

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Nagy Gábor

Témavezető: Dr. Trencsényi György



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019

**^{44}Sc és ^{68}Ga radioizotópokkal jelölt radiotracerok
biodisztribúciójának vizsgálata *in vivo* kísérletes tumorok esetén
kisállat képzőeszközökkel**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az nukleáris medicina tudományágban

Írta: Nagy Gábor, okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori
Iskolája (experimentális és klinikai onkológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Trencsényi György

A Doktori Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
Tagok: Dr. Juhász Béla, PhD
Dr. Györke Tamás, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Képzőeszköz
Intézet, Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszék, tárgyalóterem
2019. augusztus 26. , 11 óra

A Védési Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
Bírálok: Prof. Dr. Nagy Noémi, az MTA doktora
Prof. Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora
Tagok: Dr. Juhász Béla, PhD
Dr. Györke Tamás, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati
Intézet, „A” épület, tanterem
2019. augusztus 26. , 13 óra

1. Bevezetés

Az elmúlt 30 évben a pozitron emissziós tomográfia (PET) a világ számos területén, így hazánkban is az egyik legfontosabb *in vivo* orvosi diagnosztikai képképző eljárásává nőtte ki magát. Ennek köszönhetően folyamatos kutatás folyik a nem konvencionális PET radioizotópok területén.

Ilyen radioizotóp például a ^{68}Ga és a ^{44}Sc , amelyek közül a ^{68}Ga felhasználásával már a 2000-es évek vége óta számos preklinikai és klinikai kísérlet is sikeresen lezajlott, míg a ^{44}Sc az elmúlt 5 évben került a figyelem középpontjába. Míg a $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ esetén igen széles kelátor-paletta áll rendelkezésre, addig a munkám kezdetén ugyanez nem volt elmondható a ^{44}Sc radioizotópról. A konvencionális kelátorokon kívül ígéretesnek tűnnek az AAZTA alapú kelátorok, amelyeknek a gadolíniummal alkotott komplexeit már MRI kontrasztanyagként alkalmazták. Szkandium komplexéről kevés, míg ^{44}Sc -jelölt származékáról egyáltalán nem volt fellelhető adat.

Ennek többek közt az is lehet az oka, hogy egy új radiofém-kelátor rendszer esetén kézi jelölések útján időigényes a jelölési körülmények optimumának a feltérképezése. Ezen segíthetnek a mikrofluid, vagy kapilláris rendszerek, amelyek a kis folyadéktérfogatok, a gyorsaság és az automatizálhatóság révén segítséget nyújthatnak ezen a területen. Továbbá, ha úgynevezett „scale-up” átalakítást hajtunk végre, akkor biológiai vizsgálatokhoz szükséges térfogatú és aktivitású radiofarmakonok is előállíthatóak a segítségével.

Ezen radiofarmakonok egy jelentős része valamilyen daganatos elváltozás diagnózisában, vagy terápiájában játszik fontos szerepet. Mivel a rákos megbetegedések esetén az áttétek kialakulása nagy arányban vezet a daganatos betegek halálához, így a metasztatikus folyamatok mélyrehatóbb megismerése kritikussá vált. A metasztázisok létrejöttének az egyik fő oka a tumorban kialakuló hipoxia, ami minden – egy bizonyos méretet meghaladó – szolid tumor egyik közös jellemzője. Ez szoros összefüggésben van az angiogenezis folyamatával, amely a lokális hipoxiás területek környezetében rendre kialakul, lehetővé téve ezen hatások közvetett vizsgálatát. Az $\alpha_v\beta_3$ integrin a daganatos szövetek vérereiben fokozottan expresszálódik, aminek a vizsgálatára alkalmasak az RGD alapú peptid-radiotrészerek.

Egy igen agresszívnek tartott daganatos megbetegedés a malignus melanoma, amely a kiemelkedő metasztatikus potenciáljának köszönhetően magas halálozási arányt okoz a világ számos területén. A jelentős áttétképzési tulajdonsága miatt a korai detektálása létfontosságú a betegek túlélési arányának a növelése érdekében. Ennek köszönhetően számos radioizotóppal jelölt α -melanocita stimuláló hormon (α -MSH) analóg peptid, antitest és melanin specifikus molekula került tesztelésre. A NAPamid és származékai specifikusan kötődnek a melanin pozitív tumorokban, illetve a melanoma metasztázisok több mint 80 %-ban fokozottan expresszálódó melanokortin-1 receptorokhoz (MC1-R).

2. Célkitűzések

A leírtak alapján a doktori munkám során a fő célunk az volt, hogy a PET képalkotás területén az egyik leginkább kutatott radionuklid, a ^{44}Sc előállítását, jelölhetőségét és különböző biológiai molekulákkal képzett trészereinek a tulajdonságait vizsgáljuk, mind kémiailag, mind biológiailag. Ehhez a bevezetésben részletezett témákat érintve a következő feladatok elvégzését tűztük ki célul:

^{44}Sc előállítási módok vizsgálata és összehasonlítása

Az első célunk egy, a kémiai vizsgálatokhoz és a tájékozódó biológiai mérésekhez elegendő aktivitású ^{44}Sc radioizotópot termelő $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátor építése és tesztelése volt. Ezen túl fontosnak tartottuk azt is, hogy a nagyobb aktivitást igénylő vizsgálatokhoz szükséges ciklotronban előállított ^{44}Sc jelölési tulajdonságait összehasonlítsuk az izotópgenerátorban termelttel.

Optimalizációs reakciók kivitelezése kapilláris rendszer segítségével

A következő célunk egy kapilláris rendszer felépítése volt, amely segítségével a radiokémiai jelölési reakciók a manuális jelzésekhez képest gyorsabban és megbízhatóbban végezhetőek el a jelölési körülmények változtatásai mellett. Ennek segítségével különböző „referencia” kelátorok jelölését és az eredmények összehasonlítását terveztük elvégezni $^{44}\text{Sc(III)}$ és $^{68}\text{Ga(III)}$ felhasználásával.

A ^{44}Sc -AAZTA kémiai és biológiai vizsgálata

Vizsgálni kívántunk egy, az előzetes információk alapján a szkandiummal történő komplexképzésre alkalmas, a nukleáris medicina területén új kelátornak számító molekula, az AAZTA jelölési körülményeit. Majd a kapott adatok tükrében terveztük a kelátor és a radiofém felhasználását biológiai markerek (c(RGDfK), BSA) jelölésére és *in vivo* PET/MRI nyomon követésére.

^{68}Ga - és ^{44}Sc -jelölt melanoma markerek összehasonlítása

Ezen túl a metasztázisok képzésére hajlamos malignus melanomát terveztük vizsgálni ^{68}Ga - és ^{44}Sc - jelölt DOTA-NAPamid felhasználásával. Különös figyelemmel kísérve az *in vivo* PET/MRI mérések során jelentkező biodisztribúciós eltéréseket, amelyeket a molekulában lévő két radioizotópok eltérése okozhat.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A ^{44}Sc radioizotóp előállítási módszerei és azok összehasonlítása

Az izotópgenerátor töltése idején csupán Filosofov és mtsai. rendelkeztek irodalomban közölt $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ radioizotóp-generátorral, így az általuk leírt módon végzetük el a tisztítási lépéseket és a betöltést. Kiemelendő különbség, hogy az általunk alkalmazott generátor

kiindulási aktivitása 3 MBq , míg a Filosofov-féle generátoré 185 MBq volt.

Először megtisztítottuk a ^{44}Ti anyaelemet AG 50W X8 kationcserélő gyantával töltött kolonnán, amit a felvitelt követően víz, növekvő koncentrációjú u.p. HCl és oxálsavas oldat segítségével mostunk. Az eközben szedett legaktívabb frakciókkal végeztük a második tisztítási lépést. A generátorba történő betöltéshez az itt szedett, $^{44}\text{Ti(IV)}$ radiofém-iont tartalmazó frakciókat szárazra pároltuk, majd feloldottuk 0,1 M-os oxálsav oldatban, amit felvittünk egy kondicionált AG 1-X8 anioncserélővel töltött kolonnára. Az elkészült rendszerről a $^{44}\text{Sc(III)}$ radiofém-iont 0,07 M-os u.p. HCl/0,005 M oxálsav segítségével szelektíven eluáltuk, ami egyben a végső eluálászer összetétel is lett. A $^{44}\text{Ti(IV)}$ kimosódást folyamatosan monitoroztuk, így láttuk, hogy megközelítőleg 60 elúció után jelentősebb mennyiségű anyaelem távozott a generátorból, így az újratöltés mellett döntöttünk. Ehhez liofilizáltuk az elúciók során gyűjtött frakciókat, majd az így nyert kis térfogatú $^{44}\text{Ti(IV)}$ tartalmú oldatot és a generátorról leoldott teljes $^{44}\text{Ti(IV)}$ mennyiséget felvittük az új AG 1X-8 anioncserélő gyantára. A folyamat végeztével feltöltöttük az oszlopot a maradék inaktív gyantával és lezártuk a generátort. Innentől kezdve meghatározott alkalmanként SPECT/CT segítségével követtük az anyaelem mozgását az állófázison.

A ^{44}Sc ciklotronban történő előállításánál során az Orvosi Képző Intézetrel működünk közre és a segítségükkel tudunk nagyobb aktivitásokkal (200-400 MBq) dolgozni. A besugárzás során természetes izotópösszetételű kalciumot használtak, amit hidraulikus

préssel pasztillává sajtoltak. A légköri nyomáson lévő céltárgy besugárzása $30 \mu\text{A}$ áramerősség mellett 30-60 percig tartott. Az alumínium korongba préselt fém Ca-ot (^{44}Sc) 3 M-os HCl oldat segítségével oldottunk fel. A fémmentesítéséhez DGA állófázist és eltérő töménységű u.p. HCl oldatot, HNO_3 oldatot és vizet használtunk. A jelölésre alkalmas magasabb aktivitáskoncentrációjú eluátum 0,1 M-os HCl oldatban állt elő.

Az izotópgenerátoros és ciklotronos ^{44}Sc jelölési hatásfokát és egyben a szennyezők fémionok relatív mennyiségét DOTA jelölésekkel hasonlítottuk össze. Ehhez csökkenő koncentrációjú ($30\text{-}0,01 \mu\text{M}$) DOTA jelzéseket hajtottunk végre $\text{pH} = 4$, NH_4OAc pufferben, 15 perces reakcióidővel és $95 \text{ }^\circ\text{C}$ -on.

3.2. ^{44}Sc és ^{68}Ga izotópokkal végzett jelzések kapilláris rendszer segítségével

A rendszer alapját három HPLC szelep alkotja, amelyek teflon kapillárisokon keresztül kapcsolódnak. A vezérlésért egy Arduino Mega kártya felelős, míg a folyadékmozgatást egy dupla-fecskendővel ellátott fecskendőpumpa végzi, amelynek segítségével a megfelelő folyadékok összeinjektálhatóak egy fűthető PEEK reaktorba. A reaktorból kikerülő reakcióelegy közvetlenül (on-line) kerül egy analitikai kolonnára, ahol az elválasztás történik. Ehhez egy UPLC rendszert és a hozzá kapcsolt radioaktivitás detektort alkalmaztunk.

Az reprodukálhatóság és a szinkronizált folyadékmozgatás ellenőrzéséhez és beállításához acetofenon és fenil-etanol oldatokat

alkalmaztunk. Az egymást követő injektálások során az UV (220 nm) kromatogramokon kapott csúcsok területének szórását és arányát vizsgáltuk. A két injektálás közötti keresztszennyezés csökkentését a mosófolyadék összetételének a változtatásával és a mosási ciklus idejének növelésével értük el.

A beállított rendszer segítségével $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ és funkcionizálatlan kelátorok optimalizációs jelzéseit hajtottunk végre. A reakciókhoz a ^{44}Sc izotópgenerátort használtuk, úgy, hogy az eluátumot AG 50W-X8 kationcserélő töltet segítségével tisztítottuk és töményítettük. A jelölések során a rendszer 20-20 μl puffertelt ^{44}Sc oldatot és kelátort (DOTA, NOTA, NOPO) tartalmazó oldatot (200 - 0,6 μM) szívott fel. Ebből injektált 10-10 μl -t a 95 °C-ra fűtött, 25 μl -es PEEK reaktorba, ahol a keverék 5 percet tartózkodott, majd a reakcióidő leteltével egyenesen a kolonnára került analitikai elválasztás céljából.

A funkcionizálatlan és a funkcionizált kelátoros jelzések eredményei gyakran térnek el a funkcionizálásból adódó kémiai változások miatt. Ezért a kelátorok maleimid származékaival (DOTA/DOTA-GA/NOTA/NODA-GA-Maleimid) is elvégeztük az optimalizálást. A jelzési reakciók során eltérő pH és kelátor koncentrációk esetén vizsgáltuk a radiokémiai tisztaságot és radiokémiai hozamot.

Az optimalizálást követően az ideális körülményeket használva léptéknövelt, a biológiai vizsgálatokhoz megfelelő aktivitású és mennyiségű terméket adó jelölést végeztünk el. Ehhez a reaktor térfogatát 200 μl -re, a felszívott reagensek térfogatát pedig 150-150 μl -re növeltük. A jelöléshez mindkét esetben a Strata SCX oszlopról eluált,

NH₄OAc pufferelt oldatokat, illetve a 0,002 mg/ml koncentrációjú NODA-GA-c(RGDfK) jelölhető peptidet használtunk. A reakcióelegy 95 °C-on, 15 percet töltött a reaktorban, majd a reakció befejeztével a rendszer egy analitikai kolonnára injektálta. 30 másodpercenként frakciókat szedtünk, így preparatív módon, kis térfogatban választottuk el a terméket, amit N₂ gázáram alatt 60 °C-on szárazra pároltuk, majd feloldottuk 200 µl PBS-ben. A kapilláris rendszer hatékonyságának megítélése végett ugyanilyen körülmények alkalmazása mellett manuális jelöléseket is hajtottunk végre.

3.3. AAZTA kelátorral és származékaival végzett kémiai kísérletek

Először a ⁴⁴Sc-AAZTA jelölési körülményeinek az optimalizálását végeztük el és hasonlítottuk össze a párhuzamosan futó ⁴⁴Sc-DOTA jelölésekkel. A körülmények optimalizálása során a megfelelő paraméterek (pH, kelátor konc., reakcióhőmérséklet, reakcióidő) változásának a hatásait vizsgáltuk a radiokémiai tisztaságra (RCP) nézve. A RCP értéket minden esetben HPLC segítségével követtük. Először a pH (1-9) hatását térképeztük fel eltérő kelátor koncentrációk (0,1-100 µM) esetén. Az optimalizáláshoz 90 µl pufferelt, ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc generátorból nyert ⁴⁴Sc(III) oldathoz adtunk 10 µl kelátor oldatot (1-1000 µM) és 5 percig 95 °C-on inkubáltuk. A hőmérséklet hatásának a vizsgálatához 0,1 µM kelátor koncentrációt alkalmaztunk 25-90 °C hőmérséklet tartományban. A reakcióidő vizsgálatához is 0,1 µM kelátor koncentrációt alkalmaztunk 25 °C-on.

A stabilitásmérésekhez szükséges ^{44}Sc -AAZTA előállítását az előzőekben már leírt módon végeztük $10\ \mu\text{M}$ kelátor koncentráció mellett. A kész terméket 1:1 arányban elegyítettük $100\ \mu\text{l}$ egér plazmával és $37\ ^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. $10\ \mu\text{l}$ térfogatú mintákat vettünk 0, 1, 2, 4, 8 és 12 óra elteltével és a radiokémiai tisztaságukat az előzőekben már leírt kromatográfiai körülmények között vizsgáltuk.

A kelátoros vizsgálatokat követően peptidhez (c(RGDfK)) és fehérjéhez (BSA) kapcsolva teszteltük a kelátor jelölhetőségét, amely során az első lépés a funkcionizált származékok szintézise volt. Az AAZTA-C9-c(RGDfK) előállításához AAZTA-C9-(tBu)₄ kapcsolható kelátort kapcsolunk a c(RGDfK) peptidhez. Ehhez DMF-ben oldottuk a reagenseket, majd a kapcsolást HBTU és DIPEA jelenlétében hajtottuk végre. A tisztítást követően az előálló AAZTA-C9-(tBu)₄-c(RGDfK) védett termékről TFA segítségével távolítottuk el a védőcsoportokat. A preparatív HPLC tisztítás előtt háromszor ismételt TFA-ecetsav cserét és szárazra párlást hajtottunk végre.

Az AAZTA-BSA előállítása három lépésben valósult meg. Első lépésben előállítottuk az AAZTA-(tBu)₄-TFP-t. Ennek során AAZTA-(tBu)₄ és TFP száraz DCM-os keverékéhez DCC-t adtunk, miközben az elegyet $0\ ^\circ\text{C}$ -on tartottuk, majd szobahőmérsékleten reagáltattuk egy napig. A szűrést követően a töményített szűrletet gravitációs kromatográfia segítségével tisztítottuk szilikagéllal töltött kolonnán. A második lépésben a keletkező AAZTA-(tBu)₄-TFP-ről eltávolítottuk a védőcsoportokat TFA és szobahőmérsékleten történő 2 napos kevertetés segítségével. A bepárolt és C18 Sep-Pak-on tisztított AAZTA-TFP-t DMF-ben oldottuk, majd hozzáadtuk a BSA-t tartalmazó borát-pufferelt

0,9 %-os NaCl oldathoz. Az egy napos, szobahőmérsékleten történő kevertetést követően G25 gélszűrőn tisztítottuk, megkapva az AAZTA-BSA terméket.

Az elkészült kelátorral kapcsolt származékok jelölését és *in vivo* vizsgálatát végeztük el, ahol mindkét esetben a $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátor használtuk. A ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) előállításához 200 μl NH_4OAc pufferelt $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ oldatot használtuk, amihez hozzáadtuk az AAZTA-C9-c(RGDfK)-t (10 μl ; 1 mg/ml), majd 95 °C-on, 15 percig reagáltattuk. A nyersterméket egy kondicionált Strata X tölteten tisztítottuk, majd az etanolos eluátumot szárazra pároltuk. A terméket 200 μl PBS segítségével foldottuk, és *in vivo* vizsgálatokhoz felhasználtuk.

A ^{44}Sc -AAZTA-C9-BSA előállításánál szintén 200 μl NH_4OAc pufferelt $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ oldathoz került az AAZTA-C9-BSA oldat. Az elegyet 40 °C-on 60 percig reagáltattuk, majd a nyersterméket gélszűrő segítségével tisztítottuk. A termék tisztaságát HPLC segítségével határoztuk meg.

3.4. A $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -DOTA-NAPamiddal végzett kémiai kísérletek

A biológiai vizsgálatokhoz használt ^{68}Ga -DOTA-NAPamid előállításához $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátort frakcionálтан eluáltuk, majd a legaktívabb frakció egy adott részletéhez pipettáztunk NH_4OAc puffert (0,5 M, pH=4), illetve 5 μl 1 mg/ml-es DOTA-NAPamid oldatot és

15 percig inkubáltuk 95 °C-on. A reakcióidő lejártával az elegyet egy kondicionált Strata X tölteten tisztítottuk. A terméket 200 µl PBS-ben feloldottuk és a radiokémiai tisztaságát HPLC segítségével ellenőriztük.

A ^{44}Sc -DOTA-NAPamid jelöléshez ciklotronban előállított ^{44}Sc -ot alkalmaztunk. A tisztítás után kapott $^{44}\text{Sc(III)}$ oldathoz adtuk az NH_4OAc puffert és a DOTA-NAPamidot, hasonlóan a fentebb leírtakhoz. A reakciókörülmények, a tisztítás és az analitikai elválasztás is ugyanúgy zajlott, mint a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid esetén.

A logP meghatározásához a már leírt módon állítottuk elő a $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid termékoldatot, majd ebből pipettáztunk fix mennyiségeket 1-oktanol és víz 1:1 arányú keverékéhez. A kétfázisú rendszert 10 percig rázattuk és 5 percig centrifugáltuk, majd mintát vettünk a fázisokból és meghatároztuk az aktivitásukat gammaszámláló segítségével.

A stabilitás vizsgálatához $^{68}\text{Ga}/^{44}\text{Sc}$ -DOTA-NAPamid termékoldatot adtunk egér plazmához, Na_2EDTA oldathoz és oxálsav oldathoz. A keletkező oldatokat 37 °C-ra inkubáltuk, majd a minták radiokémiai tisztaságát 0, 30, 60 és 120 perc elteltével ellenőriztük.

3.5. Az *in vitro* vizsgálatok során alkalmazott módszerek

A melanoma tumort célzó *in vitro* vizsgálatokhoz használt B16-F10 és A375 sejtek DMEM médiumban növekedtek, kiegészítve 10 %-os FBS szérummal, 1 %-os nem esszenciális aminosavakat tartalmazó oldattal és 1 %-os MEM vitamin oldattal. Az angiogenikus vizsgálatok alapjául szolgáló 4T1 sejteket RPMI-1640 típusú + 10 % FBS

médiumban tenyésztettük. Minden sejtvonal tenyésztése során 5 % CO₂, 37 °C körülményeket alkalmaztunk. Az *in vitro* kísérletekhez, valamint a daganatok indukciójához a sejteket a fagyasztásból történő felvétel után 6-8 passzálást követően használtuk fel. A sejtek életképessége minden esetben 90 % fölött volt, melyet trypan kék kizárásos teszttel ellenőriztünk.

Az melanoma *in vitro* kötődési vizsgálatokhoz a B16-F10 sejteket 24-lyukú lemezen tenyésztettük 24 órán keresztül, majd különböző koncentrációban (20-3200 nM) ⁴⁴Sc/⁶⁸Ga-DOTA-NAPamid radiotrészert adtunk hozzá. 60 perc inkubálási idő után a médiumot eltávolítottuk, a sejteket mostuk PBS és glicin segítségével, majd NaOH hozzáadásával 10 percig, 37 °C-on lizáltuk. A minták radioaktivitását gamma számlálóval mértük.

A trészert felvételi vizsgálatokhoz a B16-F10 és A375 sejteket a tripszinnel történő felvételt követően centrifugáltuk, majd újraszuszpendáltuk glükózt tartalmazó PBS oldatban, majd 37 °C-on 10 percig inkubáltuk. Ezt követően ⁴⁴Sc/⁶⁸Ga-DOTA-NAPamid radiotrészert adtunk a mintákhoz, majd 37 °C-on 30, 60 és 90 percig inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltével, PBS oldattal mostuk és szuszpendáltuk, majd a minták radioaktivitását gamma számlálóval mértük. A radiofarmakon felvétel bomlás korrigált értékét ID % értékben adunk meg. A megjelenített eredmények legalább három független kísérlet ± SD adatait tartalmazzák.

3.6. Az *in vivo* vizsgálatok során alkalmazott módszerek

Az állatkísérletekhez 10-12 hetes felnőtt nőstény C57BL/6, BALB/c és CB17 SCID egereket használtunk. Az egereket steril körülmények között tartottunk IVC rendszerben állandó hőmérsékleten, páratartalommal és automatizált mesterséges megvilágítással. A kísérleti állatokat VRF1 típusú táppal etettük, valamint autoklávozott csapvízzel itattuk ad libitum. A kísérleteket az Európai Unió és a Magyarországi törvényeknek megfelelően a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának engedélyével (8/2016/DEMÁB) végeztük.

A kísérleti állatok daganatos sejtekkel történő injektálása minden esetben inhalációs altatásban történt. A szingenikus melanoma modellhez B16-F10 tumorsejtet injektáltuk C57BL/6 egerek bal váll területén a bőr alá. A xenograft melanoma modell létrehozásához az Melur daganatos sejteket injektáltuk SCID egerek bal váll régiójában a bőr alá. A szingenikus emlőtumor modell előállításához 4T1 sejtet injektáltuk BALB/c egerek bal váll területének bőre alá. Az *in vivo* kísérleteket a tumor sejtek injektálását követően 20 ± 2 nappal végeztük.

A kisállat képalkotó vizsgálatokat a Scanomed Kft. Transzlációs Kutató Központjának preklinikai laboratóriumában került sor. A kontroll és tumoros egereket a jelzett származékok injektálása és a vizsgálat alatt inhalációs altatógéppel altattuk. A PET vizsgálatokhoz megközelítőleg 15 MBq radiotrészert injektáltunk a laterális farki vénába.

A teljes test statikus PET vizsgálatokat a preklinikai PET/MRI készülékkel végeztük 60, 90 és 240 perccel a radiotrészerek injektálását

követően. A szövetek és szervek anatómiai lokalizációjának meghatározásához T1 súlyozott MRI felvételeket készítettünk.

A PET adatok rekonstrukcióját 3 dimenziós iteratív algoritmussal végeztük. A vizsgált területek aktivitás-koncentrációjának a meghatározásához manuálisan VOI-kat rajzoltunk, majd a 3D VOI-k alapján a SUVmin, SUVmax és SUVmean értékeket a szoftver automatikusan számolta.

A kontroll és a tumoros kísérleti állatokat az *in vivo* képalkotó vizsgálatok után túllattuk, a hasüreget, valamint a mellüreget megnyitottuk és a szívből vért vettünk, majd egy-egy darabot eltávolítottunk a vizsgálni kívánt szervekből az *ex vivo* vizsgálatokhoz. A minták tömegét és radioaktivitását lemértük és az végeredményt %ID/g szövet értékben fejeztük ki.

Az melanoma vizsgálatok során az *in vivo* blokkolós vizsgálatokhoz magas MC1-R expressziójú B16-F10 tumoros egereket használtunk, amelyekbe intravénásan $^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -jelzett DOTA-NAPamid radiotrészert és α -MSH blokkolót injektáltunk. Egy órával az injektálás után *in vivo* PET/MRI és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat végeztünk a fent leírt metodikák alapján.

4. Eredmények és megbeszélésük

A munkám négy fő kísérletsorozatból épült fel, amelyek együtt és külön-külön is kiértékelhetők, de közös pontjuk a ^{44}Sc radioizotóp, amelynek vizsgáltuk az eltérő előállítási módjait, különböző

kelátorokkal való reakcióit, illetve jelölt fehérje és peptid származékainak az *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* viselkedését. Ezen vizsgálatok során a következő új eredményekhez és következtetésekhez jutottunk:

1. Az első lépésben létrehoztunk egy $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátort, amelynek vizsgálatuk az elúciós tulajdonságait, a kinyerhető ^{44}Sc jelölési tulajdonságait, illetve az újratöltésének a metodikáját. Az eredményeinket összehasonlítottuk egy, az irodalomban már leírt hasonló $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátorral. A jelölőkészséget vizsgálva egyező eredményeket kaptunk, míg a elúció módjával kapcsolatban az irodalmi hivatkozással ellentétes következtetésre jutottunk. Ezen túl kimutattuk, hogy egy közreműködés keretén belül ciklotronban termelt ^{44}Sc jelölőkészsége jobb, mint a generátorból kinyertnek.
2. Sikeresen kifejlesztettünk egy kapilláris szintézis rendszert, amely segítségével rövid idő alatt, kevés veszteséggel és kis anyagmennyiségek felhasználásával radiokémiai optimalizációs jelölési reakciókat hajtottunk végre $^{68}\text{Ga(III)}$ és $^{44}\text{Sc(III)}$ radiofémionok és különböző kelátorok felhasználásával. Az optimalizációs méréseink során azt találtuk, hogy a $^{68}\text{Ga(III)}$ és $^{44}\text{Sc(III)}$ esetén is a DOTA-GA és a NODA-GA kelátorok voltak a legalkalmasabbak komplexképzésre a vizsgált molekulák közül.
3. A következő lépésben a nukleáris medicina területén új komplexképzőként szereplő AAZTA kelátorral végeztünk

kísérleteket. Hamar kiderült, hogy a ^{44}Sc -AAZTA rendszer túlszárnyalja az előző pontban említett kelátorok eredményeit. 95 °C-on, 5 perces reakcióidő, pH = 3-4 és igen alacsony AAZTA koncentráció (0,1 μM) mellett is 80%-ot meghaladó jelölési határfokot mutattunk ki. Ezen túl az egyik legértékesebb eredményünk, annak a bizonyítása volt, hogy a ^{44}Sc -AAZTA radiofém-kelátor rendszer lehetővé teszi a semleges pH-n és szobahőmérsékleten történő jelöléseket, ami új teret nyithat a pH és hőérzékeny molekulák, antitestek és fehérjék segítségével végzett képalkotásban és terápiában.

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

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

A kezdeti célkitűzésünket teljes mértékben sikerült megvalósítani, miszerint a Scanomed Kft. radiokémiai laboratóriumában hozunk létre egy $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátort. A kialakított rendszer a radiokémiai tesztelésekhez és optimalizálásokhoz, illetve tájékozódó biológiai vizsgálatokhoz elegendő aktivitást szolgáltatott, Magyarországon elsőként. A munkám kezdetén egyetlen irodalomban közölt hasonló izotópgenerátor volt, amit Filosofov és mtsai. írtak le, így a létrehozott rendszer elsőként szolgáltatott ^{44}Sc -ot Magyarországon. A legnagyobb különbség a két izotópgenerátort összehasonlítva az aktivitásban keresendő, mivel Filosofov és mtsai. egy 180 MBq-es generátort írtak le, míg mi egy 3 MBq-es izotópgenerátort építettünk. Részünkről ez egy tudatos lépés volt, hiszen a ^{44}Ti költséges előállítás miatt bizonyítani szeretettük volna, hogy egy hatvanszor kisebb aktivitású (és költségű) generátor segítségével is képesek vagyunk megfelelő vizsgálatok elvégzésére, amit e doktori értekezés keretein belül igazoltunk is.

A generátorral szerzett tapasztalatok megegyeztek a Filosofov-féle generátornál leírtakkal, a $^{44}\text{Ti(IV)}$ áttörés kivételével. A „direkt-reverz” elúciós módszerrel az első elúció során jelentősebb aktivitású (~ 0,3 MBq) $^{44}\text{Ti(IV)}$ anyaelem hagyta el a generátort, így ezzel felhagytunk, csak direkt módon eluáltuk a generátort. Ez valószínűleg annak tudható be, hogy a betöltés során a gyanta közvetlen tetejére adszorbeáltuk az anyaelemet, így a fordított elúció során jelentősebb mennyiség távozott, mint a generátor másik oldalán. Ezen túl az eluátum aktivitását minden alkalommal mértük, így nyomon tudtuk követni a generátor ^{44}Ti szintjét. Az ábrázolt pontokra illesztett egyenes

meredeksége megadta a generátor aktivitás csökkenésének a mértékét, amely nagyobb volt, mint ami a ^{44}Ti bomlásából adódna. Ez is megerősítette, hogy eluálható aktivitás csökkenése az anyaelem folyamatos deszorpciójából adódik. Mivel SPET/CT segítségével is tudtuk monitorozni a $^{44}\text{Ti(IV)}$ kedvezőtlen mozgását a gyantán, így megközelítőleg 50 elúciót követően újratöltöttük a generátort, úgy, hogy az új rendszerben az anyaelem már az oszlop közepén helyezkedjen el. Az új elrendezéssel is teszteltük a „direkt-reverz” elúciós technikát, de igen hamar kiderült a két modalitású képző módszer segítségével, hogy nem sikerült csökkenteni a hosszanti irányban történő „szétkenődést” és a $^{44}\text{Ti(IV)}$ kijutását a generátorból. Az első töltésnél használt 10 ml eluálószerhez képest 10-10 ml-t (direkt és reverz), vagyis összesen 20 ml-t használtunk egy elúciónál, ami okozhatta a gyorsabb deszorpciót. A megnövelt elúciós térfogattól függetlenül a hosszanti irányú diffúzió hatása mindkét kísérletünk során látható volt, amire a reverz elúció rásegített.

A generátorból kinyert és ciklotronban előállított ^{44}Sc összehasonlítása során elsőnek a radionuklid tisztaságot érdemes megemlíteni. A generátor esetén az egyetlen radionuklid szennyező a ^{44}Ti lehet, amely az állófázisról történő deszorpció révén juthat az eluátumba. Ennek mértéke megközelítőleg 0,03-0,21% volt, ami így 99,97-99,79%-os radionuklid tisztaságot eredményezett ^{44}Sc -ra nézve. Ez az érték megegyezik a Filosofov és mtsai. által tapasztaltakkal. Ezzel ellentétben a ciklotronban történő előállítás során 3 másik szkandium izotóp is termelődött ($^{44\text{m}}\text{Sc}$, ^{47}Sc , ^{48}Sc), amelyek ugyanazon elem révén kémiai módszerek segítségével nem elválaszthatók. A ciklotronnal

kapott minták radionuklidos tisztasága $94,19 \pm 1,35\%$ volt, ami korrelált az irodalomban található $95,7\%$ -os értékkel. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a generátorból származó ^{44}Sc radionuklidos tisztasága közel 5% -kal nagyobb, mint a ciklotronban termelt párjának.

Ezt követően a jelölőkészségről, vagyis az egyéb fémionokra nézett szennyezettségről gyűjtöttünk adatokat. Ehhez a Scanomed Kft. izotópgenerátorából származó, illetve a Debreceni Egyetem Orvosi Képző Intézetének ciklotronjában előállított és általunk feldolgozott ^{44}Sc mintákkal végeztük jelöléseket, amelyek eredményei jól korreláltak más közleményekben szereplő adatokkal. Így kijelenthető, hogy a ciklotronban termelt és tisztított ^{44}Sc segítségével egy nagyságrenddel kisebb kelátor koncentráció mellett is sikeres jelöléseket ($\text{RCP} > 90\%$) tudtunk végrehajtani, mint a generátorban termelt ^{44}Sc esetén. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a generátorból eluált oldat több fém szennyezőt tartalmaz, amik negatív hatással vannak a jelölésre. Mivel sokszor a legkisebb mérhető mennyiségű fém-szennyezők is nagyságrendekkel magasabb koncentrációban van jelen az oldatban, mint a radiofém, így „kompetitív” folyamatok mehetnek végbe, ami a radioaktív izotóp komplexálódását a háttérbe szoríthatja. A keltortól és a radiofémtől függően a jelzési reakciókat jellemzően a Zn^{2+} , Fe^{3+} és Cu^{2+} fémionok befolyásolhatják. Ezen fémionok ugyan csak ppm-es mennyiségben találhatóak meg az eluálószerekben, de az izotópgenerátor többszöri eluálása miatt ezek a szennyezők akkumulálódhatnak, majd később szennyezhetik az eluátumot. Ezen túl az $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ izotópgenerátor elúciós profilját vizsgálva láttuk, hogy a $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ „elnyúltan” mosható le a rendszerről, ami okozhatja a frakciók

eltérő a szennyező tartalmát. Ez a hatás valószínűleg mérsékelhető a generátorház hosszának a növelésével és a belső átmérő csökkentésével. A fémion szennyezők jelölésre gyakorolt hatása megegyezett az irodalomban közölt adatokkal, viszont a „direkt-reverz” elúció pozitív hatásáról ugyanez nem mondható el.

Az előálló izotópgenerátor előnye a ciklotronos előállításához képest a könnyű kezelhetőség, a költséghatékonyság és az aktivitás huzamosabb ideig történő biztosítása. Hátránya, hogy a fémszennyezők mennyiségének köszönhetően megközelítőleg egy nagyságrenddel nagyobb kelátor koncentráció szükséges ugyanolyan jelölési hatások eléréséhez, mint a ciklotronban előállított ^{44}Sc esetén.

4.2. A kapilláris rendszer segítségével nyert eredmények értelmezése és megbeszélése

A kapilláris rendszer megépítésénél a fő célunk az volt, hogy egy olyan berendezést hozzunk létre, amely segítségével gyorsan, kis térfogatban, jó reprodukálhatósággal tudunk kelátor optimalizálásokat, majd minimális átalakítással preparatív jelöléseket végrehajtani, úgy, hogy közben a HPLC analitikai vizsgálat on-line folyik. A kereskedelmi forgalomban lévő szintézis panelekkel és modulokkal összehasonlítva az egyik legfontosabb különbség a reakció-térfogat, amely miatt ezen rendszerek preklinikai alkalmazása limitált. A modulok általában 5-20 ml-es folyadékmozgatással, 10-20 ml-es végtérfogattal és igen jelentős ligandum felesleggel működnek. A rendszerünk esetén 10-10 μl összeinjektálásával optimalizációs, míg 100-100 μl összeinjektálásával

preparatív jelölési reakciókat tudunk kivitelezni. Ennek köszönhetően kis mennyiségű ligandum felhasználással, nagy aktivitáskoncentrációban és nagy specifikus aktivitás mellett áll elő a minőségellenőrzött termék.

A kapilláris rendszert használva, a megfelelő beállítások és finomhangolások végeztével elkezdtük a jelölési reakciók ismételhetőségének a vizsgálatát. Azt találtuk, hogy a RCP – Kelátor koncentráció görbék inflexiós pontjánál, ugyanazon elúcióból történő jelölések ismétlésével a relatív standard deviáció (RSD) 1-3 % volt, míg más napon, más elúcióból történő jelöléseket nézve ez az érték 10-30 %-ra nőtt. Ez azzal magyarázható, hogy az inflexiós pontnak megfelelő kelátor koncentráció mellett a rendszer érzékeny az izotópgenerátorokból kioldódó, változó mennyiségű fémion szennyezőkre. Fontos megjegyezni, hogy az inflexiós ponttól különböző kelátor koncentrációk esetén a szórás rendre 2 % alatti volt.

Ezt követően funkcionálizálatlan kelátorok jelölését végeztük el $^{44}\text{Sc(III)}$ felhasználásával. A három választott kelátor a DOTA, a NOTA és a NOPO volt. A kapott eredményeket egymással összehasonlítva azt láttuk, hogy a NOTA és a DOTA hasonló jelölhetőséget mutat, hiszen 3 μM -os kelátor koncentráció mellett megközelítőleg 90 %-os jelölési hozam volt elérhető. A NOPO esetében ugyanezen kelátor koncentráció mellett mindössze 20 %-os jelölési hatásfok volt megfigyelhető, amely további kelátor hozzáadására nem emelkedett, hanem telítésbe ment. A ^{68}Ga izotóppal történő összehasonlításhoz az irodalomban megtalálható jelölési eredményeket használtuk. Az adatokból kiderül, hogy a ^{68}Ga -DOTA és ^{68}Ga -NOTA megközelítőleg 5 μM -os kelátor koncentráció

mellett 90 %-os radiokémiai hozammal volt előállítható, míg ugyanezt az érték a ^{68}Ga -NOPO esetén akár $0,1 \mu\text{M}$ is lehet. Összehasonlítva a $^{44}\text{Sc(III)}$ -as eredményeinkkel kijelenthető, hogy a DOTA és a NOTA kelátorok hasonlóan jól jelölhetőek $^{44}\text{Sc(III)}$ radiofém-ionnal, mint a $^{68}\text{Ga(III)}$. Ezen túl azt is láttuk, hogy a NOPO nagyságrendekkel rosszabbul teljesített hasonló körülmények között, mint a többi kelátor. A NOPO alacsony jelölhetőségét a foszfinát-karok és a fémion között kialakuló nem kedvezményezett koordinatív kötés kialakulásával magyarázzuk.

A funkcionizálatlan kelátoros vizsgálatok kiegészítésre szorulnak, hiszen a radiofarmakonokban történő felhasználás során a bifunkciós kelátorok egyik – jellemzően – karboxil csoportját funkcionizálják, ami ennek hatására koordinatív kötés kialakítására alkalmatlanná válik. Ezért a következőekben a DOTA és NOTA kelátorok maleimid származékaival folytattuk a vizsgálatokat. A ^{68}Ga -mal történő jelöléseink során hasonló eredményeket kaptunk mind a négy kelátor származék esetén, amelyek megegyeztek az irodalomban található hasonlóan monofunkcionizált származékok eredményeivel. A $^{44}\text{Sc(III)}$ esetén elmondható, hogy a DOTA-GA-maleimid bizonyult a legjobbnak, míg a vártaknak megfelelően a NOTA-maleimid a legrosszabbnak. A vártakkal ellentétben a második legjobb a NODA-GA-maleimid volt, nem pedig a sejtett DOTA-maleimid. Ezen adatainkkal ellentmondanak a K. A. Domnanich és mtsai. által közölt eredmények, akik fordítva írták le a két kelátor egymáshoz viszonyított jelölhetőségét. A kísérletsorozatot a következő napon, megismételtük, de ugyanazokat a lefutású görbéket kaptuk. A K. A. Domnanich és

mtsai., illetve a mi eredményeink közötti eltérés két módon magyarázható. Az egyik a ligandum-hatás, ahol a kelátorhoz kapcsolt molekulák (egyszerű csoportok, peptidek, fehérjék, stb.) jelentős hatással vannak a komplexképző tulajdonságokra a szterikus gátlás és az elektroneloszlás megváltozása révén. Mi egy kismolekulával, a maleimiddel funkcionalizált kelátorokat vizsgáltuk, míg ők RGD és NOC peptidekkel kapcsolt rendszereket néztek. Az ilyen ligandumbeli eltérések már befolyásolhatják annyira a komplexképződést, hogy a leírt mértékű eltérések megfigyelhetőek legyenek. A másik lehetséges magyarázat a szennyező fémionok változó mennyiségéből adódik. K. A. Domnanich és mtsai. azt is kimutatták, hogy a ^{44}Sc -NODA-GA-RDG/NOC rendszer sokkal érzékenyebb a Cu^{2+} és Fe^{3+} szennyeződésekre, mint a ^{44}Sc -DOTA-RDG/NOC, így feltételezhetően szennyező fémionokban szegényebb körülményeket tudunk biztosítani, ami esetünkben növelte a NODA-GA-maleimid jelölhetőségét.

A fentebb leírt kelátor sorrend, illetve a részletezett okok miatt a ^{68}Ga -NODA-GA-c(RGDfK) preparatív jelzését hajtottunk végre a kapilláris rendszeren. Ehhez az összeinjektált folyadéktérfogatokat 10-10 μl -ről 100-100 μl -re növeltük hosszabb csövezés bekötésével, hogy a keletkező reakcióelegy térfogata ideális legyen preklinikai vizsgálatok elvégzésére. Mivel meglehetősen nagy irodalmi háttere van a ^{68}Ga -NODA-GA-c(RGDfK)-nak, így az eredményeinket összevetettük más kutatócsoportokéval. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a kapilláris rendszer akár több nagyságrenddel kevesebb ligandum felhasználásával képes üzemelni, mint egyes szintézismodulok. Egy

szintézispanelt, vagy kézi jelölést alkalmazva akár 10-20 μg peptid felhasználása is megtörténik, míg esetünkben ez az érték a 0,6 μg -ot is elérheti. Ezen túl a reakcióidő is kevesebb az általános 15-20 perchez képest, hiszen jellemzően 5-10 perc a reaktorban töltött idő. Esetünkben a teljes előállítás időtartama mindössze 30 perc, ami tartalmazza a folyadékok mozgatását, a reakcióidőt és a preparatív elválasztást.

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

A Bracco gyógyszergyár által rendelkezésünkre bocsátott AAZTA vizsgálatát először a funkcionizálatlan kelátoros mérések kivitelezésével kezdtük. Fontos kiemelni, hogy a méréssorozatban manuálisan végeztük a jelöléseket, nem pedig a kapilláris rendszer segítségével. Hogy összehasonlítási alapunk legyen nem csak a ^{44}Sc -AAZTA, hanem a ^{44}Sc -DOTA rendszer teljes jelölési optimalizálását elvégeztük. A kapott optimalizációs felületekből kiderült, hogy az AAZTA kiemelkedően jó kelátora a $^{44}\text{Sc(III)}$ -nak, hiszen igen széles pH tartományban képes alacsony kelátor koncentráció mellett is jó jelölési hatásfokot produkálni. Annak ellenére, hogy a DOTA egy alkalmas komplexképzője a $^{44}\text{Sc(III)}$ -nak az AAZTA-hoz képest szűkebb pH tartományba (2-4) jelölhető, illetve több, mint egy nagyságrenddel magasabb kelátor koncentráció mellett szolgáltat ugyanolyan jelölési hatásfokot. Kiemelendő, hogy az AAZTA segítségével képesek vagyunk szobahőmérsékleten és pH = 7 körül jó hozamú jelzéseket végrehajtani, ami nagyon ígéretes, hiszen lehetővé teszi hő- és pH-érzékeny vegyületek (egyes peptidek, fehérjék és antitestek) jelölését. A semleges pH-n történt jelölés főként az Sc(III) kedvező hidrolitikus tulajdonságának köszönhető, miszerint a fiziológiás körülmények között történő hidrolízise nagyobb pH-n kezdődik, mint a Ga(III) esetén. Az irodalomban található radioaktív fémion-kelátor párosok közül mindössze a ^{64}Cu -TETA, az ^{111}In -HBED és SHBED, a ^{89}Zr -DFO, illetve a ^{68}Ga -AAZTA és DATA komplexeknél beszélhetünk pH = 7 és

szobahőmérséklet esetén számottevő módon végbemenő jelölési reakciókról.

A kapott eredmények alapján PET/MRI segítségével megvizsgáltuk, hogy *in vivo* körülmények között milyen a biodisztribúciója a $^{44}\text{Sc(III)}$ -nak, a $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ -nak, illetve a peptid és fehérje származékainak egészséges állatokban. Az injektált $^{44}\text{Sc(III)}$ főleg a májon, míg $^{44}\text{Sc-AAZTA}$ a várt módon, igen gyorsan a veséken keresztül ürült ki és a vizeletben dúsult 90 perccel az injektálást követően. A $^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-c(RGDfK)}$ más RGD tartalmú radiotrészerekhez hasonlóan az epehólyagban, a belekben és a húgyhólyagban volt megtalálható. Ezt okozhatja az adott területek magasabb $\alpha_3\beta_1$ integrin expressziója, az anyag lipofilebb jellege, illetve a hepatobiliáris úton történő kiválasztódás. A 4T1 tumort hordozó BALB/c egérbe történő injektálást követően jelentősen magasabb halmozást láthattunk a tumorban, mint a környező szövetekben. A halmozás mértékét a tumor/izom arányában adtuk meg, aminek az értéke megközelítőleg 25 volt, ami más RGD alapú radiotrészerek ugyanezen értékéhez képest (1,8-12,8) kimagaslóan nagy.

A leírtak segítségével igazolni tudtuk, hogy az előállított $^{44}\text{Sc-AAZTA-C9-c(RGDfK)}$ hasonló, vagy jobb biodisztribúciós tulajdonságokkal rendelkezik, mint az irodalomban már közölt egyéb származékok. Ennek, a kiemelkedően magas tumor/izom aránynak, a jelöléshez szükséges alacsony ligandum mennyiségnek, illetve a ^{44}Sc kedvező 4 órás felezési idejének köszönhetően kecsegtető alternatívát kínálhat a jövőben.

A leírtakon kívül teszteltük a szobahőmérsékleten és 7-es pH-n végzett jelölés hatékonyságát, amit AAZTA-C9-BSA segítségével hajtottunk végre. A BSA és AAZTA-C9 kapcsolását követően jelöltük $^{44}\text{Sc}(\text{III})$ -at felhasználva a leírt körülmények között, majd egészséges egerbe injektáltuk és PET/MRI vizsgálatot végeztünk. Azért egészséges egeret használtunk, mivel az elsődleges célunk a ^{44}Sc -AAZTA-C9-BSA *in vivo* viselkedésének és biodisztribúciójának a vizsgálata volt. A vártaknak megfelelően az injektálást követően 90 perccel az aktivitás nagy része a szívben és a májban volt megfigyelhető.

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

Ezen fejezetben tárgyalt kísérletekhez rendre ciklotronban előállított ^{44}Sc -ot használtunk. A munkám ezen részének a célja az volt, hogy feltérképezzük az általunk újonnan előállított ^{44}Sc -DOTA-NAPamid radiotrészernek az MC1-R specifikusságát megfelelő melanoma állatmodellt használva. A ^{44}Sc -DOTA-NAPamid jelölést kidolgoztuk a ^{68}Ga -jelölt származék mintájára, aminek eredményeképpen rendre 99 % RCP feletti termékeket tudunk előállítani, melyeknek a specifikus aktivitása minden esetben 15 GBq/ μM felett volt. A ^{68}Ga -jelölt származékkal történő összehasonlítása során a nem bomláskorrigált radiokémiai hozam esetén látható az első eltérés (^{44}Sc -DOTA-NAPamide: 60-70 %; ^{68}Ga -DOTA-NAPamide: 80-86 %), hiszen a ciklotronban előállított ^{44}Sc tisztítása és töményítése egy extra lépés jelent a ^{68}Ga -DOTA-NAPamide

előállításához képest. A logP vizsgálatok eredményei (^{44}Sc -DOTA-NAPamide: -3,30; ^{68}Ga -DOTA-NAPamide: -3,50) alapján mindkét radiotrészert hidrofíll jellegű, így a vártaknak megfelelő volt, amikor a későbbi *in vivo* vizsgálatok során a vesén keresztül ürültek a szervezetből. Megemlítendő, hogy a logP értékek alapján a ^{44}Sc -jelölt molekula kis mértékben ugyan, de hidrofóbbabb jellegűt mutat. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a Ga^{3+} jellemzően oktaédres szerkezetű komplexeket alkot 6 koordinatív kötésen keresztül. Emiatt a DOTA-NAPamid összesen 7 donoratomja közül mindössze 6-hoz koordinálódik (4 gyűrűnitrogén és 2 deprotonált karboxil-kar), aminek köszönhetően egy karboxil-kar koordinátatlanul marad, illetve a komplex nem lesz töltéssemleges. A Sc(III) hajlamos 7, vagy akár 8 koordinációs kötés kialakítására is, aminek köszönhetően a harmadik karboxil-kar is koordinálódhat, így töltéssemlegessé és apolárosabb jellegűvé téve a teljes molekulát, különbséget okozva a logP értékekben.

Az Na_2EDTA -ban, oxálsavban és egér plazmában végzett stabilitásmérések azt mutatták, hogy a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid kinetikailag inertebb, hiszen 2 óra elteltével semmilyen RCP változás nem volt megfigyelhető. A ^{68}Ga (III)-at tartalmazó komplexet nézve a RCP értéke már 1 óra elteltével megközelítőleg 5 %-ot esett egér plazmában. A leírtak alapján kijelenthető, hogy hasonló, vagy jobb kémiai tulajdonságokkal bír a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid, illetve a ^{44}Sc megközelítőleg négyszeres felezési ideje is előnyhöz juttatják a ^{68}Ga -DOTA-NAPamiddel szemben.

Az MC1-R specificitást először receptor pozitív B16-F10 tumorsejteken vizsgáltuk *in vitro* körülmények között. A kötődéses vizsgálatok során azt találtuk, hogy megközelítőleg 1600 nM ($^{44}\text{Sc}/^{68}\text{Ga}$ -)DOTA-NAPamid koncentráció eléréséig gyorsan növekszik a teljes kötődés értéke ($\text{mol/sejt} \times 10^{-18}$), majd 3600 nM-t elérve a rendszer „steady state” állapotba kerül. Az általunk tapasztalt ígéretes eredményeket alátámasztották az irodalomban leírtak, miszerint több DOTA- α -MSH analóg közül a DOTA-NAPamid volt a legalkalmasabb MC1-R vizsgálatára, kimutatására. Ezen túl a specificitás további bizonyításához MC1-R negatív A375 melanoma sejtvonalakon is elvégeztük a méréseket, ahol a vártaknak megfelelően azt láttuk, hogy az MC1-R pozitív B16-F10 sejtek megközelítőleg 5-6-szoros % ID/106 sejt (0,8-1,0) értékeket adtak az A375 sejtekkel szemben.

A sejtes vizsgálatokat követően egészséges kontroll és tumort hordozó egerek segítségével vizsgáltuk mindkét anyag biodisztribúcióját. A PET/MRI képalkotással és az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok segítségével igazoltuk a vesén történő kiürülést, amit a magas vese felvétel bizonyított. Ezen túl alacsony felvétel volt megfigyelhető a mellkasi és hasüregi régiókban. A melanoma specificitás vizsgálatához használt α -MSH analógok segítségével a B10-F19 tumoroknál jelentősen magasabb halmozás érhető el, mint az A375 tumorok esetén, amit a mi eredményeink is megerősítettek. Ezen túlmenően a szubkután oltott B16-F10 tumor esetén a magas MC1-R expresszációknak köszönhetően kiváló kontraszt érhető el mindkét radiotrézser használatával. A két anyag összehasonlításánál kijelenthető, hogy ugyan kis mértékben, de a ^{44}Sc -

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

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

A leírtaknak a tükrében látható, hogy a ^{68}Ga -DOTA-NAPamid irodalmi eredményeit reprodukálni tudtuk, így megfelelő összehasonlítási alapot szolgáltatott a ^{44}Sc -DOTA-NAPamid vizsgálatához. Kijelenthető, hogy a ^{44}Sc -jelölt peptid rendelkezik a

⁶⁸Ga-jelölt származék és egyéb, az irodalomban közölt melanoma kimutatására alkalmas vegyületek MC1-R specificitásával. Ezen túlmenően az *in vivo* kinetikai inertsége és a PET/MRI képalkotás során kapott tumor/izom aránya kiemelkedő. Valamint az általunk előállított, jellemzett és *in vitro*, illetve *in vivo* körülmények között vizsgált ⁴⁴Sc-DOTA-NAPamid az első melanoma kimutatásra alkalmas ⁴⁴Sc(III) radiofém-iont tartalmazó PET radiotrészter.

5. Összefoglalás

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

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

Kifejlesztettünk egy radiokémiai jelölés-optimalizálást és gyártást segítő kapilláris rendszert, melynek köszönhetően gyorsan és reprodukálhatóan voltunk képesek bizonyos kelátorok $^{44}\text{Sc(III)}$ affinitását vizsgálni. Segítségével kiderült, hogy a $^{44}\text{Sc(III)}$ -mal történő komplexképzésre nem alkalmas a NOPO, illetve az egyszerűen funkcionális NOTA. A monofunkcionális DOTA, DOTA-GA és NODA-GA esetében biztató jelölhetőségi eredményeket kaptunk.

Ezt követően az AAZTA $^{44}\text{Sc(III)}$ -mal történő jelölhetőségének a vizsgálatait végeztük el. Azt találtuk, hogy kiemelkedően kis kelátor

koncentráció, illetve pH = 3-7 mellett magas radiokémiai hozam elérhető el. Ennek okán a ^{44}Sc -AAZTA-C9-c(RGDfK) és a ^{44}Sc -AAZTA-C9-BSA előállítását és *in vivo* vizsgálatát is elvégeztük, ahol a várt eredményeket kaptuk. Kiemelendő az ^{44}Sc -AAZTA rendszer azon tulajdonsága, hogy szobahőmérsékleten és semleges pH-n is érdemi jelölés hajtható vele végre, ami ígéretes fehérjék, antitestek és egyéb hő- és pH-érzékeny vegyületek radiotrészerként történő alkalmazásánál.

A szélesebb spektrum feltérképezéséhez az MC1-R specifikus ^{68}Ga -DOTA-NAPamid mintájára előállítottuk a ^{44}Sc -DOTA-NAPamidot, amit jellemeztünk és összehasonlítottunk más melanoma markerrel. Eredményül azt kaptuk, hogy az MC1-R specifikus α -MSH analógok közül kiemelkedően jó kémiai, illetve biodisztribúciós tulajdonságai vannak. Ezen túl hangsúlyozandó, hogy elsőnek állítottunk elő melanoma tumor kimutatására alkalmas ^{44}Sc -jelölt radiotrészert.

5. Függelék

Önállóan végzett munka:

- $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ generátor megépítés, tesztelése és használata az összehasonlító és jelölési kísérletekben
- Ciklotronban előállított ^{44}Sc feldolgozása, tisztítása, töményítése és használata az összehasonlító és jelölési kísérletekben
- A kapilláris rendszer inaktív tesztelése és beállítása, majd felhasználása kelátor összehasonlító reakciókhoz
- AAZTA kelátorral végzett optimalizációs jelölési reakciók megtervezése és kivitelezése
- AAZTA-C9-c(RGDfK) peptid és AAZTA-BSA kémiai szintézise és jelölésük $^{44}\text{Sc(III)}$ segítségével
- Forgalomban kapható DOTA-NAPamid jelzési reakcióinak kivitelezése
- Kísérlettervezés, eredmények feldolgozása és kiértékelése

Közreműködésben végzett munka:

- ^{44}Sc ciklotronban történő előállítása (Dr. Szikra Dezső)
- ^{44}Sc -csatorna létrehozása dóziskalibrátoron (Dr. Szabó Sándor, Dr. Forgács Attila)
- Kapilláris szintézis rendszer megépítése (Dr. Szikra Dezső)
- AAZTA rendelkezésünkre bocsátása (Dr. Baranyai Zsolt, Bracco)
- AAZTA-(tBu)₄-TFP szintézise (Dr. Fekete Anikó)
- *In vitro*, *ex vivo* és *in vivo* biológiai vizsgálatok kivitelezése (Dr. Trencsényi György, Nagy Tamás)



Nyilvántartási szám: DEENK/345/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, G.**, Szikra, D. P., Trencsényi, G., Fekete, A., Garai, I., Giani, A. M., Negri, R., Masciocchi, N., Maiocchi, A., Uggeri, F., Tóth, I., Aime, S., Giovenzana, G. B., Baranyai, Z.: AAZTA: an Ideal Chelating Agent for the Development of 44Sc PET Imaging Agents.
Angew. Chem.-Int. Edit. 56 (8), 2118-2122, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201611207>
IF: 12.102
2. **Nagy, G.**, Dénes, N., Kis, A., Péli-Szabó, J., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hajdu, I., Szikra, D. P., Trencsényi, G.: Preclinical evaluation of melanocortin-1 receptor (MC1-R) specific 68 Ga- and 44 Sc-labeled DOTA-NAPamide in melanoma imaging.
Eur. J. Pharm. Sci. 106, 336-344, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.026>
IF: 3.466





További közlemények

3. Trencsényi, G., Dénes, N., **Nagy, G.**, Kis, A., Vida, A., Farkas, F., Péli-Szabó, J., Kovács, T., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hunyadi, J., Kertész, I.: Comparative preclinical evaluation of 68Ga-NODAGA and 68Ga-HBED-CC conjugated procainamide in melanoma imaging. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 139, 54-64, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.049>
IF: 2.831
4. Kertész, I., Vida, A., **Nagy, G.**, Emri, M., Farkas, A., Kis, A., Angyal, J., Dénes, N., Péli-Szabó, J., Kovács, T., Bai, P., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Experimental Melanoma Tumors Using The Novel Radiotracer 68Ga-NODAGA-Procaïnamide (PCA). *J. Cancer.* 8 (5), 774-785, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.17550>
IF: 3.249
5. Garai, I., Barna, S., **Nagy, G.**, Forgács, A.: Limitations and pitfalls of 99mTc-EDDA/HYNIC-TOC (Tektrotyd) scintigraphy. *Nucl. Med. Rev. Cent. East Eur.* 19 (2), 93-98, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5603/NMR.2016.0019>
6. Trencsényi, G., Bakó, F., **Nagy, G.**, Kertai, P., Bánfalvi, G.: Methotrexate induced apoptotic and necrotic chromatin changes in rat myeloid leukemia cells. *Inflamm. Res.* 64 (3), 193-203, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-015-0797-x>
IF: 2.557

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 24,205

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

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

