



1949

**Fémkomplex alapú radiogyógyszerek szintézise, fizikai-kémiai,
radiokémiai jellemzése és preklinikai vizsgálata**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szűcs Dániel

témavezetők:

Dr. Fekete Anikó

Prof. Tóth Imre

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács

Kémiai 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, 20.

.....

Szűcs Dániel

Tanúsítom, hogy **Szűcs Dániel** doktorjelölt **2019- 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, 20..

.....

Dr. Fekete Anikó

Tanúsítom, hogy **Szűcs Dániel** doktorjelölt **2019- 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, 20..

.....

Prof. Tóth Imre

Fémkomplex alapú radiogyógyszerek szintézise, fizikai-kémiai, radiokémiai jellemzése és preklinikai vizsgálata

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a **Kémia** tudományágban

Írta: **Szűcs Dániel**, okleveles gyógyszerész

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

Témavezetők: Dr. Fekete Anikó
Prof. Tóth Imre

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2025.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm **Prof. Dr. Berényi Ervinnek**, a DE Orvosi Képalkotó Klinika Nukleáris Medicina igazgatójának, **Dr. Trencsényi Györgynek** a DE ÁOK Orvosi Képalkotó Intézet Nukleáris Medicina Tanszék vezetőjének és **Prof. Dr. Tircsó Gyulának** a DE TTK Fizikai Kémiai Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tették a PhD kutatómunkám elvégzését és az értekezésem elkészítését a Nukleáris Medicina- és a Fizikai Kémiai Tanszéken.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek **Dr. Fekete Anikónak** és **Prof. Dr. Tóth Imrénnek**, akik a munkám során mindvégig támogattak és szakmai tanácsokkal láttak el.

Köszönöm **Dr. Szikra Dezsőnek** a szakmai támogatásért és az izotópok előállításáért. **Dr. Péliné Szabó Juditnak**, **Nagy Tamásnak**, **Dr. Kis Adrienn-nek** a preklinikai vizsgálatok elvégzéséért. Köszönöm **Dr. Arató Viktória Zsófiának** a lutécium-177 izotópot. Külön köszönöm **Dr. Trencsényi Györgynek** a preklinikai felvételek kiértékelését. Köszönettel tartozom továbbá a Nukleáris Medicina munkatársainak, akik a munkájukkal és szakmai támogatásukkal segítettek a kutatómunkámat.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Csupász Tibornak** az NMR és fizikai kémiai mérésekben végzett munkájáért és **Lénárt Jánosnak** a szerves kémiai szintézisekért. Külön köszönöm **Prof. Dr. Tircsó Gyulának** a fizikai kémiai mérések kiértékelésében nyújtott segítségét. Továbbá köszönettel tartozom a Fizikai Kémiai Tanszék munkatársainak, akik a munkájukkal és szakmai támogatásukkal segítettek a kutatómunkámat.

Köszönöm **Dr. Gáspár Attilának** és a Scanomed Kft. munkatársainak, **Dr. Nagy Gábornak** és **Dr. Vágner Adrienn-nek** az MS mérések megvalósításáért.

Külön köszönet **Dr. Gyuricza Barbarának** és **Stefánné Dr. Dénes Noéminek**, akik segítséget nyújtottak a kutató munkám során és kellemes munkahelyi légkört teremtettek.

Hálával tartozom a feleségemnek **Dr. Szűcs-Virág Beatrixnak**, aki mellettem állt és támogatott a PhD munkám során. Végül de nem utolsó sorban köszönettel tartozom szüleimnek, családomnak és a barátaimnak, akikre bármikor számíthattam és a PhD képzésem során mindvégig támogattak.

Köszönöm a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítványának, hogy a Rövidtávú kutatás támogatás keretében finanszírozták a publikációim megjelenését és az NKFI K-128201 és K-134694 alap támogatását a kutatásom során.

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	1
2.	Bevezetés	4
3.	Irodalmi háttér.....	6
3.1	Hipoxia.....	6
3.2	Melanoma	8
3.2.1	Melanoma malignum kialakulása	8
3.2.2	A melanocortin 1 receptor (MC1R) és az α -melanocita stimuláló hormon (α -MSH).....	9
3.3	Orvosi képalkotó eljárások	10
3.3.1	Nukleáris medicina	10
3.3.2	Morfológiai képalkotó módszerek	18
3.4	Targetált radionuklid terápia.....	21
3.5	A kutatás során megvalósított radiogyógyszer fejlesztések háttére.....	26
3.5.1	Radiofém alapú radiofarmakonok szerkezete	26
3.5.2	Ligandumok	27
3.5.3	Polioxopalladát komplexek, mint fémkötő ligandumok.....	30
3.5.4	Tumorhipoxia detektálására alkalmazható radiofarmakonok.....	34
3.5.5	Malignus melanomában alkalmazható radiofarmakonok	38
3.5.6	Radiogyógyszerek farmakokinetikai tulajdonságainak módosítása albuminkötő egység beépítésével.....	41
4.	Eredmények	45
4.1	Célkitűzések.....	45
4.2	Hipoxia detektálására alkalmas radiofarmakonok előállítása és vizsgálata	46

4.2.1	[⁴⁴ Sc]Sc-DO3AM-NI szintézise, fizikai-kémiai, radiokémiai és biológiai vizsgálata.....	46
4.2.2	⁵² Mn- és ⁴⁴ Sc-jelzett PC2AM-NI és a PC2A-Ph-NI szintézise, fizikokémiai, radiokémiai és biológiai vizsgálata.....	62
4.2.2.1	A PC2AM-NI, a PC2A-Ph-NI és a PC2AM ^{nBu} komplexképzők szintézise	63
4.3	Radioaktív bizmut polioxopalladát komplexek előállítása és vizsgálata.....	85
4.4	Albuminkötő egység hatásának a vizsgálata ⁶⁸ Ga-, ^{205/206} Bi- és ¹⁷⁷ Lu-jelzett DOTA konjugált NAPamid-származékok farmakokinetikai tulajdonságaira	91
4.4.1	4-(p-jód-fenil)-butánsavat tartalmazó DOTA-NAPamid (24) szintézise ..	91
4.4.2	Radiokémiai vizsgálatok.....	92
4.4.3	Az előállított radiojelzett komplexek preklinikai vizsgálata	95
5.	Anyagok és módszerek	103
5.1	Kémiai szintézisek	104
5.2	Analitikai módszerek	104
5.2.1	A ligandumok és a Sc(III)-komplexek pH-potenciometriás vizsgálata ...	104
5.2.2	A Sc(III)-komplexek ¹ H és ⁴⁵ Sc-NMR mérései.....	105
5.2.3	A Sc-PC2AM ^{nBu} komplex disszociációjának vizsgálata UV-Vis spektrofotométerrel	105
5.2.4	A Mn-PC2AM-NI komplex fizikokémiai vizsgálata.....	106
5.3	Radiokémiai vizsgálatok.....	107
5.3.1	Radioizotópok előállítása és tisztítása	107
5.3.2	Prekurzorok radiojelzése és tisztítása	109
5.3.3	Szérumstabilitási teszt.....	111
5.3.4	Fémcsere vizsgálatok.....	111

5.3.5	Ligandumcsere vizsgálatok.....	112
5.3.6	Az előállított radiofarmakonok <i>logP</i> meghatározása.....	112
5.3.7	Polyoxopalladátok előállítása és vizsgálatai.....	112
5.4	Biológia kísérletek	113
5.4.1	Kísérleti állatok.....	113
5.4.2	Sejtvonalak.....	113
5.4.3	<i>In vivo</i> tumormodellek	114
5.4.4	<i>In vivo</i> pozitronemissziós tomográfia (PET) képalkotás	114
5.4.5	PET-adatértékelés	115
5.4.6	SPECT képalkotás és értékelés.....	115
5.4.7	<i>Ex vivo</i> szervi megoszlási kísérletek.....	115
5.4.8	Statisztikai elemzés	115
6.	Összefoglalás	116
7.	Summary	120
8.	Irodalomjegyzék	1
9.	Függelék.....	I
9.1	PC2AM-NI ligandum esszenciális fémionokkal alkotott komplexeinek fizikai-kémiai jellemzése.....	I
9.2	A kémiai szintézisek leírása.....	II
9.2.1	2-(2-nitroimidazol-1-il)-etil-DO3AM (6) előállítása.....	II
9.2.2	PC2AM ^{nBu} (14) szintézise.....	III
9.2.3	DOTA-IPB-NAPamid (24) szintézise	IV

1. Rövidítések jegyzéke

ACN	acetonitril
α -MSH	α -melanocita stimuláló hormon
AZZTA	6-Amino-6-metilperhidro-1,4-diazepintetraecetsav
BFC	bifunkciós kelátor
$[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$	$[[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{O}_{32}(\text{AsPh})_8]^{5-}$
$[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}_\text{N}$	$[[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{O}_{32}(\text{AsC}_6\text{H}_4\text{N}_3)_8]^{5-}$
$[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}_\text{C}$	$[[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{O}_{32}(\text{AsC}_6\text{H}_4\text{COO})_8]^{13-}$
$[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsPL}$	$[[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{15}\text{O}_{40}(\text{PPh})_{10}]^{7-}$
CT	komputer tomográfia
DIPEA	diizopropil-etilamin
DKM	diklórmétán
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetrai)tetraecetsav
DOTAGA	10-(1-karboxi-4-((4-izotiocianátobenzil)amino)-4-oxobutil)- 1,4,7,10- tetraazaciklododekán-1,4,7-triil)triecetsav
DTPA	dietilén-triamin-pentaecetsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EMA	Európai Gyógyszerügynökség
FDA	Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal, Egyesült Államok
GMP	jó gyártási gyakorlat
HBTU	Hexafluorofoszfát-benziltriazol-tetrametil-urónium
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HIF	hipoxia indukált faktor
iTLC	instant vékonyréteg kromatográfia
iTLC papír	szilikagéllel impregnált üveg mikroszálás kromatográfias papír

KB tumor	emberi eredetű epidermális karcinóma
L	fémkomplex liganduma
LET	lineáris energia transzfer
logP	oktanol-víz megoszlási hányados logaritmusa
M	fémkomplex központi fémionja (töltés jelzése nélkül)
MC1R	melanocortin 1 receptor
MMP	metalloproteáz
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
NFS	nefrogén szisztémás fibrózis
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
NOTA	1,4,7-triazaciklononán-1,4,7-triecetsav
PBS	foszfátpufferelt sóoldat
PCTA	3,6,9,15-tetraazabiciklo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trién-3,6,9-triecetsav
PEG	polietilénlikol
PET	pozitron emissziós tomográfia
pM	adott körülmények között a ligandum által nem koordinált fémion koncentrációjának negatív logaritmusa
POM	polioxometallát
POP	polioxopalladát
PSMA	prosztata specifikus membránantigén
Py	piridin
relaxivitás	az oldószer vízprotonok relaxációs sebességének növekedése a paramágneses anyag 1 mM oldatában a diamágneses környezethez képest
SCID egér	kombinált immunhiányos egér
SPE	szilárd fázisú extrakció
SPECT	egyfoton kibocsátásos komputer tomográfia

stabilitási állandó	$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]}$
stabilitási szorzat	$\beta_n^H = K_1^H \cdot K_2^H \cdot \dots \cdot K_n^H = [H_nL] / [L][H]^n$
SUV_{max}	maximális standardizált felvételi érték
SUV_{mean}	átlagos standardizált felvételi érték
T/M	tumor/izom arány
TFA	trifluorecetsav
TRAP	3,3',3''-(((1,4,7-triazonán-1,4,7-triil)tris(metilén))tris(hidroxifoszforil))tripropánsav
TRT	targetált radionuklid terápia

2. Bevezetés

A nukleáris medicina egy olyan, napjainkban dinamikusan fejlődő orvostudományi terület, amely molekuláris képalkotással és radioterápiával foglalkozik. Az alapjául szolgáló radioizotóp nyomjelzést Hevesy György dolgozta ki 1913-ban, melyért 1943-ban Nobel-díjjal jutalmazták. A nyomjelzés lényege, hogy ha egy molekulában kicserélünk egy atomot a radioaktív izotópjára, akkor a jelzett molekula kémiaiilag megegyezik az eredeti molekulával. Továbbá a jelzett molekulában lévő radioizotóp által kibocsátott radioaktív sugárzás detektálásával információt nyerhetünk kémiai reakciók végbemeneteléről, vagy az élőszervezetben lejátszódó különböző biológiai folyamatokról. Ez a felismerés új utat nyitott az orvosi diagnosztikában és lehetővé tette a molekuláris képalkotást.

Ezen az elven alapul a nukleáris medicina területén elterjedt két technika, az egyfoton-kibocsátásos komputer tomográfia (SPECT) és a pozitron emissziós tomográfia (PET). Ha ezeket a funkcionális képalkotó módszereket egy morfológiai képalkotó eljárással, például komputertomográfiával (CT), vagy mágnesesrezonancia képalkotással (MRI) egészítjük ki, akkor igen hatékony leképezés jön létre. Ezekkel a hibrid készülékekkel pontos diagnosztikai képet kaphatunk az élőszervezetben lejátszódó kóros folyamatokról, például a különböző tumorok és áttétjeik pontos helyéről, az adott betegség előrehaladottságáról. Ezen kívül alkalmazzák ezeket a képalkotó módszereket terápiás kezelések hatékonyságának a követésére is.

Napjainkban egyre több radiofarmakont fejlesztettek ki a különböző patológiás folyamatok azonosítására és ezeknek a radiojelzett vegyületeknek a száma exponenciálisan növekszik. A radiógyógyszerek előnyös tulajdonsága, hogy a vizsgálatok során kis anyagmennyiségben alkalmazzák őket, így nem váltanak ki farmakológiai hatást. A diagnosztikai fémizotóp alkalmazása mellett egyre népszerűbbek a terápiás fémizotópokat (pl.: lutécium-177, bizmut-213, aktínium-225) tartalmazó radiofarmakonok, melyek célzottan pusztítják el a tumoros sejteket.

2016-ban csatlakoztam az Orvosi Képző Intézet Nukleáris Medicina Tanszékén folyó azon kutatásokhoz, amelyek különböző fémkomplex alapú radiógyógyszerek kifejlesztésére és biológiai vizsgálatára irányulnak. Tudományos diákkörösként pozitron-sugárzó szkandium-44 és galium-68 izotópokkal jelölt PET radiofarmakonok szintézisét, radiokémiai és preklinikai vizsgálatát valósítottam meg. Majd 2019-től PhD hallgatóként bekapcsolódtam a Kémia Intézet Fizikai Kémiai Tanszékén folyó kutatómunkába is, ahol elsajátítottam az NMR mérések alapjait, valamint a makrociklusos ligandumok különböző fémionokkal képzett komplexeinek fizikai-kémiai jellemzését.

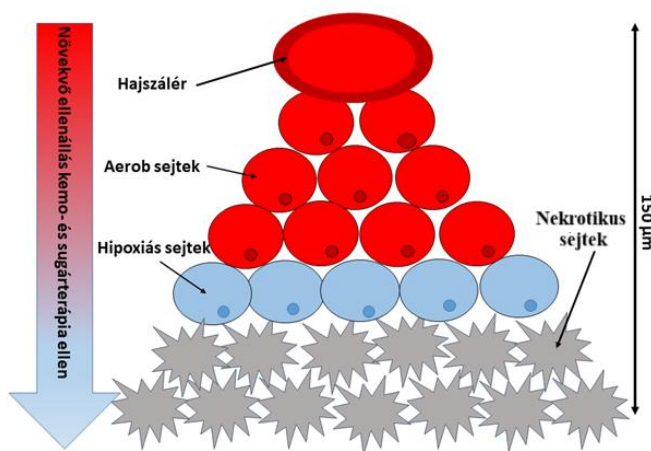
3. Irodalmi háttér

3.1 Hipoxia

A daganatos megbetegedések világszerte a leggyakoribb halálokok között szerepelnek. A tumorokat az egészséges sejtekből kialakult hibás működésű sejtek alkotják. A sejtek DNS-e különböző külső behatásokra megsérülhet, például UV-sugárzás, kémiai karcinogének, vagy a sejtosztódás során bekövetkező hibák miatt. A hibásan működő sejtek nagy részét a szervezet DNS-javító mechanizmusai kijavítják, vagy az immunrendszer elpusztítja. A javító mechanizmusokat és az immunrendszert kikerülő hibás sejtek alkotják a tumorszöveteket. A tumoros sejtek jellemző tulajdonsága, hogy nem csak a szervezet által adott jelzésre osztódnak, hanem folyamatosan és kontrollálatlanul. Továbbá olyan receptorokat expresszálnak, azaz helyeznek ki a sejtmembránjukra, amelyek miatt a szervezet és az immunrendszer egészséges sejteknek véli őket. Ezen kívül képesek kikapcsolni a programozott sejthalál, azaz apoptózis jelátviteli útvonalait is, ami szintén az ellenőrizetlen burjánzásukat segíti [1].

A túléléshez a tumoros sejteknek nagy mennyiségű tápanyagra és oxigénre van szükségük. Intenzív szaporodásuk, burjánzásuk során azonban egyre messzebb kerülnek a véráramtól, amely alacsony oxigénszintet, azaz hipoxiát okoz. Helmlinger és munkatársai [2] 1997-ben megállapították, hogy azok a sejtek hipoxiások, amelyek 70 μm -re, vagy ettől nagyobb távolságra kerülnek az artériás véráramtól. A 150 μm távolságban lévő sejtek pedig elhalnak az oxigén hiány következtében (1. ábra).

Az alacsony oxigénszint hatására olyan jelátviteli utak aktiválódnak, amelyek az érzépeződést serkentik. Ennek a folyamatnak egyik kulcsszereplője a hipoxia indukálta faktor (HIF). Az emberi szervezetben három HIF faktort azonosítottak, a HIF-1-et, a HIF-2-öt és a HIF-3-at. A tumoros sejtek többsége a HIF-1-t termeli, ami két részből áll, a HIF-1 α és a HIF-1 β alegységekből [3]. HIF-1 α alegység folyamatosan termelődik, de normoxiás körülmények között, azaz normális oxigenellátottság mellett gyorsan elbomlik.



1. ábra Hipoxiás sejtek keletkezése

Hipoxia esetén azonban a HIF-1 α stabilizálódik és összekapcsolódik a HIF-1 β alegységgel és létrejön az aktív HIF-1 transzkripciósfaktor. Az aktivált HIF-1 több olyan folyamatot indukál, amelyek segítik a tumoros sejtek túlélését, ezek között szerepel a tumor-érképződés aktiválása (például a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) expressziójának növekedése), a metabolizmus megváltozása, valamint a metasztázis kialakulása [4], [5], [6]. A tumor-érképződés során nem szabályos, hanem rendellenes erek képződnek, amelyek képesek egymásba fonódni, és ezért nem egyirányú véráram jellemző rájuk. Ezen kívül az ilyen erek falai vékonyak, könnyen kitágulnak, ezért nem folyik konzisztens véráram rajtuk. Ennek következménye, hogy ez az új érrendszer nem képes a megfelelő mennyiségű oxigén és tápanyag szállítására.

A tumorhipoxia detektálása azért fontos, mert a sejtek alacsony oxigenizáltsága jelentősen rontja a különböző rákellenes terápiák hatékonyságát [7]. Például a hipoxiás sejtek a normoxiásokhoz képest ellenállóbbak a sugárterápiával szemben, mert esetükben az oxigén sugárérzékenyítő hatása nem érvényesül. Továbbá a kemoterápiára is kevésbé érzékenyek, mert a citosztatikus molekulák a nem megfelelő érhalózat miatt alacsonyabb koncentrációban jutnak el a hipoxiás tumorsejtekhez, ezért kisebb mértékben tudják kifejteni rákellenes hatásukat. Ezen kívül megfigyelték még, hogy az oxigénhiány a P-glikoprotein megnövekedett expresszióját indukálja a tumoros sejtek sejtmembránján. A

P-glikoprotein egy membrán transzporter fehérje, ami a sejtbe bejutott különböző anyagokat, gyógyszereket visszapumpálja az extracelluláris térbe, és fokozott expressziója révén növeli a tumorsejt kemoterápiás szerek elleni rezisztanciáját [8].

Számos kemoterápia során alkalmazott gyógyszer (például a doxorubicin) úgy működik, hogy oxigén jelenlétében szabad gyököket hoz létre, amelyek károsítják a DNS-t. Ennek megfelelően alacsony oxigén szint esetén az ilyen típusú rákellenes gyógyszerek citotoxicitása csökken [8].

A fent leírtak alapján kijelenthetjük, hogy a tumor hipoxiás területeinek detektálása jelentősen segítheti a hatékony rákellenes terápia tervezését.

3.2 Melanoma

3.2.1 Melanoma malignum kialakulása

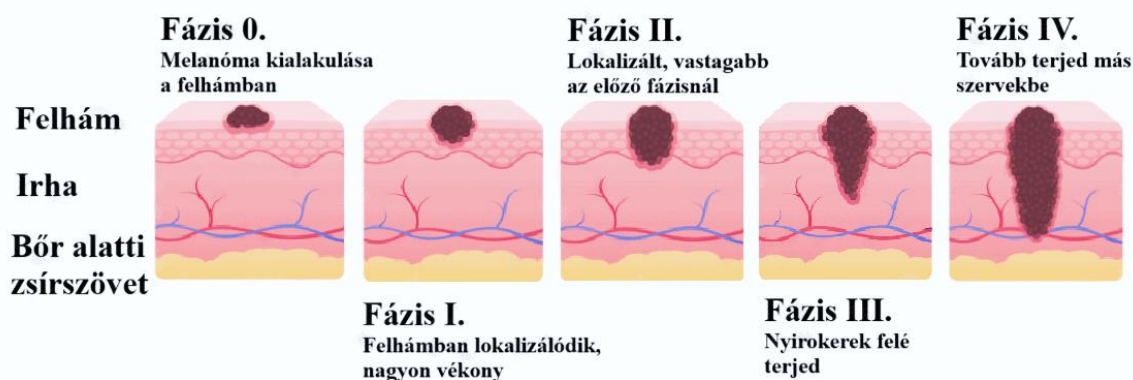
A bőr daganatos megbetegedéseit két nagy csoportra lehet osztani, a melanoma típusúra és a nem melanoma típusúra. Az első esetben a tumorok a hám legalsó rétegében található festéktermelő sejtekből, az úgynevezett melanocita sejtekből indulnak ki. Leggyakrabban a bőrben fordulnak elő, de megtalálhatók még a nyálkahártyákon, a szemben és az agy lágyburkában is. Melanocita sejtek melanint termelnek, amelynek három típusa van: eumelanin, feomelanin és a neuromelanin. Napsütéskor vagy szoláriumban az UV-sugarak hatására sérülés keletkezik a bőrben. Ennek hatására fokozódik az eumelanin termelődés, ami elnyeli az UV-sugárzás nagy részét és ennek következménye a bőr barnulása. Ilyenkor termelődik még feomelanin is, de ez kevésbé védi meg a bőrt a további UV-sugárzástól. A fehér bőrű embereknél több feomelanin, míg a sötét bőrűeknél több eumelanin termelődik, ezért a sötétebb bőrű embereknél kisebb eséllyel fordul elő a melanoma malignum [9].

A túlzott UV-sugárzás DNS törést okoz a melanocitákban, amely a sejtek hibás működéshez, azaz melanoma kialakulásához vezet. A melanomás megbetegedések előfordulása folyamatosan emelkedik és 2021-ben világviszonylatban átlépte már az évi 320000 beteg számot [10]. Ennek oka, hogy az elmúlt évtizedekben folyamatosan csökkent az ózon réteg vastagsága, így megnőtt a káros UV-sugarak mennyisége, ami növelte a megbetegedések előfordulását. További kockázati tényezők még a rossz

napozási szokások, amelyek napégést okoznak és jelentősen növelik a melanomás elváltozások számát különösen a fehér bőrűek körében. Ennek megfelelően a legtöbb megbetegedést Ausztráliában és az észak-európai lakosság körében jegyezték fel [10].

A melanoma korai felismerése nagyon fontos, mivel a tumoros sejtek először a bőr felső hámrétegében terjeszkednek, és csak később érik el az ér- és nyirokrendszert. Ezért időben észlelve a kóros elváltozást, lehetőség van a melanoma sebészi úton történő eltávolítására, mely a tumor és a körülötte lévő bőr 1-2 centiméteres kimetszését jelenti. Ilyen esetben a beteg teljes felépülése valószínűsíthető és a melanoma visszatérésének kockázata is 5% alatti. A melanoma malignum nagy mortalitása gyors növekedésével magyarázható. Továbbá azzal, hogy amikor eléri a bőrben lévő hajszálér- és nyirokrendszert, azután rövid idő alatt képes áttétet adni a különböző létfontosságú szervekbe, például a tüdőbe, a vesébe, az agyba és a májba. A melanomás beteg túlélési esélye a metasztázisok megjelenése után 20% alá csökken [11] (2. ábra).

Melanóma kialakulásának fázisai

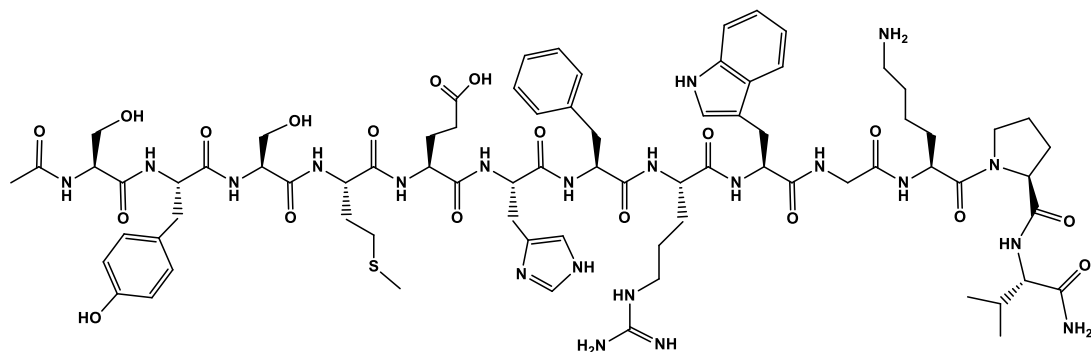


2. ábra Melanoma kialakulása

3.2.2 A melanocortin 1 receptor (MC1R) és az α -melanocita stimuláló hormon (α -MSH)

A melanocortin 1 receptor (MC1R) a melanin szintézis szabályozásában részt vevő receptor és melanociták sejtmembránján expresszálódik. Az MC1R egy G-fehérje

kapcsolt receptor, amely a sejten belüli jelátviteli útvonalakon keresztül számos folyamatot irányít, például a melanin termelődést, ami felelős a bőr- és a hajszínért. Számos közleményben számoltak már be arról, hogy a malignus melanomasejtek membránján a MC1R receptor kifejeződése nagymértékben megnő az egészséges sejtekhez képest [12]. Ennek a receptornak a nem szelektív, teljes agonistája az α -melanocita stimuláló hormon (α -MSH). Ez a peptid a melanocortin hormon család tagja, amelyek számos fiziológiai folyamatban vesznek részt, például hatással vannak a szexuális aktivitásra, az energia háztartásra, az éhségérzetre, valamint a tejtermelődésre [13]. Az α -MSH egy 13 aminosavból felépülő, lineáris szerkezetű peptid. (3. ábra) A biológiai felezési ideje körülbelül 3 perc, ami azt jelenti, hogy ennyi idő alatt a peptid mennyisége a vérben a felére csökken. Ezért önmagában alkalmatlan arra, hogy rákellenes gyógyszerként alkalmazzák [14, 15], ugyanakkor számos radiojelzett α -MSH analógot elterjedten használnak a melanoma kimutatására [15], ilyen peptid származék például a NAPamid [16].



3. ábra α -Melanocita stimuláló hormon (α -MSH) szerkezete

3.3 Orvosi képalkotó eljárások

3.3.1 Nukleáris medicina

Napjainkban egyre elterjedtebben alkalmazzák a molekuláris, másnéven funkcionális képalkotó eljárásokat a különböző betegségek diagnosztizálására, valamint előrehaladottságuk mértékének a megállapítására. A nukleáris medicina körébe tartoznak a nyílt sugárforrást használó különböző diagnosztikai és terápiás gyógyászati eljárások.

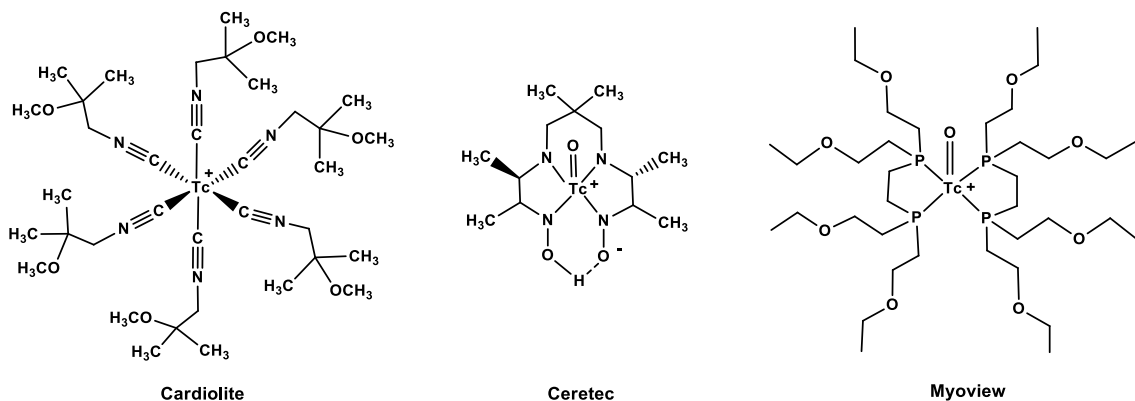
Ilyen diagnosztikai módszer az egyfotonos emissziós komputertomográfia (SPECT) és a pozitronemissziós tomográfia (PET) is. Jellemző rájuk, hogy kis mennyiségű radioaktív nyomjelző (radiógyógyszer) felhasználásával molekuláris képalkotást tesznek lehetővé. Ez azt jelenti, hogy ezekkel a diagnosztikai módszerekkel a különböző fiziológiai folyamatokat molekuláris szinten lehet tanulmányozni és észlelni az adott szövet, szerv működésében bekövetkezett változásokat. Ennek megfelelően ezeket a technikákat alkalmazva lehetőség nyílik a különböző betegségek korai diagnózisára az anatómiai változások megjelenése előtt. A morfológiai képalkotásra épülő eljárásokkal a szöveteket és szerveket tudjuk egymástól jól elkülöníteni, azaz pontos anatómiai információkat nyerhetünk velük. Ilyen diagnosztikai módszerek például az ultrahang, a komputertomográfia (CT) és a mágnesesrezonancia-képalkotás (MRI). A molekuláris képalkotó technikának a morfológiai képalkotó eljárással történő ötvözése hatékonyabb leképezést, azaz a betegség pontosabb lokalizációját teszi lehetővé.

3.3.1.1 Egyfotonos emissziós komputertomográfia (SPECT)

A SPECT képalkotás során a beteg szervezetébe gamma-sugárzó radioizotóppal jelzett radiógyógyszert juttatnak. Az izotóp bomlásakor alacsony energiájú gamma-fotonok (kb. 140 keV) keletkeznek, amelyeket a gammadetektor érzékel. A detektor a vizsgálandó test körül forog és eközben 3-6 fokonként adatokat gyűjt, majd a kapott kétdimenziós képeket számítógépes technikával háromdimenziós képpé alakítják át. Egy vizsgálat 15-20 percig tart és egy voxel éle 5-8 mm. A voxelek háromdimenziós megfelelői a pixeleknek. Napjainkban a SPECT technikát általában egy morfológiai képalkotó eljárással kombinálják, például CT-vel [17].

A nukleáris medicinában a leggyakrabban alkalmazott gamma-sugárzó radionuklid a technécium-99m. A ^{99m}Tc ideális kémiai és nukleáris tulajdonságokkal rendelkező radioizotóp. Nem toxikus a szervezetre nézve, radioaktív felezési ideje 6 óra, mely nem túl hosszú, így egy nap után a technécium-99m 94%-a lebomlik a szervezetben. Bomlása során ^{99}Tc képződik, miközben a SPECT-kamera számára ideális, 140 keV energiájú gamma-fotonok keletkeznek [18].

A technécium-99m izotópot $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -generátorból nyerik, amelyben ioncserélő oszlophoz kötött formában található az anyaelem, melynek bomlása során keletkezik a képalkotáshoz szükséges technécium-99m leányelem. A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ izotópot megfelelő eluálószerrel lehet elválasztani az anyaelemtől. A molibdén-99 anyaelemet hordozómentes formában urán hasadványból állítják elő és a $[\text{}^{99}\text{Mo}]\text{MoO}_4^-$ -ot savas alumíniumoxid gyantán kötik meg, ami bomlása során $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{-pertechnetát}$ alakul. A $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ -ot felhasználás előtt az ioncserélő oszlopról fiziológiás sóoldattal szelektíven tudják eluálni az anyaelem mellől. A $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátor kb. 2-3 hétig használható a molibdén-99 izotóp 66 órás felezési ideje miatt [19]. A radiokémiai jelzésekhez előre elkészített inaktív készleteket, úgy nevezett kiteket alkalmaznak. Perfúziós vizsgálatok során egyes esetekben a $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{-pertechnetát}$ fiziológiás sóoldatát közvetlenül is alkalmazzák, de különböző $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -komplexekkel is történhet a vizsgálat. Az utóbbi esetben ugyanis az alkalmazott komplexképzők megváltoztatják a technécium-99m perfúzióját a különböző szövetekben. Ilyen radiógyógyszerek például a teljesség igénye nélkül a Cardiolite (sestamibi), a Ceretec (exametazime) és a Myoview (tetrofosmin) (4. ábra).



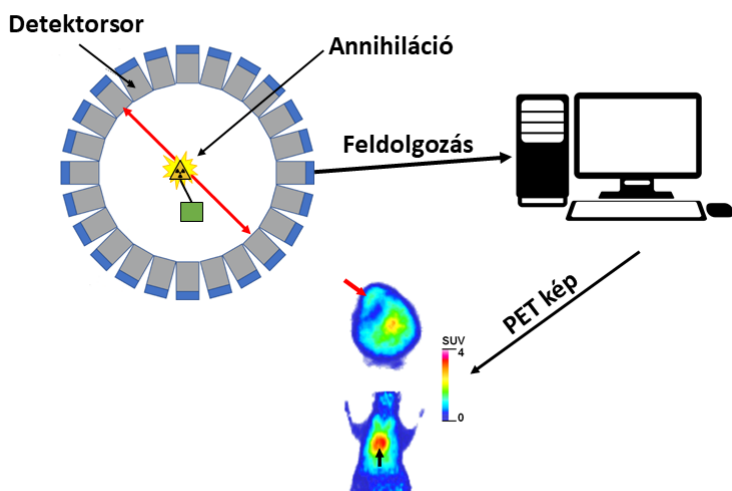
4. ábra Technécium-99m alapú radiofarmakonok szerkezete

A SPECT diagnosztikában elterjedten alkalmazzák még a jód-123 és az indium-111 izotópokkal jelzett vegyületeket. Ezek hosszabb felezési idejű izotópok ($t_{1/2} = 13$ óra, illetve $t_{1/2} = 67,9$ óra) és gamma-energiájuk is nagyobb ($E_\gamma = 159$ keV, illetve $E_\gamma = 172$ keV), mint a technécium-99m izotópé. A béta-sugárzó lutécium-177 radionuklidot (E_β

max = 497 keV (78.6%), 384 keV (9.1%) és 176 keV (12.2%)) elsősorban peptid receptor radionuklid terápiára (PRRT) használják, de mivel diagnosztikára alkalmas alacsony energiájú gamma fotonokkal is rendelkezik ($E_\gamma = 208$ keV (11.1%), 113 keV (6.6%), ezért SPECT képalkotás is lehetséges vele [20].

3.3.1.2 Pozitronemissziós tomográfia (PET)

Pozitronemissziós tomográfia a 1970-es évek óta létezik, működési elve (5. ábra) hasonlít a SPECT-hez, itt viszont pozitron-sugárzó radionuklid jelzett radiogyógyszerekkel történik a képalkotás. Az izotóp bomlása során keletkező pozitron részecske (β^+) amikor egy elektronnal találkozik, akkor kölcsönösen megsemmisítik egymást, ezt a folyamatot annihilációnak nevezünk és ennek során két egymással 180 fokos szöget bezáró, 511 keV energiájú foton képződik. A fotonokat a PET kamera érzékeli és kiszűri azokat a beütéseket, amelyek nem egy időben csapódnak be.



5. ábra PET képalkotás sematikus rajza

A PET technika a SPECT-hez képest nagyobb felbontást eredményez (3-6 mm). Felbontásban nagy szerepe van a pozitron energiájának, mert minél nagyobb ez az energia annál messzebb juthat a pozitron-részecske a bomlás helyszínétől, ami rontja a felbontást [21].

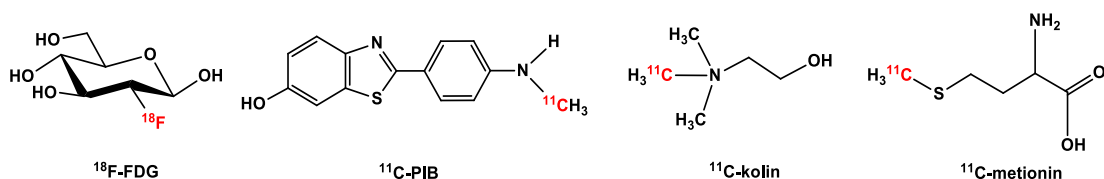
A PET alkalmazásában az igazi áttörés 2001-ben következett be, amikor a Ge Healthcare piacra bocsájtott egy kombinált PET/CT készüléket. Ennek a hibrid technikának az a nagy előnye, hogy a PET által detektált patológiás elváltozás pontos helyét könnyen meg lehet állapítani a CT képalkotás segítségével, mivel ugyanabban a testhelyzetben és időpontban készül a sejtek, szövetek működési, funkcionális tulajdonságait megjelenítő PET kép, valamint a pontos anatómiai viszonyokat ábrázoló CT felvétel. Később 2010-ben került kereskedelmi forgalomba egy a Siemens Healthcare által kifejlesztett PET/MRI készülék, ami a PET molekuláris képalkotást az MRI morfológiai leképezéssel ötvözi [22, 23]. A PET/MRI technika nem szorította ki a PET/CT eljárást, de mivel lényegesen kisebb sugárterheléssel jár, ezért gyermekek, terhes nők, valamint fiatalok betegek esetén előnyösebb az alkalmazása a PET/CT-vel szemben [24].

A PET képalkotáshoz felhasznált pozitron-sugárzó izotópok nagy részét ciklotronban állítják elő. Ezek olyan részecskegyorsítók, amelyek az elektromosan töltött részecskéket mágneses tér segítségével egy spirálpályán gyorsítják. A folyamat során a részecske minél messzebb kerül a spirálpályán, annál nagyobb energiával rendelkezik, végül egy nyalábbba rendezik a részecskéket és a céltárggyal ütköztetik [25].

A PET vizsgálatok során a négy leggyakrabban használt pozitron-sugárzó radionuklid a szén-11, az oxigén-15, a nitrogén-13, és a fluor-18. Ezek közül az első három az emberi szervezetet alkotó szerves vegyületek építőelemei. A felezési idejük változó, az oxigén-15 felezési ideje 122 másodperc, a nitrogén-13 izotópé 10 perc, a szén-11 izotópé 20,4 perc, míg a fluor-18 izotópé 109,7 perc. A rövid felezési idejű izotópokkal jelzett vegyületek csak helyben történő felhasználásra alkalmasak, míg a hosszabb felezési idejű ^{18}F -jelzett radiogyógyszerek távolabbi PET centrumokba is elszállíthatók [26].

A klinikai PET/CT vizsgálatok során radiogyógyszerként legnagyobb mértékben 2- ^{18}F fluoro-2-dezoxi-D-glükózt (^{18}F FDG-t) alkalmaznak [27] (6. ábra). Ez a vegyület egy glükóz analóg, amely alkalmas a sejtek glükóz-anyagcseréjének a vizsgálatára. A sejtekbe jutva 2-fluoro-2-dezoxi-D-glükóz-6-foszfáttá alakul, amely tovább már nem tud metabolizálódni, ezért felhalmozódik a magas cukor-felhasználású sejtekben,

szövetekben. A tumoros sejteket az egészséges sejtekhez képest fokozott glükózananyagcsere jellemzi, ezért az [^{18}F]FDG hatékony diagnosztikai ágensként alkalmazható a daganatos megbetegedések detektálására. A rövidebb felezésű idejű szén-11 izotóppal jelölt molekulákat elterjedten használják Alzheimer kór (például: 2-(4'-([^{11}C]metilamino)fenil)-6-hidroxi-benzotiazol ([^{11}C]PIB) [28]), prosztata (például.: [^{11}C]kolin [29]) és agyi tumorok (például.: [^{11}C]metionin [30]) vizsgálata során (6. ábra). A nitrogén-13 radionukliddal jelzett vegyületek közül az [^{13}N]ammóniát agyi metabolizmus [31] mellett myocardialis perfúziós vizsgálatokban is használják [32], az utóbbi esetben ^{15}O -jelzett vizet is alkalmaznak [33].



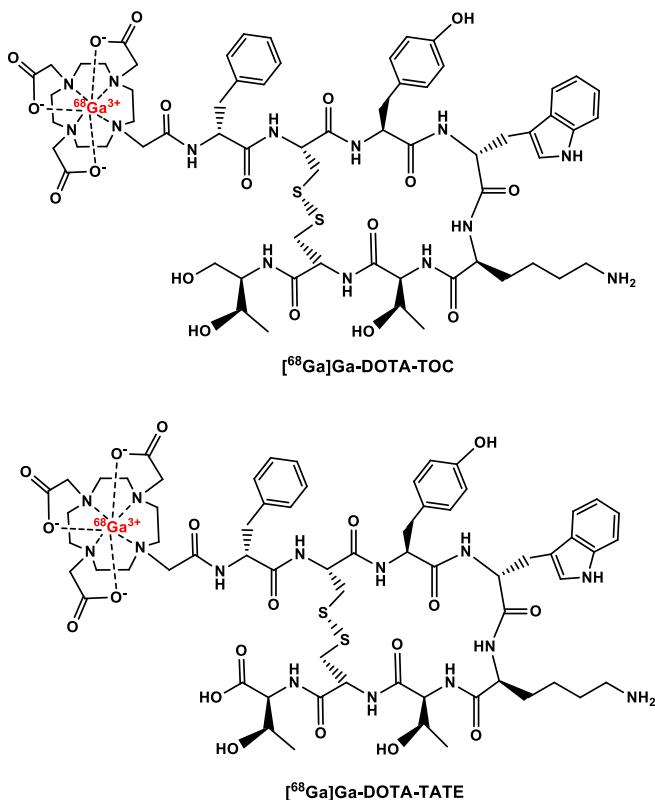
6. ábra Klinikai gyakorlatban alkalmazott PET-radiofarmakonok szerkezete

Napjainkban a fent említett négy radionuklid mellett egyre elterjedtebben használják radiokémiai jelzésekre a különböző pozitron-sugárzó fémizotópokat is, ilyenek például a szkandium-44 ($t_{1/2} = 4,04$ óra), mangán-52 ($t_{1/2} = 5,59$ nap), réz-64 ($t_{1/2} = 12,7$ óra), gallium-68 ($t_{1/2} = 67,71$ perc) és a cirkónium-89 ($t_{1/2} = 78,4$ óra) izotópok [34]. A cirkónium-89 fémizotópot főleg a hosszabb biológiai félidejű antitestek radiokémiai jelzésére használják, ilyen radiogyógyszer például a ^{89}Zr -trastuzumab [35].

A fenti fémizotópokat főleg ciklotronban állítják elő, de például a gallium-68 nyerhető még kereskedelmi forgalomban elérhető, GMP-kompatibilis $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorból is [36]. Ennek megfelelően ^{68}Ga -jelzett radiogyógyszerekkel ciklotronnal nem rendelkező PET centrumokban is lehet PET vizsgálatokat végezni. A generátor anyaeleme a germánium-68, aminek a felezési ideje 270,8 nap, ezért körülbelül egy évig használható, de mivel két óránként lehet róla [^{68}Ga]GaCl₃ oldatot eluálni, így naponta többször is lehet vele radiojelzést megvalósítani.

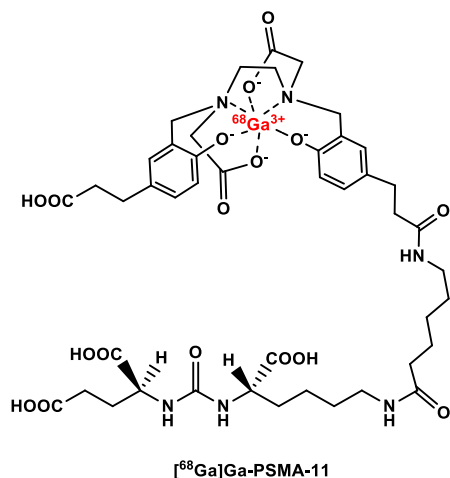
A gallium-68 ciklotronban történő előállítása $^{68}\text{Zn}(n,p)^{68}\text{Ga}$ magreakcióval valósítható meg, ami hosszú távon gazdaságosabb megoldást jelent a ciklotronnal

rendelkező radiogyógyszergyártók részére. A gallium-68 izotópot elsősorban peptidek radiojelzésére használják, mivel 68 perces felezési ideje jól korrelál ezeknek a vegyületeknek a biológiai felezési idejével. A gallium-68 bomlások 89,1%-a β^+ -bomlás, ami a fluor-18-hoz ($E_{\max} = 0,63$ MeV) képest nagyobb energiával történik ($E_{\max} = 1.92$ MeV). A forgalomban lévő ^{68}Ga -jelzett radiogyógyszerek között megtalálható a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TOC}$, ill. a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ (7. ábra), melyek neuroendokrin tumorsejtek felszínén nagymértékben expresszáló szomatosztatin receptorok kimutatására alkalmasak [37].



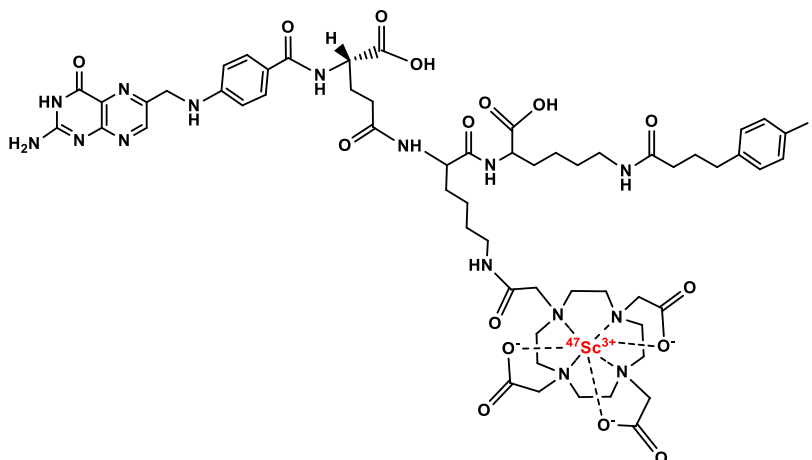
7. ábra ^{68}Ga -jelzett radiofarmakonok szerkezete

Napjainkban gallium-68 izotóp felhasználása ismét növekszik a prosztatárak detektálására használható különböző ^{68}Ga -jelzett, PSMA-alapú radiofarmakonok növekvő népszerűsége miatt. Az egyik ilyen széleskörűen alkalmazott PET diagnosztikai ágens a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ [38] (8. ábra).



8. ábra [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 szerkezete

A gallium-68 radiofém egyik kiváló alternatívája a szkandium-44 izotóp [39], melynek a felezési ideje 4,04 óra. Ez a felezési idő lehetővé teszi a ⁴⁴Sc-jelzett radiofarmakonok, de akár a radioizotóp szállítását is távolabbi PET központokba. A szkandium-44 izotóp előállítható ⁴⁴Ti/⁴⁴Sc generátorral [40], valamint ⁴⁴Ca(p,n)⁴⁴Sc magreakcióval ciklotronban [41]. Képalkotó tulajdonságai megfelelőek a PET képalkotás számára, mivel a szkandium-44 esetében a β⁺-bomlások aránya magasabb (94,3%) a gallium-68 izotóphoz képest (89,1%). A bomlási energiája viszont kisebb (E_{mean} = 0,63 MeV), így jobb felbontású PET képet kapunk a ⁴⁴Sc-jelzett radiofarmakonok alkalmazásakor [42]. Továbbá a szkandium-44 négy órás felezési ideje későbbi PET képalkotást is lehetővé tesz. ⁴⁴Sc-jelzett vegyületeket használtak már többek között szomatosztatint expresszáló tumorok [43] és prosztataraák kimutatására [39]. A szkandium-44 rendelkezik egy terápiás izotóppárral is, mégpedig a 3,35 nap felezési idejű, béta-sugárzó szkandium-47 izotóppal [44]. Müller és munkatársai által végrehajtott preklinikai kísérletekben a ⁴⁷Sc-jelzett radiofarmakonnal (9. ábra) végrehajtott terápiás kezelések növelték a folát receptor-pozitív KB tumoros egerek túlélési idejét [45].



9. ábra ^{47}Sc -jelzett DO3AM-folát konjugátum (cm10) szerkezete

3.3.2 Morfológiai képkalkotó módszerek

3.3.2.1 Komputertomográfia (CT)

A komputertomográfiát az 1970-es évek óta használják az orvostudományban és különböző anyagszerkezeti vizsgálatokban. A CT ionizáló röntgensugárzást használva készít morfológiai képet az emberi testről. A különböző szövetek különböző mértékben nyelik el a röntgensugárzást, melyet a detektorok érzékelnek. Egy vizsgálat a bonyolult számítások ellenére is, csak pár percet vesz igénybe. A jobb kép elkészítése érdekében gyakran kontrasztanyagot adnak a betegnek. Leggyakoribbak a jód és bárium tartalmú kontrasztanyagok, mivel ezen kémiai elemek vegyületei nagyobb elnyelést eredményeznek. A készülék főbb részei a röntgenső, detektor, mozgatható ágy és a szkennerdob. Az elkészített kép felbontása 1 mm körüli [46].

3.3.2.2 Mágnesesrezonancia képkalkotás (MRI)

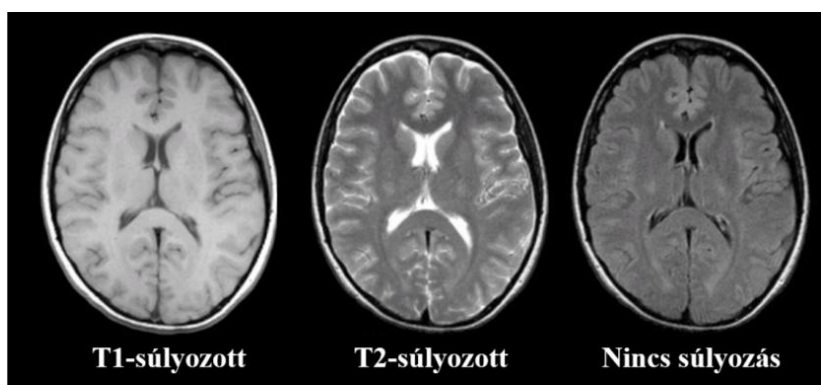
A mágnesesrezonancia képkalkotás a CT-vel ellentétben nem használ ionizáló sugárzást a felvétel elkészítése során. Az MRI vizsgálat során a páciens egy alagútszerű mágneses térbe fektetik, ami a készüléktől függően 10-30000 gauss (1-3 Tesla) nagyságú.

Az MRI készülék működése a következő megfontolásokon alapul. A páratlan nukleonszámú atomoknak mágneses momentumuk és spinjük van, ezért elemi mágneseknek tekinthetők. Legnagyobb mágneses momentuma az egy protont tartalmazó

hidrogénnek van. Ha a protonokat külső mágneses térbe helyezzük, akkor ezek az elemi mágnesek paralel vagy antiparalel irányba rendeződnek a külső mágneses tér irányához képest. Az ellentétes irányú spinek semlegesítik egymást és csak néhány proton helyezkedik el az energetikailag kedvezőbb, a külső térrel megegyező irányba. Továbbá ezek a paralel állású protonok nem teljesen párhuzamos irányban állnak, hanem a külső mágneses tér irányához képest egy adott szöget bezáró kúppalást mentén forognak, úgynevezett precesszáló mozgást végeznek. Azt a frekvenciát, amivel a protonok precesszálnak Larmor frekvenciának nevezzük. Egy külső, megfelelő frekvenciájú, impulzusszerű rádiófrekvenciás hullámmal ezek a protonok kibillenthetőek a paralel helyzetből, azaz gerjeszthetőek. A rádiófrekvenciás jel megszüntetése után a protonok visszarendeződnek, ezt a folyamatot relaxációnak nevezzük. Ennek során a protonok a felvett energiát kisugározzák hő és rádiófrekvenciás hullám formájában, amit egy vevőegység érzékel. A detektortekercsben elektromágneses jel lesz detektálható, amelyet Fourier transzformációval alakítanak át úgynevezett 'proton térképpé'. Azt az időt, ami alatt a relaxáció megtörténik, relaxációs időnek nevezzük. Annak függvényében, hogy milyen kémiai környezetben van az adott proton, a relaxációs ideje más és más.

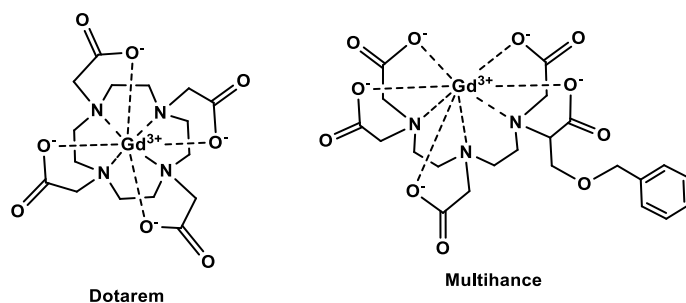
A relaxáció során a protonok egyrészt a külső mágnes tér által meghatározott longitudinális irányba állnak ismét vissza, ezt T_1 relaxációnak nevezzük, ekkor a felesleges energiát hő formájában adják át a közegnek. Másrészt, a rádiófrekvenciás impulzus hatására létrejött szinkronizáció felbomlik, azaz fázisvesztés történik a transzverzális síkban, ezt pedig T_2 relaxációnak nevezzük, amit az egyes protonok eltérő kémiai környezete befolyásol.

Az emberi test MRI-vel jól vizsgálható, mivel az emberi test 70%-át víz teszi ki, amely hidrogén atomokat tartalmaz. Továbbá a fehérjékben, zsírokban és a szénhidrátokban is sok hidrogén található. A kép elkészítése során lehetőség van a különböző relaxációkat is figyelembe venni, a T_1 súlyozás esetén az anatómiáról kapunk kontrasztosabb képet, míg a T_2 súlyozás esetén a patológiás elváltozásokról. Az MRI képek felbontása körülbelül 1 mm [47] (10. ábra).



10. ábra MRI képképzési módszerek

Az MRI esetében is alkalmaznak kontrasztanyagokat, amelyek növelik az egészséges és a kóros szövetek közötti jelintenzitás különbségeket. A kontrasztanyagok nem tartalmaznak protont, lehetnek paramágnesesek (pl.: gadolínium(III), mangán(II)), amelyek a T_1 relaxációs időt csökkentik jelentősen, míg a szuperparamágneses ill. ferromágneses tulajdonságúak (pl.: vas(II)) a T_2 relaxációs időt. A gadolínium mérgező az emberi szervezet számára, így csak különböző kelátorokkal képzett, nagy stabilitású és inert komplexeit lehet alkalmazni erre a célra. Kereskedelmi forgalomban kapható Gd(III)-komplexe például a Dotarem (meglumin-gadoterát), a MultiHance (gadobénsav) (11. ábra).



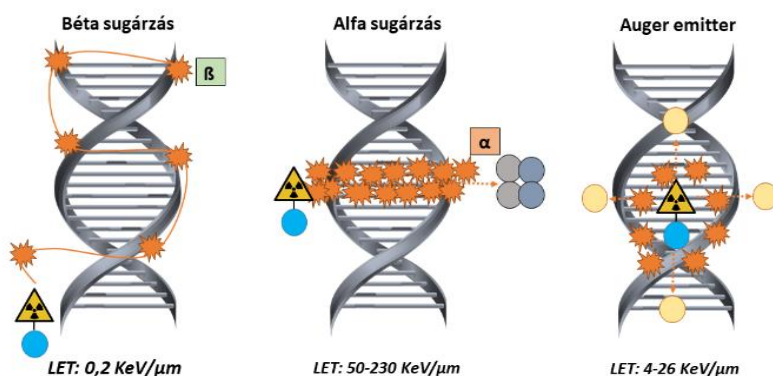
11. ábra Néhány gadolínium-alapú kontrasztanyag szerkezete

A gadolínium tartalmú kontrasztanyagok gyakori felhasználása során megfigyeltek egy súlyos mellékhatást, melynek során a komplexből kiszabaduló szabad gadolínium

súlyos immunreakciót vált ki, ami az 5%-ban halálos nefrogén szisztémás fibrózist (NSF) okozza. Ez a mellékhatás főleg a veseelégtelenséggel küzdő beteg esetén jelent nagy kockázatot. Ennek elkerülésére az utóbbi évtizedekben intenzív kutatás figyelhető meg az újabb, nagy stabilitású és inert Gd(III)-komplexek, valamint ezt a mellékhatást nem okozó Mn(II)-komplexek fejlesztésének a területén [48-49].

3.4 Targetált radionuklid terápia

Napjainkban a nukleáris medicina egyik legdinamikusabban fejlődő ága a targetált radionuklid terápia (TRT) és ezen belül a terápiás radiofémekkel jelölt radiogyógyszereket fejlesztése. A terápiás radiofémek sugárzásuk típusa szerint három csoportba sorolhatók, vannak az alfa-, a béta- és az Auger-elektron-sugárzó izotópok. (12. ábra) A különböző izotópok bomlása során keletkező ionizáló részecskék energiájukat más és más távolságon belül adják le környezetüknek, továbbá az átadott energia nagysága is eltérő. Ez alapján a különböző ionizáló sugárzások egy úgynevezett lineáris energia transzfer (LET) értékkel jellemezhetőek, ami megadja, hogy az ionizáló részecske adott távolság megtétele során mekkora energiát ad le a közegnek. A radionuklid terápia tervezésekor figyelembe kell venni az izotópok jellemzőit, és kiválasztani az adott rendszerhez legjobban illőt.

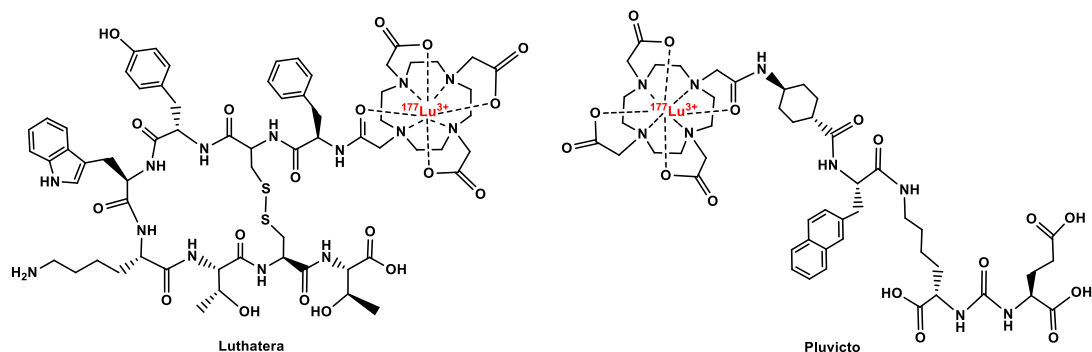


12. ábra Különböző típusú radioaktív sugárzások hatása a DNS-re

A legkisebb LET értékkel a béta-sugárzás rendelkezik, ami átlagosan 0.2 keV/μm. Hatótávolsága 0,05-12 milliméterig terjed, ez a legnagyobb a terápiára használt

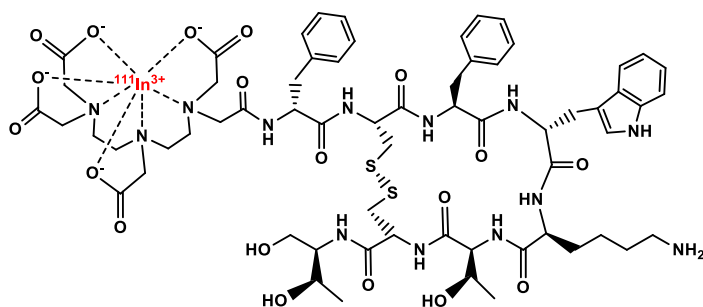
sugárzások között és a közepesen nagy tumorok kezelésére alkalmas. Kis áttétek esetén a béta-sugárzás károsíthatja a közeli egészséges sejteket is. A béta-bomló izotópok által leadott energia igen változatos lehet, 50-2300 keV közötti.

Napjainkban a klinikai gyakorlatban a targetált radioizotóp terápiát általában béta-sugárzó radionuklidokkal végzik. Egyik legismertebb, ilyen típusú izotópot tartalmazó terápiás ágens a $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$, amelyet pajzsmirigy radionuklid terápiájában alkalmaznak. Ezen kívül az irodalomban beszámoltak már ittrium-90 és jód-131 izotópokkal jelölt anti-CD20 monoklonáris antitestek használatáról, amelyekkel non-Hodgkin szindróma radioimmunoterápiáját valósították meg [50]. A lutécium-177, egy másik béta-bomló izotóp, amit gyakran használnak a humán radionuklid terápiában. Az utóbbi években két radiogyógyszert is elfogadott az FDA, az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala a daganatos betegségek kezelésére. Az egyik ilyen molekula a 2018-ban engedélyezett Lutathera, azaz a $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$ (13. ábra), amely egy szomatosztatin receptorhoz kötődő terápiás készítmény és a bélrendszer gasztroenteropankreatikus neuroendokrin tumorjainak a radioterápiájára alkalmas. Az EMA, az Európai Gyógyszerügynökség 2008-ban ritka betegség elleni gyógyszernek minősítette a Lutatherát, majd 2018-ban engedélyezte a használatát [51, 52]. Egy másik ilyen készítményt, a Pluvicto-t, azaz a $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617-et}$ (13. ábra) 2022 márciusában engedélyezte az FDA. Ezt a radiogyógyszert olyan PSMA-pozitív prosztatata daganatos betegek esetében alkalmazzák, akik nem reagálnak a hormon és a Taxán kezelésre [53]. Mind a két vegyület peptidalapú radiofarmakon, amelyekben a receptorokhoz kötődő, kis molekulatömegű peptidek radiofémeket komplexáló kelátorhoz, DOTA-hoz vannak konjugálva.



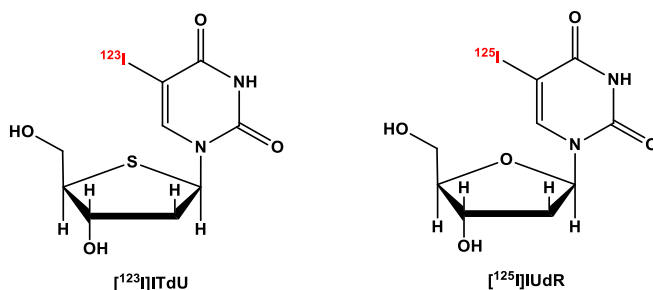
13. ábra ^{177}Lu -jelzett radiogyógyszerek szerkezete

Nagyobb LET értékkel (4–26 keV/ μm) rendelkeznek az Auger-elektron-sugárzó izotópok, amelyek bomlásakor keletkező nagyszámú, kis energiájú elektronok által megtett út csak nanométerekben mérhető (2-500 nm). Így ezek az Auger-elektron kaszkádot kibocsátó izotópok a rövid hatótávolságuk miatt képesek nagy lokális sugárdózist leadni a bomlásuk helyének közvetlen közelében. Mivel azonban a környező egészséges sejtekben csak csekély mértékű károsodást okoznak, ezért nagy irántuk az érdeklődés. Viszont kis hatótávolságuk miatt a tumoros sejtek sejtmagjában, a DNS közvetlen közelében tudják igazán kifejteni toxikus hatásukat, ami azt jelenti, hogy oda kell eljuttatni ezeket a radionuklidokat megfelelő vektormolekula segítségével. Ilyen típusú radioterápiával kapcsolatban csak néhány klinikai vizsgálatot említ az irodalom, például a ^{111}In -DTPA-octreotid radiofarmakont (14. ábra) használták szomatostatin receptor-pozitív neuroendrokin tumorok kezelésére [54]. Ugyanakkor számos preklinikai kísérletről számoltak már be, amelyek során Auger-elektron-sugárzó izotópot tartalmazó radiofarmakonokat alkalmaztak [55].



14. ábra ^{111}In -DTPA-octreotide szerkezete

Például, *in vitro* vizsgálatokat végeztek a jód-123 izotóppal jelzett 5- ^{123}I jód-4'-tio-2'-dezoxi-uridinnel (^{123}I ITdU) HL60 leukémiás sejteken [56], továbbá jód-125 jelzett 5- ^{125}I jód-2'-dezoxi-uridin (^{125}I IUdR) vegyület alkalmaztak radioizotópos terápiára egy patkány glioma modell esetében, ami az egyik leghalálosabb agytumor [57]. (15. ábra) Mindkét radiofarmakon timidin analóg és a DNS szintéziskor épülnek be a DNS-be és így képesek sejthalált indukálni a tumoros sejtekben. Napjainkban az egyik legígéretesebb Auger-elektron-sugárzó radiofém az antimon-119, amit szintén célzott radionuklid terápiára javasolnak [58, 59].

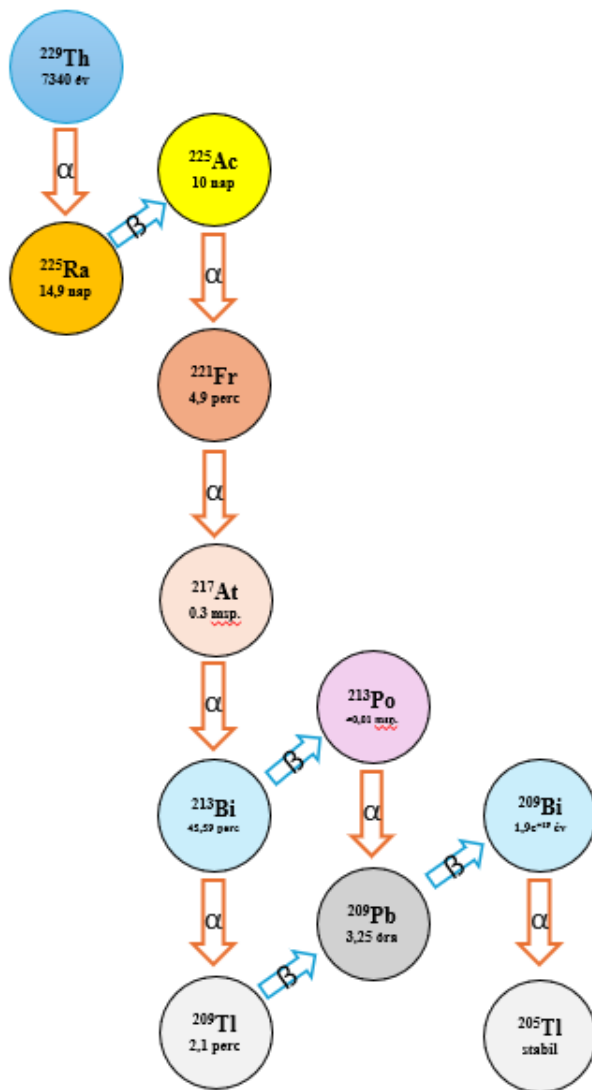


15. ábra Jód-123 és jód-125 jelzett radiogyógyszerek szerkezete

A fent említett sugárzás típusok közül az alfa-sugárzás rendelkezik a legnagyobb LET értékkel (50-230 keV/ μm). Az alfa-részecske egy két pozitív töltéssel rendelkező hélium atommag, hatótávolsága 50–100 μm (ez kevesebb, mint 10 sejt távolságot jelent) és energiája 5–9 MeV. Az alfa-sugárzás citotoxikus hatását, a béta-sugárzással ellentétben nem befolyásolja a sejtek oxigénszintje és a sejtciklus. Az alfa részecskék kettős szálú DNS törést okoznak, amelyek nehezebben javíthatók a béta-sugárzás által okozott károsodásoknál [60].

Targetált radionuklid terápiára alkalmas, alfa-sugárzó izotóp a bizmut-213, aminek az előállítását aktínium-225 generátorral történik [61]. Az aktínium-225 anyaelem tórium-229 generátorból nyerhető, melynek felezési ideje 7397 év, így hosszú távon biztosíthatja az aktíniumtermelést. A bomlási sor az urán-233 izotóppal kezdődik, amelyből 6 alfa- és 3 béta-bomlás után bizmut-209 keletkezik (16. ábra). Az aktínium-225 felezési ideje 9,9 nap, ennek megfelelően egy generátort 3-4 hétig lehet használni, de mivel 2 óránként lehet eluálni, ezért naponta több beteg vizsgálata valósulhat meg. A bizmut-213 felezési ideje

45,6 perc, az alfa-bomlásának energiája 5.9 MeV (2%), béta-bomlásának (98%) energiája 435 keV. Ezen kívül a bizmut-213 izotóp bomlását egy 440 keV energiájú gamma-sugárzás is kíséri, amely SPECT képalkotásra alkalmas. Béta-bomlás során rövid felezési idejű polónium-213 keletkezik, mely alfa-bomlással polónium-209 izotóppá alakul ($t_{1/2} = 3.72 \mu\text{s}$, 8.4 MeV) [61]. Preklinikai és fázis I. vizsgálatokban már bizonyították a ^{213}Bi -jelzett radiogyógyszerek hatékonyságát melanoma (^{213}Bi]Bi-h8C3 antitest [62]), glioma (^{213}Bi]Bi-DOTA-substance P [63]) és leukémia (^{213}Bi]Bi-HuM195 [64]) kezelése során.



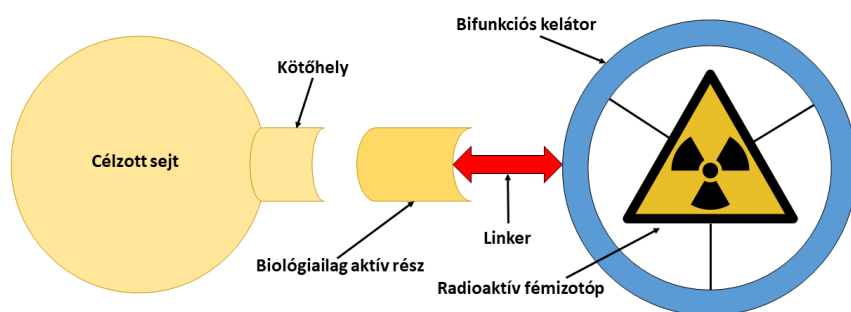
16. ábra Bizmut-213 bomlási sora tórium-229-től kezdve

3.5 A kutatás során megvalósított radiógyógyszer fejlesztések háttere

3.5.1 Radiofém alapú radiofarmakonok szerkezete

A radioizotópot felhasználó orvosi képalkotó eljárások radioaktív nyomjelzésen alapulnak. A módszer lényege, hogy a patológiás folyamatban résztvevő biológiailag aktív molekulát (pl. peptidet, fehérjét) radioaktív izotóppal jelzik, majd az így előállított radiógyógyszer sorsát tanulmányozzák az élőszervezetben és meghatározzák, hogy mely szervekbe, szövetekbe jut el, milyen mértékben akkumulálódik ott és hogyan ürül ki a szervezetből [65].

A radiofém alapú radiógyógyszerek előállítása során a radioaktív fémizotóp biomolekulához való kapcsolásának legmegbízhatóbb módja, ha a fémiont egy bifunkciós kelátképzővel (BFC) komplexáljuk. Ez a ligandum két fontos feladatot lát el, egyrészt képes koordinálni az adott fémiont termodinamikailag stabil és kinetikailag inert formában, másrészt funkciós csoportja révén stabil kovalens kötést alakít ki a biológiai célponthoz specifikusan kötődő vektormolekulával (pl: peptiddel, monoklonális antitesttel). Az ilyen típusú radiógyógyszerek általában egy úgynevezett linkert is tartalmaznak, amely összeköti a komplexképző részt és a bioaktív fragment, továbbá farmakokinetikai módosítóként is szolgál. Például a polietilén-glikol (PEG) lánc növeli a radiofarmakon vízoldhatóságát, míg az alifás lánc növeli a lipofilitását. Az 17. ábra egy radiógyógyszer sematikus szerkezetét mutatja be [66].



17. ábra Radiofém alapú radiofarmakonok sematikus ábrája

A megfelelő ligandum kiválasztása döntő fontosságú a radiofarmakon stabilitásának szempontjából és nagymértékben függ a komplexálandó fémiontól. A komplex stabilitási vizsgálatait során meg kell határozni az esszenciális fémionok (például Cu^{2+} , Zn^{2+} stb.) általi fémcseré vagy az endogén ligandumok, például transferrin általi ligandumcsere lehetőségét is, amelyek *in vivo* körülmények között is előfordulhatnak. Ezek a vizsgálatok azért is fontosak, mert a radiokomplex radionuklid vesztese mellett, hogy radiotoxicitást okoz az egészséges szövetekben, rossz képminőséget is eredményez [67].

A rövid felezési idejű radiofémrel történő jelzés esetén kiemelten fontos, hogy gyorsan és lehetőleg kis hőmérsékleten („lágý” körülmények között) menjen végbe a komplexképződés. A gyakorlati felhasználás szempontjából előnyös, ha a jelölendő vegyület előállítását könnyen megvalósítható és a radiojelzés egyszerűen kivitelezhető. A biológiailag aktív molekuláris célzott receptorhoz való, minél szelektívebb kötődése, azért is fontos, mert így a nem targetált sejtek, szövetek sugárterhelése kisebb lesz. Továbbá, a vektormolekula biológiai felezési idejének összhangban kell lennie a radioizotóp felezési idejével, ez alapján effektív felezési idővel is jellemzik a radiógyógyszereket. Ezen kívül, *in vivo* körülmények között ennek a résznek is stabilnak kell lennie. Ez azt jelenti, hogy ellenállónak kell lennie a különböző enzimek hatására bekövetkező degradációnak az élőszervezetben, mert ellenkező esetben elveszíti a specifikitását a radiofarmakon.

3.5.2 Ligandumok

Az előző fejezetben leírtaknak megfelelően a radiofém alapú radiógyógyszerek fontos szerkezeti eleme a ligandum, aminek a feladata az adott fémizotóp koordinálása. A ligandum, úgynevezett donoratomot vagy donoratomokat tartalmaz, melyek révén képes komplexálni a központi atomot, azaz a fématomot. A donoratom lehet nitrogén, oxigén, foszfor, kén és szén, vagy néha valamilyen másik fémion.

A ligandumok komplexképző tulajdonságai eltérőek. A fémkomplex klinikai felhasználhatósága szempontjából fontos meghatározni a komplex képződési kinetikáját, termodinamikai stabilitását, kinetikai inertségét és *in vivo* stabilitását. A képződési

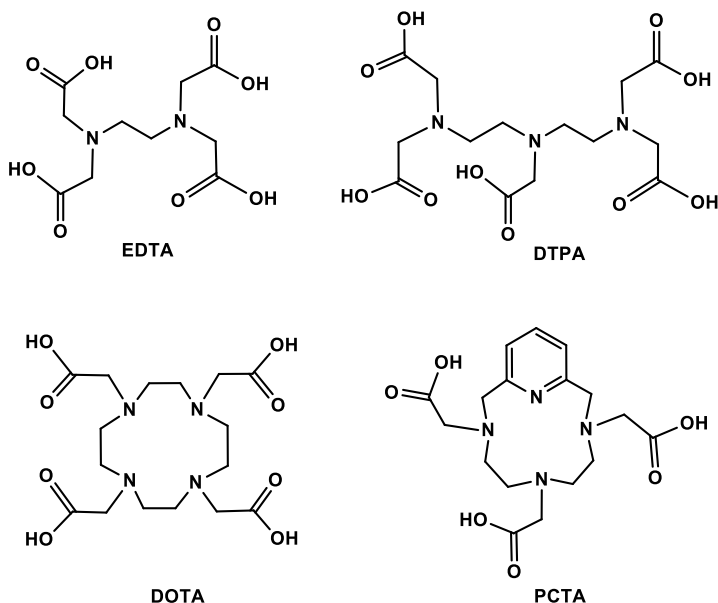
kinetika tanulmányozása során azt vizsgálják, hogy milyen gyorsan képződik a komplex a különböző reakciókörülményeket között.

A radiofém komplexálása során figyelembe kell még venni az adott izotóp felezési idejét és ahhoz képest kell megválasztani a reakcióidőt. A megfelelő reakcióhőmérséklet meghatározása is fontos, mert a biológiailag aktív molekulák egy része hőérzékeny (pl: fehérjék, antitestek), ezért túl magas hőmérsékleten tönkremehetnek és így elveszíthetik specifikus kötődésüket a biológiai célpontokhoz [68].

A kinetikai inertség vizsgálata szintén elengedhetetlen, mivel *in vivo* körülmények között a radiofarmakon nagymértékben hígul, így az egyensúly a bomlás irányba tolódik el és emellett fémion- vagy ligandumcserével is számolni kell. A komplex *in vivo* stabilitását preklinikai vizsgálatok során egészséges, vagy tumoros állatokban tanulmányozzák. A biodisztribúciós vizsgálatok során megfigyelhetjük, hogy a radiofarmakon mely szervekben dúsul, valamint milyen úton távozik a szervezetből. Továbbá megállapíthatjuk azt is, hogy a kiürült molekula megegyezik-e az eredeti fémkomplexszel, vagy degradálódott-e a vizsgálat során.

A ligandumokat több módszer alapján lehet csoportosítani, például méretük, töltésük, szerkezetük, a donorumok minősége és a kialakuló koordinációs kötések száma szerint. Az utóbbi szerint két fő csoportra lehet osztani a komplexképző molekulákat, mono- és polidentát ligandumokra. Az orvosi alkalmazások során főleg polidentát ligandumokat tartalmazó fémkomplexekeket használnak. Jellemző ezekre a ligandumokra, hogy kettő vagy annál több donorummal rendelkeznek, amelyek révén kettő vagy több koordinatív kötéssel kapcsolódhatnak a központi fématomhoz. A polidentát ligandumokat csoportosíthatjuk aszerint, hogy nyíltláncúak vagy makrociklusosak. Nyíltláncú ligandumok esetében csak kelátképződés közben zár gyűrűt (5- vagy 6 tagú kelátgyűrűk a leginkább stabilisak) a ligandum a fémmel, míg a makrociklusos vegyületek esetében a ligandum gyűrűs szerkezetű és ebbe a gyűrűbe ül bele a fématom. A nyíltláncú ligandumok egyik képviselője az oxálsav, ami két karboxilátcsoportja révén kapcsolódik a különböző fémionokhoz. A nyíltláncú ligandumok legismertebb tagja az etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) (18. ábra). Az EDTA hatfogú ligandum és a legtöbb fémmel

gyorsan képez komplexet, ezért elterjedten alkalmazzák olyan területeken, ahol fémionokat kell eltávolítani a rendszerből, vagy legalábbis megkötni (maszkírozni). Másik széleskörben alkalmazott nyíltláncú kelátor a nyolcfogú dietilén-triamin-pentaecetsav (DTPA) (18. ábra). Felhasználási területe az EDTA-hoz hasonló, valamint a nukleáris hulladék kezelésében is fontos szerepet játszik. 2004-ben az FDA gyógyszerként fogadta el a kalcium és cink sóját, mely alkalmas plutóniummal és cirkóniummal kontaminált páciensek gyógyítására. A gadolíniummal alkotott komplexét MRI kontrasztanyagként alkalmazzák már a nyolcvanas évek közepétől. A nyíltláncú ligandumok gyors képződési kinetikával rendelkeznek, így a komplexképződés kis hőmérsékleten is gyorsan végbemegy. A DTPA galliummal alkotott komplexének $\log K$ értéke 20,27, bizmut komplex esetében ez az érték 27,90, míg szkandium komplex esetében 23,10 [69].



18. ábra Néhány gyakran használt amino-polikarboxilát ligandumok szerkezete

A kelátorok másik típusát a makrociklusos ligandumok alkotják. Ezek közül a legelterjedtebbek az oxigéntartalmú koronaéterek vagy nitrogéntartalmú aza-makrociklusok. A legismertebb képviselőjük a 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazaciclododekán-1,4,7,10-tetraacetsav, azaz a DOTA (18. ábra). A

makrociklus négy nitrogénatomja és az oldallánc négy karboxilátcsoportja révén tud koordinálódni a fémionokhoz, azaz összesen nyolc (oktadentát) kötőhellyel rendelkezik és ezért a nagy koordinációs számmal rendelkező fémeket is képes teljes mértékben „beburkolni”. A nyíltláncú ligandumokhoz képest a makrociklusos komplexképzők alkalmazása során általában magasabb hőmérséklet szükséges a komplexképződés felgyorsításához. Ugyanakkor a DOTA komplexek $\log K$ stabilitási állandói is nagy értékek, mivel érvényesül a keláteffektus mellett a szintén stabilitás növekedést eredményező ún. makrociklusos effektus. Például gallium(III) esetén 21,3, bizmut(III) esetén 30,3 és szkandium(III) esetén 27 a $\log K$ érték, jelezve a stabilitás növekedést a szintén nyolcfogú DTPA-hoz képest [70]. Általánosan is elmondható, hogy a makrociklusos ligandumok komplexei nagyobb $\log K$ értékkel jellemezhetőek a nyíltláncú ligandumok komplexeihez képest. A DOTA széles körben alkalmazott makrociklusos kelátor, mivel nagyon sok fémvel képez stabil komplexet. Gadolínium komplexét használják MRI kontrasztanyagként, ezen kívül származékait elterjedten alkalmazzák különböző radiogyógyszer molekulákban, például prosztatatarák, vagy neuroendokrin tumorok diagnosztikájára és radioterápiájára. Makrociklusos ligandumok közé tartoznak még a piklén makrociklus származékai is. Ezek egy vagy két piridin gyűrűt is tartalmaznak, melyek merevítik a makrociklus vázát. Egyik legismertebb képviselőjük a 3,6,9,15-tetraazabiciklo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trién-3,6,9-triecetsav (PCTA) (18. ábra). A DOTA ligandumhoz hasonlóan számos fémionnal stabil komplexet képez, de ezek képződése gyorsabb, viszont általában kevésbé inerte [71].

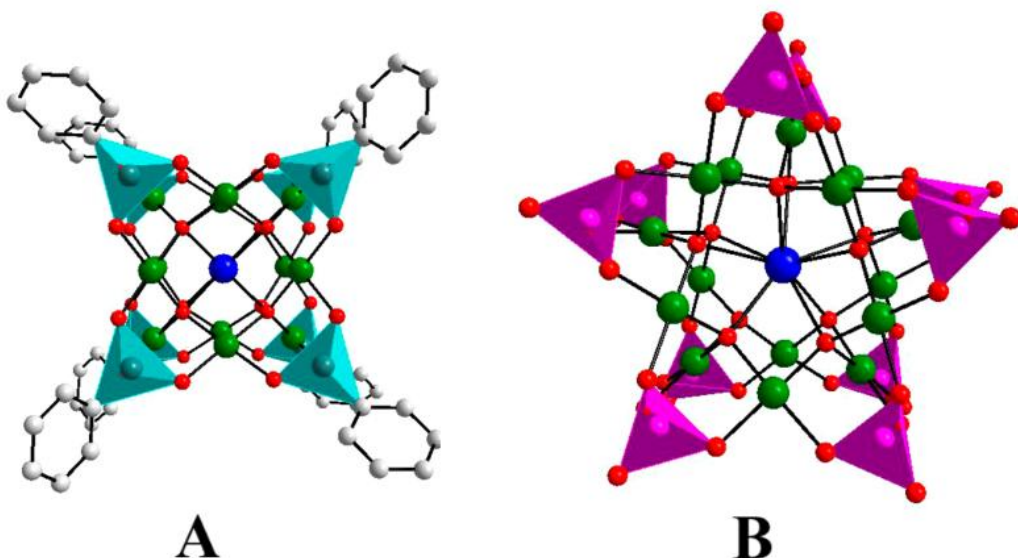
3.5.3 Polioxopalladát komplexek, mint fémkötő ligandumok

A polioxopalladátok (POP) a polioxometalátok (POM) egyik legdinamikusabban fejlődő alosztályát képezik, melynek mára már több mint 70 tagja van [72]. A klasszikus POM-ok jellegzetessége, hogy átmenetifémionok találhatók bennük, és tulajdonságaikban jelentősen eltérnek a főcsoportbeli atomokat tartalmazó polioxoanionoktól, például a szilikátoktól, polifoszfátoktól. A POM-okban előforduló magas oxidációs állapotú átmenetifémiont centrumnak (M) nevezik, ami lehet például molibdén(VI), wolfrám(VI), vagy vandánium(V). A fémcentrumhoz oxocsoportok (O^{2-})

koordinálódnak, az így létre jövő átmenetifém-oxid egységek közös oxigénatomokon keresztül összekapcsolódnak, ezáltal egy háromdimenziós szerkezetű polioxoanion képződik. A POM szerkezete az adott fém koordinációs szférája szerint alakul ki, amelyben az oxocsoportok terminális és híd pozícióban is elhelyezkedhetnek. Ha egyféle fémcentrum található a POM-ban, akkor izopolisavról ($[M_nO_y]^{p-}$) beszélünk, ha más átmeneti fémion, vagy főcsoportbeli atom anionjai is előfordulnak a komplexben, akkor heteropolisavról ($[X_zM_nO_y]^{q-}$, ahol $z \leq n$) beszélünk. Az eltérő fématomot heteroatomnak nevezzük és általában a POM szimmetriacentrumában helyezkedik el. A PO_4^{3-} , az SO_4^{2-} , és az SiO_4^{2-} anionok fordulnak elő gyakran a heteropolisavakban, amelyek templáló csoportok is.

A POM-ok már régóta ismert vegyületek és viszonylag egyszerűen kivitelezhető 'one-pot' reakcióban állíthatók elő. Ennek ellenére, a képződésükhöz vezető keláthatáson alapuló, önszerveződő aggregációs folyamatok részletei nem ismertek. Ezeknek a folyamatoknak a felderítésére egyre elterjedtebben alkalmazzák a multinukleáris NMR vizsgálatokat és a nagyfelbontású tömegspektroszkópiát. A hidratációs-kondenzációs folyamatok során keletkező POM-ok szerkezete függ a fémcentrumtól, annak számától, koordinációs szférájától és természetesen az előállítás körülményeitől, azaz a koncentrációktól, a pH-tól és a hőmérséklettől is. Továbbá a heteropolisavak esetén a beépülő vendég fémion és a fedőcsoport kémiai minőségétől és tulajdonságaitól. Ennek megfelelően változatos szerkezetű POM-ok alakulhatnak ki, amelyek lehetnek például köbös, csillag, oktaéderes szerkezetűek.

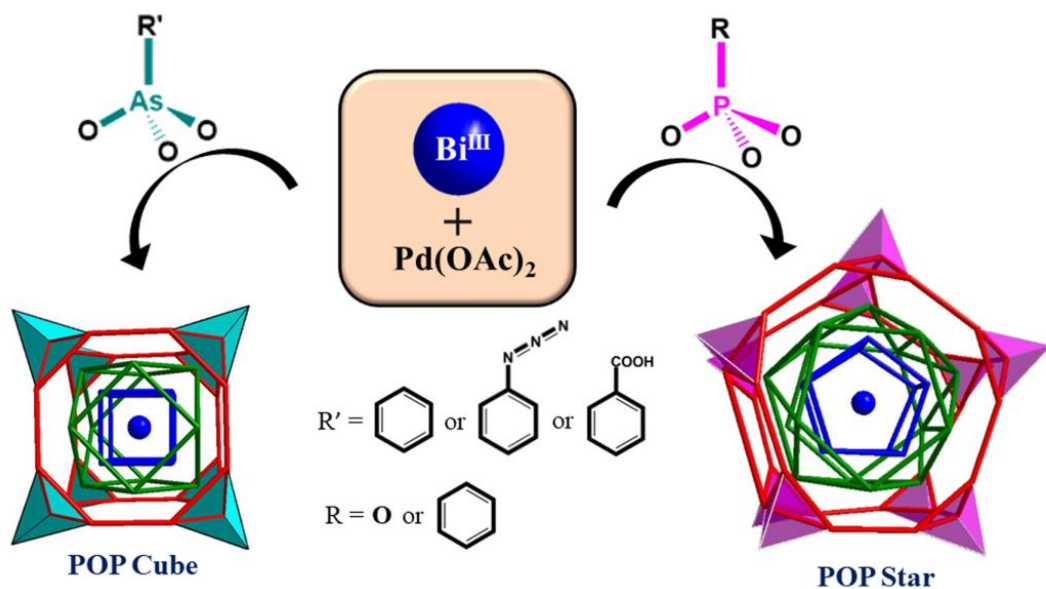
Ennek megfelelően a POM-ok felhasználási területe is szerteágazó, használják őket katalizátorként, de egyes típusoknak vannak antivirális és -bakteriális hatásai is [73, 74]. Egyik jelentős képviselőjük a $[P_2W_{18}O_{62}]^{6-}$ komplex, amit a krisztallográfiás vizsgálatok során riboszómák nagy felbontású szerkezetmeghatározására használtak markerként és ezért a kutatásért 2009-ben Nobel-díjat adtak [75].



19. ábra POP szerkezetek [71]: **A:** Kőbös szerkezetű; **B:** Csillag szerkezetű;
 Kék: bizmut, zöld: palládium, piros: oxigén, fehér: szén, ciánkék: arzén, magenta:
 foszfor;
 hidrogének nincsenek jelölve az ábrán a jobb átláthatóság érdekében

A 2000-es évektől kezdve számos olyan POM-ot állítottak elő, amelyek nemesfém-oxoanionok. Ilyenek például a polioxopalladátok, polioxoplatinátok és polioxoaurátok. Kortz és munkatársai jelentős eredményeket értek el a polioxopalladátok előállításának terén [72]. A polioxopalladátokban (POP) Pd(II) ionok vannak (szemben a POM-ok nagy oxidációs állapotú fématomjaival), így mindenképpen szükség van fedőcsoportra. Ezek a következők lehetnek: arzenát, foszfát, szelenit, fenil-arzenát, fenil-foszfát és acetát. Ilyenkor a síknégyszetes Pd(II)O₄ egységekből a fedőcsoportok jelenlétében kontrollált hidrolízis-kondenzációs folyamatok révén diszkrét, többmagvú Pd(II)-oxoanionok keletkeznek vizes oldatban. A POP-ok esetében is lehetőség van arra, hogy a Pd(II)O₄ kalitka belsejébe egy vendég fématom épüljön be. Ilyen atomok lehetnek főcsoportbeli kationok, lantanoida és átmeneti fémionok is. Ezek mérete és koordinációs száma is jelentősen befolyásolja a keletkező POP-ok szerkezetét és tulajdonságait.

Elméleti számításokkal meg lehet tervezni egy POP molekula szerkezetét és tulajdonságait, ezért is olyan nagy a tudományos érdeklődés ezek iránt a vegyületek iránt. A POP-ok szilárd állapotban, oldatban (vizes és szerves közegben egyaránt) és gázfázisban mutatott kiváló stabilitása teszi lehetővé, hogy homo- és heterogén katalízisben katalizátorként alkalmazzák őket. Továbbá óriási potenciál rejlik bennük az atomról atomra történő nanoszerkezetek előállítására. Ezen kívül, ha a fedőcsoport olyan fenil-arzenát, vagy fenil-foszfát csoport, amely megfelelő funkciós csoporttal, például karboxil vagy azido csoporttal szubsztituált [76], akkor a POP elméletileg biológiailag aktív molekulához (pl. peptid, fehérje) is kapcsolhatóvá válik.

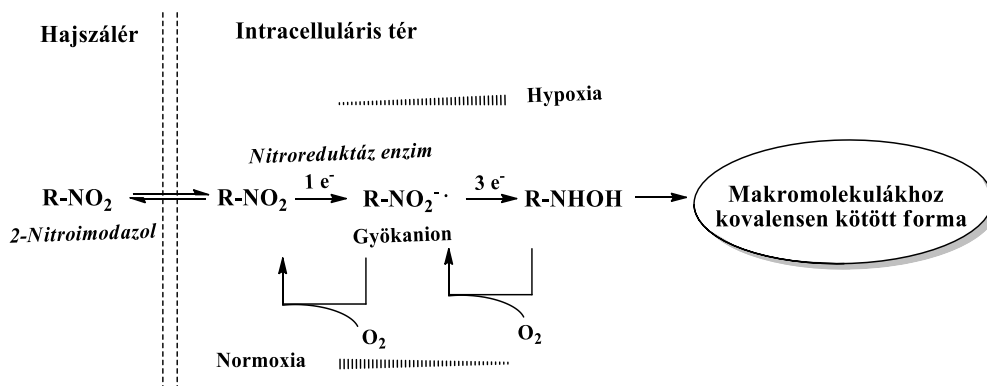


20. ábra Fedőcsoportok hatása a polioxopalladát komplexekre [76]

Újabban arra is irányultak már kutatások, hogy olyan POP-ot állítsanak elő, amelyben a vendégfém egy radioaktív fémion. Gott és munkatársai 2019-ben publikáltak először radioaktívan jelzett POP komplexről, amelyek rádium-224 és bárium-133 izotópót tartalmaztak [77]. A kísérleteik során olyan POP komplexeket sikerült létrehozniuk, amelyek a radioaktív izotóp mellett tartalmazták a fémion nem radioaktív izotópját is.

3.5.4 Tumorhipoxia detektálására alkalmazható radiofarmakonok

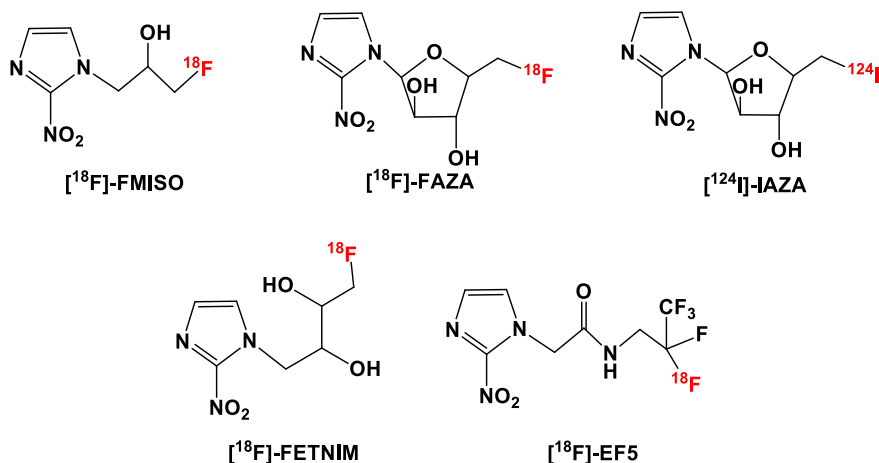
A hipoxiás tumorsejtek kimutatása általában nitroimidazol csoportot tartalmazó radiofarmakkal történik a nukleáris medicinában. A sejtekben a nitroreduktáz enzim redukálja a molekula kettes helyzetében található nitrocsoporthoz (NO_2), így először szabad gyökanion, majd hidroxil-amin képződik. Oxigén jelenlétében ezek a reakciók reverzibilisek, viszont hipoxiás körülmények között a redukció tovább folytatódik és a képződő amino származék már nem tud visszaoxidálódni, hanem irreverzibilisen kötődik az intracelluláris makromolekulákhoz. Így a 2-nitroimidazol-alapú radiogyógyszer a hipoxiás sejtekben dúsul és alkalmas a hipoxiás tumorok kimutatására (21. ábra) [78].



21. ábra 2-nitroimidazol-alapú radiofarmakon működésének molekuláris alapja tumor hipoxiában [78]

Klinikai alkalmazás szempontjából legjelentősebbek a fluor-18 izotóppal jelölt nitroimidazol származékok. Ezekben a kis molekulákban a nitroimidazol részhez egy oldalláncon keresztül kapcsolódik a fluor-18 izotóp. Közös jellemzőjük, hogy lipofil karakterük miatt lassan ürülnek ki a szervezetből, ami jelentősen rontja a PET felvétel kontrasztját, azaz a minőségét. Előnyük viszont, hogy átjutnak a vér-agy gáton, így az agyi tumorok hipoxiáját is lehet vizsgálni velük. Ilyen farmakonok pl. a $[^{18}\text{F}]$ -fluoromizonidazol ($[^{18}\text{F}]$ MIZO) [79], 1-(5-dezoxi-5- $[^{18}\text{F}]$ -fluoro- α -D-arabinofuranozil)-2-nitroimidazol ($[^{18}\text{F}]$ FAZA) [80], $[^{18}\text{F}]$ -fluoroeritronitroimidazol ($[^{18}\text{F}]$ FETNIM) [81]

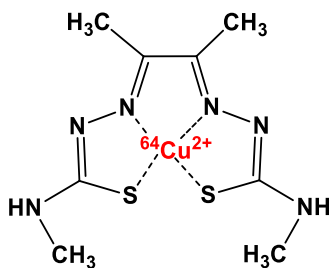
és a [^{18}F]F-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)-N-(2,2,3,3,3-[^{18}F]pentafluoropropil)-acetamid ([^{18}F]EF5) [82, 83] (22. ábra).



22. ábra ^{18}F - és ^{124}I -jelzett tumorhipoxia detektálásra használható radiogyógyszerek

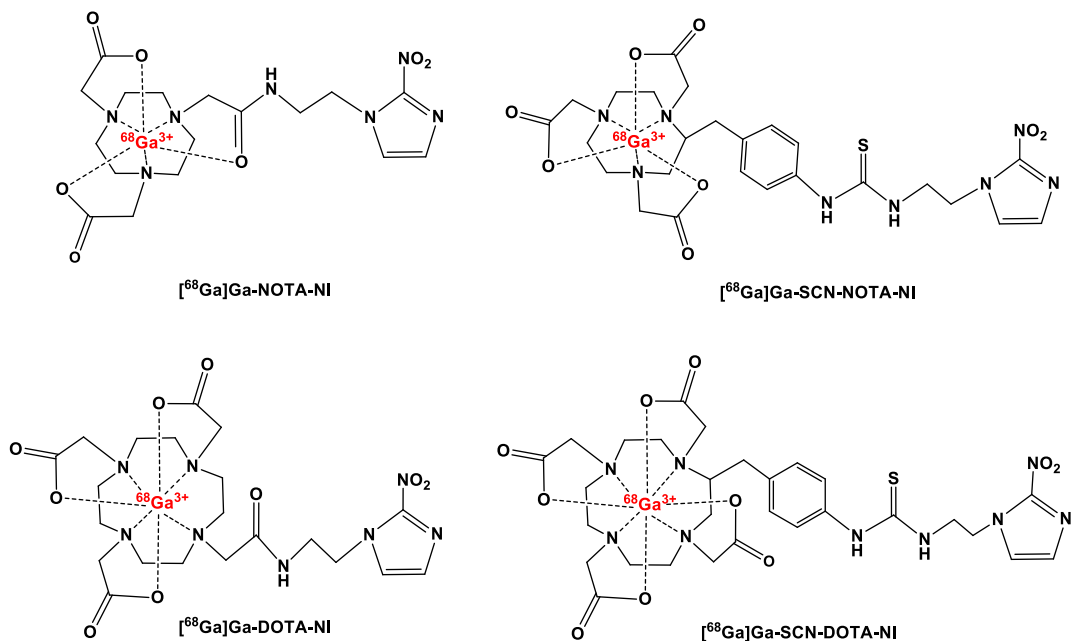
A [^{18}F]FAZA jód-124 jelzett analógja a 1-(5-dezoxi-5-[^{124}I]jodo- α -D-arabinofuranozil)-2-nitroimidazol [^{124}I]IAZA (22. ábra), ami hozzá hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, de elérhetősége limitált. A [^{18}F]FAZA-nak jobb a biokinetikai tulajdonsága, míg a jódzott származék esetében nagyobb a radiofarmakon tumor/izom megoszlási hányadosa [84].

Tumorhipoxia detektálására alkalmas még a pozitron-sugárzó réz izotópokkal (^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu and ^{64}Cu) jelzett diacetil-bis(*N*-metiltiosemikarbazon) is (ATSM) [85]. (23. ábra) Ezek a jelzett vegyületek jobb farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek a ^{18}F -jelzett radiofarmakonokhoz képest, mivel hidrofílebbek. Ennek megfelelően gyorsabban ürülnek ki a normoxiás sejtekből, így magasabb tumor/izom arány érhető el alkalmazásukkal. A réz izotópok közül réz-64 hosszabb felezési ideje és kedvező nukleáris tulajdonságai miatt a ^{64}Cu -jelzett ATSM molekula a legígéretesebb radiogyógyszer [86]. Ez az izotóp nem csak PET képalkotásra alkalmas, hanem terápiára is [87], de sajnos a réz-64 izotóp hozzáférhetősége limitált, mivel a targetanyag, amiből ciklotronban elő lehet állítani drága, ami hátráltatja használatának széles körben történő elterjedését.



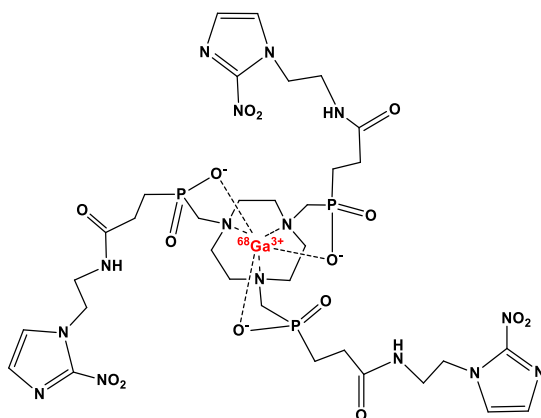
23. ábra $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$ szerkezete

Nitroimidazolt tartalmazó radiofarmakonok harmadik csoportját a bifunkciós kelátort tartalmazó vegyületek alkotják, amelyek főleg gallium-68 izotópot komplexálnak. Ezekben a molekulákban a komplexképző egy linker molekulán keresztül kapcsolódik a nitroimidazolhoz. Ezek a radiógyógyszerek hidrofil jellegűek és kis $\log P$ értékkel jellemezhetőek. Ez azt jelenti, hogy gyorsan ürülnek ki az egészséges sejtekből, ami magas tumor/izom arányt eredményez a PET felvételeken, de ugyanakkor nem elég lipofilok ahhoz, hogy átjussanak a vér/agy gáton, ezért nem alkalmasak agyi tumorok vizsgálatára. A gallium-68 izotóp komplexálására leggyakrabban alkalmazott kelátorok a makrociklusos DOTA és a NOTA (2,2',2''-(1,4,7-triazaciklononán-1,4,7-triil)triacetsav). Hoigebazar és munkatársai ezen komplexképzők különböző származékainak a felhasználásával állítottak elő négy 2-nitroimidazol származékot, nevezetesen a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NI-t}$ és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-SCN-NI-t}$ [88], valamint a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-NI-t}$ és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-SCN-NI-t}$ [89]. (24. ábra) A vegyületeket gallium-68 izotóppal jelölték és az elvégzett preklinikai vizsgálatok alapján az előállított radiofarmakonok alkalmasak voltak a tumorhipoxia kimutatására.



24. ábra Gallium-68 jelzett nitroimidazol alapú radiofarmakonok

Seelam és munkatársai a 3,3',3''-(((1,4,7-triazonán-1,4,7-triil)tris(metilén))tris(hidroxifoszforil))tripropánsav (TRAP) ligandum felhasználásával kifejlesztettek egy multivalens 2-nitroimidazol származékot, a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-TRAP-NI-t}$ [90] (25. ábra).



25. ábra $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-TRAP-NI}$

A kutatók a fent említett molekulák radiojelzésére gallium-68 izotópot alkalmaztak, így felhasználásuk csak olyan PET centrumban lehetséges, ahol $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor vagy

ciklotron található, mivel a gallium-68 izotóp kicsivel több, mint egy óras felezési ideje nem teszi lehetővé a ^{68}Ga -jelzett radiológyszer szállítását.

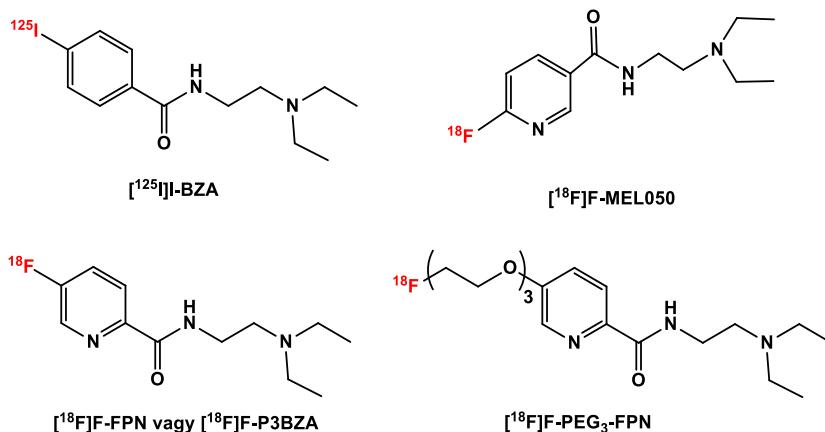
3.5.5 Malignus melanomában alkalmazható radiofarmakonok

Napjainkban a klinikai gyakorlatban a melanoma tumor kimutatásában még mindig a ^{18}F FDG a leggyakrabban alkalmazott radiológyszer, ami ki tudja mutatni nemcsak a primer tumorokat, hanem a nagyobb metasztázisokat is.

A pontosabb diagnózis érdekében az elmúlt években újabb radiofarmakonok jelentek meg, melyek még nem terjedtek el a klinikai diagnosztikában, de mivel receptor-ligand kölcsönhatáson alapulnak, ezért specifikusabb radiológyszerek az ^{18}F FDG-hez képest. Ilyen típusú vegyületek például, a melanint targetáló radiofarmakonok. Ebbe csoportba tartoznak a különböző benzamid származékok. Az elsőként kifejlesztett ilyen típusú radiofarmakon a *N*-[2-(diethylamino)etil]-4- ^{125}I iodobenzamid (^{125}I I-BZA) volt [91] (26. ábra). A radiojelzett benzamid származékok szabadon tudnak áthaladni a sejtmembránon és nagy affinitással kötődnek a melaninhoz, ami magas tumorfelvételt és tumor-háttér arányt eredményez. Ezekre a vegyületekre azonban gyakran lassú hepatobiliáris kiürülés jellemző, ami potenciálisan csökkenti a máj- és vékonybél-metasztázisok kimutathatóságát.

A nikotinamid és a pikolinamid olyan benzamid analógok, amelyek jobb farmakokinetikával rendelkezik az eredeti molekulánál. Ezért ezeknek a vegyületeknek is számos radiojelzett származékát állították már elő, és alkalmazták melanoma detektálására. Irodalomból ismert egyik nikotinamid származék például a *N*-[2-(diethylamino)etil]-6- ^{18}F fluoro-nikotinamid (^{18}F F-MEL050) [92] (26. ábra), mely preklinikai vizsgálatok során jobbnak bizonyult az ^{18}F FDG-nél a primer tumor, valamint a tüdőáttétek kimutatása során. Ígéretes radiológyszer jelölt az 5- ^{18}F fluoro-*N*-[2-(diethyl-amino-ethyl)pikolinamid (5- ^{18}F FPN) [93] (26. ábra), mely szintén jobb képalkotó tulajdonságokkal rendelkezik, mint az ^{18}F FDG, mivel esetében a tumor/háttér arány 10-szer nagyobb, továbbá a kisméretű tüdőáttétek is kimutathatók vele (1-2 mm), hátránya viszont a nagy májfelvétel. A kutatók ezt a problémát a radiofarmakon pegilálásával próbálták kiküszöbölni. Az előállított ^{18}F F-PEG₃-FPN pegilált verzió [94] (26. ábra)

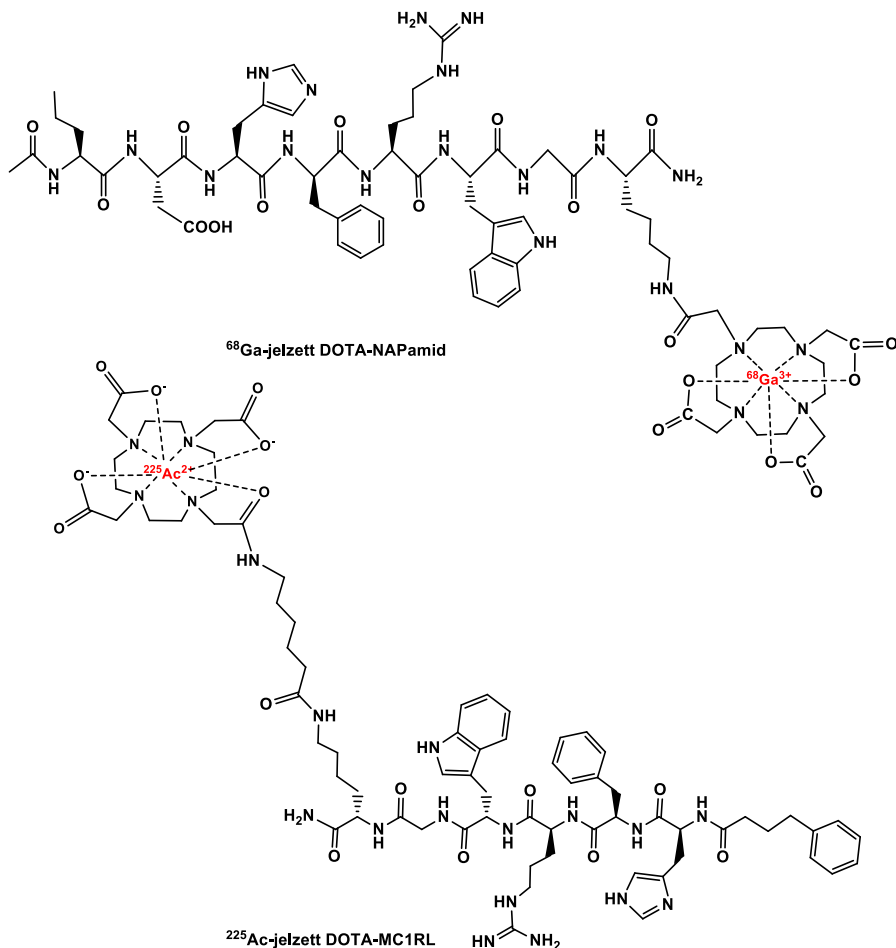
már kisebb májfelvétellel rendelkezett, ezért a máj- és tüdőmetasztázisok detektálására is alkalmasnak bizonyult. A 5- ^{18}F -fluoro-*N*-[2-(diethyl-amino-ethyl)]pikolinamidot, ^{18}F -P3BZA néven klinikai vizsgálat során is alkalmazták már [95], melynek során közel kétszer nagyobb tumorfelvételi értékeket mutatott, mint az ^{18}F FDG.



26. ábra Melanin targetáló radiofarmakonok szerkezete

A másik csoportot alkotják a MC1R receptorhoz kötődő radiofarmakonok, ide tartozik a vizsgálatainkhoz referencia vegyületként alkalmazott ^{68}Ga -jelzett DOTA-NAPamid is [16] (27. ábra).

A szakirodalomban csak néhány radiofarmakonról olvashatunk, amelyet a melanoma radioterápiájára alkalmaztak. Ilyen molekula például az alfa-sugárzó aktínium-225 izotóppal jelzett DOTA-MC1RL radiofarmakon [96] (27. ábra), ami szintén a MC1R receptorhoz kötődik szelektíven. Ez a radiojelzett komplex az elvégzett vizsgálatok alapján hatékonynak bizonyult a kezelt állatok élettartalmának meghosszabbításában.



27. ábra MC1R receptor targetáló radiofarmakonok szerkezete

Megfigyelték, hogy a [²²⁵Ac]Ac-DOTA-MC1RL már egyetlen kezelés alkalmával is gátolta a tumor és a metasztázisok növekedését az egerek uveális melanomájának kezelésekor, valamint az *in vivo* vizsgálatok során a MC1R-pozitív sejtekben és a kiválasztó szervekben dúsult, ugyanakkor alacsony toxicitást mutatott a nem targetált sejtekben, szövetekben [96].

Továbbá preklinikai vizsgálatokat végeztek béta-sugárzó terbium-152 és szamárium-153 jelzett 9.2.27 melanoma monoklonális antitesttel (MAb) [97]. Ezen kívül beszámoltak már az alfa-sugárzó bizmut-213 jelzett cDTPAa-MAb 9.2.27 radiofarmakon felhasználásával végrehajtott targetált immunterápiáról. A radioterápiás vizsgálat során

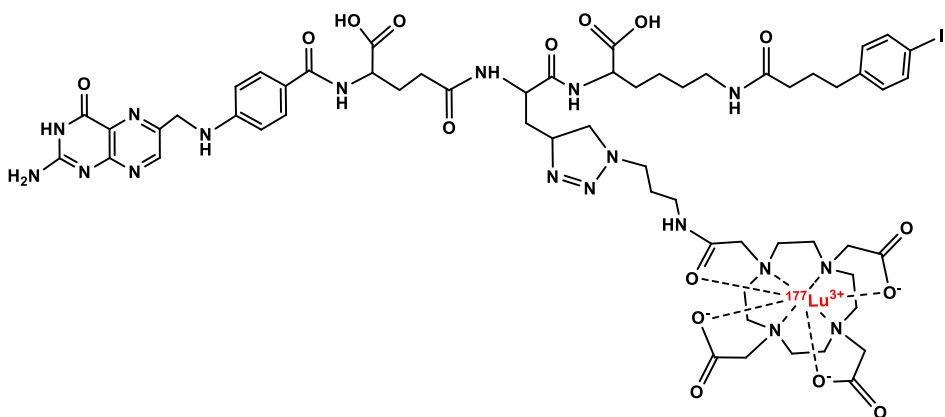
melanoma xenograftjait vizsgálták meztelen egereken és a radiológyszert ebben az esetben is sikeresen megállította a tumor növekedését a kezelés során [98].

3.5.6 Radiológyszerek farmakokinetikai tulajdonságainak módosítása albuminkötő egység beépítésével

A kis molekulájú hidrofíl radiológyszerek nagyon gyorsan ürülnek ki a szervezetből, ami a tumorok kis radiofarmakon-felvételét eredményezheti. Az ilyen típusú radiofarmakonok rövid biológiai felezési idejének kiküszöbölésére több módszer létezik, az egyik lehetőség, amikor egy albuminkötő egységet kapcsolnak a molekulához. Az albuminkötő egység beépítése növeli a molekulák keringési idejét a véráramban és ezáltal növeli a tumor radiofarmakon-felvételét, valamint csökkentheti a vese és a máj sugárterhelését, azaz javíthatja a radiológyszerek farmakokinetikai tulajdonságait is.

A humán albumin a legnagyobb mennyiségben megtalálható fehérje az emberi vérben, tömege körülbelül 67 kDa és a biológiai felezési ideje 19 nap. A vérplazmában 50 mg/mL koncentrációban van jelen és segíti a vér pH értékének a beállítását, valamint a normál vérnyomás fenntartását. A vérben lévő albumin folyamatosan kicserélődik az endotélen keresztül az extravaszkuláris térben lévő albuminnal, így transzport folyamatokat is ellát. Fémion kötőhellyel is rendelkezik, ezen kívül gyógyszerhatóanyagoknak és azok metabolitjainak szállítását is végzi [99].

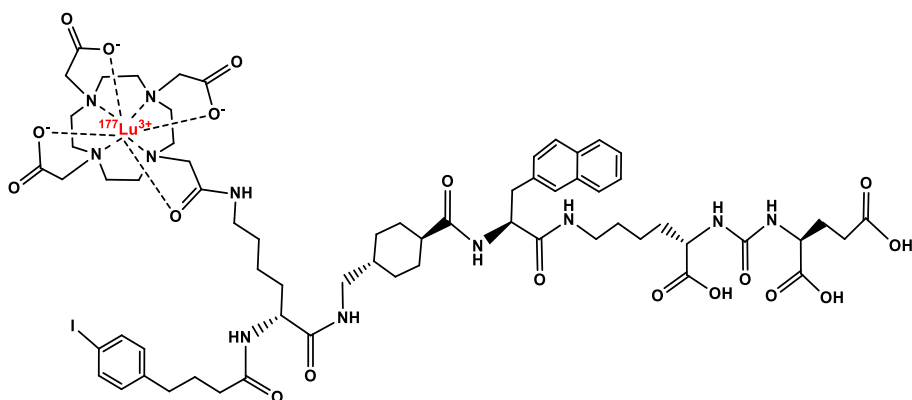
A molekulák egy része reverzibilisen, nem kovalens kötéssel kötődik az albuminhoz, ezért folyamatosan képesek visszakerülni a véráramba és így hosszabb ideig tudják kifejteni a hatásukat a szervezetben. A keringési idő növelésére albuminkötő egységként a kis molekulák közül a *p*-jód-fenil-butánsavat alkalmazzák elterjedten. Ennek a molekulának a konjugálásával először 2009-ben Trüssel és munkatársai növelték sikeresen ¹²⁵I-jelzett antitest fragmentek keringési idejét [100]. 2013-ban Müller és munkatársai egy ¹⁷⁷Lu-jelzett folsav alapú radiológyszert (28. ábra) szintézise során alkalmazták ezt a kémiai módosítást, amellyel folát receptor targetált radioterápiát valósítottak meg [101].



28. ábra [^{177}Lu]Lu-cm09 radiógyógyszer szerkezete

A preklinikai vizsgálat során a [^{177}Lu]Lu-cm09 radiofarmakon tumorfelvétele kétszerese volt az albuminkötő egységet nem tartalmazó referencia vegyület tumorfelvételének, valamint a vese radiofarmakon-felvétele is 30%-kal kevesebb volt [^{177}Lu]Lu-cm09 esetében.

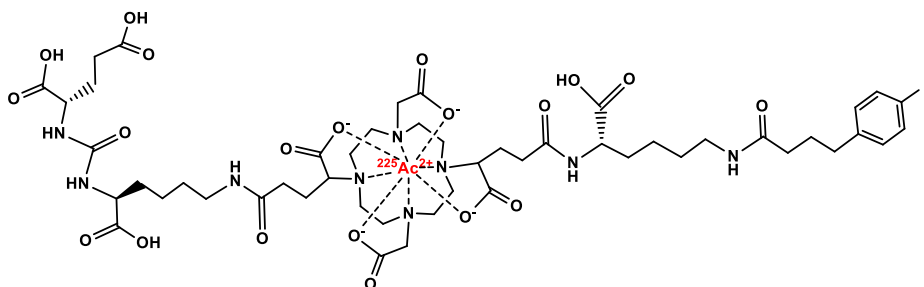
Ennek analógjára több prosztatatarák kezelésére alkalmas PSMA származék esetén is vizsgálták *p*-jód-fenilbutánsav egység bevezetésének a hatását [102]. A tesztelt radiofarmakonok között a [^{177}Lu]Lu-PSMA-ALB-02 (29. ábra) tumorfelvétele kivételesen magas volt 24 órával az injektálás után. A radiógyógyszer tumor-vér aránya ~176-nak adódott, míg a vese felvétele alacsonyabb volt a többi származékhoz képest.



29. ábra [^{177}Lu]Lu-PSMA-ALB-02

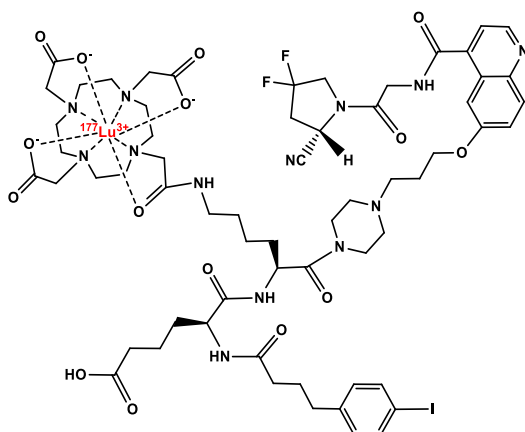
Egy másik PSMA származék, nevezetesen a [^{225}Ac]Ac-PSMA-DA1 [103] (30. ábra) esetében az albuminkötő egységgel megnövelt hosszabb biológiai felezési idő jelentősen

javította a radiofarmakon hatékonyságát. A jelzett vegyület keringési idejének a növelése azért is volt fontos, mert az alfa-sugárzó aktínium-225 izotóp felezési ideje 10 nap, és így a nagyobb tumorfelvétel miatt megnövekedett a citotoxikus hatása.



30. ábra $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-PSMA-DAI}$ radiogyógyszer

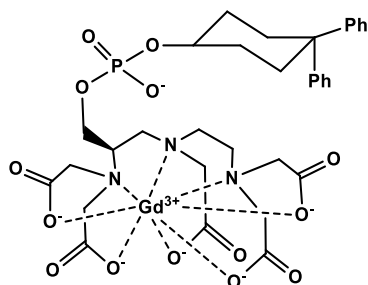
A radiojelzett fibroblast aktivációs fehérje inhibitor (FAPI) is egy gyorsan kiürülő kinolinalapú radiofarmakon, azonban albuminkötő egységgel kombinálva már alkalmassá tehető radionuklid terápiára. Ennek vizsgálatára Ding és munkatársai [104] négy *p*-jód-fenilbutánsav egységgel rendelkező FAPI-t állítottak elő, amelyeket gallium-68, ittrium-90 és lutécium-177 izotópokkal jelöltek. A lutécium-177-tel jelölt vegyületek közül a $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-TE-FAPI-04}$ radioligand (31. ábra) bizonyult a legalkalmasabbnak a FAP-pozitív tumorok targetált radioterápiájára, ami a legmagasabb tumorfelvételnek és a kedvező farmakokinetikai tulajdonságainak köszönhető.



31. ábra $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-TE-FAPI-04}$ radifarmakon szerkezete

Gyakran használt albuminkötő egység még a mirisztinsav, amely egy 14 szénatomos zsírsav. Ha az inzulint ezzel a molekulával módosítjuk, akkor 2-10-szer lassabban ürül ki a szervezetből, mint a humán inzulin [105].

A gadolínium alapú MRI kontrasztanyagok között is találkozhatunk albuminkötő egységet tartalmazó vegyülettel, például a Vasovistban (korábban MS325, gadofosveset) [106] (32. ábra) a 4,4-difenil-ciklohexilcsoport az albuminkötő egység, amire szintén az jellemző, hogy nem kovalens kötéssel kötődik a humán szérum albuminhoz. Ezt a vegyületet mágneses rezonancia angiográfia (MRA) során alkalmazták [107].



32. ábra Vasovist szerkezete

4. Eredmények

4.1 Célkitűzések

Radioaktív fémizotópot komplexált formában tartalmazó radiofarmakonok fejlesztése és alkalmazása egyre nagyobb teret hódít a nukleáris medicinában. Ezeket a biológiai vektormolekula részletet tartalmazó radiogyógyszereket, az alkalmazott radioaktív izotópok nukleáris tulajdonságai szerint lehet felhasználni targetált diagnosztikai és radioterápiás célokra. A humán felhasználás szempontjából nagyon fontos, hogy ezek a fémkomplexek nagy stabilitással és inertséggel, valamint megfelelő farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezzenek *in vivo* körülmények között.

A tumorsejtek burjánzásának egyik következménye a tumorhipoxia, ami jelentősen rontja a rákellenes terápiák hatékonyságát. Ezért a tumor hipoxiás területeinek az előzetes detektálása fontos segítséget nyújthat a kemo- és sugárterápiák tervezése során. Kutatómunkám egyik célja tumorhipoxia PET képalkotással történő kimutatására alkalmas 2-nitroimidazolt tartalmazó, ^{44}Sc - és ^{52}Mn -jelzett radiofarmakonok szintézise, valamint fizikai-kémiai, radiokémiai és preklinikai vizsgálata volt.

A másik feladatom a Kortz és munkatársai által szintetizált három Bi-POP komplex [^{213}Bi]bizmut ionokkal történő szintézise és radiokémiai vizsgálata volt. Az előállítani kívánt polioxopalládátok közül két vegyület összetételét úgy terveztük meg, hogy biomolekulákhoz konjugálhatóak legyenek. Ezért előállításukat azidocsoporttal, illetve karboxilcsoporttal funkcionalizált fenil-arzenát fedőcsoporttal valósítjuk meg. A bizmut-213 radionuklid nehéz hozzáférhetősége miatt kísérleteinkhez ciklotronban előállított bizmut-205/206 izotópot használtunk.

A harmadik kutatási feladatom a radiofarmakonok farmakokinetikai tulajdonságait módosító egyik módszer, nevezetesen az albuminkötő egység hatásának a vizsgálata volt. A kis molekulatömegű peptidek általában rövid biológiai felezési idővel rendelkeznek, ami számos esetben a peptidalapú radiogyógyszerek alacsony tumorfelvételét okozza. A kutatómunkám során vizsgálni kívánt kémiai módosítás, azaz az albuminkötő *p*-jód-fenilbutánsav egység konjugálása a megfelelő peptid származékhoz, növeli a

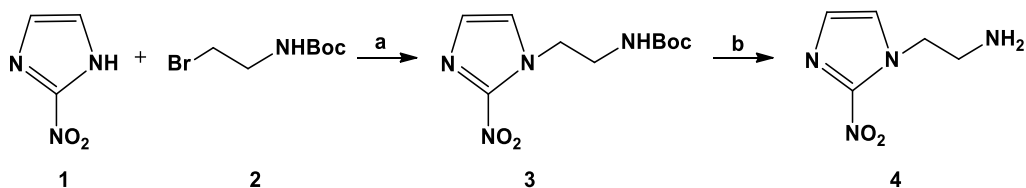
radiofarmakonok keringési idejét, így küszöböli ki ezt a problémát. Ezekhez a kísérletekhez pozitron-sugárzó ^{68}Ga -, alfa-sugárzó ^{213}Bi - és béta-sugárzó ^{177}Lu -jelzett NAPamid peptid származékok előállítását terveztük, amelyekkel a melanoma targetált diagnosztikája, illetve radioterápiája valósítható meg. A radiojelzések ebben az esetben is bizmut-205/206 izotóppal történtek. A $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett vegyületek terápiára nem használhatók, de alkalmasak a radiofarmakonok tumor specifikálásának és farmakokinetikai tulajdonságainak a vizsgálatára.

4.2 Hipoxia detektálására alkalmas radiofarmakonok előállítása és vizsgálata

4.2.1 $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-DO3AM-NI}$ szintézise, fizikai-kémiai, radiokémiai és biológiai vizsgálata

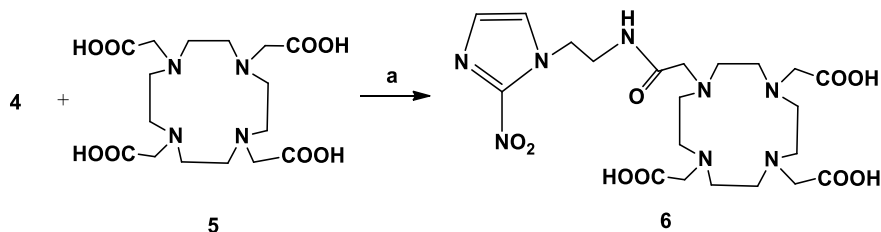
4.2.1.1 DO3AM-NI ligandum előállítása

Hoigebazar és munkatársai konjugálták először a 2-nitroimidazolt (**1**) olyan komplexképzőhöz (DOTA), amely lehetővé teszi a különböző fémek koordinációját (pl.: Ga(III)) és így előállították a DO3AM-NI ligandumot [88]. A kutatómunka első lépéseként ennek a vegyületnek a szintézisét valósítottuk meg a szakirodalomban fellelhető kémiai módszerek alkalmazásával. Először 2-(2-nitro-imidazol-1-il)-etán-amint (**4**) állítottunk elő Zha és munkatársai által ismertett eljárás kismértékű módosításával [108]. Az első reakciólépésben a 2-nitroimidazolt (**1**) K_2CO_3 bázis jelenlétében reagáltattuk *tert*-butil-2-bróm-etil-karbamáttal (**2**) vízmentes dimetil-formamidban, majd a kapott **3**-as vegyületről savas hidrolízissel eltávolítottuk a *tert*-butoxikarbonil védőcsoportot (33. ábra).



33. ábra 2-(2-Nitro-imidazol-1-il)-etán-amin (**4**) előállításának a lépései Reagensek és reakciókörülmények: (a) K_2CO_3 , NaI, DMF, rt, 4 nap, 91%; (b) DKM-TFA (1:1), rt, 1 nap, 78%.

Ezután a **4**-es vegyületet 1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsavhoz (DOTA, **5**) kapcsoltuk Hoigebazar és munkatársai által leírt reakciókörülmények között [88]. A kapcsolási reakciót vízmentes dimetil-formamidban hajtottuk végre és bázisként piridint, míg kapcsolószerként *N,N'*-diciklohexil-karbodiimidet alkalmaztunk (34. ábra).

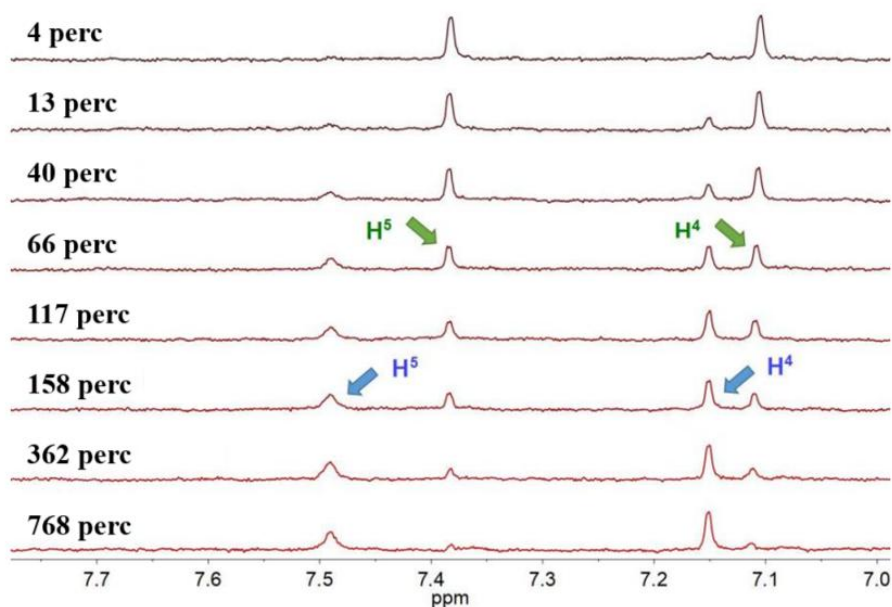


34. ábra A DO3AM-NI ligandum szintézise Reagensek és reakciókörülmények: (a)
DCC, Py, DMF, rt, 1 nap, 36%.

Az előállított DO3AM-NI ligandum (**6**) tisztítását félpreparatív nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel valósítottuk meg. A kapott **6**-os vegyület molekulatömegét tömegspektroszkópiával határoztuk meg, míg szerkezetét NMR-rel igazoltuk.

4.2.1.2 Fizikokémiai vizsgálatok

Az Sc(III)-kelát fizikai-kémiai vizsgálatának első lépése a komplexképződés sebességének a meghatározása volt savas pH-n, mivel a szakirodalomban található, a DOTA, DTPA vagy AAZTA ligandumok Sc(III)-komplexeire vonatkozó egyensúlyi adatok alapján a Sc(DO3AM-NI)-komplex kialakulása kis pH-n volt várható [109, 110]. A pH = 1,52-nél végzett ^1H és ^{45}Sc NMR mérések azt mutatták, hogy a komplexképződés körülbelül tizenkét óra alatt éri el az egyensúlyt (35. ábra).



35. ábra A minták ^1H -NMR-spektrumának időbeli változása az aromás régióban ($\text{pH} = 1,52$, $c_L = 3,8 \text{ mM}$; $c_{\text{Sc}^{3+}} = 4,9 \text{ mM}$; $I = 0,15 \text{ M NaCl}$; 25°C). A **zöld** nyilak a ligandum ^1H -NMR jeleit, a **kék** nyilak a szkandiumkomplex ^1H -NMR csúcsait mutatják.

Ez az előzetes mérés ígéretes a radiojelzés szempontjából, mind kinetikai mind egyensúlyi szempontból, ugyanakkor azt is mutatja, hogy a $\text{Sc}(\text{DO3AM-NI})$ -komplex stabilitási állandójának meghatározásához a nagyon savas mintákban az úgynevezett különmintás „batch” módszert kell alkalmazni, mivel komplexképződés reakciói túl lassúak ahhoz, hogy közvetlen pH-potenciometriás titrálással monitorozhatók legyenek. Ilyen esetekben a makrociklusos ligandumok fémkomplexeinek stabilitási állandóit gyakran így, ezzel az „out-of-cell”-nek is nevezett módszerrel határozzák meg. A módszer során több különálló mintát készítenek abban a pH-tartományban, ahol a komplexképződési egyensúlyokat vizsgálják. Minden minta a titrálási görbe egy pontjának felel meg. A lezárt mintákat N_2 vagy Ar atmoszférában tartják adott hőmérsékleten, amíg az egyensúly be nem áll [111].

Az egyensúlyi méréseket a ligandum 37°C -on ($I = 0,15 \text{ M NaCl}$) mért protonálódási állandóinak meghatározásával kezdtük, tekintettel a kelát *in vivo* körülmények között tervezett alkalmazására. A 1. táblázat a DO3AM-NI ligandum pH-potenciometriás

adatainak illesztésével kapott protonálódási állandókat, valamint a DOTA, a DTPA, az AAZTA és néhány DO3A-monoamid származék irodalmi adatait tartalmazza [112].

1. táblázat Az általunk vizsgált DO3AM-NI, valamint az összehasonlítási és viszonyítási alapként használt DOTA, DO3AMnBu, DO3AM-NI, DTPA és AAZTA ligandumok lépcsőzetes protonálódási állandói^[a], protonálódási állandóinak összege^[b], Sc(III) komplexeik stabilitási állandói^[c] és pSc értékei^[d].

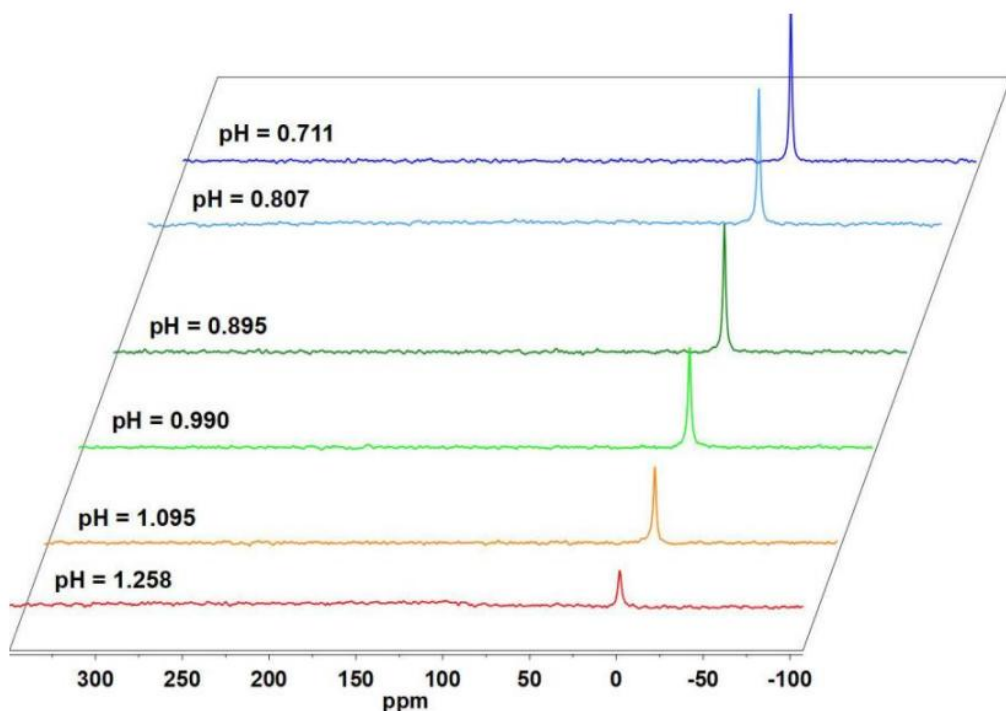
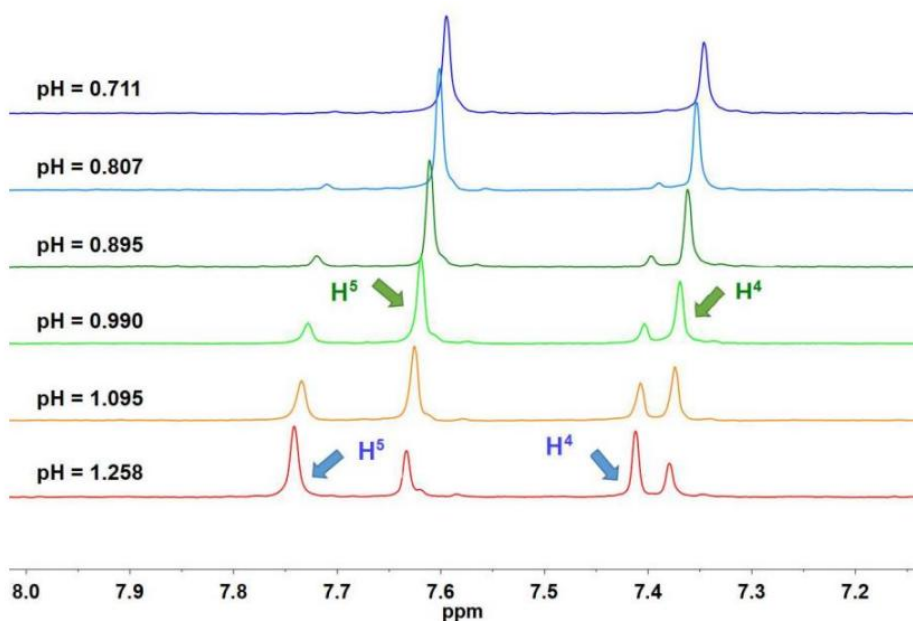
Ligandum	DO3AM-NI	DOTA	DTPA	AAZTA	DO3AM ^{nBu}	DO3AM ^{NIM}
Reakció- körülmények:	0,15 M NaCl, 37°C	0,1 M Me ₄ NCl, 25°C ^[e]	0,1 M Me ₄ NCl, 25°C ^[e]	0,1 M KCl, 25°C ^[f]	1,0 M KCl, 25°C ^[g]	1,0 M KCl, 25°C ^[g]
log K_1^H	8,79(1)	12,90	10,65	11,26	9,78	10,17
log K_2^H	8,59(1)	9,72	8,66	6,62	9,05	9,02
log K_3^H	4,23(1)	4,62	4,36	3,86	4,53	4,41
log K_4^H	2,49(1)	4,15	2,82	2,45	3,17	2,94
log K_5^H	1,00(4)	2,29	2,03	1,88	2,19	1,99
log K_6^H	n.é.	1,34	1,31	1,46	n.é.	n.é.
log K_7^H	n.é.	n.é.	1,30	n.é.	n.é.	n.é.
log β_{015}	25,10	33,68	28,52	26,04	28,72	28,53
log K_{ScL}	22,36(4)	30,79	27,43	27,69	n.m.	n.m.
log $K_{ScL \cdot H}$	n.é.	1,00	1,36	0,86	n.m.	n.m.
log $K_{ScL \cdot OH}$	10,88(5)	n.é.	12,44	n.é.	n.m.	n.m.
pSc	20,74	23,92	23,88	24,72	n.m.	n.m.

^[a] $K_i^H = [H_iL]/[H^+][H_{i-1}L]$; ^[b] $\log \beta_{015} = \sum \log K_5^H$; ^[c] $K_{ScL} = [ScL]/[Sc^{3+}][L]$, a protonálódási állandó $K_{ScLH} = [ScLH]/[ScL][H^+]$ és a tercier hidroxido részecske $K_{ScLOH} = [ScLOH]/[H^+][ScL]$; ^[d] A pSc értékek a fiziológias körülményekhez közel számolva: pSc = -log[Sc(III)]_{szabad}, [Sc(III)]_{teljes} = 1×10^{-8} M, [L]_{teljes} = 1×10^{-7} M és pH = 7,4; komplexképződés hiányában ilyen körülmények között a pSc minimális értéke 8,0; n.é.: nem észlelhető; n.m.: nincs mérve; ^[e] [109]; ^[f] [110]; ^[g] [112].

A DO3AM-NI monoamid típusú ligandum 1,72-11,85 pH-tartományban végzett titrálásával öt protonálódási lépést figyeltünk meg. Ezek közül két lépés, amelyek nagy protonálódási állandóval rendelkeznek, az egymáshoz képest *transz* helyzetben lévő nitrogénatomok protonálódását írják le a makrociklusban. A többi log K_i^H érték a karboxilát csoportok protonálódását jellemzi és sokkal kisebbek a fent említett két

protonálódási állandónál. A DOTA egy acetátcsoportjának amidcsoporttal történő helyettesítése a ligandum protonálódási helyeinek csökkenését eredményezi, ami miatt a ligandum összbázicitása is kisebb lesz, mivel ennek az értékét a protonálódási állandók összegeként határozzuk meg ($\log \beta_{015}$). Ezen kívül az első protonálódási állandó alacsonyabb értékéért az első protonálódási folyamattal versengő gyenge Na^+ komplex képződése (ionerősségből származik) is felelős lehet. Összességében a DO3AM-NI ligandum bázicitása lényegesen kisebb a DOTA-énál, ugyanakkor összevethető, bár egy kicsivel kisebb a 1-es táblázatban megadott DO3AM-monoamidokénál. Általában a ligandum bázicitásának csökkenése az Ln(III)-komplexek stabilitási állandóinak csökkenését eredményezi és ez várható az általunk vizsgált Sc(III)-kelát esetében is.

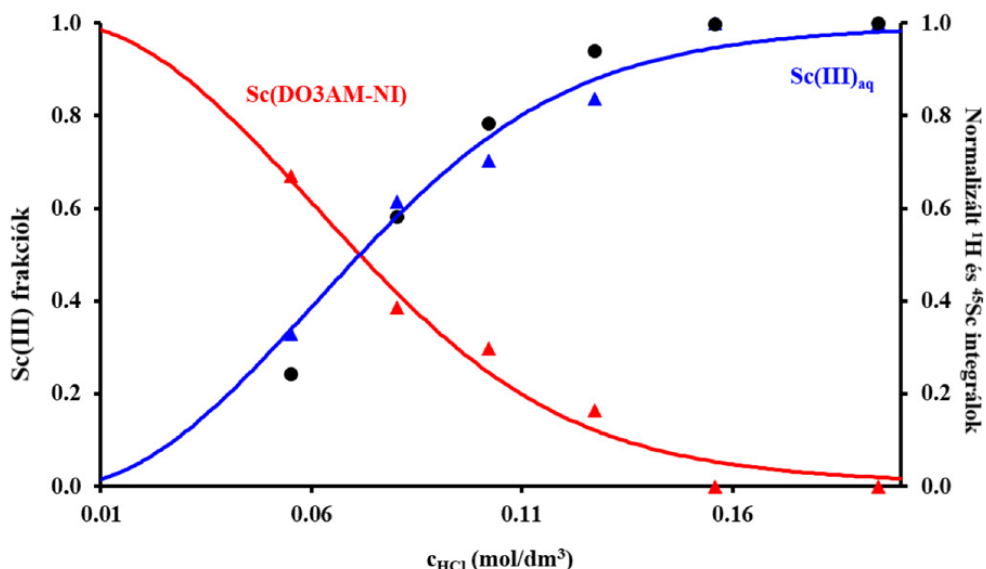
Az Sc(DO3AM-NI)-komplex stabilitási állandóját ^1H - és ^{45}Sc -NMR vizsgálatokkal határoztuk meg 0,055-0,195 M savkoncentráció tartományban készített minták felhasználásával. Az ^1H -NMR a szabad és a kötött ligandumkoncentráció arányát, míg a ^{45}Sc -NMR a szabad Sc(III) koncentrációját adja meg, a komplex ^{45}Sc -NMR jele túl széles az integráláshoz. A mintákat 37°C -on termosztáltuk és a ^1H - és ^{45}Sc -NMR-spektrumukat 60 nap múlva vettük fel. Azért, hogy biztosak legyünk abban, hogy az egyensúly kialakult a mintákban az ^1H és ^{45}Sc -NMR méréseket 90 nap múlva megismételtük. A kapott spektrumok gyakorlatilag megegyeztek a 60. napon felvett spektrumokkal (36. ábra). Ezeket az adatokat kiegészítettük a komplex pH-potenciometriás titrálási adataival. Kísérleti körülményeink között a protonálódás hiányát és a tercier hidroxid komplexek képződését mutattuk ki $\log K_{\text{ScL}\cdot\text{OH}} = 10,88(5)$ értékkel. Az NMR-minták 3,32 mM ligandumot és ScCl_3 -ot, valamint az állandó ionerősség biztosításához 0,15 M NaCl-t tartalmaztak.



36. ábra [A] A Sc(III) - (DO3AM-Ni) egyensúlyi rendszer ^1H -NMR spektrum aromás régiója változó savkoncentrációknál. A zöld nyilak a ligandum ^1H -NMR jeleit, a kék nyilak a szkandium-komplex ^1H -NMR jeleit mutatják. [B] A minták ^{45}Sc -NMR spektruma ($c_{\text{L}} = c_{\text{Sc}^{3+}} = 3,2 \text{ mM}$; $I = 0,15 \text{ M}$; 37°C , 60 nap várakozási idő).

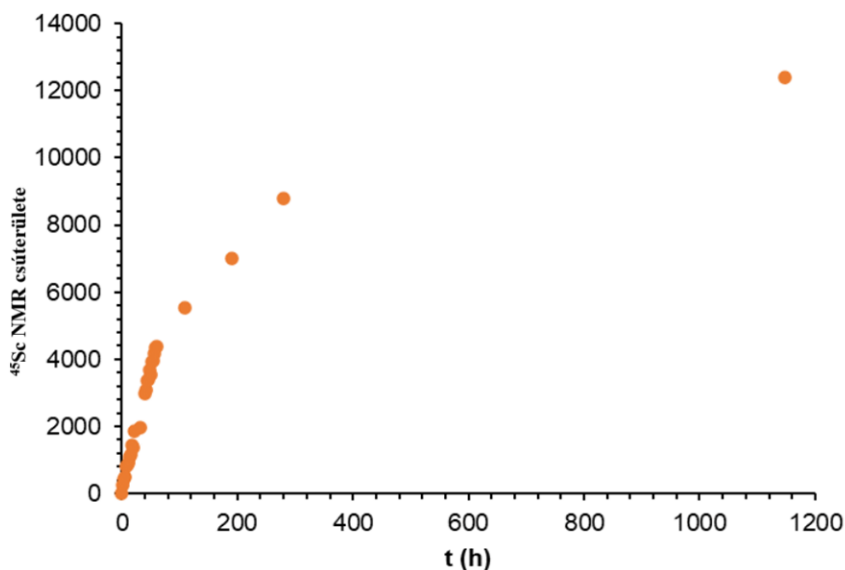
Az előzetesen vártaknak megfelelően, az Sc(DO3AM-NI)-komplex termodinamikai stabilitási állandója ($\log K_{\text{ScL}} = 22,36(4)$) lényegesen kisebb érték, mint a DOTA, DTPA vagy AAZTA ligandumokkal képzett Sc(III)-komplexeiké (1. táblázat). A termodinamikai stabilitási állandók mérsékelt csökkenését már korábban megfigyelték a Gd(III)-ionokkal képződött DO3A-monamidok komplexeinél a Gd(DOTA)-kelát stabilitásához képest [112, 113]. A Sc(DO3AM-NI)-komplex kisebb stabilitási állandója ellenére, az Sc(III)-ion pH = 2,0 körül millimoláris koncentráció tartományban is teljesen komplexbe került (36. ábra).

Mivel azonban félrevezető lehet a különböző bázicitású ligandumokkal alkotott komplexek stabilitási állandóinak közvetlen összehasonlítása (mert ezek az értékek a ligandum bázicitásától is függenek), ezért kiszámítottuk és összehasonlítottuk az 1. táblázatban lévő komplexek $p\text{Sc}$ értékeit, amelyek látszólagos stabilitási állandónak tekinthetők. Ennek meghatározásához felhasználtuk a ligandumok protonálódási állandóit, az oldatban jelen lévő komplexek stabilitási állandóit és a Sc(III)-ion hidrolízisét (a [114] hivatkozás szerint a $\log \beta_{\text{Sc}(\text{OH})} = -4,3$, a $\log \beta_{\text{Sc}(\text{OH})_2} = -9,7$, a $\log \beta_{\text{Sc}(\text{OH})_3} = -16,1$, a $\log \beta_{\text{Sc}(\text{OH})_4} = -26,0$ és a $\log \beta_{\text{Sc}_2(\text{OH})_4} = -6,0$). A kapott adatok alapján az Sc(DO3AM-NI)-komplex fiziológiás pH közelében alacsonyabb látszólagos stabilitással bír a Sc(AAZTA)- és a Sc(DOTA)-kelátokhoz képest. Ez a csökkenés azonban jóval kisebb, mint a termodinamikai stabilitási állandó esetében kapott öt-nyolc log-egység csökkenés. A Sc(DO3AM-NI) látszólagos stabilitási állandójának kismértékű csökkenése főleg a kísérleti körülmények közötti különbségeknek tudható be, kevésbé a karboxilát fémkötő egység helyett alkalmazott amidcsoportnak.



37. ábra A $[Sc(III)-DO3AM-NI]-[H]^+$ rendszer eloszlásgörbéi (folytonos vonalak) az ^1H és ^{45}Sc -NMR jelekintenzitásából számolva. $Sc(III)_{aq}$ normalizált intenzitása (fekete pontok) és az oldatban lévő kötött (piros háromszögek) és szabad (kék háromszögek) ligandumban lévő nitroimidazoil-protonok intenzitását jelzik. (3,32 mM ligandum és $ScCl_3$, $I = 0,15$ M NaCl, $37^\circ C$).

Mivel kísérleteink során a $Sc(DO3AM-NI)$ -komplex stabilitása kisebbnek bizonyult, mint az összehasonlításra használt komplexeké, ezért különösen fontos volt megvizsgálni a komplex inertségét is. A makrociklusos ligandumok komplexei esetén a savkatalizált disszociációt tekintik a fő disszociációs útnak, amely felelős a DOTA-alapú ligandumok komplexeiből történő fémionvesztésnek. Ezért erős sav (1 M HCl) jelenlétében vizsgáltuk a $Sc(DO3AM-NI)$ -komplex disszociációjának a sebességét. Két párhuzamos kísérletben végeztük a vizsgálatot és a következő sebességi állandókat kaptuk: $(1,55 \pm 0,04) \times 10^{-6} s^{-1}$ és $(1,67 \pm 0,05) \times 10^{-6} s^{-1}$. (38. ábra) A $Sc(DO3AM-NI)$ esetében kapott érték egynegyede a $Sc(DOTA)^-$ -komplex azonos körülmények között meghatározott sebességi állandójának, és több nagyságrenddel kisebb, mint az $Sc(AAZTA)^-$ -komplexre korábban meghatározott érték ($0,1 M^{-1}s^{-1}$) [109, 110]. Ezek az adatok egyértelműen azt mutatják, hogy az $Sc(DO3AM-NI)$ -komplex igen jó inertséggel rendelkezik és alkalmas *in vivo* vizsgálatokra.



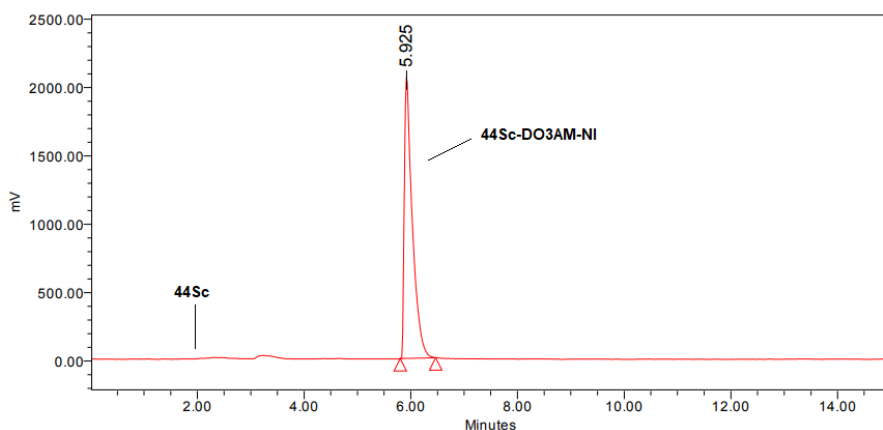
38. ábra A szabad Sc(III)-nak megfelelő ^{45}Sc NMR csúcsterület az idő függvényében az Sc-DO3AM-NI disszociációja során 1,0 M HCl-ben ($c_{\text{komplex}} = 7,30 \text{ mM}$; $I = 1,0 \text{ M}$; 25°C).

Összefoglalva, a Sc(DO3AM-NI)-komplex fizikai-kémiai vizsgálatai azt mutatják, hogy ha az acetátotcsoportot acetamidcsoporttal helyettesítjük a DOTA vegyületen, akkor az megváltoztatja a ligandum tulajdonságait, annak összbázicitását. Ez a változás okozza a Sc(DO3AM-NI)-komplex stabilitásának mérsékelt csökkenését. Ugyanakkor az elvégzett vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a Sc(DO3AM-NI)-komplex, a Sc(DOTA)-komplexhez képest is, nagy inertséggel rendelkezik és ez kiváló Sc-kötővé teszi a DO3AM-NI ligandumot.

4.2.1.3 DO3AM-NI ligandum radiojelzése szkandium-44 és galium-68 izotópokkal és a jelzett vegyületek radiokémiai vizsgálata

A radiokémiai kísérletek során először előállítottuk a DO3AM-NI radiokémiai jelöléséhez szükséges pozitron-sugárzó szkandium-44 izotópot. A ciklotronban történő előállítását kalcium target protonbesugárzásával valósítottuk meg, melynek során $^{44}\text{Ca}(p, n)^{44}\text{Sc}$ magreakcióval nyertük a szkandium-44 izotópot [115], amelyet a kalciumtól és más fémalapú szennyeződésektől Happel és munkatársai [116] által leírt módszerrel választottuk el. Ennek során a targetanyagot feloldottuk 3 M-os sósavban és egy kation

cserélő gyantán megkötöttük. Ezután a kalciumot és az egyéb fémszennyeződések 3 M-os sósavas és 1 M-os salétromsavas mosással távolítottuk el ^{44}Sc mellől, amelyet végül 0,1 M-os sósav oldattal eluáltunk le a gyantáról. A tisztítás után nyert ^{44}Sc oldattal, magas jelölési hozam mellett (>93%) valósítottuk meg a DO3AM-NI ligandum radioaktív jelölését a következő módon. 500 μL ^{44}Sc (100-150 MBq) oldathoz 100 μL NaOAc/HOAc puffert (3 M, pH = 4), 20 μL 5%-os NaOH oldatot és 5 μL DO3AM-NI törzsoldatot (1 mg/mL) adtunk, majd a reakcióelegyet 95°C-on 15 percig melegítettük. Az előállított ^{44}Sc -komplexet szilárd fázisú extrakcióval (SPE) tisztítottuk LiChrolute EN oszlopon. Ennek során először a radiofarmakont az SPE oszlopon megkötöttük, majd 1 mL vízzel mostuk, végül víz és etanol 1:1 arányú keverékével (0,5 mL) eluáltuk. A tisztított jelzett komplex radiokémiai tisztaságát (RCP-t) radio-HPLC-vel határoztuk meg, ami 95% feletti volt (39. ábra).



39. ábra A tisztított ^{44}Sc -DO3AM-NI radiokromatogramja. A radio-HPLC vizsgálatához Luna C18 3 μm (150 x 4,6 mm) oszlopot használtunk. Az A oldószer: oxálsav (0,01 M pH = 3); a B oldószer: acetonitril volt.

A biológiai vizsgálatokhoz referencia vegyületként előállítottuk a ^{68}Ga -jelzett DO3AM-NI vegyületet is. A DO3AM-NI ligandum galium-68 izotóppal történő radioaktív jelölését Hoigebazar és mtsai. [88] által leírt módszer módosított változatával végeztük. A radioaktív jelöléshez a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátorból eluált ^{68}Ga oldatot alkalmaztunk, amelyet Eppard és munkatársai [117] által javasolt utófeldolgozási módszerrel kezeltünk. Ennek során az eluátumot Strata SCX kationcserélő oszlopra vittük

fel, majd sósav és etanol keverékével (0,15 M HCl 8:2) mostuk az oszlopot, ily módon távolítottuk el a fémszenyeződések a gallium-68 izotóp mellől, amelyet ezután 3 x 100 µL 0,9 M-os HCl etanolos oldatával (9:1) frakcionáltan eluáltunk. Ezt követően a DO3AM-NI prekuzort jó jelzési hozammal (>90%) jelöltük a tisztított gallium-68 izotóppal, melynek során egy frakcióhoz 60 µL NaOAc/HOAc puffert (3 M, pH = 4), 40 µL 5% NaOH és a DO3AM-NI vizes oldatát (1 mg/mL) adtuk. A radioaktív jelölést követően (95°C, 15 perc) a radiojelzett vegyületet szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk fordított fázisú WATERS SepPak C18 Plus oszlopon. Ennek során 5 mL etanollal és 10 mL vízzel kondicionált SPE oszlopra vittük a reakcióelegyet, ezután 1 mL vízzel mostuk, majd víz és etanol 1:1 arányú keverékével eluáltuk a radiokomplexet. A tisztított ⁶⁸Ga-jelzett vegyület radiokémiai tisztaságát radio-HPLC-vel határoztuk meg a ⁴⁴Sc-komplex vizsgálatához alkalmazott körülmények szerint, és a kapott RCP nagyobb volt, mint 96%.

Ezt követően meghatároztuk a radiojelzett komplexek oktanol/víz megoszlási koefficiensét (logP), melynek értéke a [⁶⁸Ga]Ga-DO3AM-NI esetében -3,89, míg a [⁴⁴Sc]Sc-DO3AM-NI esetében -2,59 volt. Az alacsony logP értékek azt mutatják, hogy mindkét radiofarmakon hidrofil sajátságú.

Ezután háromféle módszerrel vizsgáltuk a jelzett vegyületek stabilitását szobahőmérsékleten. Először szérumbiztonsági vizsgálatot végeztünk, ennek során a tisztított radiokomplexek vizes oldatát egerplazmával kevertük össze. Ezután ligandumcserés kísérleteket végeztünk Na₂H₂EDTA és oxálsav jelenlétében külön-külön. Végül a keverékekből különböző időpontokban (0, 60, 120 és 240 perc) vett minták radio-HPLC kromatogramjait elemeztük. Mindkét radiofarmakon nagy stabilitással rendelkezett a vizsgált körülmények között, mivel 240 perc elteltével is a minták RCP-je mindhárom esetben 98% feletti volt (3. táblázat).

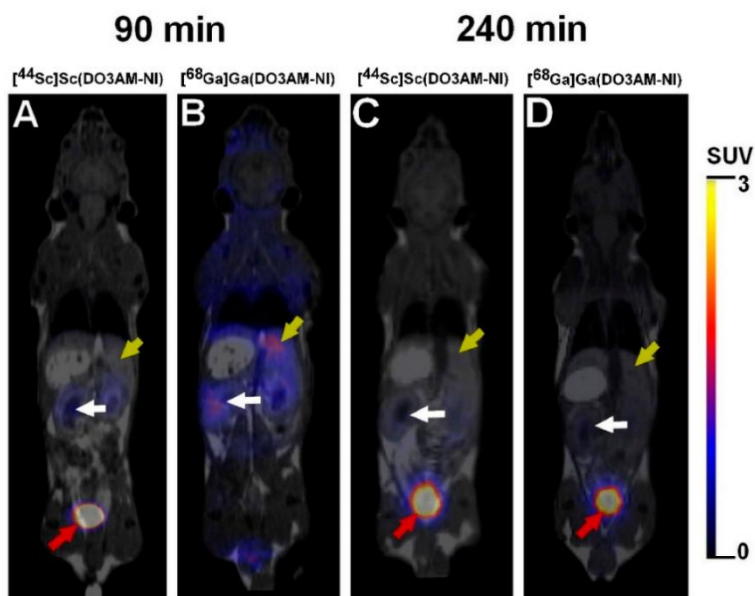
3. táblázat A [⁴⁴Sc]Sc-DO3AM-NI stabilitásvizsgálatai különböző időpontokban

Stabilitásvizsgálatok	A különböző időpontokban vett minták radiokémiai tisztasága (%)			
	0 perc	60 perc	120 perc	240 perc
szérumbiztonság	100	99	98	98
ligandumcsere Na₂H₂EDTA-val	99	99	99	98

ligandumcsere oxálsavval	100	100	98	98
-----------------------------	-----	-----	----	----

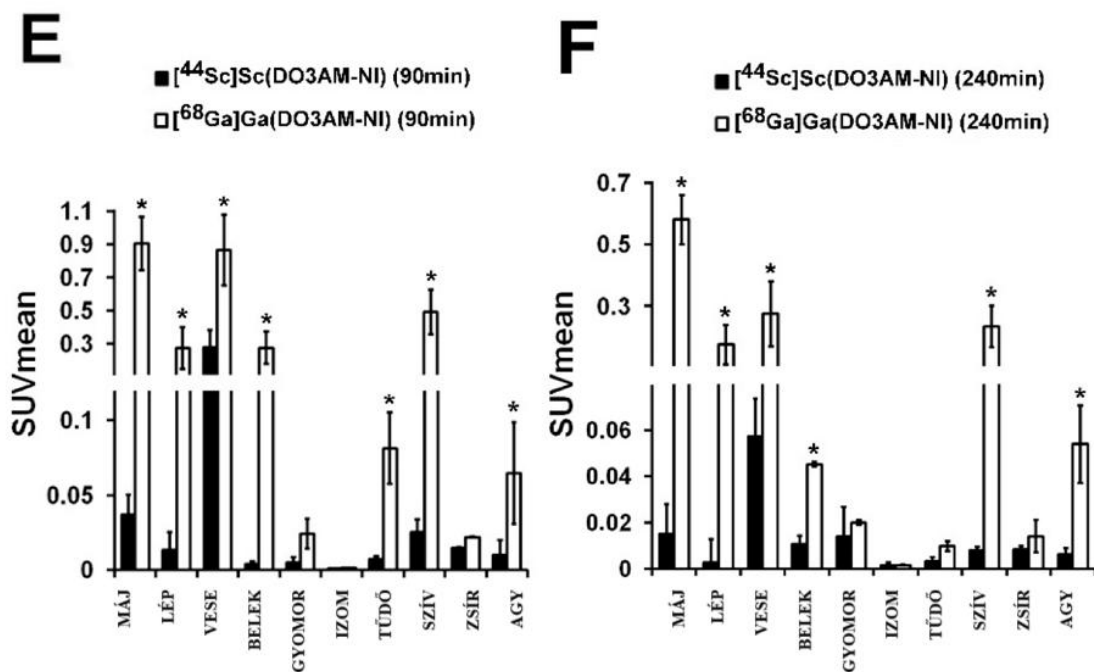
4.2.1.4 A [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI és a [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI *in vivo* és *ex vivo* vizsgálatának eredményei

A biológiai vizsgálatok során a ^{44}Sc - és ^{68}Ga -jelzett DO3AM-NI *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúcióját határoztuk meg egészséges (kontroll) és KB tumort hordozó SCID egerek felhasználásával. Az ehhez szükséges PET/MRI képalkotásokat és *ex vivo* vizsgálatokat 90 és 240 perccel a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI vagy [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI radiofarmakonok intravénás injekciója után valósítottunk meg. A fent említett vizsgálatokat először egészséges állatokon végeztük el, melyek során meghatároztuk a radiofarmakonok szervi eloszlását és kiürülésük módját. A 40. ábrán egészséges egerek koronális PET/MRI képei láthatóak, amelyeken a húgyhólyag és a vesék egyértelműen detektálhatóak a vizsgált időpontokban mindkét radiogyógyszer esetében. A többi vizsgált hasi és mellkasi szervben alacsony radiofarmakon-felvétel figyelhető meg a ^{44}Sc -jelzett vegyület alkalmazása során 90 és 240 perc után is. Ezzel ellentétben a [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI esetében 90 perces inkubációs idő után viszonylag nagy radiogyógyszer felhalmozódás látható a májban (40/B ábra).



40. ábra A [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI és [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI *in vivo* biológiai megoszlása. Reprezentatív koronális PET/MRI képek egészséges kontroll SCID egerekről 90 és 240 perccel [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI (A,C) és [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI (B,D) intravénás injekció után. Sárga nyilak: máj; fehér nyilak: vese; piros nyilak: húgyhólyag.

Továbbá az *in vivo* PET/MRI képek kvantitatív SUV analízise után kijelenthetjük, hogy 90 és 240 perccel a radiofarmakon injekció beadása után szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI felvételt találtunk a májban, lépben, vesében, belekben, tüdőben, szívben és agyban, mint a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI esetében (41. ábra).



41. ábra Az *in vivo* biológiai megoszlási adatok kvantitatív SUV analízise ($n = 5$ kontroll állat/radiofarmakon) 90 perccel (E) és 240 perccel (F) a radiógyógyszer beadása után. A SUV értékek átlag $\pm$ SD formában vannak megadva. Szignifikancia szint [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI és [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI között: $p \leq 0,01$ (*).

A kvantitatív SUV analízisnek az eredményei jól korrelálnak a 4. táblázatban látható *ex vivo* biodistribúciós adatokkal. Az egészséges állatok *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálatait is a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI és [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI radiofarmakonok intravénás injekciója után 90 és 240 perccel történtek. A szervekben és a szövetekben

felhalmozott aktivitásokat gamma-számláló segítségével határoztuk meg. Az *ex vivo* adatok kvantitatív analízise során szignifikáns különbségeket találtunk a szöveti felvételi értékek (%ID/g) között, amikor a két radiofarmakon akkumulációit hasonlítottuk össze az egyes szervekben (4. táblázat).

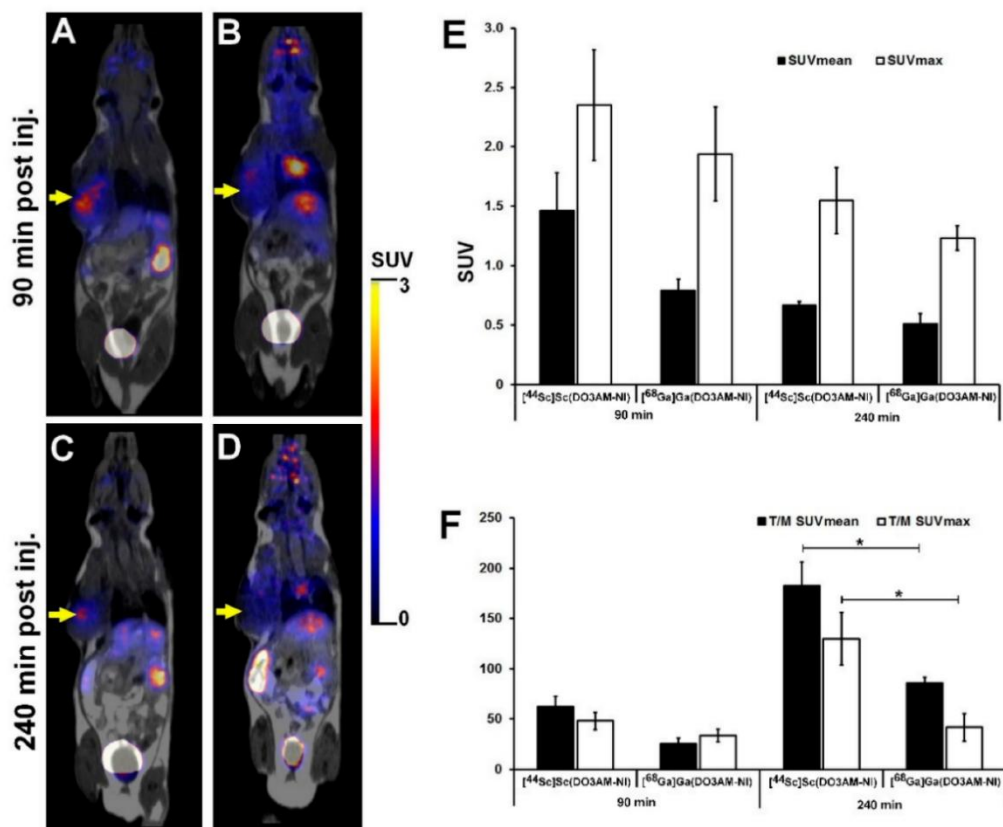
4. táblázat A $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-DO3AM-NI}$ és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO3AM-NI}$ (%ID/g) *ex vivo* biodisztribúciója egészséges kontroll SCID egerekben 90 és 240 perccel a radiofarmakon injekció után. A $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-DO3AM-NI}$ és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO3AM-NI}$ közötti szignifikancia szint 90 és 240 percnél: $p \leq 0,01$ (*). A %ID/g értékek átlag $\pm$ SD-ként vannak megadva.

	$[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-DO3AM-NI}$		$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO3AM-NI}$	
Szerv/Szövet	90 perc (n = 3)	240 perc (n = 5)	90 perc (n = 5)	240 perc (n = 5)
Vér	0,08 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,22 *	0,65 $\pm$ 0,11 *
Vizelet	57,78 $\pm$ 12,41	6,23 $\pm$ 1,25	65,94 $\pm$ 5,21	17,08 $\pm$ 7,97 *
Máj	0,14 $\pm$ 0,09	0,20 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,11 *	0,37 $\pm$ 0,10 *
Lép	0,07 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,14 *	0,32 $\pm$ 0,18 *
Vese	1,17 $\pm$ 0,41	0,89 $\pm$ 0,23	1,32 $\pm$ 0,47	1,21 $\pm$ 0,17
Vékonybél	0,10 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,10 *	0,14 $\pm$ 0,04 *
Vastagbél	0,05 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,004	0,20 $\pm$ 0,13 *	0,15 $\pm$ 0,06 *
Gyomor	0,09 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,005	0,21 $\pm$ 0,04 *	0,22 $\pm$ 0,06 *
Izom	0,01 $\pm$ 0,01	0,007 $\pm$ 0,002	0,10 $\pm$ 0,03 *	0,06 $\pm$ 0,03 *
Tüdő	0,10 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,003	0,49 $\pm$ 0,08 *	0,46 $\pm$ 0,09 *
Szív	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,06 *	0,22 $\pm$ 0,04 *
Zsír	0,01 $\pm$ 0,001	0,01 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,10 *	0,12 $\pm$ 0,08 *

A kapott adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált időpontokban szignifikánsan ($p \leq 0,01$) alacsonyabb %ID/g felvételi értékeket mértünk az egyes szervekben a $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-DO3AM-NI}$ radiofarmakon esetében, mint a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO3AM-NI}$ vizsgálata során. Ezen túlmenően mindkét radioaktív vegyületet alkalmazása során jelentős felhalmozódást figyeltünk meg a vesékben és a vizeletben (4. táblázat), ami azt jelenti, hogy a két radiokomplex vesén keresztül ürül ki szervezetből. Ez összhangban van a radiofarmakonok korábban megállapított $\log P$ értékeivel, amelyek szintén a molekulák hidrofíliájára utaltak.

A fenti vizsgálatok után a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI és [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI tumorspecifikus felhalmozódását KB tumort hordozó egereken tanulmányoztuk PET/MRI képalkotással 90 és 240 perccel a radiógyógyszerek intravénás beadása után. A reprezentatív bomlás korrigált PET felvételeket a 42. ábra mutatja, és ezeken a szubkután növekvő KB daganatok egyértelműen azonosíthatók. A PET képek elemzése során [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI radiofarmakon esetében magas SUVmean és SUVmax értékeket határoztunk meg. A SUVmean: $1,46 \pm 0,32$, míg a SUVmax: $2,35 \pm 0,47$ volt 90 percnél, ugyanakkor 240 percnél a SUVmean: $0,67 \pm 0,03$ -nak és SUVmax: $1,55 \pm 0,28$ -nak adódott. Ugyanakkor alacsonyabb radiofarmakon akkumulációt találtunk a KB-tumorokban a gallium-68-al jelölt molekula alkalmazása során. Ebben az esetben a kapott értékek a következők voltak, 90 percnél a SUVmean: $0,79 \pm 0,10$ és a SUVmax: $1,94 \pm 0,40$ volt, míg 240 percnél a SUVmean: $0,51 \pm 0,09$ és SUVmax: $1,23 \pm 0,10$ volt (42/4E. ábra).

A PET felvételek jellemzésének egyik fontos paramétere a tumor és a háttérnek számító izom radiofarmakon-felvételének az aránya. Ez az érték egyértelműen jelzi, hogy mennyire kontrasztos az adott PET kép. 240 perccel a radiofarmakon injekciók beadása után a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI vizsgálatokor kapott tumor-izom arány (T/M) SUVmean értéke ($182,67 \pm 23,50$) és SUVmax értéke ($129,68 \pm 26,11$) szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb volt, a [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI alkalmazása során kapott értékeknél, amelyek a következők voltak: T/M SUVmean: $85,66 \pm 6,06$, T/M SUVmax: $41,72 \pm 13,61$. Nem találtunk azonban szignifikáns különbséget a két radiógyógyszer T/M SUV értékei között 90 perccel az injekció beadása után (42/4F. ábra).



42. ábra Reprezentatív *in vivo* teljes test PET/MRI felvétel KB daganatot hordozó egerekről [⁴⁴Sc]Sc-DO3AM-NI (A,C) és [⁶⁸Ga]Ga-DO3AM-NI (B,D) alkalmazásával 90 és 240 perc intravénás nyomjelző injekció után. A [⁴⁴Sc]Sc-DO3AM-NI és [⁶⁸Ga]Ga-DO3AM-NI felhalmozódásának kvantitatív SUV analízise KB tumorokban (E,F). A bomlás szempontjából korrigált PET/MRI képeket és adatokat 13±1 nappal a tumorsejt-oltás után kaptuk. Sárga nyíl: KB daganatok. Szignifikancia szint: $p \leq 0,01$ (*).

A [⁴⁴Sc]Sc-DO3AM-NI és [⁶⁸Ga]Ga-DO3AM-NI vegyületek KB tumorokban való felhalmozódásának értékelésére *ex vivo* szervi megoszlás vizsgálatokat is végeztünk. Az 5-ös táblázatban megadott adatok azt mutatják, hogy a radiofarmakonok beadása után 90 és 240 perccel nincs szignifikáns különbség a radiojelzett komplexek tumorfelvételi értékei között, ugyanakkor a [⁴⁴Sc]Sc-DO3AM-NI tumorfelvétele valamivel nagyobb volt mindkét vizsgált időpontban. Ezen kívül a tumor-izom arányok (T/M) kiszámításakor azt találtuk, hogy a [⁴⁴Sc]Sc-DO3AM-NI T/M aránya mindkét időpontban körülbelül 10-15-ször nagyobb volt, mint a [⁶⁸Ga]Ga-DO3AM-NI T/M aránya, és ez a különbség szignifikáns volt ($p \leq 0,01$).

5. táblázat A [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI és [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI tumorfelvételének (%ID/g) *ex vivo* értékelése KB tumorokban 13 ± 1 nappal a szubkután tumorindukció után A [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI és a [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI tumor-izom aránya (T/M) közötti szignifikancia szint 90 és 240 percnél: $p \leq 0,01$ (*). A %ID/g értékek átlag $\pm$ SD-ként van megadva.

Tumor	[^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI		[^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI	
	90 perc	240 perc	90 perc	240 perc
KB tumor (n = 5)	$0,82 \pm 0,11$	$0,70 \pm 0,14$	$0,62 \pm 0,10$	$0,46 \pm 0,07$
T/M	$79,30 \pm 5,26$ *	$99,35 \pm 5,14$ *	$6,28 \pm 1,11$	$7,51 \pm 1,13$

Az elvégzett biológiai vizsgálatokat összegezve, azt mondhatjuk, hogy a PET felvételeken a szubkután növekvő KB daganatok egyértelműen azonosíthatóak voltak a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI alkalmazásakor, továbbá a PET képek kvantitatív SUV analízise során magasabb SUV értékeket és jelentősen magasabb T/M arányokat kaptunk mindkét vizsgált időpontban a [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI molekulához képest. Ezen kívül az *in vivo* vizsgálatok eredményei jó egyezést mutattak az *ex vivo* vizsgálatokkal. Így az elvégzett vizsgálatok alapján kijelenthetjük, hogy a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI radiofarmakont jobb képalkotó és farmakokinetikai tulajdonságok jellemzik a [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI vegyülettel összehasonlítva, ami részben a szkandium-44 hosszabb felezési idejének is köszönhető. A preklinikai vizsgálatok során megállapított kedvező tulajdonságai a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI vegyületet potenciális tumorhipoxia detektálására alkalmas radiogyógyszerré teszi.

4.2.2 ^{52}Mn - és ^{44}Sc -jelzett PC2AM-NI és a PC2A-Ph-NI szintézise, fizikokémiai, radiokémiai és biológiai vizsgálata

Ebben a fejezetben két másik tumorhipoxia kimutatására alkalmas 2-nitroimidazol származék szintézisét, fizikokémiai, radiokémiai és preklinikai vizsgálatáról számolunk be. Az előállítani kívánt vegyületek PCTA komplexképzőt tartalmaznak, ami kiválóan koordinálja a Mn(II)- és a Sc(III)-ionokat. Ennek a két fémnek PET képalkotásra alkalmas pozitron-sugárzó izotópjai vannak, nevezetesen a mangán-52 és a szkandium-44. Ezért a

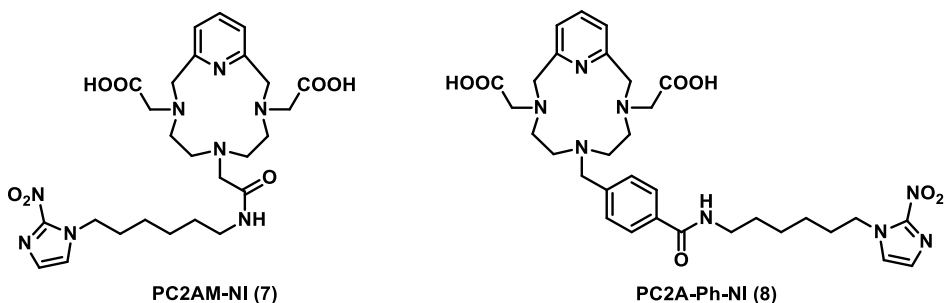
kutatómunka során a PC2AM-NI és a PC2A-Ph-NI ligandumok Mn(II)- és a Sc(III)-ionokkal képzett komplexeinek a fizikai-kémiai, radiokémiai és biológiai tulajdonságait terveztük vizsgálni.

4.2.2.1 A PC2AM-NI, a PC2A-Ph-NI és a PC2AM^{nBu} komplexképzők szintézise

A makrociklusos 3,9-PC2A származék előállítását először A. Dean Sherry és munkacsoportja dolgozta ki [118], később a ligandum fémionokkal képződő komplexeit (különösen a Mn(II)-komplexet) Tircsó Gyula kutatócsoportja vizsgálta részletesen [119]. Azóta megjelent publikációkban megtalálható a 3,9-PC2A makrociklus különböző diészter származékainak előállítása (pl. 3,9-PC2A^{Me} [120], 3,9-PC2A^{Et} [121], 3,9-PC2A^{tBu} [122]), melyeket a 6-Boc-piklén makrociklusos vegyületből [123] egyszerűen előállíthatunk.

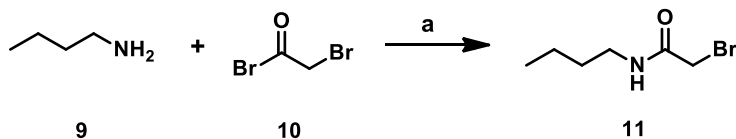
A tervezett ligandumok makrociklusos vázának 3-as és 9-es pozíciójában lévő aminocsoportokhoz kapcsolt oldalláncok a fémionok koordinációját biztosítják. Míg a 6-os pozícióba további, extra funkció, például egy biológiailag aktív molekularészlet is beépíthető, ami lehetővé teszi a komplex kóros sejtekhez, szövetekhez történő célba juttatását. A vizsgálandó ligandumok esetében erre a célra a hipoxiára érzékeny nitroimidazolt alkalmazunk, amely ebben a pozícióban a radioizotóp koordinációs szférájától távolabb található, ezért valószínűleg nem befolyásolja majd a radiojelzett komplex szelektivitását.

A mangán-52 és szkandium-44 izotópokkal jelölhető két ligandumot, nevezetesen a PC2AM-NI (7), a PC2A-Ph-NI (8) vegyületeket Tircsó Gyula és munkatársai állították elő és bocsátották a rendelkezésünkre [124]. A PC2AM-NI, a PC2A-Ph-NI ligandumok szerkezete a 43. ábrán látható.



43. ábra A PC2AM-NI, a PC2A-Ph-NI ligandumok szerkezete

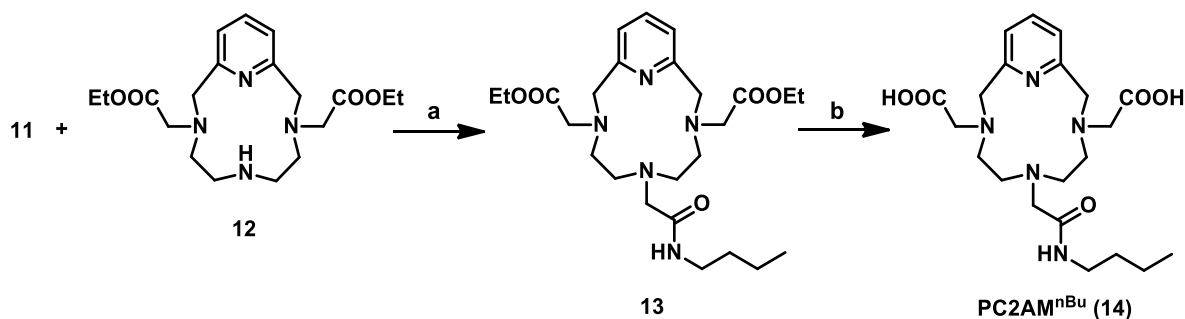
A fizikokémiai vizsgálatokhoz előállítottuk a PC2AM^{nBu} modellvegyületet is, melynek Sc(III)-ionnal alkotott fémkomplexének stabilitását, képződési sebességét és inertségét vizsgáltuk. A modellvegyület előállítását a 6-os pozícióban kialakítandó oldallánc szintézisével kezdtük. Ennek során a 6-os aminocsoport alkilezésére felhasználható 2-bróm-*N*-butilacetamid (**11**) vegyületet állítottuk elő butil-amin (**9**) és brómacetil-bromid (**10**) acilezési reakciójában. (44. ábra)



44. ábra 2-Bróm-*N*-butilacetamid előállítása Reagensek és reakciókörülmények: (a)

K₂CO₃, DKM, 2-3°C → 25°C, 1 óra, 21%.

A PC2AM^{nBu} modellvegyületet (**14**) 3,9-PC2A^{Et} (**12**) makrociklusból állítottuk elő két lépésben. (45. ábra) Először a 3,9-PC2A^{Et} (**12**) vegyületben [121] található szekunder aminocsoportot reagáltattuk 2-bróm-*N*-butilacetamiddal (**11**), majd a reakcióból kinyert PC2A^{Et}1AM^{nBu} (**13**) termékben található etil-védőcsoportokat lúgos hidrolízissel eltávolítottuk. A preparatív HPLC-s elválasztást követően sikerült tisztán izolálni a PC2AM^{nBu} (**14**) ligandumot.



45. ábra PC2AM^{nBu} előállításának lépései Reagensek és reakciókörülmények: (a) K₂CO₃, MeCN, rt, 1 óra, 72%; (a) NaOH, absz. EtOH, 60°C, 1 óra, 46%.

4.2.2.2 PC2AM-NI ligandum fizikokémiai vizsgálata

4.2.2.2.1 A PC2AM^{nBu} és a PC2AM-NI ligandumok és fémionokkal alkotott komplexeinek egyensúlyi vizsgálata

A makrociklusos ligandumok egyensúlyi vizsgálatát a ligandumok protonálódási állandóinak meghatározásával kezdtük. A pH-potenciometriás mérés adatait az 6. táblázatban láthatjuk, melyeket a 3,9-PC2A [119] és a PCTA [125] ligandumok megfelelő adataival egészítettünk ki. A protonálódási állandók ismerete elengedhetetlen a fémionokkal alkotott komplexek stabilitásának meghatározásához.

6. táblázat: A PC2AM^{nBu} és a PC2AM-NI ligandumok protonálódási állandói, kiegészítve a PCTA és a 3,9-PC2A ligandumok megfelelő értékeivel (0,15 M NaCl, 25°C)

	PC2AM ^{nBu}	PC2AM-NI	PCTA [119]	3,9-PC2A [113]
$\log K_1^H$	8,79(1)	8,60(3)	9,97	12,25
$\log K_2^H$	7,59(1)	7,39(3)	6,73	5,97
$\log K_3^H$	2,31(2)	2,28(3)	3,22	3,47
$\log K_4^H$	1,28(3)	1,58(3)	1,40	1,99
$\log \beta_2^H$	16,38	15,99	16,70	18,22

Az 6. táblázat alapján látható, hogy a 3,9-PC2A ligandum *N*-donorjai rendelkeznek a legnagyobb bázicitással ($\log \beta_2^H$), aminek legnagyobb mértékű hozzájárulását a makrociklus vázában található szekunder aminocsoport (6-os helyzetű) adja. A többi származék esetében a 6-os helyzetbe szubsztituált elektronszívó csoportok csökkentik az aminocsoport bázicitását, így az első protonálódási állandók 2-3 nagyságrenddel kisebbek. A PCTA ligandum első protonálódási állandójához képest a PC2AM vegyületek megfelelő értékei további egy nagyságrenddel kisebbek, mely bázicitáscsökkenés az acetátcsoport amidcsoportokká történő cseréjével értelmezhető. A piklén típusú ligandumok második protonálódása a makrociklus piridinegységéhez képest valamelyik *cisz*-nitrogénatomján történik meg, mely lépést követően az első proton a jobb töltéseloszlás érdekében a *transz*-nitrogénatomról a másik *cisz*-nitrogénatomra vándorol. Így a folyamatot jellemző második protonálódási állandók a PC2AM vegyületek esetében

nagyobbak, mint a PCTA és a 3,9-PC2A vegyületek esetében találtak. Összességében azonban a PC2AM vegyületek kisebb összbázicitása előrevetíti, hogy a fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitása kisebb lesz. (Megjegyzendő, hogy a komplexek stabilitásának összehasonlítása céljából csak a komplexképzést jelentősen befolyásoló csoportok bázicitását érdemes figyelembe venni, a koordinációs szféra távolabbi részén található csoportok protonálódását figyelmen kívül hagyhatjuk ebből a szempontból).

Az esszenciális, kétértékű fémionokkal képződő komplexek stabilitását pH-potenciometriás mérésekkel, valamint UV-látható spektrofotometriás mérésekkel kiegészítve határoztuk meg. A PC2AM-NI ligandum esetében a Ca(II)-, Mg(II)-, Zn(II)-ionokkal alkotott komplexek stabilitását a függelékben foglaltuk össze, míg a Mn(II)-ionnal alkotott komplex értékei a 7. táblázatban találhatók, melyhez megadtuk az összehasonlító komplexek adatait is. (A PC2AM^{nBu} modellvegyületet csak a Sc(III)-ionnal alkotott komplex stabilitásának meghatározásához használtuk.)

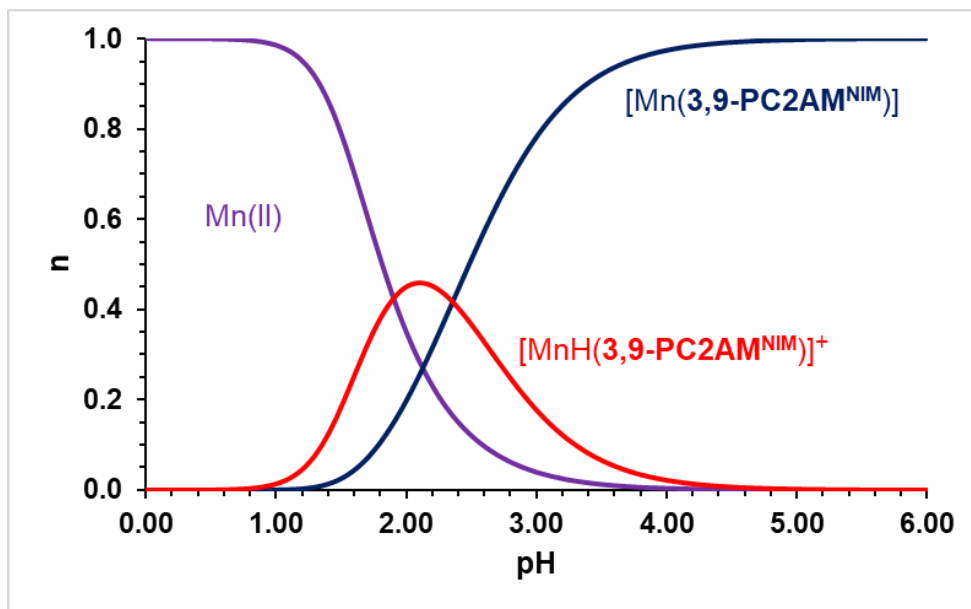
7. táblázat: A **PC2AM-NI** ligandum Mn(II)-ionnal alkotott komplexének stabilitási és protonálódási állandói, kiegészítve a **PCTA** és a **3,9-PC2A** ligandumokkal alkotott komplexek megfelelő értékeivel (0,15 M NaCl, 25°C, $pMn = -\log[Mn^{2+}]_{szabad}$; $c_{Mn(II)} = c_{lig} = 0,01\text{ mM}$)

	PC2AM-NI	PCTA [119]	3,9-PC2A [113]
$\log \beta_2^H$	15,99	16,70	18,22
$\log K_{ML}$	15,45(9)	16,83 / 16,64 ^a	17,09
$\log K_{MHL}$	2,36(6)	1,96	2,14
pMn	8,60	9,74	8,64

^a ¹H-relaxometriás mérésből kapott érték

A 7. táblázat alapján a PC2AM-NI ligandum Mn(II)-ionnal alkotott komplexének stabilitása kisebb, mint az összehasonlító komplexek megfelelő értékei. A kapott stabilitási állandók közvetlen összehasonlítása nem eredményez feltétlenül reális képet, mivel nem veszi figyelembe a fémionok és a protonok közötti kompetíciót a ligandum kötőhelyeiért. A látszólagos (adott körülményekre jellemző) állandók (ilyennek tekinthető a pMn is) meghatározása fiziológias körülmények környékén (pH = 7,4) reálisabb képet

mutathat a komplexek stabilitásáról, ráadásul a komplexek stabilitása ilyen módon direkt is összehasonlítható. A Mn(II)-komplexekre számított pMn értékek közül a legnagyobb a PCTA-hoz tartozik, a $[Mn(PC2AM-NI)]$ - és a $[Mn(3,9-PC2A)]$ -komplexek stabilitása a pMn értékeik alapján pedig közel megegyeznek. Ez a korábbi tapasztalatok alapján azzal magyarázható, hogy az acetátkarok amidcsoportokra történő cseréje mind a komplex egyensúlyi állandójának, mind a pMn értékének csökkenését eredményezi. A 3,9-PC2A ligandum jó affinitással képes a Mn(II)-ionokat megkötni, így a hasonló stabilitással rendelkező $[Mn(PC2AM-NI)]$ -komplex is alkalmas lehet a Mn(II)-ionok stabil megkötésére. A 46. ábrán található a Mn(II)-ionok és PC2AM-NI rendszer koncentrációeloszlás diagramja (melyet a komplex stabilitási és protonálódási állandóinak a felhasználásával szerkesztettük), ez alapján a komplexképződés $pH = 4,25$ felett teljesnek tekinthető.



46. ábra: A Mn(II)-ion és PC2AM-NI rendszer koncentrációeloszlás diagramja ($c_L = c_{Mn} = 2,0$ mM; $25^\circ C$)

A PC2AM-NI ligandum Sc(III)-ionnal alkotott komplexét a $PC2AM^{nBu}$ ligandum felhasználásával modelleztük. A komplex stabilitásának meghatározása különmintás („batch”) módszerrel, ^{45}Sc -NMR spektrometriás, ill. pH-potenciometriás mérésekkel

történt. Az NMR méréshez különmintákat állítottunk össze pH = 0,1 – 1,3 tartományban (a mintákban található ionerősség azonos volt $I = 1,0$ M NaCl). A minták összeállítását követően 1 hetet vártunk az egyensúly beállítására. Ennek igazolására a mintákat több időpontban is lemértük, azért, hogy a jelek alatti terület nagysága ne változzon. A mintákról készített NMR spektrumokban a szabad Sc(III)-hoz rendelhető csúcsok a 0 ppm tartományban találhatók, ezek jel alatti területeit használtuk fel a $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ -komplex stabilitásának meghatározásához. A pH-potenciometriás titrálás esetén Sc(III):ligandum = 1:1 arányú rendszerét egy nappal a titrálás megkezdése előtt állítottuk össze (sav hozzáadása nélkül), majd a komplex savanyított oldatát titráltuk meg NaOH oldattal ($\text{pH}_0 = 1,52$). Azonban a pH-potenciometriás titrálási görbe illesztése alapján nem volt tapasztalható a komplex deprotonálódási folyamata. A ^{45}Sc NMR is csak egyetlen, 90 ppm eltolódásnál jelentkező, változatlan intenzitású jelet mutatott a pH = 4-10 tartományban, és ez a törzskomplexhez rendelhető. (Feltételezhető, hogy a $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ -komplex nem tartalmaz a fémionhoz koordinált vízmolekulát, amely deprotonálódhatna). A kapott ^{45}Sc -NMR jelterületek felhasználásával, a PSEQUAD programmal történő illesztés segítségével számítottuk ki a komplexet jellemző stabilitási állandókat. A $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplex stabilitását hasonlóan határoztuk meg, és az eredményeket a 8. táblázatban foglaltuk össze.

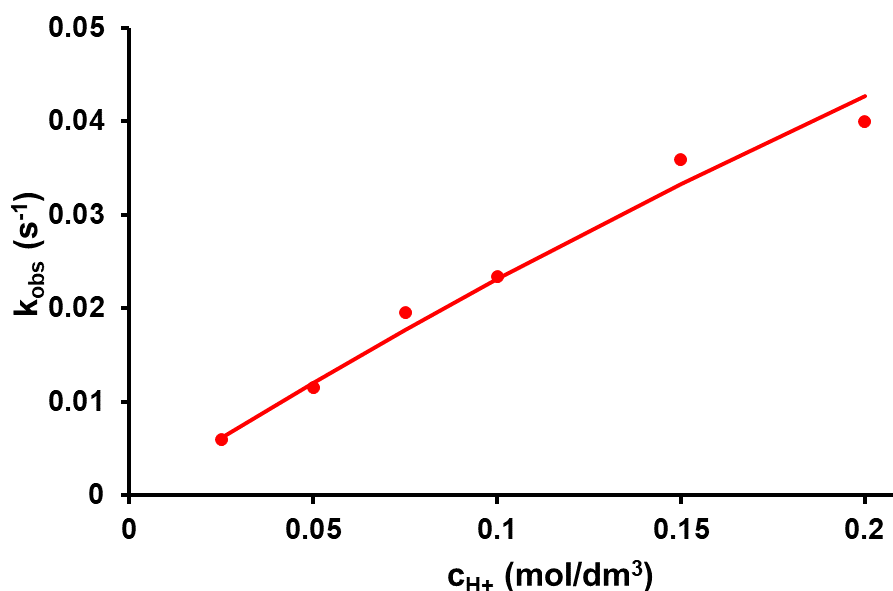
8. táblázat: A $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ - és a $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplexek stabilitási állandói, kiegészítve a **DO3AM-NI** ligandummal [126] alkotott komplex megfelelő értékeivel (25°C) ($p_{\text{Sc}} = -\log[\text{Sc(III)}]_{\text{szabad}}$, $[\text{Sc(III)}]_{\text{teljes}} = 1 \times 10^{-8}$ M, $[\text{L}]_{\text{teljes}} = 1 \times 10^{-7}$ M és pH = 7,4)

		PC2AM ^{nBu}	PCTA	DO3AM-NI [120]
$\log \beta_2^{\text{H}}$		16,38	16,70	17,38
I		1,00 M NaCl	1,00 M NaCl	0,15 M NaCl
Sc(III)	$\log K_{\text{ML}}$	20,74	21,91	22,36
	<i>pSc</i>	19,89	20,21	20,74

A 8. táblázatban szereplő komplexek közül az általunk korábban vizsgált [Sc(DO3AM-NI)]-komplex stabilitása a legnagyobb, azonban ez is elmarad a [Sc(DOTA)]⁻ (log $K_{\text{ScL}} = 30,79$) és [Sc(DTPA)]²⁻ (log $K_{\text{ScL}} = 27,43$) megfelelő értékeitől [109]. A [Sc(PCTA)]- és a [Sc(PC2AM^{nBu})]⁺-komplexek stabilitási állandói között egy nagyságrendnyi különbséget tapasztaltunk, ami a 6-os pozícióban található acetát-oldallánc amidcsoportra történő cseréjével magyarázható (a látszólagos stabilitásban azonban alig tapasztalható különbség).

4.2.2.2.2 A [Mn(PC2AM-NI)]-komplex savasszisztált disszociációjának vizsgálata

A Mn(II)-komplex inertségének vizsgálatát P. Caravan és munkatársai által javasolt módszer szerint kezdtük vizsgálni [127], azonban pH = 6 körülmény és nagy feleslegű Zn(II)-ion jelenlétében a disszociáció nagyon lassú volt. A komplex bomlását ezért erősen savas közegben vizsgáltuk UV-spektrofotometriás módszerrel ($\lambda = 269$ nm). A pszeudo-elsőrendű sebességi együtthatók H^+ -iontól való függését 0,025 és 0,200 M savkoncentráció tartományban határoztuk meg, amely adatokat a 47. ábrán ábrázoltuk.



47. ábra $[Mn(PC2AM-NI)]$ -komplex savasszisztált disszociációjára jellemző sebességi együtthatók a hidrogénion koncentráció függvényében ($T = 25^\circ C$, $I = 1,0\text{ M}$ ($H^+ + Na^+)$ Cl^- , $c_{kompl} = 0,4\text{ mM}$, 269 nm -en követve UV-látható spektrofotometriás módszerrel)

A sebességi együtthatók meghatározása az alábbi egyenlet felhasználásával valósult

$$\text{meg: } k_{obs} = \frac{k_0 + k_1[H^+] + k_2[H^+]^2 + k_3[Cu^{2+}]}{1 + K_{Mn(H_2L)}[H^+]}$$

, ahol a k_0 a spontán disszociációt, a k_1 és a k_2 a savkatalizált disszociációt, a k_3 pedig a kicserélő fémion által okozott disszociációt jellemzi. A 47. ábra alapján látható k_{obs} sebességi együtthatók savfüggése egy enyhén telítési görbét eredményezett, ami azt feltételezi, hogy a savasszisztált disszociáció közben a komplex maga is protonálódik. Mivel az adatok illesztését követően a spontán disszociációt jellemző k_0 együtthatót csak nagy hibával tudtuk meghatározni (a hiba értéke nagyobb volt, mint maga az együttható), ezért annak értékét 0-ra rögzítettük (ez természetesen nem az öndisszociáció hiányát jelenti, csupán ilyen savkoncentráció mellett döntően a savasszisztált disszociáció a meghatározó). A $[Mn(PC2AM-NI)]$ -kompleket jellemző sebességi együttható és a monoprotonált komplex protonálódási folyamatára jellemző egyensúlyi állandó értékeket a 9. táblázatban adtuk meg és kiegészítettük a $[Mn(3,9-PC2A)]$ - és a $[Mn(3,9-PCTA)]$ -komplexek megfelelő értékeivel.

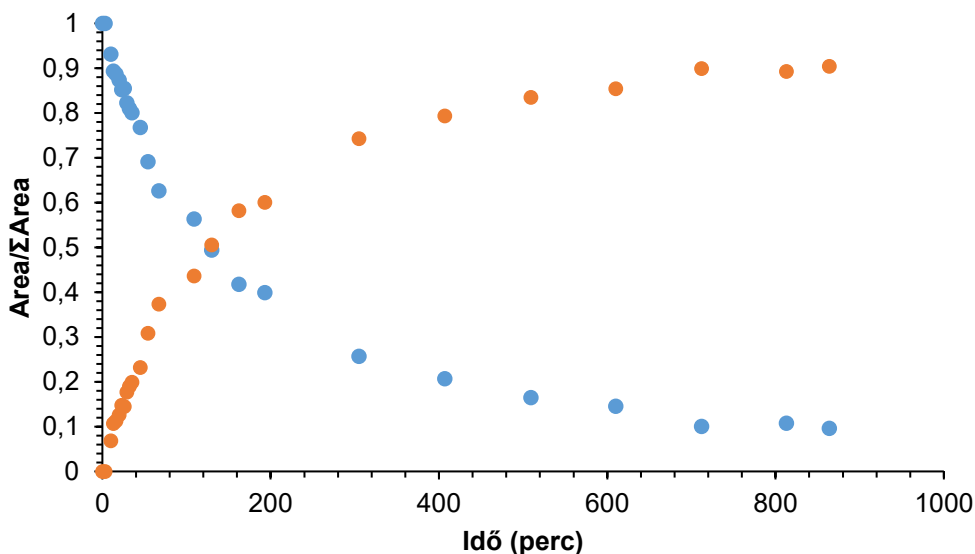
9. táblázat: A $[Mn(PC2AM-NI)]$ -, $[Mn(3,9-PC2A)]$ - és a $[Mn(PCTA)]$ -komplexek disszociációját jellemző sebességi együtthatók és a protonálódási folyamatra jellemző egyensúlyi állandók értékei

	PC2AM ^{NIM}	3,9-PC2A [113]	PCTA [119]
$k_0\text{ (s}^{-1}\text{)}$	0	-	$7,0 \times 10^{-3}$
$k_1\text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	0,25±0,02	221	$8,2 \times 10^{-2}$
$k_2\text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	-	-	$3,5 \times 10^2$
$k_3\text{ (M}^{-1}\text{s}^{-2}\text{)}$	Nem vizsgált	$3,6 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-6}$
$K_{Mn(H_2L)}\text{ (M}^{-1}\text{)}$	0,9±0,6	$3,6 \times 10^3$	91
$t_{1/2}\text{ (s) (0,1 M HCl)}$	29,7	0,031	63,4

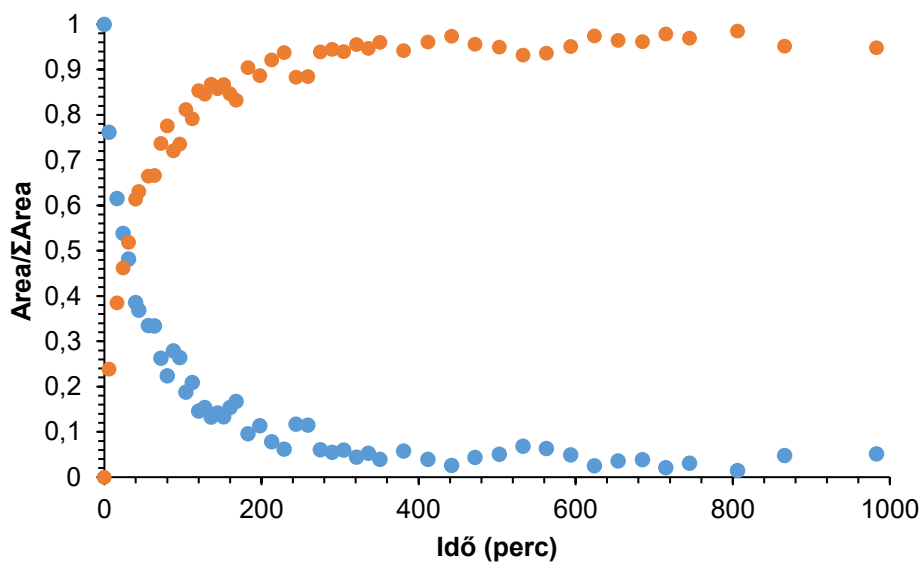
A $[\text{Mn}(\text{PC2AM-NI})]$ -komplex inertségét jellemző k_1 sebességi együttható és a disszociációt jellemző felezési idő (amely egy direkt, a komplex 0,1 M-os sósavban történő disszociációs méréséből számított érték) a $[\text{Mn}(3,9\text{-PC2A})]$ - és a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]$ -komplexek megfelelő értékei között helyezkedik el. A korábbi tapasztalatok alapján vártunk ugyan valamilyen mértékű javulást a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]$ -komplex inertségében a 6-os helyzetben lévő acetátcsoport amidcsoportra történő cseréje miatt, de még ennek elmaradása után is azt mondhatjuk, hogy nagyságrendileg hasonló inertséggel rendelkezik a $[\text{Mn}(\text{PC2AM-NI})]$ -komplex, mint a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]$ -komplex. Viszont jelentős javulás látható $[\text{Mn}(3,9\text{-PC2A})]$ -komplex disszociációját jellemző sebességi együtthatók megfelelő értékeihez képest, ugyanis a 3,9-PC2A ligandum 6-os pozíciójában lévő szekunder aminocsoport nagy bázicitása jóval nagyobb mértékben indukálja a savasszisztált disszociációt.

4.2.2.2.3. A $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ - és a $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplexek kinetikai vizsgálatai

A Sc(III)-komplexek esetében vizsgáltuk, hogy savas körülmények mellett milyen gyorsan képesek komplexet képezni a $\text{PC2AM}^{\text{nBu}}$ és a PCTA ligandumok. A vizsgálatot ^{45}Sc -NMR méréssel végeztük, ahol a szabad Sc(III)-ionhoz rendelhető jel időbeni fogyását követtük. A mérés során a komplexekhez tartozó jel is fokozatosan megjelent, így a $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ -komplexhez (91 ppm) és a $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplexhez (92 ppm) tartozó jelek területeit is meghatároztuk. A képződési kinetikákat a 47. és 48. ábrákon mutatjuk be. A komplexképződési folyamat a $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplex esetében 1,28-as pH-n és 20°C-on kb. 300 perc alatt, míg a $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ -komplex esetében egy kicsit hosszabb idő alatt áll be az egyensúly, ilyen körülmények mellett az egyensúlyi állandók ismeretében csak a komplex részecske található a rendszerben, a komplexképződés 100%-os. A szabad Sc(III)-ionhoz tartozó mérési adatsorokra monoexponenciális illesztést végeztünk, a látszólagos sebességi együttható a $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplex esetében $k_{\text{obs}} = 2,51(\pm 0,12) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, míg a $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ -komplex esetében $k_{\text{obs}} = 1,04(\pm 0,05) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. A viszonylag gyors komplexképződés ilyen savkoncentráció esetében biztató lehet a jelölés szempontjából.

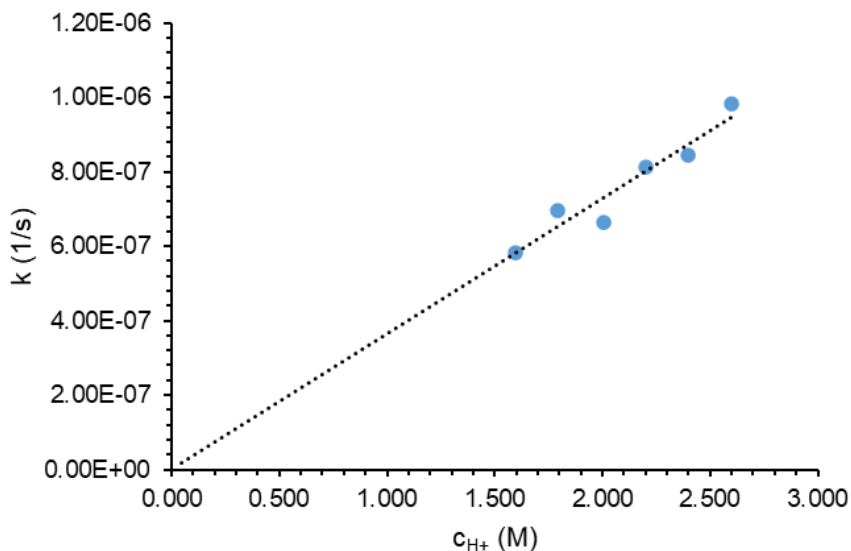


48. ábra: $[Sc(PC2AM^{mBu})]^+$ -komplex képződésének vizsgálata ^{45}Sc -NMR-rel
 (●: szabad Sc(III) jelterülete, ●: komplex jelterülete)
 ($c(Sc^{3+}) = c(PC2AM^{nBu}) = 10$ mM; pH = 1,28; T = 20°C)

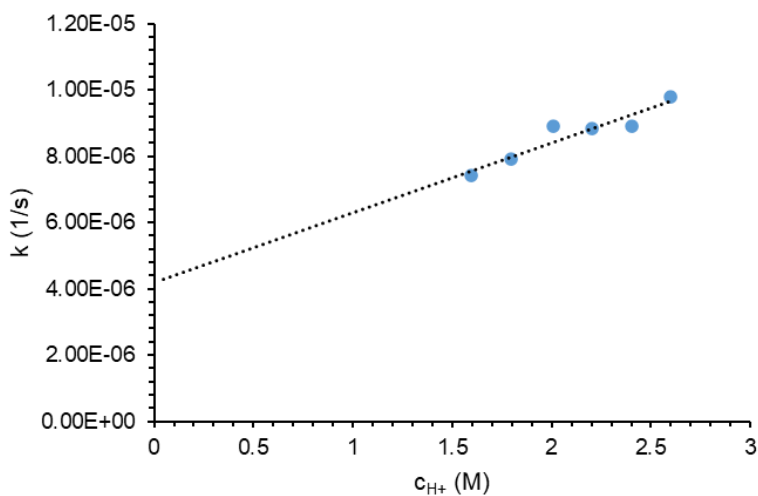


49. ábra: $[Sc(PCTA)]$ -komplex képződésének vizsgálata ^{45}Sc -NMR-rel
 (●: szabad Sc(III) jelterülete, ●: komplex jelterülete)
 ($c(Sc^{3+}) = c(PCTA) = 9,5$ mM; pH = 1,28; T = 20°C)

A $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ - és a $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplexek savkatalizált disszociációját erősen savas közegben ($c_{\text{H}^+} = 2,6 - 1,6 \text{ M HClO}_4$) vizsgáltuk UV-spektroszkópiával, melynek eredményét az 50. és 51. ábrán mutatjuk be.



50. ábra: $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{mBu}})]^+$ -komplex savasszisztált disszociációja (25°C , $c_{\text{H}^+} = 2,6 - 1,6 \text{ M HClO}_4$)



51. ábra: $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplex savasszisztált disszociációja (25°C , $c_{\text{H}^+} = 2,6 - 1,6 \text{ M HClO}_4$)

A kapott k_{obs} sebességi együtthatók illesztése során megállapítható, hogy a $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ -komplex disszociációját egy $k_{\text{obs}} = k_1[\text{H}^+]$ egyenlettel illeszthető (jelentősebb öndisszociáció nem állapítható meg az illesztés alapján), míg a $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplex esetében számolnunk kell a komplex öndisszociációjával is, ezért az illesztést a $k_{\text{obs}} = k_0 + k_1[\text{H}^+]$ egyenlettel végeztük el. A kapott sebességi együtthatókat a 10. táblázatban foglaltuk össze a sebességi együtthatókból számított felezési időikkel együtt.

10. táblázat: A $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ - és a $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplexek disszociációját jellemző sebességi együtthatók és a számított felezési idők

	PC2AM ^{nBu}	PCTA
$k_0 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0	$4,20 \times 10^{-6}$
$k_1 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$3,64 \times 10^{-7}$	$2,11 \times 10^{-6}$
$t_{1/2} \text{ (h)}$	529	30,5

A $[\text{Sc}(\text{PCTA})]$ -komplex savasszisztált disszociációjának sebessége nagyságrendileg megegyezik a $[\text{Sc}(\text{DOTA})]$ -komplex megfelelő értékével [127], míg a $[\text{Sc}(\text{PC2AM}^{\text{nBu}})]^+$ monoamid származék egy nagyságrenddel lassabban disszociál erősen savas közegben. A számított felezési idők alapján is megállapítható, hogy a ligandumba beépített amidcsoport jelentősen javítja a komplex inertségét.

4.2.2.2.4 A $[\text{Mn}(\text{PC2AM-NI})]$ -komplex relaxivitásának meghatározása

A $[\text{Mn}(\text{PC2AM-NI})]$ -komplex relaxivitását a kutatócsoportban már korábban alkalmazott módszerrel határoztuk meg. Különmintákat állítottunk össze azonos ligandum- és változó Mn(II)-ion koncentrációval (pH = 7,4 (HEPES), $I = 0,15 \text{ M NaCl}$) és mértük a minták relaxációs idejét különböző térerőn és hőmérsékleten. Amíg a ligandum feleslege van a mintákban és feltételezzük, hogy egy típusú részecske található a mintákban (maga a MnL komplex a teljes komplexképződés révén), a minták mérését követően a kapott relaxációs idők reciprokanak értéke lineárisan nő a hozzáadott Mn(II)-ion mennyiségének növelésével. A mért adatokra illesztett egyenes pedig a komplexet jellemző relaxivitást adja meg adott hőmérsékleten és térerőn. A kapott mérési

eredmények illesztését követően a $[Mn(PC2AM-NI)]$ -komplexet jellemző relaxivitásokat az 11. táblázatban foglaltuk össze.

11. táblázat: A $[Mn(PC2AM-NI)]^-$ -, $[Mn(3,9-PC2A)]^-$ és a $[Mn(PCTA)]^-$ -komplexek relaxivitása különböző térerőn és hőmérsékleten (0,15 M NaCl, pH = 7,4)

			PC2AM-NI	3,9-PC2A [113]	PCTA [119]
0,49 T	25°C	r_{1p}	1,25	2,91	1,50
		r_{2p}	1,42	3,96	2,37
	37°C	r_{1p}	1,01	-	-
		r_{2p}	1,15	-	-
1,41 T	25°C	r_{1p}	1,11	2,24	-
		r_{2p}	1,43	4,82	-
	37°C	r_{1p}	0,85	-	-
		r_{2p}	1,08	-	-

A $[Mn(PC2AM-NI)]$ -komplex kicsi relaxitás értékei alapján elmondható, hogy a komplexben nem található a fémionhoz koordinált vízmolekula, amely biztosítaná a megfelelő relaxációs hatást. A relaxitások közel megegyeznek a $[Mn(PCTA)]$ -komplex megfelelő értékeivel, amely hasonlóan nem tartalmaz koordinált vízmolekulát. A $[Mn(PC2AM-NI)]$ -komplex relaxitása alapján nem alkalmazható MRI kontrasztanyagként (tervezés alapján a 6-os pozícióban lévő amid oldallánc cseréje vagy elhagyása növelhetné a komplex relaxitását), ha viszont sikerül igazolni a nitroimidazol egység specifikus kötődését a hipoxiás sejtekhez, akkor az ^{52}Mn -jelzett komplex potenciális PET radiofarmakon lehet.

PC2A-Ph-NI (8) ligandum Mn(II) és Sc(III)-komplexeinek a fizikokémiai vizsgálata még folyamatban van.

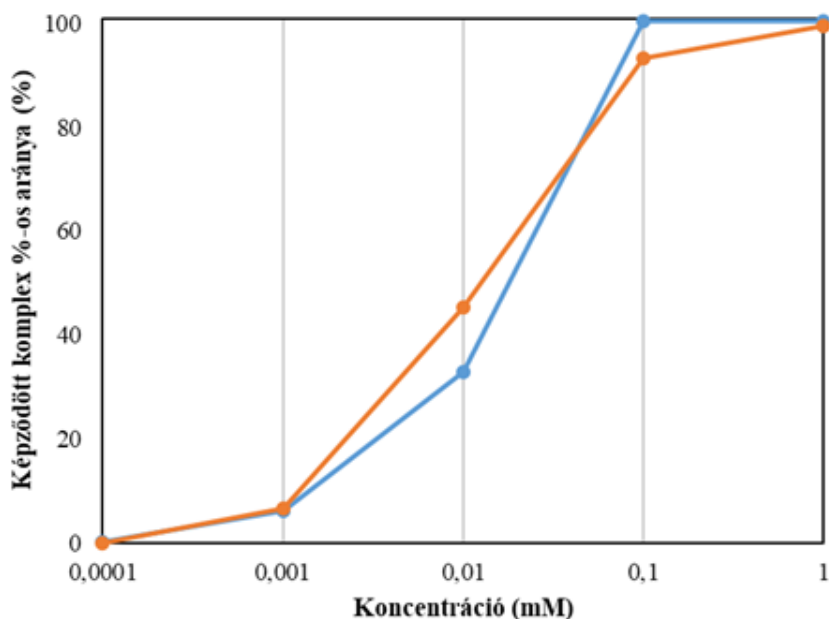
4.2.2.3. PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI ligandumok radiojelzése mangán-52 és szkandium-44 izotópokkal

A következő kísérletekben a PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI ligandumok radiokémiai vizsgálatát végeztük el. Ezek a vegyületek 2-nitroimidazol egységük révén képesek

szelektíven kötődni az oxigénhiányos tumorsejtekhez, ezért pozitron-sugárzó mangán-52 és szkandium-44 izotópokkal jelölve alkalmasak lehetnek PET képalkotásra.

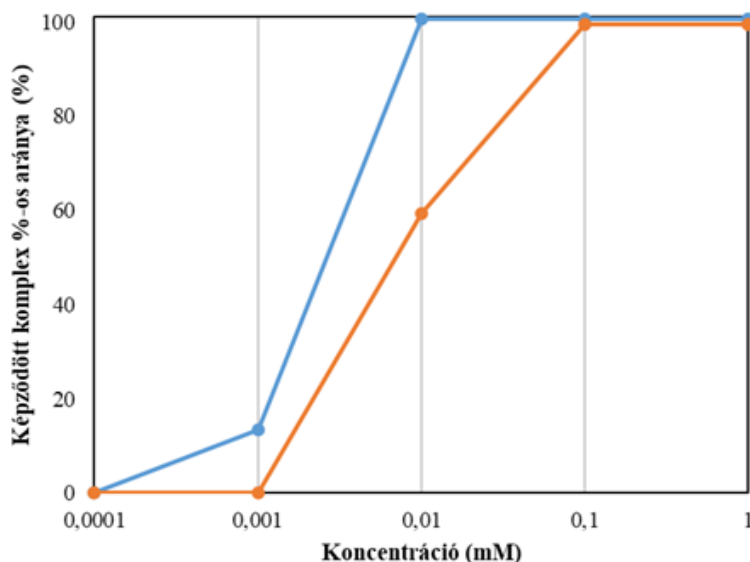
4.2.2.3.1 [^{52}Mn]Mn-PC2AM-NI és a [^{52}Mn]Mn-PC2A-Ph-NI radiokémiai vizsgálata

A radiokémiai vizsgálatok során először a PC2AM-NI (7) és PC2A-Ph-NI (8) ligandumok mangán-52 izotóppal történő radiojelzését valósítottuk meg. A radiokémiai vizsgálatokhoz a mangán-52 nuklidot $^{52}\text{Cr}(\text{p},\text{n})^{52}\text{Mn}$ magreakcióval állítottuk elő ciklotronban szilárd krómtarget protonbesugárzásával [128]. A keletkezett mangán-52 izotópot szilárd fázisú extrakcióval három lépésben választottuk el a krómtargettől Fonslet és munkatársai által kidolgozott eljárás szerint [129]. Ennek során először tömény sósavban feloldottuk a targetanyagot, majd abszolút etanollal hígítottuk. A kapott oldatot anioncserélő AG-X8 gyantával tisztítottuk, ami szelektíven megkötötte a mangán(II)-ionokat. Ezután az [^{52}Mn]mangánionokat híg sósavval (0,1 M HCl) eluáltuk, majd betöményítettük az eluátumot és a folyamatot még kétszer megismételtük. Az így megtisztított mangán-52 izotóp 0,1 M-os sósavas oldatát használtuk a radiokémiai vizsgálatokhoz. Először a ligandumok jelzési hatékonyságát vizsgáltuk különböző ligandumkoncentrációk (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 és 1 mM) alkalmazása mellett 1 M-os HEPES (pH = 7) pufferben 37 és 95°C-on. A különböző összetételű reakcióelegyekből 10 perc után mintát vettünk, amelyek radiokémiai tisztaságát radio-instant vékonyrétegekromatográfiával elemeztük, ahol az állófázis iTLC-SG papír (szilikagéllal impregnált üveg mikroszálaskromatográfiás papír), míg mozgófázis 0,5 M-os citrát oldat (pH = 5,5) volt. A radiojelzések során kapott jelzési hozamok az 52. és 53. ábrán láthatóak.



52. ábra Az mangán-52 izotóppal történő radiojelzés hozama különböző ligandumkoncentrációknál 37°C-on.
(●: *PC2AM-NI*, ●: *PC2A-Ph-NI*)

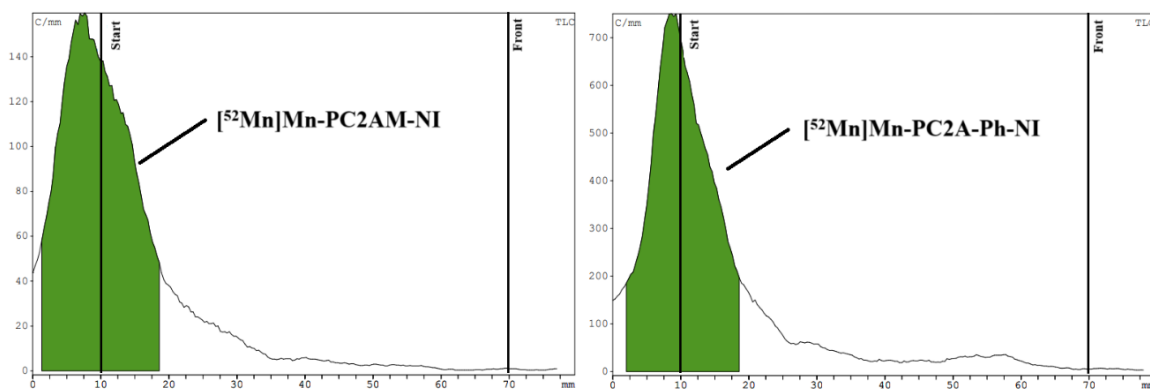
A meghatározott jelzési hozamok alapján a következő megállapításokat tehetjük. 37°C-on a *PC2AM-NI* ligandum esetében már 0,1 mM ligandumkoncentráció mellett 100%-os radiojelzést detektáltunk, míg a *PC2AM-Ph-NI* esetében 1 mM ligandumkoncentrációra volt szükség ennek a jelzési hatékonyságnak az eléréséhez. Magasabb hőmérsékleten, azaz 95°C-on azonban a *PC2AM-NI* esetében 0,01 mM-os ligandumkoncentráció is elegendő volt a teljes jelöléshez, míg a *PC2A-Ph-NI* esetében ez csak 0,1 mM-os ligandumkoncentráció esetében következett be.



53. ábra A mangán-52 izotóppal történő radiojelzés hozama különböző ligandumkoncentrációknál 95°C-on.
(●: PC2AM-NI, ●: PC2A-Ph-NI)

A további radiokémiai és *in vitro* stabilitási vizsgálatokhoz a PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI ligandumok [^{52}Mn]mangánionnal történő jelölését a következő reakciókörülmények között valósítottuk meg. Először 100 μL [^{52}Mn] MnCl_2 (~25 MBq) 0,1 M-os sósavas oldatát 350 μL HEPES (1 M, pH = 7) pufferrel kevertük össze, majd ehhez az elegyhez egyik esetben 50 μL PC2AM-NI vizes oldatot (1 mM), míg a másik esetben 50 μL PC2A-Ph-NI vizes oldatot (1 mM) adtuk. A radiojelzési reakciót 95°C-on végeztük és a reakcióidő 10 perc volt. Az előállított radiokomplexeket mindkét esetben szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk WATERS C18 Plus Light oszlopon. Az ^{52}Mn -komplexek radiokémiai tisztaságát radio-iTLC-vel elemeztük (állófázis: iTLC-SG papír, mozgófázis: 0,5 M-os citrát oldat (pH = 5,5)), ami mindkét esetben nagyobb volt, mint 99% (54. ábra).

A tisztított radiokomplexek stabilitását patkányszérumban, EDTA ligandum és esszenciális fémionok jelenlétében vizsgáltuk. A radiojelzett vegyületek *in vitro* szérumbiztonság vizsgálata során a komplexek vizes oldatait patkányszérummal kevertük össze és a keverékeket inkubáltuk szobahőmérsékleten 4 órán át.



54. ábra ^{52}Mn -jelzett komplexek radio-iTLC kromatogramja A: $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2AM-NI}$ radio-iTLC kromatogramja; B: $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$ radio-iTLC kromatogramja (Álló fázis: iTLC-SG papír, mozgó fázis: 0,5 M-os citrát oldat (pH = 5,5))

A ligandumcsere kísérlethez 0,2 M-os EDTA (pH = 7,4) oldatot alkalmaztunk. A fémcserehez 0,1 mM-os ZnCl_2 (1 μL), 0,01-os mM CuCl_2 (1 μL), 1,02 mM-os MgCl_2 (24 μL) és 2,28 mM-os CaCl_2 (24 μL) oldatokat elegyítettük és ezt az elegyet adtuk a radiokomplexek vizes oldatához, majd a keveréket inkubáltuk szobahőmérsékleten 4 órán át. Az egyes keverékekből vett mintákat óránként elemeztük radio-iTLC-vel a fent említett körülmények között. A stabilitási vizsgálatok eredményeit az 12. és 13. táblázatban gyűjtöttük össze.

12. táblázat A $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2AM-NI}$ komplex stabilitásvizsgálatainak eredményei

Stabilitási teszt	$[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2AM-NI}$ százalékos mennyisége különböző időpontokban vett mintákban			
	1 óra	2 óra	3 óra	4 óra
szérumstabilitás	100	100	100	100
ligandumcsere $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$-val	59	52	50	48
fémcsere endogén fémionokkal	100	100	100	100

Az elvégzett vizsgálatok alapján a szérumstabilitási és a fémcsérés kísérletek során mindkét ^{52}Mn -jelzett komplexet nagy stabilitás jellemezte 4 órán keresztül, mivel a minták radiokémiai tisztasága 100% volt a vizsgált időpontokban. Ugyanakkor mindkét komplex disszociációja jelentős volt az EDTA-val történő ligandumcsere reakciókban. A

$[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2AM-NI}$ -nek csak 48%-a és a $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$ -nek csak 22%-a maradt intakt 4 óra elteltével.

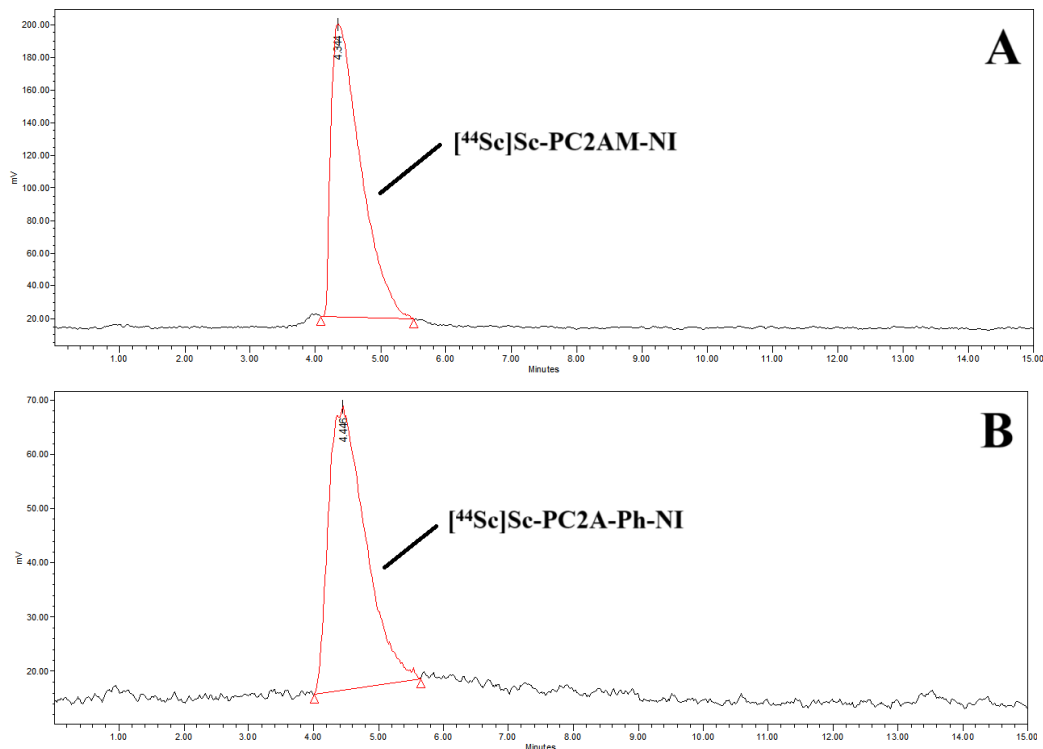
13. táblázat A $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$ komplex stabilitásvizsgálatainak eredményei

Stabilitási teszt	$[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$ százalékos mennyisége a különböző időpontokban vett mintákban			
	1 óra	2 óra	3 óra	4 óra
szérumstabilitás	100	100	100	100
ligandumcsere $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ -val	67	53	30	22
fémcsere endogén fémionokkal	100	100	100	100

A radiojelzett komplexek lipofilitásának a vizsgálata során meghatároztuk a jelzett vegyületek logP értékeit, amely $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2AM-NI}$ esetén -2,32, míg a $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$ esetén -1,42 volt. A kapott eredmények alapján a radiofarmakonok hidrofilak, de a $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$ komplex esetében valószínűleg a ligandumban található fenil csoport hatására a radiofarmakon tulajdonságai eltolódtak a lipofil irányba.

4.2.2.3.2 A $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-PC2AM-NI}$ és $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-PC2A-Ph-NI}$ radiokémiai vizsgálata

Ebben a fejezetben a PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI ligandumok ciklotronban előállított szkandium-44 izotóppal történő radiojelzéséről számolunk be. Az izotóp előállítása, tisztítása a 4.2.1.3. fejezetben leírtak szerint történt. A radiojelzést a következő módon valósítottuk meg: a tisztított szkandium-44 oldat 100 μL -es frakciójához 250 μL $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{HOAc}$ puffert (3M, pH = 4) és 60 μL prekursor törzsoldatot (1 mg/mL) adtunk. Az elegyet 95°C-on 15 percig melegítettük. A jelzési hozam a $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-PC2AM-NI}$ esetében 95%, míg a $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-PC2A-Ph-NI}$ esetében 96% volt. A ^{44}Sc -jelzett komplexeket fordított fázisú extrakciós oszloppal (Waters C18 Plus Light) tisztítottuk és tisztítás után a radiojelzett vegyületek radiokémiai tisztasága >99%, amelyet radio-HPLC-vel határoztunk meg (55. ábra).



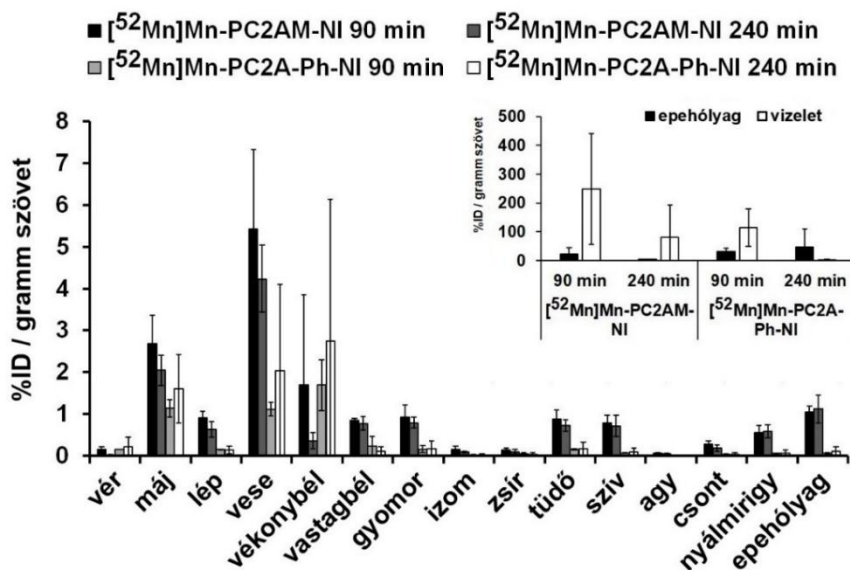
55. ábra A ⁴⁴Sc-komplexek radiokémiai tisztaságának vizsgálata radio-HPLC-vel A: [⁴⁴Sc]Sc-PC2AM-NI radio-HPLC kromatogramja; B: [⁴⁴Sc]Sc-PC2A-Ph-NI radio-HPLC kromatogramja (oszlop: Kinetex XB-C18 2.6 μm (50 × 4.60 mm); eluens A: oxálsav (0.01 M, pH = 3), eluens B: 95% acetonitril; áramlási sebesség: 1 mL/perc; gradiens: 0 perc: 100% A, 1 perc: 100% A, 10 perc: 100% B, 10.1 perc: 100% A).

Ezután meghatároztuk a [⁴⁴Sc]szkandiumionnal jelölt ligandumok logP értékeit, amely a [⁴⁴Sc]Sc-PC2AM-NI esetében -2,44, a [⁴⁴Sc]Sc-PC2A-Ph-NI esetében pedig -1,25 volt. A mért logP értékek alapján mindkét ⁴⁴Sc-jelzett komplex hidrofílnak volt, de a fenil gyűrűt tartalmazó származék kevésbé. Ez a tendencia azonos a Mn-komplexek esetében tapasztaltakkal.

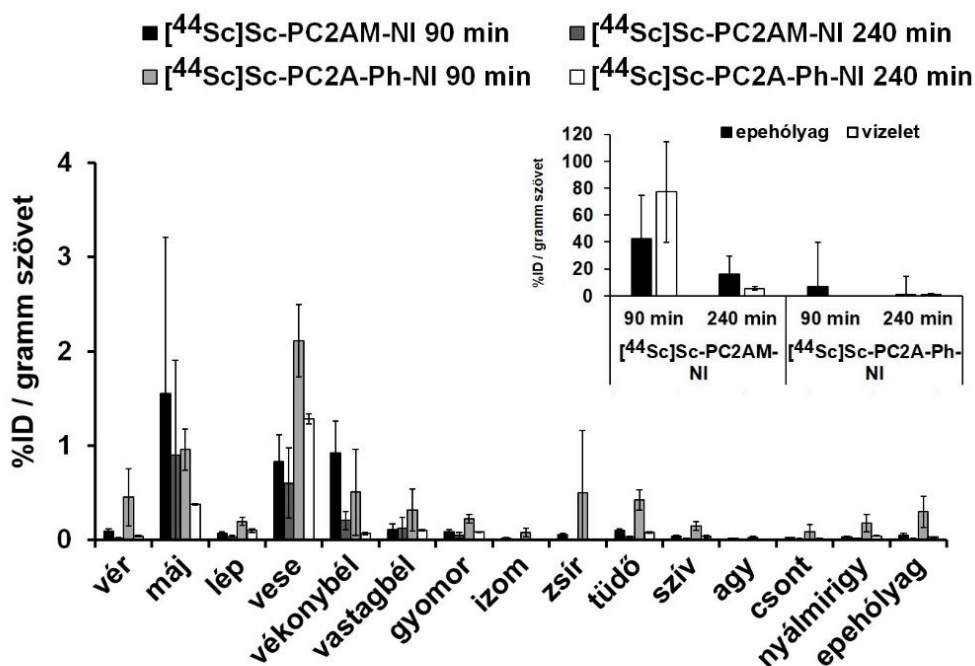
Végül vizsgáltuk a ⁴⁴Sc-komplexek stabilitását és inertségét az ⁵²Mn-jelzett komplexek esetében alkalmazott körülmények között. A ⁴⁴Sc-jelzett radiofarmakonok nagyfokú stabilitást és inertséget mutattak a szérumstabilitási, ligandumcsere és fémcseré vizsgálatok során 4 órán keresztül, mivel a keverékekből vett minták radiokémiai tisztasága >99%.

4.2.2.4. ^{52}Mn - és ^{44}Sc -jelzett PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI biológiai vizsgálata

A következőkben a ^{52}Mn - és ^{44}Sc -jelzett PC2AM-NI, illetve PC2A-Ph-NI vegyületek preklinikai vizsgálatának eredményeit mutatjuk be. A kísérleti radiofarmakonok *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatához egészséges (kontroll) C57Bl6 egereket alkalmaztunk. Az *in vivo* biodisztribúciós PET képalkotáshoz viszont B16F10 melanomatumort hordozó, 12 hetes hím C57Bl6 egereket használtunk. Az *ex vivo* vizsgálatokat és a PET felvételeket is 90 és 240 perccel a ^{52}Mn - és ^{44}Sc -jelzett PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI radiofarmakonok intravénás beadása után végeztük. Az *ex vivo* vizsgálatok során meghatároztuk a radiokomplexek szervi megoszlását és kiürülésük módját, a kapott eredményeket a 56. és 57. ábra foglalja össze.



56. ábra ^{52}Mn -jelzett PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI komplexek *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálata egészséges egerekben 90 és 240 perccel a radiofarmakonok intravénás beadása után. A %ID/g szövet értékeket átlag $\pm$ SD-ként adjuk meg (n = 5 egér/radiofarmakon/mérési időpont).

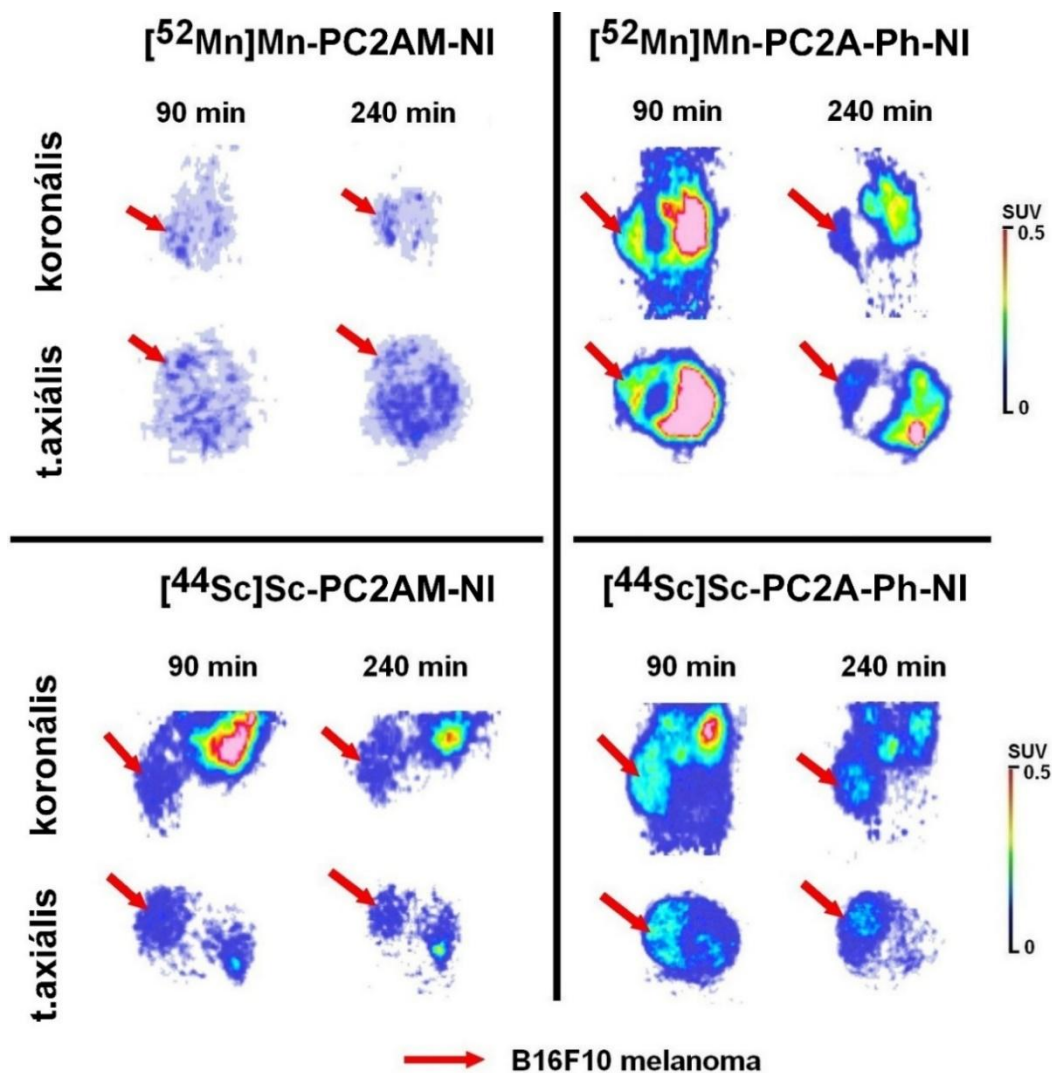


57. ábra ^{44}Sc -jelzett PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI komplexek *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálata egészséges egerekben 90 és 240 perccel a radiofarmakonok intravénás beadása után. A %ID/g szövet értékeket átlag $\pm$ SD-ként adjuk meg ($n=5$ egér/radiofarmakon/mérési időpont).

A 56. és 57. ábrán jól látható, hogy a májban, a vesékben, a vékony- és vastagbélben, valamint az epehólyagban is magas radiofarmakon-felvétel volt tapasztalható a vizsgált időpontokban mindegyik radiogyógyszer esetében. Ez azt jelenti, hogy a radiofarmakonok a vesén kívül, a máj-epe rendszeren keresztül is ürültek. A többi vizsgált hasi és mellkasi szervben alacsony radiofarmakon-felvétel figyelhető meg a ^{44}Sc -jelzett vegyületek és a $^{52}\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$ alkalmazása során 90, valamint 240 perc inkubálási idő után is. Ezzel ellentétben a $^{52}\text{Mn-PC2AM-NI}$ komplex esetében viszonylag nagy radiogyógyszer felhalmozódás látható még a tüdőben, szívben, a nyál- és hasnyálmirigyben mindkét vizsgált időpontban (56. ábra).

A B16F10 tumort hordozó állatokról készült PET felvételek (58. ábra) összhangban vannak az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokkal. Itt is jól látható, hogy a

radiofarmakonok nem csak a vesén, hanem a hepatobiliáris rendszeren keresztül is távoznak a szervezetből.



58. ábra Reprezentatív bomlás-korrigált PET felvételek B16F10 melanomatumort hordozó egerekről 90 és 240 perccel a $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2AM-NI}$, a $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$, valamint a $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-PC2AM-NI}$ és a $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-PC2A-Ph-NI}$ intravénás injekciója után és 14 ± 1 nappal a B16F10 melanomasejtek transzplantációja után. Piros nyilak a B16F10 daganatot jelzik.

A bomlás-korrigált PET-felvételek kvantitatív analízise során kapott tumorfelvételi adatokat a 14. táblázat tartalmazza. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a szubkután növekvő B16F10 melanoma daganatok oxigénhiányos területei egyértelműen

azonosíthatók a hipoxiás sejteket célzó ^{52}Mn - és ^{44}Sc -jelzett PC2A-Ph-NI radiofarmakonokkal. Ezzel ellentétben az ^{52}Mn - és ^{44}Sc -jelzett PC2AM-NI komplexek esetében alacsony tumor akkumulációt és tumor-izom arányt kaptunk, így ezek a radiojelzett vegyületek jelen formájukban nem alkalmasak a tumorhipoxia kimutatására.

14. táblázat Az *in vivo* biológiai eloszlási adatok kvantitatív SUV analízise ($n = 3$ kontroll állat/radiofarmakon) 90 és 240 perccel a radiógyógyszerek beadása után

	$[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-PC2AM-NI}$		$[^{44}\text{Sc}]\text{Sc-PC2A-Ph-NI}$	
Inkubációs idő	90 min	240 min	90 min	240 min
B16F10 tumor SUVmean	0,08±0,02	0,04±0,02	0,14±0,03	0,10±0,03
izom SUVmean	0,02±0,01	0,01±0,01	0,05±0,01	0,01±0,01
T/M arány	4,04±0,02	4,02±0,02	2,81±0,04	10,12±0,24

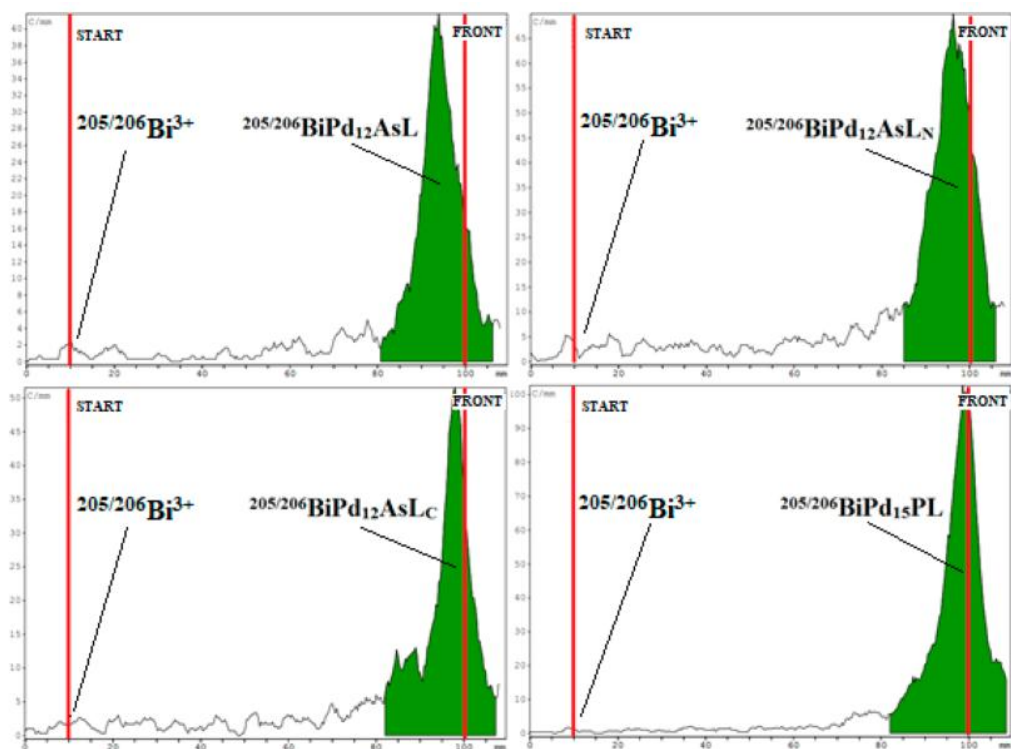
	$[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2AM-NI}$		$[^{52}\text{Mn}]\text{Mn-PC2A-Ph-NI}$	
Inkubációs idő	90 min	240 min	90 min	240 min
B16F10 tumor SUVmean	0,02±0,01	0,01±0,01	0,26±0,09	0,12±0,03
izom SUVmean	0,01±0,01	0,01±0,01	0,05±0,02	0,02±0,01
T/M arány	2,01±0,02	1,00±0,02	5,21±0,12	6,07±0,04

4.3 Radioaktív bizmut polioxopalladát komplexek előállítása és vizsgálata

Kutatómunkánk során azt a célt tűztük ki, hogy hordozómentes, azaz csak radioaktív $[^{213}\text{Bi}]$ bizmutationokat tartalmazó Bi-POP komplexeket állítsunk elő. Az $-\text{N}_3$ és $-\text{COOH}$ csoportokkal funkcionizált fenilcsoportokat tartalmazó kocka- és csillag alakú palladátok üregébe a Bi(III)-ionok képesek stabilan beépülni és a képződő komplexek biológiailag aktív molekulához kapcsolás után alkalmasak lehetnek biológiai felhasználásra is. A radiokémiai kísérleteinkben ciklotron által termelt bizmut-205/206 izotópokat használtunk a bizmut-213 izotóp helyettesítőjeként, az utóbbi nehéz hozzáférhetősége miatt. A bizmut-205/206 izotópot ciklotronban állítottuk elő természetes ólomfólia besugárzásával. Besugárzás után 24 órát vártunk, azért, hogy a rövid felezésű izotópok elbomoljanak. Ezután 7 M-os HNO_3 oldatban (2 mL) feloldottuk a targetanyagot és ezt az oldatot felére pároltuk, majd leszűrtük. A szűrletet vízzel

tízszerezésre hígítottuk. A bizmut-205/206 izotópkeveréket a targetanyagtól TK200-as gyantán választottuk el. Ez egy trioktilfoszfín-oxid alapú gyanta, ami képes megkötni a bizmutot, míg az ólom nem kötődik hozzá. Az elválasztás során a hígított szűrletet a prekondicionált TK200 gyantán átengedtük, majd a gyantát mostuk 0,7 M-os HNO₃ oldattal és végül bizmut-205/206 izotópkeveréket 7 M-os HNO₃ oldattal eluáltuk. Bepárlás után 0,1 M-os sósav oldatban oldottuk fel a bizmut-205/206 izotópkeveréket és ilyen formában használtuk fel a radiojelzésekhez.

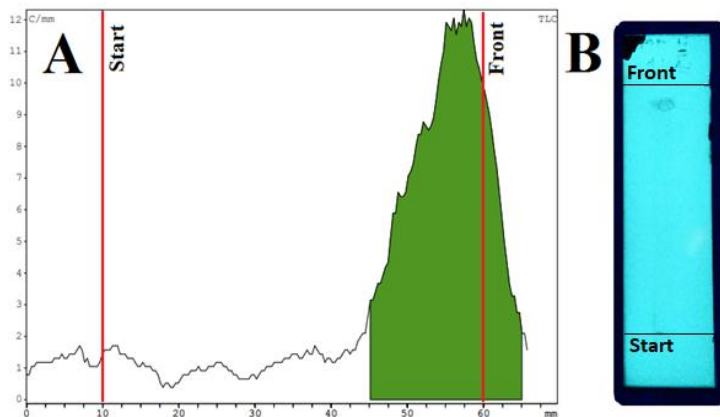
A radioaktív jelölési reakciók alapját a Bi-POP-ok esetében már sikeresen alkalmazott szintetikus eljárás adta [76]. A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ ($[[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{O}_{32}(\text{AsPh})_8]^{5-}$) és $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}_\text{N}$ ($[[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{O}_{32}(\text{AsC}_6\text{H}_4\text{N}_3)_8]^{5-}$) szintézisét 0,5 M-os nátrium-acetát oldatban végeztük Pd(OAc)₂ jelenlétében. Ehhez az elegyhez adtuk hozzá a ^{205/206}Bi-izotópok 0,1 M-os sósavval készült oldatát, valamint az adott fenil-arzenát származékot és 80°C-on melegítettük a reakcióelegyet. A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}_\text{C}$ ($[[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{O}_{32}(\text{AsC}_6\text{H}_4\text{COO})_8]^{13-}$) és $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{15}\text{PL}$ ($[[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{15}\text{O}_{40}(\text{PPh})_{10}]^{7-}$) esetében a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiCl}_3$ oldat adagolása késleltetett volt, azaz 15 perc 80°C-os melegítés után adtuk a reakcióelegyhez. A radiofém beépülésének vizsgálatára, valamint a megmaradt szabad $[^{205/206}\text{Bi}]$ bizmut-ionok kimutatására radio-vékonyréteg-kromatográfiát (radio-TLC) alkalmaztunk. Megállapítottuk, hogy 10 perc reakcióidő elegendő volt a bizmut-205/206 izotóppal jelölt POP-ok teljes képződéséhez, mert 10 perc után a radiokémiai hozam nagyobb volt, mint 99% mind a négy esetben. A radioaktív jelölés során a pH bármilyen beállítása bonyolult lett volna a reakcióelegy kis térfogata és a rövid reakcióidő miatt, de erre a kellően nagy pufferkapacitás miatt nem is volt szükség. A radio-TLC-s vizsgálatokhoz először fordított fázisú TLC lemezt (RP-18) alkalmaztunk, míg a mozgófázis víz és acetonitril 1:2 arányú elegye volt a Gott és munkatársai által leírt módszer szerint [77]. Kipróbáltuk azonban egy iTLC módszert is, ahol az állófázis iTLC-SG papír és a mozgófázis 0,05 M-os Na₂CO₃ oldatot volt. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy jobb lett az elválasztás, mivel simább alapvonalat kaptunk (59. ábra).



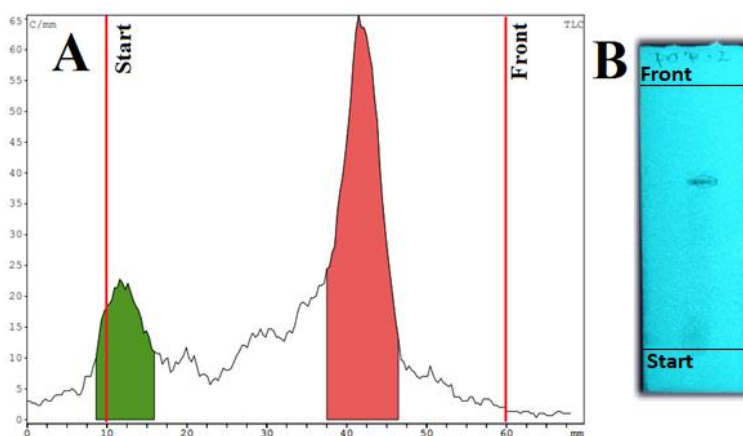
59. ábra A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$, $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsLN}$, $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsLC}$ és $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{15}\text{PL}$ reakcióelegyek radio-iTLC kromatogramjai (álló fázis: iTLC-SG papír, mozgó fázis: 0,05 M-os Na_2CO_3 oldat)

Radio-iTLC kromatogramok kimutatták, hogy az összes bizmut-205/206 izotóp sikeresen beépült a POP központi üregébe, mivel nem volt kimutatható szabad $[^{205/206}\text{Bi}]$ bizmut-ion a kiindulási pontban, viszont a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-POP}$ komplexek az oldószerfronttal együtt mozogtak. A radioaktív termékek azonosításához fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfiával (RP-TLC) vizsgáltuk a reakcióelegyeket és állófázisként szilikagél 60 RP-18 F254s réteget, a mozgófázis pedig víz és acetonitril 1:2 arányú elegyét használtunk. A bizmut-205/206 izotóppal jelölt komplexeket radioaktivitásuk alapján, míg a nem radioaktív, nem radioaktív standard Bi-POP komplexeket UV aktivitásuk alapján detektáltuk. A retenciós faktor (R_f) 0,90 volt a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ és 0,91 a nem radioaktív $\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ komplexek esetében (60. ábra). A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsLN}$ esetében az R_f érték 0,656 volt, míg nem radioaktív $\text{BiPd}_{12}\text{AsLN}$ esetében 0,66. (61. ábra) Mivel a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ és $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsLN}$ komplexek R_f értékei és a nem radioaktív

sztenderd komplexek R_f értékei jó egyezést mutattak, ezért ezeknek a vegyületeknek az azonosítása sikeres volt.



60. ábra A: Radio-TLC kromatogram $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$, $R_f = 0,9$; B: Hideg $\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ RP-TLC kromatogramja, $R_f = 0,91$ (álló fázis: RP-TLC lap, mozgó fázis: víz:acetonitril 1:2)



61. ábra A: Radio-TLC kromatogram $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsLN}$, $R_f = 0,656$; B: Hideg $\text{BiPd}_{12}\text{AsLN}$ RP-TLC kromatogramja, $R_f = 0,6$ (álló fázis: RP-TLC lap, mozgó fázis: víz:acetonitril 1:1)

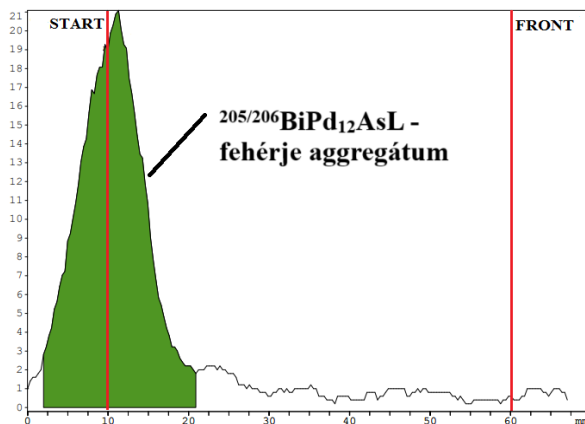
A közel azonos R_f értékek alapján kijelenthetjük, hogy a radiojelzés során a kívánt $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-POP}$ vegyületeket állítottuk elő, annak ellenére, hogy a reakció során eltérő koncentráció-tartományt alkalmaztunk a standard Bi-POP-ok szintéziséhez képest. Sajnálatos módon a $\text{BiPd}_{12}\text{AsLc}$ és a $\text{BiPd}_{15}\text{PL}$ esetében a szilikagél 60 RP-18 F254s réteggel végzett TLC vizsgálat nem volt sikeres, mivel nem találtunk olyan mozgófázist,

amely a sztenderd és a radioaktívan jelölt Bi-POP-okat a felcseppentés helyéről elmozdította volna.

A bizmut-205/206 izotóppal jelölt POP-ok előállítása után szükség van arra, hogy a jelzett komplexeket elválasszuk a feleslegben lévő $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ -től, szerves arzonáttól, nátrium-acetáttól és szabad $^{205/206}\text{Bi}$]bizmutionoktól, mert ez elengedhetetlen a radiofarmakonok további biológiai felhasználhatóságához. Az előbb felsorolt komponensek reakcióelegyből történő eltávolítására a szilárdfázisú extrakció (SPE) hatékonyságát vizsgáltuk. Először a reakcióelegyeket egy 0,22 μm -es fecskendőszűrővel szűrtük, ezzel a lépéssel eltávolítottuk a feleslegben maradt szilárd $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ -ot. Ezután a szűrletben lévő $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL-komplexet egy SPE oszlopon (Waters SepPak C18 Light) kötöttük meg, amelyet előzőleg 5 ml etanollal és 10 ml vízzel kondicionáltunk. Ezt követően 1 ml vízzel lemostuk a szennyeződések maradékát is és végül a $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett POP molekulát 33%-os etanolos oldattal eluáltuk az SPE oszlopról. Tisztítás után ismét megvizsgáltuk a $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett POP komplex tisztaságát fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfiával (RP-TLC) és instant vékonyréteg-kromatográfiával (iTLC) is. Ennek során nem detektáltunk UV-aktív szennyeződések az RP-TLC kromatogramon és nem találtunk radioaktív szennyeződések az iTLC kromatogramon sem, ennek megfelelően a tisztított $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL radiokémiai tisztasága >98% volt. Sajnos azonban a másik három $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-POP komplex ezzel a módszerrel nem volt tisztítható. A $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL_N esetében irreverzibilis adszorpciót, míg a $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL_C és $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₅PL esetében alacsony retenciót figyeltünk meg. Ezen $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-POP-ok tisztításához további kísérletekre van szükség.

Ezután *in vitro* stabilitási vizsgálatot végeztünk. A szérumbizmutstabilitási vizsgálatához a tisztított $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL-t patkányszérummal inkubáltuk szobahőmérsékleten. Különböző időközönként (0, 20, 60, 120 és 180 perc) mintákat vettünk, amelyeket radio-TLC-vel analizáltunk. A radio-TLC kromatogram szerint a $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL-komplex már 20 perc elteltével átalakult a stabilitásvizsgálat során, mivel a kapott aktivitásfolt alig mozdult el a kiindulási pontból (62. ábra), amit egy fehérje-aggregátum képződésével

magyaráztunk. A többi radio-TLC kromatogram is ugyanazt az eredményt mutatta, ami hasonlított a Gott és munkatársai által már korábban közölt megfigyeléshez [77].



62. ábra A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ és a patkány szérum keverékének radio-TLC kromatogramja 20 perc inkubálás után (álló fázis: RP-TLC, mozgó fázis: víz-acetonitril 1:2)

A szérumstabilitási tesztet elvégeztük még foszfátos sóoldatban (PBS pufferben) is azért, hogy szimuláljuk a véráramban található pH-t és ionerősséget (PBS, pH = 7,2), de ebben az esetben is ugyanazt az eredményt kaptuk, mint a vízben végzett vizsgálatok során. A fehérje-aggregátum kialakulását a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ nyolc aromás fedőcsoportjának patkányszérummal való kölcsönhatásával magyarázhatjuk. Számos gadolinium alapú kontrasztanyagról ismert, hogy az aromás ligandumokat tartalmazó fémkomplexeknek igen erős a kölcsönhatása a humán szérumalbuminnal (HSA) [130]. Ezeknek a komplexeknek a véráramban való hosszú tartózkodási idejét az magyarázza, hogy a HSA és a komplexek fenilcsoportjai összekapcsolódnak. A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ -ben nyolc aromás csoport található, amelyek valószínűleg részt vesznek az aggregációban.

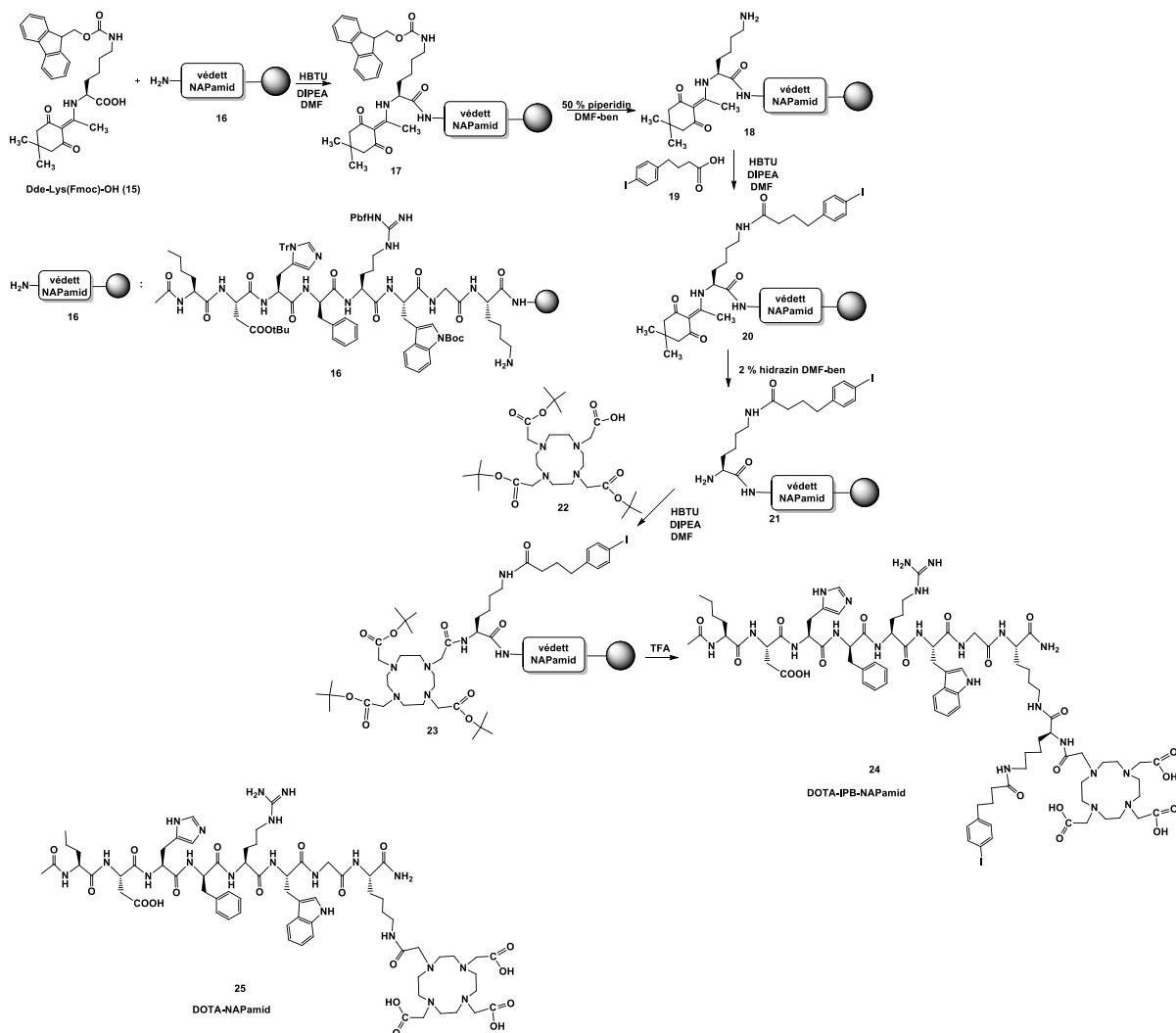
Érdemes megemlíteni, hogy előzetes kísérleteket végeztünk az α -sugárzó bizmut-213 izotóppal, hogy radioaktívan jelölt $[^{213}\text{Bi}]\text{Bi-POP}$ -ot állítsunk elő. Ennek során a bizmut-213 izotópot sikeresen építettük be a $\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ és $\text{BiPd}_{12}\text{AsL}_N$ központi üregébe a fentebb említett radiojelzési eljárásokkal. A ^{213}Bi -generátor rövid életideje miatt azonban további kísérletekre nem volt lehetőségünk.

4.4 Albuminkötő egység hatásának a vizsgálata ^{68}Ga -, $^{205/206}\text{Bi}$ - és ^{177}Lu -jelzett DOTA konjugált NAPamid-származékok farmakokinetikai tulajdonságaira

A kutatómunka ezen részében azt terveztük, hogy megvizsgáljuk a 4-(p-jód-fenil)-butánsavnak, mint albuminkötő egységnek hatását a melanoma szelektív, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -, $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ - és $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -izotópokkal jelzett DOTA konjugált NAPamid származék biológiai tulajdonságaira. Ettől a kémiai módosítástól azt reméltük, hogy csökkenteni fogja az irodalomból ismert NAPamid származék [131] szervezetből történő gyors eliminációját és nagymértékű vesefelvételét.

4.4.1 4-(p-jód-fenil)-butánsavat tartalmazó DOTA-NAPamid (**24**) szintézise

A tervezett **24**-es NAPamid-származékot többlépéses szilárd fázisú peptid szintézissel (63. ábra) állítottuk elő, Umbricht és munkatársai [132] által leírt módszerrel analóg módon. Az első lépésben a 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) csoporttal és 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciklohex-1-ilidén)-etil csoporttal (Dde) védett lizin származékot (**15**) kapcsoltuk a gyantához kötött, védett NAPamid molekulához (**16**) *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametil-urónium-hexafluor-foszfát (HBTU) kapcsolószer és etil-diizopropilamin (DIPEA) jelenlétében *N,N*-dimetil-formamidban. Az Fmoc védőcsoport eltávolítása után 4-(p-jód-fenil)-butánsavat (**19**) konjugáltunk a **18**-as NAPamid származékhoz a korábban említett kapcsolási módszerrel. Ezután a kapott **20**-as vegyületről a Dde védőcsoportot 2%-os hidrazin DMF-es oldatával távolítottuk el. Ezt követően DOTA-trisz(t-Bu)-észtert (**22**) kapcsoltuk a **21**-es peptid szabad amino csoportjához a fent említett konjugálási körülmények között. Végül trifluor-ecetsavas hidrolízissel egyrészt eltávolítottuk a védőcsoportokat, valamint a peptid származékot lehasítottuk a gyantáról és így kaptuk a 4-(p-jód-fenil)-butánsavat tartalmazó DOTA konjugált NAPamid származékot, a DOTA-IPB-NAPamidot (**24**). A **24**-es vegyületet félpreparatív fordított fázisú HPLC módszerrel tisztítottuk, és tömegspektroszkópiával azonosítottuk.



63. ábra Az albuminkötő egységet tartalmazó DOTA-IPB-NAPamid (**24**) szintézise

4.4.2 Radiokémiai vizsgálatok

A 4-(p-jód-fenil)-butánsavat tartalmazó DOTA-IPB-NAPamid származék (**24**) radioaktív jelölését először a diagnosztikus [^{68}Ga]galliumionnal valósítottuk meg ($t_{1/2} = 68$ perc, $I = 89\%$, $E_{\max}(\beta^+) = 1,92$ MeV), amelyet ciklotronban $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$ magreakcióval állítottunk elő [133]. A targetanyagot 5 M-os sósavban oldottuk fel, majd először ZR ioncserélő gyantán megkötöttük. 5 M-os sósavas mosás után 2 M-os sósavval

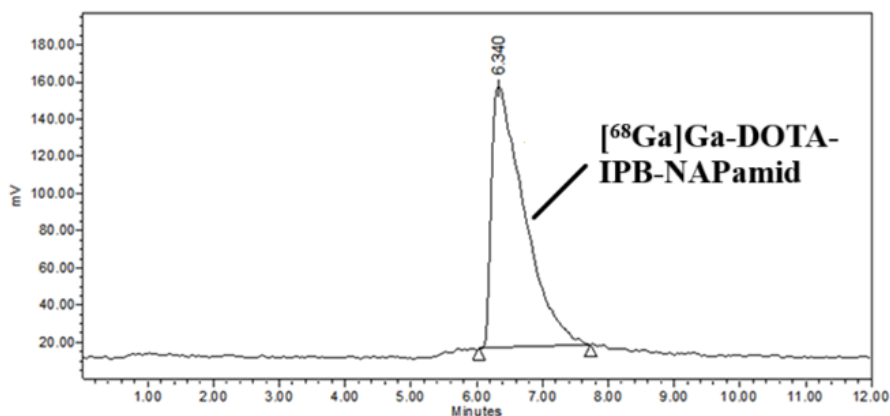
eluáltuk a ^{68}Ga -at. Ezután az eluátumot TK200-as gyantán további tisztításnak vetettük alá. A TK200-as gyantáról 0,05 M-os sósavval frakcionáltan eluáltuk le ^{68}Ga izotópot. $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ oldat pH-ját $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{HOAc}$ pufferrel (3 M, pH = 4) állítottuk be, majd a prekursor hozzáadása után 95°C -on 15 percig melegítettük. A radiojelzést magas jelzési hozammal (~98%) valósítottuk meg

Ezt követően preklinikai vizsgálatokhoz a **24-es** vegyületet bizmut-205/206 izotóp keverékkel jelöltük, amelyet könnyebb hozzáférhetősége miatt az alfa-emittáló bizmut-213 izotóp helyettesítőjeként alkalmaztuk. A bizmut-205/206 izotópok ciklotronban történő előállítását és tisztítását a 4.3 fejezetben leírt módszerrel végeztük. A radiojelzésekhez bizmut-205/206 izotópok 0,1 M-os sósavas oldatát használtuk fel. A reakcióelegy pH-ját ebben az esetben is $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{HOAc}$ (3 M, pH = 4) oldattal állítottuk be, majd a prekursor hozzáadása után 10 percig 95°C -on melegítettük az oldatot. A jelzett komplex előállítása során kiváló jelölési hozamot értünk el (~98%).

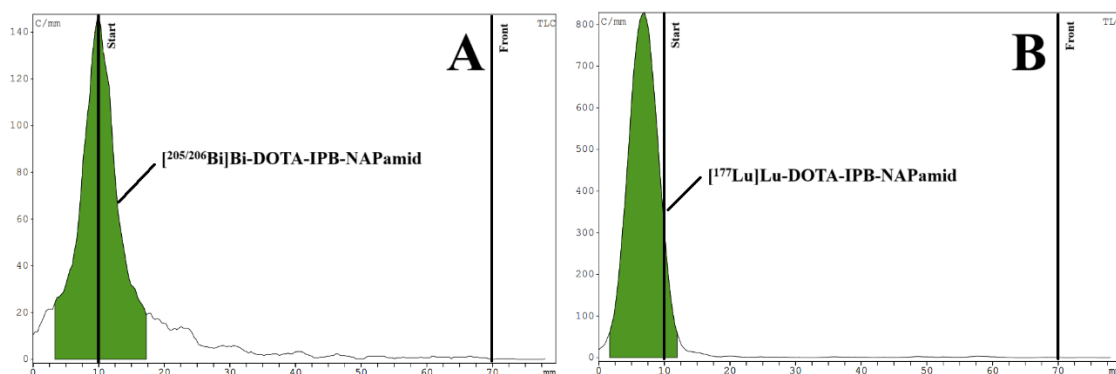
Ezen kívül kiváló jelzési hozammal (~98%) végrehajtottuk a 24-es prekursor radiojelzését béta-emittáló lutécium-177 izotóppal is. Ebben az esetben nátrium-acetát (3 M, pH = 4) oldattal állítottuk be a pH-t és csak öt percig melegítettük a reakcióelegyet 95°C -on.

Továbbá elvégeztük a kereskedelembe kapható DOTA-NAPamid ligandum (**25**, 63. ábra) radioaktív jelölését is $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -, $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ - és $[\text{}^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -izotópokkal a fent említett reakciókörülmények között, és ezeket a radioaktív komplexeket referenciaként használtuk a preklinikai vizsgálatok során.

A radiojelzett vegyületeket szilárd fázisú extrakcióval tisztítottuk Waters C18 Plus Light oszlopon, ennek során a reakcióelegyeket kondicionált Water C18 Plus Light oszlopra vittük fel, majd vizes mosás után alkohollal eluáltuk a jelzett komplexet. A preklinikai vizsgálatokhoz az eluátumokat bepároltuk és a radiofarmakonokat Salsol oldatban oldottuk fel. A ^{68}Ga -jelzett radiofarmakonok tisztaságát radio-HPLC-vel határoztuk meg (64. ábra), míg a $^{205/206}\text{Bi}$ - és ^{177}Lu -jelzett komplexek esetében radio-iTLC módszert alkalmaztunk erre a célra. (65. ábra) A vizsgálatok alapján az előállított radiokomplexek radiokémiai tisztasága minden esetben 98% feletti volt.



64. ábra $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-IPB-NAPamid}$ radio-HPLC kromatogramja (oszlop: Luna C18 3 μm (150 x 4.6 mm), eluens A: 0,01% TFA, eluens B: 95% ACN).



65. ábra A: $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-IPB-NAPamid}$ radio-iTLC kromatogramja; B: $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-IPB-NAPamid}$ radio-iTLC kromatogramja (álló fázis iTLC-SG papír, mozgó fázis: 0,5 M-os citrát oldat ($\text{pH} = 5,5$))

A tisztítás után megvalósítottuk a jelzett vegyületek *in vitro* stabilitásvizsgálatait szérumban, 0,2 M EDTA oldat és fémionok (Mg^{2+} : 0,51 mM, Ca^{2+} : 1,14 mM, Zn^{2+} : 0,01 mM, Cu^{2+} : 0,001 mM) jelenlétében a korábbi fejezetekben (4.2.1.3) leírt módon. A különböző időpontokban vett minták analízise során nem tapasztaltuk a jelzett vegyületek bomlását, így azt mondhatjuk, hogy a radiokomplexek nagy stabilitással rendelkeztek szérumban, továbbá a ligandumcserével és a fémcserével szemben is inertek maradtak a vizsgált körülmények között.

Ezen kívül meghatároztuk a radiofarmakonok oktanol/víz megoszlási koefficiens értékét is, amelyeket a 15. táblázat ismerteti. A kapott logP értékek azt mutatják, hogy az

albuminkötő egységet (IPB) tartalmazó komplexek lipofilebbek, mint a radiojelzett referencia vegyületek.

15. táblázat A különböző radiofémekkel jelzett DOTA-NAPamid és DOTA-IPB-NAPamid $\log P$ értékei.

	DOTA-NAPamid származékok $\log P$ értékei	DOTA-IPB-NAPamid származékok $\log P$ értékei
gallium-68 jelzett	-3,46	-2,12
bizmut-205/206 jelzett	-3,65	-2,32
lutécium-177 jelzett	-2,60	-1,26

4.4.3 Az előállított radiojelzett komplexek preklinikai vizsgálata

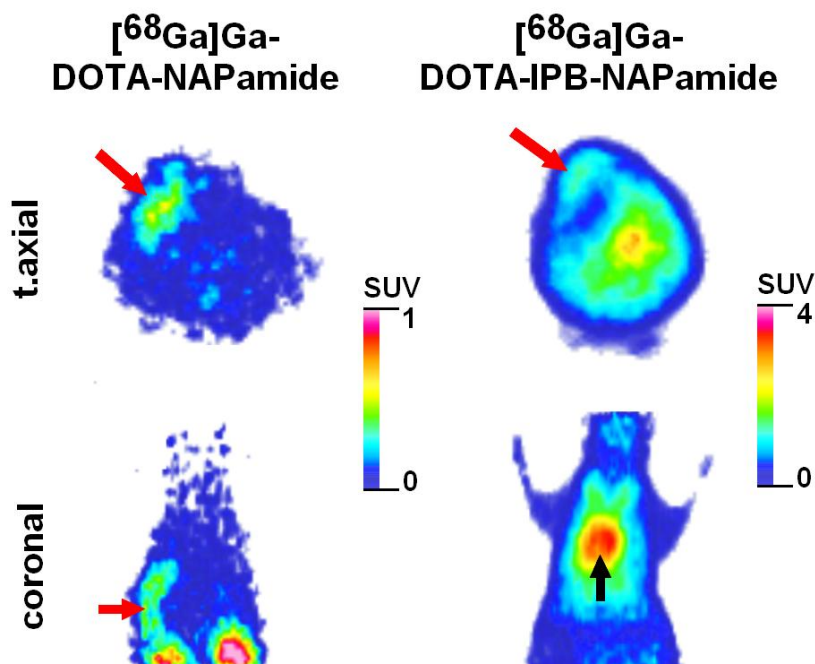
4.4.3.1 A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-NAPamid és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-IPB-NAPamid biológiai vizsgálata

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-NAPamid és a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-IPB-NAPamid tumor célzási potenciáljának és szervi megoszlásának a vizsgálatát *in vivo* PET képalkotással és *ex vivo* biodisztribúcióval valósítottuk meg B16F10 tumort hordozó egerek felhasználásával. Az irodalomból ismert B16F10 tumor modell jól alkalmazható a rosszindulatú melanómát célzó radiofarmakonok vizsgálatára, mivel magas MC1-R-expressziót mutat. [134].

A PET felvételek kvalitatív elemzése során megállapítható, hogy a szubkután növekvő daganatok egyértelműen azonosíthatók mindkét MC1-R-specifikus radiofarmakonnal végzett vizsgálat során. A kapott tumor-akkumulációk alátámasztják, hogy a ^{68}Ga -jelzett radiofarmakonok megfelelő mértékben kötődnek az MC1-R receptorhoz és így alkalmasak a melanomatumorok kimutatására. Azonban magasabb radiofarmakon-felvétel volt megfigyelhető a nem célzott szövetekben, szervekben a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-IPB-NAPamid esetében a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-NAPamid-hoz képest (66. ábra).

Továbbá a bomláskorrigált PET-felvételek kvantitatív analízisének eredményei alapján szignifikáns különbség figyelhető meg a két ^{68}Ga -jelzett vegyület között, mert a SUV_{mean} érték $0,43 \pm 0,09$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-NAPamid esetében, míg $1,31 \pm 0,24$ a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-IPB-NAPamid esetében ($p < 0,05$). Ez az eredmény összhangban van azokkal az irodalmi adatokkal [131], amelyek szerint a különböző albuminkötő egységek

(pl. a 4-(p-jód-fenil)-butánsav (IPB)) beépítése a molekulába növeli a kisméretű, gyors kiürülésű, daganat-specifikus vegyületek biológiai felezési idejét és ezzel párhuzamosan a tumor-akkumulációjukat is.



66. ábra Reprezentatív bomláskorrigált PET felvételek B16F10 melanomatumort hordozó egerekről 90 perccel a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NAPamid}$ és $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-IPB-NAPamid}$ intravénás injekciója után és 9 ± 1 nappal az MC1-R pozitív egér B16F10 melanoma sejt transzplantációja után. Piros nyilak: B16F10 daganat, fekete nyíl: szív.

Az *in vivo* adatokkal párhuzamosan a megnövekedett keringési idő hatása az *ex vivo* szervi megoszlásos vizsgálatok eredményeiben is megmutatkozott. A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-IPB-NAPamid}$ radiofarmakonnal végzett vizsgálatokban a vizsgált szervekben és szövetekben magasabb radiotracer felvételt mértünk, mint az albuminkötő nélküli $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NAPamid}$ esetében ($p \leq 0,01$; 16. táblázat). Továbbá a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-IPB-NAPamid}$ megnyújtott keringési idejét a vérben mért magas radioaktivitás is igazolta, mivel a vér %ID/g értéke $14,21 \pm 1,87$ volt a radiofarmakon beadása után 90 perccel. Míg a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NAPamid}$ felvételi mintázatának értékelése során, a vesék kivételével alacsony radioaktivitást észleltünk a vizsgált hasi és mellkasi szervekben.

16. táblázat A [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és a [^{68}Ga]Ga-DOTA-IPB-NAPamid *ex vivo* szervi megoszlás vizsgálata B16F10 daganatot hordozó egerekben 90 perccel a radifarmakonok intravénás beadása után és 9 ± 1 nappal a tumor indukció után. A %ID/g szövet értékeket átlag $\pm$ SD-ként adjuk meg. $n = 5$ egér/radifarmakon. A [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és a [^{68}Ga]Ga-DOTA-IPB-NAPamid felhalmozódása közötti szignifikancia szint a vizsgált szervekben és szövetekben: $p \leq 0,01$ (**).

szerv/szövet	[^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamide (%ID/g)	[^{68}Ga]Ga-DOTA-IPB-NAPamide (%ID/g)
vér	0,35 $\pm$ 0,10	14,21 $\pm$ 1,87**
máj	0,31 $\pm$ 0,08	2,64 $\pm$ 0,11**
lép	0,15 $\pm$ 0,02	2,37 $\pm$ 0,25**
vese	3,07 $\pm$ 0,35	4,57 $\pm$ 0,88
vékonybél	0,35 $\pm$ 0,13	2,41 $\pm$ 0,03**
vastagbél	0,30 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 1,25
gyomor	0,24 $\pm$ 0,09	2,97 $\pm$ 1,38**
izom	0,08 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,18**
tüdő	0,33 $\pm$ 0,06	6,32 $\pm$ 0,91**
szív	0,10 $\pm$ 0,06	5,14 $\pm$ 0,72**
agy	0,03 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,02**
zsír	0,16 $\pm$ 0,03	2,02 $\pm$ 0,65**
B16-F10 tumor	1,18$\pm$0,27	5,06$\pm$1,08**

SD: standard deviation

Az elvégzett preklinikai vizsgálat alapján az albuminkötő egység jelenléte csökkentette a [^{68}Ga]Ga-DOTA-IPB-NAPamid komplex diagnosztikai PET ágensként való alkalmazásának a potenciálját a referencia vegyülethez képest, ami főleg a nem célzott szervekben talált magas radiofarmakon-felhalmozódásnak a következménye.

4.4.3.2 A [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-NAPamid és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-IPB-NAPamid *ex vivo* szervi megoszlása

A [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-NAPamid és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-IPB-NAPamid radiofarmakonok MC1-R-specifititásának és szöveti felvételi mintázatának értékelésére csak *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat végeztünk B16F10 daganatot hordozó, hímnemű C57BL/6 egerek felhasználásával. Ebben az esetben a PET képalkotás nem volt

lehetséges, mivel a bizmut-205/206 izotóp nem rendelkezik olyan radioaktív sugárzással, amelyet a PET kamera képes detektálni.

A $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett radiofarmakonok vizsgálata során kapott %ID/g adatok (17. táblázatban) szoros korrelációt mutattak a ^{68}Ga -jelölt vegyületek *ex vivo* szervi megoszlás vizsgálata során kapott felvételi értékekkel (9. táblázatban).

17. táblázat A $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-NAPamid és a $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-IPB-NAPamid *ex vivo* biológiai megoszlási vizsgálata B16F10 daganatot hordozó egerekben 90 perccel a radiofarmakon intravénás beadása után és 9 ± 1 nappal a tumor indikáció után. A %ID/g szövet értékeket átlag $\pm$ SD-ként adtuk meg. $n = 5$ egér/radiofarmakon. A $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-NAPamid és a $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-IPB-NAPamid felhalmozódása közötti szignifikancia szint a kiválasztott szervekben és szövetekben: $p \leq 0,05$ (*) és $p \leq 0,01$ (**).

szerv/szövet	$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-NAPamide (%ID/g)	$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-IPB-NAPamide (%ID/g)
vér	$0,34 \pm 0,08$	$13,75 \pm 3,58^{**}$
máj	$1,09 \pm 0,17$	$2,54 \pm 0,91^*$
lép	$0,53 \pm 0,12$	$2,07 \pm 1,35^{**}$
vese	$8,78 \pm 3,61$	$3,85 \pm 0,55$
vékonybél	$0,31 \pm 0,19$	$1,99 \pm 0,21^{**}$
vastagbél	$0,39 \pm 0,11$	$1,02 \pm 0,86$
gyomor	$0,18 \pm 0,07$	$1,59 \pm 1,11^{**}$
izom	$0,04 \pm 0,02$	$1,20 \pm 0,75^{**}$
tüdő	$0,44 \pm 0,08$	$6,14 \pm 1,62^{**}$
szív	$0,16 \pm 0,03$	$4,52 \pm 1,13^{**}$
agy	$0,04 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,10^{**}$
zsír	$0,03 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,96^{**}$
B16-F10 tumor	$3,14 \pm 0,32$	$4,50 \pm 0,98^*$

SD: standard deviation

A két $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett vegyület *ex vivo* vizsgálata során eltérő biodisztribúciós profilokat kaptunk. Összehasonlítva a két $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett vegyületnek a vizsgált szervekben és szövetekben kapott radioaktivitás-koncentrációját, azt mondhatjuk, hogy a $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-IPB-NAPamid értékei szignifikánsan nagyobbak voltak ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) a $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTA-NAPamid értékeihez képest. Ez egyrészt azt mutatja, hogy

lipofilabb jellege miatt, amit a korábban mért logP értéke is alátámaszt, az albuminkötő csoportot tartalmazó vegyület magasabb hepatikus és alacsonyabb renális akkumulációval rendelkezik (17. táblázat), azaz a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-IPB-NAPamid}$ eliminációja a szervezetből a hepatobiliáris rendszeren keresztül is végbe megy.

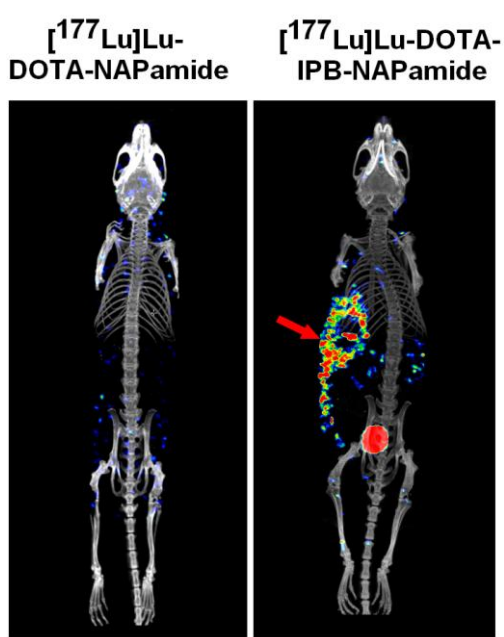
Továbbá a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-IPB-NAPamid}$ dal kezelt állatok esetében nagyobb radiofarmakon-felvétel történik a vérben és a vérből szervekben, azaz a tüdőben és a szívben, ami az albuminkötő egységgel rendelkező radiofarmakon megnövekedett keringési idejével magyarázható. Ezek a farmakokinetikai tulajdonságok rontják ennek a Bi-komplexnek a klinikai felhasználhatóságát.

Ezzel szemben a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-NAPamid}$ szervi megoszlásos vizsgálata során a vizsgált szervekben és szövetekben mérsékelt radiofarmakon-felvételt észleltünk, ami megegyezett kutatócsoportunk ^{213}Bi -jelzett DOTA-Napamid származékok vizsgálatával kapcsolatos korábban publikált kutatási eredményeivel [135]. A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-NAPamid}$ esetében a gyors vese kiürülést a vér alacsony aktivitása és a radiofarmakon magas vesefelvétele ($8,78 \pm 3,61\% \text{ID/g}$) igazolta.

Vizsgáltuk még a $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett DOTA konjugált NAPamid származékok MC1-R-specifitását B16F10 melanomatumort hordozó egerekben 90 perccel a radiógyógyszerek beadása után. A B16F10 daganatok nagymértékű radiofarmakon-felvétele bizonyítja a $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett NAPamid molekulák tumorcélzó képességét, mivel a tumor radiofarmakon-felvétele $3,14 \pm 0,32\% \text{ID/g}$ a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-NAPamid}$ és $4,50 \pm 0,98\% \text{ID/g}$ a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-IPB-NAPamid}$ esetében. Az albuminkötő egységgel rendelkező radiofarmakon esetében ugyan valamivel nagyobb volt a B16F10 tumor radiofarmakon-felvétele, de a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTA-NAPamid}$ nagymértékű tumor akkumulációja elhanyagolható máj felvétellel párosult ($\% \text{ID/g}$: $1,09 \pm 0,17$), ami magas tumor/háttér arányhoz vezetett és ez egy nagyon fontos paraméter a klinikai felhasználhatóság szempontjából.

4.4.3.3 [^{177}Lu]Lu-DOTA-NAPamid és [^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamid biológiai vizsgálata

A biológiai kísérleteink harmadik részében *in vivo* képalkotó és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat végeztünk a β -sugárzó ^{177}Lu -jelzett NAPamid származékok tumorfelvételi tulajdonságainak és daganatcélzási potenciáljának a meghatározására. Az *in vivo* SPECT/CT képalkotó vizsgálatok alapján a szubkután növekvő B16F10 daganatok egyértelműen azonosíthatók voltak a [^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamid injekció beadása után 24 órával; ugyanakkor az albuminkötő egységgel nem rendelkező referencia vegyület esetében a rosszindulatú daganat nem volt kimutatható ebben a vizsgálati időpontban (67. ábra).



67. ábra Reprezentatív MIP SPECT/CT-vizsgálatok B16F10 daganatos egerekről 24 órával a [^{177}Lu]Lu-DOTA-NAPamid és [^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamid intravénás beadása után és 9 ± 1 nappal a szubkután MCI-R pozitív B16F10 sejtbeültetés után. Piros nyíl: B16F10 daganat. MIP: 3D maximális intenzitású vetítés.

Ezek az eredmények jól korreláltak az *ex vivo* biodisztribúciós adatokkal (18. táblázat), amelyek szintén megerősítették a [^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamid szignifikánsan megnövekedett ($p \leq 0,01$) tumorfelvételét a [^{177}Lu]Lu-DOTA-NAPamidhoz képest. Hasonlóan a ^{68}Ga - és $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett radiofarmakonokhoz, az

albuminkötő rész jelenléte felelős a megnövekedett tumorfelvételért és a tumorretencióért. A logP értékekkel összhangban, ebben az esetben is magasabb májakkumulációt figyeltünk meg az IPB-tartalmú ^{177}Lu -jelölt radiofarmakon esetében, de érdekes módon a vese radiofarmakon-felvétele is emelkedett volt (18. táblázat). Ez arra utalhat, hogy a farmakon a vesén, valamint a máj-eperendszeren keresztül is ürül. Továbbá ebben az esetben is emelkedett radiofarmakon-dúsulás volt található a vérben és a vérbő szervekben, ami az albuminkötő egység miatti megnövekedett keringési idővel magyarázható.

18. táblázat A $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-NAPamid}$ és a $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-IPB-NAPamid}$ *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálata B16F10 daganatot hordozó egerekben 24 órával az intravénás radiofarmakon injekció után és 9 ± 1 nappal a tumor indukció után. A %ID/g szövet értékeket átlag $\pm$ SD-ként adjuk meg. $n = 5$ egér/radiofarmakon. A $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-NAPamid}$ és a $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-IPB-NAPamid}$ közötti szignifikancia a kiválasztott szervekben és szövetekben a következő volt $p \leq 0,01$ (**).

szerv/szövet	$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-NAPamide}$ (%ID/g)	$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-IPB-NAPamide}$ (%ID/g)
vér	0,02 $\pm$ 0,02	3,71 $\pm$ 0,73**
máj	0,24 $\pm$ 0,13	1,97 $\pm$ 0,13**
lép	0,07 $\pm$ 0,04	1,32 $\pm$ 0,20**
vese	1,85 $\pm$ 0,79	5,58 $\pm$ 1,59
vékonybél	0,01 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,03**
vastagbél	0,02 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,11**
gyomor	0,02 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,11**
izom	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,07**
tüdő	0,04 $\pm$ 0,03	2,50 $\pm$ 0,24**
szív	0,01 $\pm$ 0,00	1,30 $\pm$ 0,12**
agy	0,00 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,01**
zsír	0,01 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,34**
B16-F10 tumor	0,16$\pm$0,15	4,16$\pm$1,86**

SD: standard deviation

Összegezve a ^{68}Ga -, $^{205/206}\text{Bi}$ - és ^{177}Lu -jelzett komplexek vizsgálata során kapott *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós eredményeket, megállapíthatjuk, hogy az albuminkötő egységet tartalmazó ^{68}Ga -, $^{205/206}\text{Bi}$ - és ^{177}Lu -jelzett MC1-R specifikus NAPamid radiofarmakonok megnövekedett keringési idejük miatt szignifikánsan nagyobb

radiofarmakon-felvételt mutattak B16F10 melanoma daganatokban és a többi vizsgált szervben az IPB egység nélküliekhez képest.

Továbbá azt is elmondhatjuk, hogy az összes vizsgált NAPamid-alapú radiofarmakon szelektív MC1-R kötő képességgel rendelkezett, ezért a diagnosztikai gallium-68 izotóppal jelzett származékok a MC1-R expresszálo malignus melanoma diagnosztikájára, míg a terápiás bizmut-213 és lutécium-177 izotóppal jelöltek az MC1-R pozitív rákos megbetegedések célzott sugárterápiájára lehetnek potenciálisan alkalmasak.

Megjegyzendő azonban, hogy az albuminkötő egység bevezetése elsősorban a hosszú felezési idejű lutécium-177 izotóppal jelölt radiofarmakon esetében volt igazán előnyös. Mivel a rövid felezési idejű ^{68}Ga , valamint a ^{213}Bi helyett $^{205/206}\text{Bi}$ nuklidokkal jelzett radiofarmakonok intravénás beadása után 90 perccel végzett kísérletekben az IPB-vel konjugált DOTA-NAPamid megnövekedett keringési ideje ugyan növelte a radiofarmakon tumorfelvételét, ugyanakkor magas háttérfelvételt is eredményezett. Ez a nem célzott szövetekben található magas radiofarmakon-felvétel rontja a PET képek kontrasztját, de a terápiás bizmut-213 izotóppal jelzett vegyület esetén is előnytelen a klinikai felhasználhatóság szempontjából.

A radiofarmakonok intravénás beadása után 24 órával elvégzett kísérletekben az albuminkötő egység bevezetése jelentősen növelte a $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-IPB-NAPamid}$ tumorfelvételét, míg az IPB egységet nem tartalmazó referencia vegyület már nem is volt kimutatható ebben az időpontban. Ugyanakkor a $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-IPB-NAPamid}$ esetében is magas radiofarmakon-felhalmozódást mértünk a vérben és a vérbő szervekben, és ennek csökkentése elengedhetetlen a komplex klinikai felhasználáshoz. Ezért a további kutatások során célszerűbb lenne a 4-(p-jód-fenil)-butánsav helyett az albuminhoz kisebb mértékben kötődő molekuláriszletet alkalmazni albuminkötő egységként, például p-(tolil)vajsavat, mert így kiküszöbölhetnénk ezt a problémát [136].

5. Anyagok és módszerek

A PC2AM^{nBu} (**14**) ligandum szintéziséhez használt kiindulási vegyületeket a Merck Life Science Kft., Tokyo Chemical Industry és Fluorochem, míg az oldószereket a VWR International Kft. és a Molar Chemicals Kft. cégektől szereztük be. Az oszlopkromatográfiás tisztítást UV-VIS detektorral felszerelt CombiFlash® EZ Prep kompakt flash kromatográfon (#68-5230-026) végeztük, a készülékhez pedig Redisep® Rf Gold szilikagélt tartalmazó flash oszlopot használtunk. Az áramlási sebesség 40 mL/perc volt. A reakciók követését és a termékek tisztaságának ellenőrzését Waters 2690 Separation Module analitikai HPLC rendszerrel végeztük, melyhez Waters 996 diódasoros detektort és Phenomenex Luna® 5 µm C18(2) 100 Å, 150 x 4,6 kolonnát kapcsoltunk. A kolonnátér hőmérséklete 25°C-os volt, az áramlási sebességet 1 mL/perc-re állítottuk és a jelek detektálását 220 és 260 nm-en végeztük. Az A eluens: 5% TFA, B eluens: MeCN, míg az alkalmazott gradiens a következő volt: 0 perc: 100% A, 15 perc: 10% A, 16 perc: 100% A, 25 mL/perc-es áramlási sebesség mellett. A ligandumok végső tisztítását YL9120S UV/VIS detektorral kapcsolt YL9100 HPLC rendszerrel (Youngin Chromass) valósítottuk meg, az elválasztást Phenomenex Luna® 5 µm C18(2) 100 Å, 250 x 21,2 mm (Part No: 00G-4252-P0-AX) kolonnán végeztük 25 mL/perc áramlási sebesség mellett. A HPLC-s vizsgálatokhoz használt oldószerek (VWR International Kft. cégtől vásároltuk) minősége HiPerSolv Chromanorm gradient grade.

A vegyületekről felvett ¹H- és ¹³C-NMR spektrumokat Bruker Avance DRX 360 MHz-es (5 mm-es QNP mérőfejjel felszerelt) és Bruker Avance II 500 MHz (5 mm z-gradiens BBI mérőfejjel felszerelt) spektrométerrel rögzítettük. A spektrumok kémiai eltolódásának kalibrálásához deuterált oldószereket használtunk. A HR-MS spektrumokat a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének munkatársai (Dr. Gáspár Attila, Nagy Cynthia Nóra) mérték Bruker maXis II UHR ESI-QTOF MS készülékkel.

A további kísérletekben használt reagensek és oldószerek nagy részét a Sigma-Aldrich-től szereztük be és további tisztítás nélkül használtuk fel. 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetrail)tetraecetsav(DOTA) és a DOTA-trisz(tBu) észtert (**16**) ChemaTech-től vásároltuk. A DOTA-NAPamid (**19**) prekuzort az ABX-től szereztük be. CASLO ApS-től rendeltük az Ac-Nle-Asp(tBu)-His(Trt)-(D-Phe)-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Gly-Lys peptidet MBHA gyantához (**8**) kötve. Az ultratiszta vizet és a sósavat Carl Roth-tól vásároltuk meg. A vékonyréteg kromatográfiához Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) TLC lapot használtunk, míg a detektálás UV fénnel történt. Az ¹H (400 MHz) és ¹³C (128 MH) NMR spektrumokat Bruker DRX-400 spektrométer segítségével vettük fel. A ¹H NMR mérések során a belső standardként TMS-t (0,000 ppm) alkalmaztunk. Az LC-MS méréseket Waters Acquity UPLC Iclass rendszerhez kapcsolt maXis II UHR ESI-QTOF MS Bruker tömegspektrométerrel valósítottuk meg. A Waters LC Module 1 HPLC rendszert Luna C18 10 µm (250 x 10 mm) oszloppal használtuk a félpreparatív HPLC tisztításokhoz és az A eluens: 0,1% hangyasavat vagy TFA volt, míg a B eluens: acetonitril vagy 95%-os acetonitril volt. Analitikai HPLC-s vizsgálatokhoz

Waters 2695 Alliance HPLC rendszert alkalmaztuk Luna C18 3 μm (150 x 4.6 mm) oszloppal, valamint a fent említett eluensekkel. Kivételt csak a szkandium-44 jelzett vegyületek vizsgálata képzett, ahol az A eluens: 0,01 M (pH = 3) oxálsav oldat volt. A félpreparatív HPLC rendszer esetében UV detektort alkalmaztunk, míg radioanalitikai mérések esetén az UV detektor mellett ATOMKI 120 CsI szcintillációs radioaktív detektort használtunk. Az eluens készítéséhez a vizet a Milli-Q, 18.2 M Ωcm^{-1} víztisztítóból nyertük, míg az acetonitrilt Fisher Solutions-től rendeltük. A radiokémiai kísérletekhez a gallium-68 izotópot egyrészt $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ izotópgenerátorból (Eckert-Ziegler, eluens: 0,1 M u.p. HCl) nyertük, de egyes kísérletekhez a DE KK Orvosi Képző Kórház Nukleáris Medicina Tanszéken található ciklotronban előállított ^{68}Ga -ot használtuk. A többi alkalmazott izotópot, azaz a ^{44}Sc -t, ^{52}Mn -t és a $^{205/206}\text{Bi}$ -ot szintén a tanszéken található ciklotronban állítottuk elő. A mangán-52 izotóp előállításához használt krómot az Alfa Aesar-től szereztük be. A lutécium-177 izotópot az IZINTA Trading Co. Kft-től (Magyarország) vásároltuk. A minták radioaktivitását CAPINTEC CRC-15PET készüléken határoztuk meg. A radioizotópok tisztításához az AG[®] 1-X8 gyantát a Bio-Rad-tól, a ZR, a TK200-as és a DGA gyantákat pedig a Triskem-től szereztük be. A radiofarmakonok tisztításához használt szilárd fázisú oszlopokat a következő cégektől vásároltuk, a SepPak[®] C18 Plus és SepPak[®] C18 Plus Light oszlopokat a Waterstől, míg a LiChrolut EN oszlopot a Merck-től. A Strata SCX SPE oszlopot a Phenomenextől szereztük be. A radioTLC-hez iTLC-SG papírt az Agilent Technologiéstől szereztük be. Az iTLC kromatogramokon a radioaktivitást MiniGinta TLC-szkennelvel detektáltuk és az adatok kiértékelését a GINA-Star TLC szoftverrel végeztük.

5.1 Kémiai szintézisek

A kémiai szintézisek a függelékben találhatók.

5.2 Analitikai módszerek

5.2.1 A ligandumok és a Sc(III)-komplexek pH-potenciometriás vizsgálata

Az egyensúlyi méréseket a DO3AM-NI esetében 37°C-on, míg a PC2AM^{nBu} esetében 25°C-on végeztük. A ligandumok protonálódási állandóinak meghatározásához pH-potenciometriás titrálást végeztünk 0,16 M NaOH-val, az 5,00 mL-es minta ~2 mM koncentrációban tartalmazta a ligandumot. A protonált és tercier hidroxikomplexek képződését pH-potenciometriás titrálással vizsgáltuk, ennek során az előzetesen előállított komplexet (2 mM) standardizált NaOH oldattal titráltuk. A $\log_{\text{KM}^{\text{H}}-1\text{L}}$ érték kiszámításához a $V_{\text{NaOH}} - \text{pH}$ adatokat a 1,68 – 11,85 pH tartományban határoztuk meg. A pH-potenciometriás titrálásokat Metrohm 785 DMP Titrino titráló egységhez tartozó Metrohm-6.0233.100 kombinált elektródával végeztük. A kétpontos kalibrációhoz KH-ftalát (pH = 4,005) és bórax (pH = 9,177) puffereket használtunk. A titrált mintákat mágneses keverővel kevertük, és N₂ gázt buborékolattunk át az oldatokon, hogy távol tartsuk a CO₂-t a mintától. A $[\text{H}^+]$ mért pH-értékekből történő kiszámításához az Irving és munkatársai által publikált módszert alkalmaztuk [137]. A módszer során a 0,01 M HCl oldatot standardizált NaOH oldattal titráltunk 0,15 M NaCl ionerősség mellett 37°C-on. A mért (pH_{read}) és a számított pH ($-\log[\text{H}^+]$) értékek közötti különbségeket használtuk az

egyensúlyi H^+ koncentráció pH_{meas} értékekből történő meghatározásához a titrálás során. Az egyensúlyi állandók kiszámításához a PSEQUAD programot használtuk [138].

5.2.2 A Sc(III)-komplexek ^1H és ^{45}Sc -NMR mérései

Az ^1H - és ^{45}Sc -NMR méréseket (400 MHz, illetve 97 MHz) Bruker VT-1000 hőszabályozóval és BB inverz z-gradiens mérőfejjel (5 mm) felszerelt Bruker DRX 400 (9,4 T) spektrométerrel végeztük. A kinetikai kísérleteket $25^\circ C$ -on, míg az egyensúlyi vizsgálatokat a Sc-PC2AM^{nBu} esetében $25^\circ C$, a Sc-DO3A-NI esetében $37^\circ C$ -on végeztük és kapillárisban lévő D_2O -t használtunk a lockoláshoz. A ^{45}Sc -NMR mérések jellemző paraméterei a következők voltak: TD = 32k, a 90° impulzushossza $p1 = 15,6 \mu s$, a késleltetési időhossza $d1 = 0,1 s$, scan-nek száma NS = 128. Az Sc(III)-komplexek képződési reakcióját ^1H - és ^{45}Sc -NMR spektroszkópiával követtük, a Sc-DO3A-NI esetében 3,80 mM ligandumot és 4,90 mM $ScCl_3$ -at tartalmazott a minta, amelynek teljes savkoncentrációja 1,54 pH-nak felel meg. A Sc-PC2AM^{nBu} komplex képződésének vizsgálatához olyan mintát állítottunk össze $pH = 1,28$ savtartalommal, melyben 10,04 mM ligandum és 10,01 mM $ScCl_3$ volt. A Sc-DO3A-NI egyensúlyi vizsgálatához összesen hat mintát ($0,70 cm^3$) készítettünk 0,05 – 0,2 M teljes H^+ koncentrációval és amelyekben a $[Sc(III)] = [DO3AM-NI] = 3,32 mM$ volt vízben 0,15 M NaCl állandó ionerősség mellett. A Sc-PC2AM^{nBu} komplex stabilitásának meghatározásához 12 mintát állítottunk össze, melyekben a fémion és a ligandumkoncentrációja sorra 3,02 és 3,09 mM és a minták savtartalma 0,80 és 0,05 M között változott. A mintákban az egyensúly beállítását 90 napon át követtük. Az Sc(III) csere a szabad Sc(III) és az Sc(DO3AM-NI) komplex között, valamint a ligandum csere a szabad és a kötött ligandum között a „lassú csere” tartományba esik az aktuális NMR időskálákon (^{45}Sc - és ^1H NMR). Az $Sc(III)_{v\acute{e}z}$ ^{45}Sc -NMR jelének ($\delta = 0 ppm$) intenzitása pontosan mérhető volt, míg az Sc(DO3AM-NI)-komplex széles jelének intenzitása nem. Megmértük viszont a 2-nitroimidazol-rész aromás tartományba eső ^1H -NMR-jeleinek intenzitását a szabad ligandum és az Sc(DO3AM-NI)-komplex esetében is. A Sc(PC2AM^{nBu}) komplex vizsgálata esetében a ^{45}Sc -NMR spektrumokban 92 ppm-nél látható a komplex széles jele ($\nu = 950 Hz$), melynek jelterület értékeivel is számoltunk a stabilitás meghatározásánál. Az $Sc(III)_{aq}$ ^{45}Sc -NMR jelének moláris integrál értékeit meghatároztuk a 0,015 M HCl-t tartalmazó 50 mM-os $ScCl_3$ oldattal, mint referencia mintával. Az NMR intenzitás értékeket a PSEQUAD programmal illesztettük, és így kaptuk meg a stabilitási állandót, a $\log K_{ScL}$ -t. A megadott hiba az illesztés bizonytalanságát jelenti. Az Sc(DO3AM-NI)-komplex disszociációs kinetikáját 1 M HCl-oldatban vizsgáltuk, követve az $Sc(III)_{v\acute{e}z}$ ^{45}Sc -NMR jelének megjelenését és növekedését a 7,30 mM Sc(DO3AM-NI)-komplexet tartalmazó mintában.

5.2.3 A Sc-PC2AM^{nBu} komplex disszociációjának vizsgálata UV-Vis spektrofotométerrel

A Sc-PC2AM^{nBu} komplex disszociációjának savkoncentráció-függését spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk JASCO V-760 készülékkel $\lambda = 280 nm$ -en. A minták komplexkoncentrációja 0,32 mM volt, a minták teljes savtartalma 2,6 – 1,6 M között változott, melyet $HClO_4$ -val biztosítottuk. A méréseket $25^\circ C$ -on és 0,15 M NaCl ionerősség mellett végeztük. A disszociációs vizsgálatok során kapott exponenciális

függvényeket a lent megadott egyenlettel illesztettük, melyből a látszólagos sebességi együtthatók (k_{obs}) határozhatók meg:

$$A_t = A_v + (A_0 - A_v) \times e^{k_{\text{obs}} \times t} \quad (1)$$

ahol az A_t a t időpontban mért abszorbanciát, az A_0 a Sc(III)-komplex, míg az A_v a termékek abszorbanciáját jelöli.

5.2.4 A Mn-PC2AM-NI komplex fizikokémiai vizsgálata

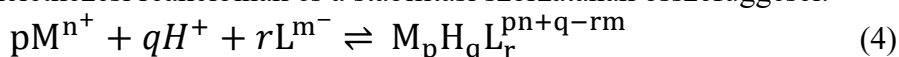
5.2.4.1 pH-potenciometria

A fémkomplexek termodinamikai stabilitását, ha a komplexképződést jól mérhető pH változás kíséri, akkor általában pH-potenciometriás titrálással vizsgálják, mivel a komplexképződési folyamat során a fémionok leszorítják a protonokat a ligandum donortomjairól, amely kompetíciót hoz létre. Ezen folyamatok megváltoztatják az oldat proton koncentrációját. Az eredményt az alábbi összefüggések alapján számolhatjuk ki, mindenekelőtt ismernünk kell a ligandum protonálódási állandóit:



$$K_i^H = \frac{[H_iL]}{[H_{i-1}L][H^+]} \quad (3)$$

A fémkomplexek keletkezési reakcióinak és a stabilitási szorzatának összefüggései:



$$\beta_{pqr} = \frac{M_pH_qL_r^{pn+q-rm}}{[M^{n+}]^p[H^+]^q[L^{m-}]^r} \quad (5)$$

Ha azt feltételezzük, hogy az oldatban a fém és a ligandum aránya az 1:1 (ami a radiofarmakonok esetében csaknem minden esetben így van), illetve azok különböző protonáltságú részecskéi keletkeznek, akkor az alábbi matematikai összefüggésekkel írhatók le töltések nélkül:

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (6)$$

$$K_{ML}^H = \frac{[MHL]}{[ML][H^+]} \quad (7)$$

A komplex egyensúlyi jellemzéséhez a ligandum protonálódási állandói is szükségesek. A PC2AM^{NIM} ligandum és Mn(II)-ionnal alkotott komplexének pH-potenciometriás mérésével a ligandum protonálódási, valamint a Mn(II)-komplex protonálódási és stabilitási állandóját határoztuk meg. A protonálódási folyamatot a 3-as egyenlet írja le, melyben a $[H^+]$, a $[H_{i-1}L]$ ($i = 1$) és a $[H_iL]$ ($i = 2, 3, \dots$) a hidrogénion, a ligandum és annak protonált formáinak egyensúlyi koncentrációját jelenti. Korábbi ismereteink alapján feltételezhető, hogy a ligandum és a Mn(II)-ion komplexképződése során csak egymagvú komplex képződik, így a komplexet, valamint annak protonálódását jellemző stabilitási állandókat a 6-os és 7-es egyenletek írják le, melyekben a megfelelő részecskék egyensúlyi koncentrációi találhatók.

A pH-potenciometriás mérésekhez egy Metrohm 702SM típusú Titrino automata titrátort használtunk, melyhez egy Metrohm 6.00234.100 kombinált üvegelektrodót csatlakoztattunk. Az összeállított minták kezdeti térfogata 5 mL, az ionerőssége pedig 0,15 M volt, melyet NaCl oldattal állítottunk be. A titrálás során 25°C-on termosztáltuk a

rendszert, melybe folyamatos N_2 gázt buborékolattunk. A titrálás során $pH = 2-12$ tartományban dolgoztunk. A használt NaOH oldat pontos koncentrációját KH-ftalát puffer felhasználásával határoztuk meg. A pH-mérőket kétpontos kalibrációval kalibráltuk KH-ftalát ($pH = 4,002$), illetve nátrium-tetraborát ($pH = 9,177$) pufferek alkalmazásával. A felhasznált $MnCl_2$ törzsoldat analitikai tisztaságú sóból készül, pontos koncentrációját EDTA oldattal történő komplexometriás titrálással határoztuk meg. A rendszert jellemző Irving faktort (mely a valódi és mért pH értékek közötti különbséget mutatja) $pH < 2,4$ tartományban,[137] míg $pH > 11$ tartományban a vízionszorzatot határoztuk meg.

A ligandum titrálásából a törzsoldat pontos koncentrációját ($c_{\text{törzs}} = 13,85 \text{ mM}$), valamint protonálódási állandóit; a ligandum és a $Mn(II)$ -ion 1:1 arányú rendszerének titrálásából (ahol 5%-os ligandumfelesleget alkalmaztunk) pedig a komplexet jellemző stabilitási és protonálódási állandókat a Psequad program segítségével határoztuk meg, mely során a lúg fogyás – pH adatpárokat illesztettük. [138]

5.2.4.2 A $[Mn(PC2AM^{NIM})]$ -komplex relaxivitásának meghatározása

A $[Mn(PC2AM^{NIM})]$ -komplex relaxivitását kétféle térerőn (0,49 és 1,41 T), illetve hőmérsékleten ($25^\circ C$ és $37^\circ C$) mértük Bruker Minispec MQ20 és MQ60 kisterű relaxométereken. A T_1 relaxációs időket inverzió átviteli kísérlettel, míg a T_2 relaxációs időket CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) szekvencia alkalmazásával határoztuk meg. A minták össztérfogata $300 \mu L$ volt, melyek mindegyikében 50 mM HEPES ($pH = 7,00$) és $0,15 \text{ M}$ NaCl koncentrációt állítottunk be. A minták ligandumkoncentrációja $1,62 \text{ mM}$ volt, ehhez képest a mintákban található különböző $Mn(II)$ -koncentráció kisebb és nagyobb volt. Így a kisebb $Mn(II)$ -koncentráció tartományban mért relaxációs időkből a kialakult komplex relativitása határozható meg.

5.2.4.3 UV-látható spektrofotometriás mérés

Ezzel a módszerrel vizsgáltuk a $[Mn(PC2AM^{NIM})]$ -komplex savkatalizált disszociációját állandó, 1 M -os ionerősséget tartalmazó mintákban, miközben a savkoncentráció hatását vizsgáltuk a disszociáció sebességére. A méréshez JASCO V-760 készüléket használtunk és a disszociációt $\lambda = 275 \text{ nm}$ -en követtük. A minták térfogata $700 \mu L$ volt melyekhez az előre elkészített $[Mn(PC2AM^{NIM})]$ -komplex oldatának $35 \mu L$ mennyiségű részletét adtuk. A mérés során rögzített abszorbancia értékek exponenciálisan változtak, az adatok illesztéséből a látszólagos sebességi együttható (k_{obs}) határozható meg (1-es egyenlet), ahol az A_t a t időpontban mért abszorbanciát, az A_0 a $Mn(II)$ -komplex, míg az A_∞ a termékek abszorbanciáját jelöli.

A stabilitási állandót pH-potenciometria és UV-vis spektrofotometria alkalmazásával határoztuk meg. A relaxivitást $0,94$ és $1,41 \text{ T}$ térerősségnél 25 és $37^\circ C$ -on mértük.

5.3 Radiokémiai vizsgálatok

5.3.1 Radioizotópok előállítása és tisztítása

5.3.1.1 Gallium-68 izotóp előállítása és tisztítása

A kísérletekhez generátorból nyert, valamint ciklotronnal előállított gallium-68 izotópot is használtunk. Az első esetben a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátort (Ecklert & Ziegler, $1,85 \text{ GBq}$, Galliapharm generátor típusa) 6 mL $0,1 \text{ M}$ -os HCl oldattal eluáltuk, majd a

[⁶⁸Ga]galliumionokat (100-120 MBq) tartalmazó eluátumot Eppard és munkatársai szerint leírt módszerrel kezeltük [117]. Az eljárás során először a [⁶⁸Ga]galliumionokat egy kationcserélő gyantán (Strata SCX, prekondicionálva 5 ml 0,1 M-os sósavval) kötöttük meg, amelyet ezután 1 mL 0,15 M-os sósavas etanol és víz 8:2 arányú elegyével mostunk. A gyantáról a [⁶⁸Ga]galliumionokat 0,9 M-os sósavas etanol-víz 9:1 arányú elegyével eluáltuk (3x100 µL). Ezt az eluátumot használtuk radiokémiai jelzésekre [139]. A gallium-68 izotóp GE PETtrace ciklotronban történő előállításakor 20 mg préselt cinkkorongot 12 MeV-os proton nyalábbal bombáztunk 50 µA-es árammal. Besugárzási idő 10 perc volt. A besugárzott cinktargetet 5 M-os HCl-ban (5 mL) oldottuk, és a kapott [⁶⁸Ga]galliumionokat tartalmazó oldatot ZR ioncserélő gyantán (0,3 mL töltet) tisztítottuk. A [⁶⁸Ga]galliumionok megkötődése után a ZR gyantát 5 M-os HCl oldattal (5 mL) mostuk, majd a gallium-68 izotópot 2 M-os sósavval (5 mL) eluáltuk le az oszlopról. Ezután ezt az eluátumot TK200 gyantán (prekondicionálva 3 mL 2 M-os sósavval) tovább tisztítottuk. A gyantán megkötöttük a [⁶⁸Ga]galliumionokat, majd mostuk 2 M-os sósavval (5 mL). Végül [⁶⁸Ga]galliumionokat 0,05 M-os HCl oldattal frakcionáltan eluáltuk. A radiokémiai szintézishez az így nyert [⁶⁸Ga]GaCl₃ oldatot (130-200 MBq, 400 µL) használtuk.

5.3.1.2 Szkandium-44 izotóp előállítása és tisztítása

A szkandium-44 izotóp GE PETtrace ciklotronban történő előállításához 120 mg kalciumot (99,99%) koronggá préseltünk és egy alumínium-targettartóba nyomtuk, majd 60 perces, 16,5 MeV-es protonnyalábbal és 30 µA-es nyalábárammal történő besugárzás után ~ 300 MBq szkandium-44 izotópot kaptunk. Ezután a besugárzott Ca-korongot 3 M-os u.p. HCl oldatban feloldottuk (4 mL), majd ezt az oldatot 3 M-os sósavval (3 mL) előkondicionált, 70 mg-os DGA ioncserélő gyantából készült oszlopon tisztítottuk. A [⁴⁴Sc]szkandium-ionok megkötődése után az oszlopot először 3 mL 3 M-os HCl oldattal, majd 3 mL 1 M-os HNO₃ oldattal mostuk. Végül a [⁴⁴Sc]szkandiumionok 2 mL 0,1 M-os HCl oldattal frakcionáltan eluáltak az oszlopról, melynek során 200 µL-es frakciókat szedtünk és a legtöményebb frakciót használtuk a radiojelzésekhez.

5.3.1.3 Mangán-52 izotóp előállítása és tisztítása

A mangán-52 izotópot GE PETtrace ciklotronban ⁵²Cr(p,n)⁵²Mn magreakcióval állítottuk elő, ennek során a krómtargetet (250 mg) 16,5 MeV-os protonnyalábbal és 20 µA-es nyalábárammal sugaraztuk be. A 60 perces besugárzás ~150 MBq aktivitású mangán-52 izotópot eredményezett. A mangán-52 izotóp tisztítását Fonslet és munkatársai által leírt [109] szilárd fázisú extrakcióval valósítottuk meg. A besugárzás után 24 órával a besugárzott krómot feloldottuk 2 mL tömény sósavban, majd addig töményítettük, amíg a szilárd CrCl₃ ki nem vált (~1 mL) az oldatból. A szilárd CrCl₃ eltávolítása után az oldatot etanollal 50 mL-re hígítottuk, és ebből az oldatból a mangán-52 izotópot AG® 1-X8 extrakciós oszlop (300 mg) segítségével nyertük ki, amelyet előtte 5 mL 3 v/v%-os sósavas etanollal kondicionáltunk. Az [⁵²Mn]mangánionok megkötése után az oszlopot 3 v/v%-os sósavas etanollal (20 mL) mostuk, majd a mangán-52 izotópot 0,5 mL 0,1 M-os HCl oldattal oldottuk le a gyantáról. Ezután az [⁵²Mn]mangánionokat tartalmazó oldatot szárazra pároltuk és 300 µL tömény sósavban újra feloldottuk, majd etanollal 10 mL-re hígítottuk. Az így kapott oldatot újra megtisztítottuk egy 200 mg-os AG® 1-X8 extrakciós

oszlopon, majd ezt az eljárást még egyszer megismételtük, csak harmadszorra már 100 mg-os AG® 1-X8 gyantát tartalmazó oszlopot használtunk. Az utolsó tisztításkor az mangán-52 izotóp (~100 MBq) 400 µL 0,1 M-os HCl oldattal eluáltuk és az így kapott oldatot használtuk fel a radiojelzésekhez.

5.3.1.4 Bizmut-205/206 izotóp előállítása és tisztítása

A bizmut-205/206 izotópkeveréket GE PETtrace ciklotronban állítottuk elő 16,5 MeV-os proton nyalábbal ólomfólia-target besugárzásával. 20 µA-es nyalábárammal végzett 60 perces protonbesugárzás és 24 órás bomlási periódus után a besugárzott ólomcéltárgyat 2 mL 7 M-os HNO₃ oldatban oldottuk fel. A kapott oldatot kb. 1 mL-re betöményítettük, majd a kivált szilárd csapadéktól elválasztottuk, és végül vízzel 10 mL-re hígítottuk. Ezt a bizmut-205/206 izotópot tartalmazó oldatot egy 70 mg TK200 gyantát tartalmazó oszlopon tisztítottuk, amelyet előtte először 0,7 M-os HNO₃ (1 mL), majd 7 M-os HNO₃ (1 mL) és végül újra 0,7 M-os HNO₃ (5 mL) oldatokkal kondicionáltunk. Az bizmut-205/206 izotópkeverék megkötése után az oszlopot 0,7 M-os HNO₃ oldattal (5 mL) mostuk, amivel a maradék ólomionokat is eltávolítottuk. Végül a bizmut-205/206 izotópkeveréket 2 mL 7 M-os HNO₃ oldattal eluáltuk. A tiszta eluátumot, amely ~40 MBq bizmut-205/206-t tartalmazott szárazra pároltuk, majd 0,1 M-os HCl (300 µL) oldatban újra feloldottuk. A radiojelzésekhez az így nyert oldatot használtuk fel.

5.3.2 Prekurzorok radiojelzése és tisztítása

5.3.2.1 [⁶⁸Ga]Ga-DO3A-NI előállítása

100 µL (~80-100 MBq) generátorból nyert gallium-68 izotópot tartalmazó oldathoz 60 µL NaOAc/HOAc puffert (3 M, pH = 4), 40 µL 5%-os NaOH oldatot, végül 40 µL DO3A-NI törzsoldatot (1 mg/mL) adtunk. A radiojelzést 95°C-on 15 percig végeztük. A reakcióelegyet 1 mL vízzel hígítottuk, majd 5 mL etanollal és 10 mL vízzel kondicionált szilárd fázisú extrakciós (SPE) oszlopon (SepPak® C18 plus, Waters) tisztítottuk. A radiofarmakon megkötődése után az oszlopot 1 mL vízzel mostuk, majd a tiszta radiojelzett vegyületet 0,5 mL etanol és víz 1:1 arányú elegyével eluáltuk az oszlopról. A radiojelzett komplexet tartalmazó oldatot bepároltuk, majd a maradékot 100 µL izotóniás sóoldatban oldottuk fel és ezt az oldatot használtuk a további radiokémiai és biológiai vizsgálatok során. Az előállított radiogyógyszer radiokémiai tisztaságát radio-HPLC-vel határoztuk meg, amihez Waters LC Module 1 HPLC rendszert alkalmaztunk. Az analitikai vizsgálat Luna C18 10 µm (250 x 10 mm) oszlopon történt, a következő körülmények között: eluens A: oxálsav (0,01 M, pH = 3), eluens B acetonitril, az áramlási sebesség: 1 mL/perc, a gradiens: 0 perc: 100% A, 1 perc: 100% A, 10 perc: 100% B, 10,1 perc: 100% A.

5.3.2.2 [⁴⁴Sc]Sc-DO3A-NI előállítása

500 µL (~150 MBq) tisztított [⁴⁴Sc]ScCl₃ oldathoz 100 µL NaOAc/HOAc puffert (3 M, pH = 4), 20 µL 5%-os NaOH oldatot, valamint 5 µL DO3A-NI törzsoldatot (1 mg/mL) adtunk. A radiojelzést 95°C-on 15 percig végeztük. Ezután a reakcióelegyet egy etanollal (5 mL) és vízzel (10 mL) kondicionált LiChrolut EN SPE oszlopon (Merck) tisztítottuk. A radiogyógyszer megkötődése után az oszlopot 1 mL vízzel mostuk, majd a tiszta, jelzett vegyületet 0,5 mL etanol és víz 1:1 arányú elegyével eluáltuk az oszlopról. Az eluátumot

bepároltuk, majd a radiofarmakont 100 μL sóoldatban feloldottuk. Az előállított radiogyógyszer radio-HPLC analízisét a 5.3.2.1 fejezetben leírtak szerint végeztük.

5.3.2.3 [^{44}Sc]Sc-PC2AM-NI és [^{44}Sc]Sc-PC2A-Ph-NI előállítása

100 μL -es (~150 MBq) frakcióhoz 250 μL $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{HOAc}$ puffert (3 M, pH = 4) és 60 μL PC2AM-NI és PC2A-Ph-NI (1 mg/mL) törzsoldatot adtunk hozzá külön-külön. Az elegyet 95°C-on 15 percig melegítettük, majd egy előkondicionált C18 Plus Light oszlopon tisztítottuk. A radiofarmakon megkötődése után az oszlopot 1 mL vízzel mostuk, majd a jelölt vegyületet 250 μL etanollal eluáltuk és betöményítettük, majd a maradékot 100 μL izotóniás sóoldatban oldottuk. A ^{44}Sc -jelzett komplexek radiokémiai tisztaságát radio-HPLC-vel határoztuk meg Waters 2695 Alliance HPLC rendszert alkalmazva és Kinetex XB-C18 2,6 μm (50 $\times$ 4,60 mm) oszlopon. Az analitikai HPLC vizsgálat további paraméterei megegyeztek a 5.3.2.1 fejezetben leírtakkal.

5.3.2.4 [^{52}Mn]Mn-PC2AM-NI és [^{52}Mn]Mn-PC2A-Ph-NI előállításának koncentrációfüggés vizsgálata

[^{52}Mn]MnCl₂ (~25 MBq) 0,1 M-os sósavas oldatát (10 μL) összekevertük 1 M-os HEPES pufferrel (pH = 7, 35 μL), majd 5 μL PC2AM-NI, illetve PC2A-Ph-NI prekursorzt adtunk a keverékhez külön-külön. A prekursorzkoncentrációját úgy állítottuk be, hogy a reakció elegyben 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 és 1 mM legyen. A reakcióelegyeket ezek után 37°C és 95°C-on is inkubáltuk. 15 perc melegítés után mintát vettünk a reakcióelegyekből és iTLC-vel (állófázis: iTLC-SG papír, mozgó fázis: 0,5 M-os citrát oldat (pH = 5,5)) vizsgáltuk a képződött komplex radiokémiai tisztaságát.

5.3.2.5 [^{52}Mn]Mn-PC2AM-NI és [^{52}Mn]Mn-PC2A-Ph-NI előállítása

[^{52}Mn]MnCl₂ (~25 MBq) 0,1 M-os sósavas oldatát (100 μL) összekevertük 1 M-os HEPES pufferrel (pH = 7, 350 μL), majd 50 μL PC2AM-NI, illetve PC2A-Ph-NI 1 mM-os oldatát adtuk a keverékhez külön-külön. A reakcióelegyet 15 percig 95°C-on melegítettük, ezután 5 mL etanollal és 5 mL vízzel kondicionált SPE oszlopon (SepPak® C18 Plus Light, Waters) tisztítottuk. A radiofarmakonok megkötődése után az oszlopot 1 mL vízzel mostuk, ezután a jelzett komplexeket 400 μL 33 v/v%-os etanollal eluáltuk. A kapott oldatokat szárazra pároltuk, és a ^{52}Mn -jelzett komplexeket 100-400 μL izotóniás sóoldattal újra feloldottuk. A radiofarmakonok radiokémiai tisztaságát iTLC-vel határoztuk meg, ahol a mozgó fázis 0,5 M-os citrát oldat (pH = 5,5) volt.

5.3.2.6 [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid és [^{68}Ga]Ga-DOTA-IPB-NAPamid előállítása

Ezekhez a radiokémiai szintézisekhez ciklotronnal előállított gallium-68 izotópot használtunk. 400 μL [^{68}Ga]GaCl₃ oldatot (130-200 MBq) összekevertük 3 M-os $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{HOAc}$ pufferrel (400 μL , pH = 4), majd 20 μL DOTA-NAPamidot (1 mg/mL, 0,0125 μmol), illetve 20 μL DOTA-IPB-NAPamidot törzsoldatot (1 mg/mL, 0,0106 μmol) adtunk hozzá külön-külön. A reakcióelegyeket 95°C-on 15 percig inkubáltuk. A radiojelzett komplexeket SepPak® C18 Plus light oszlopon (Waters) tisztítottuk. Az SPE oszlop kondicionálása 5 mL etanollal és 5 mL vízzel történt. A radiopeptidek megkötődése után 1 mL vízzel mostuk az oszlopot, majd a radiofarmakonokat 150 μL 96%-os etanollal eluáltuk. A kapott oldatokat szárazra pároltuk, és a maradékokat 300 μL

vízben újra feloldottuk. A radiogyógyszerek radiokémiai tisztaságát radio-HPLC-vel vizsgáltuk és HPLC vizsgálat körülményei megegyeztek a 5.3.2.3-as fejezetben leírtakkal.

5.3.2.7 $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ -DOTA-NAPamid és $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ -DOTA-IPB-NAPamid előállítása

450 μL 3 M $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{HOAc}$ puffert ($\text{pH} = 4$) és 50 μL DOTA-NAPamidot (1 mg/mL, 0,0313 μmol), illetve DOTA-IPB-NAPamidot (1 mg/mL, 0,0265 μmol) adtunk $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiCl}_3$ izotóp 0,1 M-os HCl (~20 MBq) oldatához. A reakcióelegyeket 10 percig 95°C -on melegítettük, majd egy SPE oszlopon (SepPak® C18 Plus light, Waters) tisztítottuk, amelyet 5 mL etanollal és 5 mL vízzel előkezeltünk. A radiofarmakonok megkötődése után az oszlopot 1 mL vízzel átmostuk, majd a jelzett komplexeket 200 μL 96 v/v%-os etanollal eluáltuk. Az eluátumokat szárazra pároltuk, ezután a maradékokat 300 μL vízben feloldottuk. A radiogyógyszerek radiokémiai tisztaságát 0,5 M-os citromsav ($\text{pH} = 5,5$) mobil fázissal kifejlesztett iTLC-SG papírral határoztuk meg.

5.3.2.8 $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-NAPamid és $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-IPB-NAPamid előállítása

300 μL $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ (100-130 MBq) 0,05 M-os sósavas oldatát összekevertük 300 μL NaOAc/HOAc pufferrel (3 M $\text{pH} = 4$). Ezután 90 μL DOTA-NAPamidot (1 mg/mL, 0,0564 μmol) vagy DOTA-IPB-NAPamidot (1 mg/mL, 0,0477 μmol) adtunk a keverékhez külön-külön, majd 5 percig 95°C -on melegítettük. A reakcióelegyeket szilárd fázisú extrakcióval (SPE) tisztítottuk SepPak C18 Plus oszlopon a 5.3.2.6 fejezetben leírt módon, valamint a tisztított radiokomplexek minőségellenőrzését is azonos iTLC módszerrel végeztük.

5.3.3 Szérumstabilitási teszt

A jelzett vegyületek vizes oldatát (~1-4 MBq, 50 μL) összekevertük 450 μL patkányszérummal és szobahőmérsékleten inkubáltuk a keveréket 4 óráig. A ^{177}Lu -jelzett komplexek inkubálása viszont 24 óráig tartott. A ^{68}Ga -, a ^{44}Sc -, a $^{205/206}\text{Bi}$ - és az ^{52}Mn -jelzett radiofarmakonok esetében a keverékből mintát vettünk az összekeverés után közvetlenül, illetve 1, 2, 3 és 4 óra után is. A ^{68}Ga -, a ^{44}Sc -jelzett radiogyógyszerek mintáit radio-HPLC-vel vizsgáltuk és HPLC vizsgálat körülményei megegyeztek a 5.3.2.3-as fejezetben leírtakkal. A $^{205/206}\text{Bi}$ - és a ^{52}Mn -jelzett komplexek mintáit radio-iTLC-vel elemeztük, mozgófázisként 0,5 M-os citromsav ($\text{pH} = 5,5$) oldatot, míg állófázisként iTLC-SG papírt alkalmaztunk. A ^{177}Lu -jelzett komplexek esetében 1, 2, 3, 4 és 24 óra után elemeztük a mintákat a fent említett radio-iTLC módszerrel.

5.3.4 Fémcsere vizsgálatok

$[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}$ -PC2AM-NI, $[^{52}\text{Mn}]\text{Mn}$ -PC2A-Ph-NI, $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}$ -PC2AM-NI, $[^{44}\text{Sc}]\text{Sc}$ -PC2A-Ph-NI, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-NAPamid, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-IPB-NAPamid, $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ -DOTA-NAPamid, $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ -DOTA-IPB-NAPamid, $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-NAPamid és $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-IPB-NAPamid radiokomplexek vizes oldatát (49 μL) (~1-4 MBq) összekevertük külön-külön 0,1 mM-os ZnCl_2 és 0,01 mM-os CuCl_2 oldatok 1:1 arányú keverékével (1 μL), valamint 1,02 mM-os MgCl_2 és 2,28 mM-os CaCl_2 oldatok 1:1 arányú keverékével (50 μL), majd szobahőmérsékleten inkubáltuk. A keverékek mintáit az 5.3.3-as fejezetben leírt módszerekkel és ideig vizsgáltuk.

5.3.5 Ligandumcsere vizsgálatok

A radiojelzett származékok (~1-4 MBq) vizes oldatait (50 µL) EDTA vizes oldatával (0,2 M, 50 µL, pH = 7,4) kevertük össze szobahőmérsékleten és inkubáltuk 4 óráig. A lutécium-177-jelzett komplexek esetében 24 órás inkubálás volt. Mintát vettünk az elegyekből az összekeverés után közvetlenül, illetve 1, 2, 3 és 4 óra után (a lutécium-177-komplexek esetében 24 óra múlva is), amelyeket radio-iTLC módszerrel vizsgáltuk, ahol mozgófázisként 0,5 M-os citromsav (pH = 5,5) oldatot, állófázisként pedig iTLC-SG papírt alkalmaztunk. A ^{68}Ga és ^{44}Sc -jelzett komplexek mintáinak elemzésére a 5.3.3 fejezetben leírt analitikai radio-HPLC módszert alkalmaztuk.

A [^{44}Sc]Sc-DO3A-NI estében elvégeztük a ligandumcserét nátrium-oxálát vizes oldatával is (0,2 M, 50 µL, pH = 7,2). Az inkubációs idő szintén 4 óra volt és közvetlenül összekeverés után, illetve 1, 2, 3 és 4 óra múlva vettünk mintát. A mintákat a fentebb említett 5.3.2.1-es fejezet alapján radio-HPLC-el vizsgáltuk.

5.3.6 Az előállított radiofarmakonok $\log P$ meghatározása

A tisztított radiofarmakonokat (50 µL, 1-3 MBq) 450 µL vízzel hígítottuk egyenként, majd 500 µL vízmentes n-oktanolt adtunk az egyes oldatokhoz. Az elegyet 3 percig intenzíven kevertettük, majd 5 percig centrifugáltuk (9000 rpm). A fázisok szétválása után mintát vettünk a n-oktanol fázisból (20 µL) és a vizes fázisból (20 µL), amelyek radioaktivitását gamma számlálóval elemeztük. A mért adatokból kiszámoltuk a $\log P$ értékeket. Az eljárást minden radiofarmakon esetében háromszor ismételtük meg.

5.3.7 Polyoxopalladátok előállítása és vizsgálatai

5.3.7.1 A [$^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL előállítása

20 µL [$^{205/206}\text{Bi}$]BiCl₃ (~3 MBq) 0,1 M-os sósavas oldatának és 80 µL (1,98 µmol) fenil-arzonsav 5 mg/mL-es 0,5 M-os NaOAc/HOAc pufferben készült oldatának az elegyéhez adtunk 1,00 mg szilárd Pd(OAc)₂-ot (4,4 µmol). A reakcióelegyet 80°C-on 10 percig melegítettük, majd 0,22 µm-es fecskendőszűrőn szűrtük. A szűrletet szilárd fázisú extrakciós oszlopon (Waters SepPak C18 Light) tisztítottuk, amelyet 5 ml etanollal és 10 ml vízzel kondicionáltunk előtte. Az oszlopot 1 ml vízzel mostuk, majd a jelzett vegyületet 33%-os etanol oldattal eluáltuk. A [$^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL radiokémiai tisztaságát radio-TLC-vel határoztuk meg, ahol az állófázis iTLC-SG papír, míg a mozgófázis 0,05 M-os Na₂CO₃ oldat volt.

5.3.7.2 A [$^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL_N előállítása

A [$^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL_N szintéziséhez ugyanazt a módszert alkalmaztuk, mint a [$^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL esetében. 20 µL [$^{205/206}\text{Bi}$]BiCl₃ (~3 MBq) 0,1 M-os sósavas oldatát elegyítettük 80 µL (1,64 µmol) (4-azidofenil)arzonsav oldattal (a törzsoldat 5 mg/mL-es 0,5 M nátrium-acetátban készült), majd 1,00 mg (4,4 µmol) szilárd Pd(OAc)₂-ot adtunk hozzá. A [$^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL_N képződését radio-TLC-vel detektáltuk, ahol az álló fázis iTLC-SG papír, mozgó fázis 0,05 M-os Na₂CO₃ oldat volt.

5.3.7.3 A [$^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL_C előállítása

80 µL (1,62 µmol) (4-karboxi-fenil)-arzonsav oldatot (5 mg/ml-es törzsoldat, ami 0,5 M nátrium-acetátban készült) adtuk 1,00 mg (4,4 µmol) szilárd Pd(OAc)₂-hoz. Miután az elegyet 15 percig 80°C-on melegítettük, 20 µL [$^{205/206}\text{Bi}$]BiCl₃ (~3 MBq) 0,1 M-os

sósavas oldatát adtuk a keverékhez, és ismét 80°C-on 10 percig melegítettük. A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}_\text{C}$ képződését radio-TLC-vel detektáltuk, állófázisként iTLC-SG papírt használtunk és mozgófázisként pedig 0,05 M-os Na_2CO_3 oldatot.

5.3.7.4 A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{15}\text{PL}$ előállítás

A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{15}\text{PL}$ szintéziséhez ugyanazt a módszert alkalmaztuk, mint a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}_\text{C}$ esetében. 80 μL (2,56 μmol) fenil-foszfónát oldatot (5 mg/ml-es 0,5 M vizes nátrium-acetátban) adtunk 1,00 mg (4,4 μmol) szilárd $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ -hoz. Miután az elegyet 15 percig 80°C-on melegítettük, 20 μL $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiCl}_3$ (~3 MBq) 0,1 M-os sósavas oldatát adtuk a keverékhez és ismét 80°C-on 10 percig melegítettük. A $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsPL}$ képződését is radio-TLC-vel detektáltuk, ahol az állófázis iTLC-SG papír, a mozgófázis 0,05 M-os Na_2CO_3 volt.

5.3.7.5 $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ stabilitási tesztje

100 μL tisztított $[^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ oldathoz adtunk 100 μL patkányszérumot. A mintákat radio-TLC-vel elemeztük 0, 20, 60, 120 és 180 perces inkubációs idő után. A radio-TLC vizsgálatokhoz RP-TLC-t használtunk, mozgófázisként víz és acetonitril (1:2) keverékével. A tesztet PBS pufferrel is elvégeztük, azonos körülmények között.

5.3.7.6 Radioaktívan jelölt Bi-POP-ok azonosítása RP-TLC-vel

A fordított fázisú vékonyréteg-kromatográfiát (RP-TLC) szilikagél 60 RP-18 F254s rétegen hajtottuk végre és mozgófázisként víz/acetonitril 1:2 arányú elegyét alkalmaztuk. UV-detektálást végeztünk a nem radioaktív Bi-POP-ok esetében, míg a bizmut-205/206 izotóppal jelzett POP-ok esetében a radioaktivitást detektáltuk. A referenciamintákat a kristályos Bi-POP-ok feloldásával állítottuk elő.

5.4 Biológia kísérletek

5.4.1 Kísérleti állatok

A Charles Rivertől vásárolt 12-18 hét közötti C57BL/6 hím egereket és CB17 SCID egereket (Animalab Ltd., Budapest, Magyarország) egyedileg szellőztetett ketrecekben (IVC) helyeztünk el, amelyekben az állatokat $26 \pm 3^\circ\text{C}$ -on és $55 \pm 10\%$ relatív páratartalom mellett tartottuk. A 12 órás laboratóriumi cirkadián ciklust az egész vizsgálat során biztosítottuk. Az állattartás során félszintetikus táp (Akronom Kft., Budapest, Magyarország) és megfelelő ivóvíz állt a kísérleti állatok rendelkezésére ad libitum. „A laboratóriumi állatok tartása és kezelése a magyar törvények és az Európai Unió előírásai szerint történt. Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága regisztrálta (regisztrációs szám: 16/2020/DEMÁB)”.

5.4.2 Sejtvonalak

A KB tumor (emberi eredetű epidermális karcinóma) sejtvonalat és az MC1-R pozitív B16F10 (egér eredetű melanoma) sejtvonalat az American Type Culture Collection-től (CRL-6475TM, ATCC) vásároltuk. A sejtek tenyésztéséhez Dulbecco's Modified Eagle's táptalajt (DMEM, Merck Life Science Ltd.) használtunk, amelyet 1%-os (v/v) MEM Non Essential Amino Acid oldattal (Merck Life Science Ltd.), 1%-os MEM vitamin oldattal (Merck Life Science Ltd.), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO Life Technologies) és 1% antibiotikum és antimikotikum oldattal (Merck Life Science Ltd.) egészítettünk ki. A sejtvonalakat 95%-os páratartalom mellett, 5% CO_2 atmoszférában tartottuk 37°C-on.

A tumorbeültetéshez 85%-os konfluenciájú sejtenyészeteket használtunk. A sejtek életképességét tripán-kék kizárási teszttel értékeltük, és ez minden esetben meghaladta a 90%-ot.

5.4.3 *In vivo* tumormodellek

A tumorhipoxia meghatározásakor a [^{68}Ga]Ga-DO3A-NI és a [^{44}Sc]Sc-DO3A-NI esetében tumorindukció céljából a SCID egerek bal váll területére 5×10^6 KB tumorsejteket injektáltunk 0,9%-os NaCl-ban (100 μL) szubkután. Az *in vivo* és az *ex vivo* kísérleteket körülbelül 13 ± 1 nappal a tumorsejtek injektálása után végeztük, amikor a daganat körülbelül $110 \pm 10 \text{ mm}^3$ térfogatú volt.

A melanoma detektálásának vizsgálatához MC1-R pozitív melanomatumorokat ültettünk be C57BL/6 egerek bal váll régiójába, 100 μL sóoldatban lévő 1×10^5 B16F10 tumorsejt szubkután injekciójával. 9 ± 1 nappal a tumorsejtek beültetése után *in vivo* és *ex vivo* radiofarmakon megoszlási vizsgálatokat végeztünk átlagosan $124 \pm 12 \text{ mm}^3$ tumortérfogat mellett. A [^{44}Sc]Sc-PC2AM-NI, [^{44}Sc]Sc-PC2A-Ph-NI, [^{52}Mn]Mn-PC2AM-NI és a [^{52}Mn]Mn-PC2A-Ph-NI esetén is hasonlóképpen jártunk el, de a tumor beültetése után 13 ± 1 napot vártunk a vizsgálatokkal, hogy a tumorokban kialakuljanak a hipoxiás sejtek.

A tumorsejtek injektálásához az állatokat elaltattuk izoflurán inhalációs gőz, oxigén és dinitrogén-oxid vivőgáz alkalmazásával.

5.4.4 *In vivo* pozitronemissziós tomográfia (PET) képalkotás

A tumorokban előforduló hipoxia detektálása érdekében az *in vivo* képalkotó vizsgálatokhoz egészséges kontroll és KB tumort hordozó CB17 SCID egerekbe $8,42 \pm 0,38 \text{ MBq}$ [^{68}Ga]Ga- vagy [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI injektáltunk a laterális farokvénán keresztül 13 ± 1 nappal a KB tumorsejtek beültetése után. A kísérleti állatokon teljes test T1 súlyozott MRI-vizsgálatot végeztünk (3D GRE EXT multi-FOV; TR/TE 15/2 ms; fázis: 100; FOV 60 mm; NEX 2) 1 Tesla mágneses térrel, majd az MRI képalkotást követően az állatokról 20 perces statikus teljes test PET-felvételeket készítettünk (90 és 240 perccel a radiofarmakon injektálása után) preklinikai nanoScan PET/MRI rendszerrel (Mediso Ltd., Magyarország). A vizsgálatokat altatásban végeztük.

A tumorindukciót követő 13 ± 1 napon, amikor a tumorok már megfelelő méretűek voltak (minimum 1 cm^3) végeztük a PET vizsgálatot. Az elaltatott egerek farki vénájába $6 \pm 1 \text{ MBq}$ [^{44}Sc]Sc-PC2AM-NI-t vagy [^{44}Sc]Sc-PC2A-Ph-NI-t injektáltunk, illetve $6 \pm 1 \text{ MBq}$ [^{52}Mn]Mn-PC2AM-NI-t illetve [^{52}Mn]Mn-PC2A-Ph-NI-t injektáltunk, majd 90 perc és 240 perc inkubálási időt követően (melyet ébren töltöttek az állatok) az állatokat újra elaltattuk és 20 perces statikus PET vizsgálatot végeztünk MiniPET-III kisállat PET készülék segítségével a tumor területére fókuszálva (DE ÁOK OKI Nukleáris Medicina Tanszék).

A melanoma vizsgálatokhoz az egészséges és a B16F10 daganatot hordozó egerek (a daganat beültetése után 9 ± 1 nappal, átlagosan körülbelül 120 mm^3 -es tumortömeg mellett) intravénásan (iv.) $9,36 \pm 0,67 \text{ MBq}$ [^{68}Ga]Ga-DOTA-NAPamid vagy [^{68}Ga]Ga-DOTA-IPB-NAPamid injekciót kaptak az oldalsó farokvénán keresztül. 90 perces radiofarmakon eloszlási idő után a vizsgált egerekről teljes test statikus PET-felvételeket készítettünk (10 perces szkennelés minden ágy pozícióban) izofluránnal indukált

altatásban, preklinikai MiniPET-II kisállat PET készülék alkalmazásával (DE ÁOK OKI Nukleáris Medicina Tanszék).

5.4.5 PET-adatértékelés

A PET-képek rekonstrukciójához 3D OSEM iteratív algoritmust használtunk. A vizsgálati területet (VOI) manuálisan jelöltük ki a szerv/szövet aktivitás határa körül, hogy kiszámítsuk a radiofarmakon koncentrációját. A rekonstruált képek kiértékeléséhez a BrainCAD képelemző programot használtuk. A radiofarmakon felhalmozódásának mértékét a standardizált felvételi érték (SUV = Standardized Uptake Value) segítségével mutattuk be. A SUV paraméter meghatározásához a következő képletet alkalmaztuk, melynél azt feltételeztük, hogy az állat sűrűsége 1g/ml:

$$\text{SUV} = [\text{VOI aktivitás (Bq/mL)}] / [\text{beadott aktivitás (Bq)} / \text{állattömeg (g)}]$$

5.4.6 SPECT képalkotás és értékelés

In vivo egyfoton emissziós számítógépes tomográfia/számítógépes tomográfia (SPECT/CT) adatok gyűjtése a [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-NAPamide és [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamide tumor-célzó képességének értékeléséhez nanoSPECT/CT rendszerrel készültek (Mediso Kft., Budapest, Magyarország) 24 órával a radiogyógyszer intravénás injekciója után. A kísérleti kisállatok iv. $6,34 \pm 1,07$ MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-NAPamid vagy [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamid injekciót kaptak farokvénán keresztül. 24 óra elteltével SPECT/CT felvételeket készítettünk (NanoSpect, Mediso Kft., Budapest, Magyarország) és a rekonstruált képeket InterView™ FUSION 1.2 (Mediso Kft., Budapest, Magyarország) képelemző szoftverrel értékeltük.

5.4.7 *Ex vivo* szervi megoszlási kísérletek

Az *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálatok elvégzéséhez az egyes radiofarmakonokból a PET képalkotáshoz használt aktivitás mennyiséggel azonos radioaktivitást injektáltuk a kísérleti egerek laterális farokvénájába, míg a [^{205/206}Bi]Bi-DOTA-NAPamide és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTA-IPB-NAPamide esetében az injektált dózis csak 2.39 ± 0.19 MBq volt. A képalkotáshoz használt inkubációs idő (90 perc, illetve 240 perc, lutécium jelzett farmakonok esetén 24 óra) eltelte után az egereket izoflurán alkalmazásával inhalációs érzéstelenítéssel túlaltattuk. Ezután a kiválasztott szerveket és szöveteket eltávolítottuk, mint például a gasztrointesztinális szervek, vese, lép, szív, izom, daganat, és vér, lemértük az egyes minták tömegét, majd kalibrált gamma-számlálóval (Perkin-Elmer Packard 406 Cobra, Waltham, MA) a mintákban lévő radioaktivitást. Az így kapott percenkénti beütési számból (CPM) kiszámoltuk az injektált dózis per a szövet grammban megadott tömegének százalékos értékét (%ID/g). Az egyes szervek felvételi értékeit az átlagos % ID/g $\pm$ SD értéként adtuk meg.

5.4.8 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzésekhez MedCalc 18.5 kereskedelmi szoftvercsomagot (MedCalc 18.5, MedCalc Software) használtunk. A statisztikai különbségeket Student-féle kétirányú t-teszt, kétirányú ANOVA és Mann–Whitney U-teszt segítségével határoztuk meg. Az adatokat átlag $\pm$ SD-ként adtuk meg, és a szignifikancia értéke $p < 0,05$ volt, hacsak másként nem jeleztük.

6. Összefoglalás

Különböző fémkomplexek radiógyógyszerként történő alkalmazása egyre elterjedtebb az orvosi diagnosztikai vizsgálatok (PET, SPECT) és a célzott radioterápia során. Ezek a klinikai felhasználási területek *in vivo* körülmények között nagy stabilitással és inertséggel bíró fémkomplexeket igényelnek.

Kutatómunkám első részében olyan fémkomplexek előállítását és vizsgálatát végeztem, amelyek hipoxia-specifikus 2-nitroimidazol vektormolekulát tartalmaznak. A tumorhipoxia jelentősen csökkenti a kemo- és sugárterápia hatékonyságát. A 2-nitroimidazol alapú radiofarmakonok alkalmazásával történő PET vizsgálatok lehetővé teszik a hipoxiás régiók kimutatását a daganatokban, ezzel segítve a hatékony terápia tervezést.

A kutatás során először megvalósítottuk a DO3AM-NI (6) ligandum szintézisét. Ezt követően elvégeztük a Sc(DO3AM-NI) komplex fizikai-kémiai vizsgálatát, ami a következő eredményeket szolgáltatta: az Sc(DO3AM-NI) kelátot viszonylag lassú képződés jellemzi savas közegben, továbbá alacsonyabb a termodinamikai stabilitása a referencia Sc(DOTA) komplexhez képest, ugyanakkor lényegesen inertebb, így kiváló Sc-kötő ligandumnak tekinthető. Ezután előállítottuk a pozitron-sugárzó ^{44}Sc -jelzett DO3AM-NI radiokomplexet, melynek biológiai tulajdonságait *in vivo* és *ex vivo* szervi megoszlás vizsgálatokkal hasonlítottuk össze az irodalomból ismert ^{68}Ga -jelzett DO3AM-NI vegyülettel. A vizsgálatok egészséges és KB tumort hordozó SCID egerek alkalmazásával és a radiofarmakonok intravénás beadása után 90 és 240 perccel történtek. A PET felvételeken nem találtunk szignifikáns különbséget a ^{44}Sc - és ^{68}Ga -jelölt DO3AM-NI tumor specifikáció között, de a ^{68}Ga -DO3AM-NI esetében szignifikánsan nagyobb felhalmozódást tapasztaltunk a májban, a lépben, a vesében, a bélben, a tüdőben, a szívben és az agyban a ^{44}Sc -DO3AM-NI radiofarmakonhoz képest. Ez azt is jelenti, hogy a ^{68}Ga -DO3AM-NI radiofarmakon nagy akkumulációja a nem célzott szervekben, szövetekben kisebb tumor/háttérarányt eredményezett, mivel a ^{44}Sc -DO3AM-NI radiógyógyszer tumor-izom (T/M) aránya minden időpontban körülbelül 10-

15-ször magasabb volt, mint a [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI referencia vegyületé. Az *ex vivo* vizsgálatok jó egyezést mutattak az *in vivo* vizsgálatokkal. Az elvégzett preklinikai vizsgálat alapján kijelenthetjük, hogy a [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI komplex a KB tumorok egyértelmű detektálását teszi lehetővé a PET képeken, ezért ígéretes hipoxia-specifikus PET radiológyszernek tekinthető.

A következő kísérletekben hipoxia-specifikus, 2-nitroimidazolt tartalmazó PCTA-alapú ligandumok Mn(II)- és a Sc(III)-kötő képességét tanulmányoztuk. A vizsgálni kívánt PC2AM-NI (7) és PC2A-Ph-NI (8) vegyületeket Tircsó Gyula és munkatársai állították elő és bocsátották a rendelkezésünkre. Elvégeztük PC2AM-NI (7) ligandum fizikokémiai vizsgálatát, amihez előállítottunk egy referencia vegyületet, a PC2AM^{nBu} (14) molekulát is. Ez alapján a PC2AM-NI ligandum jó Mn(II)-kötő kelátornak tekinthető, mivel a komplexképződés pH = 4 fölött teljes. Ez a kelát inert a savkatalizált disszociációval szemben. A Mn(PC2AM-NI) mérsékelt relaxivitása a fémionhoz koordinálódó vízmolekula hiányát jelzi, ezért MRI alkalmazásra nem javasolható, de ^{52}Mn -alapú PET képalkotásra alkalmas. Továbbá a Sc(PC2AM^{nBu}) stabilitása egy nagyságrenddel marad csak el a Sc(PCTA) értékétől, ugyanakkor az inertsége lényegesen jobb (a disszociációra jellemző sebességi állandók tízszer kisebbnek adódtak). A PC2A-Ph-NI (8) ligandum fizikokémiai vizsgálata még folyamatban van.

Ezután megvalósítottuk a PC2AM-NI (7) és PC2A-Ph-NI (8) vegyületek radiokémiai vizsgálatát, ennek során a ligandumokat pozitron-sugárzó mangán-52 és a szkandium-44 izotópokkal jelöltük, majd elvégeztük az előállított radiokomplexeknek a preklinikai vizsgálatát is. Az mangán-52 izotóppal végzett radiokémiai vizsgálatok során megállapítottuk, hogy 37°C-on a PC2AM-NI ligandum esetében már 0,1 mM ligandumkoncentráció mellett 100%-os volt a radiojelzés hozama, míg ugyanehhez a PC2A-Ph-NI esetében 1 mM ligandumkoncentrációra volt szükség. 95°C-on a PC2AM-NI esetében 0,01 mM-os ligandumkoncentráció is elegendő volt a teljes jelöléshez, míg a PC2A-Ph-NI esetében ez csak 0,1 mM-os ligandumkoncentráció esetében következett be. A szérumbiztonsági és a fémcsere kísérletek során mindkét ^{52}Mn -jelzett komplexet nagy stabilitás jellemezte 4 órán keresztül, ugyanakkor gyenge stabilitást mutattak az EDTA

ligandummal történő ligandumcsere esetén. A ^{44}Sc -jelzett komplexeket 4 órán keresztül nagyfokú stabilitás és inertség jellemezte a fent említett stabilitási vizsgálatok során.

Elvégeztük az előállított ^{52}Mn - és ^{44}Sc -jelzett radiokomplexek preklinikai vizsgálatát. A bomlás-korrigált PET-felvételek kvantitatív analízise során kapott eredmények alapján a szubkután növekvő B16F10 melanomatumorok hipoxiás területei egyértelműen detektálhatóak voltak az ^{52}Mn - és a ^{44}Sc -jelzett PC2A-Ph-NI radiofarmakonokkal. Ezzel ellentétben az ^{52}Mn - és ^{44}Sc -jelzett PC2AM-NI komplexek alkalmazása alacsony tumor-akkumulációt és tumor-izom arányt eredményezett, így ezek a radiojelzett komplexek nem elég hatékonyak a tumorhipoxia kimutatásához.

A kutatás következő részében $^{205/206}\text{Bi}$ -jelzett polioxopalladát (POP) komplexek szintézisét valósítottuk meg, melynek során $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{bizmutionokat}$ építettünk be különböző POP-szerkezetek középpontjába. A radiokémiai kísérletek során hordozómentes bizmut-205/206 izotópokat alkalmaztunk, az α -kibocsátó bizmut-213 helyettesítőiként a $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$, $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsLN}$, $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsLC}$, illetve $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{15}\text{PL}$ komplexek előállításához. A reakciók során a radiofém beépülése a radio-TLC vizsgálat szerint 10 perc alatt teljes végbement, a radiokémiai hozam mindegyik esetben nagyobb volt, mint 99%. A $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ polianiont szilárd fázisú extrakcióval sikeresen tisztítottuk. A tisztított komplex patkányszérumban történő inkubációja során $[\text{}^{205/206}\text{Bi}]\text{BiPd}_{12}\text{AsL}$ -fehérje aggregátum képződött.

A kutatómunkám utolsó részében a radiofarmakonok farmakokinetikai tulajdonságait befolyásoló albuminkötő egység hatását vizsgáltuk, ami képes növelni a rövid biológiai felezési idejű peptidek keringési idejét. A kísérletekhez először az albuminkötő egységet, nevezetesen a *p*-jód-fenilbutánsav (IPB) molekula részletet konjugáltuk egy melanoma-specifikus NAPamid peptidhez. Ezután a *p*-jód-fenilbutánsav egységet tartalmazó NAPamid peptid (**18**) származékot pozitron-sugárzó ^{68}Ga -, alfa-sugárzó ^{213}Bi - és béta-sugárzó ^{177}Lu -izotóppal jelöltük. A bizmut-213 nuklid nehéz hozzáférhetősége miatt kísérleteinkhez ciklotronban előállított bizmut-205/206 izotópot használtunk, ami lehetővé teszi a radiokomplex tumor-specifitásának és farmakokinetikai tulajdonságainak

a vizsgálatát. A preklinikai vizsgálatokhoz referencia vegyületként az irodalomból ismert DOTA-NAPamid (19) radiojelzett komplexeit alkalmaztuk.

A ^{68}Ga -, $^{205/206}\text{Bi}$ - és ^{177}Lu -jelzett komplexek *in vivo* és *ex vivo* vizsgálata során kapott eredmények elemzése során a következő megállapításokat tehetjük. Az albuminkötő egységet tartalmazó ^{68}Ga -, $^{205/206}\text{Bi}$ - és ^{177}Lu -jelzett MC1-R-specifikus NAPamid radiofarmakonok megnövekedett keringési idejük miatt szignifikánsan nagyobb radiofarmakon-felvételt eredményeztek a B16F10 melanoma daganatokban az IPB egység nélküliekhez képest. Azonban a radiofarmakonok intravénás beadása után 90 perccel végzett kísérletekben az IPB-vel konjugált DOTA-NAPamide magas radiofarmakon-felvételt eredményezett a szívben, tüdőben és a vérben is. Ez azt jelzi, hogy az albuminkötő egység sikeresen növelte a radiofarmakon keringési idejét, de sajnos ezzel egyidőben növelte a nem célzott szervek sugárterhelését, valamint a nagy háttér felvétel rontotta a PET képek kontrasztját, főleg a rövid felezési idejű radiofarmakonok esetében.

Az albuminkötő egység bevezetése elsősorban a hosszú felezési idejű lutécium-177 izotóppal jelölt radiofarmakon esetében volt előnyös, mivel a ^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamid esetében a radiofarmakonok intravénás beadása után 24 órával elvégzett kísérletekben az albuminkötő egység jelenléte jelentősen növelte a ^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamid keringési idejét, ami magas tumorfelvételt eredményezett, így ebben az időpontban a tumor még mindig jól detektálható volt a SPECT képeken. Míg az IPB egységet nem tartalmazó referencia vegyülettel készült SPECT képeken a tumor nem volt kimutatható 24 órával a radiofarmakon injektálása után. Sajnos a ^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamid esetében is magas radiofarmakon-felhalmozódást mértünk a vérben és a vérbő szervekben. A radiofarmakon-akkumulációjának a csökkentése a nem célzott szervekben, szövetekben elengedhetetlen a komplex klinikai felhasználásához. Ezért a további kutatások során célszerűbb lenne a 4-(p-jód-fenil)-butánsav helyett az albuminhoz kisebb mértékben kötődő molekula részletet alkalmazni albuminkötő egységként, például p-(tolil)vajsavat, ami kiküszöbölhetné ezt a problémát.

7. Summary

The use of radiometal complexes as radiopharmaceuticals is getting increasingly common in medical diagnostic tests (PET and SPECT) and targeted radiotherapy. These clinical applications require metal complexes with high stability and inertness under *in vivo* conditions.

In the first part of the research work, metal complexes containing a hypoxia-specific 2-nitroimidazole vector molecule were prepared and investigated. During tumour cell proliferation hypoxia triggers angiogenesis (which is crucial for tumour growth), but also induces malignant progression and significantly reduces the effectiveness of chemotherapy and radiotherapy. PET imaging with 2-nitroimidazole-based radiopharmaceuticals allow the detection of hypoxic regions of tumours, thus helping therapy planning.

First, the synthesis of the DO3AM-NI (**6**) ligand was carried out. Then the physicochemical analysis of Sc(DO3AM-NI) complex was performed, which provided the following results: the Sc(DO3AM-NI) chelate was characterized by average slow formation in acidic media, and had lower thermodynamic stability than the reference Sc(DOTA) complex, but was significantly more inert, making DO3AM-NI an excellent Sc-binding ligand.

The ^{44}Sc -labeled DO3AM-NI radiocomplex was synthesized and its biological properties were compared with those of the ^{68}Ga -labeled DO3AM-NI known from the literature by *ex vivo* and *in vivo* biodistribution studies using PET imaging. The studies were performed using healthy and KB tumor-bearing SCID mice, 90 and 240 minutes after the intravenous administration of the radiopharmaceuticals. No significant difference was found between the accumulation of ^{44}Sc - and ^{68}Ga -labeled DO3AM-NI in KB tumors on PET images. However, during the examination of ^{68}Ga -DO3AM-NI we observed a significantly higher accumulation in the liver, spleen, kidney, intestine, lung, heart and brain compared to the ^{44}Sc -DO3AM-NI, resulting in a lower tumor/background ratio for ^{68}Ga -DO3AM-NI. Furthermore, the tumor-to-muscle (T/M) ratio of ^{44}Sc -

DO3AM-NI was approximately 10-15 times higher than that of the reference compound [^{68}Ga]Ga-DO3AM-NI at all time points. The *ex vivo* studies showed good agreement with the *in vivo* studies. Based on these results, we could conclude that the use of [^{44}Sc]Sc-DO3AM-NI complex resulted in higher resolution visualization of KB tumors on PET images and could therefore be considered as a promising hypoxia-specific PET radiopharmaceutical.

In the following experiments, two other 2-nitroimidazole-containing hypoxia-specific molecules were investigated. In these compounds, PCTA was used as a complexing agent. PCTA is a suitable ligand for the complexation of Mn(II) and Sc(III) ions. For this study, PC2AM-NI (**7**) and PC2A-Ph-NI (**8**) ligands were prepared and provided by Gyula Tircsó and co-workers. A physicochemical study of the ligand PC2AM-NI (**7**) was performed, for which a reference compound, PC2AM^{nBu} (**14**), was also prepared. PC2AM-NI was found to be good Mn binder, as the complexation was complete above pH = 4. The inertness towards acid-assisted dissociation was also good. Mn(PC2AM-NI) showed low relaxivity, indicating the absence of inner-sphere water molecule. Therefore, the given complex could not be suggested as a probe for MRI but could rather be recommended for ^{52}Mn -based PET imaging. The stability of Sc(PC2AM^{nBu}) was lower than that of Sc(PCTA) by one order of magnitude, yet its inertness was considerably better (a 10-fold decrease in the rates of dissociation was observed). The physicochemical study of the ligand PC2A-Ph-NI (**8**) is still in progress.

Next, we carried out a radiochemical investigation of PC2AM-NI (**7**) and PC2A-Ph-NI (**8**) compounds by labelling the ligands with positron emitting manganese-52 and scandium-44 isotopes, and then performed a preclinical study of the prepared radiocomplexes. In radiochemical studies with the manganese-52 isotope, we found that at 37°C, 100% radiolabelling was achieved with 0.1 mM ligand concentration for the PC2AM-NI ligand, whereas 1 mM ligand concentration was required for PC2A-Ph-NI. While at 95°C, a ligand concentration of 0.01 mM was sufficient for complete labeling in the case of PC2AM-NI, this was only the case for PC2A-Ph-NI at a ligand concentration of 0.1 mM. In serum stability and transmetalation experiments, both ^{52}Mn -labeled

complexes showed high stability over 4 h, but poor stability against transchelation with EDTA ligand. The ^{44}Sc -labeled complexes were characterized by high stability and inertness during all stability tests for 4 hours.

Subsequently, a preclinical examination of the resulting ^{52}Mn - and ^{44}Sc -labelled radiocomplexes was performed. Quantitative analysis of decay-corrected PET images revealed that hypoxic areas of subcutaneously growing B16F10 melanomatous tumors were clearly detectable with ^{52}Mn - and ^{44}Sc -labeled PC2A-Ph-NI radiopharmaceuticals. In contrast, the use of ^{52}Mn - and ^{44}Sc -labeled PC2AM-NI complexes resulted in low tumor accumulation and tumor-to-muscle ratios, so these radiolabeled complexes are not efficient enough to detect tumor hypoxia.

In the next part of the research, $^{205/206}\text{Bi}$ -radiolabeled POPs have been synthesized by incorporating a $^{205/206}\text{Bi}$ bismuth ion in the center of the POP structures. Carrier-free bismuth-205/206 radioisotopes (as surrogates of α -emitting ^{213}Bi) were incorporated into the POP host-cage for the preparation of $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL, $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsLN, $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsLC, and $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₅PL, respectively. The radiometal incorporation was complete (>99% radiochemical yield) in 10 min according to radiothin-layer chromatography. The $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL polyanion was purified by solid-phase extraction. The incubation in rat serum showed the formation of a $^{205/206}\text{Bi}$]BiPd₁₂AsL–protein aggregate.

Finally, the effect of albumin-binding moiety on the pharmacokinetic properties of radiopharmaceuticals was investigated. In this study, the albumin-binding *p*-iodophenylbutanoic acid (IPB) was conjugated to a melanoma-specific NAPamide peptide. This albumin-binding moiety was able to increase the circulation time of NAPamide, which had a short biological half-life, thereby increasing the low tumour accumulation of this rapidly clearing peptide derivative. We radiolabelled the NAPamide peptide derivative containing the *p*-iodophenylbutanoic acid moiety (**18**) with positron-emitting ^{68}Ga -, α -emitting ^{213}Bi - and β -emitting ^{177}Lu - isotopes. Due to the difficult availability of the bismuth-213 nuclide, we used the bismuth-205/206 isotope produced in the cyclotron for our experiments, which allowed the investigation of the tumour-

specific and pharmacokinetic properties of the radiocomplex. The known DOTA-NAPamide (**19**) was radiolabelled with the above-mentioned radiometals and the resulting radiocomplexes were used as reference compounds for preclinical studies.

Analysis of the results obtained from *in vivo* and *ex vivo* studies of the ^{68}Ga -, $^{205/206}\text{Bi}$ - and ^{177}Lu -labeled complexes, the following conclusions could be made. Due to their increased circulation time, the ^{68}Ga -, $^{205/206}\text{Bi}$ - and ^{177}Lu -labeled MC1-R-specific NAPamide derivatives containing the albumin-binding unit resulted in significantly higher radiotracer uptake in B16F10 melanoma tumors compared to those without the IPB unit. This indicated, that we were successful in increasing the circulation time of the radiopharmaceutical with the albumin-binding unit (IPB). However, in addition to increased tumour uptake, the presence of the albumin-binding unit resulted in higher accumulation of radiotracers in the heart and lungs, as well as in other blood-enriched organs. Unfortunately, this means that conjugation of the IPB unit also increased the radiation exposure to non-target organs, and this higher background radiation degraded the contrast of the PET image.

The increased circulation time was particularly beneficial for radiopharmaceutical labelled with the long half-life lutetium-177 isotope. Since in experiments with [^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamide 24 hours after intravenous administration of the radiopharmaceutical, B16F10 melanoma tumours were well detected on SPECT images. While, in the case of the reference compounds without the IPB moiety, tumours were not detectable at this time point. However, for [^{177}Lu]Lu-DOTA-IPB-NAPamide, we also measured a higher accumulation in blood and blood-enriched organs, and its reduction could be essential for the clinical application of this radiocomplex. Therefore, in further research, it would be preferable to use a molecule that binds less to albumin instead of 4-(p-iodophenyl)-butanoic acid. Such a molecule could be, for example, p-(tolyl)butyric acid, which would eliminate this problem.

8. Irodalomjegyzék

- [1] National Cancer Institute (2025); What Is Cancer?, **2025**, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [2] G. Helmlinger; F. Yuan, F; M. Dellian; K. J. Rakesh; Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat. Med.*, **1997**, 3, 177–182.
- [3] A. Weidemann; R. Johnson; Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ*, **2008**, 15, 621–627.
- [4] P. Vaupel; L. Harrison; Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms, and Cellular Response. *The Oncologist*, **2004**, 9(5), 4–9.
- [5] W. G. Kaelin; P. J. Ratcliffe; G. L. Semenza; Pathways for Oxygen Regulation and Homeostasis. *The 2016 Albert Lasker Basic Medical Research Award (JAMA)*, **2016**, 316(12), 1252–1253.
- [6] G. L. Semenza; HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, **2002**, 8(4), 62–67.
- [7] E. K. Rofstad; K. Sundf r; H. Lyng; C. G. Trop ; Hypoxia-induced treatment failure in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix is primarily due to hypoxia-induced radiation resistance rather than hypoxia-induced metastasis. *Br. J. Cancer*, **2000**, 83(3) 354–9.
- [8] O. Tr dan; C. M. Galmarini; K. Patel; I. F. Tannock; Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **2007**, 99(19), 1441–1454.
- [9] L. E. Davis; S. C. Shalin; A. J. Tackett; Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol. Ther.*, **2019**, 20(11), 1366–1379.
- [10] H. Sung; J. Ferlay; R. L. Siegel; M. Laversanne; I. Soerjomataram; A. Jemal; F. Bray; Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **2021**, 71(3) 209–249.
- [11] A. Sandru; S. Voinea; E. Panaitescu; A. Blidaru; Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J. Med. Life*, **2014**, 7(4), 572–6.
- [12] L. Dall’Olmo; N. Papa; N. C. Surdo; I. Marigo; S. Mocellin; Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH): biology, clinical relevance and implication in melanoma. *J. Transl. Med.*, **2023**, 21, 562.
- [13] A. Catania; S. Gatti; G. Colombo; J. M. Lipton; Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev.*, **2004**, 56(1), 1–29.
- [14] F. Rouzaud; A. L. Kadakara; Z. A. Abdel-Malek; V. J. Hearing; MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **2005**, 571(1–2) 133–152.
- [15] H. Shi; Z. Cheng; MC1R and melanin-based molecular probes for theranostic of melanoma and beyond. *Acta. Pha.rmacol. Sin.*, **2022**, 43, 3034–3044.

- [16] S. Froidevaux; M. Calame-Christe; J. Schuhmacher; H. Tanner; R. Saffrich; M. Henze; A. N. Eberle; A Gallium-Labeled DOTA- α -Melanocyte-Stimulating Hormone Analog for PET Imaging of Melanoma Metastases. *Journal of Nuclear Medicine*, **2004**, 45, 1.
- [17] M. M. Khalil; J. L. Tremoleda; T. B. Bayomy; W. Gsell; Molecular SPECT Imaging: An Overview. *International Journal of Molecular Imaging*, **2011**, 796025, 15.
- [18] M. R. A. Pillai; A. Dash; F.F. Knapp; *Journal of Nuclear Medicine*, **2013**, 54 (2) 313-323.
- [19] National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; *Molybdenum-99 for Medical Imaging*, **2016**, 2. fejezet.
- [20] S. Sharma; M. K. Pandey; Radiometals in Imaging and Therapy: Highlighting Two Decades of Research, *Pharmaceuticals*, **2023**, 16(10), 1460.
- [21] S. R. Cherry; Fundamentals of Positron Emission Tomography and Applications in Preclinical Drug Development. *American College of Clinical Pharmacology*, **2013**, 41(5), 482-491.
- [22] D. W. Townsend; Combined Positron Emission Tomography–Computed Tomography: The Historical Perspective. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, **2008**, 29(4), 232-5.
- [23] G. Delso; S. Ziegler; PET/MRI system design. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2009**, 36(1), 86–92.
- [24] MAGYAR ONKOLÓGIA **2020**, 64, 87–96.
- [25] S. M. Qaim; Cyclotron Production of Medical Radionuclides. *Handbook of Nuclear Chemistry*, **2011**.
- [26] P. W. Miller; Radiolabelling with short-lived PET (positron emission tomography) isotopes using microfluidic reactors. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **2008**, 84(3), 309-315.
- [27] E. E. Kim; S. K. Chung; T. P. Haynie; C. G. Kim; B. J. Cho; D. A. Podoloff; R. S. Tilbury; D. J. Yang; W. K. Yung; R. P. Moser; Differentiation of residual or recurrent tumors from post-treatment changes with F-18 FDG PET. *RadioGraphics*, **1992**, 12(2).
- [28] S.Zhang; N. Smailagic; C. Hyde; A. H. Noel-Storr; Y. Takwoingi; R. McShane; J. Feng; ¹¹C-PIB-PET for the early diagnosis of Alzheimer’s disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2014**, 7.
- [29] W. P. Parker; B. J. Davis; S. S. Park; K. R. Olivier; R. Choo és mkt; Identification of Site-specific Recurrence Following Primary Radiation Therapy for Prostate Cancer Using C-11 Choline Positron Emission Tomography/Computed Tomography: A Nomogram for Predicting Extrapelvic Disease. *European Urology*, **2017**, 71(3), 340-8.
- [30] K. Herholz; T. Hölzer; B. Bauer; R. Schröder; J. Voges; R. I. Ernestus; G. Mendoza; G. Weber-Luxenburger; J. Löttgen; A. Thiel; K. Wienhard; W. D. Heiss; ¹¹C-methionine PET for differential diagnosis of low-grade gliomas. *Neurology*, **1998**.
- [31] S. Keiding; M. Sørensen; D. Bender; O. L. Munk; P. Ott; H. Vilstrup; Brain metabolism of ¹³N-ammonia during acute hepatic encephalopathy in cirrhosis measured by positron emission tomography. *Hepatology*, **2006**, 43, 42-50.

- [32] B. Herzog; L. Husmann; I. Valenta és mkt.; Long-Term Prognostic Value of ^{13}N -Ammonia Myocardial Perfusion Positron Emission Tomography: Added Value of Coronary Flow Reserve. *JACC*, **2009**, 54 (2), 150–156.
- [33] M. Grönman; M. Tarkia; C. Stark; T. Vähäsilta; T. Kiviniemi; M. Lubberink; P. Halonen és mkt.; Assessment of myocardial viability with [^{15}O]water PET: A validation study in experimental myocardial infarction. *J. Nucl. Cardiol.*, **2021**, 28(4), 1271-1280.
- [34] L. Jødal; C. Le Loirec; C. Champion; Positron range in PET imaging: non-conventional isotopes. *Phys. Med. Biol.*, **2014**, 59(23), 7419-34.
- [35] E. C. F. Dijkers; J. G. W. Kosterink; A. P. Rademaker; L. R. Perk; G. A. M. S. van Dongen; J. Bart; J. R. de Jong; E. G.E. de Vries; M. N. Lub-de Hooge; Development and Characterization of Clinical-Grade ^{89}Zr -Trastuzumab for HER2/neu ImmunoPET Imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, **2009**, 50(6), 974-981.
- [36] M. Fani; J. P. André; H. R. Maecke; ^{68}Ga -PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging*, **2008**, 3, 53-63.
- [37] S. R. Banerjee; M. G. Pomper; Clinical applications of Gallium-68. *Appl. Radiat. Isot.*, **2013**, 76, 2-13.
- [38] F. Bois; C. Noirot; S. Dietemann; I. C. Mainta; T. Zilli; V. Garibotto; M. A. Walter; [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in prostate cancer: a comprehensive review. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2020**, 10(6), 349-374.
- [39] C. A. Umbricht; M. Benešová; R. M. Schmid; A. Türlér; R. Schibli; N. P. van der Meulen; C. Müller; ^{44}Sc -PSMA-617 for radiotheragnostics in tandem with ^{177}Lu -PSMA-617—preclinical investigations in comparison with ^{68}Ga -PSMA-11 and ^{68}Ga -PSMA-617. *EJNMMI Research.*, **2017**, 7, 9.
- [40] C. E. Schmidt; L. Gajecki; M. A. Deri; V. A. Sanders; Current State of $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ Radionuclide Generator Systems and Separation Chemistry. *Curr. Radiopharm.*, **2023**, 16(2), 95-106.
- [41] R. Mikolajczak; D. Pawlak; W. Wojdowska; T. Janiak; T. Barcikowski; M. Zoltowska; I. Cieszykowska; J. Parus; I. Hajdu; Gy. Baranyai; V. Forgács; D. Szikra; G. Nagy; Cyclotron production of Sc-44 from natural calcium. *The Journal of Nuclear Medicine*, **2018**, 59(1), 1043.
- [42] F. Rosar; H. G. Buchholz; S. Michels; M. A. Hoffmann; M. Piel; C. M. Waldmann; F. Rösch; S. Reuss; M. Schreckenberger; Image quality analysis of ^{44}Sc on two preclinical PET scanners: a comparison to ^{68}Ga . *EJNMMI Physics*, **2020**, 7, 16.
- [43] M. Pruszyński; A. Majkowska-Pilip; N. S. Loktionova; E. Eppard; F. Roesch; Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter ^{44}Sc . *Applied Radiation and Isotopes*, **2012**, 70(6), 974-9.
- [44] L. Deilami-nezhad; L. Moghaddam-Banaem; M. Sadeghi; M. Asgari; Production and purification of Scandium-47: A potential radioisotope for cancer theranostics. *Applied Radiation and Isotopes*, **2016**, 118, 124-130.
- [45] C. Müller; M. Bunka; S. Haller; U. Köster; V. Groehn; P. Bernhardt; N. van der Meulen; A. Türlér; R. Schibli; Promising prospects for $^{44}\text{Sc}/^{47}\text{Sc}$ -based theragnostics:

application of ^{47}Sc for radionuclide tumor therapy in mice. *J. Nucl. Med.*, **2014**, 55(10), 1658-64.

[46] S. L. Brooks; Computed Tomography. *Dental Clinics of North America*, **1993**, 37(4), 575-590.

[47] D. B. Plewes; W. Kucharczyk; Physics of MRI: A primer. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, **2012**, 35(5), 1038-1054.

[48] A. Chachuat; P. Molinier; B. Bonnemain; C. Chambon; J. L. Gayet; Pharmacokinetics and tolerance of Gd-DOTA (DOTAREM) in healthy volunteers and in patients with chronic renal failure. *European Radiology*, **1992**, 2, 326-9.

[49] A. Bradu; M. Penescu; C. Pitrou; J. Hao; P. Bourrinet; Pharmacokinetics, Dialysability, and Safety of Gadopiclenol, a New Gadolinium-Based Contrast Agent, in Patients With Impaired Renal Function. *Investigative Radiology*, **2021**, 56(8), 486-493.

[50] H. N. Wagner; G. A. Wiseman; C. S. Marcus; H. A. Nabi; C. E. Nagle; D. M. Fink-Bennett; D. M. Lamonica; P. S. Conti; Administration Guidelines for Radioimmunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphoma with ^{90}Y -Labeled Anti-CD20 Monoclonal Antibody. *Journal of Nuclear Medicine*, **2002**, 43(2), 267-272.

[51] U. Hennrich; K. Kopka; Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Pharmaceuticals*, **2019**, 12(3), 114.

[52] European Medicines Agency; Lutathera **2025**, https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/lutathera-epar-summary-public_hu.pdf

[53] U. Hennrich; M. Eder; [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (PluvictoTM): The First FDA-Approved Radiotherapeutic for Treatment of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals*, **2022**, 15(10), 1292.

[54] E. P. Krenning; M. de Jong; P. P. M. Kooij; W. A. P. Breeman; W. H. Bakker; W. W. de Herder; C. H. J. van Eijck; D. J. Kwekkeboom; F. Jamar; S. Pauwels; R. Valkema; Radiolabelled somatostatin analogue(s) for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy. *Annals of Oncology*, **1999**, 10(2), 23-29.

[55] A. Ku, V. J. Facca; Z. Cai; R. M. Reilly; Auger electrons for cancer therapy – a review. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, **2019**, 4.

[56] S. N. Reske; S. Deisenhofer; G. Glatting; B. D. Zlatopolskiy; A. Morgenroth; A. T. J. Vogg; A. K. Buck; C. Friesen; ^{123}I -ITdU-Mediated Nanoirradiation of DNA Efficiently Induces Cell Kill in HL60 Leukemia Cells and in Doxorubicin-, β -, or γ -Radiation-Resistant Cell Lines. *Journal of Nuclear Medicine*, **2007**, 48(6), 1000-1007.

[57] S. Lehnert; Y. Li; E. Bump; B. Riddoch; A. Chenite; M. Shive; ^{125}I -Iododeoxyuridine for the Treatment of a Brain Tumor Model: Selection of Conditions for Optimal Effectiveness. *The Open Nuclear Medicine Journal*, **2011**, 3, 19-24.

[58] H. Thisgaard; M. Jensen; Production of the Auger emitter ^{119}Sb for targeted radionuclide therapy using a small PET-cyclotron. *Appl. Radiat. Isot.*, **2009**, 67(1), 34-8.

[59] A. P. Olson; L. Ma; Y. Feng; F. N. Khosroshahi; S. P. Kelley; E. Aluicio-Sarduy; T. E. Barnhart; H. M. Hennkens; P. A. Ellison; S. S. Jurisson; J. W. Engle; A Third

- Generation Potentially Bifunctional Trithiol Chelate, Its $^{nat,1XX}\text{Sb(III)}$ Complex, and Selective Chelation of Radioantimony (^{119}Sb) from Its Sn Target. *Inorg. Chem.*, **2021**, 60(20), 15223–15232.
- [60] S. Aghevlian; A. J. Boyle; R. M. Reilly; Radioimmunotherapy of cancer with high linear energy transfer (LET) radiation delivered by radionuclides emitting α -particles or Auger electrons. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2017**, 109, 102-118.
- [61] S. Ahenkorah; I. Cassells; C. M. Deroose; T. Cardinaels; A. R. Burgoyne; G. Bormans; M. Ooms; F. Cleeren; Bismuth-213 for Targeted Radionuclide Therapy: From Atom to Bedside. *Pharmaceutics*, **2021**, 13, 599.
- [62] R. Jiao; K. J. H. Allen; M. E. Malo; D. Rickles; E. Dadachova; Evaluating the Combination of Radioimmunotherapy and Immunotherapy in a Melanoma Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 773.
- [63] D. Cordier; F. Forrer; F. Bruchertseifer; A. Morgenstern; C. Apostolidis; S. Good; J. Müller-Brand; H. Mäcke; J. C. Reubi; A. Merlo; Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ^{213}Bi -DOTA-[Thi⁸,Met(O₂)¹¹]-substance P: a pilot trial. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2010**, 37, 1335–1344.
- [64] G. Sgouros; Å. M. Ballangrud; J. G. Jurcic; M. R. McDevitt; J. L. Humm; Y. E. Erdi; B. M. Mehta; R. D. Finn; S. M. Larson; D. A. Scheinberg; Pharmacokinetics and Dosimetry of an α -Particle Emitter Labeled Antibody: ^{213}Bi -HuM195 (Anti-CD33) in Patients with Leukemia. *Journal of Nuclear Medicine*, **1999**, 40(11) 1935-1946.
- [65] S. Hoberück; K. Zöphel; M. G. Pomper; S. P. Rowe; A. Gafita; One Hundred Years of the Tracer Principle. *Journal of Nuclear Medicine*, **2023**, 64, 12.
- [66] H. A. Holik; F. M. Ibrahim; A. A. Elaine; B. D. Putra; A. Achmad; A. H. S. Kartamihardja; The Chemical Scaffold of Theranostic Radiopharmaceuticals: Radionuclide, Bifunctional Chelator, and Pharmacokinetics Modifying Linker. *Molecules* **2022**, 27(10), 3062.
- [67] E. Boros; B. V. Marquez; O. F. Ikotun; S. E. Lapi; C. L. Ferreira; Coordination Chemistry and Ligand Design in the Development of Metal Based Radiopharmaceuticals. In *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*. 2014.
- [68] E. W. Price; C. Orvig; Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 260-290.
- [69] R. M. Smith; A. E. Martell; Critical stability constants, enthalpies and entropies for the formation of metal complexes of aminopolycarboxylic acids and carboxylic acids. *Science of The Total Environment*, **1987**, 64, 1–2, 125-147.
- [70] Zs. Baranyai; Gy. Tircsó; F. Rösch; The Use of the Macrocyclic Chelator DOTA in Radiochemical Separations. *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2020**, 36-56.
- [71] F. A Rojas-Quijano; E. T. Benyó; Gy. Tircsó; F. K Kálmán; Zs. Baranyai; S. Aime; A D. Sherry; Z. Kovács; Lanthanide (III) complexes of PCTA-(tris-amide) derivatives as potential bimodal MRI and optical imaging agents. *Chemistry*, **2009**, 15(47), 13188-13200.
- [72] P. Yang; U. Kortz; Discovery and Evolution of Polyoxopalladates. *Acc. Chem. Res.*, **2018**, 51, 7, 1599–1608.

- [73] M. Misono; Catalytic chemistry of solid polyoxometalates and their industrial applications. *Mol. Eng.*, **1993**, 3, 193–203.
- [74] J. T. Rhule; C. L. Hill; D. A. Judd; R. F. Schinazi; Polyoxometalates in Medicine. *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1, 327–358.
- [75] B. M. Calisto; I. Fita; The race to resolve the atomic structures of the ribosome. On the Nobel Prize in Chemistry awarded to Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz, and Ada E. Yonath. *CONTRIBUTIONS to SCIENCE*, **2011**, 7(2) 125–130.
- [76] P. Manna; D. Szűcs; T. Csupász; A. Fekete; D. Szikra; Z. Lin; A. Gáspár; S. Bhattacharya; A. Zulaica; I. Tóth; U. Kortz; Shape and Size Tuning of BiIII-Centered Polyoxopalladates: High Resolution ^{209}Bi NMR and $^{205/206}\text{Bi}$ Radiolabeling for Potential Pharmaceutical Applications. *Inorganic Chemistry*, **2020**, 59(23), 16769-16782.
- [77] M. Gott; P. Yang; U. Kortz; H. Stephan; H.-J. Pietzsch; C. Mamat; A ^{224}Ra -labeled polyoxopalladate as a putative radiopharmaceutical. *Chem. Commun.*, **2019**, 55, 7631-7634.
- [78] D. Shetty; J.-M. Jeong; H. Shim; Stroma targeting nuclear imaging and radiopharmaceuticals. *Int. J. Mol. Imaging*, **2012**, 817682.
- [79] W. J. Koh; J. S. Rasey; M. L. Evans; J. R. Grierson; T. K. Lewellen; M. M. Graham; K. A. Krohn; T. W. Griffin; Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]fluoromisonidazole. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **1992**, 22(1), 199-212.
- [80] E. J. Postema; A. J. B. McEwan; T. A. Riauka; P. Kumar; D. A. Richmond; D. N. Abrams; L. I. Wiebe; Initial results of hypoxia imaging using 1- α -D:-(5-deoxy-5-[^{18}F]-fluoroarabinofuranosyl)-2-nitroimidazole (^{18}F -FAZA). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2009**, 36(10), 1565-73.
- [81] D. J. Yang; S. Wallace; A. Cherif; C. Li; M. B. Gretzer; E. E. Kim; D. A. Podoloff; Development of F-18-labeled fluoroerythronitroimidazole as a PET agent for imaging tumor hypoxia. *Radiology*, **1995**, 194(3), 795-800.
- [82] L. Ziemer; S. Evans; A. Kachur; A. Shuman; C. Cardi; W. Jenkins; J. Karp; A. Alavi; W. Dolbier; C. Koch; Noninvasive imaging of tumor hypoxia in rats using the 2-nitroimidazole ^{18}F -EF5. *Eur. J. of Nucl. Med. and Mol. Imaging*, **2003**, 30, 259-266.
- [83] X. Sun; G. Niu; N. Chan; B. Shen; X. Chen; Tumor hypoxia imaging. *Mol. Imaging Biol.*, **2011**, 13(3), 399-410.
- [84] G. Reischl; D. Dorow; C. Cullinane; A. Katsifis; P. Roselt; D. Binns; R. Hicks; First comparison of [^{124}I]IAZA with [^{18}F]FAZA and [^{18}F]FMISO: Imaging of tumor hypoxia in a small animal PET study. *Journal of Nuclear Medicine*, **2007**, 48(2), 304.
- [85] A. L. Vāvere; J. S. Lewis; Cu-ATSM: a radiopharmaceutical for the PET imaging of hypoxia. *Dalton Trans.*, **2007**, 21(43), 4893-902.
- [86] J. S. Lewis; D. W. McCarthy; T. J. McCarthy; Y. Fujibayashi; M. J. Welch; Evaluation of ^{64}Cu -ATSM In Vitro and In Vivo in a Hypoxic Tumor Model. *Journal of Nuclear Medicine*, **1999**, 40(1), 177-183.
- [87] F. Xie; W. Wei; [^{64}Cu]Cu-ATSM: an emerging theranostic agent for cancer and neuroinflammation. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2022**, 49(12), 3964-3972.

- [88] L. Hoigebazar; J. M. Jeong; M. K. Hong; Y. J. Kim; J. Y. Lee; D. Shetty; Y.-S. Lee, D. S. Lee, J.-K. Chung; M. C. Lee; Synthesis of ^{68}Ga -labeled DOTA-nitroimidazole derivatives and their feasibilities as hypoxia imaging PET tracers. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19(7), 2176-81.
- [89] L. Hoigebazar; J. M. Jeong; S. Y. Choi; J. Y. Choi; D. Shetty; Y.-S. Lee; D. S. Lee; J.-K. Chung; M. C. Lee, Y. K. Chung; Synthesis and characterization of nitroimidazole derivatives for ^{68}Ga -labeling and testing in tumor xenografted mice. *J. Med. Chem.*, **2010**, 53(17), 6378-85.
- [90] S. R. Seelam; J. Y. Lee; Y.-S. Lee; M. K. Hong; Y. J. Kim; V. K. Banka; D. S. Lee; J.-K. Chung; J. M. Jeong; Development of ^{68}Ga -labeled multivalent nitroimidazole derivatives for hypoxia imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, 23(24), 7743-7750.
- [91] J. M. Michelot; M. F. Moreau; P. G. Labarre; J. C. Madelmont; A. J. Veyre; J. M. Papon; D. F. Parry; J. F. Bonafous; J. Y. Boire; G. G. Desplanches; Synthesis and evaluation of new iodine-125 radiopharmaceuticals as potential tracers for malignant melanoma. *J. Nucl. Med.*, **1991**, 32(8), 1573-80.
- [92] N. Rizzo-Padoin; M. Chaussard; N. Vignal; E. Kotula; V. Tsoupko-Sitnikov; S. Vaz; F. Hontonnou; W.-Q. Liu; J.-L. Poyet; M. Vidal; P. Merlet; B. Hosten; L. Sarda-Mantel; [^{18}F]MEL050 as a melanin-targeted PET tracer: Fully automated radiosynthesis and comparison to ^{18}F -FDG for the detection of pigmented melanoma in mice primary subcutaneous tumors and pulmonary metastases. *Nucl. Med. Biol.*, **2016**, 43(12), 773-780.
- [93] H. Feng; X. Xia; C. Li; Y. Song; C. Qin; Q. Liu; Y. Zhang; X. Lan; Imaging malignant melanoma with (^{18}F)F-5-FPN. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2016**, 43(1), 113-122.
- [94] Xu; L. Yuan; L. Yin; Y. Jiang; Y. Gai; Q. Liu; Y. Wang; Y. Zhang; X. Lan; Synthesis and Preclinical Evaluation of ^{18}F -PEG-FPN for the Detection of Metastatic Pigmented Melanoma. *Mol. Pharmaceutics*, **2017**, 14(11), 3896–3905.
- [95] X. Ma; S. Wang; S. Wang; D. Liu; X. Zhao; H. Chen; F. Kang; W. Yang; J. Wang; Z. Cheng; Biodistribution, Radiation Dosimetry, and Clinical Application of a Melanin-Targeted PET Probe, ^{18}F -P3BZA, in Patients. *J. Nucl. Med.*, **2019**, 60(1), 16-22.
- [96] N. K. Tafreshi; C. J. Tichacek; D. N. Pandya; M. L. Doligalski; M. M. Budzevich; H. Kil és mkt.; Melanocortin 1 Receptor-Targeted α -Particle Therapy for Metastatic Uveal Melanoma. *J. Nucl. Med.*, **2019**, 60(8), 1124-1133.
- [97] D. T. Nguyen; M. Smith; R. Bleijs; P. Hersey; Characterization of immunosuppressive factor(s) produced by melanoma cell lines. *Melanoma Research*, **1997**, 7(1), S35.
- [98] B. J. Allen; S. M. A. Rizvi; Z. Tian; Preclinical targeted alpha therapy for subcutaneous melanoma. *Melanoma Research*, **2001**, 11(2), 175-182.
- [99] M.S. Dennis; M. Zhang; Y. G. Meng; M. Kadkhodayan; D. Kirchhofer; D. Combs; L. A. Damico; Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277(38), 35035-43.

- [100] S.Trüssel; C. Dumelin; K. Frey; A. Villa; F. Buller; D. Neri; New strategy for the extension of the serum half-life of antibody fragments. *Bioconjug Chem.*, **2009**, 20(12), 2286-92.
- [101] C. Müller; H. Struthers; C. Winiger; K. Zhernosekov; R. Schibli; DOTA conjugate with an albumin-binding entity enables the first folic acid-targeted ^{177}Lu -radionuclide tumor therapy in mice. *J. Nucl. Med.*, **2013**, 54(1), 124-31.
- [102] M. Benešová; C. A. Umbricht; R. Schibli; C. Müller; Albumin-Binding PSMA Ligands: Optimization of the Tissue Distribution Profile. *Mol. Pharm.*, **2018**, 15(3), 934-946.
- [103] S. Iikuni; Y. Tarumizu; K. Nakashima; Y. Higaki; H. Ichikawa; H. Watanabe; M. Ono; Radiotheranostics Using a Novel ^{225}Ac -Labeled Radioligand with Improved Pharmacokinetics Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen. *J. Med. Chem.*, **2021**, 64(18), 13429–13438.
- [104] J. Ding; M. Xu; J. Chen; P. Zhang; L. Huo; Z. Kong; Z. Liu; ^{86}Y -Labeled Albumin-Binding Fibroblast Activation Protein Inhibitor for Late-Time-Point Cancer Diagnosis. *Mol. Pharmaceutics*, **2022**, 19(9) 3429–3438.
- [105] G. M. Keating; Insulin detemir: a review of its use in the management of diabetes mellitus. *Drugs*, **2012**, 72(17), 2255-87.
- [106] R. B. Lauffer; D. J. Parmelee; S. U. Dunham; H. S. Ouellet; R. P. Dolan; S. Witte; T. J. McMurphy; R. C. Walovitch; MS-325: albumin-targeted contrast agent for MR angiography. *Radiology*, **1998**, 7(2), 529-38.
- [107] Je. Bremerich; D. Bilecen; P. Reimer; MR angiography with blood pool contrast agents. *Eur. Radiol.*, **2007**, 17(12), 3017-24.
- [108] Z. Zha; L. Zhu; Y. Liu; F. Du; H. Gan; J. Qiao; H. F. Kung; Synthesis and evaluation of two novel 2-nitroimidazole derivatives as potential PET radioligands for tumor imaging. *Nuclear Medicine and Biology*, **2011**, 38(4), 501-508.
- [109] M. Pniok; V. Kubíček; J. Havlíčková; J. Kotek; A. Sabatie-Gogová; J. Plutnar; S. Huclier-Markai; P. Hermann; Thermodynamic and Kinetic Study of Scandium(III) Complexes of DTPA and DOTA: A Step Toward Scandium Radiopharmaceuticals. *Chemistry – A European Journal*, **2014**, 20(26), 7944-7955.
- [110] G. Nagy; D. Szikra; Gy. Trencsényi; A. Fekete; I. Garai; A. M. Giani; R. Negri és mkt.; AAZTA: An Ideal Chelating Agent for the Development of ^{44}Sc PET Imaging Agents. *Angewandte Chemie*, **2017**, 129(8), 2150-2154.
- [111] Do. Q. et al.; Contrast Agents for MRI: Experimental Methods (Chapter I.), Section 1.3.4.1 Experimental Methods.
- [112] F. A. Rojas-Quijano; Gy. Tircsó; E. T. Benyó; Zs. Baranyai; H. T. Hoang; F. K. Kálmán; P. K. Gulaka; V. D. Kodibagkar; S. Aime; Z. Kovács; A. D. Sherry; Synthesis and Characterization of a Hypoxia-Sensitive MRI Probe. *Chem. - A European Journal*, **2012**, 18(31), 9669-9676.
- [113] L. Tei; Zs. Baranyai; L. Gaino; A. Forgács; A. Vágner; M. Botta; Thermodynamic stability, kinetic inertness and relaxometric properties of monoamide derivatives of lanthanide(III) DOTA complexes. *Dalton Transactions*, **2015**, 44, 5467-5478.

- [114] C. F. Baes; R. S. Mesmer; The Hydrolysis of Cations. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie*, **1977**, 81(2), 245-6.
- [115] N. P. van der Meulen; M. Bunka; K. A. Domnanich; C. Müller; S. Haller; C. Vermeulen; A. Türler; R. Schibli; Cyclotron production of ^{44}Sc : From bench to bedside. *Nuclear Medicine and Biology*, **2015**, 42(9), 745-751.
- [116] S. Happel; C. Dirks; Application of extraction chromatography to the separation of Sc and Zr isotopes from target materials. *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci.*, **2014**, 1, 3.
- [117] E. Eppard; M. Wuttke; P. L. Nicodemus; F. Rösch; Ethanol-Based Post-processing of Generator-Derived ^{68}Ga Toward Kit-Type Preparation of ^{68}Ga -Radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine*, **2014**, 55(6), 1023-1028.
- [118] W. D. Kim; D. C. Hrnčir; G. E. Kiefer; A. D. Sherry; Synthesis, Crystal Structure, and Potentiometry of Pyridine-Containing Tetraaza Macrocyclic Ligands with Acetate Pendant Arms. *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 8, 2225–2232.
- [119] Z. Garda; E. Molnár; N. Hamon; J. L. Barriada; D. Esteban-Gómez; B. Váradi; V. Nagy; K. Pota; F. K. Kálmán; I. Tóth; N. Lihi; C. Platas-Iglesias; É. Tóth; R. Tripier; Gy. Tircsó; Complexation of Mn(II) by Rigid Pyclen Diacetates: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Density Functional Theory, and Superoxide Dismutase Activity Studies. *Inorg. Chem.*, **2021**, 60, 2, 1133–1148.
- [120] M. L. Fur; M. Beyler; E. Molnár; O. Fougère; D. Esteban-Gómez; Gy. Tircsó; C. Platas-Iglesias; N. Lepareur; O. Rousseaux; R. Tripier; The role of the capping bond effect on pyclen $^{\text{nat}}\text{Y}^{3+}/^{90}\text{Y}^{3+}$ chelates: full control of the regiospecific N-functionalization makes the difference. *Chem. Commun.*, **2017**, 24, 53(69), 9534-9537.
- [121] B. Váradi; K. Brezovcsik; Z. Garda; E. Madarasi; H. Szedlacsek; R.-A. Badea; A.-M. Vasilescu; A.-G. Puiu; A. E. Ionescu; L.-E. Sima; C. V. A. Munteanu; S. Călărăș; A. Vágner; D. Szikra; N. M. Toàn; T. Nagy; Z. Szűcs; S. Szedlacsek; G. Nagy; Gy. Tircsó; Synthesis and characterization of a novel ^{52}Mn Mn-labelled affibody based radiotracer for HER2+ targeting. *Inorg. Chem. Front.*, **2023**, 10, 4734-4745.
- [122] H. Ma; I. Y. Zhou; Y. I. Chen; N. J. Rotile; I. Ay; E. A. Akam; H. Wang; R. S. Knipe; L. P. Hariri; C. Zhang; M. Drummond; P. Pantazopoulos; B. F. Moon; A. T. Boice; S. E. Zygmunt; J. Weigand-Whittier; M. Sojoodi; R. A. Gonzalez-Villalobos; M. K. Hansen; K. K. Tanabe; P. Caravan; Tailored Chemical Reactivity Probes for Systemic Imaging of Aldehydes in Fibroproliferative Diseases. *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145, 38, 20825–20836.
- [123] J.-M. Siaugue; F. Segat-Dioury; I. Sylvestre; A. Favre-Réguillon; J. Foos; C. Madic; A. Guy; Regioselective synthesis of N-functionalized 12-membered azapyridinomacrocycles bearing trialkylcarboxylic acid side chains. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 22, 4713-4718.
- [124] Lénárt János; LEHETSÉGES HIPOXIA-ÉRZÉKENY KONTRASZTANYAG KÉMIAI ANALÍZISE, **2022**
- [125] Z. Garda; E. Molnár; F. K. Kálmán; R. Botár; V. Nagy; Zs. Baranyai; E. Brücher; Z. Kovács; I. Tóth; Gy. Tircsó; 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. *Front. Chem.*, **2018**, 13, 6, 232.

- [126] D. Szücs; T. Csupász; J. P. Szabó; A. Kis; B. Gyuricza; V. Arató; V. Forgács; A. Vágner; G. Nagy; I. Garai; D. Szikra; I. Tóth; Gy. Trencsényi; Gy. Tircsó; A. Fekete; Synthesis, Physicochemical, Labeling and In Vivo Characterization of ^{44}Sc -Labeled DO3AM-NI as a Hypoxia-Sensitive PET Probe. *Pharmaceuticals*, **2022**, 15(6), 666.
- [127] E. M. Gale; H.-Y. Wey; I. Ramsay; Y.-F. Yen; D. E. Sosnovik; P. Caravan; A Manganese-based Alternative to Gadolinium: Contrast-enhanced MR Angiography, Excretion, Pharmacokinetics, and Metabolism. *Radiology*, **2018**, 286(3), 865-872.
- [128] A. L. Wooten; B. C. Lewis; S. E. Lapi; Cross-sections for (p,x) reactions on natural chromium for the production of $^{52,52\text{m},54}\text{Mn}$ radioisotopes. *Applied Radiation and Isotopes*, **2015**, 96, 154-161.
- [129] J. Fonslet; S. Tietze; A. I. Jensen; S. A. Graves; G. W. Severin; Optimized procedures for manganese-52: Production, separation and radiolabeling. *Appl Radiat Isot.*, **2017**, 121, 38-43.
- [130] P. Caravan; N. J. Cloutier; M. T. Greenfield; S. A. McDermid; S. U. Dunham; J. W. M. Bulte; J. C. Amedio Jr; R. J. Looby; R. M. Supkowski; W. DeW. Horrocks Jr; T. J. McMurry; R. B. Lauffer; The interaction of MS-325 with human serum albumin and its effect on proton relaxation rates. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124(12), 3152-62.
- [131] G. Nagy; N. Dénes; A. Kis; J. P. Szabó; E. Berényi; I. Garai; P. Bai; I. Hajdu; D. Szikra; Gy. Trencsényi; Preclinical evaluation of melanocortin-1 receptor (MC1-R) specific ^{68}Ga - and ^{44}Sc -labeled DOTA-NAPamide in melanoma imaging. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2017**, 106, 336-344.
- [132] C. A. Umbricht; M. Benešová; R. Schibli; C. Müller; Preclinical Development of Novel PSMA-Targeting Radioligands: Modulation of Albumin-Binding Properties To Improve Prostate Cancer Therapy. *Mol. Pharmaceutics*, **2018**, 15(6), 2297–2306.
- [133] H. Thisgaard; J. Kumlin; N. Langkjær; J. Chua; B. Hook; M. Jensen; A. Kassaian; S. Zeisler; S. Borjian; M. Cross; P. Schaffer; J. H. Dam; Multi-curie production of gallium-68 on a biomedical cyclotron and automated radiolabelling of PSMA-11 and DOTATATE. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, **2021**, 6, 1.
- [134] Z. Cheng; L. Zhang; E. Graves; Z. Xiong; M. Dandekar; X. Chen; S. S. Gambhir; Small-Animal PET of Melanocortin 1 Receptor Expression Using a ^{18}F -Labeled α -Melanocyte-Stimulating Hormone Analog. *Journal of Nuclear Medicine*, **2007**, 48(6), 987-994.
- [135] I. Kálmán-Szabó; Z. Képes; A. Fekete; A. Vágner; G. Nagy; D. Szücs; B. Gyuricza; V. Arató; J. Varga; L. Kárpáti; I. Garai; I. Mándity; F. Bruchertseifer; J. Elek; D. Szikra; Gy. Trencsényi; In Vivo evaluation of newly synthesized ^{213}Bi -conjugated alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) peptide analogues in melanocortin-1 receptor (MC1-R) positive experimental melanoma model. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2023**, 229, 115374.
- [136] J. Xu; F. Gallazzi; D. R. Fisher; R. Gonzalez; Y. Miao; The Effect of Albumin-Binding Moiety on Tumor Targeting and Biodistribution Properties of ^{67}Ga -Labeled Albumin Binder-Conjugated Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone Peptides. *Cancer Biother Radiopharm*, **2022**, 37(1), 47-55.

- [137] H.M. Irving; M.G. Miles; L.D. Pettit; A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode. *Analytica Chimica Acta*, **1967**, 38, 475-488.
- [138] L. Zekany; I. Nagypal; A Comprehensive Program for the Evaluation of Potentiometric and/or Spectrophotometric Equilibrium Data Using Analytical Derivatives. *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, **1985**, 291-353.
- [133] M. Pérez-Malo; G. Szabó; E. Eppard; A. Vagner; E. Brücher; I. Tóth; A. Maiocchi; E. H. Suh; Z. Kovács; Zs. Baranyai; F. Rösch; Improved Efficacy of Synthesizing $^{*}\text{M}^{\text{III}}$ -Labeled DOTA Complexes in Binary Mixtures of Water and Organic Solvents. *Inorg. Chem.*, **2018**, 57, 10, 6107–6117.

9. Függelék

9.1 PC2AM-NI ligandum esszenciális fémionokkal alkotott komplexeinek fizikai-kémiai jellemzése

1. Táblázat *A PC2AM-NI ligandum fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitási és protonálódási állandói, kiegészítve a PCTA és a 3,9-PC2A ligandumokkal alkotott komplexek megfelelő értékeivel (0,15 M NaCl, 25°C)*

		PC2AM-NI	PCTA [119]	3,9-PC2A [113]
	$\log \beta_2^H$	15,99	16,70	18,22
Mg(II)	$\log K_{ML}$	7,60(3)	12,35	9,84
	$\log K_{MHL}$	5,66(3)	3,82	5,91
Ca(II)	$\log K_{ML}$	9,45(6)	12,72	9,92
	$\log K_{MHL}$	4,30(4)	3,79	5,08
Zn(II)	$\log K_{ML}$	16,25(5)	20,48	19,49
	$\log K_{MHL}$	2,94(5)	3,10	2,47
Cu(II)	$\log K_{ML}$	Nem határoztuk meg^a	18,79	23,58
	$\log K_{MHL}$		3,58	2,12

^aA [Cu(PC2AM^{NIM})]-komplex stabilitását pH-potenciometriás és UV-látható spektrofotometriás módszerrel nem tudtuk meghatározni, mivel pH = 2-nél már teljes a komplexképződés, a komplex disszociációja pedig 3 M-os savoldatban sem válik mérhetővé. A stabilitási állandó meghatározásához kompetitív módszert tervezünk.

Az 1. táblázat alapján a PC2AM-NI ligandum fémionokkal alkotott komplexeinek stabilitása kisebb, mint az összehasonlító komplexek megfelelő értékei. A Ca(II)- és a Mg(II)-komplexekben található protonálódási állandók értékei nagyobbak, mint a hozzátartozó ligandumok 3. és 4. protonálódási állandói, amely a ligandumok karboxilcsoportjához rendelhetők. Mivel általánosságban a ligandumban található, a fémion koordinációjához szorosan kötődő csoportok protonálódási állandói csökkenek a komplexképződést követően, ezért azt feltételezzük, hogy a Ca(II)- és Mg(II)-komplexek

protonálódása nem a karboxilcsoportokhoz, hanem a makrociklus aminocsoportjaihoz köthető.

9.2 A kémiai szintézisek leírása

9.2.1 2-(2-nitroimidazol-1-il)-etil-DO3AM (6) előállítása

A 2-(2-nitro-imidazol-1-il)-etán-amin szintézisét a Zha és munkatársai által leírt módszer módosított változatával végeztük [108]. 2-nitro-imidazol (**1**, 1,55 g, 13,7 mmol) és *terc*-butil-2-bróm-etil-karbamát (**2**, 4,2 g, 18,8 mmol) vízmentes dimetil-formamiddal (20 mL) készült oldatához nátrium-jodidot (0,2 g, 1,36 mmol) és kálium-karbonátot (3,79 g, 27,4 mmol) adtunk és szobahőmérsékleten 4 nap keverés után a reakcióelegyet etil-acetáttal hígítottuk és vízzel mostuk. A szerves fázist elválasztottuk és szárítottuk, végül vákuumban bepároltuk. A maradékot etil-acetátból átkristályosítottuk és így 3,2 g (91%) *terc*-butil-2-(2-nitro-imidazolil)-etil-karbamátot (**3**) kaptunk halványsárga kristályok formájában. A **3**-as vegyületet (66 mg, 0,256 mmol) 1 mL diklór-metánban oldottuk és 1 mL trifluorecetsavat adtunk hozzá. Egy éjszakán át tartó keverés után a reakcióelegyet bepároltuk. A **4**-es nyersterméket további tisztítás nélkül használjuk fel a következő lépésben. A 2-(2-nitro-imidazol-1-il)-etánamint (**4**) DOTA-hoz (**5**) konjugáltuk Hoigebazar és munkatársai által leírt reakciókörülmények alkalmazásával [83]. A **4**-es vegyületet (0,256 mmol) és DOTA-t (**5**, 104 mg, 0,256 mmol) feloldottuk *N,N*-dimetil-formamid és víz 1:1 arányú elegyében (3 mL) és hozzáadtunk 53 mg (0,256 mmol) *N,N'*-diciklohexil-karbodiimid 300 μ L piridinben készült oldatát. Egy éjszakán át tartó keverés után a reakcióelegyet szűrtük, és a szűrletet vákuumban bepároltuk. A nyersterméket szemipreparatív HPLC-vel tisztítottuk, melynek során 43 mg DO3AM-NI-t (**6**, 31%) kapunk. A félpreparatív HPLC tisztítást Luna C18 10 μ m (250 x 10 mm) oszlopon végeztük és a következő eluenseket alkalmaztuk: A oldószer: 1% HCOOH, B oldószer: acetonitril. A gradiens: 0 perc: 100% A, 2 perc: 100% A, 32 perc: 0% A, 40 perc: 0% A 40,1 perc: 100% A volt, míg az áramlási sebesség 4 mL/perc volt. ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.52 (s, 1H, imidazol-CH), 7.15 (s, 1H, imidazol-CH), 4.61 (s, 2H, CH_2), 3.92 – 2.97 (m, 24H, 12x CH_2), 2.85 (s, 2H, CH_2). HRMS ESI: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_8\text{O}_9$, $[\text{M}]^+$ számított = 542,2449; $[\text{M}+\text{H}]^+$ mért = 543,2534.

9.2.2 PC2AM^{nBu} (**14**) szintézise

Először a 2-bróm-*N*-butilacetamid (**11**) szintézisét valósítottuk meg. Az izzított K₂CO₃ (1,89 g, 13,7 mmol) 80 mL diklórmetánban szuszpendáltattuk, majd hozzáadtuk a butilamint (**9**, 1 g 13,7 mmol,) és a keveréket 0°C-ra hűtöttük. Ezután a 2-bróm-acetilbromid (**10**, 2,48 g, 12,3 mmol) diklórmetános oldatát (30 mL) csepegtettük az elegyhez argon atmoszférában egy órán keresztül. Egy óra után a reakcióelegyből kivált szilárd anyagot G3 üvegszűrővel kiszűrtük és diklórmetánnal mostuk. A szűrletet előbb 50 mL vízzel, majd 50 mL 5%-os citromsav oldattal, végül újra 50 mL vízzel extraháltuk. A szerves fázist MgSO₄-tal szárítottuk, szűrtük, majd vákuumban bepároltuk. A nyersterméket flash kromatográfiával tisztítottuk (eluens: hexán – etil-acetát). A kapott szintelen olaj (**11**) tömege 500 mg (21%) volt. ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.05 (1H, s, -NH-), 3.78 (2H, s, CH₂), 3.17 (2H, m, CH₂), 1.42 (2H, m, CH₂), 1.26 (2H, m, CH₂-), 0.83 (3H, t, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 166.0 (C=O), 39.8, 31.1, 29.1, 19.9 (CH₂), 13.6 (CH₃); HRMS ESI: C₆H₁₂BrN₁O₁, [M+H]_{számított} = 194,0175; [M+H]⁺_{mért} = 194,0176. A következő lépésben a 3,9-PC2A^{Bt}-t (**12**, 300 mg, 0,793 mmol) oldottuk vízmentes acetonitrilben (150 mL), majd izzított K₂CO₃-ot (329 mg, 3.96 mmol) adtunk hozzá. Ezután a **11**-es vegyület vízmentes acetonitriles (50 mL) oldatát lassan csepegtettük hozzá a reakcióelegyhez. Egy órás reakcióidő után a reakcióelegyből a szilárd anyagot G3-as üvegszűrővel kiszűrtük, majd a szűrletet vákuumban bepároltuk. A nyersterméket preparatív HPLC-vel tisztítottuk (A eluens: 5% TFA, B eluens: MeCN – gradiens: 0 perc: 100% A, 15 perc: 10% A, 16 perc: 100% A, míg az áramlási sebesség 25 mL/perc volt. A **13**-as halványsárga olaj tömege 280 mg (72%) volt. ¹H NMR (500,13 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 7.87 (1H, s, NH), 7.77 (1H, t, arom.), 7.20 (2H, d, arom.), 4.19 (4H, q, CH₂), 4.06 (2H, m, CH₂), 3.99 (2H, m, CH₂), 3.96 (2H, m, CH₂), 3.79 (2H, s, CH₂), 3.66 (4H, m, CH₂), 3.39 (2H, m, CH₂), 3.25 (4H, q, CH₂), 3.16 (2H, m, CH₂), 1.54 (2H, m, CH₂), 1.39 (2H, m, CH₂), 1.27 (6H, t, CH₃), 0.97 (3H, t, CH₃); ¹³C NMR (125,76 MHz, CD₃CN) δ (ppm): 172.2 (2C, C=O), 165.3 (C=O), 160.8 (2C, C_q arom.), 139.2 (C arom.), 121.7 (2C, C arom.), 61.4, 58.2, 58.1, 53.6, 51.3 (2C, CH₂), 47.3, 39.7, 32.0, 20.7

(1C, CH₂), 14.5 (2C, CH₃), 14.0 (1C, CH₃); HRMS ESI: C₂₅H₄₁N₅O₅, [M+H]⁺_{számított} = 492.3180; [M+H]⁺_{mért} = 492.3180 [M+H]⁺. Végül a **13**-as vegyületet (390 mg, 0.793 mmol) 40 mL absz. etanolban oldottuk és szilárd NaOH-ot (127 mg, 3.17 mmol) adtunk az oldathoz. Két óra után a reakcióelegyet bepároltuk és a nyersterméket preparatív HPLC-vel tisztítottuk (A eluens: 5 mM TFA, B: MeCN – gradiens: A: 95% → 75% 8 perc alatt). A PC2AM^{nBu} (**14**) halványsárga olajként nyertük ki és a tömege 159 mg (46%) volt. ¹H NMR (360 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.85 (1H, t, arom.), 7.32 (2H, d, arom.), 4.95 (4H, s, CH₂), 4.36 (4H, s, CH₂), 3.88 (2H, s, CH₂), 3.86 (4H, s, CH₂), 3.40 (4H, s, CH₂), 3.26 (2H, t, CH₂), 1.52 (2H, m, CH₂), 1.38 (2H, m, CH₂), 0.96 (3H, t, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD) δ (ppm): 172.7 (2C, C=O), 168.5 (C=O), 158.2 (2C, C_q arom.), 140.2 (C arom.), 122.4 (2C, C arom.), 59.2, 57.8, 53.7, 53.0, 40.31, 32.3, 21.1 (2C, CH₂), 50.8 (1C, CH₂), 14.0 (1C, CH₃); HRMS ESI: C₂₁H₃₃N₅O₅, [M+H]⁺_{számított} = 436.2554; mért: [M+H]⁺_{mért} = 436.2554.

9.2.3 DOTA-IPB-NAPamid (**24**) szintézise

A DOTA-IPB-NAPamid (**24**) szintézisét az Umbrici és munkatársai [127] által leírt módszerhez hasonló módon végeztük. Először a Dde-Lys(Fmoc)-OH-t (**15**, 38,3 mg, 0,072 mmol) Ac-Nle-Asp(tBu)-His(Trt)-(D-Phe)-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Gly-Lys-(ring Amide MBHA gyanta)-hoz (**16**, 0,018 mmol) konjugáltuk (*O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónium-hexafluor-foszfát (HBTU, 27 mg, 0,071 mmol) és diizopropil-etil-amin (DIPEA, 12,5 μL 0,072 mmol) jelenlétében vízmentes *N,N*-dimetil-formamidban (2 mL). Az Fmoc-védőcsoportot 2 mL DMF-ben készült 50%-os piperidin oldattal távolítottuk el. Ezután a (*p*-jód-fenil)-butánsavat (**19**, 35 mg, 0,072 mmol) a **18**-as NAPamid származékhoz kapcsoltunk HBTU (27 mg, 0,071 mmol) és DIPEA (12,5 μL, 0,072 mmol) jelenlétében, vízmentes DMF-ben (2 mL). Ezután a Dde védőcsoportot 2 mL DMF-fel készült 2%-os hidrazin oldattal távolítottuk el a **20**-as peptid származékról. Majd DOTA-trisz(t-Bu) észtert (**22**, 41 mg, 0,072 mmol) kapcsoltunk HBTU (27 mg, 0,071 mmol) és DIPEA (12,5 μL, 0,072 mmol) jelenlétében, vízmentes DMF-ben (2 mL) a **21**-es peptid származékhoz. Végül a **23**-as NAPamid származékról trifluor-ecetsavval

(TFA, 2 mL) a védőcsoportokat eltávolítottuk, valamint ennek során a peptidet is lehasítottuk a gyantáról, majd a bepárlás után a nyers DOTA-IPB-NAPamidot (**24**) félpreparatív RP-HPLC-val tisztítottuk. A félpreparatív RP-HPLC tisztítást a 5.1.1. fejezetben leírtak szerint végeztük. A t_R 17,5 perc volt, és az összegyűjtött frakciót liofilizáltuk, így 11,7 mg DOTA-IPB-NAPamidot (**24**) kaptunk (34,5%). HRMS ESI: $[M+H]^{2+}_{\text{számított}} = 944,4193$ és $[M+H]^{3+}_{\text{számított}} = 629,6145$; $[M+H]^{2+}_{\text{mért}} = 944,4180$ és $[M+H]^{3+}_{\text{mért}} = 629,6163$.