



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

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Váradi Balázs

Témavezető: Prof. Dr. Tircsó Gyula egyetemi tanár

Vállalati konzulens: Dr. Szűcs Zoltán

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2025.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács, **Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 Koordinációs és analitikai kémia programja** keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2025.

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Váradi Balázs** doktorjelölt **2020 - 2024** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2 Koordinációs és analitikai kémia** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2025.

.....
a témavezető aláírása

Tanúsítom, hogy **Váradi Balázs** doktorjelölt **2020 - 2024** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2 Koordinációs és analitikai kémia** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2025.

.....
a vállalati konzulens aláírása

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a **Kémia** tudományágban

Írta: **Váradi Balázs**, okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem **Kémiai Tudományok Doktori Iskolája**
(K/2 Koordinációs és analitikai kémia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Tircsó Gyula

Vállalati konzulens: Dr. Szűcs Zoltán

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2025.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Prof. Dr. Tircsó Gyulának, akinek szakmai iránymutatásával, szakmai és baráti tanácsaival, idejét és türelmét nem sajnálva folyamatosan segítette munkámat.

Köszönettel tartozom vállalati konzulensemnek, Dr. Szűcs Zoltánnak, aki lehetőséget teremtett arra, hogy kutatásom egy részét ipari környezetben valósíthassam meg.

Szeretném megköszönni kutatócsoportunk minden volt és jelenlegi tagjának, Prof. Dr. Brücher Ernő és Prof. Dr. Tóth Imre professzoroknak, Babinszkiné Dr. Farkas Editnek, Dr. Sebestyén Annamáriának, Silyéné Madarasi Enikőnek, Takács Katalinnak, Dr. Tóth-Molnár Enikőnek, Achacoso Alexis Cabahug-nak, Dr. Botár Richárdnak, Dr. Csupász Tibornak, Dr. Garda Zoltánnak, Dr. Fodor Tamásnak, Dr. Horváth Dávidnak, Dr. Kálmán Ferenc Krisztiánnak, Kapus Istvánnak, Sajtos Gergő Zoltánnak, Szilágyi Balázsnak, Zékány Lászlónak és szakdolgozóinknak a családi légkört, a támogató szavakat és a baráti tanácsokat, amelyek hozzájárultak ahhoz, hogy a mindennapok örömteliek legyenek.

Köszönettel tartozom továbbá Krusper Lászlónak, akinek iránymutatásával megismerhettem, elsajátíthattam és megszerethettem a folyadékromatográfia rejtelmét. Hálás vagyok Dr. Kormány Róbertnek, hogy ezt az elméleti és gyakorlati tudást tovább mélyíthettem, valamint a Waters Kft.-nek, amely a szükséges műszereket és eszközöket biztosította munkámhoz.

Köszönöm a Scanomed Kft. dolgozóinak, Dr. Garai Ildikónak, Dr. Vágner Adriennek és Dr. Nagy Gábornak az állatkísérletekben nyújtott értékes segítségüket.

Hálával tartozom továbbá a HUN-REN Atommagkutató Intézet munkatársainak, különösen Dr. Brezovcsik Károlynak és Fodor Mátyásnak a radioaktív jelzésekkel kapcsolatos támogatásukért.

Köszönöm a Romániai Akadémia Enzimológiai Csoportjának, különösen Szedlacek Istvánnak, az affitest-fehérjével kapcsolatos együttműködést és segítséget.

Köszönöm Dr. Nagy Tibornak, Dr. Nagy Cynthia Nórának és Szabó Dávid Rubennek az MS mérésekben nyújtott segítségét, illetve türelmüket és idejüket – még a legváratlanabb időpontokban is.

Szeretnék köszönetet mondani Páromnak, Dr. Magyar Máriának, aki minden pillanatban mellettem állt, buzdított és támogatott a munkámban és a magánéletben egyaránt. Köszönettel tartozom szüleimnek, akik megteremtették számomra a lehetőségeket és a légkört, amely lehetővé tette, hogy idáig eljuthassak. Hálás vagyok a fáradhatatlan támogatóimért és azért, hogy mindig hittetek bennem.

Valamint köszönöm barátaimnak, ismerőseimnek és mindenkinek, aki bármilyen formában hozzájárult ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

Ezúton szeretném megköszönni a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) **K-128201** és **134694** számú pályázatainak, valamint a **TKP2021-NKTA-42** számú projektjének a kutatásomhoz nyújtott támogatását.

A dolgozat az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program doktori hallgatói ösztöndíj programjának (**KDP-2020**) a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Az ismertetett tudományos eredmények a Richter Gedeon Nyrt. által létrehozott Richter Gedeon Talentum Alapítvány támogatásával, „**Richter Talentum PhD ösztöndíj**” keretében készültek.

A dolgozat elkészítéséhez nyújtott segítséget a Kulturális és Innovációs Minisztérium **EKÖP-24-4** kódszámú egyetemi kutatói ösztöndíj programja, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatással biztosította.

A dolgozatban szereplő rövidítések magyarázata

ADC – Antibody–drug conjugate (Antitest-gyógyszer konjugátum)

ACN – Acetonitrile (Acetonitril)

Alloc – Allyloxycarbonyl (Alliloxi-karbonil)

Alloc-Cl – Allyloxycarbonyl chloride (Alliloxi-karbonil-klorid)

Boc – *tert*-Butoxycarbonyl (*terc*-butil-oxi-karbonil)

CB17 SCID – CB17 Severe Combined Immunodeficient (CB17 súlyos kombinált immunhiányos egér)

CE – Capillary Electrophoresis (Kapilláris Elektroforézis)

CPMG – Carr-Purcell-Meiboom-Gill NMR pulzusszekvencia

DKM – Dichloromethane (Diklórmétán)

DIPEA – *N,N*-Diisopropylethylamine (*N,N*-Diizopropil-etil-amin)

DMF – *N,N*-Dimethylformamide (*N,N*-Dimetil-formamid)

DTT – Dithiothreitol (1,4-bisz(szulfanil)-bután-2,3-diol)

ESI-qTOF-UHRMS – Electrospray Ionization – quadrupole Time-of-Flight
– Ultra High Resolution Mass Spectrometry (Elektrospray ionizációs –
kvadrupól Repülési idő – Ultra magas felbontású tömegspektrometria)

Fab – Fragment antigen-binding (az antitest antigénkötő fragmentuma)

Fc – Fragment crystallizable (az antitest kristályosítható fragmentuma)

Fmoc – Fluorenylmethyloxycarbonyl – (fluorenil-metiloxi-karbonil)

FOV – Field of View (Látómező)

HBTU – O-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium
hexafluorophosphate (O-Benzotriazol-1-il-*N,N,N',N'*-tetrametiluronium-
hexafluorofoszfát)

HEPES – 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-propane sulfonic acid (4-(2-
hidroxietil)-piperazin-1-propán-szulfonát)

HER2+ – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 positive (Humán epidermális növekedési faktor receptor 2 pozitív)

HOBt – *N*-Hydroxybenzotriazole (1*H*-1,2,3-Benzotriazol-1-ol)

HSA – Human Serum Albumin (Humán szérum albumin)

ImmunoPET – Immuno-pozitronemissziós tomográfia (antitestekkel végzett PET képalkotás)

IVC – Individually Ventilated Cages (Egyedileg szellőztetett ketrecek)

MCF7 – Michigan Cancer Foundation-7 (Humán emlőrák sejtvonal)

MDA-MB – Maryland Department of Agriculture – Mammary Gland Breast (MDA-MB emlőrák sejtvonal)

MLEM – Maximum Likelihood Expectation Maximization (Maximum valószínűség várható érték maximalizálás)

Milli-Q – Milli-Q water (Milli-Q tisztított víz)

MRI – Magnetic Resonance Imaging (Mágneses rezonanciás képalkotás)

^{nat}Cr(p,xn)⁵²Mn – A természetes króm izotópjain (^{50/52/53/54}Cr) végbemenő protonindukált (p,n), (p,2n), ... csatornákra, amelyek ^{52g}Mn-t eredményeznek

NMR – Nuclear Magnetic Resonance (Mágneses magrezonancia spektroszkópia)

NP – Normal Phase (Normál fázisú kromatográfia)

Ns – Nozyl; *p*-nitrobenzenesulfonyl (Nozil)

ON – Over Night (Egy éjszakán át)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Foszfátpufferes sóoldat)

PET – Positron Emission Tomography (Pozitronemissziós tomográfia)

PEG – Polyethylene Glycol (Polietilénlikol)

ROI – Region of Interest (A vizsgálat tárgyát képező terület)

RCP – Radiochemical Purity (Radiokémiai tisztaság)

RP – Reverse Phase (Fordított fázisú kromatográfia)

RT – Room Temperature (Szobahőmérséklet)

scFv – Single-chain variable fragment (egyetlen polipeptidlánccá kapcsolt VH és VL domén)

SKOV3 – (Petefészekrák sejtvonala)

SUV – Standardized Uptake Value (Standardizált felvételi érték)

SUMO – Small Ubiquitin-like Modifier (Kis ubiquitin-szerű módosító fehérje)

SPECT – Single Photon Emission Computed Tomography (Egyfoton-emissziós komputertomográfia)

TEA – Triethylamine (Trietil-amin)

TFA – Trifluoroacetic Acid (Trifluor-ecetsav)

Ts – Tosyl; toluenesulfonyl (Toluolszulfonil)

VH – Variable domain of Heavy chain (a nehézlánc variábilis doménje)

VL – Variable domain of Light chain (a könnyűlánc variábilis doménje)

VOI – Volume of Interest (A vizsgálat tárgyát képező térfogat)

Tartalomjegyzék

I. BEVEZETÉS.....	1
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
II.1. HER2-pozitív mellrák.....	4
II.2. Antitestalapú vektormolekulák és fragmentumaik fejlesztése a célzott képalkotáshoz	5
II.3. Molekuláris és anatómiai képalkotás – PET/MRI	9
II.4. Mn(II)-ion és komplexeinek diagnosztikai alkalmazási lehetőségei	11
II.4.1. A Mn(II) izotópok sajátosságai	11
II.4.2. A ⁵² Mn-izotóp előállítása.....	12
II.4.3. A ⁵² Mn-izotóp tisztítása.....	13
II.5. Mn(II)-ion komplexálására alkalmazott ligandumok szerkezete és a komplexek sajátosságai	13
II.6. Nyíltláncú ligandumok.....	14
II.7. A (makro)ciklusos ligandumok	15
II.8. Bifunkciós (kétfunkciós) és „intelligens” Mn(II)-komplexek	17
III. CÉLKITŰZÉS	22
IV. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK ÉS KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK.....	24
IV.1. A makrociklusos ligandumok és komplexeik előállítása és szerkezetük igazolása során alkalmazott módszerek	24
IV.2. Egyensúlyi, relaxometriás mérések és a komplexek kinetikai vizsgálatai	27
IV.3. Ligandumok jelölés optimalizálása [⁵² Mn]Mn izotóppal (Atommagkutató Intézet).....	31
IV.3.1. A [⁵² Mn]Mn radioizotóp előállítása	31
IV.3.2. A 3,9-PC2ABn ^{pCO₂H} , a 3,9-PC2MABn ^{pCO₂H} és a 3,9-PC2AMP ^{pip} Bn ^{pCO₂H} bifunkciós ligandumok jelölés optimalizálása [⁵² Mn]Mn radioizotóppal	32
IV.3.3. A 3,9-CB ^{8O₂PC} és a 3,9-CB ^{8O₂PCBn^{pCO₂H}} kriptát típusú ligandumok jelölés optimalizálása [⁵² Mn]Mn radioizotóppal	33
IV.3.4. [⁵² Mn][Mn(3,9-PC2ABn ^{pCO₂H})], [⁵² Mn][Mn(3,9-PC2MABn ^{pCO₂H})], [⁵² Mn][Mn(3,9-PC2AMP ^{pip} Bn ^{pCO₂H})] radioaktívan jelölt komplexek transzkelációja transz-CDTA kicserélő ligandummal.....	34
IV.4. Ligandumok jelölés optimalizálása [⁵² Mn]Mn izotóppal (Scanomed Kft.)	34
IV.4.1. A ⁵² Mn radioizotóp előállítása.....	34
IV.4.2. A 3,9-PC2ABn ^{pCO₂H} ligandum részletes jelölés optimalizálása [⁵² Mn]Mn radioizotóppal	35
IV.5. Kisállat PET/MRI képalkotás	36
V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	39
V.1. A ligandumok előállításainak ismertetése	40
V.1.1. Piklén és védett származékainak előállítása	42
V.1.2. 3,6- és 3,9-PC2A előállítása.....	44
V.1.3. Bifunkciós ligandumok előállítása az analitikai vizsgálatokhoz	46
V.1.4. A 3,9-PC2ABn ^{pCO₂H} ligandum funkcionálizálása szelektív konjugáláshoz	49
V.1.5. A piklén származék kriptandok előállítása	51
V.2. A ligandumok protonálódási egyensúlyának vizsgálata	52

V.2.1.	3,6- és 3,9-PC2A ligandumok protonálódási egyensúlyának vizsgálata	53
V.2.1.	Bifunkciós 3,9-PC2A származék ligandumok protonálódási egyensúlyának vizsgálata	54
V.2.1.	Kriptát típusú ligandumok protonálódási egyensúlyának vizsgálata	55
V.3.	A ligandumok Mn(II)-ionnal képződő komplexeinek stabilitása	57
V.3.2.	A kriptát típusú ligandumok Mn(II)-ionnal alkotott komplexeinek egyensúlyi jellemzése	62
V.4.	A $[Mn(3,9-CB^{802}PC)]^{2+}$ és a $[Mn(3,9-CB^{802}PCBn^{pCO_2H})]^+$ komplexek képződéskinetikai vizsgálata	63
V.5.	Kinetikai mérések eredményei	66
V.5.1.	A PC2A származékok Mn(II)-komplexei inertségének a vizsgálata	67
V.5.1.	Kriptát származékok Mn(II)-komplexei inertsége	71
V.6.	A Mn(II)-komplekek relaxometriás vizsgálatai	74
V.7.	Ligandumok $[^{52}Mn]Mn$ izotóppal történő jelölésének eredményei	78
V.8.	A bifunkciós ligandum (BFL) konjugálása anti-HER2 affitesttel	86
V.9.	A $[^{52}Mn]Mn(3,9-PC2ABn^{pMA})(H_2O)]$ -Cys-HER2-affitest (44) előállítás	91
V.10.	A $[^{52}Mn]Mn(3,9-PC2ABn^{pMA})(H_2O)]$ -Cys-HER2-affitesttel kapcsolatos eredmények	93
VI.	ÖSSZEFOGLALÁS	98
VII.	SUMMARY	101
VIII.	IRODALOMJEGYZÉK	104
IX.	FÜGGELLÉK	i
IX.1.	Piklén (6) és védett származékainak szintézis leírása	i
IX.1.1.	3-Alloc-PC (12) szintézis leírása	i
IX.1.2.	3,9-diNs-PC (13) szintézis leírása	iii
IX.1.3.	6-Boc-PC (14) szintézis leírása	iv
IX.2.	3,6 és 3,9-PC2A szintézis leírása	v
IX.2.1.	3,9-PC2A (16) szintézis leírása	v
IX.2.2.	3,6-PC2A (19) szintézis leírása	vii
IX.3.	Az analitikai vizsgálatokhoz használt bifunkciós ligandumok szintézis leírása	ix
IX.3.1.	3,9-PC2ABn ^{pNO₂} (32) szintézis leírása	ix
IX.3.2.	3,9-PC2ABn ^{pCO₂H} (26) szintézis leírása	xi
IX.3.3.	3,9-PC2MABn ^{pCO₂H} (28) szintézis leírása	xv
IX.3.4.	3,9-PC2AM ^{pip} Bn ^{pCO₂H} (30) szintézis leírása	xix
IX.4.	A bifunkciós ligandum (3,9-PC2ABn ^{pMA} 38) szintézis leírása	xxiii
IX.5.	A bifunkciós ligandum (38) kapcsolása anti-HER2 affitesttel	xxix
IX.6.	A kriptát típusú ligandumok szintézis leírása	xxx
IX.7.	Mn(II)-komplekek szintézis leírása	xxxiv
IX.7.1.	$[Mn(3,9-CB^{802}PCBn^{pCO_2H})]^+$ szintézis leírása	xxxiv
IX.7.2.	$[Mn(3,9-CB^{802}PC)]^{2+}$ szintézis leírása	xxxvi
IX.7.3.	$[Mn(3,6-PC2A)]$ szintézis leírása	xxxvii

I. BEVEZETÉS

A modern orvoslás egyik legnagyobb kihívása a daganatos betegségek korai felismerése és célzott, személyre szabott kezelése. A daganatos betegek terápiája jelentős átalakuláson megy keresztül napjainkban, amelyben nagy szerepet játszanak a kis molekulájú, a tumoros sejtekre célzottan ható szerek, az antitest-gyógyszer konjugátumok (ADC-k), a sejtalapú terápiák és a génterápia. Ezek a kezelési módok nemcsak a daganatos sejtek szelektív támadását teszik lehetővé, hanem csökkentik a mellékhatásokat, javítják a betegek életminőségét és lelassíthatják vagy megállíthatják a betegség előrehaladását. A HER2-pozitív emlőrák az emlődaganatok körülbelül 15 - 20%-át alkotja, és a receptor túlzott expressziója általában intenzívebb klinikai lefolyással jár. A HER2-státusz megbízható, lehetőség szerint egész testre kiterjedő meghatározása alapvető jelentőségű a személyre szabott ellátásban és a célzott terápiás döntésekben. Az említett terápiák elengedhetetlen feltétele a korai és pontos diagnózis felállítása. Ebben egyre nagyobb segítséget nyújt a célzott molekuláris képalkotás, amelynek célja az élő szövetekben zajló sejtes és molekuláris folyamatok nem invazív, *in vivo* megjelenítése specifikus molekulák segítségével. A vizsgálatok során olyan diagnosztikai anyagokat alkalmaznak, melyek szelektíven kötődnek és dúsulnak a daganatos sejtek felületén megjelenő specifikus receptorokhoz, vagy segítenek lekövetni az adott biológiai folyamatot, eltérést. Az alkalmazott molekulák általában összetett szerkezetűek: tartalmaznak egy célba juttatásért felelős, valamint egy jelet kibocsájtó egységet (ez lehet valamilyen (radio)fém-komplex), amelyek között a kapcsolatot egy megfelelő hosszúságú és flexibilitású összekötő elem biztosítja. A jelölt molekula célba juttatásáért felelős molekularész lehet monoklonális antitest, annak kisebb/nagyobb, de még aktív töredékei (affitest,

nanotest), vagy akár kisebb fehérje, peptidlánc is. Bár a monoklonális antitestek fontos szerepet töltenek be a célzott diagnosztikai és terápiás alkalmazásokban, számos más típusú vektormolekula (pl. peptidek, antitesttöredékek) is elterjedten használatosak. A célszövetben feldúsult molekulák által kibocsájtott jel (optikai, SPECT, PET) képpé és ezáltal diagnosztikai információvá alakítható. A célzott diagnosztikai (és terápiás) alkalmazásokhoz napjainkra a vektormolekulák széles palettája vált elérhetővé. Monoklonális antitesteket (mAb) gyakran alkalmaznak ilyen céllal, mivel ezek alapvetően képesek felismerni egy specifikus antigénkötő helyet - a célzott molekula egy részét - és ahhoz kötődni. (A monoklonális antitestekről és fragmenseiről (affitest stb.) részletesen az *Irodalmi áttekintés II.2. fejezetében* lesz szó.) Ugyanakkor a monoklonális antitestek képalkotó ágensként való használatának több korlátja is van: lassan hatolnak be a tumorokba, hosszú a keringési idejük, lassan ürülnek ki a szervezetből és nem specifikus a szöveti eloszlásuk. Ezek a tényezők fokozott háttérzajt és szükségtelenül nagy sugárterhelést eredményezhetnek. Ezen hiányosságok olyan új alternatívák felkutatását indították el, mint az antitesttöredékekre (pl. nanotestek, affitestek stb.), valamint peptidekre alapozó vektormolekulák felhasználása. E fejlesztések eredményeként több új vektormolekula már a klinikai vizsgálatok szakaszába lépett.

A diagnosztikai ágensek közé tartoznak a kontrasztanyagok, az intelligens kontrasztanyagok és a radiogyógyszerek, amelyek funkciójukban részben átfedést mutatnak, de szerepük és alkalmazási módjuk eltérő. Radiogyógyszerek nélkül például a PET-nyomjelzés nem valósulhat meg, míg MRI-felvétel kontrasztanyag nélkül is készíthető.

A mangánizotópok széles palettája kiváló lehetőséget kínál a bimodális képalkotásra annak ellenére, hogy a képalkotó módszerek lényegesen eltérő

érzékenysége kihívások elé állítják a kutatókat. (*Bimodális azt jelenti, hogy két különböző képalkotó eljáráshoz (pl. MRI + PET) alkalmas. Ez nem funkcionális különbség a molekulán belül, hanem diagnosztikai alkalmazásbeli sokoldalúság.*) A mangán izotópok között létezik egy hosszú felezési idővel rendelkező pozitron kibocsátó izotóp, amely alkalmazható a funkcionális képalkotásban (^{52}Mn). Míg a ^{55}Mn paramágneses jellege miatt a Mn(II)-kelátokra az MRI-ben alkalmazott Gd(III)-komplexeknek biztonságosabb alternatívájaként tekintenek.¹ Erre az ad lehetőséget, hogy a Mn(II)-ion döntően nagyspínszámú komplexei a Mn(II) öt párosítatlan elektronjának köszönhetően erős paramágneses tulajdonsággal rendelkeznek, amelyhez megfelelően gyors oldószercsere és elektronrelaxációs idő is társul. Az ^{52}Mn izotóp felezési ideje 5,59 nap, ami meghaladja a ^{89}Zr felezési idejét ($t_{1/2} = 78,4$ óra), és lényegesen hosszabb, mint a ^{64}Cu izotópé ($t_{1/2} = 12,7$ óra). Ezért az ^{52}Mn használata lehetővé teszi a hosszabb időskálán végzett képalkotást, így különösen alkalmas az antitest vektormolekulákra alapozó célzott alkalmazásokra. Ezen túl, a ^{52}Mn 29,4%-ban bocsát ki pozitronokat, míg ez az érték 17,6 % a ^{64}Cu és 22,7 % a ^{89}Zr izotópok esetében. A kibocsátott pozitronok energiája (242 keV) kisebb, mint a ^{11}C (960 keV), ^{18}F (635 keV), és töredéke a ^{68}Ga esetében tapasztalható értéknek (1899 keV), ami javítja a térbeli felbontást. Rengeteg pozitív tulajdonsága mellett, hátrányaként a bomlás során keletkező nagy energiájú gamma-fotonok (744, 936, 1434 keV) említendő, amelyek további terhelést jelentenek a páciensek szervezetére számára az alkalmazások során.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az irodalmi áttekintés célja, hogy a HER2-pozitív emlőrák diagnosztikájához kapcsolódó, mangánalapú kontrasztanyagok és radiofarmakonok fejlesztésének elméleti és módszertani alapjait rendszerezze. A fejezet először rövid biológiai és képalkotás-módszertani kontextust ad, majd bemutatja a diagnosztikai szempontból releváns Mn-izotópokat, az előállítási és tisztítási technikákat. Végül a Mn(II)-komplexek irodalmát tekintjük át különös tekintettel az „intelligens” - *olyan kontrasztanyagok, amelyek valamilyen környezeti ingerre (pH, fémion koncentráció változása, enzimaktivitás, redox állapot stb.) válaszul változtatják relaxációs tulajdonságaikat (pl. relaxivitás, fluoreszcencia) - és bifunkciós - olyan ligandum, amely képes fémionokat koordinálni, de alkalmas biológiailag aktív molekulához való kapcsolásra is reaktív csoporttal/csoportokkal - ágensekre.*

II.1.HER2-pozitív mellrák

A daganatos betegségek közül a mellrák világszerte az egyik leggyakoribb és legnagyobb halálozással járó kórkép. Különösen fontos altípusa a HER2-pozitív emlőrák, amelyben a humán epidermális növekedési faktor 2 (HER2) receptor túlzott mértékben keletkezik a tumorsejteken. A HER2 a sejtszaporodást és túlélést szabályozó jelátviteli utakban játszik szerepet, ezért túltermelődése agresszív tumorviselkedéssel, gyors növekedéssel és rosszabb kilátásokkal társul. A HER2 célzott detektálása és terápiája kiemelt fontosságú, mivel lehetővé teszi a személyre szabott kezelés és a pontos képalkotás kombinációját.²

Napjainkban a HER2-expresszió szintjét rutinszerűen meg lehet határozni a primer tumor diagnózisakor, ugyanakkor az esetek kb. 20%-ában pontatlan

lehet, és invazív biopszia ismételt elvégzését igényli.³ A HER2-státusz követése kulcsfontosságú a tumorprogresszió megértésében és az optimális terápia időben történő kiválasztásában. A molekuláris képalkotás (PET, SPECT) nem invazív megoldást nyújt a HER2-pozitív tumorok funkcionális állapotának meghatározására, kritikus szerepe van a célzott terápia kiválasztásában és a HER2-státusz kezelés alatti monitorozásában. A terápia közbeni heterogenitás-változás követése még nem kiforrott, csak néhány radiojelzett antitest/antitest-származék jár a klinikai vizsgálat különböző fázisaiban. Antitestek esetén hátrány a hosszú biológiai felezési idő, a korlátozott szöveti penetráció, az sejten belüli célpontok elérhetetlensége, valamint a gyártás/tárolás érzékenysége.⁴













II.2. Antitest alapú vektormolekulák és fragmentumaik fejlesztése a célzott képalkotáshoz

A monoklonális antitestek olyan, azonos B-sejtvonalból származó ellenanyagok, amelyek nagy szelektivitással ismernek fel egy adott antigént. Viszonylag nagy (~150 kDa) Y-alakú fehérjék, amelyek két antigénkötő hellyel rendelkeznek. Szerkezetük egységes, ezért jól reprodukálhatóan alkalmazhatók diagnosztikai és terápiás célokra. A monoklonális antitestek az egyik legismertebb és legelterjedtebb biológiai vektormolekulák, amelyek eljutottak a terápiás alkalmazásokig. Az első klinikai alkalmazások előrelépést hoztak a daganatok és egyéb betegségek kezelésében, amelynek eredményeként számos antitest alapú gyógyszer ma már rutinszerűen használnak az orvosi gyakorlatban.⁵ Ennek a piaca több száz millió dollárra becsülhető évente, ami előrejelzések szerint rohamosan nő.⁶ Az elmúlt öt évben az EU-ban és az USA-ban évente 12 - 13 új ilyen készítmény kapja meg az engedélyt, melynek közel fele a rákkezelésben használatos.⁷

Egy antitestmolekula magas specifitása és affinitása kombinálva a PET vagy SPECT érzékenységgel egy rendkívül hatékony diagnosztikai eszközt eredményez, főleg MRI-vel vagy CT-vel kombinált hibrid készülékek esetén. Az így kapott nagyon pontos diagnosztikai információk segítik a különböző klinikai beavatkozások tervezését, például a szövettani mintavételt vagy műtétet.⁸ A gyakorlatban azonban a teljes, intakt antitesteken alapuló képalkotó ágenseknek vannak jelentős hátrányai, elsősorban nagy méretük miatt (kb. 150 kDa). Hosszú ideig, akár 3 hétig is keringenek a szervezetben a lassú farmakokinetikájuk miatt, így csak hosszabb felezési idejű radioizotóp (pl. ⁸⁹Zr, ¹²⁴I stb.) alkalmazhatók. Ezek a hosszabb felezési idejű radionuklidok azonban klinikai szempontból kevésbé ideálisak, mivel nagyobb sugárterhelést és hosszabb várakozási időt eredményeznek a képalkotás előtt. Az intakt antitestek nagy mérete miatt jellemzően a májon keresztül ürülnek, ami kizárhatja a májbetegségek képalkotását. Lassú vérkiürülésük és a nyomjelző nem specifikus kötődése magasabb háttér jelet eredményezhet, ami csökkenti a PET jel kontrasztját, és ezáltal rontja a képminőséget. Mivel sok teljes antitest terápiás szerként is alkalmazható, elméletileg nem kívánt biológiai válaszreakciót válthatnak ki az Fc-régió sejtfelszíni receptorokkal való kölcsönhatása révén. Az Fc-régió (Fragment Crystallizable – kristályosítható fragmentum) az antitestek azon része, amely nem vesz részt közvetlenül az antigén felismerésében, de fontos szerepe van az immunválaszban.⁹

Az antitestfragmentumok olyan mérnökiileg megtervezett antitest-részletek, amelyek megtartják a teljes antitestekre jellemző magas affinitást és szelektivitást, de jobb farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek a képalkotáshoz.⁸ Ezek lényegében csak a célfelismeréshez és kötődéshez szükséges alapvető elemeket tartalmazzák. Egyszerűbb felépítésük ellenére az antitestfragmentumok klinikai fejlesztése még mindig jóval ritkább, mint az intakt antitesteké.¹⁰ Képalkotáshoz szükséges, hogy megfelelő kémiai

funkcióval rendelkezzenek a radiofém kapcsolásához. Méretük típustól függően általában 7 - 100 kDa között mozog (1. ábra).

	 Teljes hosszúságú IgG	 (Fab') ₂	 Minibody	 Diabody	 Fab	 Fab'	 scFv	 Nanobody	 Affibody
Előállítás módja	-	IgG emésztése pepszinnel	IgG emésztése papainnal	Rekombináns DNS-technológia	IgG emésztése papainnal	IgG emésztése papainnal β-merkaptetanol	Rekombináns DNS-technológia	Rekombináns DNS-technológiája (Tevefélék)	Rekombináns DNS-technológia (Protein A)
Molekulatömeg (kDa)	150	110	75	55	50	55	26	12	6
Kötőképeség	Bivalens	Bivalens	Bivalens	Bivalens	Monovalens	Monovalens	Monovalens	Monovalens	Nem értelmezhető
Kiürülés útja	Máj	Máj / vese	Máj	Vese	Vese	Vese	Vese	Vese	Vese
Tumorfelvétel									
Kiürülési sebesség									
Tumorpenetráció									

1. ábra Az intakt antitestek, antitestfragmentumok és affitestek legfontosabb tulajdonságainak összefoglalása. (Ruisi Fu által publikált ábra adaptációja¹¹)

Enzimatis emésztéssel vagy géntechnológiával állíthatók elő.^{12,13} Fab' (Fab – fragment antigen-binding – ez a rész felel az antigén felismerésért és kötésért) és (Fab')₂ fragmentumok állíthatóak elő az antitestek papain (2 db Fab és 1 db Fc) vagy pepszin (1 db (Fab')₂ + lebontott Fc) enzimmel történő emésztésével, amelyek egy vagy két antigénkötő régióval rendelkeznek, de hiányzik belőlük az Fc régió. A Fab' fragmentumok már gyorsabb vese kiválasztást és jobb tumorpenetrációt mutatnak, viszont előállításuk nem minden antitestosztályból lehetséges, nagy mennyiségű kiindulási anyag szükséges előállításukhoz, melyek időigényes folyamatok.

A technológiai fejlődés a biotechnológia területén lehetővé tette az antitestek változó régióinak viszonylag egyszerű előállítását, mint például az egyetlen láncból álló változó régió fragmentumok (scFv-k) izolálását, valamint különféle diatestek, minitestek és egyetlen doménből álló antitestvariánsok létrehozását. Ezek a variánsok mind sajátos kötődési és funkcionális jellemzőkkel bírnak.

Az scFv az egyik legnépszerűbb forma, amelyben a VH (Variable domain of Heavy chain) és VL (Variable domain of Light chain) doméneket egy rövid, rugalmas peptidlánc köti össze.¹⁴ Ezek kicsi (26 kDa) fragmentumok, melyekben, ha a linker legalább 12 aminosavból áll, akkor monomerek és monovalensek maradnak. Az egész scFv-t egy génszekvencia kódolja. Amikor a peptid linkert 11 aminosavnál rövidebbre tervezik, az scFv molekula hajlamos önmagával asszociálódni, aminek eredményeként bivalens diatest alakul ki (55 kDa mérettel).¹⁵ Ha a linker hossza még tovább csökken, kevesebb mint 3 aminosavra, akkor három- vagy négyértékű struktúrák jönnek létre, azaz tritestek (80 kDa) és tetratestek (110 kDa). Amennyiben a két változó régió közé genetikailag diszulfidkötés kerül beépítésre, diszulfidhíddal stabilizált Fv fragmentum (dsFv) keletkezik. Ennek peptid linkerrel változata az scdsFv. Ezek az alternatív formák hozzájárulhatnak az scFv típusú fragmentumok stabilitásának javításához, és mérsékelhetik azok aggregációs hajlamát.

A minitestek olyan fúziós fehérjék, amelyek egy scFv régiót kapcsolnak össze az IgG nehézlánc CH3 doménjével. Két ilyen egység természetes módon bivalens dimer struktúrába rendeződik (75 kDa). A bivalens, egyetlen láncú változó régióval rendelkező fragmentumok (bi-scFv-k, 55 kDa) két külön scFv domén genetikai egyesítésével jönnek létre, így képesek két eltérő antigénkötő helyhez kötődni, ami lehetővé teszi számukra a kettős szelektivitást.

A legkisebb olyan antitestfragmentumok, amelyek még mindig képesek specifikusan antigénekhez kapcsolódni, az úgynevezett egydoménes antitestek. Ezek a molekulák a VH vagy VL régióból származnak, illetve tevékhez hasonló fajokból izolálhatók. Az egydoménes antitestek (sdAb-k, 12 - 15 kDa), más néven nanotestek, számos előnyt kínálnak az scFv-kkal szemben: kisebb méretük mellett nagyobb stabilitással rendelkeznek,

előállításuk pedig egyszerűbb. Ezek a tulajdonságok különösen alkalmassá teszik őket radiofarmakon-alapú képalkotásra, ahol fontos a hatékony szöveti áthatolás és a gyors elimináció.

Az affitestek ennél is kisebb méretű, körülbelül 6 - 7 kDa tömegű affinitásfehérjék, amelyek a staphylococcus fehérje A immunoglobulin-kötő régiójának B-doménjéből származtathatók (fágmegjelenítéses technológia segítségével).¹⁶ Tervezett fehérjék, amelyek 58 aminosavból állnak, és három alfa-hélixből felépülő szerkezettel rendelkeznek. Kis méretük, kiváló kémiai, hő- és pH-stabilitásuk, magas affinitásuk (nM tartományban), valamint egyedi C-terminális ciszteinjük együttesen kiváló képalkotó próbává teszik őket, különösen az ImmunoPET alkalmazásokban, ahol ezek a tulajdonságok előnyt jelentenek a jelöléshez és a célba juttatáshoz.¹⁷ Ugyanakkor gyors kiürülésük és viszonylag kisebb affinitásuk a célmolekulákhoz még mindig technológiai kihívást jelent.

II.3. Molekuláris és anatómiai képalkotás – PET/MRI

A radioizotóp-alapú diagnosztikai módszerek közül a pozitronemissziós tomográfia (PET) a legérzékenyebb molekuláris képalkotó technika. A vizsgálat során rövid felezési idejű, pozitronkibocsátó (β^+) radioizotóppal jelölt vegyületet (radiofarmakont) juttatnak a szervezetbe. A jelölt molekula a célszövet(ek) biokémiai/biofizikai folyamataiban vesz részt, majd a radionuklid által kibocsátott pozitron elektronnal találkozáskor megsemmisül (annihilálódik). Ennek hatására két, 511 keV energiájú γ -foton keletkezik, amelyek közel 180° -ban távoznak egymáshoz képest. A gyűrűdetektoros PET-kamera a két foton egyidejű észlelését (koincidenciáját) tekinti jelnek, csak akkor rögzít eseményt, ha a gyűrű átellenes pontjain lévő detektorok egyszerre érzékelik a fotonokat. Így nagy mértékben javul a jel/zaj arány, és pontosabban becsülhető az esemény helye, mint a planáris γ -kameráknál. Több metszeti sík

koincidencia-adataiból a rekonstrukciós szoftver 3D teljes-test PET-képet állít elő. A PET könnyen kombinálható CT-vel vagy MRI-vel, ami egyesíti a molekuláris információt a nagyfelbontású anatómiai képpel.^{18,19}

Az MRI a nem zérus spinű atommagok külső mágneses tér által okozott Zeeman-felhasadását használja fel. A klinikai vizsgálatok során a páciens egy erős mágneses térbe kerül, ahol rádiófrekvenciás impulzusokkal gerjesztik a szövetekben található párosítatlan spinnel rendelkező protonokat. A külső gerjesztés megszűnését követően a protonok a spin-rács (longitudinális) és a spin-spin (transzverzális) relaxáció mechanizmusain keresztül állítják helyre a mágneszettség termodinamikai egyensúlyi állapotát. A vizsgálatok jelentős része kontrasztanyag alkalmazásával történik. A T_1 típusú kontrasztanyagok, mint például a Gd(III)-, Mn(II)- vagy Fe(III)-komplexek, jellemzően a képek világosságát növelik, míg a T_2 típusú ágensek – amelyek általában szuperparamágneses nanorészecskék, például vas-oxid – a képek sötétebb megjelenését eredményezik. A kontrasztanyagok relaxivitása (r_1 , $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) az MRI-ben azt fejezi ki, hogy milyen mértékben növelik a vízprotonok relaxációs sebességét a diamágneses közeghez képest.²⁰

A PET nagy érzékenysége révén képes molekuláris szintű folyamatok követésére, míg az MRI kiváló anatómiai kontrasztot és részletgazdag képeket biztosít.²¹ A PET/MRI kombinációja egyszerre funkcionális és morfológiai információt nyújt, ami különösen előnyös a daganatok diagnosztikájában és a terápiás válasz nyomon követésében. Ez az integrált megközelítés pontosabb célzást, személyre szabott kezeléstervezést és a terápia hatékonyságának korai értékelését teszi lehetővé.²²

II.4. Mn(II)-ion és komplexeinek diagnosztikai alkalmazási lehetőségei

A mangán izotópok iránti érdeklődés az elmúlt években megnőtt, mivel a mangán egyaránt alkalmazható paramágneses MRI kontrasztanyagként és radioizotópként PET képalkotás során. A továbbiakban áttekintjük a Mn-izotópjait, azok jellegzetes fizikai tulajdonságait, valamint az előállításukra szolgáló módszereket, amelyek kulcsfontosságúak a későbbi diagnosztikai alkalmazások szempontjából.

II.4.1. A Mn(II) izotópok sajátosságai

A ^{51}Mn egy rövid felezési idejű ($t_{1/2} = 46$ perc), pozitronkibocsátó izotóp, amely elsősorban gyors farmakokinetikájú vegyületek PET-képalkotására alkalmas. A β^+ energiája viszonylag nagy (2185 keV) a „standard” PET-nuklidnak számító ^{18}F -hez (635 keV) képest, ami kedvezőtlenül hosszú behatolási tartományhoz vezet a szövetekben, és ezáltal a PET-képek térbeli felbontásának a romlását eredményezi.²³

A metastabilis $^{52\text{m}}\text{Mn}$ rövidebb felezési idővel rendelkezik ($t_{1/2} = 21$ perc), mint a ^{51}Mn , és a széles körben használt ^{11}C -hez hasonló, ami tovább nehezíti a radiokémiai kezelhetőségét. A β^+ energiája (2633 keV) még az előbbinél is nagyobb, így a pozitronok szöveti hatótávolsága tovább nő (átlagosan 5,3 mm), jelentősen rontva a PET térbeli felbontását, emellett a bomlása során részben keletkező hosszabb élettartamú ^{52}Mn és a nagy energiájú γ -sugárzás további dózis- és sugárvédelmi aggályokat vet fel.

A $^{52\text{g}}\text{Mn}$ (a továbbiakban ^{52}Mn) hosszú, 5,59 napos felezési idővel rendelkezik, ami előnyös a céltárgytól való tisztítás és a radionuklid kémiai kezelhetősége szempontjából. Ez az időtartam jól illeszkedik lassú biológiai folyamatok, akár antitestek farmakokinetikájának vizsgálatához is. A ^{52}Mn 29%-os β^+ bomlási aránnyal és alacsony maximális β^+ energiával (575 keV) bomlik, ami javítja a

PET-képek térbeli felbontását, azonban három, nagy energiájú γ -foton (744, 936, 1434 keV) jelenléte jelentős sugárterhelést okoz, valamint zavaró jeleket generál a PET-detektorokban, ezért szükség van megfelelő gamma-korrekciós technikák alkalmazására.²⁴

A ^{53}Mn és ^{54}Mn kedvezőtlen bomlási tulajdonságaik (elhanyagolható β^+ emisszió és extrém hosszú felezési idő) kizárják őket a diagnosztikai alkalmazásokból. Ennek ellenére előállítási melléktermékként vagy szennyezőként jelen lehetnek más izotópok (pl. ^{52}Mn) előállítása során, így technológiai szempontból figyelembe kell venni őket.

A természetes $^{55}\text{Mn(II)}$ izotóp 100%-os izotópos eloszlásban fordul elő, és paramágneses tulajdonságait a d^5 elektronszerkezete ($S = 5/2$) biztosítja. A Gd(III)-hoz hasonlóan ($S = 7/2$), a Mn(II) is erősen paramágneses, de kisebb elektronspinszámának köszönhetően kisebb mértékben járul hozzá a relaxációs folyamatokhoz. Ennek ellenére a Mn(II) biológiai kompatibilitása, valamint kisebb toxicitása miatt ígéretes alternatívát jelenthet a gadolínium-alapú kontrasztanyagokkal szemben.

II.4.2. A ^{52}Mn -izotóp előállítása

Az ^{52}Mn -radioizotóp előállítása történhet dúsított ^{52}Cr vagy $^{\text{nat}}\text{Cr}$ természetes izotóp összetételű (83,8% ^{52}Cr , 9,5% ^{53}Cr , 2,4% ^{54}Cr) céltárgyból. Több kutatás is bizonyította a ^{52}Mn előállításának lehetőségét a $^{\text{nat}}\text{Cr}(p,xn)^{52}\text{Mn}$ reakció segítségével, 16 MeV-es ciklotronban.²⁵⁻²⁷ Mivel az energiaküszöbök hasonlóak, $^{52\text{m}}\text{Mn}$ mindig együtt keletkezik $^{52\text{g}}\text{Mn}$ -nal, a $^{\text{nat}}\text{Cr}$ céltárgy protonnal történő besugárzásakor. Illetve a nem dúsított targetanyag használata esetén számolni kell a besugárzás során megjelenő ^{54}Mn szennyezővel is, amelynek hosszú a felezési ideje (312,2 nap). A besugárzáshoz a céltárgyat előkészíthetjük fólia vagy krómporból készült tablettá formájában is.²⁵⁻²⁷

II.4.3. A ^{52}Mn -izotóp tisztítása

A ^{52}Mn -izotóp elkülönítése a céltárgy savas oldásával kezdődik a besugárzást követően. Ezután több módszer is rendelkezésre áll, hogy a céltárgy anyagától elkülönítsük a ^{52}Mn -radioizotópot az így nyert oldatból.

Az elválasztáshoz az irodalom különböző ioncserélő gyanták alkalmazását javasolja. A kationcserés elválasztás gyakran alkalmazott módszer vizes közegben. Valamint az elválasztás kivitelezhető anioncserélő oszlopon is a Mn(II) és a Cr(VI) vagy a Mn(II) és a Cr(III) elválasztására.^{26,28} Ebben az esetben eluensként tömény sósavat használnak abszolút alkohollal kombinálva.^{27,29-32} A folyadék-folyadék extrakciós technika lehet egy másik megoldás. Ez a módszer is hatékony módszer a radioizotópok céltárgytól való elválasztására és tisztítására.³³

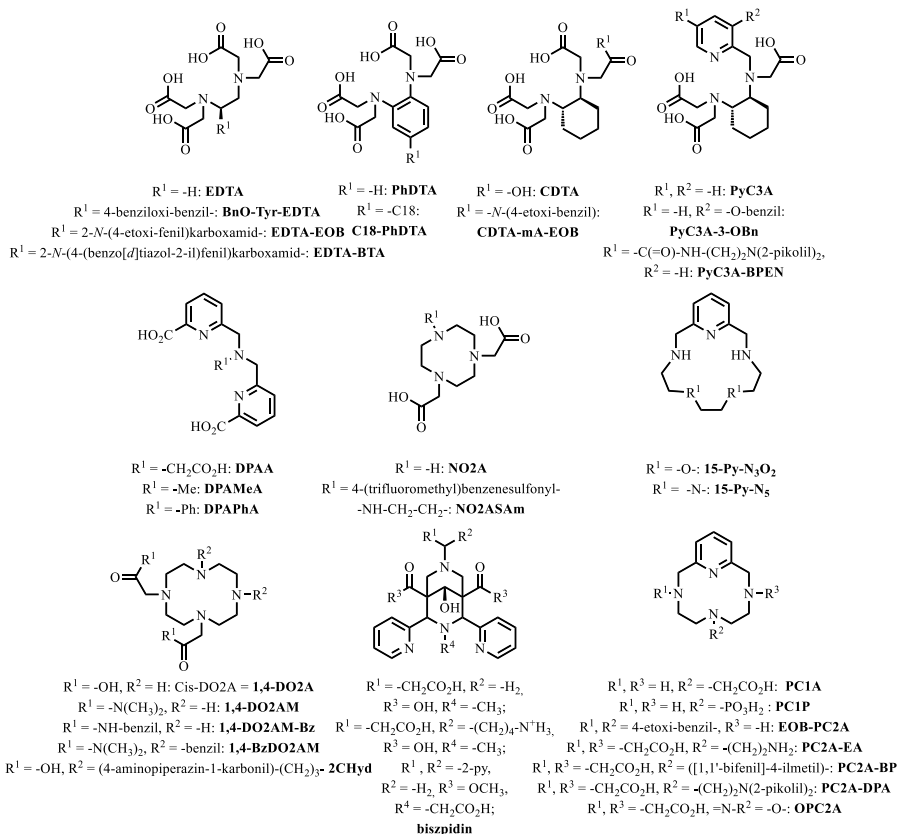
II.5. Mn(II) -ion komplexálására alkalmazott ligandumok szerkezete és a komplexek sajátosságai

A Gd(III) -alapú kontrasztanyagok klinikai alkalmazásának széles körű elterjedése ellenére a szabad Gd(III) -ionok felszabadulása toxikus mellékhatásokhoz, például nefrogén szisztémás fibrózishoz (NSF) vezethet, ami aggodalmat kelt a biztonságosságukkal kapcsolatban.³⁴ A Mn(II) -ion számos kedvező fizikai-kémiai tulajdonsággal és jó toxicitási profillal rendelkezik, ami a klinikumban jelenleg használt Gd(III) -alapú MRI-kontrasztanyagok alternatívájává teszi. A Mn(II) -ion komplexálására javasolt ligandumok köre az elmúlt évtizedben végzett intenzív kutatások eredményeként jelentősen bővült. A komplexképző ligandumokat két csoportra szokás osztani, így a lehetséges ligandumok körének az áttekintése során is ezen csoportosítás mentén mutatjuk be a Mn(II) -ion komplexálására leginkább alkalmas nyíltláncú, valamint a makrociklusos komplexképzőket.

II.6. Nyíltláncú ligandumok.

Lévén, hogy a Mn(II)-ion koordinációs száma a komplexeiben leggyakrabban hat vagy hét, így a komplexálására leggyakrabban penta-, ill. hexadentát kelátorokat javasoltak, mivel az ilyen ligandum lehetőséget biztosít az MRI szempontjából elengedhetetlen, a fémionhoz koordinálódó vízmolekula meglétére.³⁵ A kelátorok ezen csoportjába tartozik pl. az **EDTA** komplexképző és származékai (**2. ábra**). A flexibilis etiléndiamin „egység” (azaz a ligandum alapvázának/gerincének) a merevítésével ugyanakkor lényegesen jobb kinetikai paraméterekkel rendelkező komplexeket sikerült később előállítani (pl. *transz*-**CDTA**, **PhDTA** stb.).³⁶⁻³⁸ A *transz*-**CDTA** kelátorra jellemző merev gerinc megjelenik az egyik, a klinikai kipróbálás II. fázisában lévő Mn(II)-alapú kontrasztanyag-jelölt, a **PyC3A**, szerkezetében is.³⁹ Ezen túl, ezen ligandum szerkezetét bifunkciós kelátorok, valamint intelligens/szerv-vagy szövetspecifikus kontrasztanyag-jelöltek szerkezetébe is beépítették.⁴⁰⁻⁴²

A nyíltláncú kelátorok egy másik jelentős számban előállított és vizsgált vegyületcsaládja a N-dipikolinát-származék komplexképzők érdemelnek említést. Ezen ligandumok rendszerint pentagonális bipiramisos koordinációs geometriát alakítanak ki a Mn(II)-ion körül, amely komplexekben a fémionhoz még két vízmolekula is koordinálódik a piramis csúcsain. Amennyiben a két pikolinátcsoport mellett további koordinálódásra alkalmas donorcsoportok kapcsolódnak (acetát, alfa-metil-acetát, acetamid, pikolil- stb.) a két pikolinátcsoportot tartalmazó nitrogénatomhoz, úgy a kelátok elveszítenek egy koordinálódó vízmolekulát, ami kisebb relaxációs hatást, de stabilabb (és feltehetően inertebb) Mn(II)-komplexeket eredményez.⁴³⁻⁴⁵ Ezen vegyületcsalád szerkezetét az utóbbi időben sikeresen építették be micelláris, angiográfias képalkotásra alkalmas, ill. pH-érzékeny komplexek szerkezetébe is.^{46,47}



2. ábra A dolgozatban tárgyalt összehasonlító ligandumok szerkezeti képletei.

II.7.A (makro)ciklusos ligandumok.

A (makro)ciklusos ligandumok tekintetében a Mn(II)-komplexálására ígertes vegyületek közül a 12-tagú 1,4,7,10-tetraazaciklododekán (**ciklén**), a merevebb **piklén** (3,6,9,15-tetraazabiciklo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trién) kétszeresen helyettesített (acetát, ill. acetamid oldalláncokat tartalmazó származékai), a **15-Py-aneN₅** (15-Py-aneN₅ = 3,6,9,12,18-pentaazabicyclo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-triéne), valamint **15-Py-aneN₃O₂** (15-Py-aneN₃O₂ = 3,12,18-triaza-6,9-dioxabiciklo[12.3.1]octadeca-1(18),14,16-trién) makrociklusok oldalláncok nélküli származékait érdemes kiemelni.⁴⁸⁻⁵² Az itt felsorolt vegyületek közül az **1,4**- helyettesített **DO2A**

esetében (**2. ábra**) voltak olyanok a legfőbb fizikokémiai paraméterek (stabilitás, inertség és relaxációs hatás), hogy elindulhattak az intelligens, ill. szövetspecifikus kontrasztanyag-jelöltek (angiográfiás ágensek, ill. újabban a máj fibrogenezisének detektálásra alkalmas diagnosztikai ágensek) fejlesztése.⁵³⁻⁵⁷

A jelen dolgozat tárgyát képező 3,9-PC2A kedvező fizikokémiai paramétereinek köszönhetően a kutatócsoportunkban az utóbbi időben számos intelligens, illetve szövetspecifikus származékot állítottunk elő és vizsgáltunk (**2. ábra**). Ilyen kelátok segítségével lehetőség nyílt a szervezet érrendszerének MRI-vel történő feltérképezésére (**3,9-PC2A-BP**) angiográfiás képalkotásban, ami komplex és a vérben nagy koncentrációban jelenlévő humán szérum albumin (HSA) fehérjével való kölcsönhatására alapoz. Ezen túl, sikerült előállítanunk pH- (**3,9-PC2A-EA**), ill. a Zn(II)-ion koncentrációjára érzékeny (**3,9-PC2A-DPA**) Mn(II)-komplexeket is, valamint Z. R. Lu és mtsai. májszövet-specifikus ágenszt állítottak elő, igaz a szerzők a **3,6-PC2A** kelátorra alapozták a szövetspecifikus ágensük ligandumát (**3,6-PC2A-EOB**) (lásd később).⁵⁸⁻⁶¹

A merev gyűrűs biszpidin alapú kelátorokat több diagnosztikai értékkel bíró fémion komplexálására javasolták az elmúlt évtizedekben.⁶² Ezen ligandumcsaláddal képződő Mn(II)-komplexek (**2. ábra**) vizsgálata azonban csak az elmúlt négy évben vett komolyabb lendületet ezért nem meglepő, hogy a jelenlegi kutatások Mn(II)-komplexek szerkezete és fizikokémiai paraméterei (stabilitás és szelektivitás, inertség, relaxációs hatás stb.) közötti összefüggések feltárására fókuszálnak.⁶³⁻⁶⁵ Azonban az már most is látható, hogy ez a ligandumcsalád jelentős hatással lesz a Mn(II)-alapú ágensek jövőjére, mivel az eddig vizsgált származékok között rendkívül inert Mn(II)-

komplexeket is találunk, melyhez időnként nem várt szelektivitás is társul az ugyancsak esszenciális Zn(II)-ionnal szemben.⁶⁶

II.8. Bifunkciós (kétfunkciós) és „intelligens” Mn(II)-komplexek

A fiziológiás paraméterek változására reagáló „intelligens” fémkomplexek új dimenziót nyitnak az MRI képalkotásban. A ligandum „szelektívvé tételével” olyan tulajdonságok feltérképezésére válik lehetőség egy adott szöveten belül, mint pl. a pH, a redoxi potenciál, különböző endogén fémionok (Ca(II), Zn(II), Cu(II)) koncentrációja stb. Az egyik ilyen példa egy pH-érzékeny Mn(II)-komplexre, amelyet kutatócsoportunkban fejlesztettünk ki, a [Mn(3,9-PC2A-EA)], ahol etilamin-oldallánc (EA) protonálódása következtében változik a komplex relaxivitása 3,50 és 2,10 mM⁻¹s⁻¹ között a 5,8 - 7,8 pH-tartományban.⁵⁹ pH-érzékeny ágensként triaza-ciklononán származékokat [Mn(NO2ASAm)], [Mn(MPA)] is javasoltak az irodalomban, igaz ezen komplexek a jelenlegi ismereteink alapján nem kellően inerte az *in vivo* vizsgálatokhoz.^{47,67} Az EA molekularész két pikolilcsoportot tartalmazó származéka pedig a Zn(II)-ionok szelektív érzékelésére tette képessé a komplexet egy teljesen más mechanizmus szerint, mivel ezen kelát esetében a fémionhoz koordinálódó vízmolekulák száma az eredmények alapján nem változott. A relaxációs hatást ezen komplex esetében a rotációs korrelációs idő növekedése okozta, ami a Mn(L)Zn heterodinukleáris komplex és a vérérszumban nagy koncentrációban található fehérje, a HSA, közötti kölcsönhatásnak köszönhető.⁶⁰ A redoxi potenciál változásának érzékelésére kiaknázható a Mn(II)/Mn(III) redoxi pár. Ilyen indítással P. Caravan és mtsai. az EDTA ligandum hidroxibenzil-származékait javasolták a Mn(II) oxidációs potenciáljának a finomhangolásához.⁶⁸

A szövetspecifikus vagy megfelelő vektormolekulákkal célzott kontrasztanyagok előállítását az indukálta, hogy ezek bizonyos szövetekben,

ill. szervekben képesek dúsulni, ami lehetőséget ad a vizsgálat során szükséges dózis csökkentésére, ill. láthatóvá tehetnek bizonyos sejt/szövetszintű specifikus folyamatokat. Az irodalomban legtöbb szövetspecifikus ágens példája a májspecifikus kontrasztanyagokkal kapcsolatos, aminek az lehet az oka, hogy a máj ismert betegségein túl (pl. zsírmáj, májcirrózis stb.), elég gyakran jelennek meg áttétek is ebben a szervben. A legtöbb tanulmányban bemutatott ágens esetén a nyíltláncú **EDTA**, ritkábban **transz-CDTA**, újabban **PhDTA** ligandum platformokra alapoznak (**2. ábra**), az eddig publikált egyetlen makrociklusos kelát, a $[\text{Mn}(\mathbf{3,6-PC2A-EOB})]$ -komplex, amely a májsejtekben található szerves aniontraszporter fehérjékre szelektív 4-etoxibenzil funkcióscsoportot tartalmazza.⁶¹

A kardiovaszkuláris képalkotásra használt ún. blood pool ágensek elsősorban a vérben található HSA fehérjéhez kötődve képesek megjeleníteni az érrendszert, mivel ezek kiürülése a kelát és a HSA közötti kölcsönhatás eredményeként lassabb, és az így létrejövő makromolekuláris adduktum nagy relaxivitással bír. Ilyen megközelítéssel többnyire apoláris molekularésszel funkcionizált komplexképzőket használnak (pl. a bifenilcsoportot tartalmazó **3,9-PC2A-BP** ligandum), de számos példát találunk **1,4-DO2A** bisz(amid)-származékaira - ($[\text{Mn}(\mathbf{2CHyd})]$, $[\text{Mn}(\mathbf{1,4-DO2AM})]^{2+}$, $[\text{Mn}(\mathbf{DO2AMGly})]$, $[\text{Mn}(\mathbf{DD-DO2A})]$, $[\text{Mn}(\mathbf{DH-DO2A})]$, $[\text{Mn}(\mathbf{1,4-BzDO2AM})]^{2+}$, $[\text{Mn}(\mathbf{1,4-DO2AMBz})]^{2+}$ - is, melyek a HSA-hoz kötött formái gyakran 10-szer nagyobb relaxivitással rendelkeznek, mint azt az alapkompexek esetében tapasztalták az adduktum megnövekedett rotációs korrelációs idejének köszönhetően.⁵³⁻⁵⁸

A **3,9-PC2A** Mn(II)-kötő motívumot pH-érzékeny kontrasztanyag-jelölt szerkezetébe is beépítettük a kutatócsoportunkban ($[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2A-EA})]$).⁵⁹ A $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2A-EA})]$ -komplex nagy pH-n heptakoordinált, így nem tartalmaz a fémionhoz koordinálódó vízmolekulát (így a relaxációsebességet növelő

hatása is csekély). A pH csökkentése az EA oldallánc aminocsoportjának a protonálódását idézi elő a komplexben, melynek helyét egy vízmolekula veszi át a fémion belső koordinációs szférájában, ami a relaxitás növekedését eredményezi. Hasonló elven működnek a szulfonamid oldalláncokat tartalmazó Mn(II)-komplexek, melyeket C. Platas-Iglesias és munkatársai javasoltak, bár ezen komplexek esetében a kelátok inertségéről nem mutattak be információt (azonban az **NO2A**-száramzékokkal végzett korábbi vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy labilis Mn(II)-komplexek képződtek ezen ligandummal).⁴⁷ Azonban az **NO2A** anyaligandum két acetátcsoportját pikolilcsoportokra cserélve G. Liang és munkatársainak sikerült javítani a Mn(II)-komplexek inertségén.⁶⁷ Ezen vegyületek esetében azonban a legnagyobb hátránya a pH-változás hatására bekövetkező relaxitás különbségek mértéke, ami további finombeállítást igényel.

Az esszenciális fémionok (pl. Zn(II)) mérésére alkalmas Mn(II)-alapú komplexek irodalma is bővült az elmúlt három év során. Talán nem meglepő, hogy az első előállított ilyen vegyület a **PyC3A** (**2. ábra**) ligandumra alapozott.⁴¹ Azonban a **PyC3A** vegyülettel a vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a Mn(II)-kelát nem rendelkezik megfelelő inertséggel, így kézenfekvőnek láttuk ezt a funkciót a pH-érzékenyítés során már bevált **3,9-PC2A** platformra „átvezetni”.⁶⁰ Az előállított **3,9-PC2A-DPA** komplexképző *in vitro* fizikokémiai vizsgálatokban és *in vivo* egérkísérletekben is kiválóan teljesített, amit a prosztatában glükózindukált Zn(II) leadásának a követésével igazoltunk. Ezen csoport harmadik képviselője egy olyan heptakoordinált Mn(II)-komplex, amelyet 13,2 nm méretű porózus szilícium-dioxid nanogömbbe ágyaztak.⁴⁵ Azt, hogy a nanogömb reagáljon a Zn(II)-ionok koncentrációjának a változásra úgy érték el, hogy a felületére Zn(II)-ionokkal stabil komplexet képző kelátor motívumot kapcsolnak, amely Zn(II)-ionok

jelenlétében képes a BSA-hoz kötődni, ami a relaxivitás jelentős növekedését idézte elő.

A bimodális kontrasztanyagok lehetővé teszik, hogy egyszerre több képalkotó módszerrel kapjunk diagnosztikai felvételeket, ezáltal ötvözhetjük az egyes diagnosztikai módszerek előnyeit. Az MRI-vel leggyakrabban kapcsolt technikák a PET, a SPECT és az optikai képalkotás (OI). A Mn(II)-alapú ágensek esetében egyre nagyobb figyelmet kapnak a PET-MRI hibrid képalkotásban alkalmazható bimodális komplexek az irodalomban, mivel a pozitron emittáló ^{52}Mn izotóp kézenfekvő jelölt ilyen irányú alkalmazásokra.^{69,70} A bimodális megközelítés nagy előnye az egyéb PET ágensek (^{18}F , ^{11}C , ^{68}Ga stb.) használatával szemben, hogy elég egy fajta, speciálisan a Mn(II)-ion gyors komplexálására tervezett ligandumot alkalmazni (hiszen azonos biodisztribúciót kapunk a PET és MRI felvételeknél, mivel kémiaailag ekvivalens a stabil és radioaktív izotóp komplexe), az intelligens (pl. pH-érzékeny) ágensek alkalmazása is egyszerűbbé válik. Ebben a kontextusban a pH-érzékeny, „intelligens” MRI-kontrasztanyagok működésének lényege, hogy pH-változásra a komplex relaxivitása módosul (pl. a koordinációs állapot változásán keresztül). Az MRI-ből nyert relaxációs idők önmagukban nem elegendőek a kontrasztanyag koncentrációjának meghatározásához, mivel a mért relaxációs idők a koncentrációtól és a pH-tól is függenek. Ezért megbízható pH-következtetés akkor adható, ha a lokális koncentráció ismert. Ezt a PET képalkotó eljárás biztosíthatja – különösen, ha ugyanazon komplex ^{55}Mn (MRI-aktív) és ^{52}Mn (PET-aktív) izotópparmáinak „koktéliját” alkalmazzuk –, mivel in vivo független információt ad a lokális kontrasztanyag-koncentrációról. Mivel a nem radioaktív és radioaktív izotóppal képzett komplexek kémiaailag azonosak, biodisztribúciójuk is azonosnak tekinthető; így a PET-aktivitáseloszlásból visszakövetkeztethető a moláris koncentráció. A PET-alapú

koncentrációmérés az MRI-vel mért relaxációs változásokkal kombinálva lehetővé teszi a pH (vagy más környezeti paraméter) kvantitatív feltérképezését. Erre példa Malikidogo K. P. és munkatársai munkájában bemutatott megközelítés, amelyben a $^{165}\text{Er(III)}$ - és Gd(III) -komplexek „koktéliját” alkalmazzák a koncentráció kvantitatív meghatározására⁷¹. Az ilyen típusú alkalmazásokban azonban égető szükség van ún. bifunkciós kelátorokra (BFL-kra), amelyek a fémion megkötéséért felelős donorcsoportokon túl biológiai vektormolekulákhoz kapcsolható funkciócsoportokat is tartalmaznak. Ezen vegyületek köre az esetek többségében **EDTA**-ligandumokra korlátozódtak (bár feltehetően ezek Mn(II) -komplexei a $[\text{Mn(EDTA)}]$ -komplexnél valamivel jobb inertséggel rendelkeznek).⁷²⁻⁷⁵

Ahogy az korábban is láttuk, a kinetikai vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a nyíltláncú ligandumok közül a **transz-CDTA**, valamint a **PhDTA** ligandumok Mn(II) -kelátjai kellően inerte ahhoz, hogy ezen ligandumokból BFL-at képezzünk. Ezt kihasználva Vanasschen és mtsai. klikk-reakcióval vektormolekulához kapcsolható **CDTA**-származékot állítottak elő. A ligandum vizsgálatai alapján a BFL kelátor komplexkémiai tulajdonságai kicsivel jobbnak is bizonyultak a **CDTA** anyavegyülethez képest és a duális képalkotásra is alkalmasnak találták.⁷⁶ Valamivel később, hasonló megfontolásokat követve P. Caravan és munkatársai a **PyC3A** ligandumot alakították át BFL-má.⁷⁷ Optikai képalkotásra is alkalmas Mn(II) -komplexeiket is állítottak elő az **EDTA** bisz(amid)-származékának fluorofórokkal való funkcionálásával, ezeknek a komplexeknek a relaxivitása MR képalkotásra is alkalmassá teszi a kelátokat.⁷⁸

III. CÉLKITŰZÉS

A jelen dolgozat célja a Mn(II)-ion komplexálására alkalmas kelátorok szerkezetének célzott fejlesztése és finomhangolása, a korszerű molekuláris *in vivo* képalkotásban való alkalmazás érdekében.

A kutatás legfőbb célja olyan kelátorplatform kialakítása volt, amely Mn(II)-komplexe megfelel mind a PET, mind az MRI diagnosztikai készítmények kialakításához szükséges követelményeknek. A kutatás következő célja a megfelelő paraméterekkel rendelkező platform bifunkciós ligandumok szerkezetébe való „adaptáció” volt. További céljaink között szerepelt olyan bifunkciós ligandumok előállítása, amelyek ezen platformra épülnek, és lehetővé teszik a különböző minőségű donortomokat tartalmazó oldalláncok hatásának szisztematikus vizsgálatát a komplexek relaxivitására, termodinamikai stabilitására, kinetikai inertségére, valamint a [⁵²Mn]Mn(II)-ionnal való jelölhetőségre. A legjobban teljesítő bifunkciós ligandum biovektor molekulaként alkalmazható vegyülettel (HER2+ mellrák specifikus antitesttel vagy affitesttel) konjugálni, tisztítani és jellemezni, majd *in vivo* kísérletes modellekben is vizsgálni azok biológiai viselkedését, képalkotási hatékonyságát és stabilitását.

Az *in vivo* egérkísérletekre alapozva a kutatás további célja annak vizsgálata volt, hogy a ligandum szerkezetének merevítése és a komplexképzési tulajdonságok optimalizálásával kriptandszerű, keresztkötött ligandumok létrehozásával javítható-e a Mn(II)-komplexek stabilitása és kinetikai inertsége. Ezen túl, célul tűztük ki ezen, új ligandumcsalád bifunkciós változatainak előállítását és fizikai-kémiai jellemzőik részletes összehasonlító elemzését, annak érdekében, hogy feltárjuk azokat a szerkezeti tényezőket,

amelyek a Mn(II)-alapú bimodális kontrasztanyagok diagnosztikai teljesítményét és hosszú távú stabilitását leginkább befolyásolják.

IV. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK ÉS KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK

IV.1. A makrociklusos ligandumok és komplexeik előállítására és szerkezetük igazolására során alkalmazott módszerek

A kiindulási reagenseket és oldószereket a Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA), Tokyo Chemical Industry (Tokió, Japán) és a Fluorochem (Hadfield, Glossop, UK) cégektől vásároltuk meg és további tisztítás nélkül használtuk fel. Az előállított anyagok azonosságának, valamint tisztaságuk jellemzéséhez NMR spektroszkópiát használtunk (^1H , ^{13}C -zgdc és ^{13}C -JMOD) 298,0 K-en Bruker Avance DRX 360 MHz (360,13 MHz - ^1H , 90,55 MHz - ^{13}C), Bruker Avance I 400 MHz (400,13 MHz - ^1H , 100,62 MHz - ^{13}C) vagy Bruker Avance II 500 MHz (500,13 MHz - ^1H , 125,77 MHz - ^{13}C). A kémiai eltolódásokat (δ) referenciaoldószer-csúcsokhoz kalibráltuk (CDCl_3 -ban ^1H , $\delta = 7,26$ ppm és ^{13}C , $\delta = 77,16$ ppm; D_2O -ban ^1H , $\delta = 4,79$ ppm; ^1H , $\delta = \text{CD}_3\text{OD}$ -ban 3,31 ppm és ^{13}C , $\delta = 49,00$ ppm, CD_3CN -ben ^1H , $\delta = 1,32$ ppm and ^{13}C , $\delta = 118,26$ ppm, DMSO-d_6 -ban ^1H , $\delta = 2,50$ ppm és ^{13}C , $\delta = 39,52$ ppm).⁷⁹ A ^{13}C -JMOD (J-modulált) spektrum a ^{13}C jelek multiplicitását (metil: kvartett, metilén: triplétt, metin: dublett, kvaterner: szinglett) a teljesen ^1H lecsatolt ^{13}C spektrum jeleinek fázisában tükrözzük vissza SEFT (Spin-Echo Fourier Transform) technikát használva. A spektrumokban a metil és metin szénatomok jelei (páratlan hidrogénszám) pozitív, a metilén és kvaterner szén (páros hidrogén) negatív fázisú jeleket adnak. A termékekről a nagy felbontású tömegspektrumokat (HRMS) a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén Agilent 7100-as kapilláris elektroforézis (CE) készülékkel (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) kapcsolt Bruker maXis II UHR ESI-QTOF tömegspektrométerrel (Bruker Corp., Billerica, MA, USA) készítették el. A kapcsolatot kapilláris elektroforézis - elektropray ionizációs

(CE-ESI) Sprayer interface (G1607B, Agilent) biztosította, a mintabevitel pedig 70 cm x 75 µm méretű kapillárison keresztül történt elválasztás nélkül (Polymicro, Phoenix, AZ, USA). A tömegspektrométert 4.1-es verziójú otofControl szoftvert (build: 3.5, Bruker) vezérelte, a spektrumok feldolgozását pedig 4.4-es verziójú Compass DataAnalysis szoftverrel dolgoztuk fel (build: 200.55.2969, Bruker). Az MS mérések a következő paraméterekkel készültek: pozitív ionizációs mód; 0,8 bar porlasztó nyomás, 200 °C szárítógáz-hőmérséklet, 4,5 L/min szárítógáz-áramlási sebesség, 3500 V kapilláris feszültség, -500 V end plate offset, 1 Hz spektrális felbontás, 50-1600 m/z tömegtartomány. A fehérjéket tartalmazó mintáknál a következő paraméterek voltak eltérőek: 0,6 bar porlasztó nyomás, 4,0 L/min szárítógáz-áramlási sebesség, 4500 V kapilláris feszültség, 300-2200 m/z tömegtartomány. A belső m/z kalibráláshoz nátrium-formiátot használtak minden minta esetén.

A reakciók követéséhez, a termékek tisztításához a kromatográfiás módszerek kidolgozásához, illetve a termékek tisztaságának ellenőrzéséhez az analitikai nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) méréseket Waters Alliance 2690/5 HPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA) készülékkel végeztük, amely Waters 996 PDA diódasoros detektorral és Waters Alliance típusú kolonnatermosztáttal volt ellátva. A méréseket gradiens elúcióval, 25 °C-on, 1,00 mL/min áramlási sebességgel kiviteleztek, Luna C18(2) (150 mm × 4,6 mm, 100 Å, 3 µm vagy 5 µm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA), YMC-Pack ODS AQ (150,0 mm × 4,6 mm, 120 Å, 3 µm, YMC Co.,Ltd., Kiotó, Japán) vagy Waters XBridge Shield RP18 (130 Å, 2,5 µm, 75 × 4,60 mm, Waters Corp., Milford, MA, USA) kolonnán. Az eluensek elkészítéséhez MilliQ hátromszorosan ioncserélt 0,2 µm-en szűrt vizet, illetve gradiens kromatográfiában használható minőségű acetonitrilt, metanolt és TFA-t (VWR International Kft.) használtunk. A méréseket és az eredmények

kiértékelését Waters Empower 3 szoftver segítségével kiviteleztek. A mikrohullámú aktiválást igénylő reakciókat CEM Discover típusú mikrohullámú szintézisreaktorban (CEM Corp., Matthews, NC, USA) végeztük, dinamikus (állandó hőmérsékletű) üzemmódban és a reakciók során erős keverést alkalmaztunk.

A termékek normál-fázisú folyadékkromatográfiás (flash NP-LC) tisztítását CombiFlash® EZ Prep kompakt (flash/preparative) kromatográfiás rendszeren (Teledyne Isco Inc., Lincoln, NE, USA) végeztük, amely beépített diódasoros detektorral (PDA) rendelkezik, az elválasztások pedig RediSepRf® Gold szilikagél eldobható flash kolonnán (40 gram, 60 Å, 20 - 40 µm, Teledyne Isco Inc., Lincoln, NE, USA) történtek. A preparatív fordítottfázisú tisztításokat (prep RP-HPLC) pedig moduláris YL91110s kvaterner pumpával és YL9120s UV/Vis detektorral szerelt YL9100 (YoungIn Chromass, Anyang-si Dél-Korea) kromatográfiás rendszeren végeztük, Luna C18(2) preparatív kolonnán (250 mm × 21,2 mm, 100 Å, 5 µm vagy 10 µm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) gradiens elúciót és 25,00 mL/min áramlási sebességet alkalmazva. Az eluensek elkészítéséhez itt is MilliQ hátromszorosan ioncserélt 0,2 µm-en szűrt vizet, illetve gradiens kromatográfiában használható minőségű acetonitrilt, metanolt és TFA-t (VWR International Kft.) használtunk. A fehérjék és konjugátumok analíziséhez XBridge Peptide BEH C18 OBD kolonnát (150 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 µm, Waters Corp., Milford, MA, USA), a tisztításukhoz pedig XBridge Peptide BEH C18 OBD Prep kolonnát (150 mm × 10,0 mm, 300 Å, 5 µm, Waters Corp., Milford, MA, USA) használtunk.

IV.2. Egyensúlyi, relaxometriás mérések és a komplexek kinetikai vizsgálatai

A ligandum protonálódási állandóit ($\log K_i^H$) a következőképpen adhatjuk meg:

$i = 1, 2, \dots, 5$, $[H_{i-1}L]$ a ligandum ($i = 1$) ill. annak protonált formái ($i = 2, \dots, 4$), és $[H^+]$ a hidrogénion egyensúlyi koncentrációja.

A fémkomplexek stabilitási, valamint protonálódási állandóit a következőképpen definiálhatjuk:

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (2)$$

$$K_{MH_iL} = \frac{[MH_iL]}{[MH_{i-1}L][H^+]} \quad (3)$$

$$K_{MLOH} = \frac{[ML]}{[MLOH][H^+]} \quad (4)$$

ahol és $i = 1$ a protonált komplexre. Az analitikai vizsgálatok esetén használt vizes oldatok elkészítésénél háromszorosan ioncserélt Milli-Q[®] vizet használtunk. A $MnCl_2$ és $ZnCl_2$ törzsoldatokat analitikai reagens minőségű vegyszerekből készítettük és a koncentrációjukat a komplexometriás titrálással határoztuk meg standardizált **Na₂H₂EDTA** törzsoldattal. A $MnCl_2$ titrálásához eriokrómfekete T indikátort használtunk, aszkorbinsav, kálium-hidrogéntartarát 10-es pH-jú ammónium-klorid puffer jelenlétében. A $ZnCl_2$ törzsoldat esetén a minta pH-ját hexaminnal 6-os fölé állítva xilenolnarancs indikátor mellett titráltuk.

Az egyensúlyi vizsgálatokat pH-potenciometriás titrálással végeztük, kivéve a **3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}** ligandum Mn(II)-komplexe esetén, ahol különmintás ¹H-relaxometriát használtunk a kelát lassú képződése miatt. A titrálás során kapott térfogat-pH adatpárokat ill. a különminták esetén kapott pH-relaxivitas adatpárokat PSEQUAD program segítségével illesztettük.⁸⁰ A titrálásokat

Metrohm 785 DMP Titrino automata titrátor segítségével végeztük, és a pH méréséhez Metrohm 6.0234.100 kombinált pH-elektrodot használtunk (Metrohm AG, Herisau, Svájc), melyet kétpontos kalibrációs módszerrel kalibráltunk be 4,005-es pH értékű kálium-hidrogén-ftalát és 9,177-es pH értékű nátrium-tetraborát pufferek alkalmazásával. Az adott körülményekre jellemző elektród diffúziós potenciált figyelembe vevő korrekciós (A) faktort, valamint vízionszorzatot (pK_v) a minta titrálása előtt Irving és mtsai. által javasolt módszerrel határoztuk meg.⁸¹ Az értékeket 0,02 M-os HCl oldat 0,15 M NaCl ionerősség melletti titrálási görbéjéből számoltuk, a korrekciós faktort a savas tartományban ($pH < 2,5$) mért és számolt pH értékek különbségének átlaga, míg a vízionszorzatot a lúgos tartományban ($pH > 11,0$) számolt pOH és mért pH korrigált összegének átlaga adta.

A ligandumok protonálódási állandóit ill. Mn(II)-komplexeik stabilitási állandóit 2,5 mM-os ligandumoldat Mn(II)-ion nélkül ill. jelenlétében, standardizált, elhanyagolható karbonáttartalmú NaOH-oldattal történő titrálásával határoztuk meg 1,75 - 11,80 pH-tartományban, 5 μ L-es részletekben adagolva és 40 s egyensúly beállási időt hagyva a mintának. A minták összterfogata 5 mL körüli volt, a pontos térfogatot az automata pipetták térfogatkalibrációja után kaptuk meg, amit a bemérések után ismert hőmérsékletű víz mérlegen lemért tömegének segítségével számoltunk. A minták 0,15 M NaCl ionerősséget tartalmaztak, a titrálóedényt végig 25,0 °C-on tartottuk és a titrálást N₂ atmoszféra alatt végeztük. A relaxometriás vizsgálatokhoz Bruker minispec mq20 (0,47 T) és mq60 (1,41 T) (Bruker Corp., Billerica, MA, USA) asztali relaxométereket használtunk.

A **3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}** ligandum Mn(II)-komplex stabilitásának meghatározásához alkalmazott különmintás módszer esetén tíz, ligandumot és a Mn(II)-iont (2,0 mM koncentrációban) tartalmazó, állandó ionerősségű (0,15 M NaCl) mintát készítettünk 1,66 - 4,73 pH-tartományban, majd két

hétig vártunk az egyensúly beálltára, és ezt követően megmértük T_1 és T_2 relaxációs idejüket 25 °C hőmérsékleten és 1,41 T térerőn. A mérést további két hét elteltével megismételtük annak érdekében, hogy a mintákban biztosan beálljon az egyensúly, majd ezt követően megmértük a pontos pH-értéküket.

A komplexek relaxivitását (r_{1p} és r_{2p}) 4 ligandum felesleget és 4 Mn(II)-ion felesleget tartalmazó, állandó ligandum koncentrációjú és változó Mn(II)-koncentrációjú minták relaxometriás mérésével határoztuk meg, kivéve a $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{8\text{O}2}\text{PCBn}^p\text{CO}_2\text{H})]$ esetén, ahol a minták az előre elkészített komplexet tartalmazták változó koncentrációban. A minták összterfogata 0,3 - 0,4 ml volt és 0,15 M NaCl ionerősséget, valamint 0,05 M 7,4-es pH értékű 2-[4-(2-Hidroxietyl)-1-piperazinil]-etánszulfonsav (HEPES) puffert tartalmazott. A mintatér hőmérsékletét 25,0 ill. 37,0 °C-ra állítottuk be, amit termosztáttal szabályoztunk. A vizsgált komplexek r_{1p} értékeit inverzió visszaépülés módszerével ($180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$) határoztuk meg, 10-14 különböző τ késleltetési idővel kapott 3 - 6 mérés átlagolásával, míg az r_{2p} értékeit Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin-echo szekvenciával, minden esetben minimum 6 T_1 idő késleltetéssel a mérések között. A relaxitás értékeket a Mn(II) bemérési koncentráció – relaxációs sebesség adatpárookra illesztett egyenes meredekségéből kaptuk.

A relaxitás pH-függését relaxometriás titrálással vizsgáltuk, mely során a pH-pontenciometriás komplex stabilitás meghatározásánál ismertetett módon állítottuk össze a titrálási mérést, és a titrálás előrehaladtával bizonyos pH-egységenként mintákat vettünk. A 300 - 400 μL térfogatú minták kivétele előtt a lúg adagolását leállítottuk, ezután T_1 és T_2 relaxációjukat 25 °C-ra termosztálva, 1,41 T térerőn mértük. A mérés végeztével a relaxcsőben lévő folyadékot visszatettük a titrálóedénybe, leolvastuk a pH-t, majd folytattuk a titrálást. A mérési adatok feldolgozásánál a kapott relaxációsebességekből kivontuk a víz adott körülményekre vonatkozó diamágneses hozzájárulását

($R_{1d} = 0,34 \text{ s}^{-1}$, $R_{2d} = 0,49 \text{ s}^{-1}$ ($I = 0,15 \text{ M NaCl}$)), és a hígulással korigált Mn(II)-koncentrációval normáltuk, ami az r_{1p} értékeket eredményezte. A mért pH értékeket szintén a fentebb részletezett módon meghatározott A faktorial korigáltuk.

A **PC2A**-származékok inertségének vizsgálatához az irodalomban gyakran alkalmazott, Caravan és mtsai. által javasolt körülményeket használtuk. A Zn(II)-ionok által kiváltott fémioncsere-reakciót a T_2 relaxációs idők időbeli változásának mérésével követtük nyomon, 6,0-os pH-n, amelyet 50 mM-os 2-(*N*-morfolino)-etánszulfonsav (MES) pufferrel állítottunk be.⁷⁷ A minták 1 mM Mn(II)-komplexet és 25 ekvivalens Zn(II)-ion felesleget tartalmaztak, a reakciót 37,0 °C-on, 1,41 T térerőn követtük. A 25 ekvivalens Zn(II)-ion jelenléte biztosította a pseudo-elsőrendű kinetikai feltételeket, így a látszólagos sebességi együttható az alábbi egyenletre való illesztéssel volt

$$R_t = R_\infty + (R_0 - R_\infty) * e^{-k_{obs}t} \quad (5)$$

ahol R_t , R_0 , illetve R_∞ rendre a t időpillanatban, a reakció kezdetekor és az egyensúly beállása utáni, illetve R_2 relaxációsebesség értékeit jelöli.

A keresztkötött származékok esetén a Mn(II)-komplexek inertségét H^+ -kompetíció által kiváltott disszociáció mérésével határoztuk meg. Ehhez tíz, 0,1-1,0 M, pontosan ismert koncentrációjú sósavat tartalmazó mintát készítettünk, melyek összterfogata 300 μL volt és 1 mM Mn(II)-komplexet, valamint 1,0 M ionerősséget tartalmazott, amit a HCl és NaCl összkoncentrációjából adódott. A reakciókat 25,0 °C-ra termosztálva követtük a minta T_2 relaxációs időinek 1,41 T térerőn való mérésével.

A keresztkötött származékok komplexképződési sebességét 1 - 1 mM ligandum és MnCl₂ reakcióját követve vizsgáltuk relaxometriásan. A minták 300 μL összterfogatúak voltak és 0,05 M 7,4-es pH értékű HEPES puffert, valamint 0,15 M NaCl ionerősséget tartalmaztak. A képződési reakciót 25,0 °C-on on ill. 37,0 °C-on, 1,41 T térerőn követtük a T_2 relaxációs idők mérése

segítségével. Az így kapott adatokat másodrendű kinetikai modell segítségével illesztettük az alábbiak szerint:

$$R_t = \frac{R_0 + R_0 R_\infty k' t - R_\infty^2 k' t}{1 + R_0 k' t - R_\infty k' t} \quad (5)$$

ahol $k' = (R_0 - R_\infty) * c_0 * k_{obs}$, melyből c_0 a kiindulási reaktánsok koncentrációja (amelyek egyenlők egymással), k_{obs} a látszólagos moláris másodrendű sebességi együttható, k' a látszólagos relaxivitás-változás másodrendű sebességi együtthatója, t az eltelt idő, valamint R_t , R_0 illetve R_∞ rendre a t időpillanatban, a reakció kezdetekor és az egyensúly beállása utáni R_2 relaxációsebesség értékeit jelöli.

Az integrált másodrendű sebességi egyenletből megadhatjuk a sebességi állandó ismeretében egy reakció adott konverziójáig való lejátszódásához szükséges időt, a reakció érdemi végbemenetelét így 99%-os konverziónak véve a reakcióidőt az alábbi egyenlettel számolhatjuk:

$$t = \frac{99}{c_0 k} \quad (6)$$

ahol c_0 a kiindulási reaktánsok koncentrációja (amelyek egyenlők egymással), k a másodrendű sebességi együttható, t pedig a reakcióidő.

IV.3. Ligandumok jelölés optimalizálása [^{52}Mn]Mn izotóppal (Atommagkutató Intézet)

A kísérleteket a HUN-REN az Atommagkutató Intézet (Debrecen) Ciklotron Alkalmazási Laboratóriumában végeztük.

IV.3.1. A [^{52}Mn]Mn radioizotóp előállítás

A radiokémiai kísérletekhez használt összes oldószer “trace grade” tisztasú volt, ami ppb szintű fémionmentességet jelent. Az ultranagy tisztaságú HCl-ot a VWR-től vásároltuk. A ^{52}Mn izotópot 18 MeV-os protonnyalábbal történő

besugárással állítottuk elő természetes Cr targeten $^{52}\text{Cr}(p,n)^{52}\text{Mn}$ reakcióban HUN-REN Atommagkutató Intézet (Debrecen) MGC-20 típusú ciklotronjában. Az aktivitásméréseket AtomLab 500 dóziskalibrátorral végeztük. Az előállított $^{52}\text{Mn}]MnCl_2$ radioizotóp tisztítását egy korábban közölt módszer alapján végeztük, amely AG[®] 1-X8 (200-400 mesh, 115×15 mm, kloridos forma, Bio-Rad) típusú anioncserélő gyantát és tömény sósavat használ.²⁷ A besugárzást követően a céltárgyat egy éjszakán keresztül 6M-os HCl-ban oldottuk, hogy a krómot és a képződött mangánt klórokomples anion formába vigyük. Az oldatok óvatos szárazra párlását követően 4 mL tömény sósavban oldottuk vissza a mintát, amelyet ezután oszlopra vittünk fel. A mintafelvitelt megelőzően az oszlopot 3-szoros kolonnaterárfogatú tömény sósavval előkondicionáltunk. A kolonnát kb. 25 mL tömény sósavval mostuk, miközben a CrCl_3 (zöld szín) eluálódott az oszlopról, majd ezt követően kb. 15 mL 6M-os HCl-al eluáltuk a ^{52}Mn radioizotópot. A radioizotópot tartalmazó frakciókat bepároltuk, majd visszaoldottuk Milli-Q vízben. Az elválasztás után ^{52}Mn izotópot tartalmazó oldatok átlagosan 50 MBq aktivitásúak voltak 200 μL térfogatban.

IV.3.2. A 3,9-PC2ABn^{pCO₂H}, a 3,9-PC2MABn^{pCO₂H} és a 3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H} bifunkciós ligandumok jelölés optimalizálása [⁵²Mn]Mn radioizotóppal

Vizsgáltuk a **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**, a **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}** és a **3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}** ligandumok ^{52}Mn radioizotóppal történő jelölési hatékonyságát különböző ligandumkoncentrációk esetén (**3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**: 2,19, 21,9, 219 μM , és 2,19 mM; **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}**: 2,07, 20,7, 207 μM , és 2,07 mM; **3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}**: 1,69, 16,9, 169 μM , és 1,69 mM) szobahőmérsékleten, illetve a **3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}** esetén 37 °C, 50 °C, és 85 °C-on is. A minták készítésekor 1 μL Milli-Q vízben oldott ^{52}Mn (~70 kBq)

oldatot adtunk 300 μL különböző koncentrációjú kelátor oldatokhoz, amelyek 5 mM HEPES puffert ($\text{pH} = 7,0$) tartalmaztak. A reakcióelegyek időbeli lefutását Gabi Star RA (250 μL loop, Raytest, Straubenhardt, Németország) radioaktivitás detektorral ellátott HPLC kromatográfias rendszer (Knauer Smartline, Berlin, Németország) segítségével vizsgáltuk. Az analízisekhez YMC-Pack ODS AQ (150,0 mm \times 4,6 mm, 120 Å, 3 μm , YMC Co.,Ltd., Kiotó, Japán) fordítottfázisú kolonnát használtunk, 1,00 mL/min áramlási sebességet és gradiens elúciót (A eluensként: 20 mM foszfát puffer $\text{pH} = 6,0$ B eluensként: acetonitrilt). A **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**, **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}** ligandumok esetén 5 perc, valamint 0,5, 1,0, 1,5 és 2,0 óra után vettünk mintát, a **3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}** ligandum esetén kiegészítettük a 4,0, 5,0 és 6,0 órás mintákkal, mivel a nem radioaktív izotóppal végzett vizsgálatoknál azt tapasztaltuk, hogy a bisz(amid)-szárazék lassabban képez komplexet Mn(II)-ionnal, mint a többi vizsgált származék.

IV.3.3. A 3,9-CB⁸⁰²PC és a 3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H} kriptát típusú ligandumok jelölés optimalizálása [⁵²Mn]/Mn radioizotóppal

A **3,9-CB⁸⁰²PC**, ill. a **3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}** ligandumok szerkezetükből adódóan még nagy pH-n is lassan képeznek komplexet, így ezen vegyületek esetében a cél nem a kelátor koncentráció vagy a pH hatásának a vizsgálata volt a jelölésre, hanem azt feltárni, hogy képesek-e egyáltalán megfelelő mértékben megkötni a ligandumok a radioizotópot. A **3,9-CB⁸⁰²PC** alapligandum esetén a jelöléseket 1,0 mM, míg a **3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}** esetén 5,0 mM ligandum koncentrációnál végeztük el, szobahőmérsékleten, valamint 90°C-on, ill. 6,0-os, 7,0-es és 8,0-as pH-n.

IV.3.4. [^{52}Mn]/[Mn(3,9-PC2ABn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$)], [^{52}Mn]/[Mn(3,9-PC2MABn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$)], [^{52}Mn]/[Mn](3,9-PC2AMP $^{\text{pip}}$ Bn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$)] radioaktívan jelölt komplexek transzkelációja transz-CDTA kicserélő ligandummal

A [^{52}Mn]/[Mn(3,9-PC2ABn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$)], [^{52}Mn]/[Mn(3,9-PC2MABn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$)], [^{52}Mn]/[Mn](3,9-PC2AMP $^{\text{pip}}$ Bn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$) aktív komplexek transzkelációs reakcióit *transz*-CDTA-val a következőképpen vizsgáltuk. A jelzett komplexeket frissen készítettük: 300 μL ligandumra nézve 20 μM -os (3,9-PC2ABn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$: 21,9 μM ; 3,9-PC2MABn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$: 20,7 μM ; 3,9-PC2AMP $^{\text{pip}}$ Bn $^{p\text{CO}_2\text{H}}$: 16,9 μM), HEPES pufferre nézve 5 mM-os mintákhoz adtunk 1,0 μL ^{52}Mn -t (~ 70 kBq, Milli-Q vízben feloldva), majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációs idő elteltével 6,6 μL 100 mM koncentrációjú *transz*-CDTA oldatot adtunk az elegyhez és a **IV.3.2.** fejezetben részletezett HPLC-s módszer segítségével követtük a reakciókat 1-, 4-, 8-, 12-, 24-, 48-, és 96 órás időpontokban történő mérésekkel.

IV.4. Ligandumok jelölés optimalizálása [^{52}Mn]/Mn izotóppal (Scanomed Kft.)

A kísérleteket a Scanomed Kft. debreceni kutató laboratóriumában végeztük.

IV.4.1. A ^{52}Mn radioizotóp előállítása

A ^{52}Mn előállítását a Scanomed Kft. debreceni telephelyén szintén ciklotronban állítottuk elő, magnézium mátrixban kevert természetes krómpor 14 MeV protonnyalábbal történő besugárzásával. A besugárzott céltárgy magnézium tartalmát 10% (m/m) HNO_3 -ban oldottuk, majd a visszamaradt króm port 3 mL vízzel mostuk kétszer, a maradék HNO_3 eltávolítása érdekében Ezt követően a maradékot 2 mL tömény sósavban oldottuk fel 95 °C-on 1,5 óra alatt. Az oldatot abszolút etanollal hígítottuk úgy, hogy a tömény HCl

végkoncentrációja 3% (V/V)-os 10,82 M-os HCl legyen abszolút etanolban. Ezt AG 1-X8 (350 mg) anioncserélő oszlopra vittük fel, amelyet előzetesen 5 mL 0,1 M-os ultratiszta HCl-al, 10 mL ultratiszta vízzel és 10 mL 3% (V/V)-os 10,82 M-os HCl-al (abszolút etanolban) kondicionáltuk majd a $[^{52}\text{Mn}]\text{MnCl}_2$ -ot 0,5 mL ultratiszta 0,1 M-os HCl-al eluáltuk. Ezután a kapott frakciót szárazra pároltuk és a teljes tisztítási lépést még kétszer megismételtük, a második és harmadik lépésben a száraz $[^{52}\text{Mn}]\text{MnCl}_2$ -ot 300 μL 10,82 M ultratiszta HCl-ban oldottuk fel majd 9,7 mL abszolút etanollal hígítottuk. A második és harmadik tisztítás során már csak 300 és 250 mg-os gyantatöltetet használtunk. Ezt követően a jelölést zavaró fémionok (vas, cink és réz) eltávolítása végett elvégeztünk még egy rövid tisztítást. A harmadik tisztítást követően a ^{52}Mn oldatot (0,1 M HCl) szárazra pároltuk, majd visszaoldottuk 200 μL 3 M HCl-ban, amit ezúttal egy 100 mg-os 3 M-os HCl-dal kondicionált DGA gyantára vittünk fel. A ^{52}Mn izotópot 2 x 150 μL 3 M-os HCl-al eluáltuk és a gyűjtött frakciókat szárazra pároltuk, majd 0,1 M-os ultratiszta HCl-ban oldottuk vissza. Az oldatok aktivitását ISOMED 2010 típusú dóziskalibrátorral mértük meg ^{52}Mn -csatornán, amelyeket gammamérésekkel kalibráltunk.

IV.4.2. A 3,9-PC2ABn^{pCO₂H} ligandum részletes jelölés optimalizálása [⁵²Mn]Mn radioizotóppal

A Scanomed Kft. munkatársaival részletesen vizsgáltuk a pH, a hőmérséklet és a ligandumkoncentráció hatását az állatkísérletekhez kiválasztott **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** ligandum ^{52}Mn izotóppal történő jelölésére. A pH és a **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** ligandum koncentrációjának hatását vizsgáltuk a radiokémiai tisztaságra (RCP - radiochemical purity) 1, 3, 10 és 30 μM -os ligandumkoncentrációknál 3 - 7 közötti pH-tartományban. A reakciókhoz 10 μL $[^{52}\text{Mn}]\text{MnCl}_2$ oldatot (~200 kBq), 80 μL pufferoldatot és 10 μL 10, 30, 100

vagy 300 μM -os ligandumoldatot kevertünk össze a megfelelő ligandumkoncentráció eléréséhez. A 4 - 6 közti pH-tartományban nátrium-acetátot (0,5 M; ultratiszta), míg 7 - 8 közötti pH-tartományban HEPES (0,5 M; cellpure[®]) használtunk pufferként. A reakciókat Eppendorf csövekben végeztük 5 perces reakcióidővel 25 és 95 °C-on szárazfürdőben. A **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** ligandum ⁵²Mn izotóppal történő jelölését Raytest miniGita Star vékonyréteg kromatográfiás szkennelvel követtük. A reakcióelegyekből 3 μL -eket cseppentettünk szilikagéllel impregnált üveg makroszálás kromatográfiás papírra (iTLC-SG), amelyet 0,5 M-os nátrium-citrát (pH = 5,5) eluenssel futtattunk. A ⁵²Mn(II)-ion citrát komplex formában eluálódott az oldószer fronttal ($R_f = 0,8 - 1,0$), míg a [⁵²Mn[Mn(**3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**)]] komplex retenciós tényezője 0,1 - 0,2 között volt.

IV.5. Kisállat PET/MRI képalkotás

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága engedélyezte (engedélyszám: 16/2020/DEMÁB). A laboratóriumi állatok tartása és kezelése az Európai Unió állatjóléti irányelveinek és rendeleteinek és a magyar törvények vonatkozó paragrafusainak megfelelően történt.

A tumor indukciójához 4T1 (tripla negatív egér emlőrák) és MDA-MB (HER2+, HER2 túlexpresszált emberi emlőrák) sejtvonalakat használtunk. A sejtvonalakat a Debreceni Egyetem biztosította számunkra. A tanulmány során 14 hetes nőtény CB17 SCID egereket ((n = 3); Animalab Kft., Budapest) használtunk. Az egereket steril körülmények között, egyedileg szellőztetett ketrecben (IVC - individually ventilated cages) tartottuk és ad libitum (adagolás nélkül) módon kaptak steril táplálékot és vizet. Egy egeret MDA-MB (HER2+), két egeret pedig 4T1 sejtvonallal injektáltunk. Az egerek súlya 23 - 24 g volt és mind a két csoport két injektálást kapott az adott sejtvonalból. Az egyik injektálást szubkután végeztük a váll területére, a másodikat pedig

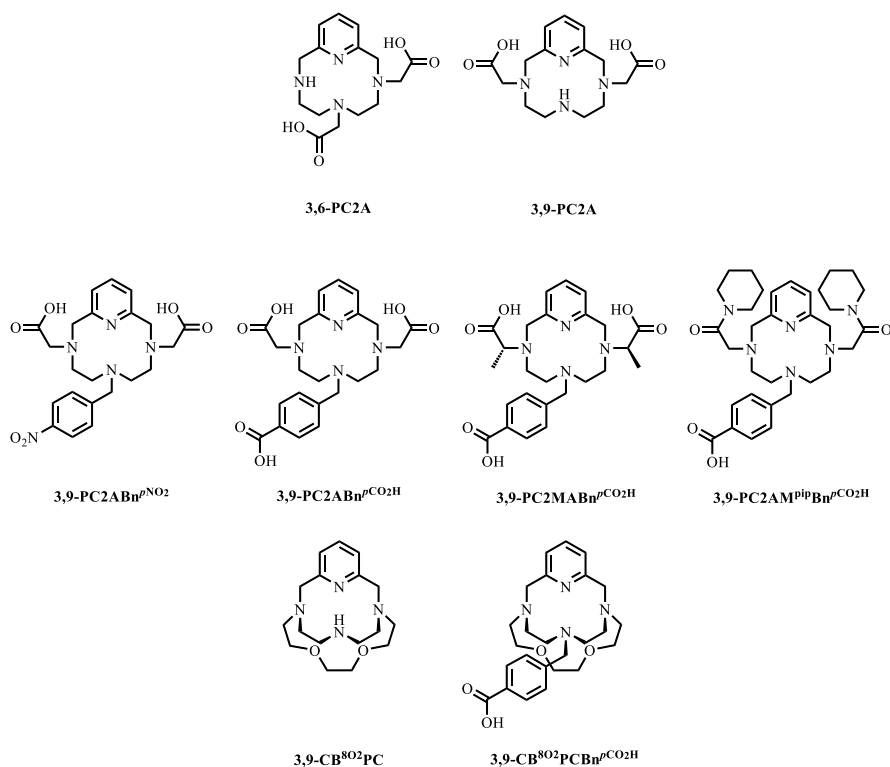
intramammálisan az ortotóp helyére lágyéktáji mellzsírpárnába. Az injekciók 5×10^6 sejtet tartalmaztak 100 μL sóoldat formájában. A tumor sejtek beoltását követő 9 - 22 nappal, amikor a xenograft-ok elérték a 6 - 7 mm-es maximális átmérőt, az egerekbe intravénásan az oldalsó farokvénán keresztül injektáltuk a radiofarmakont ($2,7 \pm 0,7$ MBq).

A PET/MRI vizsgálatokat egy preklinikai nanoScan PET/MRI 1T (Mediso Kft., Magyarország) segítségével végeztük. 3%-os izofluránt alkalmaztunk a belégzéses altatáshoz/érzéstelenítéshez, a fenntartásához pedig 2%-osat, oxigénnel (1,0 - 2,0 L/min) és N_2O -dal (0,8 - 1,0 L/min) kiegészítve. Az egereket a szkennelés idejére egy speciális szkennelő ágyra helyeztük (MultiCell Imaging Chamber, Mediso Kft., Magyarország), amely fenntartotta az egerek testhőmérsékletét és megakadályozta mozgásukat. Mindkét csoporton az injektálást követően 4 órás, 1, és 3 napos PET felvételeket készítettünk, a T_1 daganatos egerekénél ezt kiegészítettük 2 napos követéssel is. Az egyes PET mérések 20 percesek voltak, 98,5 mm látómezőt (FOV - field of view) és 400 - 600 keV-os energia ablakot használtunk. Egyidejűleg az anatómiai referenciaként T_1 gradiens echo MRI felvételeket készítettünk 0,5 mm szeletvastagsággal, 50 szelettel és 20° -os kibillentési szöggel. A felvételeken maximális valószínűségű várakozásmaximalizálás (MLEM - maximum likelihood expectation maximization) rekonstrukciót végeztünk el csillapításkorrekcióval, véletlen korrekcióval és szórás-korrekcióval a Nuclide szoftver (Mediso Kft., Magyarország) segítségével. Ezt követően az InterView FUSION szoftver (Mediso Kft., Magyarország) segítségével a rekonstruált képekből 3 mm átmérőjű ROI-kat (region of interest) és VOI-kat (volume of interest) rajzoltunk a tumorok és a főbb szervek fölé, amelyek a vérkészlet, a máj, a vese és az izom, mint háttérreferenciák voltak. A tumorok és a szervek felvételei a standardizált felvételi érték (SUV - standardized uptake value)

egységében lettek mérve, amit a következő képlet segítségével számítottuk ki:

$$\text{SUV} = [\text{ROI-aktivitás (MBq/mL)}] / [\text{beadott aktivitás (MBq)} / \text{állat súlya (g)}].$$

V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK



3. ábra A fejezetben tárgyalt ligandumok szerkezeti képletei.

Ebben a fejezetben a PCTA-ból származtatható **3,6-** és **3,9-PC2A**, a **3,9-PC2A**-ból előállított bifunkciós (**3,9-PC2ABn^pNO₂**, **3,9-PC2ABn^pCO₂H**, **3,9-PC2MABn^pCO₂H**, **3,9-PC2AM^{pip}Bn^pCO₂H**), illetve a szintén **3,9-PC2A** analóg kriptát típusú alap (**3,9-CB⁸⁰²PC**) és bifunkciós (**3,9-CB⁸⁰²PCBn^pCO₂H**) kelátorok (3. ábra), valamint Mn(II)-komplexeik előállítását, fizikai-kémiai vizsgálatát tárgyaljuk.

V.1. A ligandumok előállításainak ismertetése

A dolgozatban vizsgált ligandumok **piklén (6)** (3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán) makrociklus alapú vegyületek. A **piklén (6)** három makrociklusos szekunder amincsoportjának funkcionálizálása többféle szintézis stratégia mentén valósítható meg feltéve, ha nem három egyenértékű oldalláncot szeretnénk elhelyezni a makrocikluson.⁸² A makrociklus nitrogénatomjainak bázikus tulajdonságai (protonálódási állandói: $\log K_1^H = 10,33$, $\log K_2^H = 7,83$, $\log K_3^H = 1,27$ ($I = 0,1$ M KNO_3 , 25 °C)) jelentősen eltérnek egymástól, és protonálódásuk jellegzetes sorrendet követ.⁸³ Első lépésben a piridinnel szembeni *transz*-helyzetű (6-os helyzetű) nitrogén protonálódik, ezt követi az egyik *cisz*-helyzetű (3-as vagy 9-es N-atom) nitrogén és ezzel egyidőben a jobb töltésmegoszlás miatt az első proton a 6-os helyzetből átvándorol a másik 9-es (vagy 3-as) nitrogénre, végül, nagyon kis pH-n ezt követi a 6-os nitrogén protonálódása. Mindezek ismeretében a szekunder aminok részleges vagy szelektív alkilezése védőcsoport(ok) alkalmazása nélkül is elvégezhető, azaz a protont „kvázi védőcsoportként” használjuk. pH ~ 9 környékén nagyrészt 3-as és 9-es, míg pH = 4 - 5 között 6-os helyzetben szubsztituált terméket állíthatunk elő.

Ezt a szelektív alkilezési módszert (jelöljük **M_{1.1}**-el, a későbbi azonosítás érdekében) megvalósíthatjuk vizes közegben, hasonló stratégiát követve, mint Kovács és mtsai. diszubsztituált ciklén származékok szintézise során.⁸⁴ Ugyancsak az említett megközelítést alkalmazták W. D. Kim és munkatársai, amikor pH = 8,6-on túlnyomórészt szimmetrikus, kétszeresen helyettesített piklén származékokat (**3,9-PC2MeCN (15)** és **3,9-PC2A (16)**) szintetizáltak.⁸⁵

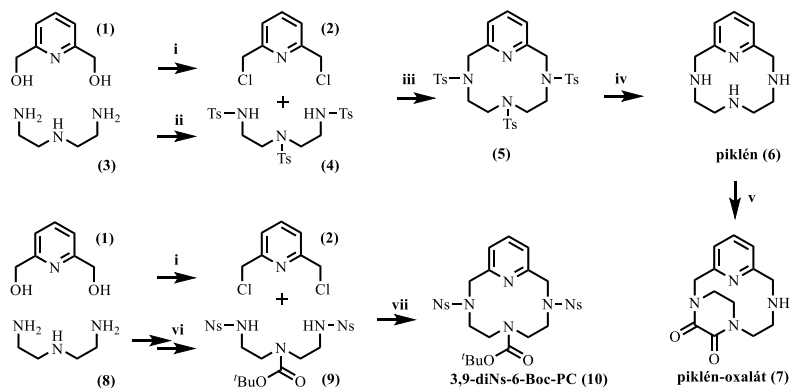
Szerves oldószerben (**M_{1.2}**) a megfelelő bázis használatával is alkalmazhatjuk ezt a stratégiát, acetonitril oldószerben kristályvizes nátrium-acetátot használva bázisként főként 3,9-helyettesített terméket kapunk, ennél erősebb

bázist használva (pl. piridin, NaHCO₃, K₂CO₃, Na₂CO₃, DIPEA, ill. TEA.) kizárólag háromszorosan alkilezett termék keletkezik.

Egy másik megoldás a védőcsoportok alkalmazása. Ha nem szimmetrikus terméket szeretnénk előállítani, akkor a Mariane Le Fur és munkatársai által bemutatott módszert (**M_{2.1}**) alkalmazva első körben az egymás melletti *cisz*- és *transz*-nitrogéneket oxalamid-gyűrű képzésével védhetjük meg dietil-oxalát segítségével.⁸⁶ A **piklén-oxalát** (**7**) szabad, 3-as helyzetű szekunder nitrogénatomja alkilezhető, vagy másfajta védőcsoporttal (pl.: Alloc - alliloxi-karbonil, Fmoc - fluorenil-metiloxi-karbonil, Ns - Nozil) védhető. Az oxalát védőcsoportot később savas hidrolízissel távolíthatjuk el.

Amennyiben szimmetrikusan helyettesített származékok előállítása a cél kiindulhatunk (**M_{2.2}**) a 3-as és 9-es helyzetben Ns, és 6-os helyzetben Boc (*terc*-butil-oxi-karbonil) védőcsoportot tartalmazó **piklén** származékból (**10**), melyről szelektíven távolíthatóak el akár a nozil védőcsoportok (pl. bázikus közegben, tiofenollal mint S-nukleofil), vagy akár a Boc védőcsoport savas hidrolízissel (pl.: TFA/diklórometán). A felszabadított szekunder aminok pedig így már szabadon helyettesíthetőek a megfelelő funkciócsoporttal.

V.1.1. *Piklén és védett származékainak előállítása*

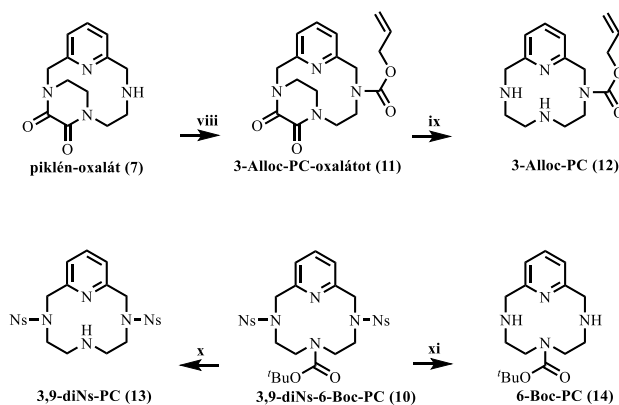


4. ábra *Piklén (6), piklén-oxalát (7) és 3,9-diNs-6Boc-PC (10) előállítása:*

(i) SOCl_2 , 0 °C \rightarrow 90 °C, 4 h (82%); (ii) TsCl , NaOH , $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$, RT, 24 h (90%); (iii) K_2CO_3 , Ar-atm. ACN, 85 °C, 48 h (86%); (iv) $\text{cc.H}_2\text{SO}_4$, 180 °C, 4 min (73%); (v) dietil-oxalát, MeOH, RT, ON (85%); (vi/1) etil-trifluoracetát, CH_2Cl_2 , 0 °C, 30 min, \rightarrow RT, 60 min; \rightarrow Boc_2O , 5 h (85%); (vi/2) NaOH -oldat, MeOH, RT, 6 h (94%); (vi/3) $p\text{Ns-Cl}$, TEA, DKM, 0°C \rightarrow RT, 12 h (82%); (vii) K_2CO_3 , ACN, 85 °C, 48 h (99%).

A **piklént (6)** és a **3,9-Ns-6-Boc-piklént (10)** korábban már az irodalomban leírt módon állítottuk elő (4. ábra). Mind a két származék kiindulópontja, a 2,6-bisz(klórmetil)piridin (2) vegyület, amelyet dialkohol származékból (1) állítottunk elő tionil-kloridban való forralással, H. Su és mtsai. által javasolt módszerrel.⁸⁷ A dietilén-triamin (3) vegyületet nem szelektíven védjük tozil védőcsoportokkal 4-toluolszulfonil-klorid segítségével, vizes NaOH oldat és dietil-éter keverékében.⁸³ A gyűrűzárást inert argon atmoszféra alatt végeztük, kihevített kálium-karbonát bázis mellett acetonitrilben. A tritozilált makrociklusról (5) a védőcsoportokat tömény kénsavban való 4 perces 180 °C-os főzéssel távolítottuk el, majd $\text{pH} > 13$ -on extraháltuk kloroformmal, így jutottunk a szabad **piklén (6)** bázikus formájához.⁸³ A **piklén-oxalátot (7)** Mariane Le Fur és munkatársainak leírása alapján készítettük el, **piklén (6)** bázis és dietil-oxalát metanolban kevertetésével.⁸⁸

A nem szimmetrikusan védett **piklén (10)** előállításához a 3,9-Ns-6-Boc-dietilén-tetraamint (**9**) Andreas Blum és mtsai. által javasolt módon állítottuk elő.⁸⁹ A kiindulási amin (**3**) primer amino csoportjait, ideiglenesen primer aminocsoportra szelektív trifluoracetamidként védtük meg, etil-trifluoracetát használatával, majd „one-pot” reakcióban *terc*-butil-oxi-karbonilként védtük a szabad szekunder amint. A trifluoracetamidok lúgos hidrolízisét követően 4-nitrobenzol-szulfonamidokra (Ns) cseréltük azokat, 4-nitrobenzol-szulfonilklorid (NsCl) használatával. A gyűrűzárást J. -M. Siaugue és mtsai. által leírt módon végeztük, K₂CO₃ bázis mellett acetonitrilben forralva, így jutottunk a **3,9-Ns-6-Boc-PC (10)** vegyülethez.⁹⁰



5. ábra 3-Alloc-PC (12), 3,9-diNs-PC (13) és 6-Boc-PC (14) előállítása:

(viii) Alloc-Cl, NaHCO₃, ACN, 14 h (99%); (ix) 2 M HCl, 100 °C, 5,5 h (98%);

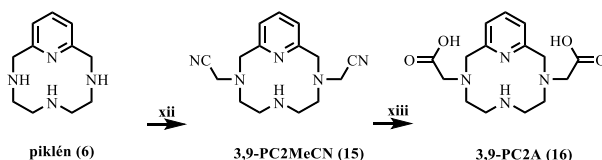
(x) TFA / DKM (7 : 15), RT, 12 h (92%) (xi) tiofenol, K₂CO₃, DMF, Ar-atm, RT, 24 h (48%).

A **piklén-oxalát (7)** szabad szekunder aminocsoportját Alloc-Cl segítségével, NaHCO₃ bázis jelenlétében, acetonitrilben védtük (5. ábra), ami a **3-Alloc-PC-oxalátot (11)** eredményezte. Itt olyan védőcsoportra volt szükségünk, amely ellenálló az oxalátcsoporthoz használt savas körülmények között és az acetátok alkilezéséhez használt bázikus körülmények mellett is.⁹¹ Ezen túl, az Alloc eltávolítására javasolt körülmények (Pd(PPh₃)₄ és fenilszilán) kompatibilisek az acetátok védelmére használt metilészter-

csoportokkal.⁹² Az oxalátcsoport eltávolítását a szokásos savas körülmények között végeztük, ioncserésen (Amberlite IRA gyanta OH⁻ forma), és oszlopkromatográfiásan (semleges alumina) is tisztítottuk, ami az **3-Alloc-PC (12)** vegyületet eredményezte.

A **3,9-di-nozilát-6-Boc-piklén (10)** *tert*-butiloxi-karbonil védőcsoportjának savas hidrolízisével **3,9-di-nozilát-piklén**-hez (**13**) juthatunk (**5. ábra**), ezt a reakciót diklórmetánban végeztünk trifluorecetsavval. Ha pedig a nozilcsoportjait távolítjuk el a **3,9-di-nozilát-6-Boc-piklén**-nek (**10**) vízmentes körülmények között tiofenollal, kihevített kálium-karbonát jelenléte mellett vízmentes DMF-ben akkor a **6-Boc-piklén**hez (**14**) jutunk, ez esetben a kapott terméket normálfázisú Flash kromatográfiával tisztítottuk etil-acetátot (A) és 10%-NH₃-t tartalmazó metanolt (B) használva eluensként gradiens elúció segítségével.

V.1.2. 3,6- és 3,9-PC2A előállítása

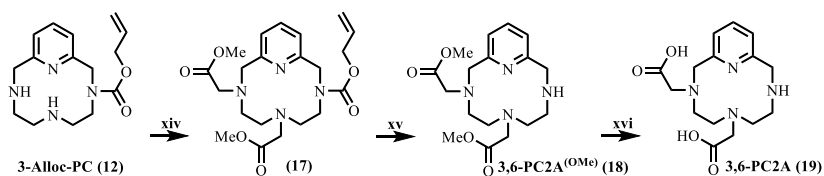


6. ábra A **3,9-PC2A** előállítása (**16**):

(xii) HOCH₂SO₃Na, H₂O, pH = 8,55, 60 °C → NaCN, RT, 3 h, (xiii) cc. HCl, 100 °C, 3 h.

A szimmetrikus **3,9-PC2A (16)** származék előállításához W. D. Kim és munkatársai korábban közölt módszerét alkalmaztuk.⁸⁵ A módszer formaldehid - nátrium-biszulfid addíciós vegyület sztöchiometrikus mennyiségének a **piklén (6)** makrociklushoz történő hozzáadásán alapul (**6. ábra**), vizes közegben (M_{1.1} stratégia) a reakcióelegy pH-ját 8,55-ön tartva, hogy a piridinnel szembeni *transz*-helyzetű nitrogént (N6) protonáljuk (védjük). Így elméletileg kvantitatívan a 3,9-diszubsztituált (nátrium-

metánszulfonát származék) terméket kapnánk, de esetünkben 7%-ban 3,6-helyettesített terméket is találunk a reakcióelegyben. A termékelegyet NaCN-dal történő szubsztitúcióban (3 óra forralás) tovább alakítottuk a megfelelő dimetilciano származékká. A **3,6- és 3,9-PC2MeCN (15)** termékek pH > 13-on kloroformmal kiextrahálhatók és izolálhatók. A következő lépésben savas (cc. HCl-ben forralás) hidrolízissel **3,6- és 3,9-PC2A (19 és 16)** vegyületeket kaptuk. Az izomer ligandumokat pedig preparatív HPLC-s technikával választottuk el.

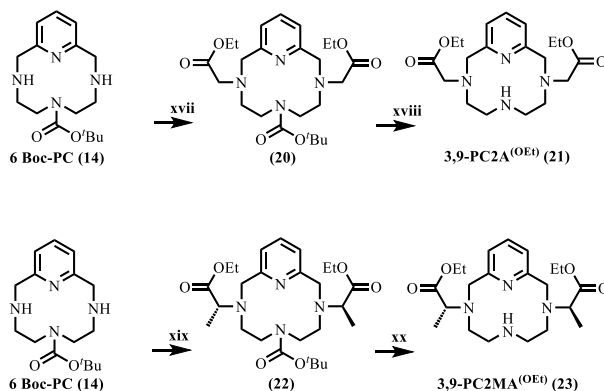


7. ábra A **3,6-PC2A (19)** előállítása:

(xiv) metil-brómacetát, K₂CO₃, ACN, 20 h (78%); (xv) Pd(PPh₃)₄, fenil-szilán, N₂-atm., CH₂Cl₂, 0 °C → RT, 15 min (64%); (xvi) 3 M HCl, 100 °C, 23 h (75%).

A **3,6-PC2A (19)** szelektív előállítása során alkalmazott stratégia (**M_{2.1}**) a **piklén (6)** makrociklus egyik szekunder aminocsoportjának regioszelektív védésén alapszik. A **3-Alloc-PC (12)** vegyületet két ekvivalens metil-2-bromacetáttal alkileztük kálium-karbonát jelenlétében, ami 78%-os hozammal a dialkilezett származékokat (**17**) eredményezte (**7. ábra**). A következő lépésben az Alloc védőcsoport eltávolítását katalitikus mennyiségű Pd(PPh₃)₄ és négy ekvivalens fenil-szilán segítségével végeztük el, ami a metilészterként védett **3,6-PC2A (18)** vegyületet eredményezte. Végül a metil-észterek savas hidrolízise után a **3,6-PC2A (19)** ligandumot kaptuk, amelyet acetonos kicsapással tisztítottunk.

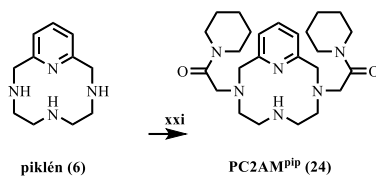
V.1.3. Bifunkciós ligandumok előállítása az analitikai vizsgálatokhoz



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

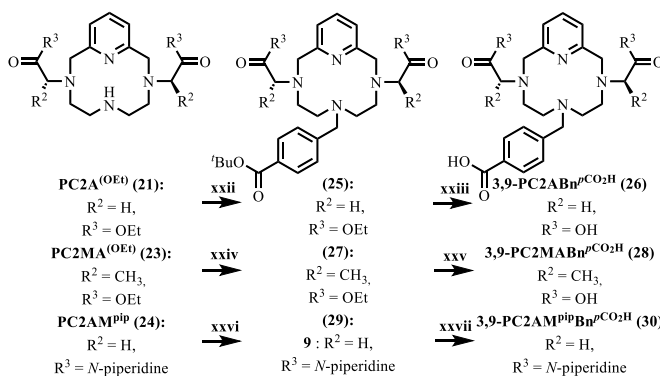
(xvii) etil-brómacetát, CH₃COONa·3H₂O, ACN, 65 °C, 48 h, (88%); (xviii) TFA : DKM (7 : 15), 0 °C → RT, 24 h (93%); (xix) etil-(S)-2-(trifluormetilszulfoniloxi)propionát, K₂CO₃, DKM, 0 °C, 72 h (79%); (xx) TFA : DkM (7 : 15), 0 °C → RT, 24 h (96%).

Az acetát (3,9-PC2A^{OEt} - 21) és alfametil (PC2MA^{OEt} - 23) származékok előállítását (M2.2) a fentebb leírt módon előállított védett 6-Boc-piklén (14) helyettesítésével kezdtük, melyet etil-brómacetáttal alkileztünk acetonitrilben, nátrium-acetát-trihidrát bázis jelenlétében, ami a 20 vegyületet eredményezte (8. ábra). A 22 vegyületet hasonló módon szubsztitúciós reakcióban állítottuk elő a 14 vegyületből kiindulva, melyet etil(S)-2-(trifluormetilszulfoniloxi)propionáttal reagáltatva, diklórmetánban és kálium-karbonát jelenlétében kaptuk a kívánt terméket. A 20 és 22 *tert*-butiloxikarbamát védőcsoportjainak eltávolítása diklórmetánban trifluor-ecetsav (TFA) segítségével a 21 és 23 vegyületeket eredményezte.


9. ábra A 3,9-PC2AMP^{pip} (24) előállítása:

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

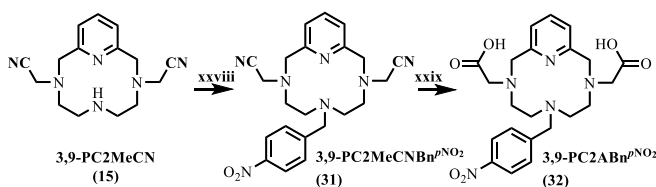
A **piklén (6)** makrociklus szelektív alkilezése (**M_{1.2}**) a megfelelő bázis-oldószer páros alkalmazásával szerves oldószerekben részben megvalósítható. A **3,9-PC2AMP^{pip}** szintézisét közvetlenül a védőcsoportot nem tartalmazó **piklén (6)** 2-brom-1-(piperidin-1-il)etán-1-on reagenssel történő alkilezésével kezdtük, nátrium-acetát-trihidrát, mint (gyenge) bázis felhasználásával acetonitrilben, ami így a **24** vegyületet eredményezte (**9. ábra**). Az alkilezőszert Å. Kaupang és munkatársai által leírt módon állítottuk elő.⁹³


10. ábra A 3,9-PC2ABn^{pCO₂H} (26), a 3,9-PC2MABn^{pCO₂H} (28) és a 3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H} (30) előállítása:

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

A **21**, **23** és **24** szekunder aminocsoportjának funkcionizálását *tert*-butil-4-(brómmetil)-benzoát alkilezőszerrel végeztük katalitikus mennyiségű nátrium-

jodid jelenlétében és *N,N*-diizopropil-etilamin (DIPEA) (**21** esetében) vagy kálium-karbonát (**23** és **24** esetében) bázisok alkalmazásával acetonitrilben, ami a **25**, **27** és **29** vegyületeket eredményezte (**10. ábra**). Az analitikai vizsgálatokhoz a **26**, a **28** és a **30** modell ligandumokat az etil- és/vagy *tert*-butil-észter védőcsoportok etanolban nátrium-hidroxiddal történő lúgos (a **29**→**30** esetén savas) hidrolízis útján történő eltávolítását követően kaptuk meg, amelyet preparatív RP-HPLC-s tisztítás követett Luna C18(2) (Phenomenex) preparatív kolonnán.

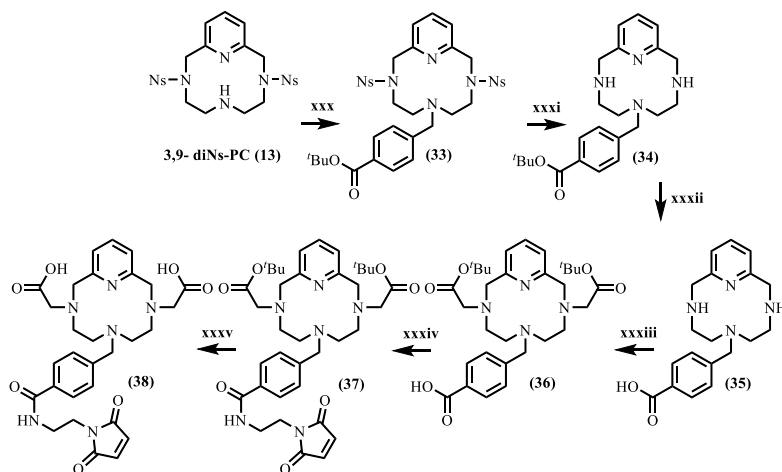


11. ábra A 3,9-PC2ABn^{pNO₂} (**32**) előállítása:

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

A 3,9-PC2ABn^{pNO₂} (**32**) előállításának első lépésében a korábban a 3,6-PC2A (**16**, **6. ábra**) szintézisének előállított 3,9-PC2MeCN-ot (**15**) alkileztük *para*-nitrobenzilbromiddal acetonitrilben DIPEA bázis és katalitikus mennyiségű nátrium-jodid jelenlétében, amely reakció a 3,9-PC2MeCNBn^{pNO₂} (**31**) terméket eredményezte (**11. ábra**). A terméket szintén preparatív HPLC-s technikával tisztítottuk. Végül a nitrilcsoportok savas hidrolízisével kaptuk a 3,9-PC2ABn^{pNO₂} (**32**) ligandumot. A nitrocsoporthoz szelektív redukciójára alkalmazott módszerekkel kapcsolatban számos klasszikus redukciós eljárást kipróbáltunk, többek között H₂/Pd-C, Fe/HCl, Sn/HCl, Zn/HCl stb) rendszereket. Tapasztalataink szerint ezek alkalmazása szinte minden esetben nem kívánt mellékreakciókhoz vezetett (a gyűrűfelnyíláshoz vagy a nitrobenzilcsoport elvesztéséhez), így a továbbiakban a benzoészter származékok előállítását helyeztük előtérbe, mint ideális bifunkciós ligandumokat.

V.1.4. A 3,9-PC2ABn^{pCO₂H} ligandum funkcionálizálása szelektív konjugáláshoz



12. ábra A 3,9-PC2ABn^{pMA} (38) előállítás:

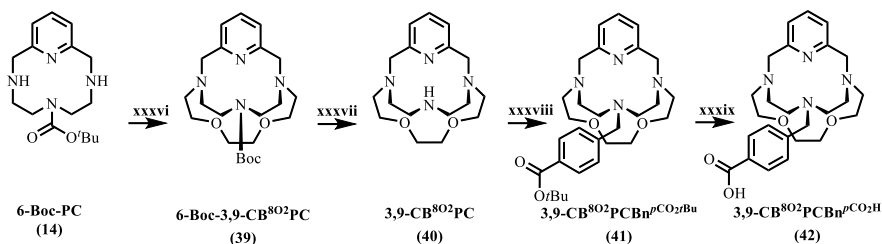
(xxx) *tert*-butil-4-(brómmetil)-benzoát, NaI, DIPEA, ACN, 80 °C, 48 h (93%); (xxxi) tiofenol, K₂CO₃, DMF, RT, 24 h (58%); (xxxii) TFA : DKM (7 : 15), RT, 12 h (93%); (xxxiii) *tert*-butil-brómacetát, DIPEA, DMF, 60 °C, 48 h (42%); (xxxiv) HBTU, HOBT, DIPEA, DKM, RT, 48 h (56%); (xxxv) TFA : DKM (7 :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

A 3,9-PC2ABn^{pCO₂H} bifunkciós ligandum két koordinálódó acetátot és egy nem koordinálódó, a konjugációhoz kialakított, benzoésav „rész” tartalmaz. Ezen vegyület közvetlen kapcsolása biovektor molekulákkal nem valósítható meg (mivel a konjugációra, valamint a fémion megkötésére, alkalmas funkciócsoportok azonosak) így a fehérjéhez való konjugálást maleimid reaktívcsoporton keresztül terveztük. Ezt a csoportot a *para*-benzoésav részen alakítottuk ki, amihez szükség volt a koordinálódó acetátok előzetes védésére. Az eredeti szintézisnél a szelektív védőcsoport eltávolítás miatt (3,9-PC2A^{OBu} (21), 7. ábra) etilészter védőcsoportot használtunk. A konjugáció előtti utolsó lépés az észterek hidrolízise, viszont a maleimid gyűrű stabilitása trifluoecetsavas/diklórmetános észterhidrolízist engedett csak meg. Ezért a

megfelelő BFL előállításához *tert*-butil-észter védőcsoportra kellett váltanunk, ami a szintézissor újra tervezését kívánta meg.

Ezen szintézis során kiindulási vegyületnek a **3,9-di-nozil-piklént** választottuk (**13**) (szintén (**M2.2**) stratégia), amelynek az alkilezése *tert*-butil-4-(brómmetil)-benzoáttal történt, katalitikus mennyiségű nátrium-jodid és DIPEA jelenlétében, acetonitril oldószerben (**12. ábra**). Ezután a di-nozilált makrociklus (**33**) nozilátcsoportjait tiofenollal távolítottuk el, vízmentes kálium-karbonát jelenlétében, vízmentes *N,N*-dimetil-formamid (DMF) oldószerben. A *tert*-butil-észter védőcsoportot TFA-val távolítottuk el a **34**-es termékről diklórmetánban. A fémion-koordinációhoz szükséges acetát oldalláncok kialakítása *tert*-butil-brómacetáttal történt DIPEA bázis jelenlétében vízmentes DMF oldószerben (mivel a **35** termék rosszul oldódott acetonitrilben, ami alkilezés során mellékreakcióhoz vezet). A maleimid részt a **36** vegyület *para*-benzoésav részéhez kapcsoltuk 1-(2-aminoetil)-1*H*-pirrol-2,5-dion, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) és 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronóium-hexafluorofoszfát (HBTU) reagensek és DIPEA jelenlétében diklórmetán oldószerben. A **37** vegyület *tert*-butil-észter védőcsoportjait ugyanazzal az eljárással távolítottuk el, mint a **34**-es esetben, ami a **3,9-PC2ABn^{pMA}** (**38**) vegyületet eredményezte.

V.1.5. A piklén származék kriptandok előállítása



13. ábra A 3,9-CB^{8O2}PC (40) és a 3,9-CB^{8O2}PCBn^pCO₂H (42) előállítása:

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

A 3,9-CB^{8O2}PC (40) ligandum és a 3,9-CB^{8O2}PCBn^pCO₂H (42) bifunkciós ligandum előállítása a 3,9-PC2A^(OEt) (21) (8. ábra) és a 3,9-PC2ABn^pCO₂H (26) (10. ábra) vegyületek előállításával (M_{2.2} stratégia) analóg módon történt, 6-Boc-piklénből (14) kiindulva, annyi különbséggel, hogy ebben az esetben egy di-jodid (1,2-bisz(2-jód-etoxi)-etán) származékkal alkileztünk (13. ábra). A jó kitermelés és mellékreakciók elkerülése érdekében szükséges a bázisból származó fémion templáló hatása, ami előrendezi a láncot és a gyűrűt. A legjobb eredményt itt is nátrium-acetát-trihidráttal értük el (de vizsgáltuk a Li₂CO₃, Na₂CO₃, K₂CO₃, Cs₂CO₃ bázisok hatását is). A további lépések (Boc védőcsoport eltávolítás, *tert*-butil-4-(brómetil)-benzoáttal történő alkilezés és *tert*-butil-észter védőcsoport eltávolítás) a korábban leírtakkal analóg módon történtek.

V.2. A ligandumok protonálódási egyensúlyának vizsgálata

1. táblázat *A vizsgált és az összehasonlítási alapul szolgáló ligandumok protonálódási állandói*
($I = 0,15 \text{ M NaCl}$, $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$)

	$\log K_1^{\text{H}}$	$\log K_2^{\text{H}}$	$\log K_3^{\text{H}}$	$\log K_4^{\text{H}}$	$\log K_5^{\text{H}}$	$\sum_{i=1}^2 \log K_i^{\text{H}}$
1,7-DO2A^a	11,69	9,75	3,97	2,68	—	21,44
1,4-DO2A^a	11,44	9,51	4,14	1,55	—	20,95
PCTA^b	9,97	6,73	3,22	1,40	—	16,70
PCTA^c	11,36	7,35	3,83	2,12	—	18,71
DO3A^b	10,07	9,83	4,43	4,11	1,88	19,9
PyC3A^d	10,16	6,39	3,13	—	—	16,55
3,6-PC2A	10,72(1)	8,37(2)	3,81(2)	1,26(2)	—	19,09
3,6-PC2A^e	10,31(1)	8,59(2)	3,92(3)	1,56(3)	—	18,90
3,9-PC2A	12,25(4)	5,97(2)	3,47(4)	1,99(3)	—	18,22
3,9-PC2A^f	12,50	5,75	3,28	2,38	—	18,25
3,9-PC2ABn^{N6}	9,84(4)	7,38(7)	2,07(8)	[1,1(1)]	—	17,22
3,9-PC2ABn^{CO2H}	10,28(1)	6,88(1)	3,98(2)	1,89(2)	1,66(2)	17,16
3,9-PC2MABn^{CO2H}	11,24(1)	7,57(1)	4,21(2)	2,31(3)	[1,1(1)]	18,81
3,9-PC2AMP^{N6}Bn^{CO2H}	11,18(2)	4,88(6)	3,14(5)	—	—	16,06
3,9-CB⁸⁰²PC	14,60(2)	6,53(5)	1,61(8)	—	—	21,13
3,9-CB⁸⁰²PCBn^{CO2H}	12,30(1)	7,58(3)	3,76(2)	—	—	19,88

^a Ref. (30); ^b Ref. (82); ^c $I = 1,0 \text{ M KCl}$, Ref. (84); ^d Ref. (77); ^e $I = 1,0 \text{ M NaCl}$; ^f $I = 1,0 \text{ M KCl}$.

Az affitest vektor molekula konjugációjához legmegfelelőbb platform kiválasztása érdekében megvizsgáltuk az előállított ligandumok Mn(II)-ionnal képzett komplexeinek fiziko-kémiai (stabilitás, inertség és relaxációs hatás) tulajdonságait. A ligandumok protonálódási állandóit az **1. táblázatban** tüntettük fel. A PCTA és származékainak protonálódási szekvenciája eltér az 1,4,7,10-tetraazaciklododekán (ciklén) származékokétól, ahol az első két protonálódás az egymással szemben elhelyezkedő nitrogénatomokhoz rendelhető, amelyeket az oldalláncban található donoratomok követnek minőségüktől függően. S. Aime és munkatársai a **PCTA** ligandum esetében ¹H-NMR titrálást végeztek, amely alátámasztotta, hogy az első protonálódás ($pK_a \sim 10,9$) a piridinnel szembeni (*transz*-helyzetű) nitrogénatomhoz (N6) rendelhető.⁹⁵ A következő lépésben az egyik piridin melletti *cis*-helyzetű nitrogén (N3 vagy N9) protonálódik ($pK_a \sim 7,1$) és ezzel egyidőben a jobb

töltés szeparáció miatt az első proton a *transz*-helyzetű nitrogénről (N6) az másik *cisz*-helyzetű nitrogénatomra (N9 vagy N3) tolódik át. A harmadik protonálódást a *transz*-helyzetű nitrogéne (N6) lévő acetát oldallánchoz rendelték.

V.2.1. 3,6- és 3,9-PC2A ligandumok protonálódási egyensúlyának vizsgálata

Az egyensúlyi vizsgálatokat a **3,6-** és **3,9-PC2A** ligandumok viselkedésének az összehasonlításával kezdtük, amelyeket a **PCTA**-ból egy acetát oldallánc eltávolításával tudjuk származtatni (szimmetrikusan és nem szimmetrikusan helyettesített **PC2A**-származékok). Mindkét **PC2A** szerkezetében 6 protonálható csoport található: 3 alifás amin és 1 piridingyűrű a makrociklusban, ill. oldalláncként 2 karboxilátcsoport. Az általunk vizsgált pH-tartományban 4 protonálódási folyamatot sikerült megfigyelni. A **PCTA**-hoz hasonló protonálódási sorrendet feltételezünk a **PC2A** izomer ligandumok esetében is. Ezzel összhangban a **3,9-PC2A** legnagyobb protonálódási állandója ($\log K_1^H = 12,25$) a *transz* nitrogénatomhoz (N6) rendelhető. Ezt támasztja alá az is, hogy a **3,9-PC2A** $\log K_1^H$ értéke jelentősen csökken N6-os szekunder aminocsoportnak a bifenil- (BP) vagy etil-amin (EA) szubsztituenssel történő funkcionálása esetén (a $\log K_1^H$ rendre 10,45 és 11,34 ezen vegyületek esetére).^{58,59} Az N6 nitrogénatom bázicitásának csökkenése figyelhető meg, ha azon acetátcsoporthoz van jelen, **3,6-PC2A** esetén ($\log K_1^H = 10,72$), valamint a **PCTA** ligandumnál ($\log K_1^H = 9,97$).

A ligandum fémionkötő képességéről a makrociklusok donoratomjaihoz tartozó bázicitás értékek fontos információt nyújtanak, így általában az összehasonlítások során az első két protonálódási állandónak az összegét ($\sum_{i=1}^2 \log K_i^H$ vagy β_2) vesszük figyelembe, ami jól korrelál a ligandum

fémionkötő képességével.⁸² A **DO2A** származékokhoz mérten a β_2 értékek alapján az izomer **PC2A** ligandumok kevésbé bázikusnak mondhatóak. A **PCTA** ligandum viszont még kevésbé tűnik bázikusnak ezt az értéket nézve, ami részben azzal magyarázható, hogy a titrált mintában található nagy mennyiségű Na^+ -ionokkal (0,15 M NaCl ionerősségből) a ligandum stabil komplexet képez. A **PCTA** 1,0 M KCl ionerősség segítségével meghatározott protonálódási állandói azonban lényegesen nagyobbak, viszont a **PC2A** ligandumok esetén 1,0 M KCl-ban elvégzett mérések eredményei nem mutatnak nagy eltérést a 0,15 M NaCl-os adatokhoz képest. Ez összhangban van azzal, amit a ciklén alapú kelátorok esetében is tapasztaltak: a ligandumok növekvő negatív töltése (azaz minél nagyobb számban tartalmaznak karboxilátcsoportokat, amelyek képesek Na^+ -ionok megkötésére) várhatóan növeli a kialakuló Na^+ -komplex stabilitását.^{96,97}

V.2.1. Bifunkciós 3,9-PC2A származék ligandumok protonálódási egyensúlyának vizsgálata

A fentebb is említett **3,9-PC2A-BP** ligandumnál tapasztaltakkal összhangban az **1. táblázat** adatai megerősítik, hogy a **3,9-PC2A** szekunder NH-csoportján kialakított *para*-nitrobenzil és *para*-karboxibenzil egység hatására - amely a későbbi bifunkció kialakításához szükséges - a **3,9-PC2A**-hoz ($\beta_2 = 18,22$) képest a kelátorok bázicitásának egy nagyságrenddel való csökkenését eredményezi. A **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** és **3,9-PC2ABn^{pNO₂}** bázicitásában ($\beta_2 = 17,16$ és $17,22$) ugyanakkor egymáshoz képest nem tapasztalható jelentős különbség. A várakozásainknak megfelelően a bázicitás tovább csökkent, amikor az acetát csoportokat piperidin-amid (AM^{pip}) oldalláncokra cseréltük (további egy nagyságrenddel, **3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}**; $\beta_2 = 16,06$). Ezzel ellentétben a **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}** ligandum bázicitását ($\beta_2 = 18,81$) az alfa-

metil-acetát (MA) oldallánc metilcsoportjai által okozott hiperkonjugációs hatás jelentősen növelte.

V.2.1. Kriptát típusú ligandumok protonálódási egyensúlyának vizsgálata

A **3,9-PC2A** analóg **3,9-CB⁸⁰²PC** kriptand ligandum esetében egy rendkívül merev szerkezetről beszélhetünk. Ennek eredményeként az általunk vizsgált kriptát típusú ligandumok esetén az első protonálódási állandó kirívóan magas, a **3,9-CB⁸⁰²PC** esetén $\log K_1^H = 14,6$ értéket határoztunk meg, amely értéknek a valós bizonytalansága jóval nagyobb, mint az illesztésből számított 0,2 standard deviáció. A kiugró $\log K_1^H$ magyarázható a keresztkötés miatt rendkívül merev ligandum szerkezettel, amely akár képes lehet oxónium-ion komplexálására is, bár a végzett ESI-MS mérések ezt nem támasztják alá („proton szivacsként” viselkedik).⁹⁸ Merevített szerkezetű keresztkötött ligandumok esetén korábban szintén mutattak ki kiugróan nagy protonálódási állandókat, reprodukálható módon.⁹⁹ A kriptát típusú ligandumoknál főként számolni kell az üregméretnek megfelelő hard karakterű kationok (pl. alkálifémek) komplexálódásával, beleértve az ionerősséggént alkalmazott Na⁺-ionokat is. A Na⁺-ionok számára a **3,9-CB⁸⁰²PC** üregmérete ideálisnak mondható, hiszen tekinthetünk a ligandumra egy 15 tagú, 5 donoratomos és 12 tagú, 4 donoratomos makrociklus „fúziójaként”, így az üregméret hasonló a 15-korona-5 koronaéterhez, amely az irodalmi adatok alapján a Na⁺-ionokra szelektív.¹⁰⁰ (Ezt az állítást az is erősíti, hogy gyűrűzárás is Na⁺-ionok jelenlétében ment a legjobb kitermeléssel). A Na⁺-ionnal történő komplexképződési, ill. a ligandum deprotonálódási folyamatának megkülönböztetése nem triviális, így a meghatározott $\log K_1^H$ értékek szintén tartalmazzák az ebből adódó hibát. Felmerülhet valamilyen gyengén kölcsönható bázissal (pl. tetraalkil-ammónium-hidroxid) történő titrálás, mint alternatív meghatározási mód, azonban az irodalomban ismertek olyan kriptát

típusú liganumok, melyek képesek komplexet képezni alkilammónium-ionokkal is.¹⁰¹⁻¹⁰³ A protonálódási folyamat elméletben detektálható lenne könnyűvízben felvett ¹H NMR spektrumból is, azonban a kölcsönhatás mentes körülmények biztosítása itt sem lehetséges. Külön nehézséget okoz NMR mérésnél a könnyűvíz és a protonált amin jele közötti 4 nagyságrendnyi intenzitás-különbség víznyomásos technika alkalmazása pedig telítené az amin protonok jelét is. A **3,9-CB⁸⁰²PC** ligandumnál a másik két detektált protonálódási állandó a makrociklus N3 és N9 atomjaihoz rendelhető és a **PC2A** származékokhoz képest jóval savasabb pH tartományba tolódik.

A korábban megfigyelt trendet követve **3,9-CB⁸⁰²PC** ligandum N6 nitrogénatomjának bázicitásában a **3,9-PC2A** származékokra analóg módon Bn^{pCO₂H}-csoporttal történő funkcionalizáció (**3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}** ligandum) hatására 2 nagyságrendnyi csökkenés tapasztalható. A log K_2^H , N3 vagy N9 atomhoz rendelhető protonálódási állandó azonban egy nagyságrenddel nőtt. A log K_3^H állandóval jellemezhető protonálódási folyamat ez esetben valószínűsíthetően a karboxilcsoporthoz tartozik, míg negyedik protonálódást nem sikerült detektálni, ez minden bizonnyal kívül esik a pH-potenciometriás módszerrel lefedhető pH -tartományán.

V.3.A ligandumok Mn(II)-ionnal képződő komplexeinek stabilitása

V.3.1. 3,6- és a 3,9-PC2A Mn(II)-ionnal alkotott komplexeinek egyensúlyi jellemzése

A 3,6- és a 3,9-PC2A ligandumok Mn(II)-komplexeinek stabilitását és protonálódási állandóinak pH-potenciometriás titrálásból meghatározott értékeit a 2. táblázat tartalmazza.

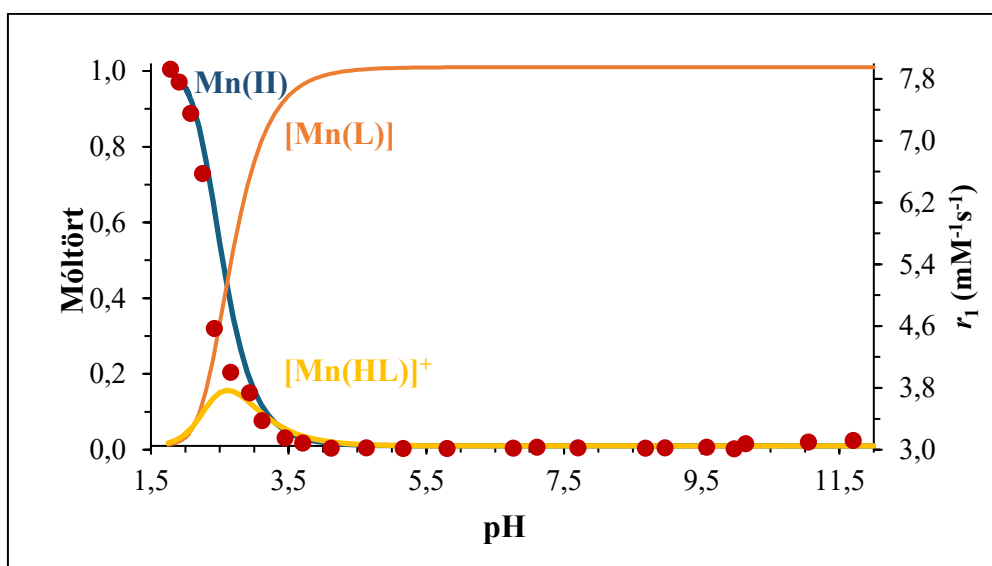
2. táblázat A dolgozatban tárgyalt ligandumok Mn(II)-ionnal alkotott komplexeinek protonálódási és stabilitási állandói, valamint pMn értékei (I = 0,15 M NaCl, 25,0 °C)

	$\Sigma_{i=1}^n \log K_i^H$	$\log K_{MnL}$	$\log K_{MnL}^H$	$\log K_{MnH-L}$	pMn ^h
1,7-DO2A ^a	21,44	14,64	4,4	—	6,52
1,4-DO2A ^a	20,95	15,68	4,15	—	7,27
PCTA ^b	16,70 / 18,71 ^c	16,83 / 16,64 ^e	1,96	—	9,74
DO3A ^b	19,9	16,55 / 19,43 ^f	4,26 / 3,55 ^f	—	8,66
PyC3A ^d	16,55	14,11	2,43	—	8,17
3,6-PC2A	19,09 / 18,90 ^e	15,53(1)	3,06(4)	—	8,09
3,9-PC2A	18,22 / 18,25 ^f	17,09(2)	2,14(2)	—	8,64
3,9-PC2ABn ^{NO₂}	17,22	14,72(1)	2,47(3)	12,66(5)	8,49
3,9-PC2ABn ^{CO₂H}	17,16	14,76(2)	4,04(1)	—	8,37
3,9-PC2MABn ^{CO₂H}	18,81	15,07(2)	3,09(2)	11,62(2)	7,93
3,9-PC2AM ^{Ph} Bn ^{CO₂H}	16,06	14,05(6)	3,64(1)	—	7,64
3,9-CB ⁸⁰² PC	21,13	> 15,3 ⁱ	—	—	> 6,50 ⁱ
3,9-CB ⁸⁰² PCBn ^{CO₂H}	19,88	> 13,3 ⁱ	—	—	> 6,50 ⁱ

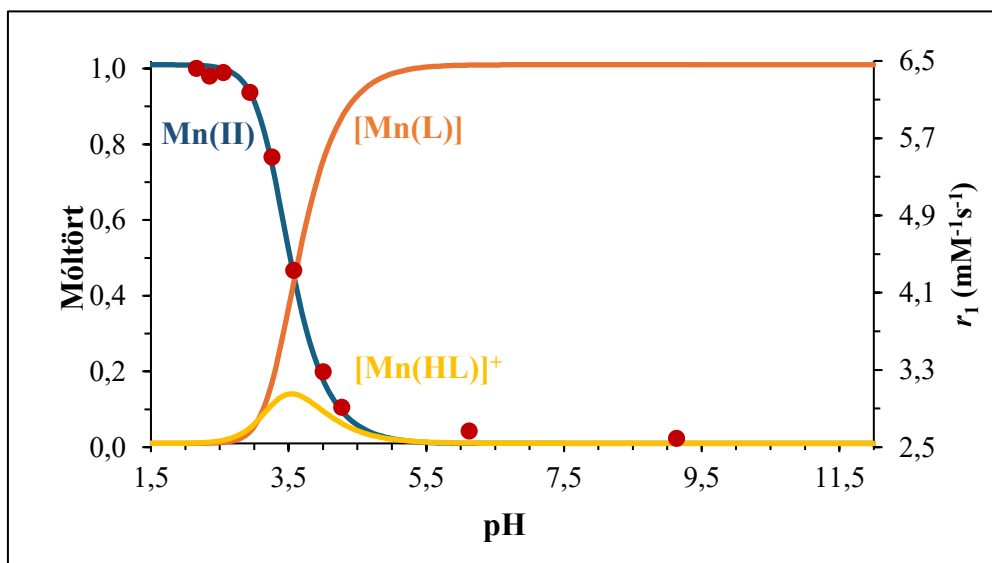
^a Ref. (50); ^b Ref. (82); ^c I = 1,0 M KCl, Ref. (94); ^d Ref. (77); ^e I = 1,0 M NaCl; ^f I = 1,0 M KCl; ^g ^h ⁱ ^h c_L = c_{Mn(II)} = 1 × 10⁻⁵ M, pH = 7,4.; ⁱ Ref. (96); ⁱ

pH-függő ¹H-relaxometriás titrálásokkal igazoltuk a pH-potenciometriás adatok illesztéséhez használt egyensúlyi modellek érvényességét (14. ábra és 15. ábra) úgy, hogy a pH-potenciometriás adatok illesztésével kapott eloszlási görbékkel hasonlítottuk össze a pH-függvényében mért relaxometriás adatokat (a komplexet tartalmazó minták R_{1p} és R_{2p} 1 mM-ra normált relaxitás értékeit). Az egyensúlyi modellek leírása során feltételeztük a protonált komplex [MnH(L)] és a hidroxido-vegyeskomplex [Mn(H₁L)]⁻ jelenlétét is. A [Mn(3,9-PC2A)(H₂O)] és [Mn(3,6-PC2A)(H₂O)] komplexek széles pH-tartományban (4,5 - 9,5) állandó relaxitást mutatnak (2,91 és 2,72 mM⁻¹s⁻¹ 0,49 T, 25 °C-on). Ezen eredmények a belső koordinációs szférájukban

koordinált vízmolekulát ($q = 1$) tartalmazó makrociklusos Mn(II)-komplexek relaxitása értékeire jellemzőek (pl. $[\text{Mn}(\mathbf{1,4-DO2A})]$ és $[\text{Mn}(\mathbf{6-PC1A})]^+$), illetve nagyobbak mint $q = 0$ komplexek esetén megfigyelt értékek (jellemzően $1,4 - 1,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ közé esnek, mint pl. a $[\text{Mn}(\mathbf{DO3A})]^-$ és a $[\text{Mn}(\mathbf{PCTA})]^-$ esetén találták.)^{49,82,104} A relaxitás kisebb pH irányába (pH = 4,5 alatt) történő növekedése a protonált komplex megjelenéséhez, ezt követően ennek a komplexnek a teljes disszociációjához rendelhető (elérve a 8,12, ill. 6,28 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ r_{1p} értékeket 0,49, ill. 1,41 T térerőnél) pH = 2,50 és 1,80 között, amik a $[\text{Mn}(\mathbf{H2O})_6]^{2+}$ komplexre jellemző r_{1p} értékek.¹⁰⁵ A $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2A})]$ komplex lényegesen nagyobb stabilitására utal az, hogy a **3,9-PC2A** rendszer esetében már 4,00-s pH-nál, míg a **3,6-PC2A** ligandumnál csak 5,07-s pH-nál van a Mn(II)-ionok 99%-a komplexált formában jelen.



14. ábra A $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2A})]$ -komplexre jellemző koncentráció eloszlási görbék ($C_L = C_{\text{Mn(II)}} = 2,04 \text{ mM}$), valamint a relaxációsebesség (R_{1p} : ●) pH-függése ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,15 \text{ M NaCl}$, $0,49 \text{ T}$)

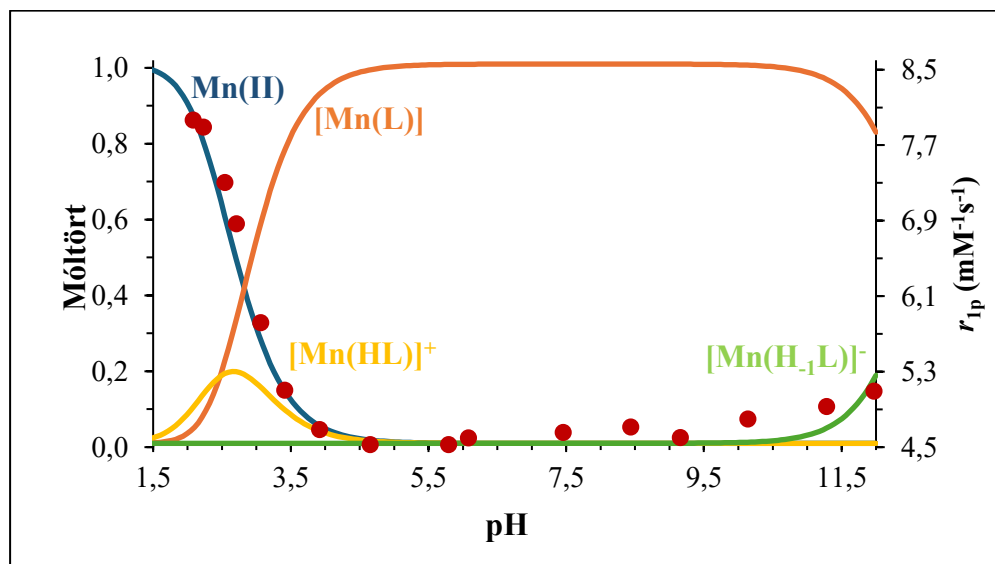


15. ábra $A[\text{Mn}(3,6\text{-PC2A})]$ -komplekre jellemző koncentráció eloszlási görbék ($c_L = c_{\text{Mn(II)}} = 2,04 \text{ mM}$), valamint a relaxációsebesség (R_{1p} : ●) pH-függése ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,15 \text{ M NaCl}$, $1,41 \text{ T}$)

A **3,9-PC2A** és **3,6-PC2A** esetében az egyensúly leírásánál az $[\text{M(L)}]$ és a monoprotonált $[\text{M(HL)}]$ komplexek képződését vettük figyelembe (2. táblázat). A **3,9-PC2A**-val képződött Mn(II) -komplex stabilitása valamivel nagyobb is, mint a **PCTA**-val képződött komplexé ($\log K_{\text{MnL}} = 17,09$ vs. $16,83$). Ez a **3,9-PC2A** ligandum megnövekedett bázicitásával magyarázható, ami az egyik acetát oldallánc eltávolításának eredménye. Ezzel jó összhangban a $[\text{Mn}(3,9\text{-PC2A})]$ komplex látszólagos stabilitásának a jelentős csökkenését eredményezi. Reálisabb képet kapunk a különböző bázicitású ligandumok fémion-kötő képességének összehasonlításáról, ha olyan látszólagos állandókat számítunk ki, amelyek adott körülmények mellett, azonos ligandum- és fémion-koncentrációjú rendszerekre vonatkoznak. Az irodalomban Mn(II) -komplexek esetében a pMn értéket használják erre a célra, ami fiziológias (7,4-es) pH-n, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, és azonos ligandum és fémion koncentráció ($c_L = c_{\text{Mn(II)}} = 10 \text{ } \mu\text{M}$) mellett az oldatban a szabad Mn(II) -ion koncentrációjának negatív előjellel vett logaritmus.⁴⁸ A számított pMn -

értékek összehasonlításakor a **3,9-PC2A** ligandum Mn(II)-ionhoz való affinitása kisebb, mint a **PCTA**-é ($pMn = 8,64$ vs. $9,74$). Ennek ellenére a 3,9-PC2A egy kiváló platformnak tekinthető a Mn(II)-ion komplexálására, mivel az azonos körülmények között számított pMn értéke a $[Mn(DOTA)]^{2-}$ -komplexétől ($pMn = 9,02$) csak kis mértékben marad el.⁸² Ha a megfelelő **DO2A** származékokat hasonlítjuk össze, akkor a piridin egység ligandum gerincébe való beépítése előnyösnek mondható, hiszen a $[Mn(3,6-PC2A)]$ - és $[Mn(1,4-DO2A)]$ -komplekx stabilitási állandói közel azonosak ($\log K_{MnL} = 15,53$ és $15,68$), azonban a csökkent bázicitás miatt a számított pMn érték közel egy nagyságrendnyi javulást mutat. A $[Mn(3,9-PC2A)]$ - és $[Mn(1,7-DO2A)]$ -komplekx esetében az előny még ennél is nagyobb (2,5 log egység a stabilitás és két nagyságrend a pMn érték tekintetében).

V.3.1. A bifunkciós ligandumok Mn(II)-ionnal alkotott komplexeinek egyensúlyi jellemzése



16. ábra A $[Mn(3,9-PC2A)Mn^{II}]$ -komplexe jellemző koncentráció eloszlási görbék ($c_L = c_{Mn(II)} = 1$ mM), valamint a relaxációsebesség (R_{1p} ; ●) pH-függése ($T = 25$ °C, $I = 0,15$ M NaCl, $0,49$ T)

A bifunkciós ligandumok (**3,9-PC2ABn^{pNO₂}**, **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** és **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}**) Mn(II)-komplexeinek stabilitási állandóit szintén pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg, kivéve a bisz(amid)-származék esetében (**3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}**), ahol a megfigyelt lassú komplexképződési kinetika miatt különmintás módszert alkalmaztunk. A **3,9-PC2ABn^{pNO₂}** esetén az egyensúlyi modell érvényességének igazolására szintén pH-függő ¹H-relaxometriás titrálást végeztünk (**16. ábra**). Az **2. táblázat**ban bemutatott bifunkciós ligandumok közül a bázicitás értékekkel összhangban a [Mn(**3,9-PC2MABn^{pCO₂H}**)] stabilitási állandója bizonyult a legnagyobbknak. A pMn értékek összehasonlítása viszont ezen vegyületek esetére már egy kicsit más képet fest.

A legnagyobb pMn-értéket az anyaligandumal (**3,9-PC2A**; pMn = 8,64) képződő Mn(II)-komplex esetén tapasztaltuk, amelyet a bifunkciós acetát származékok követnek (**3,9-PC2ABn^{pNO₂}**: pMn = 8,49 és **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**: pMn = 8,37). A [Mn(**3,9-PC2MABn^{pCO₂H}**)]-kompleyre számított pMn érték valamivel kisebb, mint az acetát-származékoké, ami összhangban van a ligandum nitrogénatomjainak az acetát-származékokhoz képest megnövekedett bázicitásával. A várakozásoknak megfelelően a bisz(amid)-származék (**3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}**: pMn = 7,64) Mn(II) rendszerére számított pMn-érték a legkisebb a vizsgált komplexek közül, (**2. táblázat**), ami összhangban van a Mn(II)- és Gd(III)-komplexekre publikált irodalmi adatokkal.⁵⁴ Ezen eredmények alapján egyensúlyi szempontból a BFL ligandumok közül a legjobb termodinamikai paramétereket a **3,9-PC2ABn^{pNO₂}** és a **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** kelátorok Mn(II)-komplexei mutatják.

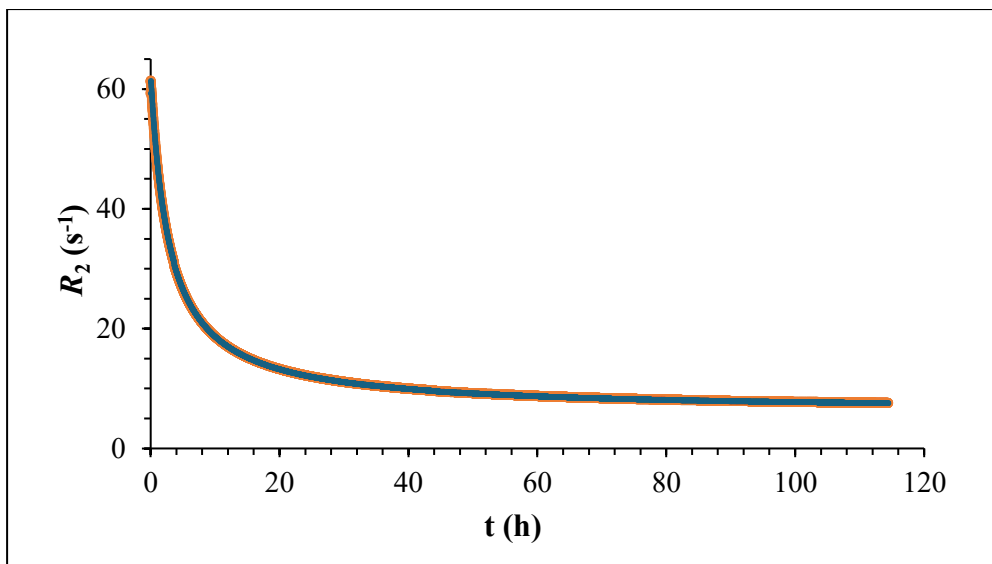
V.3.2. A kriptát típusú ligandumok Mn(II)-ionnal alkotott komplexeinek egyensúlyi jellemzése

A kriptát típusú **3,9-CB⁸⁰²PC** ligandum és a belőle származtatott **3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}** BFL esetén a Mn(II)-komplex lassú képződése miatt (lásd V.4. fejezetben) a komplex stabilitások vizsgálata igen körülményes. A pH-potenciometriás titrálás ezeknél a komplexeknél nem kivitelezhető, mivel az egyes adagolások között hónapokat kellene várni az egyensúly beálltára. Gyakran alkalmazott módszer paramágneses fémionok komplexeinek stabilitás meghatározásához a különböző pH-jú, savas pH tartományban elkészített minták relaxivitásának mérése (relaxometriás titrálás). Esetünkben azonban a savas tartományban még lassabb a Mn(II)-komplex képződése, akár évekbe is telhet míg a rendszerben beáll az egyensúly. A képződés sebessége a pH növelésével nő, viszont nagyobb pH-n - mivel kezdetben Mn(II)-ion felesleg van amíg nincs teljes komplexképződés - a Mn(II)-ion hidrolízise lehet zavaró. Alternatív meghatározási módszerként egy ismert stabilitású, labilis Mn(II)-komplexet képző kompetitor ligandum segítségével történő mérés, ahol a Mn(II)-ion a két ligandum stabilitása szerint oszlik meg és ezt az arányt valamilyen módon (pl.: UV-látható spektrofotometria, ¹H NMR (akár relaxometria is) stb.) detektáljuk. Ebben az esetben előnyt jelenthet az is, hogy elkerülhetjük a Mn(II)-ionok hidrolízisét lúgos tartományban, így lehetőség van 8-as pH felett is vizsgálatokat végezni, ahol feltételezhetően a keresztkötött származékok komplexképződési sebessége gyorsabb. A megfelelő kompetitor megtalálása azonban közelítő stabilitási (vagy látszólagos) állandó ismeretében vezethet célra. Ebben az esetben is előfordulhat, hogy csak többfajta ligandum kipróbálását követően sikerül meghatározni a keresett stabilitási állandót. Így a kompetitor ligandum megkeresése sem gyors, ill. egyszerű feladat. Az egyensúly beálltát felgyorsíthatjuk a hőmérséklet emelésével azonban, az így kapott állandó az

adott hőmérsékletre fog vonatkozni, mivel a 25 °C-ra jellemző egyensúly elérésére is várni kellene, így nem feltétlenül fogunk megbízható (legalább is összehasonlítható) eredményhez jutni. (lévén az egyensúlyi állandó hőmérsékletfüggő). Mindentől függetlenül a képződési kinetikai adatok ismeretében lehetőségünk van megadni a stabilitási állandókra, ill. pMn értékre egy minimum értéket, hiszen a képződés- és disszociációkinetikai kísérletek relaxometriás, HPLC, ill. LC-ESI-MS mérései alapján kijelenthető, hogy 25 °C-on és 7,4-es pH-n a Mn(II) és a ligandum egy mM-os oldatában több, mint 99%-os a komplexálódást tapasztaltunk. Így, ha 7,4-es pH és 1×10^{-3} M komplex koncentrációval számolva 99%-os komplexképzést érzékelünk, a ligandum protonálódási állanóit is figyelembe véve a $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\mathbf{PCBn}^{p\text{CO}_2\text{H}})]^+$ -komplex $\log K_{\text{MnL}}$ értéke minimum 15,3-nak, míg a bifunkciós származék $\log K_{\text{MnL}}$ értékére legalább 13,3-as $\log K_{\text{MnL}}$ adat becsülhető, míg a komplexek pMn értékei legalább 6,5 értékűek.

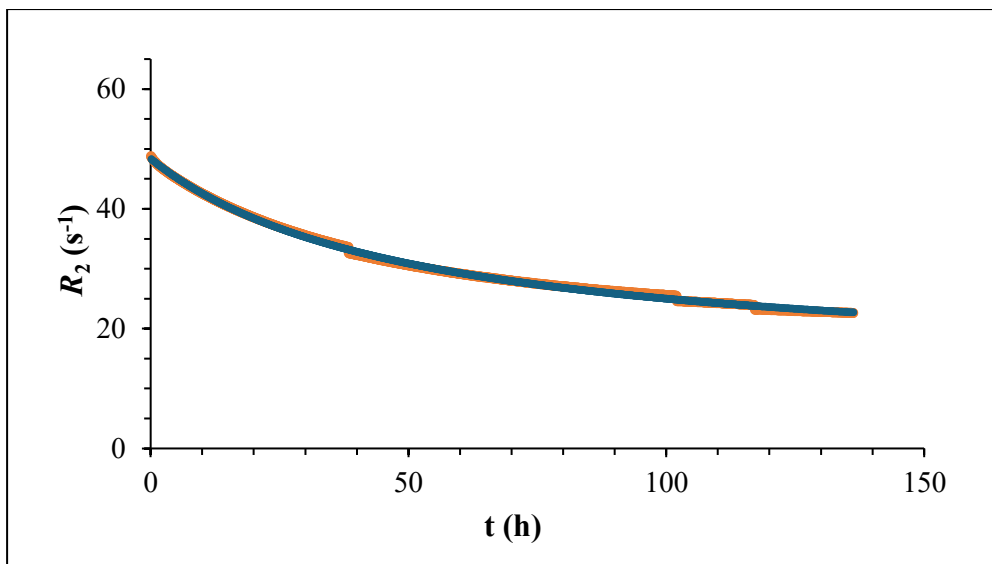
V.4. A $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\mathbf{PC})]^{2+}$ és a $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\mathbf{PCBn}^{p\text{CO}_2\text{H}})]^+$ komplexek képződéskinetikai vizsgálata

pH-potenciometriás titrálások során kísérletet tettünk a Mn(II)-komplexek titrálására is, de eredményként a ligandum titrálási görbét kaptuk vissza. előkísérleteink alapján, ami előjelezte a kelátok lassú képződését (ahogyan azt az irodalomban keresztkötött ligandumok esetében már többször tapasztalták.¹⁰⁶ Ezért relaxometriás módszerrel információt gyűjtöttünk a komplex képződéséről. Ehhez a körülményeket célszerűen úgy választottuk meg, hogy a vizsgálati körülményeket „szimuláljuk” ($c_{\text{Mn(II)}} = c_{\text{lig}} = 1,0$ mM; pH = 7,4; $I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ vagy 37 °C). A pH-t 7,4-re pufferelve a Mn(II)-ion hidrolízisével nem kell számolnunk, de a komplexképződés lényegesen gyorsabb, mint savasabb pH-n, ill. a komplexképződés során felszabaduló protonokat a pufferoldat elnyeli.



17. ábra A $[Mn(3,9-CB^{8O2}PC)]^{2+}$ -komplex mért és illesztett képződéskinetikai görbéje ($c_{Mn(II)}=c_{lig}=1,0 \text{ mM}$, $pH=7,4$, $I = 0,15 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 1,41 T) (R_{obs} : ●, $R_{\text{illesztett}}$: ●)

Ilyen körülmények között a **3,9-CB^{8O2}PC** ligandum Mn(II)-ionokkal történő komplexképződési reakciója másodrendű kinetikával jól leírható (feltételezve, hogy a két reaktáns koncentrációja egyenlő), a meghatározott sebességi együtthatója 25 °C-on $9,73(1) \times 10^{-5} \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, az ebből számítható 99%-os komplexképződéshez szükséges idő ($t_{99\%}$) 11,8 nap 1,0 mM ligandum ill. Mn(II)-koncentráció esetén (17. ábra). Tehát az egyensúlyi (relaxometriás) különmérés mérés során legalább ennyi időt vártunk, de minden esetben megbizonyosodtunk az egyensúly beálltáról egy későbbi időpontban történő visszaméréssel.

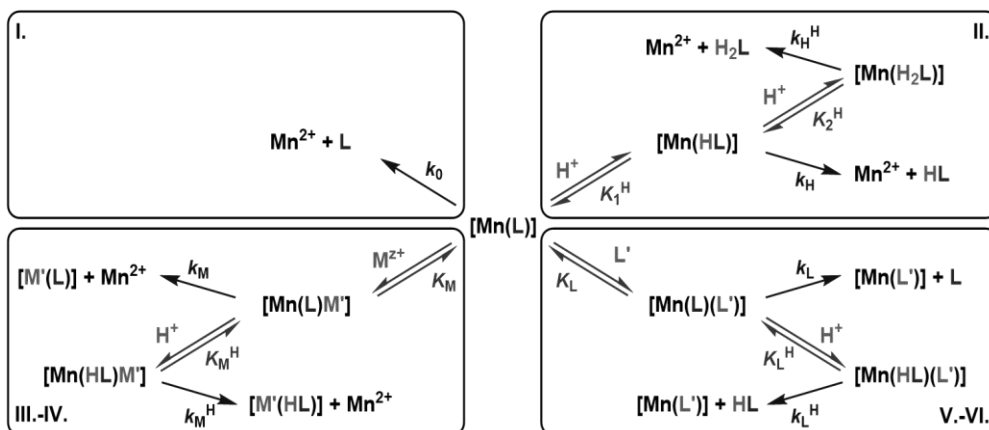


18. ábra A $[Mn(3,9-CB^{8O2}PCBn^{pCO_2H})]$ komplex mért és illesztett képződéskinetikai görbéje ($c_{Mn(II)}=c_{lig}=1,0$ mM, pH=7,4, $I=0,15$ M, $T=37$ °C, 1,41 T) (R_{obs} : ●, $R_{illesztett}$: ●)

A $3,9-CB^{8O2}PCBn^{pCO_2H}$ kelátor Mn(II)-komplexének képződési sebessége jóval lassabbnak bizonyult az alapvegyülethez képest, amit részben a benzilcsoport sztérikus hatása, részben pedig a 6N atom szubsztitúciója miatt lelassult konformációváltás magyarázhat, amely a makrociklus komplexképzéshez kedvező térszerkezetének kialakulásához szükséges. A képződés 37 °C-on illesztett másodrendű sebességi együtthatója $5,48(1) \times 10^{-6}$ mM⁻¹s⁻¹, amely reakció így 209 nap alatt érne el a 99%-os komplexálódást (18. ábra). Ezért szükségessé vált az *in situ* komplexképződés helyett a Mn(II)-komplex szintézise, amit a hőmérséklet növelésével értünk el. A reakciót 90 °C-on a képződési reakció kinetikája lényegesen gyorsabb, így a komplexet 3 - 4 nap alatt sikerült kvantitatívan előállítani.

V.5. Kinetikai mérések eredményei

Napjainkra általánosan elfogadottá vált, hogy az *in vivo* felhasználásra szánt komplexek esetében a kelátok inertsége nagyobb jelentőséggel bír, mint termodinamikai stabilitásuk.^{107,108} Az inertség vizsgálata fontos, mivel így győződhetünk meg arról, hogy kelátok milyen sebességgel disszociálnak, azaz szabadítanak fel fémiont, ill. ligandumot az *in vivo* tartózkodásuk ideje alatt. A komplexek disszociációja többféle úton is lejátszódhat, ha a folyamat protonált köztiterméken keresztül játszódik le, akkor protonasszisztált disszociációs reakcióutakról (k_H , k_H^H) beszélhetünk. Kicserélő esszenciális fémion (M' : Cu(II), Zn(II), stb.) támadásával is lejátszódhat a reakció (k_M), amely során egy kétmagvú köztitermék alakul ki (K_{MnLM}). Ebben a köztitermékben a támadó fémionra egyenként tevődnek át a donoratomok a Mn(II)-ionról. A fémion protonált komplexen is tud támadni (k_M^H), ill. a stabil hidroxido-komplexeket képző fémionok komplexei esetében hidroxidkatalizált disszociáció is bekövetkezhet, habár ez az útvonal a Mn(II)-komplexek esetében nem jellemző. Ezen túl, ha van lehetőség vegyesligandumú köztitermékek képződésére, akkor a különböző protonáltságú kelátorok (L') is kiválthatják a komplexek disszociációját (k_L , k_L^H). Továbbá a disszociáció lejátszódhat egyéb, nem vizsgált útvonalakon is, amelyek összesített hatását egy konstans (k_0) értékkel adhatjuk meg (melyet gyakran spontán útnak is neveznek). Ezen útvonalakat az alábbi **19. ábrán** mutatjuk be, ahol a K_1^H , K_2^H , K_M , K_M^H , K_L és K_L^H egyensúlyi állandókat (a protonált, ill. kétmagvú köztitermék, és vegyesligandumú komplexek protonálódási és stabilitási állandói).

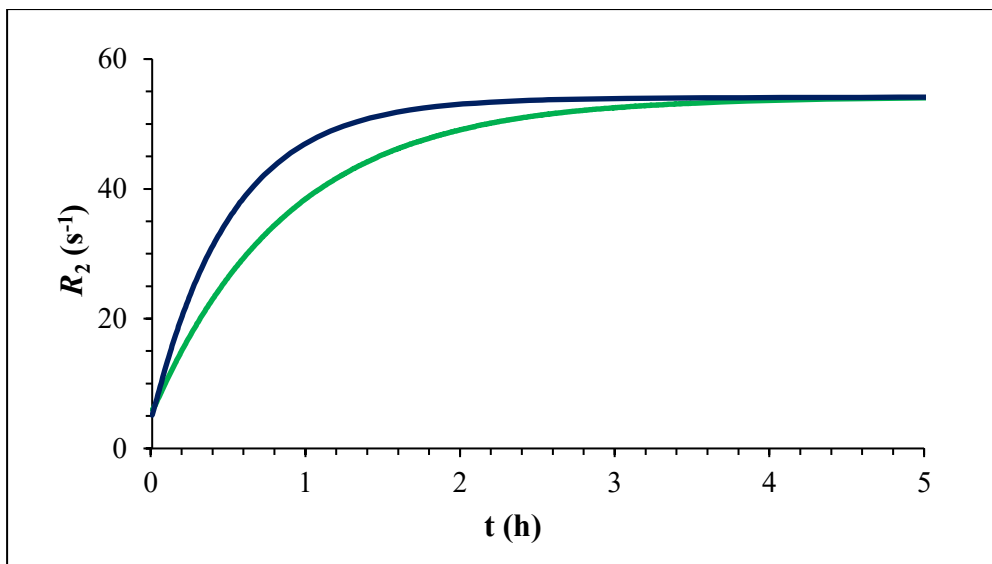


19. ábra A Mn(II)-komplexek lehetséges disszociációs útvonalai.

V.5.1. A PC2A származékok Mn(II)-komplexei inertségének a vizsgálata

A PC2A származékok kinetikai vizsgálatánál, Caravan és mtsai. által javasolt technikát használtuk.⁷⁷ Ezzel a módszerrel kapott adatok, bár nem szolgáltatnak információt a fentebb bemutatott mechanizmusok hozzájárulásáról, de közvetlenül összehasonlíthatók a klinikai kipróbálás 2. fázisában lévő: $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ az inertségével. A módszer a Zn(II)-ionokkal lezajló fémcseré-reakció (25 ekvivalens Zn(II)-ion által indukált fémcseré-reakció pH = 6,0 mellett, 50 mM MES pufferrel beállítva) T_2 relaxometria segítségével történő követésén alapul, 37 °C-os hőmérsékleten. A 25 ekvivalens Zn(II)-ion jelenléte biztosítja a reakció során a pszeudo-elsőrendű kinetikai feltételeket, így a látszólagos sebességi együtthatót az (5) egyenletre illesztve tudtuk meghatározni.

A Mn(II)-komplexek inertségének vizsgálatára a relaxációs sebességek mérése az idő függvényében nagyon érzékeny módszer, a disszociáció következtében felszabaduló Mn(II)-ion nagy r_{2p} relaxivitásának köszönhetően (64,3 és 54,2 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 25 ill. 37 °C-on, 1,41 T térerősségen).

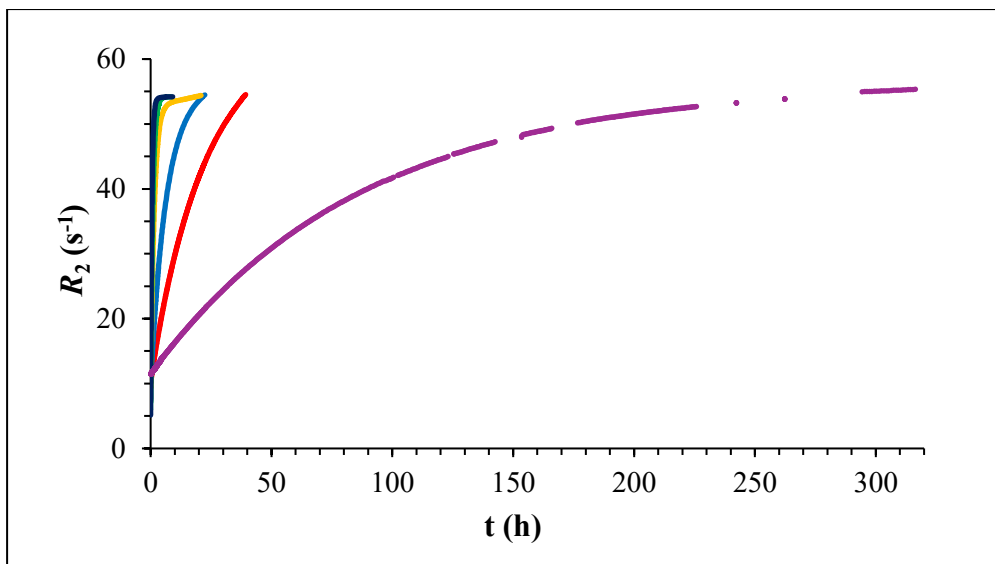


20. ábra. A $[Mn(3,6-PC2A)]$ (R_{obs} : ●) és a $[Mn(3,9-PC2A)]$ (R_{obs} : ●) komplexek disszociációs kinetikai vizsgálata 25 ekvivalens Zn(II)-ion jelenlétében.

(pH=6,0 MES puffer, $c_{komplex} = 1$ mM, $c_{Zn(II)} = 25$ mM, $I = 0,15$ M NaCl, $T = 37$ °C 1,41 T)

A $[Mn(3,6-PC2A)]$ - és $[Mn(3,9-PC2A)]$ -komplexek disszociációjára meghatározott pszeudo-elsőrendű sebességi állandók rendre $3,28(3) \times 10^{-4}$ és $5,43(4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ adódtak (20. ábra). Ezek az értékek nem térnek el számottevően a korábban a Gd(III)-ion alapú kontrasztanyagok alternatívájaként javasolt $[Mn(PyC3A)]^-$ esetben tapasztalt sebességi együtthatótól ($6,76 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).⁷⁷

Az adatok alapján megállapítható, hogy a két izomer ligandum Mn(II)-komplexének inertsége jelentősen eltér, a két komplex közül a $[Mn(3,6-PC2A)]$ -kelát disszociál lassabban, amely különbséget a kelátok szerkezetében lévő különbségekkel lehet értelmezni. A kinetikai viselkedésben tapasztalt különbség azonban kevésbé markáns, mint azt a közelmúltban piklén mono- és dipikolinátszármazékokkal képződő Gd(III)-komplexek esetében megfigyelték.¹⁰⁹



21. ábra A $[Mn(3,6-PC2A)]$ (R_{obs} : ●), a $[Mn(3,9-PC2A)]$ (R_{obs} : ●), a $[Mn(3,9-PC2ABn^{pNO_2})]$ (R_{obs} : ●), a $[Mn(3,9-PC2ABn^{pCO_2H})]$ (R_{obs} : ●), a $[Mn(3,9-PC2MABn^{pCO_2H})]$ (R_{obs} : ●), és a $[Mn(3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO_2H})]$ (R_{obs} : ●) komplexek disszociációs kinetikai vizsgálata 25 ekvivalens $Zn(II)$ -ion jelenlétében. (pH = 6,0 MES puffer, $c_{\text{komplex}} = 1,0 \text{ mM}$, $I = 0,15 \text{ M NaCl}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ 1,41 T)

A **3,9-PC2A** anyaligandum és a bifunkciós ligandumok Mn(II)-komplexeinek a transzverzális relaxivitás-változását az idő függvényében a **21. ábra** mutatja be, az ezekhez a mérésekhez tartozó adatok illesztésével kapott pszeudo-elsőrendű sebességi állandókat (és a meghatározott k_{obs} adatokból számolt felezési idő értékeket) pedig az **3. táblázat**ban hasonlítottuk össze. Ezen adatok alapján a leglassabb disszociációt a bisz(amid)-származék komplexe ($[Mn(3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO_2H})]$) esetén tapasztaltunk, ami teljes összhangban van a merev 12-tagú makrociklusokból származó trisz(amid)-származékok esetében megfigyelt adatainkkal.⁸²

3. táblázat *A vizsgált ligandumokkal alkotott Mn(II)-komplexek kicserélő fémion (25 ekvivalens Zn(II)-ion) által kiváltott disszociációjára jellemző látszólagos sebességi állandók (k_{obs}), és felezési idők ($t_{1/2}$) összehasonlítása, feltüntetve a $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ -komplex megfelelő értékeit. (pH=6,0 MES puffér, $c_{\text{komplex}} = 1,0 \text{ mM}$, $I = 0,15 \text{ M NaCl}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$)*

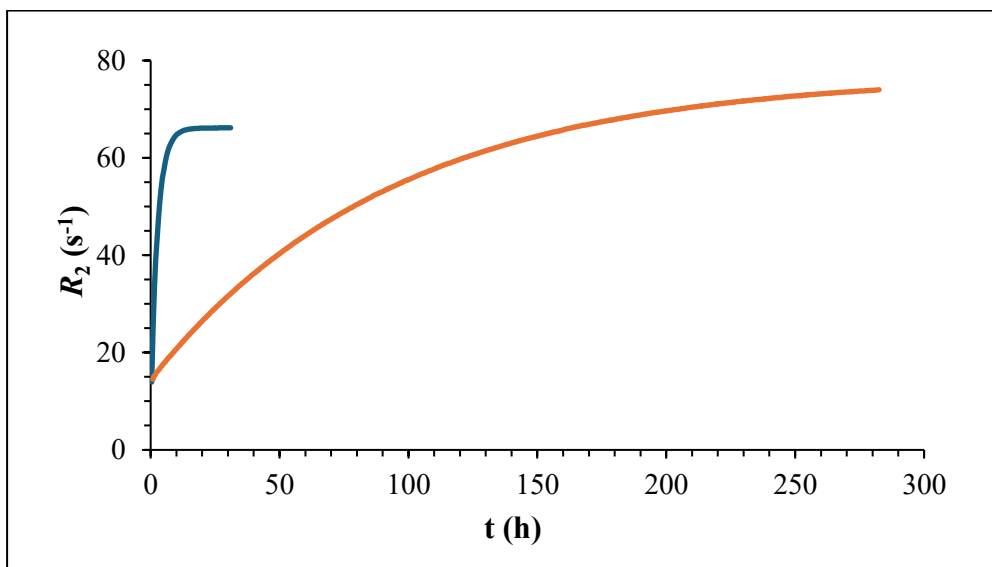
	$k_{\text{obs}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$
$[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ ^a	$6,76 \times 10^{-4}$	0,28
$[\text{Mn}(\mathbf{3,6-PC2A})]$	$3,28(3) \times 10^{-4}$	0,59
$[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2A})]$	$5,43(4) \times 10^{-4}$	0,35
$[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2ABn}^{\text{pNO}_2})]$	$1,31(2) \times 10^{-5}$	14,70
$[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}})]$	$4,28(1) \times 10^{-5}$	4,50
$[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2MABn}^{\text{pCO}_2\text{H}})]^+$	$1,81(1) \times 10^{-4}$	1,06
$[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2AM}^{\text{pipBn}^{\text{pCO}_2\text{H}}})]^{2+}$	$3,15(1) \times 10^{-6}$	61,12

^a Ref. (77).

Annak ellenére, hogy a $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2MABn}^{\text{pCO}_2\text{H}})]$ -komplex nem teljesített jól az egyensúlyi vizsgálatok során, a disszociációjára jellemző felezési ideje nagyobbak bizonyult, mint a kiindulási $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-PC2A})]$ -, valamint a $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ -komplexeké. Az adatok azt mutatják, hogy az anyaligandum **3,9-PC2A** szerkezetének bifunkciós ligandumba történő átalakításával a megfelelő Mn(II)-komplexek disszociációs kinetikai paraméterei minden esetben javultak. A **3,9-PC2ABn**^{pNO₂} nitrocsoportjának redukciója során felmerülő nehézségek (melléktermékek képződése a nitrobenzilcsoport elvesztésével, a makrociklus felnyílása stb.), a bisz(amid)-származék (**3,9-PC2AM**^{pipBn}^{pCO₂H}) [⁵²Mn]Mn(II)-komplexének viszonylag lassú képződéskinetikája, valamint az amidkötések szobahőmérsékleten, pH = 7,4 közelében vagy annál kisebb pH-n megfigyelhető hidrolízise miatt a **3,9-PC2ABn**^{pCO₂H} kelátort választottuk biokonjugációs célokra.

V.5.1. Kriptát származékok Mn(II)-komplexei inertsége

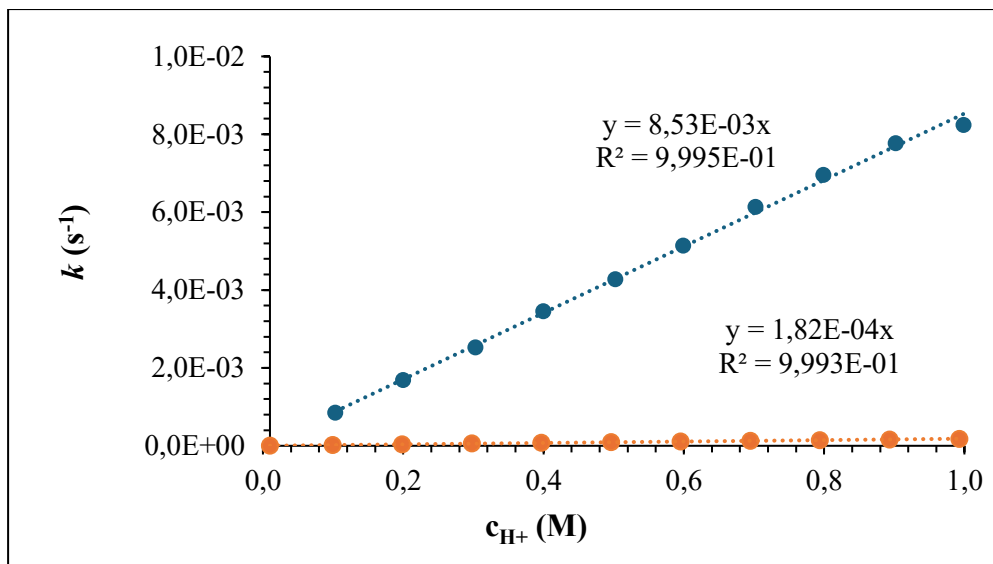
Eddig az irodalomban a Mn(II)-komplexek inertségének meghatározásához P. Caravan és mtsai. által javasolt Zn(II)-ionokkal való fémioncsere-reakció vagy különböző pH-n és kicserélő fémion-koncentráció mellett mért, Cu(II)- esetleg Zn(II)-ionnal lejátszódó kicserélődési reakciók vizsgálata a bevett módszer. Azonban ezek a keresztkötött származékok Mn(II)-komplexei esetében a nagy inertségük nem jöhettek szóba. A kiváló inertséggel rendelkező komplexek (pl. makrociklusos Gd(III)-kelátok) esetébe ezért gyakran a savasszisztált disszociációs útvonal sebességi együtthatójának közvetlen meghatározását végzik el, mely során olyan savkoncentrációknál mérjük a savasszisztált disszociáció sebességét, ahol a komplex már jelentős mértékben disszociál, ill. biztosíthatók a pszeudo-elsőrendű körülmények.



22. ábra A $[Mn(3,9-CB^{8O2}PC)]^{2+}$ (R_{obs} : ●) és a $[Mn(3,9-CB^{8O2}PCBn^{pCO_2H})]^+$ (R_{obs} : ●) komplexek disszociációs kinetikai vizsgálata 1,0 M HCl jelenlétében ($C_{komplex} = 1,0$ mM, $C_{H^+} = 1,0$ M, $I = 1,0$ M, $T = 25$ °C 1,41 T.)

A $3,9-CB^{8O2}PC$ és $3,9-CB^{8O2}PCBn^{pCO_2H}$ ligandumok Mn(II)-komplexeinek a transzverzális relaxivitás-változását az idő függvényében 1,0 M savkoncentráció esetén a 22. ábra mutatja be. A savasszisztált disszociációt

mindkét komplex esetén 0,1 - 1,0 M savkoncentráció tartományban vizsgáltuk, az így kapott k_{obs} értékeket legjobban leíró modellt pedig a lineáris összefüggés volt (**23. ábra**). Ez alapján a proton koncentráció négyzetes hozzájárulása a disszociációhoz elhanyagolható mértékű, ami összhangban van az első és második protonálódási állandók közötti nagy különbséggel is. Az adatsor kisebb savkoncentrációjú részére való illesztés esetén az egyenes metszéspontjának standard deviációja mindkét származék esetén összemérhető vagy meghaladja a tengelymetszet számolt nagyságát, így a komplex spontán disszociációjára jellemző k_0 érték ennél kisebb, vagy elhanyagolható. Mindezek fényében az illesztett k_1 sebességi együtthatók értéke a $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\text{PC})]^{2+}$ -komplex esetén $8,53(6) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek, míg a $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\text{PCBn}^{p\text{CO}_2\text{H}})]^+$ -kelát esetén $1,82(2) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek adódott. Ha a többi disszociációs útvonal valóban elhanyagolható, a $\text{pH} = 7,4$ -re extrapolált felezési ideje a két komplex esetére rendre 64,7, ill. 3033 évnek adódik. A keresztkötött származékok inertségéhez való savkatalizált hozzájárulás a **3,9-PC2A** és **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** ligandumok Mn(II)-komplexeinek analógiájára a funkcionálizálás hatására jelentősen, több mint egy nagyságrenddel csökkent, aminek ebben az esetben is a 6N atom csökkent bázicitása a feltételezhető oka. (A **3,6-PC2A**, a **3,9-PC2A** és a **3,9-PC2ABn^{pNO₂}** ligandumok Mn(II)-komplexeinek disszociációs kintetikáját vizsgálatuk részletesen is.) Összehasonlítva a kapott k_1 értékeket irodalmi adatokkal kijelenthető, hogy a kriptand típusú alapvegyület Mn(II)-komplexének inertsége megközelíti, míg bifunkciós származékának az inertsége jelentősen meghaladja az irodalomban eddig publikált leginertebb Mn(II)-komplekként hivatkozott biszpidin-származék, valamint a klinikai képzőanyagban használt gadoteridol Gd(III)-alapú MRI kontrasztanyag inertségét (**4. táblázat**).⁶³



23. ábra A $[Mn(3,9-CB^{802}PC)]^{2+}$ (●) és a $[Mn(3,9-CB^{802}PCBn^{pCO_2H})]^+$ (●) komplexek esetében tapasztalt pseudo-elsőrendű sebességi állandók H^+ -ion koncentráció függése.
($c_{komplex} = 1,0$ mM, $I = 1,0$ M, $T = 25$ °C 1,41 T.)

A k_0 pontos meghatározására (ha van hozzájárulás) kisebb pH-n történő mérésekre lenne szükség, azonban a hosszú felezési idők miatt (több mint 1 év 4,0-es pH-n) erre nincs lehetőség a gyakorlatban. Ettől függetlenül azon lehetőség kizárása érdekében, hogy a savasszisztált disszociáción kívül más útvonalnak is van hozzájárulása a fémkomplex disszociációjához, megvizsgáltuk a $[Mn(3,9-CB^{802}PCBn^{pCO_2H})]^+$ -komplex Zn(II)-ionokkal történő kicserélődési reakcióját 37 °C-on a P. Carvan és munkatársai által javasolt körülmények között. A tapasztalataink alapján 4 nap alatt a relaxivitás 5%-os változását detektáltuk, amelyből csak becsülni lehet a felezési időt a végső (R_∞) relaxációsebesség ismeretében. Feltételezve, hogy ebben az esetben nem kell számolni más disszociációs útvonallal (pl. fémkatalizált disszociáció), a meghatározott k_{obs} értéke jó közelítéssel egyenlő lesz a k_0 állandóval, hiszen a savkatalizált disszociáció sebessége ilyen körülmények között elhanyagolható ($t_{1/2} = 121$ év). Így a kinetika görbe kezdeti szakaszából becsült k_0 hozzájárulás a komplex disszociációjához 37 °C-on 3×10^{-8} s⁻¹ ($t_{1/2} = 263$ nap). Ez az érték 25 °C-on várhatóan még ennél is kisebbnek adódik, azaz

nagyságrendekkel kisebb, mint a nagy savkoncentrációnál végzett disszociáció kinetikai mérésekből meghatározott/meghatározható tengelymetszet értéke.

4. táblázat A $[Mn(3,9-CB^{802}PC)]^{2+}$ és a $[Mn(3,9-CB^{802}PCBn^{pCO_2H})]^+$ -komplexek savasszisztált disszociációjára jellemző sebességi állandók, egyes kereskedelmi forgalomban elérhető Gd(III)-komplexek adataival összehasonlítva ($c_{\text{komplex}} = 1,0 \text{ mM}$, $I = 1,0 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

	$k_1 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{obs}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 1M HCl-ban
$[Mn(L1)]^{a, b}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$
$[Gd(HP-DO3A)]^c$	$6,8 \times 10^{-4}$	—
$[Gd(DO3A-BT)]^c$	$2,8 \times 10^{-5}$	—
$[Mn(3,9-CB^{802}PC)]^{2+}$	$8,53(6) \times 10^{-3}$	$8,24(1) \times 10^{-3}$
$[Mn(3,9-CB^{802}PCBn^{pCO_2H})]^+$	$1,82(2) \times 10^{-4}$	$1,7841(1) \times 10^{-4}$

^a ezen komplex a pszeudo-elsőrendű sebességi állandói H^+ -ion koncentrációjától való függése négyzetes.

^b Ref. (65), ^c Ref. (110)

A rendkívül nagy inertséggel rendelkező komplexek esetén, mint amilyenek az itt tárgyalt keresztkötött származékok is, lehetőség van arra, hogy az elkészített komplex oldatát, ami az egyensúly (pl. kis látszólagos stabilitás) miatt tartalmaz szignifikáns mennyiségű szabad Mn(II)-iont is - valamilyen eljárással (pl. ioncsere) megtisztítsunk a szabad Mn(II)-ionoktól, hiszen az egyensúly újbóli beállta több évbe/évtizedbe telne fiziológiás körülmények között.

V.6. A Mn(II)-komplexek relaxometriás vizsgálatai

Mivel az előállított Mn(II)-komplexek tartalmaznak a fémionhoz koordinálódó vízmolekulát ezért vizsgáltuk a komplexek relaxivitását is, bár nem a relaxitás optimalizálása volt a célunk. A kelátorok tervezését azonban úgy végeztük, hogy az MRI- és PET-képző eljárások kombinálásának elméleti lehetősége megmaradjon (azaz a biokonjugációért felelős oldalláncok reaktív csoportja ne befolyásolja a fémion koordinációs szféráját a kiindulási **3,9-PC2A** anyaligandumhoz képest).

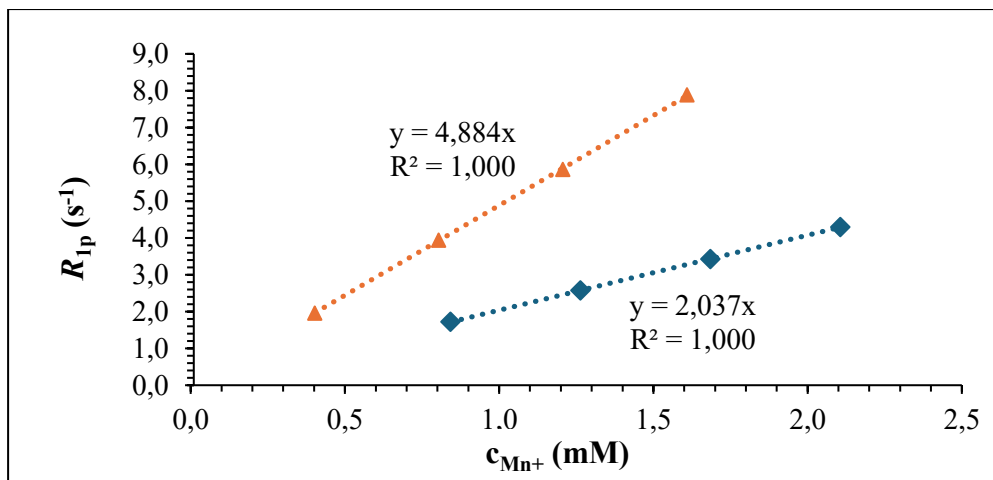
5. táblázat A vizsgált és összehasonlítási alapként szolgáló ligandumok Mn(II)-ionnal kialakított komplexeinek relaxivitás értékei. (pH = 7,4)

	20 MHz / 0,49T				60 MHz / 1,41 T			
	r_{1p} (mM ⁻¹ s ⁻¹)		r_{2p} (mM ⁻¹ s ⁻¹)		r_{1p} (mM ⁻¹ s ⁻¹)		r_{2p} (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
PyC3A ^a	3,3	2,1	—	—	2,8	2,5	—	4,9
3,6-PC2A	2,72	—	3,49	—	2,41	—	4,2	—
3,9-PC2A	2,91	—	3,96	—	2,24	—	4,82	—
3,9-PC2ABn ^{pNO₂}	4,19	—	—	—	—	—	—	—
3,9-PC2ABn ^{pCO₂H}	5,13	5,03	7,89	11,42	4,95	3,69	11,29	8,22
3,9-PC2MABn ^{pCO₂H}	4,05	3,05	5,95	4,44	3,92	2,76	9,44	7,15
3,9-PC2AM ^{pip} Bn ^{pCO₂H}	5,78	4,32	8,98	6,78	5,83	4,17	13,57	10,12
3,9-CB ⁸⁰² PC	2,41	1,97	3,32	2,68	2,04	1,54	5,76	4,58
3,9-CB ⁸⁰² PCBn ^{pCO₂H}	4,96	4,27	8,23	7,65	4,88	4,03	12,78	12,76

^a Ref. (77).

A relaxitás ($r_{1,2p}$) az 1 mM koncentrációjú paramágneses anyag oldatának longitudinális ($1/T_{1p}$) és transzverzális ($1/T_{2p}$) relaxációsebesség növelő hatása a diamágneses környezethez képest. A vizsgált Mn(II)-komplexek relaxitásait az **5. táblázat**ban hasonlítottuk össze.

A vizsgált bifunkciós ligandumok Mn(II)-komplexei relaxitása eléri vagy meghaladják a kereskedelmi forgalomban lévő, leggyakrabban használt Gd(III)-alapú MRI kontrasztanyagok megfelelő értékeit.¹¹¹ A [Mn(**3,9-PC2ABn^{pNO₂}**)]-, [Mn(**3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**)]-, [Mn(**3,9-PC2MABn^{pCO₂H}**)]-, és [Mn(**3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}**)]-komplexek esetében 0,49 T térerőn és 25 °C-on 4,19, 5,13, 4,09 és 5,78 mM⁻¹s⁻¹ r_{1p} értékeket kaptunk, míg az anyaligandum Mn(II)-kelátjára, a [Mn(**3,6-PC2A**)]-komplexre, jellemző érték 2,91 mM⁻¹s⁻¹-nak adódott. Ezek az adatok megerősítik egy Mn(II)-ionhoz koordinált vízmolekula jelenlétét a fémion belső koordinációs szférájában (ami a jövőben elengedhetetlen a PET- és az MRI-képző eljárások kapcsolásához).



24. ábra

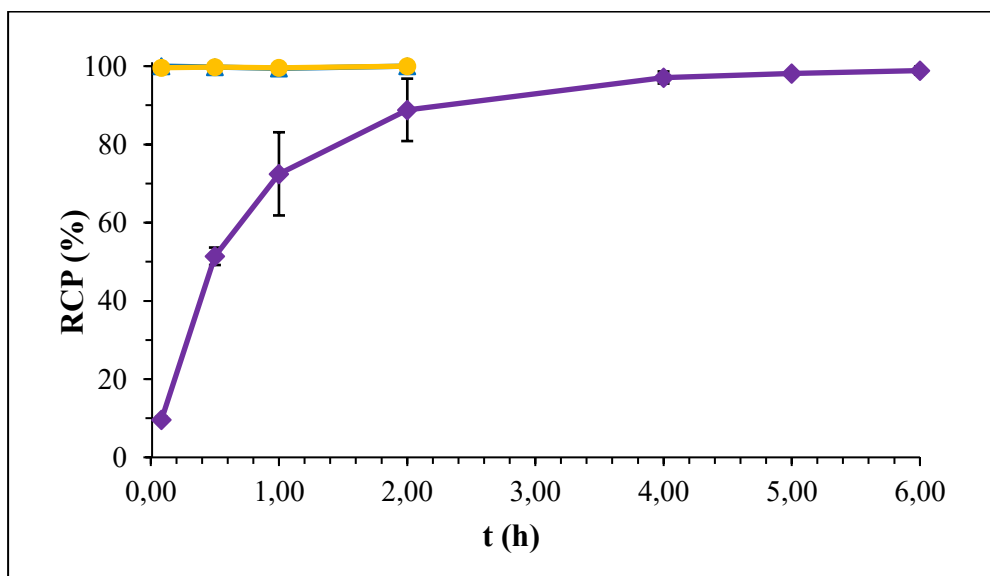
$A [Mn(3,9-CB^{8O_2}PC)]^{2+}$ (◆) és $[Mn(3,9-CB^{8O_2}PCBn^{pCO_2H})]^+$ (▲) komplexek r_{1p} relaxivitás meghatározása. (pH = 7,4, $T = 25$ °C, 1,41 T)

Meghatároztuk a **3,9- $CB^{8O_2}PC$** ligandum Mn(II)-komplexének relaxivitását is, ami $2,41 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ -nek (r_{1p}) adódott 0,49 T térerőn és 25 °C-on. Ezen relaxitás adatok hasonlóak a legtöbb, jelen dolgozatban, ill. az irodalomban korábban előállított, 1 koordinált vízmolekulát tartalmazó piklén származékokéhoz. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a keresztkötés hatására is megmaradhatott a többi, dolgozatban tárgyalt ligandumra jellemző pentagonális bipiramisos koordinációs geometria, ahol a vízion az egyik axiális helyzetben koordinálódik a fémionhoz. A **3,9- $CB^{8O_2}PCBn^{pCO_2H}$** származék Mn(II)-komplexének relaxitása a funkcionizálatlan ligandumhoz képest jelentősen, közel kétszeresére nőtt ($r_{1p} = 4,96 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 0,49 T térerőn és 25 °C-on), amit feltételezhetően a nagyobb molekulaméret miatt megnőtt rotációs korrelációs idővel magyarázható. Hasonló trendet a **3,9- $PC2A$** és **3,9- $PC2ABn^{pCO_2H}$** / **3,9- $PC2ABn^{pNO_2}$** ligandum komplexei esetében is megfigyeltünk, ezentúl kutatócsoportunk korábbi eredményei között is számos példát találhatunk arra, hogy pl. benzilcsoporttal történő módosítást követően hasonló arányban nőtt a komplexek relaxitása is (pl. **3,6- $PC2A-EOB$** , **3,9- $PC2A-EOB$** , **BPPA-EOB**, **3,9- $PC2A-BP$** , stb.) a megfelelő

anyavegyületekhez képest.^{58,61,112,113} A relaxivitás növekedés klinikai gyakorlatban releváns körülmények között ($r_{1p} = 4,03 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 1,41 T térerőn és 37 °C-on) összemérhető a jelenleg alkalmazott Gd(III)-komplexek relaxivitásával (gadotersav: $r_{1p} = 2,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; gadoteridol: $r_{1p} = 2,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; gadobutrol: $r_{1p} = 3,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), kivéve a gadopiklenol esetére mért értéket, amely azonban nagyobb molekulatömegű és két koordinált vízmolekulát is tartalmaz, tehát kifejezetten nagy relaxitású ágensek fejlesztettek ($r_{1p} = 12,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).^{114,115}

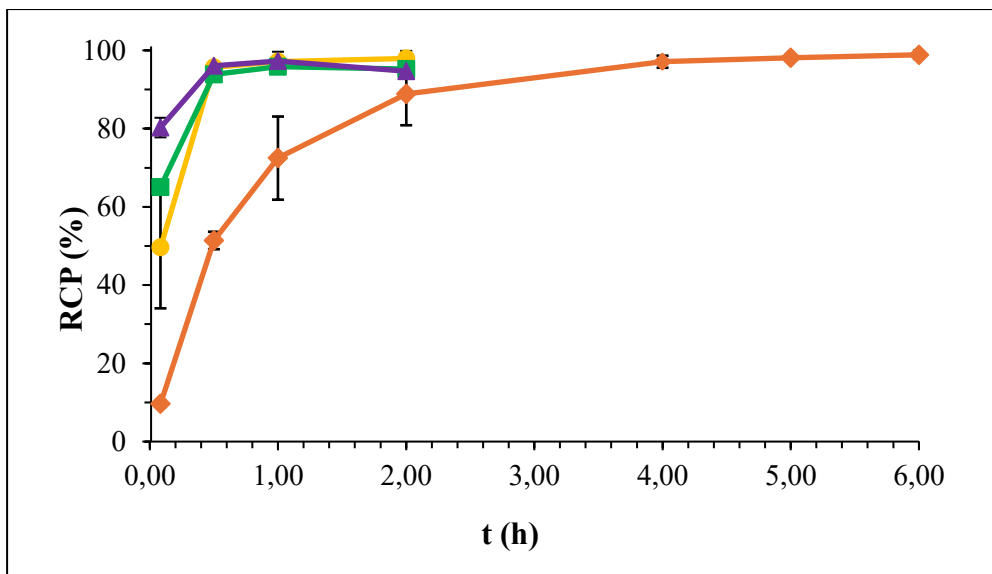
V.7. Ligandumok [^{52}Mn]Mn izotóppal történő jelölésének eredményei

A további vizsgálatokhoz az ideális kelátor kiválasztása érdekében összehasonlítottuk a **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**, a **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}** és a **3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}** ligandumok [^{52}Mn]Mn(II)-vel történő radiojelzését. A **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** és a **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}** ligandumok pillanat szerűen, 100%-os (kvantitatív) hozammal komplexálták az [^{52}Mn]Mn-izotóppal a vizsgálati körülmények között (HEPES pufferben pH = 7, szobahőmérsékleten) (**25. ábra**), és szobahőmérsékleten legalább 2 órán keresztül stabilak maradtak a vizsgált koncentrációtartományban (2 μM - 2 mM).



25. ábra Az inkubációs idő hatása a vizsgált ligandumok (▲ 2,19 mM **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**, ● 2,07 mM **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}**, ◆ 1,69 mM **3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}**) radiokémiai jelölés hozamára (átlag \pm standard deviáció, n = 3) [^{52}Mn]Mn(II)-vel szobahőmérsékleten. (HEPES pufferben pH = 7).

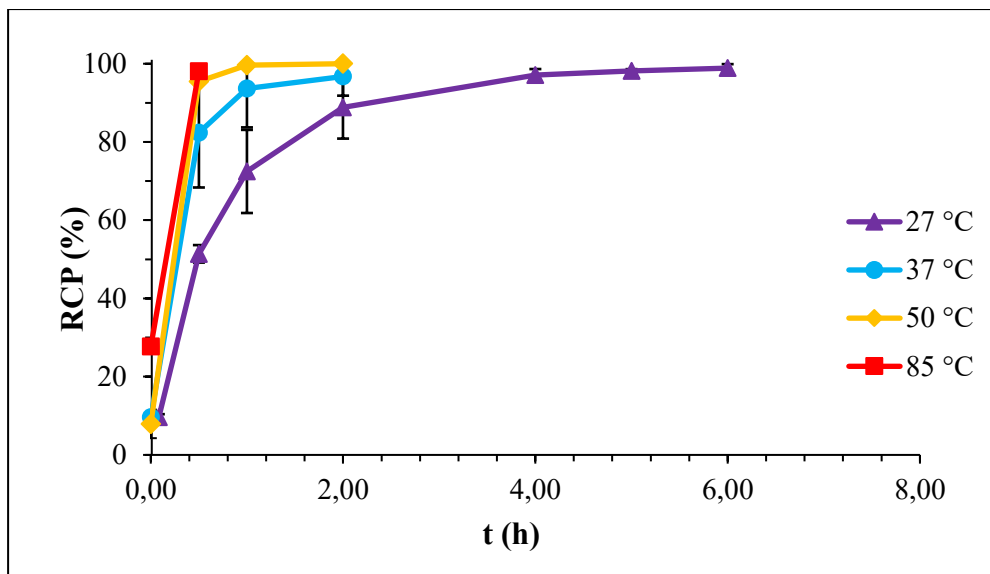
A **3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H}** ligandummal végzett jelölési reakciók viszonylag lassúak voltak szobahőmérsékleten, és még a ligandum legnagyobb (1,69 mM) koncentrációjánál sem sikerült kvantitatív jelölést elérni: 1,69 μM ligandum koncentrációt alkalmazva 240 percnyi inkubációra volt szükség a 95%-os jelölés eléréséhez (**26. ábra**).



26. ábra A 3,9-PC2AMPipBn^pCO₂H ligandum koncentrációjának (▲ 1,69 mM, ■ 169 μM, ● 16,9 μM, ◆ 1,69 μM) hatása a [⁵²Mn]Mn(II)-vel történő radiokémiai jelölés hozamára (átlag ± standard deviáció, n = 3) szobahőmérsékleten (HEPES pufferben pH = 7)

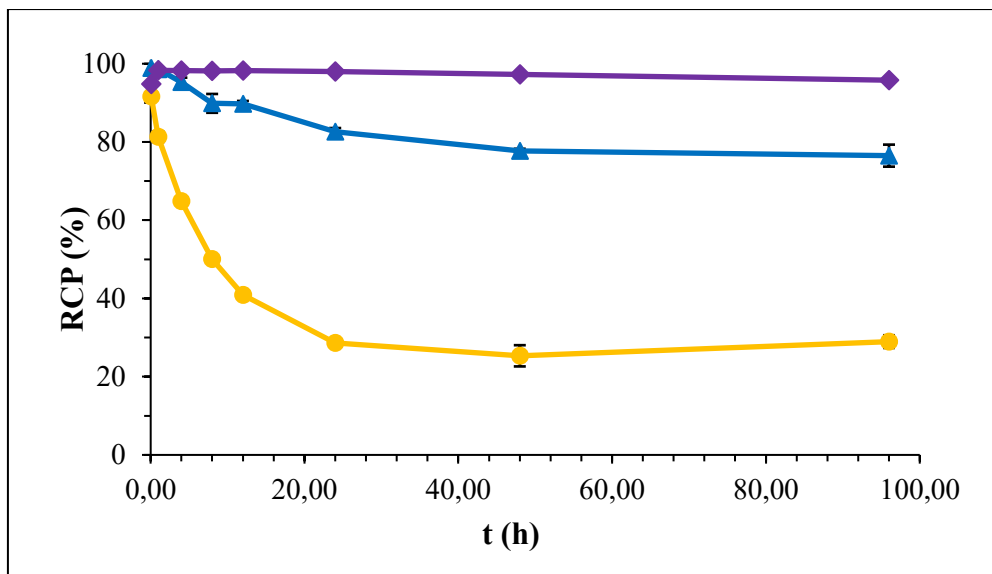
A 3,9-PC2AMPipBn^pCO₂H ligandum esetében vizsgáltuk a hőmérséklet hatását komplexképződés sebességére a jelöléshez szükséges idő csökkentése érdekében. Az eredményeket az 27. ábra. ábra foglalja össze, ahol látható, hogy a 3,9-PC2AMPipBn^pCO₂H ligandummal 30 perc alatt 95%-os jelölést lehet elérni, ha a reakciót 50 °C-on hajtjuk végre.

A disszociációs kinetikai vizsgálatok eredményeit párhuzamba szeretnénk volna állítani a PET-re jellemző koncentrációtartományban végezett vizsgálati eredményekkel ezért transzkelációs reakciókat is vizsgáltunk melyhez *transz*-CDTA ligandum nagy feleslegét használtuk. A *transz*-CDTA kifejezetten nagy stabilitású Mn(II)-komplexet képez ($\log K_{MnL} = 14,32$ és $pMn = 8,66$), ezért a feleslege mellett végrehajtott reakciók teljes mértékben lejátszódnak.³⁶



27. ábra A hőmérséklet (▲ 27°C, ● 37°C, ◆ 50°C, ■ 85°C) hatása a **3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}** ligandum [⁵²Mn]Mn(II)-vel történő radiokémiai jelölésének hozamára (átlag ± standard deviáció, n = 3) 1,69 μM kelátor koncentrációnál (HEPES pufferben pH = 7).

Amint az a **28. ábrán** látható, a **3,9-PC2MABn^{pCO₂H}** ligandum [⁵²Mn]Mn(II)-jelöltje esetében viszonylag kis inertséget figyeltünk meg, így a komplex meglehetősen gyorsan elveszítette a Mn(II)-iont. Ugyanakkor a radioaktívan jelzett [⁵²Mn][Mn(**3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}**)]-kelát a teljes vizsgálat során nem disszociált. A **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** [⁵²Mn]Mn(II)-komplexe lassan disszociált, 12 óra alatt a komplex kb. 9%-a szenvedett transzkelációt.

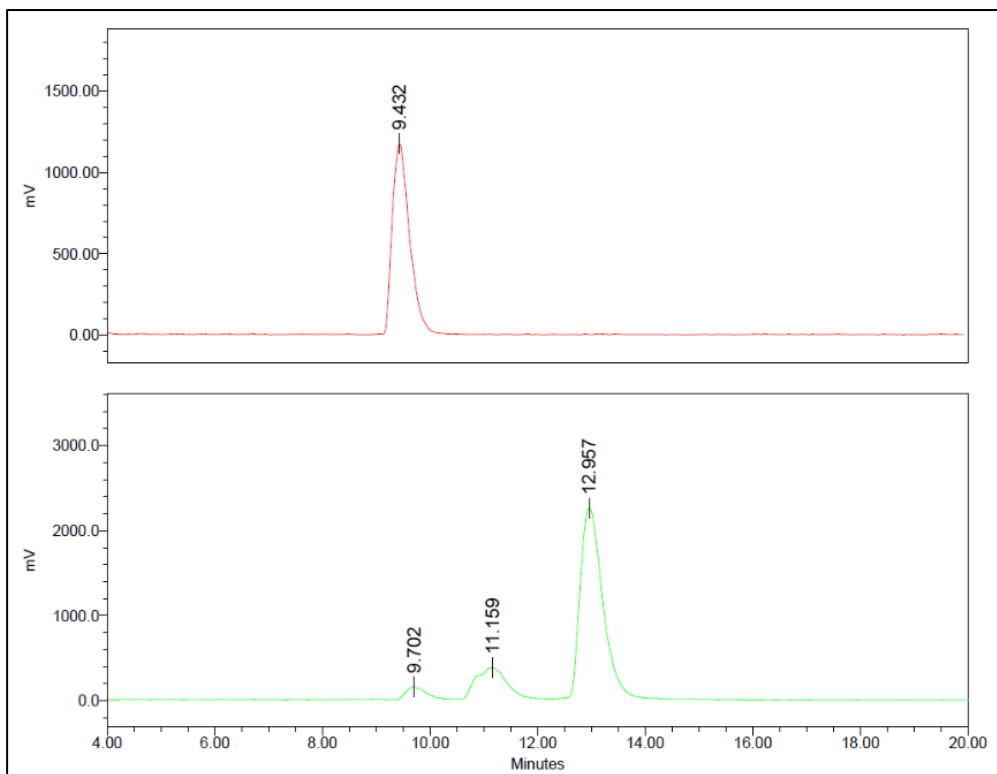


28. ábra A $[^{52}\text{Mn}][\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}})]$ ▲, a $[^{52}\text{Mn}][\text{Mn}(3,9\text{-PC2MABn}^{\text{pCO}_2\text{H}})]$ ●, és a $[^{52}\text{Mn}][\text{Mn}(3,9\text{-PC2AM}^{\text{pipBn}^{\text{pCO}_2\text{H}}})]$ ◆ komplexek transzkelációs reakciója *transz*-CDTA ligandummal. (átlag ± standard deviáció, n = 3) (300 µL ligandumoldat (21,9mM ▲, 20,7mM ●, 16,9mM ◆, 5 mM HEPES, pH = 7), és 1 µL $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ -oldat (MQ-víz, 70 kBq) elegyét inkubáltuk szobahőn 1 órán keresztül, majd 6,6 µL 100mM-os *transz*-CDTA oldatot adtunk az elegyhez)

Ezen eredmények birtokában fontosnak tartjuk aláhúzni, hogy a fémioncsere-reakció (amelyet millimólos koncentrációtartományban, Zn(II)-kicserélő fémion használva vizsgáltunk) és a transzkelációs reakciók (melyet *transz*-CDTA ligandummal radiokémiai körülmények között alkalmaztunk) reakciósebességeinek sorrendje megegyezett. Ez azt jelenti, hogy az adott ligandum-család esetében a nem radioaktív Mn(II)-ionnal végzett vizsgálatok alapján megbecsülhetjük a jelölt kelátok viselkedését.

A konjugációhoz és a további *in vivo* kísérletekhez inertség alapján a **3,9-PC2AM^{pipBn}^{pCO₂H}** ligandum kiválasztása tűnik a legcélszerűbbnek. Azonban a bisz(amid)-származékok esetében vizsgálataink során amid oldalláncok részleges hidrolízisét tapasztaltuk, amely két lépésben a megfelelő diacetát-származék (**3,9-PC2ABn^{pCO₂H}**) kialakulásához vezetett (**29. ábra**). Bár a bomlás mértéke nem olyan jelentős, hogy a stabilitási vizsgálatokat

befolyásolja, de mivel a vegyes és diacetát származékok gyorsabban jelölnek így a radio-kromatogramon azonnal megjelennek a hidrolízis miatt bomlási termékek. A bisz(amid) származékok PET-alkalmazását nem javasoljuk.

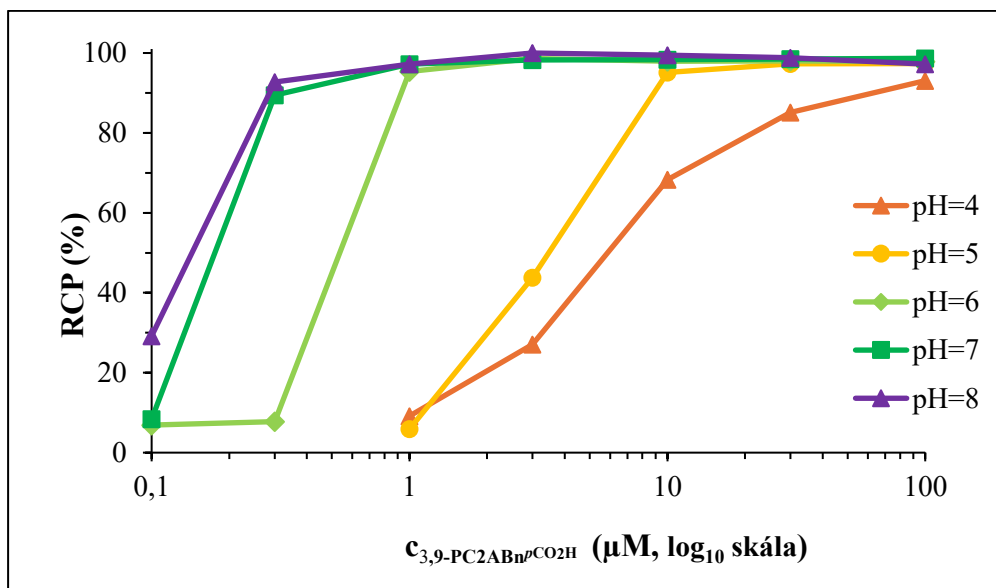


29. ábra A $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ radiojelzett $3,9\text{-PC2AM}^{\text{p}}\text{Bn}^{\text{pCO}_2\text{H}}$ (többnapos törzsoldatból készítve) (zöld) és a $\text{PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}}$ (piros) ligandumok Radio-HPLC kromatogramjai. (Gradiens: 0,00→5,00 min 5% B, 5,00→15,00 min 5→55% B; eluensek: 20 mM Foszfát puffer (pH = 6) (A) és acetonitril (B), 1 mL/min áramlási sebesség.)

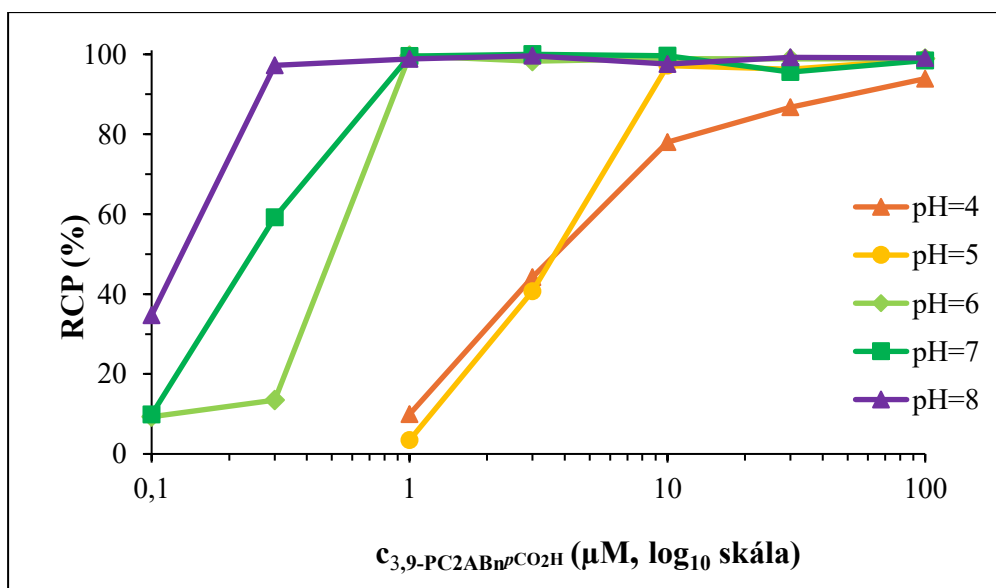
A szobahőmérsékleten mért lassú komplexképződés és a bifunkciós ligandum, ill. a konjugátuma hidrolitikus labilitása miatt a további vizsgálatainkhoz a $3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}}$ ligandumot választottuk.

Az *in vivo* kísérletekhez részletesen vizsgáltuk a pH, a hőmérséklet, a reakcióidő és a ligandum koncentrációjának hatását a $3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}}$ kelátor $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ -vel történő jelzésére. Meghatároztuk a $[^{52}\text{Mn}][\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}})]$ kelát radiokémiai tisztaságát 5 perces reakcióidővel 25 (30.

ábra) és 95 °C-on (31. ábra), $[3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}}] = 0,1 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$ jelenlétében, 4 - 8 pH-tartományban.



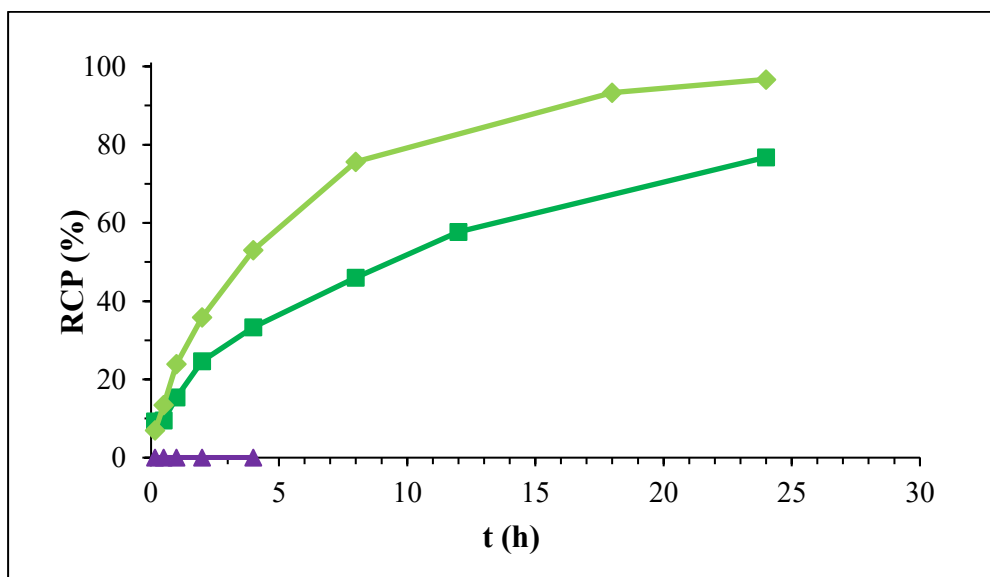
30. ábra A $3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}}$ ligandum radiojelzésének optimalizálása $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ -vel szobahőmérsékleten, 5 perces reakcióidővel, a pH függvényében (a pH = 4 – 8 pH-tartományban ($n = 1$)).



31. ábra A $3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pCO}_2\text{H}}$ ligandum radiojelzésének optimalizálása $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ -vel 95 °C-on, 5 perces reakcióidővel, a pH függvényében (a pH = 4 – 8 pH-tartományban ($n = 1$)).

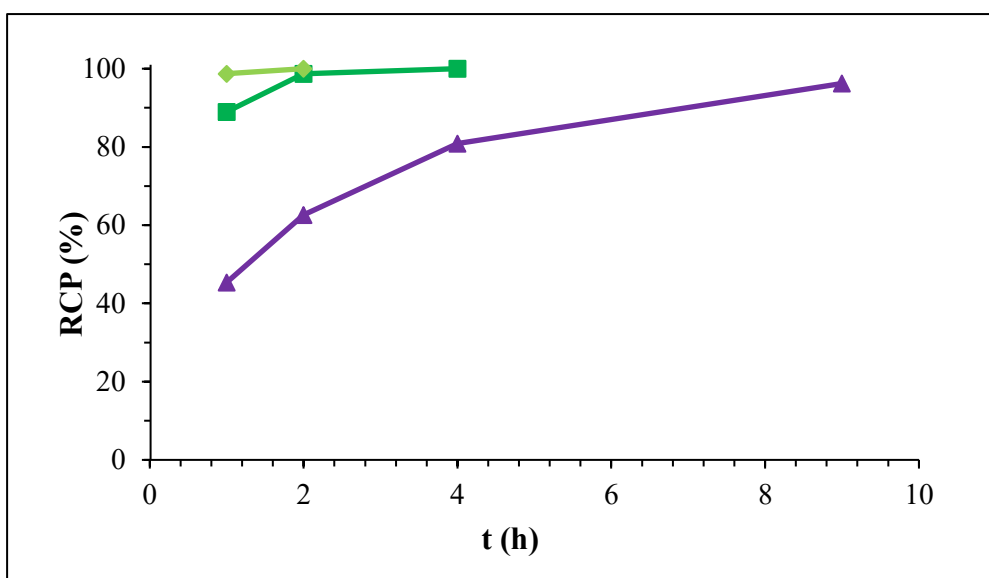
A **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** [⁵²Mn]Mn(II)-vel történő jelölésének hatékonysága a pH növekedésével javult, 1 μM ligandum koncentrációt alkalmazva 6-os pH felett nagyobb mint 95%-os radiokémiai tisztaságot lehetett elérni, míg pH = 5,0 esetén egy nagyságrenddel nagyobb ligandum koncentrációra volt szükség ugyanilyen jelölési hozam eléréséhez. A reakcióidő hatását is vizsgáltuk minden pH-nál a ligandum-koncentráció függésének az inflexiós pontján. A hosszabb reakcióidő nem eredményezett nagyobb jelzési hozamot, tehát a [⁵²Mn]Mn(II)-jelölés már szobahőmérsékleten is pillanatok alatt bekövetkezik.

Ahogy azt korábban a kinetikai adatoknál is láttuk, a **3,9-CB⁸⁰²PC**, és a **3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}** ligandumok merev szerkezetének köszönhetően ezek Mn(II)-komplexei kiemelkedő inertséggel rendelkeznek. Azonban ezen ligandumokkal képződő komplexek képződési sebessége is lényegesen kisebb (lásd korábban). Így ezen ligandumok esetén a kelátorok jelölhetőségét nagyobb, 1 - 5 mM-os, ligandumkoncentrációnál vizsgáltuk az idő, pH és hőmérséklet hatását a [⁵²Mn]Mn(II)-jelölés hatásfokára.



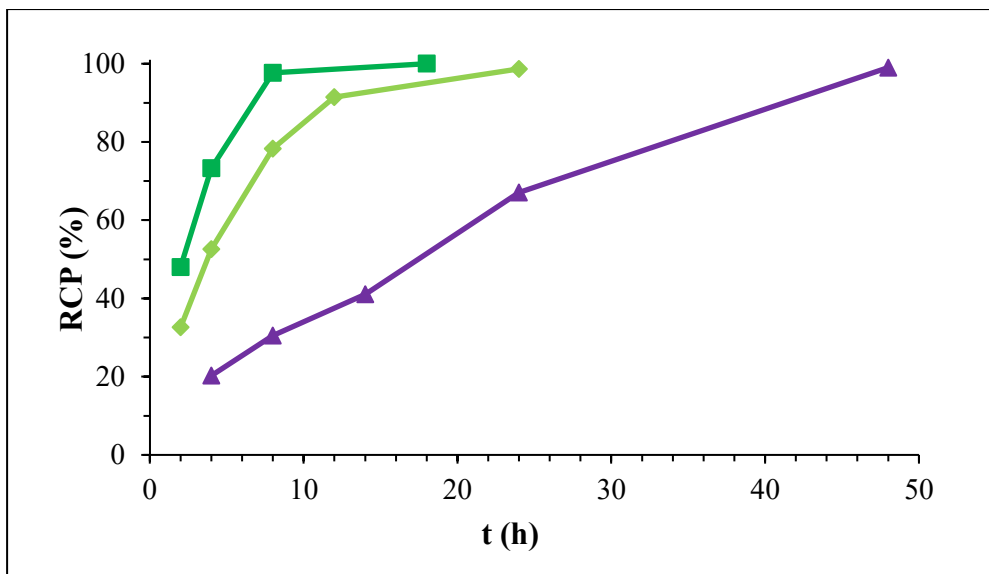
32. ábra Az inkubációs idő hatása a **3,9-CB⁸⁰²PC** ligandum (1,0 mM) [⁵²Mn]Mn(II)-vel történő radiokémiai jelölésének hozamára pH = 6,0 (◆), 7,0 (■) és 8,0-nál (▲) szobahőmérsékleten (n = 1).

Vizsgáltuk a reakcióidő hatását a $[^{52}\text{Mn}][\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\text{PC})]$ -kelát radiokémiai tisztaságára, pH = 6,0, 7,0 és 8,0-nál szobahőmérsékleten (**32. ábra**), és 90 °C-on (**33. ábra**). Meglepetésünkre a jelölés hatékonysága a pH csökkenésével javult, 5 mM ligandum koncentrációt alkalmazva pH = 6,0-nál nagyobb mint 97%-os radiokémiai tisztaságot tudtunk elérni 24 óra leforgása alatt, szobahőmérsékleten, 1 mM ligandum koncentrációt alkalmazva 6,0-os pH-n pedig közel 100%-os radiokémiai tisztaságot lehetett elérni 1 óra alatt 90 °C-on.



33. ábra Az inkubációs idő hatása a $\mathbf{3,9-CB}^{802}\text{PC}$ ligandum (1,0 mM) $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ -vel történő radiokémiai jelölésének hozamára pH = 6,0 (◆), 7,0 (■) és 8,0-nál (▲) 90 °C-on (n = 1).

Vizsgáltuk a reakcióidő hatását is a $\mathbf{3,9-CB}^{802}\text{PCBn}^{\text{pCO}_2\text{H}}$ bifunkciós ligandum $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn(II)}$ -vel való jelzési reakciójára 5 mM ligandum koncentrációt alkalmazva, pH = 6,0, 7,0 és 8,0-nál, 90 °C-on (**34. ábra**). A jelölés hatékonysága pH = 7,0-nél maximumot mutatott, 5 mM ligandum koncentrációt alkalmazva, így 100 %-os radiokémiai tisztaságot lehetett elérni 18 óra alatt 90 °C-on, de már 8 óra alatt is 98%-ot meghaladó hozamot sikerült elérni.



34. ábra Az inkubációs idő hatása a 3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H} ligandum (5,0 mM) [⁵²Mn]Mn(II)-vel történő radiokémiai jelölésének hozamára pH = 6,0 (◆), 7,0 (■) és 8,0-nál (▲) 90 °C-on (n = 1).

V.8.A bifunkciós ligandum (BFL) konjugálása anti-HER2 affitesttel

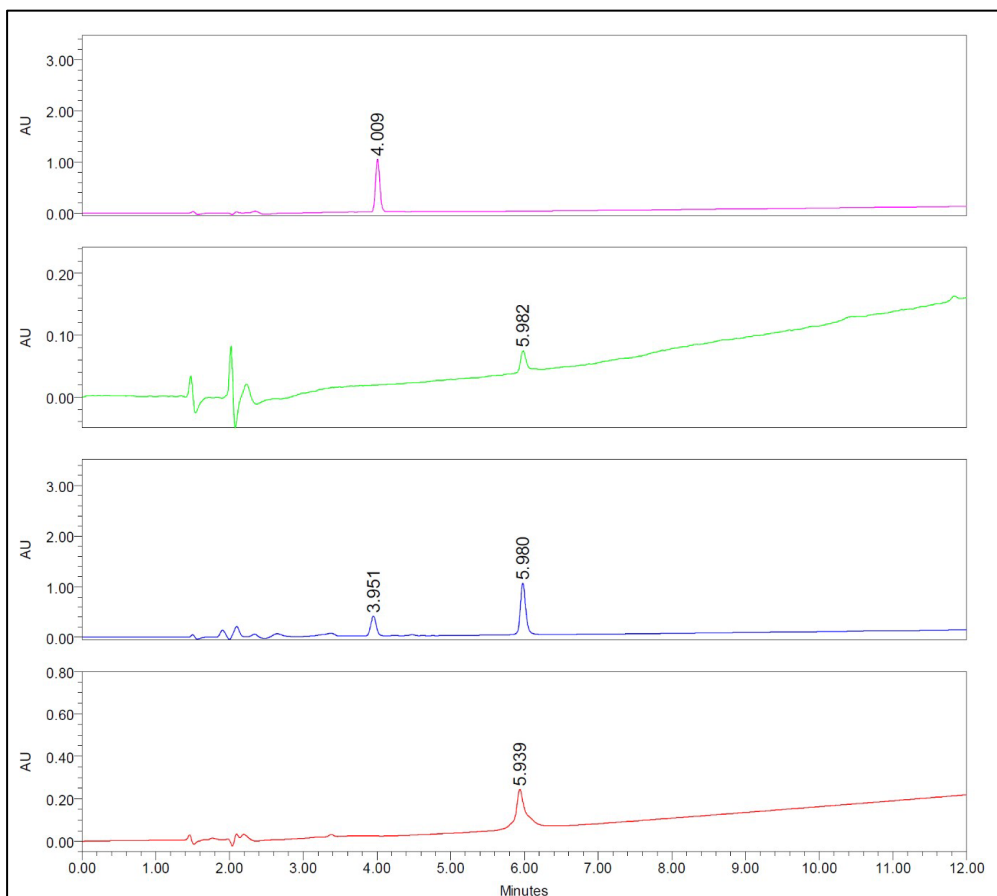
Az anti-HER2 specifikus affitest biovektor molekulát a Román Akadémia Biokémiai Intézetében az Enzimológiai csoport tagjai, Stefan Szedlacek és munkatársai expresszálták, tisztították, majd jellemezték, illetve a HER2+ sejtekre való szelektivitását SKOV3, MCF7 és HEK293T sejtvonalakon végzett sejtjelölési kísérletekkel bizonyították. A 3,9-PC2ABn^{pMA} (38) bifunkciós ligandum konjugálása előtt az affitest vektor molekulát tartalmazó oldatot ditiotreitollal (DTT) kezeltük a molekulák közötti diszulfidkötések redukciója érdekében (37 °C-on 12 órán keresztül egy Eppendorf csőben). A redukciót követően közvetlenül preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk és liofilizáltuk. Az affitest monomer molekula kb. 6,5 kDa méretű, így itt a DTT-től való tisztításra méretkizárásos (3K - 3 kDa cutoff) technikát is alkalmazni lehetne (pl.: dialízis, centrifugálás méretkizárásos membrán segítségével). Az affitest molekula azonban bírja a savas és szerves oldószeres közeget (akár a 90°C-os fűtést is) aktivitásvesztés nélkül, továbbá nagyobb

méretű szennyezőket (pl.: polimer/PEG, nagyobb fehérék/SUMO-molekula az előállításból) is tartalmazott az előállított affitest termék, így preparatív RP-HPLC-s technikával nagyobb tisztaságban tudtuk a fehérjét izolálni, mint ami méretkizárásos módszerrel elérhető lett volna, a tisztább affitestből pedig tapasztalataink alapján jobb hozamú konjugációt értünk el.¹¹⁶

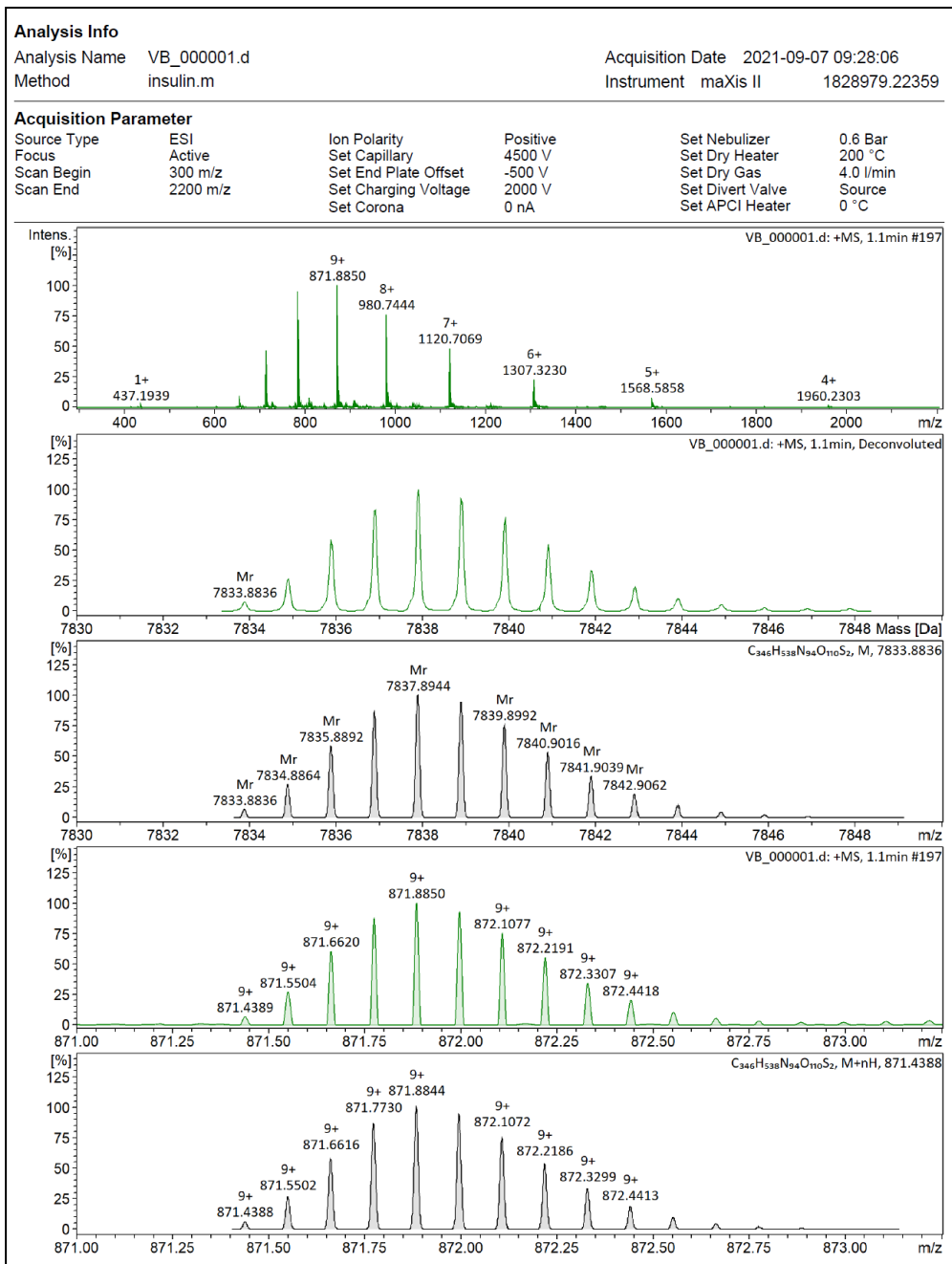
Fontos megjegyezni, hogy a pH szerepe kritikus ezeknél a reakcióknál. Az affitest molekula szerkezetét nézve egy ciszteint tartalmaz az N-terminális végén, tehát egy tiolcsoport található a molekulán, viszont aminocsoport jóval nagyobb számban. Az ideális konjugáció 1:1 BFL:affitest sztöchiometriájú tiol-maleimid reakció lenne, amely a Michael-addíciós reakció egy speciális típusa. Természetesen minél több kelátort kötünk a fehérjére, annál nagyobb moláris aktivitást érhetünk el a jelölésnél, viszont annál nagyobb mértékben módosítjuk a molekula szerkezetét, ami a tumorhoz való kötése erősség vagy szelektivitás romlását idézheti elő. Irodalmi adatok alapján pH 6,5 - 7,5 között a maleimid Michael-addíciós reakciója a tiolokra kemoszelektív. pH = 7,0-nél a maleimid reakciósebessége tiolokkal körülbelül 1000-szer gyorsabb, mint aminokkal. Azonban pH > 7,5 felett a szabad primer aminok kompetitív módon reagálnak a tiolokkal a maleimid C=C kötésére.¹¹⁷

Tolmachev és munkatársai több közleményükben is 6,5-ös pH-t javasolnak a konjugációra, szobahőmérsékleten, egy éjszakás inkubációval, kb. 2 - 5 ekvivalens konjugálószerrel.¹¹⁸ A terméket ezek után preparatív HPLC-s technikával tisztították, majd a tisztaságát ESI-TOF tömegspektrometriával vizsgálják (bár a konjugátum tisztaságáról a közleményben nem található adat). A leírt körülményeket megismételve nem tapasztaltunk teljes átalakulást, ellenben a maleimid vízáddíciója nagy mértékű volt, a reakcióidőt növelve pedig többszörös termék megjelenését is tapasztaltunk (maleimid-amin kapcsolási reakció).

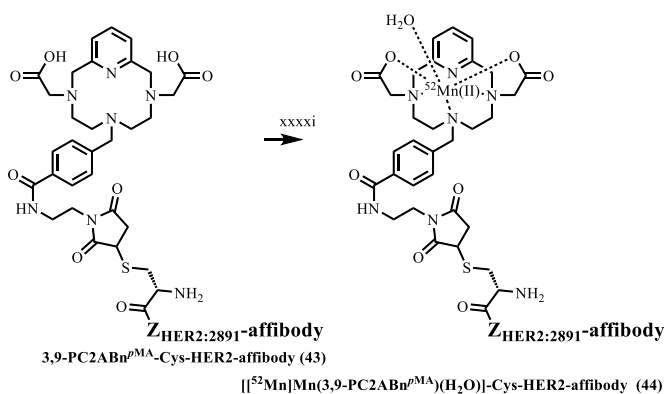
körülmények között mért spektrumon a konjugátum +4-től +12-ig terjedő töltési állapotai figyelhetők meg. A dekonvoluált spektrum alapján meghatározott molekulatömeg összhangban van a várt értékkel ($\Delta < 0,1\text{mDa}$), ami igazolja, hogy a spektrumban valóban a **43**-as konjugátum jelenik meg, és a preparatív elválasztás során bomlás nem történt. A spektrum alapvetően homogén, csupán elhanyagolható mennyiségű mellékcsúcs látható.



36. ábra A **3,9-PC2ABn^{pMA} BFL (38)** (rózsaszín), az affítést (zöld), konjugáció során kapott reakcióelegy (kék) és a tisztított **3,9-PC2ABn^{pMA}-Cys-HER2-affítést (43)** konjugátum (piros) UV-látható (220 nm) egymásra helyezett HPLC-kromatogramjai.



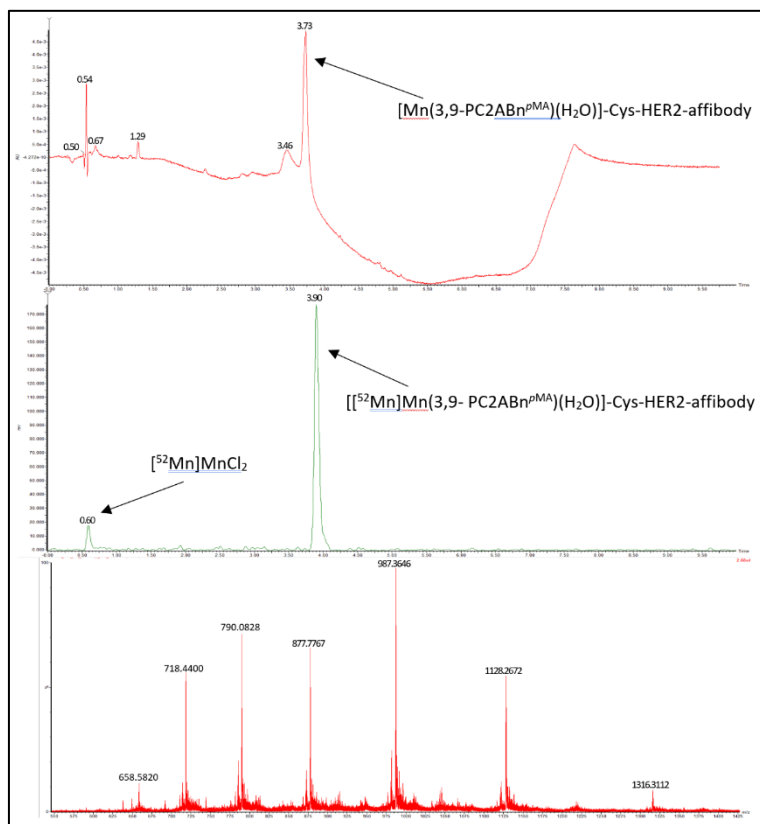
37. ábra A konjugátum (43) UHRMS spektruma (ESI+).

V.9.A $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]\text{-Cys-HER2-affitest (44)}$
előállítás


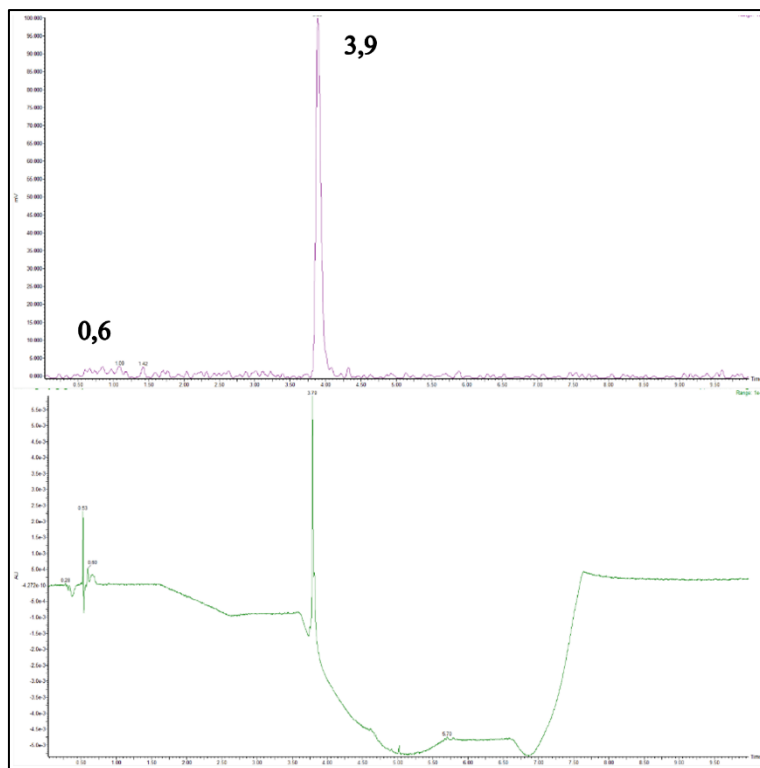
38. ábra A $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]\text{-Cys-HER2-affitest (44)}$ előállítása. (xxxxi): 1,68 - 3,36 MBq $[[^{52}\text{Mn}]\text{MnCl}_2$ radioizotóp oldat, 4,35 μmol HEPES (pH = 7,02) puffer, RT, 15 min.

Elvégeztük az elkészült konjugátum radiojelölését is ^{52}Mn -izotóppal korábban a kelátor esetére optimált körülmények alkalmazásával (**38. ábra**). A biodisztribúciós vizsgálatokhoz HEPES (4,35 μmol , pH = 7,02) puffert és **3,9-PC2ABn^{pMA}**-affitest (3,8 - 7,6 nmol) oldatot adtunk a $[[^{52}\text{Mn}]\text{MnCl}_2$ radioizotóp (1,68 - 3,36 MBq) oldatához. A jelölési kísérleteket szobahőmérsékleten, zárt 1,5 ml-es Eppendorf-csővekben végeztük 15 perc reakcióidőt alkalmazva. A radiofarmakont 100%-os radiokémiai tisztasággal sikerült előállítani, ahogyan azt a **40. ábra** láthatjuk, így reakcióelegyet sóoldattal a szükséges térfogatra hígítottuk, és további tisztítás nélkül használtuk fel a PET-vizsgálatokban. Annak bizonyítására, hogy a módszer alkalmas a szabad $[[^{52}\text{Mn}]\text{MnCl}_2$ és a jelzett konjugátum elválasztására, készítettünk egy olyan mintát is, amihez radioaktív és nem radioaktív $[[^{52/55}\text{Mn}]\text{MnCl}_2$ -ot is adtunk. Erről a mintáról készült UPLC-MS mérés eredménye a **39. ábra** ábrán, amely bemutatja a konjugátum azonosítására szolgáló UV-detektált jelet (254 nm), a radiodetektor kromatogramját, valamint a 3,73 perces csúcs tömegspektrometriás (ESI-MS) adatait. A

radiokromatogramon a jelzett konjugátum 3,9 percnél, míg a szabad rádiófé 0,6 percnél jelenik meg, jól elkülönülő retenciós időekkel.



39. ábra A $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})]\text{-Cys-HER2-affibody}$ (44) LC-MS azonosítása : (felső) UV-látható kromatogram (254 nm), (középső) radio-kromatogram, (alsó) a 3,73 perces csúcs MS spektruma (ESI+).

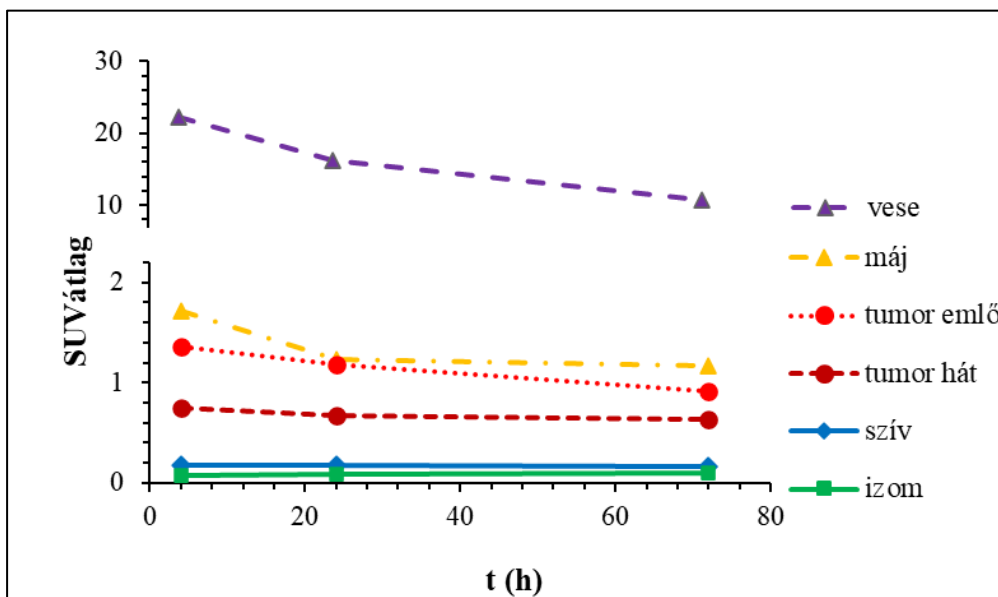


40. ábra A $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})]\text{-Cys-HER2-affitest}$ (44) radio-HPLC vizsgálata: (felső) radio-kromatogram, (alsó) UV kromatogram (274 nm).

V.10. A $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})]\text{-Cys-HER2-affitesttel}$ kapcsolatos eredmények

A $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})]\text{-Cys-HER2-affitest}$ radiofarmakon *in vivo* teszteléséhez állatkísérleteket végeztünk egerekben. Statikus (4 óra, 24 óra, 72 óra) *in vivo* PET/MRI képalkotással határoztuk meg a radiofarmakon biodisztribúcióját és HER2+ specifikusságát, MDA-MB (HER2+) (n = 1) és 4T1 (HER2-) (n = 2) tumorokat tartalmazó egerek segítségével. Ortotopikus xenotranszplantációról beszélünk, ha a rákos sejtek beültetését ugyanabba a szervbe vagy szövetbe oltjuk be, ahonnan a rák eredetileg származott az emberben, míg heterotopikus xenotranszplantációról ha a tumorsejteket az eredeti szövetből vagy szervtől eltérő helyre injektáljuk. Ezzel a biológiai környezet hatását vizsgáltuk a tumor biokinetikájára.

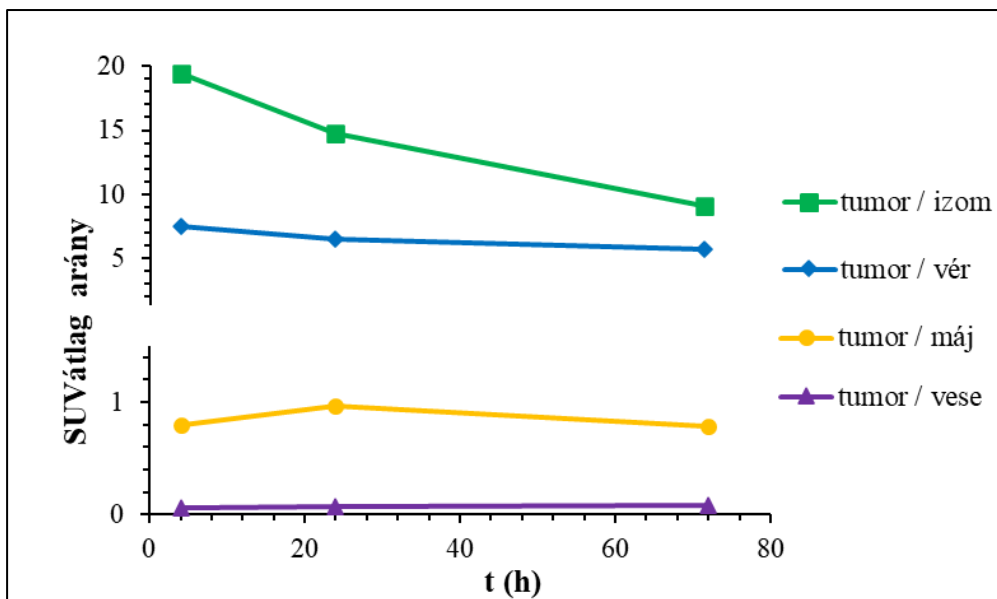
A tumorsejteket szubkután injektáltuk a váll területére (heterotopikusan) és a lágyéktáji mellzsírpárna intramammaris helyére (ortotopikusan). Amikor az egerekben a xenograftok elérték a 6 - 7 mm-es átmérőt, ideális jelölési körülmények között előállított ($2,7 \pm 0,69$ MBq) $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]$ -Cys-HER2-affitest-konjugátumot adtunk be az egereknek intravénásan.



41. ábra A daganatok (emlő és hát), az izom, a szív, a máj és a vesék időaktivitási görbéinek (TAC) átlaga, amelyek többszörös időponti MDA-MB (HER2+) daganatot hordozó SCID egér nanoPET/MRI-képképzéséből származnak a $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]$ -Cys-HER2-affitest radiofarmakon farok-vénás injekcióját követően.

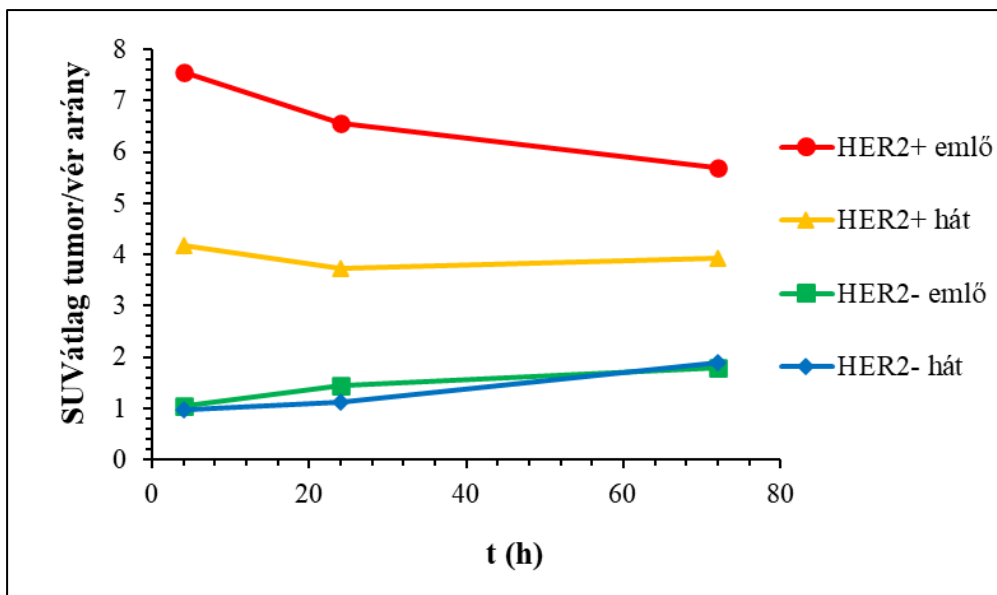
Az injektálást követően az egerek vesekérgében jelentős (SUV átlag: 22,19 4 óra alatt) radioaktivitás felhalmozódást figyeltünk meg a dinamikus bomlással korrigált PET képek elemzésével, amely az idő múlásával lassan csökkent (SUV átlag: 16,23 és 10,75 24, illetve 72 órát követő leképezések során). Ezen túl, mindkét csoportnál jelentősen kisebb radioaktív anyagfelvételt figyeltünk meg a többi egészséges szervben és szövetben (41. ábra és 42. ábra). Ez a jelenség nem ismeretlen az irodalomban, gyakran jelentkezik az affitest biovektor molekulák alkalmazása során és az affitestekre jellemző nagy

hidrofilicitásnak köszönhető. Az esetünkben is a $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]$ -Cys-HER2-affitest radiofarmakon vese-visszatartásával és vizeletkiválasztásával magyarázható. ³⁸⁻⁴¹



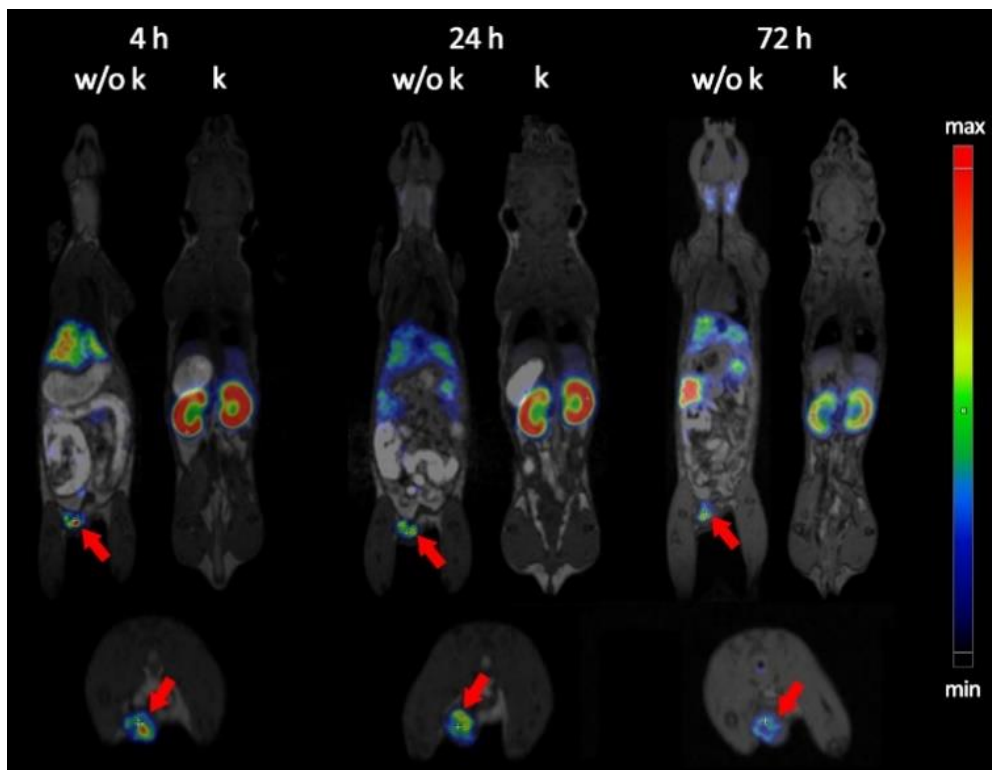
42. ábra A tumor(emlő)-szervi (izom, vér, máj, vesék) arány TAC-görbéi, amelyek többszörös időponti MDA-MB (HER2+) daganatot hordozó SCID egér nanoPET/MRI-képalkotásából származnak a $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{p\text{MA}})(\text{H}_2\text{O})]$ -Cys-HER2-affitest radiofarmakon farok-vénás injekcióját követően.

HER2+ daganatot hordozó egérben a transzplantált emlőtumor radiofarmakon felvétele nagyobb (SUV átlag: 1,36, 1,18 és 0,91 4, 24, illetve 72 órát követően) volt (a májat és a vesét kivéve) mint azt a többi szerv esetén tapasztaltuk (41. ábra, 42. ábra és 44. ábra). Ezen túl az ortotopikusan transzplantált HER2+ emlőtumorhoz képest a heterotopikusan transzplantáltak sokkal kisebb tumorfelvétele volt (SUV átlag: 0,75, 0,67 és 0,63 4, 24, illetve 72 órás időpontokban), amit azzal magyarázunk, hogy a tumor közvetlen környezete akár jelentősen befolyásolhatja a radiofarmakon felvétel mértékét.



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

A bomlással korrigált PET-felvételek kvantitatív elemzése alapján továbbá megállapítható, hogy a radiofarmakon felvétel az MDA-MB (HER2+) tumorokban három nap alatt enyhén csökkent. Az idő előrehaladtával a tumor-máj és a tumor-vese arányok megközelítőleg nem változtak, ami azt jelenti, hogy a vesékből és a májból a radiofarmakon eliminációja hasonló sebességgel játszódik le, mint a tumorból. Az átlagos tumor/vér görbék elemzéséből egyértelműen látható, hogy a $[[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}(3,9\text{-PC2ABn}^{\text{pMA}})(\text{H}_2\text{O})\text{-Cys-HER2}$ -affitest felhalmozódása az MDA-MB (HER2+) tumorban minden vizsgált időpontban jelentősen nagyobb, mint a 4T1 tumor esetében (**43. ábra**).



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

Az MDA-MB (HER2+) daganatot hordozó egerek esetén 1,7-szer nagyobb volt a vizsgált radiofarmakon felvétele az ortotopikusan injektált emlődaganatban, mint a heterotopikusan transzplantáltban. A 4T1 (HER2-) tumort hordozó egereknél ($n = 2$) nem volt figyelemreméltó különbség a két tumorkörnyezet indukálta felvételkedzőtt.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatómunka első lépéseként előállítottunk két piklén diacetát, **3,6-** és **3,9-PC2A** izomer ligandumot, amelyek Mn(II)-komplexei lényegesen eltérő termodinamikai és disszociációs, de hasonló oldószer-cseré-kinetikai, és relaxációs tulajdonságokkal rendelkeznek. A [Mn(**3,9-PC2A**)]-komplex jobb termodinamikai stabilitással ($\log K_{\text{MnL}} = 17,09(2)$, és $15,53(1)$ a **3,9-** és a **3,6-PC2A**-komplexei esetére) és enyhén jobb relaxációs tulajdonságokkal rendelkezik (r_{1p} rendre $2,72$ és $2,91 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ a **3,6-** és **3,9-PC2A**-komplexei esetére, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, $0,49 \text{ T}$ térerőn mérve). A relaxivitás értékei alapján mindkét ligandum Mn(II)-komplexében megtalálható a fémionhoz koordinálódó belsőszférás vízmolekula. A [Mn(**3,6-PC2A**)]-komplex jobb kinetikai inertséggel rendelkezik ($k_{\text{obs}} = 3,28(3) \times 10^{-4}$ és $5,43(4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a **3,6-PC2A** és **3,9-PC2A**) Zn(II)-ionnal lezajló fémioncsere-reakciók vizsgálatai alapján. Ezen adatok alapján megállapítottuk, hogy mindkét ligandum megfelelő „építőelemként” szolgálhat inert Mn(II)-komplexei előállításához, ill. biztonságosan alkalmazható „intelligens”/bifunkciós képzőanyagok tervezéséhez. A **3,9-PC2A** egyedül inertségében maradt el a **3,6-PC2A** izomertől, ami a piridinnel szembeni nitrogénatomhoz kapcsolt elektronszívó csoporttal jelentősen javítható, míg az N9-es gyűrűnitrogénen funkcionizált származékok esetén ez a hatás kevésbé jelentkezik.

A kapott eredmények alapján a **3,9-PC2A** ligandum platformot választottuk új bifunkciós vegyületcsalád előállításához és vizsgáltuk Mn(II)-komplexeik fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzéséhez. A fizikai-kémiai jellemzések eredményei igazolták, hogy az alap **3,9-PC2A** kelátor bifunkciós ligandummá alakítása javítja a Mn(II)-komplexei disszociációs kinetikai (Zn(II)-ionnal lezajló fémioncsere-reakciók vizsgálata alapján) és relaxometriás tulajdonságait, miközben a komplexek látszólagos stabilitása vagy változatlan

maradt (acetát oldalláncok), vagy csak kis mértékben csökkent (alfa-metil-acetát és amidszármazékok). A modell bifunkciós ligandumokat ciklotronban előállított és tisztított [^{52}Mn]Mn(II)-izotóppal jelöltük és tanulmányoztuk a ligandum koncentrációjának, a hőmérsékletnek, a pH-nak és a reakcióidőnek a kelátorok jelölési hozamára gyakorolt hatását. Eredményeink szerint az acetát származékok 6,0-os pH felett 5 perc alatt hatékonyan jelölhetők már 1 μM ligandum koncentrációt alkalmazva, míg a **3,9-PC2AM^{pip}Bn^pCO₂H** (bisz(amid)-származék) ligandum esetében a közel kvantitatív radiojelzés eléréséhez 4-5 óra reakcióidőre vagy melegítésre (50 °C) is szükség volt. Ugyanakkor ennek a ligandumnak a Mn(II)-komplexe esetében a leglassabb a **transz-CDTA** kicserélő ligandummal lejátszódó transzkelációs reakció. Annak ellenére, hogy kinetikailag a **3,9-PC2AM^{pip}Bn^pCO₂H** bisz(amid)-származék teljesített a legjobban, a konjugációhoz a **3,9-PC2ABn^pCO₂H** Mn(II)-kötő karboxilát-származékot választottuk, mivel radiokémiai körülmények között az amid-oldalláncok hidrolízisét figyeltük meg (ami a megfelelő diacetát-származék ligandum kialakulását eredményezte). Az előállított és megjelölt radiofarmakon az *in vivo* PET-kísérletekben figyelemre méltó nyomjelző-felhalmozódást és a HER2+ tumorszövetben specifikus dúsulást/visszatartást mutatott már 4 órával az injektálást követően, így jó kilátásokkal rendelkezik a konjugátum nukleáris gyógyászatban való alkalmazása tekintetében. Ezen túl, a különböző szövetekbe (vállizom vs. lágýéktáji mellzsírparna) ágyazott tumorok specifikus felvételét jelentősen eltérőnek találtuk, ami arra utal, hogy a helyi tumorkörnyezet hatással van a konjugátum felhalmozódására. Végül, az irodalomban más affitest-konjugátumok esetében tapasztalt eredményekkel összhangban a konjugátum kiterjedt vesekéreg-felhalmozódást is mutatott, amely csökkentése érdekében a jövőben terveink között szerepel HSA-kötő egység(ek) beépítése a konjugátumba.

Mindezekén túl, a Mn(II)-kelátok inertségének a javítása érdekében merev piklén, biszpiklén és O-pikén makrociklusokra alapozó kriptát ligadumcsaládot állítottunk elő. A **3,9-PC2A** analógnak tekinthető **3,9-CB⁸⁰²PC** ligandum és a belőle származtatható **3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}** BFL előállítását követően vizsgáltuk a kelátorok Mn(II)-komplexeinek képződési és disszociációs kinetikai viselkedését, valamint vízcseré- és relaxációs tulajdonságait. A vizsgált kriptát típusú ligandumok Mn(II)-komplexeinek képződési kinetikája kifejezetten lassú még pH=7,4-en is több napot vesz igénybe ugyanakkor kimagasló inertséggel rendelkeznek. Az eredményeinket összehasonlítva látható, hogy az általunk előállított [Mn(**3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}**)]-komplex inertsége ($k_1 = 1,75 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) meghaladja a [Gd(**HP-DO3A**)] kereskedelmi forgalomban lévő kontrasztanyag ($k_1 = 6,8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), valamint az eddig publikált leginertebb Mn(II)-kelát paramétereit ($k_1 = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), és megközelíti a [Gd(**DO3A-BT**)] kontrasztanyagra jellemző inertséget ($k_1 = 2,8 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹¹⁰ A relaxitási értékek tekintetében is összemérhető az előállított BFL ligandum Mn(II)-kelátja ($r_{1p} = 4,27 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pH=7,4, 37°C, 0,49 T) a Gd(III)-alapú kontrasztanyagokkal, például a **DOTAREM**-mel ($r_{1p} = 3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), ill. a kereskedelmi forgalomból már kivont **MAGNEVIST**-tel ($r_{1p} = 3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$). A [Mn(**3,9-CB⁸⁰²PC**)] és a [Mn(**3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}**)]-komplexek savasszisztált disszociációjuk alapján a leginertebb Mn(II)-komplexek közé tartoznak. Ezen komplexek inertsége olyannyira kimagasló, hogy az előállított új ligandumcsaládokra magyar szabadalmat nyújtottunk be, amit 2025-ben nemzetközi szabadalommal emeltünk.

VII. SUMMARY

As the initial step of our research, we synthesized two picolinate diacetate ligand isomers, **3,6-** and **3,9-PC2A**, whose Mn(II) complexes exhibit significantly different thermodynamic stabilities and dissociation kinetics, while their solvent exchange kinetics and relaxometric properties are similar. The [Mn(**3,9-PC2A**)] complex demonstrates superior thermodynamic stability ($\log K_{\text{MnL}} = 17.09(2)$ and $15.53(1)$ for the **3,9-** and **3,6-PC2A** complexes, respectively) and slightly enhanced relaxivity ($r_{\text{ip}} = 2.72$ and $2.91 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for **3,6-** and **3,9-PC2A**, respectively, measured at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and 0.49 T). The observed relaxivity values confirm the presence of an inner-sphere water molecule coordinated to the Mn(II) ion in both complexes. In terms of kinetic inertness, the [Mn(**3,6-PC2A**)] complex performs better, as evidenced from metal-ion exchange studies with Zn(II) ($k_{\text{obs}} = 3.28(3) \times 10^{-4}$ and $5.43(4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ for the **3,6-PC2A** and **3,9-PC2A** complexes, respectively). Based on these findings, we concluded that both ligands are suitable as "building blocks" for the development of kinetically inert Mn(II) complexes and the design of safe and effective "smart" or bifunctional imaging contrast agents. The **3,9-PC2A** isomer only lagged behind the **3,6-PC2A** isomer in terms of inertness, which could be significantly improved by introducing an electron-withdrawing group on the nitrogen opposite the pyridine ring. This stabilizing effect was less pronounced for derivatives functionalized on the N9 ring nitrogen.

Given the results, we selected the **3,9-PC2A** scaffold as the basis for a new family of bifunctional compounds and investigated the physico-chemical properties of their Mn(II) complexes. The transformation of the basic **3,9-PC2A** chelator into bifunctional ligands led to improved dissociation kinetics (as shown by Zn(II) metal-ion exchange studies) and relaxometric performance, while the apparent thermodynamic stability of the complexes

remained unchanged (when using acetate pendants) or decreased only slightly (for α -methyl-acetate and amide derivatives). Model bifunctional ligands were labeled with [^{52}Mn]Mn(II), produced and purified via cyclotron, and the effects of ligand concentration, temperature, pH, and reaction time on radiolabeling efficiency were evaluated. Acetate derivatives were effectively labeled within 5 minutes at pH > 6.0, even at ligand concentrations as low as 1 μM . However, for the bis(amide) derivative **3,9-PC2AMP^{pip}Bn^{pCO₂H}**, near-quantitative radiolabeling required 4–5 hours of incubation or heating to 50 °C. Notably, this ligand's Mn(II) complex exhibited the slowest transchelation with *trans*-CDTA, indicating high kinetic inertness. Despite this, the carboxylate-functionalized derivative **3,9-PC2ABn^{pCO₂H}** was chosen for conjugation due to the observed hydrolysis of amide side chains under radiochemical conditions, resulting in the corresponding diacetate ligand. The radiolabeled pharmacophore showed remarkable *in vivo* tracer accumulation and specific retention in HER2+ tumor tissue as early as 4 hours post-injection, suggesting strong potential for the conjugate in nuclear medicine applications. Furthermore, tumor uptake varied significantly depending on implantation site (e.g., shoulder muscle vs. inguinal fat pad), suggesting that the local tumor microenvironment influences conjugate accumulation. Consistent with previous findings for other affibody-conjugates, we also observed notable uptake in the renal cortex, which we aim to reduce in future studies by incorporating HSA-binding moieties into the conjugate.

Beyond this, we developed a family of cryptate ligands based on rigid pyclen, bis-pyclen, and O-pyclen macrocyclic frameworks to improve the inertness of Mn(II) chelates. We synthesized the **3,9-CB⁸⁰²PC** basic ligand - an analog of **3,9-PC2A** - and its bifunctional derivative **3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}**. We then investigated the formation and dissociation kinetics, water exchange properties, and relaxivity of their Mn(II) complexes. These cryptate ligands

form complexes at notably slow rates - even at pH 7.4, complex formation can take several days - but display exceptional kinetic inertness. Our data show that the $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\text{PCBn}^{\rho\text{CO}_2\text{H}})]$ complex surpasses the inertness of some commercial contrast agents such as $[\text{Gd}(\mathbf{HP-DO3A})]$ ($k_1 = 6.8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and even the most inert Mn(II) chelates reported to date (e.g., $k_1 = 1.6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), approaching the inertness level of $[\text{Gd}(\mathbf{DO3A-BT})]$ ($k_1 = 2.8 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Regarding relaxivity, the Mn(II) complex of the developed BFL ligand ($r_{1p} = 4.27 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ at 37 °C, pH 7.4, 0.49 T) is comparable to Gd(III)-based contrast agents such as **DOTAREM** ($r_{1p} = 3.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) and the now-withdrawn **MAGNEVIST** ($r_{1p} = 3.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Acid-assisted dissociation studies confirmed that $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\text{PC})]$ and $[\text{Mn}(\mathbf{3,9-CB}^{802}\text{PCBn}^{\rho\text{CO}_2\text{H}})]$ are among the most inert Mn(II) complexes known to date. Due to these outstanding properties, we have filed a Hungarian patent for this new ligand family, which was upgraded to an international patent in 2025.

VIII. IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Botta, M., Fabio, C., David, E.-G., Carlos, P.-I. & and Tei, L. Mn(II) Compounds as an Alternative to Gd-Based MRI Probes. *Future Medicinal Chemistry* **11**, 1461-1483, doi:<https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0608> (2019).
- 2 Cathcart-Rake, E. J., Ruddy, K. J., Bleyer, A. & Johnson, R. H. Breast Cancer in Adolescent and Young Adult Women Under the Age of 40 Years. *JCO oncology practice* **17**, 305-313, doi:<https://doi.org/10.1200/op.20.00793> (2021).
- 3 Phillips, K. A. *et al.* Clinical practice patterns and cost effectiveness of human epidermal growth receptor 2 testing strategies in breast cancer patients. *Cancer* **115**, 5166-5174, doi:<https://doi.org/10.1002/cncr.24574> (2009).
- 4 Crook, Z. R., Nairn, N. W. & Olson, J. M. Mini-proteins as a Powerful Modality in Drug Development. *Trends in biochemical sciences* **45**, 332-346, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.12.008> (2020).
- 5 Norman, D. J. *et al.* A U.S. clinical study of Orthoclone OKT3 in renal transplantation. *Transplantation proceedings* **19**, 21-27 (1987).
- 6 Globenewswire. *Antibodies Market Expected To Reach USD 865.62 Billion by 2032, Growing at CAGR 13.93% To Forecast 2024-2032*, <<https://www.globenewswire.com/news-release/2025/01/31/3018688/0/en/Antibodies-Market-Expected-To-Reach-USD-865-62-Billion-by-2032-Growing-at-CAGR-13-93-To-Forecast-2024-2032.html>> (2025).
- 7 Society, T. A. *Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the EU or US*, <<https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>> (2025).
- 8 Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology* **23**, 1126-1136, doi:<https://doi.org/10.1038/nbt1142> (2005).
- 9 Miller, P. W., Long, N. J., Vilar, R. & Gee, A. D. Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angewandte Chemie International Edition* **47**, 8998-9033, doi:<https://doi.org/10.1002/anie.200800222> (2008).
- 10 Strohl, W. R. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein & cell* **9**, 86-120, doi:<https://doi.org/10.1007/s13238-017-0457-8> (2018).
- 11 Fu, R., Carroll, L., Yahioğlu, G., Aboagye, E. O. & Miller, P. W. Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents:

- Radiolabelling Strategies and Applications. *ChemMedChem* **13**, 2466-2478, doi:<https://doi.org/10.1002/cmdc.201800624> (2018).
- 12 King, D. J. *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*. 1st edn, 249 (CRC Press, 1998).
- 13 Saerens, D. & Muyldermans, S. *Single Domain Antibodies: Methods and Protocols*. (2012).
- 14 Weisser, N. E. & Hall, J. C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances* **27**, 502-520, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.004> (2009).
- 15 McCabe, K. E. *et al.* An Engineered Cysteine-Modified Diabody for Imaging Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)-Positive Tumors. *Molecular Imaging and Biology* **14**, 336-347, doi:<https://doi.org/10.1007/s11307-011-0500-8> (2012).
- 16 Löfblom, J. *et al.* Affibody molecules: Engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Letters* **584**, 2670-2680, doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.014> (2010).
- 17 Frejd, F. Y. & Kim, K.-T. Affibody molecules as engineered protein drugs. *Experimental & Molecular Medicine* **49**, e306-e306, doi:<https://doi.org/10.1038/emm.2017.35> (2017).
- 18 Brandt, M., Cardinale, J., Rausch, I. & Mindt, T. L. Manganese in PET imaging: Opportunities and challenges. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **62**, 541-551, doi:<https://doi.org/10.1002/jlcr.3754> (2019).
- 19 Ladabaum, U. & Minoshima, S. in *Textbook of Gastroenterology* 3212-3225 (2008).
- 20 Caravan, P., Farrar, C. T., Frullano, L. & Uppal, R. Influence of molecular parameters and increasing magnetic field strength on relaxivity of gadolinium- and manganese-based T1 contrast agents. *Contrast media & molecular imaging* **4**, 89-100, doi:<https://doi.org/10.1002/cmml.267> (2009).
- 21 Pace, L., Nicolai, E., Aiello, M., Catalano, O. A. & Salvatore, M. Whole-body PET/MRI in oncology: current status and clinical applications. *Clinical and Translational Imaging* **1**, 31-44, doi:<https://doi.org/10.1007/s40336-013-0012-4> (2013).
- 22 Miles, K. A., Voo, S. A. & Groves, A. M. Additional Clinical Value for PET/MRI in Oncology: Moving Beyond Simple Diagnosis. *Journal of Nuclear Medicine* **59**, 1028, doi:<https://doi.org/10.2967/jnumed.117.203612> (2018).
- 23 Sánchez-Crespo, A., Andreo, P. & Larsson, S. A. Positron flight in human tissues and its influence on PET image spatial resolution.

- European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **31**, 44-51, doi:<https://doi.org/10.1007/s00259-003-1330-y> (2004).
- 24 Martin, C. C., Christian, B. T., Satter, M. R., Nickerson, L. D. H. & Nickles, R. J. Quantitative PET with positron emitters that emit prompt gamma rays. *IEEE Transactions on Medical Imaging* **14**, 681-687, doi:<https://doi.org/10.1109/42.476109> (1995).
- 25 Wooten, A. L., Lewis, B. C. & Lapi, S. E. Cross-sections for (p,x) reactions on natural chromium for the production of ⁵²Mn, ⁵⁴Mn radioisotopes. *Applied Radiation and Isotopes* **96**, 154-161, doi:<https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2014.12.001> (2015).
- 26 Buchholz, M., Spahn, I., Scholten, B. & Coenen, H. H. Cross-section measurements for the formation of manganese-52 and its isolation with a non-hazardous eluent. *Radiation Physics and Chemistry* **101**, 491-499, doi:<https://doi.org/10.1524/ract.2013.2083> (2013).
- 27 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. *Medical Physics* **40**, 042502, doi:<https://doi.org/10.1118/1.4793756> (2013).
- 28 Kononova, O. N., Bryuzgina, G. L., Apchitaeva, O. V. & Kononov, Y. S. Ion exchange recovery of chromium (VI) and manganese (II) from aqueous solutions. *Arabian Journal of Chemistry* **12**, 2713-2720, doi:<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.05.021> (2019).
- 29 Fonslet, J., Tietze, S., Jensen, A. I., Graves, S. A. & Severin, G. W. Optimized procedures for manganese-52: Production, separation and radiolabeling. *Applied Radiation and Isotopes* **121**, 38-43, doi:<https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2016.11.021> (2017).
- 30 Lewis, C. M. *et al.* ⁵²Mn Production for PET/MRI Tracking Of Human Stem Cells Expressing Divalent Metal Transporter 1 (DMT1). *Theranostics* **5**, 227-239, doi:<https://doi.org/10.7150/thno.10185> (2015).
- 31 Watanabe, S. *et al.* Production of positron emitters of metallic elements to study plant uptake and distribution. *Radiation Physics and Chemistry* **89**, 853-860, doi:<https://doi.org/10.1524/ract.2001.89.11-12.853> (2001).
- 32 Graves, S. A. *et al.* Novel Preparation Methods of ⁵²Mn for ImmunoPET Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **26**, 2118-2124, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00414> (2015).
- 33 Malkhede, D. D., Dhadke, P. M. & Khopkar, S. M. Solvent-Extraction Separation of Manganese(II) with Calixarene Substituted with an Acetyl Group at the Lower Rim. *Analytical Sciences* **15**, 781-784, doi:<https://doi.org/10.2116/analsci.15.781> (1999).
- 34 Grobner, T. Gadolinium – a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?

- Nephrology Dialysis Transplantation* **21**, 1104-1108, doi:<https://doi.org/10.1093/ndt/gfk062> (2006).
- 35 Regueiro-Figueroa, M. *et al.* Reasons behind the Relative Abundances of Heptacoordinate Complexes along the Late First-Row Transition Metal Series. *Inorganic Chemistry* **53**, 12859-12869, doi:<https://doi.org/10.1021/ic501869y> (2014).
- 36 Kálmán, F. K. & Tircsó, G. Kinetic Inertness of the Mn²⁺ Complexes Formed with AAZTA and Some Open-Chain EDTA Derivatives. *Inorganic Chemistry* **51**, 10065-10067, doi:<https://doi.org/10.1021/ic300832e> (2012).
- 37 Pota, K. *et al.* Taking the next step toward inert Mn²⁺ complexes of open-chain ligands: the case of the rigid PhDTA ligand. *New Journal of Chemistry* **42**, 8001-8011, doi:<https://doi.org/10.1039/C8NJ00121A> (2018).
- 38 Martinelli, J. *et al.* Improving the Stability and Kinetic Inertness of Mn(II) Complexes by Increasing the Bridge Length in Bicyclic CDTA-Like Ligands. *Chemistry – A European Journal* **30**, e202400570, doi:<https://doi.org/10.1002/chem.202400570> (2024).
- 39 Gale, E. M. *et al.* A Manganese-based Alternative to Gadolinium: Contrast-enhanced MR Angiography, Excretion, Pharmacokinetics, and Metabolism. *Radiology* **286**, 865-872, doi:<https://doi.org/10.1148/radiol.2017170977> (2017).
- 40 McRae, S. W. *et al.* Development of a Suite of Gadolinium-Free OATP1-Targeted Paramagnetic Probes for Liver MRI. *Journal of Medicinal Chemistry* **66**, 6567-6576, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01561> (2023).
- 41 Chirayil, S. *et al.* Manganese(II)-Based Responsive Contrast Agent Detects Glucose-Stimulated Zinc Secretion from the Mouse Pancreas and Prostate by MRI. *Inorganic Chemistry* **60**, 2168-2177, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02688> (2021).
- 42 Chen, K. *et al.* Kinetically inert manganese (II)-based hybrid micellar complexes for magnetic resonance imaging of lymph node metastasis. *Regenerative Biomaterials* **10**, rbad053, doi:<https://doi.org/10.1093/rb/rbad053> (2023).
- 43 Forgács, A. *et al.* Mono-, Bi-, and Trinuclear Bis-Hydrated Mn²⁺ Complexes as Potential MRI Contrast Agents. *Inorganic Chemistry* **54**, 9576-9587, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01677> (2015).
- 44 Regueiro-Figueroa, M. *et al.* High Relaxivity Mn²⁺-Based MRI Contrast Agents. *Chemistry – A European Journal* **20**, 17300-17305, doi:<https://doi.org/10.1002/chem.201404673> (2014).

- 45 Mallik, R. *et al.* Mn(ii) complex impregnated porous silica nanoparticles as Zn(ii)-responsive “Smart” MRI contrast agent for pancreas imaging. *Journal of Materials Chemistry B* **11**, 8251-8261, doi:<https://doi.org/10.1039/D3TB01289A> (2023).
- 46 Forgács, A. *et al.* Developing the family of picolinate ligands for Mn²⁺ complexation. *Dalton Transactions* **46**, 1546-1558, doi:<https://doi.org/10.1039/C6DT04442E> (2017).
- 47 Uzal-Varela, R. *et al.* Mn²⁺ Complexes Containing Sulfonamide Groups with pH-Responsive Relaxivity. *Inorganic Chemistry* **59**, 14306-14317, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02098> (2020).
- 48 Drahoš, B., Kotek, J., Hermann, P., Lukeš, I. & Tóth, É. Mn²⁺ Complexes with Pyridine-Containing 15-Membered Macrocycles: Thermodynamic, Kinetic, Crystallographic, and ¹H/¹⁷O Relaxation Studies. *Inorganic Chemistry* **49**, 3224-3238, doi:<https://doi.org/10.1021/ic9020756> (2010).
- 49 Rolla, G. A., Platas-Iglesias, C., Botta, M., Tei, L. & Helm, L. ¹H and ¹⁷O NMR Relaxometric and Computational Study on Macrocyclic Mn(II) Complexes. *Inorganic Chemistry* **52**, 3268-3279, doi:<https://doi.org/10.1021/ic302785m> (2013).
- 50 Garda, Z. *et al.* Physico-chemical properties of MnII complexes formed with cis- and trans-DO2A: thermodynamic, electrochemical and kinetic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **163**, 206-213, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.018> (2016).
- 51 Csupász, T. *et al.* A New Oxygen Containing Pycen-Type Ligand as a Manganese(II) Binder for MRI and ⁵²Mn PET Applications: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Structural and Radiochemical Studies. *Molecules* **27** (2022).
- 52 Kálmán, F. K. *et al.* Expanding the Ligand Classes Used for Mn(II) Complexation: Oxa-aza Macrocycles Make the Difference. *Molecules* **26**, 1524 (2021).
- 53 Ning, Y. *et al.* Dual Hydrazine-Equipped Turn-On Manganese-Based Probes for Magnetic Resonance Imaging of Liver Fibrogenesis. *Journal of the American Chemical Society* **144**, 16553-16558, doi:<https://doi.org/10.1021/jacs.2c06231> (2022).
- 54 Forgács, A. *et al.* A Bisamide Derivative of [Mn(1,4-DO2A)] – Solution Thermodynamic, Kinetic, and NMR Relaxometric Studies. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2016**, 1165-1174, doi:<https://doi.org/10.1002/ejic.201501415> (2016).
- 55 Leone, L. *et al.* A Neutral and Stable Macrocyclic Mn(II) Complex for MRI Tumor Visualization. *ChemMedChem* **17**, e202200508, doi:<https://doi.org/10.1002/cmdc.202200508> (2022).

- 56 Rolla, G., De Biasio, V., Giovenzana, G. B., Botta, M. & Tei, L. Supramolecular assemblies based on amphiphilic Mn²⁺-complexes as high relaxivity MRI probes. *Dalton Transactions* **47**, 10660-10670, doi:<https://doi.org/10.1039/C8DT01250D> (2018).
- 57 Forgács, A. *et al.* Optimising the relaxivities of Mn²⁺ complexes by targeting human serum albumin (HSA). *Dalton Transactions* **46**, 8494-8504, doi:<https://doi.org/10.1039/C7DT01508A> (2017).
- 58 Kálmán, F. K. *et al.* Mn(II)-Based MRI Contrast Agent Candidate for Vascular Imaging. *Journal of Medicinal Chemistry* **63**, 6057-6065, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00197> (2020).
- 59 Botár, R. *et al.* Stable and Inert Mn(II)-Based and pH-Responsive Contrast Agents. *Journal of the American Chemical Society* **142**, 1662-1666, doi:<https://doi.org/10.1021/jacs.9b09407> (2020).
- 60 Botár, R. *et al.* Synthesis and characterization of a stable and inert MnII-based ZnII responsive MRI probe for molecular imaging of glucose stimulated zinc secretion (GSZS). *Inorganic Chemistry Frontiers* **9**, 577-583, doi:<https://doi.org/10.1039/D1QI00501D> (2022).
- 61 Hall, R. C., Qin, J., Laney, V., Ayat, N. & Lu, Z.-R. Manganese(II) EOB-Pyclen Diacetate for Liver-Specific MRI. *ACS Applied Bio Materials* **5**, 451-458, doi:<https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01259> (2022).
- 62 Bleher, K., Cieslik, P. A. & Comba, P. Bispidine coordination chemistry. *Dalton Transactions* **54**, 4405-4431, doi:<https://doi.org/10.1039/D5DT00050E> (2025).
- 63 Sy, M. *et al.* 55/52Mn²⁺ Complexes with a Bispidine-Phosphonate Ligand: High Kinetic Inertness for Imaging Applications. *Inorganic Chemistry* **61**, 13421-13432, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c01681> (2022).
- 64 Ndiaye, D. *et al.* Mn²⁺ Bispidine Complex Combining Exceptional Stability, Inertness, and MRI Efficiency. *Journal of the American Chemical Society* **144**, 22212-22220, doi:<https://doi.org/10.1021/jacs.2c10108> (2022).
- 65 Ndiaye, D. *et al.* Unprecedented Kinetic Inertness for a Mn²⁺-Bispidine Chelate: A Novel Structural Entry for Mn²⁺-Based Imaging Agents. *Angewandte Chemie International Edition* **59**, 11958-11963, doi:<https://doi.org/10.1002/anie.202003685> (2020).
- 66 Cieslik, P. *et al.* Exceptional Manganese(II) Stability and Manganese(II)/Zinc(II) Selectivity with Rigid Polydentate Ligands. *Angewandte Chemie International Edition* **61**, e202115580, doi:<https://doi.org/10.1002/anie.202115580> (2022).

- 67 Shen, X., Pan, Y. & Liang, G. Development of Macrocyclic Mn(II)–Bispyridine Complexes as pH-Responsive Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *European Journal of Inorganic Chemistry* **26**, e202200786, doi:<https://doi.org/10.1002/ejic.202200786> (2023).
- 68 Gale, E. M., Mukherjee, S., Liu, C., Loving, G. S. & Caravan, P. Structure–Redox–Relaxivity Relationships for Redox Responsive Manganese-Based Magnetic Resonance Imaging Probes. *Inorganic Chemistry* **53**, 10748-10761, doi:<https://doi.org/10.1021/ic502005u> (2014).
- 69 Pyles, J. *et al.* Radiochemistry Development of ⁵²Mn for Characterization of PET/MR Imaging Agents. *Journal of Nuclear Medicine* **63**, 2468 (2022).
- 70 Porto, F. *et al.* Cyclotron production of manganese-52: a promising avenue for multimodal PET/MRI imaging. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* **9**, 57, doi:<https://doi.org/10.1186/s41181-024-00288-6> (2024).
- 71 Malikidogo, K. P. *et al.* A cocktail of ¹⁶⁵Er(iii) and Gd(iii) complexes for quantitative detection of zinc using SPECT and MRI. *Chemical Communications* **54**, 7597-7600, doi:<https://doi.org/10.1039/C8CC03407A> (2018).
- 72 Troughton, J. S. *et al.* Synthesis and Evaluation of a High Relaxivity Manganese(II)-Based MRI Contrast Agent. *Inorganic Chemistry* **43**, 6313-6323, doi:<https://doi.org/10.1021/ic049559g> (2004).
- 73 Zhu, J., Gale, E. M., Atanasova, I., Rietz, T. A. & Caravan, P. Hexameric MnII Dendrimer as MRI Contrast Agent. *Chemistry – A European Journal* **20**, 14507-14513, doi:<https://doi.org/10.1002/chem.201403883> (2014).
- 74 Loving, G. S., Mukherjee, S. & Caravan, P. Redox-Activated Manganese-Based MR Contrast Agent. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 4620-4623, doi:<https://doi.org/10.1021/ja312610j> (2013).
- 75 Wu, C. *et al.* Multivalent manganese complex decorated amphiphilic dextran micelles as sensitive MRI probes. *Journal of Materials Chemistry B* **3**, 1470-1473, doi:<https://doi.org/10.1039/C4TB02036G> (2015).
- 76 Vanasschen, C. *et al.* Novel CDTA-based, Bifunctional Chelators for Stable and Inert MnII Complexation: Synthesis and Physicochemical Characterization. *Inorganic Chemistry* **56**, 7746-7760, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00460> (2017).
- 77 Gale, E. M., Atanasova, I. P., Blasi, F., Ay, I. & Caravan, P. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *Journal of the*

- American Chemical Society* **137**, 15548-15557, doi:<https://doi.org/10.1021/jacs.5b10748> (2015).
- 78 Sathiyajith, C., Hallett, A. J. & Edwards, P. G. Synthesis, photophysical characterization, relaxometric studies and molecular docking studies of gadolinium-free contrast agents for dual modal imaging. *Results in Chemistry* **4**, 100307, doi:<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100307> (2022).
- 79 Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry* **62**, 7512-7515, doi:<https://doi.org/10.1021/jo971176v> (1997).
- 80 Zekany, L. & Nagypal, I. in *Computational Methods for the Determination of Formation Constants* (ed David J. Leggett) 291-353 (Springer US, 1985).
- 81 Irving, H. M., Miles, M. G. & Pettit, L. D. A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Analytica Chimica Acta* **38**, 475-488, doi:[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80616-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80616-4) (1967).
- 82 Garda, Z. *et al.* Effect of the Nature of Donor Atoms on the Thermodynamic, Kinetic and Relaxation Properties of Mn(II) Complexes Formed With Some Trisubstituted 12-Membered Macrocyclic Ligands. *Frontiers in Chemistry* **6**, doi:<https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00232> (2018).
- 83 Costa, J. & Delgado, R. Metal complexes of macrocyclic ligands containing pyridine. *Inorganic Chemistry* **32**, 5257-5265, doi:<https://doi.org/10.1021/ic00075a052> (1993).
- 84 Kovacs, Z. & Sherry, A. D. A general synthesis of 1,7-disubstituted 1,4,7,10-tetraazacyclododecanes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 185-186, doi:<https://doi.org/10.1039/C39950000185> (1995).
- 85 Kim, W. D., Hrnčir, D. C., Kiefer, G. E. & Sherry, A. D. Synthesis, Crystal Structure, and Potentiometry of Pyridine-Containing Tetraaza Macrocyclic Ligands with Acetate Pendant Arms. *Inorganic Chemistry* **34**, 2225-2232, doi:<https://doi.org/10.1021/ic00112a040> (1995).
- 86 Le Fur, M. *et al.* Stable and Inert Yttrium(III) Complexes with PycLen-Based Ligands Bearing Pendant Picolinate Arms: Toward New Pharmaceuticals for β -Radiotherapy. *Inorganic Chemistry* **57**, 2051-2063, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02953> (2018).
- 87 Su, H. *et al.* Rigid Mn(ii) chelate as efficient MRI contrast agent for vascular imaging. *Dalton Transactions* **41**, 14480-14483, doi:<https://doi.org/10.1039/C2DT31696J> (2012).

- 88 Le Fur, M. *et al.* The role of the capping bond effect on pyclen natY3+/90Y3+ chelates: full control of the regiospecific N-functionalization makes the difference. *Chemical Communications* **53**, 9534-9537, doi:<https://doi.org/10.1039/C7CC05088G> (2017).
- 89 Blum, A. *et al.* Achiral oligoamines as versatile tool for the development of aspartic protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**, 8574-8586, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.08.012> (2008).
- 90 Siaugue, J.-M. *et al.* Regioselective synthesis of N-functionalized 12-membered azapyridinomacrocycles bearing trialkylcarboxylic acid side chains. *Tetrahedron* **57**, 4713-4718, doi:[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00328-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00328-3) (2001).
- 91 Kunz, H. & Unverzagt, C. The Allyloxycarbonyl (Aloc) Moiety—Conversion of an Unsuitable into a Valuable Amino Protecting Group for Peptide Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English* **23**, 436-437, doi:<https://doi.org/10.1002/anie.198404361> (1984).
- 92 Dessolin, M., Guillerez, M.-G., Thieriet, N., Guibé, F. & Loffet, A. New allyl group acceptors for palladium catalyzed removal of allylic protections and transacylation of allyl carbamates. *Tetrahedron Letters* **36**, 5741-5744, doi:[https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)01147-A](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)01147-A) (1995).
- 93 Kaupang, Å. & Bonge-Hansen, T. α -Bromodiazoacetamides – a new class of diazo compounds for catalyst-free, ambient temperature intramolecular C–H insertion reactions. *Beilstein journal of organic chemistry* **9**, 1407-1413, doi:<https://doi.org/10.3762/bjoc.9.157> (2013).
- 94 Tirsó, G., Kovács, Z. & Sherry, A. D. Equilibrium and Formation/Dissociation Kinetics of Some LnIIIPTCA Complexes. *Inorganic Chemistry* **45**, 9269-9280, doi:<https://doi.org/10.1021/ic0608750> (2006).
- 95 Aime, S. *et al.* Synthesis and NMR Studies of Three Pyridine-Containing Triaza Macrocylic Triacetate Ligands and Their Complexes with Lanthanide Ions. *Inorganic Chemistry* **36**, 2992-3000, doi:<https://doi.org/10.1021/ic960794b> (1997).
- 96 Takács, A. *et al.* Solution Structures, Stabilities, Kinetics, and Dynamics of DO3A and DO3A–Sulphonamide Complexes. *Inorganic Chemistry* **53**, 2858-2872, doi:<https://doi.org/10.1021/ic4025958> (2014).
- 97 Gündüz, S. *et al.* Coordination Properties of GdDO3A-Based Model Compounds of Bioresponsive MRI Contrast Agents. *Inorganic Chemistry* **57**, 5973-5986, doi:<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00473> (2018).

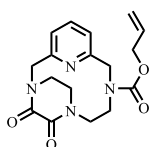
- 98 Junk, P. C. Crown ethers as stabilising ligands for oxonium ions. *New Journal of Chemistry* **32**, 762-773, doi:10.1039/B800122G (2008).
- 99 Lima, L. M. P. *et al.* Monopicolinate Cross-Bridged Cyclam Combining Very Fast Complexation with Very High Stability and Inertness of Its Copper(II) Complex. *Inorganic Chemistry* **53**, 5269-5279, doi:<https://doi.org/10.1021/ic500491c> (2014).
- 100 Frensdorff, H. K. Stability constants of cyclic polyether complexes with univalent cations. *Journal of the American Chemical Society* **93**, 600-606, doi:<https://doi.org/10.1021/ja00732a007> (1971).
- 101 Wang, X., Shyshov, O., Hanževački, M., Jäger, C. M. & von Delius, M. Ammonium Complexes of Orthoester Cryptands Are Inherently Dynamic and Adaptive. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 8868-8876, doi:<https://doi.org/10.1021/jacs.9b01350> (2019).
- 102 Buschmann, H.-J., Mutihac, L. & Jansen, K. Complexation of Some Amine Compounds by Macrocyclic Receptors. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* **39**, 1-11, doi:<https://doi.org/10.1023/A:1008155823862> (2001).
- 103 Han, Y., Jiang, Y. & Chen, C.-F. Cryptand-based hosts for organic guests. *Tetrahedron* **71**, 503-522, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.11.006> (2015).
- 104 Drahoš, B. *et al.* Mn²⁺ Complexes with 12-Membered Pyridine Based Macrocycles Bearing Carboxylate or Phosphonate Pendant Arm: Crystallographic, Thermodynamic, Kinetic, Redox, and 1H/17O Relaxation Studies. *Inorganic Chemistry* **50**, 12785-12801, doi:<https://doi.org/10.1021/ic201935r> (2011).
- 105 Esteban-Gómez, D., Cassino, C., Botta, M. & Platas-Iglesias, C. 17O and 1H relaxometric and DFT study of hyperfine coupling constants in [Mn(H₂O)₆]²⁺. *RSC Advances* **4**, 7094-7103, doi:<https://doi.org/10.1039/C3RA45721D> (2014).
- 106 Rodríguez-Rodríguez, A. *et al.* Lanthanide(III) Complexes with a Reinforced Cyclam Ligand Show Unprecedented Kinetic Inertness. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 17954-17957, doi:<https://doi.org/10.1021/ja511331n> (2014).
- 107 Le Fur, M. & Caravan, P. The biological fate of gadolinium-based MRI contrast agents: a call to action for bioinorganic chemists. *Metallomics* **11**, 240-254, doi:<https://doi.org/10.1039/c8mt00302e> (2019).
- 108 Tripier, R., Tircsó, G., Platas-Iglesias, C. & Harriswangler, C. in *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths* Vol. 61 (eds Jean-Claude G. Bünzli & Vitalij K. Pecharsky) 129-220 (Elsevier, 2022).
- 109 Le Fur, M. *et al.* A Coordination Chemistry Approach to Fine-Tune the Physicochemical Parameters of Lanthanide Complexes Relevant to

- Medical Applications. *Chemistry – A European Journal* **24**, 3127-3131, doi:<https://doi.org/10.1002/chem.201705528> (2018).
- 110 Versolato, S. *et al.* [Gd(HB-DO3A)]: Equilibrium, Dissociation Kinetic and Structural Differences in a Simple Homolog of [Gd(HP-DO3A)] (Prohance®). *Chemistry – A European Journal* **30**, e202400344, doi:<https://doi.org/10.1002/chem.202400344> (2024).
- 111 Tóth, é., Helm, L. & Merbach, A. in *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging* 25-81 (2013).
- 112 Achacoso, A. *Synthesis and Characterization of a Liver-Specific MRI Probe based on Manganese (II) formed with 3,9-PC2A* MSc Thesis thesis, University of Debrecen, (2022).
- 113 Sajtos, G. Z. *Májspecifikus Mn(II)-alapú MRI kontrasztanyag-jelölt előállítás és jellemzése* MSc Thesis thesis, Debreceni Egyetem, (2023).
- 114 Rohrer, M., Bauer, H., Mintorovitch, J., Requardt, M. & Weinmann, H.-J. Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solutions at Different Magnetic Field Strengths. *Investigative Radiology* **40**, doi:<https://doi.org/10.1097/01.rli.0000184756.66360.d3> (2005).
- 115 Robic, C. *et al.* Physicochemical and Pharmacokinetic Profiles of Gadopiclesol: A New Macrocyclic Gadolinium Chelate With High T1 Relaxivity. *Investigative Radiology* **54**, doi:<https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000563> (2019).
- 116 Tolmachev, V. & Orlova, A. Affibody Molecules as Targeting Vectors for PET Imaging. *Cancers* **12** (2020).
- 117 Hermanson, G. T.
- 118 Altai, M. *et al.* Affibody-derived drug conjugates: Potent cytotoxic molecules for treatment of HER2 over-expressing tumors. *Journal of Controlled Release* **288**, 84-95, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.040> (2018).

IX. FÜGGELLÉK

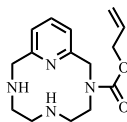
IX.1. Piklén (6) és védett származékainak szintézis leírása

IX.1.1. 3-Alloc-PC (12) szintézis leírása



A **3-Alloc-PC-oxalát (11) előállítására**: 3,10 g (11,9 mmol) **piklén-oxalát**-ot (7) 238 mL acetonitrilben oldottuk fel és hozzáadtunk 2,00 g (23,8 mmol) nátrium-hidrogén-karbonátot, majd a szuszpenziót 40 kevertettük szobahőmérsékleten. Ezt követően 1,33 mL (12,5 mmol) Alloc-kloridot adagoltunk a reakcióelegyhez cseppenként. A reakcióelegyet tovább kevertettük 14 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk szűrést követően. A bepárlási maradékot diklórmetánban visszaoldottuk, és a maradék sókat kiszűrtük. A szűrletet ismét szárazra bepároltuk, így fehér habként kaptuk meg **11**-es (4,08 g, 99%-os kitermelés, két rotamer keveréke) terméket. $^1\text{H NMR}$ (500,13 MHz, CDCl_3) δ 3,00 - 3,13 (m, 4H), 3,31 (ddd, $J = 14,7, 11,2, 3,9$ Hz, 1H), 3,51 - 3,51 (m, 7H), 3,78 - 3,88 (m, 4H), 4,04 (d, $J = 16,9$ Hz, 1H), 4,06 (d, $J = 16,9$ Hz, 1H), 4,14 (m, 1H), 4,21 (d, $J = 13,8$ Hz, 1H), 4,31 - 4,42 (m, 2H), 4,47 (d, $J = 5,8$ Hz), 4,55 (d, $J = 14,8$ Hz, 1H), 4,61 (d, $J = 14,3$ Hz, 1H), 4,92 (dd, $J = 17,2, 1,5$ Hz, 1H), 4,99 (dd, $J = 10,5, 1,2$ Hz, 1H), 5,13 (dd, $J = 10,4, 1,0$ Hz, 1H), 5,19 (dd, $J = 17,2, 1,3$ Hz, 1H), 5,19 (dd, $J = 17,2, 1,3$ Hz, 1H), 5,53 (d, $J = 16,9$ Hz, 2H), 5,62 (ddd, $J = 16,1, 10,8, 5,5$ Hz, 1H), 5,81 (ddt, $J = 16,3, 10,5, 5,8$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,0 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,10 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,51 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,52 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H) ppm; $^{13}\text{C-JMOD NMR}$ (125,77 MHz, CDCl_3) δ 45,4, 45,5, 46,8, 47,8, 48,8, 48,9,

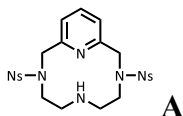
49,9, 51,1, 56,8, 57,0, 57,5, 58,7, 65,7, 66,1, 117,2, 118,2, 119,7, 119,8, 121,61, 122,1, 132,2, 137,1, 137,3, 153,0, 153,3, 156,18, 156,4, 156,5, 159,2, 159,3, 162,8, 162,9 ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $C_{17}H_{21}N_4O_4$ $[M+H]^+$ 345,1557; mért 345,1557; számolt $[M+Na]^+$ 367,1377; mért 367,1374.



A 3-Alloc-PC (12) előállítás: 4,04 g (11,7 mmol) **3-Alloc-PC-oxalátot (11)** feloldottunk 50 mL 2M-os sósavban, majd 100°C-on kevertettük 5,5 órán keresztül. Miután visszahűlt szobahőmérsékletűre 70 mL vizet és Amberlist A21 gyantán (75,0 g) adtunk hozzá, hogy eltávolítsuk a sav feleslegét. Az elegyet lassan kevertettük egy órán keresztül, majd kiszűrtük a gyantát, amit ezt követően vízzel és metanollal mostunk. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk, ami sárgás olajat eredményezett. Az ellenion cseréjét Amberlite IRA 458 (OH⁻ forma, 56 mL) kolonnán végeztük metanollal, mint eluens. Az így kapott olaj tisztítását kicsapással (1.: MeOH/Et₂O, 2.: forró ACN, 3.: MeOH/AcOEt) és oszlopkromatográfiával végeztük (oszlop: semleges Al₂O₃, gradiens: 100/0→100/2, eluensek: CH₂Cl₂/MeOH), ami így 3,37 g, (11,5 mmol, 98%-os kitermelés, 1/1 rotamer keverék) **12-es** terméket eredményezett. **¹H NMR** (500,13 MHz, D₂O) δ 2,37 (s, 2H), 2,45 (d, J = 3,2 Hz, 4H), 2,55 - 2,61 (m, 2H), 2,82 (s, 4H), 3,66 - 3,76 (m, 4H), 3,91 (d, J = 7,9 Hz, 4H), 4,45 (d, J = 4,6 Hz, 2H), 4,55 - 4,65 (m, 6H), 5,04 (d, J = 16,7 Hz, 1H), 5,06 (d, J = 10,0 Hz, 1H), 5,28 (d, J = 10,6 Hz, 2H), 5,36 (d, J = 17,2 Hz, 2H), 5,71 (ddt, J = 16,0, 10,3, 4,9 Hz, 1H), 6,00 (ddt, J = 16,3, 10,8, 5,6 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,18 (d, J = 6,5 Hz, 2H), 7,19 (d, J = 6,5 Hz, 2H), 7,67 (t, J = 7,3 Hz, 2H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (125,77 MHz, D₂O) δ 48,6, 48,7, 48,8, 48,8, 49,6, 49,7, 50,5, 53,9, 54,7, 55,2, 69,1, 69,4, 119,5, 121,1, 122,7, 122,7, 123,4, 135,2, 135,4, 140,7, 158,7, 159,1,

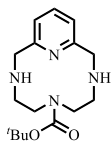
160,7, 160,9, 161,8, 161,9 ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $C_{15}H_{22}N_4O_2$ $[M+H]^+$ 291,1816; mért 291,1817.

IX.1.2. 3,9-diNs-PC (13) szintézis leírása



3,9-bis((4-nitrofenil)szulfonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-

piridinaciklodekafán (13) előállítása: 20,0 g (29,6 mmol) *terc*-butil-3,9-bis((4-nitrofenil)szulfonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-karboxilát (10) diklórmétános (45 mL) oldatához 21 mL trifluorecetsavat csepegtettünk, erős kevertetés közben. A reakciót szobahőmérsékleten 12 órán keresztül tovább kevertettük, majd az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk. A visszamaradt olajat víz és acetonitril 1:1 arányú elegyében visszaoldottuk, fagyasztottuk és liofilizáltuk. A liofilizálás 15,7 g (92%-os kitermelés) **13**-es terméket eredményezett bézs színű szilárd anyagként. **1H NMR** (360,13 MHz, DMSO- d_6) δ 3,30 (t, 4H), 3,64 (t, 4H), 4,57 (s, 4H), 7,43 (d, $J=7,7$, 2H), 7,88 (t, $J=7,7$, 1H), 8,19 (d, $J=8,9$, 4H), 8,45 (d, $J=8,9$, 4H), 10,20 (bs, 1H) ppm; **^{13}C -JMOD NMR** (90,55 MHz, DMSO- d_6) δ 44,72, 47,27, 51,62, 121,11, 124,99, 129,06, 139,02, 142,73, 150,28, 157,69 ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $C_{23}H_{24}N_6O_8S_2$ $[M+H]^+$ 577,1170; mért 577,1168; **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,33%; retenciós idő: 10,103 min; gradiens: 0.00→15,00 min 5→95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; minta: 1,00 mg/mL 100% ACN; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μ m, 150 \times 4,60 mm; kolonna ID: 181147-3.

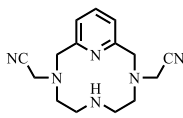
IX.1.3. 6-Boc-PC (14) szintézis leírása

A 6-Boc-PC (14) előállítás: 60,48 g (89,38 mmol) *tert*-butil-3,9-bis((4-nitrofenil)szulfonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-karboxilát-ot (**10**) oldottunk 500 mL DMF-ben, majd kevertetés közben argon atmoszféra alatt hozzáadtunk 98,82 g (715,04 mmol) vízmentes káliumkarbonátot oldathoz. Ezt követően 5,24 mL (51,02 mmol) tiofenolt adtunk a reakcióelegyhez argon atmoszféra alatt. A keletkezett szuszpenziót tovább kevertettük szobahőmérsékleten 24 órán keresztül. Az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk, a nyersterméket pedig flash kromatográfiával tisztítottuk. Az egyesített tiszta terméket tartalmazó frakciókról az oldószert eltávolítottuk csökkentett nyomáson. A visszamaradt olajos terméket víz és acetonitril elegyében (1:1) visszaoldottuk és liofilizáltuk. Ezt a lépést még kétszer megismételtük, ami 3,01 g sárgás szilárd anyagot (48%-os kitermelés) (**14**-as termék) eredményezett. **Flash NP-LC** retenciós idő: 18,6 min, gradiens: 0,00→5,00 min: 0% (B), 5,00→23,00 min 0→90% (B), eluens: etil-acetát (A) és 10% ammónia (25%-os) metanolban (B), áramlási sebesség: 85 mL/min, kolonna: 120 g-os Teledyne ISCO RediSepRf[®] Gold szilikagél eldobható kolonna; ¹H NMR (400,13 MHz, CDCl₃) δ 1,47 (s, 9H); 2,62 (t, *J* = 5,3 Hz, 4H); 3,52 (t, *J* = 5,3 Hz, 4H); 3,95 (s, 4H), 6,94 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H); 7,52 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H) ppm; ¹³C-JMOD NMR (90,55 MHz, CDCl₃) δ 28,54, 48,73, 50,65, 51,73, 80,50, 120,45, 136,79, 157,57, 157,68 ppm; UHRMS (ESI+) *m/z* számolt C₁₆H₂₆N₄O₂ [M+H]⁺ 307,2129; mért 307,2131; HPLC tisztaság (260 nm): 94,27%; retenciós idő: 5,361 min; gradiens: 0,00→15,00 min 0→90% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μL; minta: 2,00 mg / 2,00 mL

50% acetonitril vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 µm, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: 345362.

IX.2. 3,6 és 3,9-PC2A szintézis leírása

IX.2.1. 3,9-PC2A (16) szintézis leírása

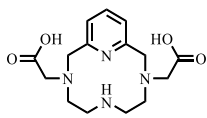


A

2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-

diil)diacetonitril (3,9-PC2MeCN) (15) előállítás: 0,50 g **piklén (6)** (2,42 mmol) 10 mL kétszeresen desztillált vízben oldottunk és az oldat pH-ját 8,55-re állítottuk 2,0 M-os sósavoldattal. 0,66 g formaldehid-nátrium-biszulfit-adduktot (4,94 mmol) 10 mL desztillált vízben feloldottuk és hozzáadtuk egy részletben a **piklén (6)** oldatához erőteljes kevertetés mellett. A reakcióelegyet felmelegítettük 60 °C-ra és tovább kevertettük 60 °C-on 3 órán keresztül. A reakcióelegy pH-ját 10 percenként ellenőriztük Metrohm 6.0210.100 kombinált elektróddal szerelt Metrohm 827 pH laboratóriumi pH-mérő segítségével és visszaállítottuk a kezdeti pH-értékre, ha 0,2 pH egység eltérést tapasztaltunk frissen készített 2 M-os NaOH-oldat segítségével. Miután visszahűtöttük a reakcióelegyet 0,40 g NaCN-ot (8,16 mmol) adtunk egy részletben a vizes oldathoz, amit tovább kevertettük 3 órán keresztül szobahőmérsékleten. A reakcióelegy analitikai HPLC-s kromatogramja a **piklén (6)** kvantitatív átalakulását mutatta 3,6- (6 - 8%) és 3,9-diszubsztituált (94 - 92%) metilnitril származékokká. A kapott oldat pH-ját 13-asra állítottuk 2 M-os NaOH-oldat használatával, majd a vizes fázist háromszor megextraháltuk kloroformmal (3 x 30 mL). Az egysített vizes fázisokat vízmentes MgSO₄-on szárítottuk, szűrtük és csökkentett nyomáson eltávolítottuk az oldószert. Ami így a **15**-ös terméket eredményezte fehér szilárd anyagként (0,47 g, 76%-os kitermelés). ¹H NMR (400,13 MHz,

CDCl₃) δ 2,01 (s, 4H), 2,61 (t, *J* = 5,2 Hz, 4H), 3,79 (s, 4H), 3,86 (s, 4H), 7,10 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,58 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H) ppm; ¹³C-JMOD NMR (100,62 MHz, CDCl₃) δ 46,15, 46,66, 52,95, 60,76, 115,43, 122,01, 137,62, 157,41 ppm UHRMS (ESI+) *m/z* számolt C₁₅H₂₀N₆ [M+H]⁺ 285,1822; mért 285,1821.

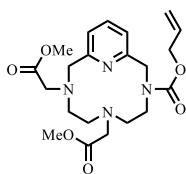


2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-

diil)diacetsav (3,9-PC2A) (16) előállítás: 0,47 g (1,83 mmol) 2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)diacetonitrilt (15) feloldottunk 40 mL tömény sósavban, majd reakcióelegyet 100 °C-ra melegítettük és tovább kevertettük ezen a hőmérsékleten 3 órán keresztül. Miután visszahűlt az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk, a visszamaradt sárgás olajat visszaoldottuk 30 mL kétszeresen desztillált vízben, megfagyasztottuk és liofilizáltuk a maradék sósav eltávolítása érdekében. Az így kapott szilárd anyagot preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. A tiszta 16-os terméket tartalmazó frakciókat liofilizáltuk, ami 0,51 g (86%-os kitermelés) fehér por formájában eredményezte a 16-os (3,9-PC2A) terméket (illetve 4,2 mg (7%-os kitermelés) 19-est (3,6-PC2A)). **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 16-os (3,9-PC2A): 4,71 min (illetve 19-os (3,6-PC2A): 3,27 min); gradiens: 0,00→5,00 min 0→30% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 350,00 μL; minta: 600 mg / 6 mL vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μm, 250 × 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346; ¹H NMR (400,13 MHz, D₂O) δ 2,97 (br s, 4H), 3,16 (t, *J* = 5,3 Hz, 4H), 3,90 (s, 4H), 4,48 (s, 4H), 7,78 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 8,38 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H) ppm; ¹³C-JMOD NMR (100,62 MHz, D₂O) δ 44,61, 51,49, 56,95, 57,53, 124,22, 146,40, 152,95, 174,99 ppm; UHRMS (ESI+) *m/z*

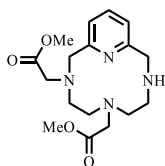
számolt $C_{15}H_{22}N_4O_4$ $[M+H]^+$ 323,1714; mért 323,1714. **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,55%; retenciós idő: 3,870 min; gradiens: 0,00→15,00 min 0→95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μ m, 150 \times 4,60 mm; kolonna ID: H20-260762.

IX.2.2. 3,6-PC2A (19) szintézis leírása

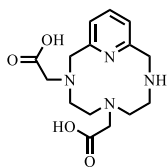


A dimetil-2,2'-(9-((allyloxy)carbonyl)-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,6-diil)diacetát (17) előállítás: 0,50 g (1,73 mmol) 3-Alloc-PC-t (12) o 91 mL acetonitrilben ldottuk fel és hozzáadtunk 0,72g (5,18 mmol) kálium-karbonátot, majd 30 percig 60 °C-on kevertettük. 0,335 mL (3,54 mmol) metil-2-brómacetátot 91 mL acetonitrilben oldottunk, majd csepegtetve hozzáadtuk a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet 60 °C-on továbbkevertettük 20 órán keresztül, ezt követően szobahőmérsékletűre hűtöttük vissza majd az oldhatatlan sókat kiszűrtük. A szűrletről csökkentett nyomáson eltávolítottuk az oldószert, majd a visszamaradt anyagot visszaoldottuk diklórmetánban. A kivált sókat ismét kiszűrtük, majd szárazra pároltuk a szűrletet. A bepárlási maradékot ezúttal minimális mennyiségű diklórmetánban oldottuk és nagy feleslegben hexánt adtunk hozzá. 4 óra elteltével a lombik falán olajos kiválás jelent meg. A felülúszó eltávolításával és az anyag szárazra párlással, 590 mg (78%-os kitermelés) halványsárga olajat kaptunk amely a két rotamer keveréke (17). 1H NMR (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 2,48 (br s, 1H), 2,61 (br s, 1H), 2,69 (m, 4H), 3,26 (br s, 1H), 3,40 (br s, 1H), 3,52 - 3,72 (m, 11H), 4,03 (d, $J = 4,5$ Hz 2H), 4,50 (m, 2H), 4,56 (m, 2H), 5,12 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H), 5,20 (m, 1H), 5,76 - 5,92 (m, 1H), 7,10 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H),

7,18 - 7,25 (m, 1H), 7,58 (m, 1H) ppm; ^{13}C -JMOD NMR (125,77 MHz, CDCl_3) δ 46,0, 46,6, 48,3, 48,9, 50,2, 50,3, 50,4, 50,9, 51,2, 51,3, 54,1, 54,5, 55,7, 55,9, 59,5, 59,6, 65,9, 65,9, 117,1, 117,2, 121,6, 122,2, 122,4, 122,7, 132,7, 132,8, 137,4, 137,6, 155,5, 155,8, 156,4, 156,6, 157,7, 157,9, 171,5, 171,6 ppm; UHRMS (ESI+) m/z számolt $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 435,2238; mért 435,2234; számolt $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 457,2058; mért 457,2055.



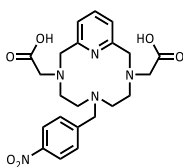
A dimetil-2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinacyklodekafán-3,6-diil)diacetát (3,9-PC2A^(OMe)) (18) előállítás: 0,31 g (0,71 mmol) 17-es anyagot 71 mL diklórmetánban oldottuk, majd 0 °C-on N_2 -t buborékolattunk át az oldaton 45 percen keresztül. Miután szobahőmérsékletre melegedett 0,082 g (0,07 mmol) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ -t és 0,352 μL (2,85 mmol) fenil-szilánt adtunk a reakcióelegyhez. Az elegyet 15 percig szobahőmérsékleten kevertettük, ezt követően 2 mL-re koncentráltuk és közvetlenül oszlopkromatográfiával (oszlop: alumina, gradiens: 100/0/1→100/1/1, eluensek: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$) tisztítottuk. A tiszta 18-as anyagot tartalmazó frakciók egyesítésével és az eluens csökkentett nyomáson történő eltávolításával 0,16 g (64%-os kitermelés) barna olajat kaptunk. ^1H NMR (500,13 MHz, CDCl_3) δ 2,28 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 2,63 (m, 2H), 2,67 - 2,75 (m, 2H), 2,95 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H), 3,31 (s, 2H), 3,45 (s, 2H), 3,55 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 3,90 (s, 2H), 4,02 (s, 2H), 6,96 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,50 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C -JMOD NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 44,4, 49,1, 51,3, 51,5, 52,6, 53,8, 54,6, 55,5, 58,2, 61,2, 121,4, 121,5, 136,8, 158,4, 158,6, 171,7, 172,1 ppm; UHRMS (ESI+) m/z számolt $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 351,2027; mért 351,2026; számolt $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 373,1846; mért 373,1843.


2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,6-

diil)diacetsav (3,6-PC2A) (19) előállítás: 0,133 g (0,38 mmol) **3,9-PC2A^(OMe)-t (18)** 5,4 mL 3 M-os HCl-ben oldottunk és 100 °C-on kevertettük 23 órán keresztül. Miután szobahőmérsékletűre hűlt nagy feleslegben acetont adtunk a reakcióelegyhez. A kivált fehér csapadékot szűrtük és több alkalommal mostuk acetonnal, végül vízben oldottuk. A víz elpárlásával 0,123 g (75%-os kitermelés) **3,6-PC2A-t (19)** kaptunk sárga olajként. **¹H NMR** (500,13 MHz, D₂O) δ 48,5, 52,5, 53,0, 54,6, 57,9, 58,5, 62,5, 124,8, 125,6, 142,8, 151,6, 152,2, 171,1, 177,9 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₁₅H₂₂N₄O₄ [M+H]⁺ 323,1714; mért 323,1714; számolt [M+2H]²⁺ 162,0893; mért 162,0889.

IX.3. Az analitikai vizsgálatokhoz használt bifunkciós ligandumok szintézis leírása

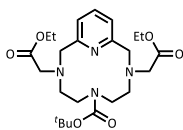
IX.3.1. 3,9-PC2ABn^{pNO₂} (32) szintézis leírása


A
2,2'-(6-(4-nitrobenzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-

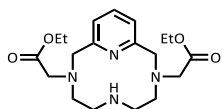
piridinaciklodekafán-3,9-diil)diacetsav (32) előállítás: 150 mg (0,528 mmol) 2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)diacetonitril (**15**) acetonitriles (150 mL) oldatához 185 μL (1,06 mmol) *N,N*-diizopropil-etilamint és 45,0 mg (0,271 mmol) nátrium-jodidot adtunk szobahőmérsékleten argon atmoszféra alatt. A reakcióelegyet 60 °C-ra melegítettük és 125 mg (0,589 mmol) 1-(bróm-metil)-4-nitrobenzol acetonitriles (5 mL) oldatát adagoltuk hozzá csepegtetve erőteljes kevertetés

közben. A reakcióelegyet tovább kevertettük 60 °C-on 72 órán keresztül, majd az oldószert eltávolítottuk csökkentett nyomáson, és a bepárlási maradékot feloldottuk 10 mL hideg desztillált vízben. Az oldat pH-ját 13,0-ra állítottuk szilárd nátrium-hidroxid használatával, és háromszor extraháltuk hideg kloroformmal (3 × 10 mL). Az egyesített szerves fázisokat kihevített Na₂SO₄-tal szárítottuk, majd az oldószert eltávolítottuk csökkentett nyomáson. A nyersterméket (**31**) visszaoldottuk 10 mL 12 M-os HCl oldatban, majd a reakcióelegyet erőteljes kevertetés mellett 110 °C-on tartottuk 3 órán keresztül. A reakció végeztével az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk. A nyersterméket (**32**) preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. Az egyesített tiszta terméket tartalmazó frakciókat liofilizáltuk, ami 160 mg (66%-os kitermelés) fehér szilárd terméket (**32**) eredményezett. **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 3,54 min; gradiens: 0,00→7,50 min 15→40% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 300,00 µL; minta: 350 mg / 4 mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 10 µm, 250 × 21,20 mm; kolonna ID: 429545-1; **¹H NMR** (360,13 MHz, D₂O) δ 3,02 (m, 4H), 3,46 (m, 4H), 3,87 (m, 4H) 4,18 (s, 2H), 4,65 (s, 4H), 7,57 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,71 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 8,12 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 8,22 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (90,56 MHz, D₂O) δ 50,67, 52,30, 56,07, 57,17, 58,69, 123,56, 124,08, 132,08, 140,36, 142,36, 148,01, 150,47, 171,30 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₂₂H₂₇N₅O₆ [M+H]⁺ 458,2034; mért 458,2034. **HPLC** tisztaság (260 nm): 95,65%; retenciós idő: 2,522 min; gradiens: 0,00→25,00 min 15% B; eluens: 20 mM PBS MQ-vízben (pH = 7,00) (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 30,00 µL; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 µm, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: 345362.

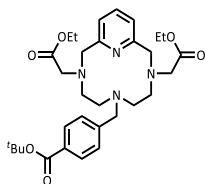
IX.3.2. 3,9-PC2ABn^{pCO₂H} (26) szintézis leírása



A dietil-2,2'-(6-(*tert*-butil-oxi-karbonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)diacetát (20) előállítás: A **6-Boc-piklén** (*tert*-butil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklo-dekafán-6-karboxilát, (14) alkilezését acetonitrilben, argon-atmoszféra alatt, nátrium-acetát trihidrát (mint „gyenge” bázis) jelenlétében végeztük. Ehhez 500 mg (1,63 mmol) **6-Boc-piklén-t** (14) 200 mL acetonitrilben oldottunk, majd hozzáadtunk 910 mg (6,69 mmol) nátrium-acetát trihidrátot. A reakcióelegyet ezután 65 °C-ra melegítettük és erőteljes kevertetés közben etil-brómacetát (510 mg, 3,05 mmol) 50 mL-es acetonitriles oldatát csepegtettük hozzá. A reakcióelegyet további 4 órán keresztül 65 °C-on kevertettük, ezt követően a reakcióelegyet leszűrtük és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk, ami a terméket (20) eredményezte, melyet barna olajként izoláltunk (687 mg, 88%-os kitermelés). ¹H NMR (360,13 MHz, MeOD-*d*₄) δ 1,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H), 1,41 (s, 9H), 2,66 (t, *J* = 6,4 Hz, 4H), 3,24 (m, 4H), 3,63 (s, 4H), 3,99 (s, 4H), 4,26 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 4,87 (s, 2H), 7,35 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,85 (t, *J* = 7,7, 1H) ppm; ¹³C-JMOD NMR (90,56 MHz, MeOD-*d*₄) δ 14,61, 28,55, 48,69, 53,60, 57,55, 61,17, 62,13, 81,55, 123,80, 139,95, 157,87, 158,14, 173,90 ppm; UHRMS (ESI+) *m/z* számolt C₂₄H₃₈N₄O₆ [M+H]⁺ 479,2864; mért 479,2863; HPLC tisztaság (260 nm): 85,67%; retenciós idő: 8,482 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95% B; eluensek: 5 mM-os TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μL; minta: 0,70 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μm, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H20-260762.

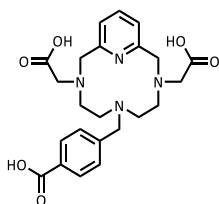


A dietil-2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)diacetát (21) előállítása: 750 mg (1,57 mmol) dietil-2,2'-(6-(*tert*-butil-oxi-karbonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklo-dekafán-3,9-diil)diacetátot (20) 30 mL diklórmetánban oldottuk fel, majd erőteljes kevertetés közben 14 mL trifluorecetsavat csepegtettünk hozzá 0 °C-on só-jég hűtőkeverék alkalmazásával. A reakcióelegyet hagytuk szobahőmérsékletre melegedni, és további 24 órán keresztül ezen a hőmérsékleten kevertettük. Az oldószer csökkentett nyomáson történő eltávolítását követően a nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottunk. A tiszta terméket tartalmazó frakciókat liofilizálásával 553 mg (93%-os kitermelés) fehér szilárd anyagot (21) izoláltunk. **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 8,45 min; gradiens: 0.00→15,00 min 5→95% B; eluens: 5 mM-os TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 500,00 μ L; minta: 590 mg / 3,00 mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 x 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (400,13 MHz, MeOD-*d*₄) δ 1,25 (t, *J* = 7,2 Hz, 6H), 3,14 (m, 4H), 3,25 (m, 4H), 3,66 (s, 4H), 4,13 (s, 4H), 4,17 (q, *J* = 7,2 Hz, 4H), 7,25 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,79 (t, *J* = 7,7, 1H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (100,62 MHz, MeOD-*d*₄) δ 14,50, 46,89, 52,87, 57,80, 58,50, 61,78, 122,02, 140,03, 160,34, 173,01 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₁₉H₃₀N₄O₄ [M+H]⁺ 379,2340; mért 379,2340; **HPLC** tisztaság (260 nm): 95,39%; retenciós idő: 7,598 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95% B; eluenst: 5 mM TFA MQ-vízben(A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; minta: 1,00 mg/mL 50 % ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μ m, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H20-260762.



A dietil-2,2'-(6-(4-(*tert*-butil-oxi-karbonil)benzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)diacetatát (25) előállítás: 150 mg (0,396 mmol) dietil-2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)diacetát (21) 150 mL-es acetonitriles oldatához, 380 μ L (1,84 mmol) *N,N*-diizopropiletilamint és 21,0 mg (0,198 mmol) nátrium-jodidot adtunk szobahőmérsékleten argon-atmoszféra alatt. A reakcióelegyet 80 °C-ra melegítettük, majd 170 mg (0,627 mmol) *tert*-butil-4-(brómmetil)benzoát 70 mL-es acetonitriles oldatát csepegtettük hozzá 30 perc alatt. A reakciót tovább kevertettük 80 °C-on 72 órán keresztül, ezt követően szobahőmérsékletre hűtöttük és az oldószert csökkentett nyomáson távolítottuk el. Az így kapott nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. A tiszta **25**-ös terméket tartalmazó frakciókat liofilizáltuk, ami fehér por formájában eredményezte a terméket (209 mg, 93%-os kitermelés). **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 4,98 min; gradiens: 0,00→9,00 min 36→90% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektálási térfogat: 200,00 μ L; minta: 375 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 × 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (360,13 MHz, CDCl₃) δ 1,38 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H), 1,74 (s, 9H), 3,22 – 3,40 (m, 8H), 3,52 – 3,67 (m, 4H), 4,12 – 4,20 (m, 4H), 4,28 (q, *J* = 7,2 Hz, 4H) 4,72 (s, 2H), 7,25 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,69 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,85 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,14 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (90,56 MHz, CDCl₃) δ 14,10, 28,12, 49,91, 54,21, 54,44, 56,66, 58,33, 60,96, 81,77, 121,04, 130,14, 130,41, 133,19, 134,62, 138,50, 158,74, 164,81, 170,54 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt

$C_{31}H_{44}N_4O_6$ $[M+H]^+$ 569,3334; mért 569,3334. **HPLC** tisztaság (260 nm): 99,50%; retenciós idő: 10,949 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95 %B; eluens: of 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; minta: 0,80 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μ m, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H20-260762.

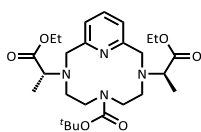


A

2,2'-(6-(4-karboxibenzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinacyklodekafán-3,9-diil)diacetsav (26) előállítás: 80 mg (2,00 mmol) nátrium-hidroxidot adtunk 160 mg (0,281 mmol) dietil-2,2'-(6-(4-(*terc*-butil-oxi-karbonil)benzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinacyklodekafán-3,9-diil)diacetátát (**25**) 3,0 mL-es etanolos oldatához szobahőmérsékleten. Ezután a reakcióelegyet 60 °C-ra melegítettük és 3 órán keresztül kevertettük ezen a hőmérsékleten, majd a reakcióelegyet visszahűtöttük szobahőmérsékletre és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk. A nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. Az egyesített tiszta **26**-os ligandumot tartalmazó frakciókat liofilizáltuk, amely fehér porszerű anyag formájában eredményezte a terméket (110 mg, 86%-os kitermelés). **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 4,45 min; gradiens: 0,00→10,00 min 5→35% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 250,00 μ L; minta: 128 mg/mL H₂O; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 × 21.20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (400,13 MHz, D₂O) δ 2,94 (m, 4H), 3,52 (t, J = 5,4 Hz, 4H), 3,75 (m, 4H), 3,95 (s, 2H), 4,70 (s, 4H), 7,52 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,62 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 8,02 (d, J = 8,2

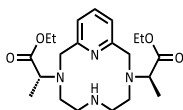
Hz, 2H), 8,04 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C -**JMOD NMR** (100,62 MHz, D_2O) δ 49,57, 52,68, 56,83, 57,94, 59,07, 123,14, 129,82, 130,37, 130,43, 140,87, 141,07, 150,14, 163,14, 170,07 ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 457,2082; mért 457,2080. **HPLC** tisztaság (260 nm): 99,50%; retenciós idő: 4,597 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 5,00 μL ; minta: 2,24 mM vizes oldata; Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 μm , 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H21-212012.

IX.3.3. 3,9-PC2MABn^{pCO₂H} (28) szintézis leírása



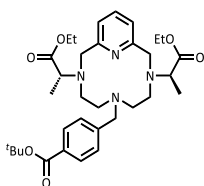
A dietil-2,2'-(6-(*tert*-butil-oxi-karbonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)(2R,2'R)-dipropionát (22) előállítás: 1,80 g (13,0 mmol) kálium-karbonátot szuszpendáltunk 1,00 g (3,26 mmol) **6-Boc-piklén (14)** (*tert*-butil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-karboxilát) 40 mL-es diklórometános oldatában argon-atmoszféra alatt. Ezután a szuszpenziót jeges fürdőn lehűtöttük és 1,51 g (6,04 mmol) etil-(S)-2-(triflormetilszulfoniloxi)propionát 80 mL-es diklórometános oldatát adtuk hozzá csepegtetve erős kevertetés mellett 30 perc alatt. A reakcióelegyet további 72 órán keresztül kevertettük szobahőmérsékleten, majd a reakcióelegyből a szilárd maradékot kiszűrtük a szűretet pedig csökkentett nyomáson bepároltuk. A visszamaradt olajszerű terméket visszaoldottuk 50 % acetontilt tartalmazó vizes oldat segítségével, majd preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. Az tiszta **22**-es terméket tartalmazó frakciókat liofilizáltuk, ami fehér szilárd porszerű anyagként eredményezte a terméket (1,30 g 79%-os kitermelés). **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és

260 nm; retenciós idő: 5,74 min; gradiens: 0,00→7,50 min 30→60% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 200,00 μ L; minta: 700 mg / 7,00 mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 \times 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. $^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ 1,25 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 1,31 (m, 9H), 1,47 (d, $J = 7,2$ Hz, 6H), 3,27 (m, 8H), 3,75 (m, 4H) 4,15 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 4,19 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 4,41 (s, 4H), 7,64 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 8,23 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H) ppm; $^{13}\text{C-JMOD NMR}$ (100,62 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ 14,48, 28,34, 51,44, 54,71, 55,39, 60,95, 62,52, 81,96, 124,80, 145,17, 153,71, 158,66, 172,90 ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 507,3177; mért 507,3177. **HPLC** tisztaság (260 nm): 100,00%; retenciós idő: 8,996 min; gradiens: 0,00→15,00 min 30→90% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 20,00 μ L; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 μ m, 150 \times 4,60 mm; kolonna ID: 345362.



A dietil-2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)(2R,2'R)-dipropionát (23) előállítása: 7 mL trifluoecetsavat cseppenként hozzáadtunk 651 mg (1,28 mmol) dietil-2,2'-(6-(*terc*-butil-oxi-karbonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)(2R,2'R)-dipropionát (22) 15 mL-es diklórmetános oldatához erős kevertetés közben 0 °C-on. A reakcióelegyet további 24 órán keresztül kevertettük tovább szobahőmérsékleten, ezt követően az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk, ami a **23**-os terméket fehér szilárd anyagként eredményezte (505 mg, 96%-os kitermelés). $^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, D_2O) δ 1,20 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), 1,52 (d, $J = 7,2$ Hz, 6H), 2,97 (m, 4H), 3,17 (m, 4H), 3,75 (m, 4H), 4,07 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 4,15 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 4,45 (bs, 4H), 7,81 (d, $J =$

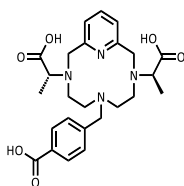
7,9 Hz, 2H), 8,42 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C -JMOD NMR (100,62 MHz, D_2O) δ 13,14, 45,38, 49,95, 61,82, 62,82, 123,96, 146,62, 153,15, 175,35 ppm; UHRMS (ESI+) m/z számolt $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 407,2653; mért 407,2655. HPLC tisztaság (260 nm): 97,27%; retenciós idő: 5,354 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95%B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μL ; minta: 0,30 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μm , 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H20-260762.



A dietil-2,2'-(6-(4-(*tert*-butil-oxi-karbonil)benzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)(2R,2'R)-dipropionát (27)

előállítás: 200 mg (0,492 mmol) dietil-2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)(2R,2'R)-dipropionát (23) 100 mL-es acetonitriles oldatához hozzáadtunk 102 mg (0,738 mmol) kálium-karbonátot és 11,0 mg (0,0611 mmol) nátrium-jodidot argon atmoszféra alatt szobahőmérsékleten. Ezután a reakcióelegyet 65 °C-ra melegítettük és erős kevertetés mellett 140 mg (0,516 mmol) *tert*-butil-4-(brómmetil)benzoát 20 mL-es acetonitriles oldatát adagoltuk hozzá csepegtetve, 30 perc alatt. Majd a hőmérsékletet 80 °C-ra melegítettük és a szuszpenziót tovább kevertettük 72 órán keresztül. Ezt követően az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk és a nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. Az egyesített 27-es terméket tartalmazó frakciókat liofilizáltuk, ami 152 mg (52%-os kitermelés) terméket eredményezett fehér szilárd por formájában. **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 9,35 min; gradiens: 0,00→13,00 min 30→60% B; eluens: 5 mM

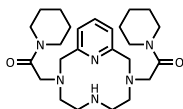
TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 300,00 μ L; minta: 150 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 150 \times 21,20 mm; kolonna ID: 589811-5. $^1\text{H NMR}$ (400,13 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ 1,04 (m, 6H), 1,25 (m, 3H), 1,33 (m, 3H), 1,56 (s, 9H), 3,04 – 3,31 (m, 9H), 3,61 – 4,23 (m, 9H), 4,46 (m, 2H), 7,13 (m, 2H), 7,67 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,69 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,97 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H) ppm; $^{13}\text{C NMR-JMOD}$ (100,62 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}-d_3$) δ 12,93, 14,39, 14,66, 17,75, 28,32, 50,50, 52,65, 54,51, 54,52, 55,20, 55,68, 61,46, 61,57, 63,16, 63,37, 82,38, 120,71, 121,22, 130,74, 131,61, 133,86, 135,68, 139,26, 161,72, 162,31, 165,74, 173,48, 174,06 ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számított $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 597,3647; mért 597,3644. **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,93%; retenciós idő: 11,687 min; gradiens: 0,00 \rightarrow 15,00 min 5 \rightarrow 95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; minta: 0,50 mg/1,00 mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μ m, 150 \times 4,60 mm; kolonna ID: H20-260762.



A (2R,2'R)-2,2'-(6-(4-karboxibenzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)dipropionsav (28) előállítása: 120 mg (0,201 mmol) dietil-2,2'-(6-(4-(terc-butyl-oxi-karbonil)benzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)(2R,2'R)-dipropionát (27) 25 mL-es etanolos oldatához szobahőmérsékleten erős kevertetés mellett 118 mg (2,95 mmol) nátrium hidroxidot adtunk. A reakció elegyet 60 °C-ra melegítettük és tovább kevertettük 3 órán keresztül. Ezt követően az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk, a nyersterméket pedig preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. Az egyesített tiszta frakciók liofilizálását követően 85 mg (87%-

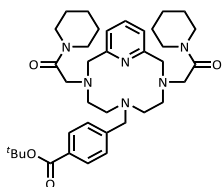
os kitermelés) **28**-as terméket izoláltunk fehér por formájában. **Preparatív HPLC**: UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 9,02 min; gradiens: 0,00→11,00 min 0→22% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 100,00 µL; minta: 97 mg/mL H₂O; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 µm, 150 × 21,20 mm; kolonna ID: 589811-5. **¹H NMR** (360,13 MHz, D₂O) δ 1,54 (s, 3H), 1,56 (s, 3H), 2,70 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 3,45 – 3,56 (m, 4H), 3,76 (m, 9H), 4,46 (m, 4H), 4,65 (m, 4H), 7,59 (d, 2H), 7,52 (d, 2H), 7,94 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 8,01 (t, 1H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (90,56 MHz, D₂O) δ 9,95, 49,25, 51,14, 55,42, 57,75, 57,80, 62,75, 123,35, 129,60, 129,95, 130,38, 133,32, 140,62, 149,43, 162,64, 169,91 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₂₅H₃₂N₄O₆ [M+Na]⁺ 507,2214; mért 507,2210. **HPLC** tisztaság (260 nm): 99,08%; retenciós idő: 5,294 min; gradiens: 0,00→6,00 min 5→41% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 µL; minta: 0,30 mg/mL H₂O; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 µm, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H20-260762.

IX.3.4. 3,9-PC2AM^{pip}Bn^{pCO₂H} (30) szintézis leírása



A 2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinacyklodekafán-3,9-diil)bis(1-(piperidin-1-il)etán-1-one) (24) szintézise: 250 mg (1.21 mmol) **piklén (6)** (3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinacyklodekafán) acetonitriles (200mL) oldatához argon atmoszféra alatt 660 mg (4.85 mmol) nátrium-acetát trihidrátot adtunk. A reakcióelegyet 60 °C-ra melegítettük és erőteljes kevertetés közben 624 mg (3.02 mmol) 2-bróm-1-(piperidin-1-il)etán-1-on acetonitriles oldatát (60 mL) csepegtettük 9 óra leforgása alatt. A

reakcióelegyet további 48 órán keresztül kevertettük ezen a hőmérsékleten, majd szűrést követően az szűrletről az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk. A nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. A terméket tartalmazó frakciók liofilizálásával 220 mg (40%-os kitermelés) **24**-es anyagot izoláltuk fehér porként. **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 16,09 min; gradiens: 0,00→20,00 min 8→28% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 600,00 µL; minta: 550 mg / 5,00 mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 10 µm, 250 × 21,20 mm; kolonna ID: 429545-1. **¹H NMR** (360,13 MHz, D₂O) δ 1,45 (m, 4H), 1,54 (m, 8H), 2,95 (m, 4H), 3,22 (m, 4H), 3,31 (m, 4H), 3,39 (m, 4H), 4,09 (s, 4H), 4,43 (s, 4H), 7,60 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 8,18 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (90,56 MHz, D₂O) δ 23,43, 25,03, 25,48, 43,50, 44,77, 45,72, 52,82, 57,26, 58,30, 123,30, 144,24, 153,09, 167,89 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₂₅H₄₀N₆O₂ [M+H]⁺ 457,3286; mért 457,3284. **HPLC** tisztaság (260 nm): 95,90%; retenciós idő: 8,111 min; gradiens: 0,00→15,00 min 0→90% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált érfogat: 1,00 µL; minta: 1,00 mg / 100 µL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 µm, 150 × 4.60 mm; kolonna ID: 345362.



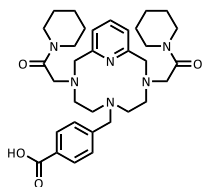
A Terc-butil 4-((3,9-bis(2-oxo-2-(piperidin-1-il)etil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-yl)metil)benzoát (29)

előállítás: 100 mg (0.219 mmol) 2,2'-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)bis(1-(piperidin-1-il)etán-1-one) (24)

acetonitriles (50 mL) oldatához 76 mg (0,55 mmol) kálium-karbonátot és 17,4

mg (0,116 mmol) nátrium jodidot adtunk argon atmoszféra alatt szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet 60 °C-ra melegítettük és 60,2 mg (0,222 mmol) *terc*-butil-4-(brómmetil)benzoát acetonitriles (20 mL) oldatát adagoltuk hozzá csepegtetve 30 perc alatt erős kevertetés mellett. A reakcióelegyet további 48 órán keresztül melegítettük, majd szűrést követően az oldószer csökkentett nyomáson eltávolítottuk. A nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. A tiszta egyesített frakciók liofilizálásával 120 mg (84%-os kitermelés) **29**-es terméket izoláltuk fehér por formájában.

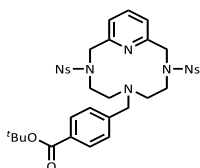
Preparatív HPLC: UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 6,02 min; gradiens: 0,00→10,00 min 20→70% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 500,00 µL; minta: 142 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 µm, 250 × 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (360,13 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ 1,52 (m, 8H), 1,58 (s, 9H), 1,60 (m, 4H), 2,95 (m, 4H), 3,09 (m, 4H), 3,46 (m, 4H), 3,50 (m, 4H), 3,80 (s, 4H), 3,94 (s, 2H), 4,51 (s, 4H), 7,37 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,62 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,92 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,92 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (90,56 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ 24,85, 26,13, 26,63, 28,41, 43,72, 46,32, 51,86, 53,51, 56,95, 57,82, 60,12, 82,28, 123,27, 130,52, 131,71, 133,00, 140,62, 140,72, 154,15, 164,91, 166,09 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₃₇H₅₄N₆O₄ [M+H]⁺ 647,4279; mért 647,4278. **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,99 %; retenciós idő: 10,326 min; gradiens: 0,00→15,00 min 0→90 % B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 µL; minta: 0,25 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 µm, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: 345362.



A 4-((3,9-bis(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)etil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-yl)metil)benzoésav (30) előállítás: 110 mg (0,170 mmol) *tert*-butil 4-((3,9-bis(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)etil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-yl)metil)benzoát (29) diklórometános oldatához (15 mL) 7 mL trifluoecetsavat csepegtettünk erős kevertetés közben só/jég hűtötte közben. A reakcióelegyet hagytuk szobahőmérsékletre melegedni, majd további 12 órán keresztül kevertettük ezen a hőmérsékleten. Ezt követően az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk a nyersterméket pedig preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. A terméket tartalmazó frakciók liofilizálásával 96 mg (96%-os kitermelés) **30**-as ligandumot izoláltuk fehér szilárd anyag formájában. **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 8,06 min; gradiens: 0,00→10,00 min 0→40% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 500,00 μL; minta: 137 mg / 800 μL 40% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μm, 250 × 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (400,13 MHz, CD₃CN-*d*₃) δ 1,49 (m, 8H), 1,60 (m, 4H), 3,01 (m, 4H), 3,10 (m, 4H), 3,41 (m, 4H), 3,49 (m, 4H), 3,68 (s, 4H), 4,05 (s, 2H), 4,40 (s, 4H), 7,31 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,61 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,87 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,96 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (100,62 MHz, CD₃CN-*d*₃) 24,85, 26,16, 26,64, 43,59, 46,30, 51,51, 52,42, 53,09, 56,99, 59,94, 122,91, 130,92, 131,72, 132,37, 139,87, 140,26, 155,42, 165,64, 167,86 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₃₃H₄₆N₆O₄ [M+H]⁺ 591,3653; mért 591,3653. **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,95%; retenciós idő: 7,741 min; gradiens: 0,00→15,00 min 0→90% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00

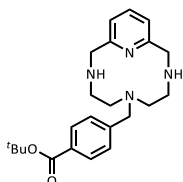
mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; minta: 0,60 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 \AA , 5 μ m, 150 \times 4,60 mm; column ID: 345362.

IX.4. A bifunkciós ligandum (3,9-PC2ABn^{PMa} 38) szintézis leírása



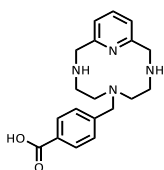
A *tert*-butil-4-((3,9-bis((4-nitrofenil)szulfonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-il)metil)benzoát (33) előállítása: 5,02 g (8,67 mmol) 3,9-bis((4-nitrofenil)szulfonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-t (13) 700 mL acetonitrilben oldottuk, majd 358 mg (2,39 mmol) nátrium-jodidot és 6,10 mL (34,67 mmol) *N,N*-diizopropil-etilamint adtunk az oldathoz. A reakcióelegyet 80 °C-ra melegítettük fel és 15 perc erős kevertetést követően, 2,35 g (8,67 mmol) *tert*-butil-4-(brómmetil)benzoát acetonitriles oldatát (50 mL) adtuk hozzá cseppenként. A reakcióelegyet további 48 órán keresztül kevertettük 80 °C-on, majd visszahűtöttük szobahőmérsékletűre és eltávolítottuk az oldószert csökkentett nyomáson. A termék acetontól való átkristályosítása 6,18 g (93%-os kitermelés) 33-es anyagot eredményezett fehér szilárd anyagként. ¹H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,57 (s, 9H), 3,31 (m, 2H), 3,53 (m, 4H), 4,35 (m, 4H), 4,51 – 4,71 (m, 4H), 4,88 (s, 4H), 7,56 (d, *J* = 7,7, 2H), 7,82 (d, *J* = 7,9, 2H), 7,99 (t, *J* = 7,8, 1H), 8,04 (d, *J* = 7,7, 2H), 8,37 (d, *J* = 8,4 Hz, 4H), 8,49 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H) ppm; ¹³C-JMOD NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*₆) δ ; 27,75, 41,74, 45,91, 46,78, 52,41, 81,33, 122,06, 124,87, 129,42, 129,81, 131,59, 132,38, 132,71, 139,65, 141,78, 150,44, 157,55, 164,36 ppm; UHRMS (ESI+) *m/z* számolt C₃₅H₃₈N₆O₁₀S₂ [M+H]⁺ 767,2164; mért 767,2164; HPLC tisztaság (260 nm): 95,39%; retenciós idő: 12,182 min; gradiens: 0,00→15,00 min

5→95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 1,00 µL; minta: 0,26 mg / 100 µL ACN + 2% DMF; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 µm, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H21-212012.



A *tert*-butil-4-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-ilmetil)benzoát (34) előállítás: 3,33 g (4,34 mmol) *tert*-butil-4-((3,9-bis((4-nitrofenil)szulfonil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-il)metil)benzoátot (33) 30 mL *N,N*-dimetilformamidban oldottunk és 5,70 g vízmentes kálium-karbonátot adtunk a kevertetett oldathoz. Ezt követően 1,50 mL (14,61 mmol) tiofenolt adtunk a reakcióelegyhez argon atmoszféra alatt. A keletkezett szuszpenziót tovább kevertettük szobahőmérsékleten 24 órán keresztül. Az oldószert csökkentett nyomáson elpároltuk, a nyersterméket pedig flash kromatográfiával tisztítottuk. Az egyesített tiszta terméket tartalmazó frakciókról az oldószert elpároltuk csökkentett nyomáson. A visszamaradt olajos terméket víz és acetonitril elegyében (1:1) visszaoldottuk és liofilizáltuk, ami 1,00 g fehér szilárd anyagot (58%-os kitermelés) (34-as termék) eredményezett. **Flash NP-LC** retenciós idő: 18,0 min, gradiens: 0,00→7,00 min: 0% (B), 7,00→22,00 min 0→90% (B), eluens: etil-acetát (A) és 10% ammónia (25%-os) metanolban (B), áramlási sebesség: 40 mL/min, kolonna: 40 g-os Teledyne ISCO RediSepRt[®] Gold szilikagél eldobható kolonna; ¹H NMR (360,13 MHz, MeOD-*d*₄) δ 1,59 (s, 9H), 2,84 (m, 4H), 3,29 (m, 4H), 3,98 (s, 2H), 4,65 (s, 4H), 7,50 (d, *J* = 7,8, 2H), 7,55 (d, *J* = 8,2, 2H), 7,98 (d, *J* = 8,2, 2H), 7,99 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H) ppm; ¹³C-JMOD NMR (90,55 MHz, MeOD-*d*₄) δ; 28,39, 47,36, 49,00, 50,96, 51,62, 60,03, 82,40, 123,21, 130,76, 130,79, 132,70, 140,78, 142,43, 151,08, 167,07 ppm; UHRMS (ESI+)

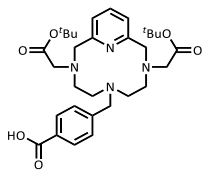
m/z számolt $C_{23}H_{32}N_4O_2$ $[M+H]^+$ 397,2598; mért 397,2594; **HPLC** tisztaság (260 nm): 99,57%; retenciós idő: 6,956 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; minta: 0,60 mg / 200 μ L H_2O ; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 μ m, 150 \times 4,60 mm; kolonna ID: H21-212012.



A

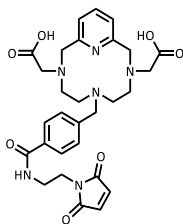
4-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-

ilmethyl)benzoésav (35) előállítás: 500 mg (1,26 mmol) *tert*-butil-4-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-ilmethyl)benzoátot (**34**) 15,0 mL diklórmétánban oldottunk és 7,0 mL trifluoecetsavat adtunk hozzá csepegtetve erőteljes kevertetés közben szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet további 12 órán keresztül kevertettük szobahőmérsékleten, majd az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk, így 400 mg (93%-os kitermelés) **35**-ös terméket kaptunk fehér szilárd anyagként. 1H NMR (400,13 MHz, MeOD- d_4) δ 2,84 (t, J = 5,4 Hz, 4H), 3,32 (m, 4H), 3,98 (s, 2H), 4,64 (s, 4H), 7,49 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,55 (d, J = 8,1, 2H), 7,99 (t, J = 7,8, 1H), 8,05 (d, J = 8,2 Hz, 2H) ppm; ^{13}C -JMOD NMR (100,62 MHz, MeOD- d_4) δ 47,36, 49,00, 50,97, 51,59, 60,00, 123,22, 130,84, 131,19, 131,55, 140,80, 142,68, 151,12, 169,49 ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $C_{19}H_{24}N_4O_2$ $[M+H]^+$ 341,1972; mért 341,1970; **HPLC** tisztaság (260 nm): 99,12%; retenciós idő: 4,347 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95 %B; eluens: 5 mM TFA MQvízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 1,00 μ L; minta: 0,62 mg / 100 μ L H_2O ; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 μ m, 150 \times 4,60 mm; kolonna ID: H21-212012.



A 4-((3,9-bis(2-(*tert*-butoxi)-2-oxoetil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-il)metil)benzesav (36) előállítás: 250 mg (0,734 mmol) 4-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-6-ilmethyl)benzoesav (35) vízmentes *N,N*-dimetilformamidban (50 mL) kapott oldatához 600 μ L (3,44 mmol) *N,N*-diizopropil-etilamint adtunk argon atmoszféra alatt szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet 60 °C-ra melegítettük és 228 μ L (1,36 mmol) *tert*-butil-brómacetát vízmentes *N,N*-dimetilformamidos (20 mL) oldatát hozzáadagoltuk csepegtetve 30 perc alatt, erős kevertetés mellett. A reakcióelegyet tovább kevertettük 60 °C-on 48 órán keresztül, majd az oldószert csökkentett nyomáson elpároltuk. Az így kapott nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. Az egyesített tiszta 36-os terméket tartalmazó frakciókat liofilizáltuk, ami 174 mg (42%-os kitermelés) szilárd anyagot eredményezett. **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 9,10 min; gradiens: 0,00→12,00 min 25→85% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 300,00 μ L; minta: 418 mg/1 mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 × 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (400,13 MHz, CDCl₃) δ 1,41 (s, 18H), 3,23 (m, 4H), 3,30 (m, 8H), 4,11 (s, 4H), 4,47 (s, 2H), 7,17 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,52 (d, *J* = 8,1, 2H), 7,75 (t, *J* = 7,7, 1H), 7,97 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (100,62 MHz, CDCl₃) δ 28,10, 50,14, 54,62, 57,46, 58,36, 82,78, 121,86, 130,75, 130,89, 131,53, 135,27, 139,52, 157,35, 168,55, 169,32 ppm; **UHRMS** (ESI⁺) *m/z* számolt C₃₁H₄₄N₄O₆ [M+H]⁺ 569,3334; mért 569,3330; **HPLC** tisztaság (260 nm): 95,62%; retenciós idő: 9,420 min; gradiens: 0,00→15,00 min 30→60% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L;

2H), 7,75 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H) ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $C_{37}H_{50}N_6O_7$ $[M+H]^+$ 691,3814; mért 691,3814; **HPLC** tisztaság (260 nm): 99,77%; retenciós idő: 10,726 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 5,00 μ L; minta: 0,53 mg / 300 μ L 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μ m, 150 \times 4,60 mm; kolonna ID: H20-261386.



A **2,2'-(6-(4-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-il)etil)karbamoil)benzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-**

diil)diacetsav (38) előállítás: 11,1 mg (0,0161 mmol) di-*tert*-butil-2,2'-(6-(4-((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-il)etil)karbamoil)benzil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklodekafán-3,9-diil)diacetát (**37**) diklórmétános (1,50 mL) oldatához 700 μ L trifluorecetsavat adtunk csepegtetve, erőteljes kevertetés mellett, 0 °C-on. A reakcióelegyet hagytuk szobahőmérsékletre melegedni, ezen a hőmérsékleten tovább kevertettük 24 órán keresztül, végül az oldószert csökkentett nyomáson elpároltuk. A nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk, majd **38**-as terméket tartalmazó frakciókat egyesítettük, liofilizáltuk, ami 8,40 mg (90%-os kitermelés) fehér szilárd anyagot eredményezett. **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 6,85 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→35% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 600.00 μ L; minta: 9 mg / 200 μ L 40% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 \times 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **1H NMR** (400,13 MHz, CD_3CN-d_3) δ 3,22 (m, 8H), 3,52 (m,

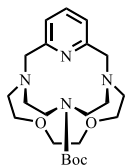
4H), 3,58 (m, 2H), 3,62 (m, 2H), 4,28 (s, 4H), 4,37 (s, 2H), 6,75 (s, 2H), 7,34 (m, 1H), 7,48 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,59 (d, $J = 7,9$, 2H), 7,76 (d, $J = 7,9$, 2H), 8,09 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H) ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $C_{29}H_{34}N_6O_7$ $[M+H]^+$ 579,2562; mért 579,2563; **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,72%; retenciós idő: 5,295 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 5.00 μ L; minta: 0,20 mg / 300 μ L 30% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μ m, 150 \times 4,60 mm; kolonna ID: 181147-3.

IX.5. A bifunkciós ligandum (38) kapcsolása anti-HER2 affitesttel

A konjugálás előtt az affitest vektor molekulát tartalmazó oldatot (2 mg/mL MQ-vízben) ditionitritollal (DTT) kezeltük a molekulák közötti diszulfidkötések redukciója érdekében. 2 mL vizes affitest oldatot (1 mg/mL) összekevertünk 60 μ L DTT oldattal (1,0 M-os MQ-vízzel frissen készült oldat) és 37 °C-on inkubáltuk 12 órán keresztül egy Eppendorf-csőben. Az oldatot ezután közvetlenül preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk, majd a $Z_{HER2:2891}$ -Cys fehérjét tartalmazó frakciókat egyesítettük és liofilizáltuk. Az affitest konjugációt 2 mg redukált $Z_{HER2:2891}$ -Cys affitest felhasználásával végeztük, amelyet 1 mL MQ-vízben oldottunk egy 1,5 mL-es HPLC-s mintatartó üvegben, majd 333 μ L 1,0 M-os ammónium-acetátot (pH = 5,5) és 60 μ L 20 mg/mL acetonitrilben oldott 3,9-PC2ABn^{pMA} (38) kelátort adtunk hozzá. A mintatartót argon gázzal töltöttük fel és 37 °C-on inkubáltuk 5 napon keresztül. A reakció előrehaladásáról offline ESI-MS technikával gyűjtöttünk információt. A közel teljes konverzió elérését követően a terméket (43) preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk, majd a konjugátumot tartalmazó frakciókat liofilizáltuk, amely a 3,9-PC2ABn^{pMA}-Cys-HER2-affitest (43) terméket eredményezte. **Preparatív HPLC:** UV-látható

detektálás: 220 és 280 nm; retenciós idő: 6,00 min; gradiens: 0,00→15,00 min 10→100% B; eluens: 0,1 TFA MQ-vízben (A) és 0,1% TFA acetonitrilben (B); áramlási sebesség: 6,60 mL/min; kolonna: Waters 300 Å, 5 µm XBridge Peptide BEH C18 OBD Prep (150 mm × 10,0 mm, 300 Å, 5 µm, Waters Inc., Milford, MA, USA). **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₃₄₆H₅₃₈N₉₄O₁₁₀S₂ [M+9H]⁹⁺ 871,4388; mért 871,4389; *m/z* számolt C₃₄₆H₅₃₈N₉₄O₁₁₀S₂ [M] 7833,8836; mért dekonvoluált 7833,8836. **HPLC** tisztaság (220 nm): 100%; retenciós idő: 5,939 min; gradiens: 0,00→15,00 min 10→100% B; eluens: 0,1% TFA MQ-vízben (A) és 0,1% TFA acetonitrilben (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; kolonna: Waters 300 Å, 5 µm XBridge Peptide BEH C18 OBD Column (4,60 mm × 150 mm, Waters Inc., Milford, MA, USA), kolonna ID: 01233824214601. **LCMS** (ESI+) *m/z* számolt C₃₄₆H₅₃₈N₉₄O₁₁₀S₂ [M+8H]⁸⁺ (100% telítettség) 980,7441; mért 980,7512; *m/z* számolt C₃₄₆H₅₃₈N₉₄O₁₁₀S₂ [M] 7837,8938; mért dekonvoluált 7838,7002.

IX.6. A kriptát típusú ligandumok szintézis leírása

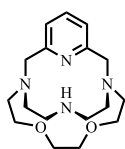


A 6-Boc-3,9-CB^{8O2}PC (39) előállítás: A 6-Boc-piklén (14) (*tert*-

butil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciklo-dekafán-6-karboxilát) alkilezését acetonitrilben, argon-atmoszféra alatt, nátrium-acetát trihidrát mint „gyenge” bázis jelenlétében végeztük. Feloldottunk 500 mg (1,632 mmol) 6-Boc-Pylen-t 500 mL acetonitrilben, majd hozzáadtunk 1450 mg (10,6 mmol) nátrium-acetát trihidrátot vizes oldatát (40 mL). A reakcióelegyet ezután 110 °C-os olajfürdőn melegítettük és erőteljes kevertetés közben 670 mg 1,2-bisz(2-jód-etoxi)-etánt (1,81 mmol) acetonitriles (100 mL) oldatát csepegtettük hozzá kb. 2 óra alatt. A reakcióelegyet további 48 órán keresztül forraltuk, ezt követően

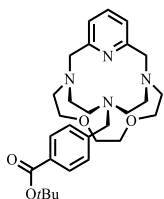
a reakcióelegyet visszahűtöttük és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk. A nyerterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottunk, az egyesített tiszta terméket (**39**) tartalmazó frakciók liofilizálásával 300 mg enyhén sárga olajat izoláltuk (43,7 %-os kitermelés).

Preparatív HPLC: UV-látható tetektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 5,85 min; gradiens: 0.00→8,00 min 0→43% B; eluens: 5 mM-os TFA MQ-vízben (A) és metanol (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 330,00 μ L; minta: 670 mg / 3,00 mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 x 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (500,13 MHz, CD₃CN) δ 1,47 (s, 9H), 2,96 - 4,89 (m, 12H), 7,53 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 8,03 (t, $J = 7,7$, 1H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (125,77 MHz, CD₃CN) δ 28,48, 47,99, 54,40, 55,21, 57,91, 63,60, 70,46, 84,31, 124,12, 141,67, 150,11 ppm; UHRMS (ESI+) m/z számolt C₂₂H₃₆N₄O₄ [M+H]⁺ 421,2809; mért 421,2806; **HPLC** tisztaság (260 nm): 97,00%; retenciós idő: 7,122 min; gradiens: 0,00→15,00 min 0→90% B; eluensek: 5 mM-os TFA MQ-vízben (A) és metanol (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; minta: 1,00 mg/mL vízben; kolonna: YMCbasic C18 100 Å, 3 μ m, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: BA99S03-1546WT.



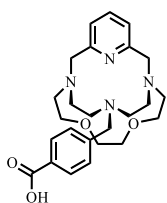
A 3,9-CB^{8O2}PC (40) előállítás: Feloldottunk 300 mg (0,713 mmol) **6-Boc-3,9-CB^{8O2}PC (39)** 15,0 mL diklórometánban, majd erőteljes kevertetés közben 7,0 mL trifluoecetsavat csepegtettünk hozzá 0 °C-on. A reakcióelegyet hagytuk szobahőmérsékletre melegedni és további 18 órán keresztül kevertettük. Az oldószer csökkentett nyomáson történő eltávolítását követően megkaptuk a nyerterméket, amelyet preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottunk. A tiszta terméket tartalmazó frakciókat liofilizálásával 201 mg (88%-os kitermelés) enyhén sárgás olajat (**40**) kaptunk.

Preparatív HPLC: UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 6,36 min; gradiens: 0,00→10,00 min 0→15% B; eluens: 5 mM-os TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 400,00 μ L; minta: 228 mg / 600 μ L H₂O; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 x 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (500,13 MHz, CD₃CN) δ 2,73 (m, 2H), 3,11 – 3,21 (m, 5H), 3,27 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 3,47 (m, 2H), 3,57 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 4,24 (d, J = 16,8 Hz, 2H), 4,33 (d, J = 16,8 Hz, 2H), 7,27 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,82 (t, J = 7,7 Hz, 1H); **¹³C-JMOD NMR** (125,77 MHz, CD₃CN) δ 45,64 53,43, 56,43, 56,73, 59,74, 67,33, 70,08, 122,17, 139,82, 156,87, ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt C₁₇H₂₈N₄O₂ [M+H]⁺ 321,2285; mért 321,2281; **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,75%; retenciós idő: 2,809 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95% B; eluenst: 5 mM TFA MQ-vízben(A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 10,00 μ L; minta: 0,90 mg/mL vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 3 μ m, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H20-260762.



A **3,9-CB⁸⁰²PCBn^pCO₂tBu (41)** előállításához 100 mg (0,312 mmol) **3,9-CB⁸⁰²PC (40)** acetonitriles (15 mL) oldatához, 178 mg (1,29 mmol) kálium-karbonátot adtunk szobahőmérsékleten argon-atmoszféra alatt. A reakcióelegyet 60 °C-ra melegítettük, majd 80 mg (0,295 mmol) *tert*-butil-4-(brómmetil)benzoát acetonitriles (8 mL) oldatát hozzácsepegtettük kb. 30 perc alatt. A reakciót tovább kevertettük 80 °C-on 24 órán keresztül, ezt követően szobahőmérsékletre hűtöttük és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk. Az így kapott nyersterméket preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottuk. A tiszta **41**-es terméket tartalmazó frakciókat liofilizáltuk és fehér

port kaptunk (83 mg, 52%-os kitermelés). **Preparatív HPLC:** UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 7,06 min; gradiens: 0,00→19,00 min 5→95% B; eluens: 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektálási térfogat: 450,00 μ L; minta: 160 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 μ m, 250 \times 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **^1H NMR** (500,13 MHz, CD_3CN) δ 1,57 (s, 9H), 2,57 (m, 2H), 3,00 (d, $J = 15,1$ Hz 2H), 3,46 – 3,63 (m, 12H), 3,78 (m, 6H), 3,97 (s, 2H), 4,65 (m, 2H), 4,90 (m, 2H), 7,49 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H), 7,52 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 7,98 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H), 8,02 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H) ppm; **^{13}C -JMOD NMR** (125,77 MHz, CD_3CN) δ 28,34, 48,89, 54,41, 56,27, 57,40, 58,86, 63,73, 70,41, 82,09, 123,73, 130,29, 131,59, 132,91, 140,26, 141,32, 150,37, 166,15 ppm; **UHRMS** (ESI+) m/z számolt $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 511,3279; mért 511,3281. **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,88%; retenciós idő: 4,356 min; gradiens: 0,00→7,50 min 5→95 %B; eluens: of 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 5,00 μ L; minta: 1,08 mg/mL 50% ACN vízben; kolonna: Waters XBridge Shield RP18 130 Å, 2,5 μ m, 75 \times 4,60 mm; kolonna ID: 01193505914502.



A 3,9-CB⁸⁰²PCBn^pCO₂H (42) előállítás: Feloldottunk 80 mg (0,157 mmol) **3,9-CB⁸⁰²PCBn^pCO₂tBu (41)** 15,0 mL diklórmetánban, majd erőteljes kevertetés közben 7,0 mL trifluorecetsavat csepegtettünk hozzá 0 °C-on. A reakcióelegyet hagytuk szobahőmérsékletre melegedni és további 24 órán keresztül kevertettük. Az oldószer csökkentett nyomáson történő eltávolítását követően megkaptuk a nyersterméket, amelyet preparatív RP-HPLC-s technikával tisztítottunk. A tiszta terméket tartalmazó frakciókat

liofilizálásával 56 mg (79%-os kitermelés) enyhén sárgás olajat (**43**) kaptunk. **Preparatív HPLC**: UV-látható detektálás: 210 és 260 nm; retenciós idő: 4,80 min; gradiens: 0,00→15,00 min 5→95% B; eluens: 5 mM-os TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 25,00 mL/min; injektált térfogat: 750,00 µL; minta: 70 mg/mL H₂O; kolonna: Phenomenex Luna Prep C18(2) 100 Å, 5 µm, 250 x 21,20 mm; kolonna ID: H18-268346. **¹H NMR** (500,13 MHz, CD₃CN) δ 2,56 (m, 2H), 2,99 (ddd, *J* = 15,2, 6,6, 3,4 Hz, 1H), 3,48 - 3,62 (m, 12H), 3,78 - 3,83 (m, 6H), 3,96 (s, 2H), 4,65 (m, *J* = 15,1 Hz, 2H), 4,89 (m, *J* = 15,1 Hz, 2H), 7,36 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,50 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,99 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 8,02 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H) ppm; **¹³C-JMOD NMR** (125,77 MHz, CD₃CN) δ 48,90, 54,44, 56,21, 57,45, 58,87, 63,57, 70,31, 123,62, 130,50, 131,38, 132,28, 140,16, 141,19, 150,25, 168,16 ppm; **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₂₅H₃₄N₄O₄ [M+H]⁺ 455,2653; mért 455,2652; **HPLC** tisztaság (260 nm): 98,17%; retenciós idő: 2,363 min; gradiens: 0,00→7,50 min 5→95 %B; eluens: of 5 mM TFA MQ-vízben (A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 5,00 µL; minta: 0,70 mg/mL vízben; kolonna: Waters XBridge Shield RP18 130 Å, 2,5 µm, 75 × 4,60 mm; kolonna ID: 01193505914502.

IX.7. Mn(II)-komplexek szintézis leírása

A Mn(II)-ionnal pH = 7,4-en gyorsan komplexet képző ligandumokból a komplexeket *in situ* állítottuk elő (összeméréssel) a vizsgálatokhoz pufferrendszer alkalmazásával.

IX.7.1. [Mn(3,9-CB^{8O2}PCBn^{pCO₂H})]⁺ szintézis leírása

A 3,9-CB^{8O2}PCBn^{pCO₂H} (**42**) ligandum Mn(II)-ionnal pH = 7,4-en nagyon lassan képez komplexet a relaxometriás képződés kinetika alapján 37 °C-on, ami azt mutatta, hogy 209 nap alatt érné el a 99%-os komplexálódást. Így a

Mn(II)-komplexet vizes oldatban ugyan, de 90 °C-on, inert atmoszféra alatt készítettük el, puffer rendszer helyett, NaOH-oldatot használva pH-t állításhoz. (A térfogatokat analitikai mérlegen kalibráltuk.) Egy nyomás és hőálló csavaros tetejű GC-s mintatartó üvegbe bemértünk 498,4 µL 0,02505 M-os **3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H}** (42) ligandumoldatot és hozzáadtuk a pH-potenciometriás titrálási adatok alapján számolt, a ligandum savtartalmának semlegesítéséhez szükséges NaOH-oldat egy részét (168,9 µL 0,1743 M). Majd N₂-atmoszféra alatt, erőteljes kevertetés mellett két részletben annyi MnCl₂-oldatot (242,9 µL 0,04882 M) adtuk hozzá, hogy a minta 5%-os ligandumfelesleg tartalmazzon. Ezt követően a reakcióelegyet 90 °C-on, zárt rendszerben, N₂-atmoszféra alatt kevertettük 18 órán keresztül. Analitikai RP-HPLC-s technikával követtük a reakció előrehaladását. Az idő előrehaladtával a komplexképződés eredményeként a pH csökkent amit kis mennyiségű (20 - 0,5 µL) NaOH-oldatot adagolásával (N₂-atmoszféra alatt) kompenzáltunk, majd az elegyet tovább kevertettük 90 °C-on, 7-8 órát. Ezt addig ismételtük míg nem tapasztaltunk további átalakulást NaOH-oldat hozzáadására és/vagy 90 °C-on kevertetésre. Összesen +71,0 µL NaOH-oldatot (0,1743 M) adtunk a reakcióelegyet és 3 - 4 napot melegítettük. Így 0,01207 M koncentrációjú **[Mn(3,9-CB⁸⁰²PCBn^{pCO₂H})]⁺**-oldatot készítettünk. **UHRMS** (ESI+) *m/z* számolt C₂₅H₃₄N₄O₄Mn²⁺ [M+H]²⁺ 254,5975; mért 254,5969; számolt C₂₅H₃₃N₄O₄Mn⁺ [M]⁺ 508,1877; mért 508,1879; **HPLC** tisztaság (235 nm): 100%; retenció idő: 3,270 min; gradiens: 0,00→7,50 min 5→95% B; eluenst: 5 mM TFA MQ-vízben(A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 5,00 µL; minta: 0,05 mg/mL vízben; kolonna: Waters XBridge Shield RP18 130 Å, 2,5 µm, 75 × 4,60 mm; kolonna ID: 01193500713109.

IX.7.2. $[Mn(3,9-CB^{802}PC)]^{2+}$ szintézis leírása

A **3,9-CB⁸⁰²PC (40)** ligandum a Mn(II)-ionnal pH = 7,4-en már gyorsabban képez komplexet a relaxometriás képződési kinetikai vizsgálat alapján, ami azt mutatta, hogy 25 °C-on 25 - 30 óra alatt végbemegy a reakció. Így a Mn-komplexet vizes oldatban 25 °C-on, inert atmoszféra alatt készítettük el, szintén puffer rendszer helyett, NaOH-oldatot használva pH-t állításhoz. (A térfogatokat analitikai mérleggen kalibráltuk.) Egy csavaros tetejű mintatartó üvegbe bemértünk 457 µL MQ-vizet, hozzáadtunk 445 µL 0,01125 M-os **3,9-CB⁸⁰²PC (40)** ligandum oldatot. Majd N₂-atmoszféra alatt, erőteljes kevertetés mellett hozzáadtuk annyi MnCl₂-oldatot (89 µL 0,05069 M), hogy 0,8%-os ligandum-felesleg maradjon. Az oldat pH-ját pH = 5,537-re (pH = 3,802-ről) állítottuk pontos koncentrációjú NaOH-oldattal. Ezt követően 25 °C-on, zárt rendszerben, N₂-atmoszféra alatt kevertettük 2 napon keresztül. Analitikai RP-HPLC-s technikával követtük a reakció előrehaladását. További kis mennyiségű NaOH-oldatot adagoltunk, N₂-atmoszféra alatt az oldathoz, majd újból kevertettük 1-2 napot. Ezt addig ismételtük míg nem tapasztaltunk további átalakulást NaOH-oldat hozzáadására és/vagy kevertetésre. Összességében így 7 napot vett igénybe a reakció. Így 0,004967 M koncentrációjú $[Mn(3,9-CB^{802}PC)]^{2+}$ -oldatot készítettünk. UHRMS (ESI+) *m/z* számolt C₁₇H₂₈N₄O₂Mn [M]²⁺ 187,5791; mért 187,5792; HPLC tisztaság (260 nm): 96,86%; retenciós idő: 4,392 min; gradiens: 0,00→9,00 min 5→40% B; eluenst: 5 mM TFA MQ-vízben(A) és acetonitril (B); áramlási sebesség: 1,00 mL/min; injektált térfogat: 30,00 µL; minta: 0,50 mg/mL vízben; kolonna: Phenomenex Luna C18(2) 100 Å, 5 µm, 150 × 4,60 mm; kolonna ID: H21-212012.

IX.7.3. [Mn(3,6-PC2A)] szintézis leírása

A **3,6-PC2A (19)** (21 mg, 48,6 μmol) oldatát ultratiszta H_2O -ban (5 ml) 1 M-os KOH oldattal $\text{pH} = 7,1$ -re állítottuk be. Ehhez az oldathoz $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -t (35 mg, 97,3 μmol , 2 ekvivalens) oldatot adtunk, aminek a hatására a pH -t 3,1-re csökkent. A pH -t 0,1 M-os KOH oldattal visszaállítottuk $\text{pH} = 7,2$ -re, majd a reakcióelegyet 2,5 napig refluxáltatva kevertettük. Ezt követően az oldószert szárazra pároltuk, és a maradékhoz metanolt (HPLC minőségű) adtunk. A visszamaradt szilárd anyagot szűrtük és többször mostuk metanollal. A szűrletet szárazra pároltuk, és a felesleges sók eltávolítása érdekében még kétszer visszaoldottuk metanollal. A végső szűrletet szárazra párlásával halványsárga olajként kaptunk meg a **[Mn(3,6-PC2A)]** (18 mg, 100%-os kitermelés) komplexet.

UHRMS (ESI+) m/z számolt $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{MnN}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 375,0859; mért 375,0858.