárpáti, L., Garai, I., Mándity, I. M., Bruchertseifer, F., Elek, J., Szikra, D. P., Trencsényi, G.: In Vivo evaluation of newly synthesized 213Bi-conjugated alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) peptide analogues in melanocortin-1 receptor (MC1-R) positive experimental melanoma model.
J. Pharm. Biomed. Anal. 229, 1-9, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115374>
IF: 3.1

További közlemények

4. Bunda, S., Kálmán-Szabó, I., Lihi, N., Képes, Z., Szikra, D. P., Péli-Szabó, J., Timári, I., Szűcs, D., May, N. V., Papp, G., Trencsényi, G., Kálmán, F. K.: Diagnosis of Melanoma with 61Cu-Labeled PET Tracer.
J. Med. Chem. 67 (11), 9342-9354, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00479>
IF: 6.8 (2023)





5. Péli-Szabó, J., Csige, K., Kálmán-Szabó, I., Arató, V. Z., Opposits, G., Józszai, I., Kertész, I., Képes, Z., Méhes, G., Fenyvesi, F., Hajdu, I., Trencsényi, G.: In vivo assessment of tumor targeting potential of ⁶⁸Ga-labelled randomly methylated beta-cyclodextrin (RAMEB) and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) using positron emission tomography.
Int. J. Pharm. 630, 1-8, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122462>
IF: 5.3
6. Csikos, C., Vágner, A., Nagy, G., Kálmán-Szabó, I., Péli-Szabó, J., Ngo, M. T., Szoboszlai, Z., Szikra, D. P., Krasznai, Z. T., Trencsényi, G., Garai, I.: In Vivo Preclinical Assessment of the VEGF Targeting Potential of the Newly Synthesized [⁵²Mn]Mn-DOTAGA-Bevacizumab Using Experimental Cervix Carcinoma Mouse Model.
Diagnostics. 13 (2), 236-, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics13020236>
IF: 3
7. Boda, R., Lázár, I., Keczánné Üveges, A., Bakó, J., Tóth, F., Trencsényi, G., Kálmán-Szabó, I., Béres, M., Sajtos, Z., D. Tóth, E., Deák, Á., Tóth, A., Horváth, D., Gaál, B. Á., Daróczi, L., Dezső, B., Ducza, L., Hegedűs, C.: β -Tricalcium Phosphate-Modified Aerogel Containing PVA/Chitosan Hybrid Nanospun Scaffolds for Bone Regeneration.
Int. J. Mol. Sci. 24 (8), 1-23, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24087562>
IF: 4.9
8. Képes, Z., Barkóczi, A., Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., Arató, V. Z., Garai, I., Árkosy, P., Józszai, I., Deák, Á., Kertész, I., Hajdu, I., Trencsényi, G.: In Vivo Assessments of Mesoblastic Nephroma (Ne/De) and Myelomonoblastic Leukaemia (My1/De) Tumour Development in Hypercholesterolemia Rat Models.
Int. J. Mol. Sci. 23 (21), 1-16, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232113060>
IF: 5.6
9. Csige, K., Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., Dénes, N., Szikra, D. P., Képes, Z., Opposits, G., Méhes, G., Kertész, I., Fenyvesi, F., Trencsényi, G., Hajdu, I.: In vivo investigation of Gallium-68 and Bismuth-205/206 labeled beta cyclodextrin for targeted alpha therapy of prostaglandin E2 receptor-expressing tumors in mice.
Int. J. Pharm. 625, 1-10, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122132>
IF: 5.8





10. Képes, Z., Barkóczy, A., Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., Arató, V. Z., Jószai, I., Deák, Á., Kertész, I., Hajdu, I., Trencsényi, G.: In Vivo Preclinical Assessment of β -Amyloid-Affine [11C]C-PIB Accumulation in Aluminium-Induced Alzheimer's Disease-Resembling Hypercholesterinaemic Rat Model.
Int. J. Mol. Sci. 23, 1-14, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232213950>
IF: 5.6
11. Kordován, M. Á., Hegedűs, C., Czifrák, K., Lakatos, C., Kálmán-Szabó, I., Daróczy, L., Zsuga, M., Kéki, S.: Novel Polyurethane Scaffolds Containing Sucrose Crosslinker for Dental Application.
Int. J. Mol. Sci. 23 (14), 1-18, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23147904>
IF: 5.6
12. Kálmán-Szabó, I., Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Kertész, I., Képes, Z., Fekete, A., Szikra, D. P., Hajdu, I., Trencsényi, G.: PET Probes for Preclinical Imaging of GRPR-Positive Prostate Cancer: comparative Preclinical Study of [68Ga]Ga-NODAGA-AMBA and [44Sc]Sc-NODAGA-AMBA.
Int. J. Mol. Sci. 23 (17), 1-17, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms231710061>
IF: 5.6
13. Geninatti-Crich, S., Alberti, D., Kálmán-Szabó, I., Aime, S., Djanashvili, K.: MRI Visualization of Melanoma Cells by Targeting Overexpressed Sialic Acid with a GdIII-dota-en-pba Imaging Reporter.
Angew. Chem.-Int. Edit. 52 (4), 1161-1164, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201207131>
IF: 11.336
14. Geninatti-Crich, S., Cutrin, J. C., Lanzardo, S., Conti, L., Kálmán, F. K., Kálmán-Szabó, I., Lago, N. R., Iolascon, A., Aime, S.: Mn-loaded apoferritin: a highly sensitive MRI imaging probe for the detection and characterization of hepatocarcinoma lesions in a transgenic mouse model.
Contrast. Media Mol. Imaging. 7 (3), 281-288, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cmmi.492>
IF: 2.872
15. Kálmán-Szabó, I., Crich, S. G., Alberti, D., Kálmán, F. K., Aime, S.: Mn loaded apoferritin as an MRI sensor of melanin formation in melanoma cells.
Chem. Commun. 48 (18), 2436-2438, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c2cc17801j>
IF: 6.378





16. Geninatti-Crich, S., Alberti, D., Kálmán-Szabó, I., Deagostino, A., Toppino, A., Barge, A., Ballarini, F., Bortolussi, S., Bruschi, P., Protti, N., Stella, S., Altieri, S., Venturello, P., Aime, S.: MRI-Guided Neutron Capture Therapy by Use of a Dual Gadolinium/Boron Agent Targeted at Tumour Cells through Upregulated Low-Density Lipoprotein Transporters. *Chem.-Eur. J.* 17 (30), 8479-8486, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201003741>
IF: 5.925
17. Geninatti-Crich, S., Kálmán-Szabó, I., Alberti, D., Longo, D., Aime, S.: MRI of cells and mice at 1 and 7T Tesla with Gd-targeting agents: when the low field is better! *Contrast Media Mol. Imaging.* 6 (6), 421-425, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cmml.436>
IF: 3.328
18. Crivello, A., Nervi, C., Gobetto, R., Geninatti-Crich, S., Kálmán-Szabó, I., Barge, A., Toppino, A., Deagostino, A., Venturello, P., Aime, S.: Towards improved boron neutron capture therapy agents: evaluation of in vitro cellular uptake of a glutamine-functionalized carborane. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (6), 883-890, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-009-0500-1>
IF: 3.415
19. Stefania, R., Tei, L., Barge, A., Geninatti-Crich, S., Kálmán-Szabó, I., Cabella, C., Cravotto, G., Aime, S.: Tuning Glutamine Binding Modes in Gd-DOTA-Based Probes for an Improved MRI Visualization of Tumor Cells. *Chem. Eur. J.* 15, 76-85, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200801567>
IF: 5.382

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 97,036

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,2

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

Debrecen, 2025.04.14.



10. Tárgyszavak

In vivo képalkotás, Pozitron emissziós tomográfia (PET), melanoma malignum, kelátor, ciklodextrin, NAPamid peptid.

In vivo imaging, positron emission tomography (PET), melanoma malignum, chelator, cyclodextrin, NAPamide peptide

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Prof. Dr. Berényi Ervin intézetvezetőnek és Dr. Trencsényi György tanszékvezetőnek a lehetőséget, hogy elkészíthettem a PhD dolgozatom az Orvosi Képző Klinikai Nukleáris Medicina Tanszékén.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Trencsényi Györgynek a PhD tanulmányaim során nyújtott útmutatásért és támogatásért.

Köszönet illeti Dr. Mándity Istvánt és kutatócsoportját a budapesti Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézetben a DOTA-MARSamid és a DOTA-FOLDamid vegyületeket rendelkezésünkre bocsátották.

Köszönettel tartozom Dr. Kálmán Ferencnek és munkatársainak a Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszékén előállított KFTG kelátorért.

És természetesen külön köszönet illeti a Nukleáris Medicina Intézet minden munkatársát ezen belül kiemelten a közvetlen kollegáimat, Péliné Dr. Szabó Juditot, Nagy Tamást, Dr. Arató Viktóriát, Dr. Képes Zitát a segítségükért és az általuk nyújtott támogatásért.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családomnak a türelmet és a támogatást.

12. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatait tartalmazza.