EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Gallium-68 radioizotóppal jelölt komplexek szintézise, vizsgálata és alkalmazásuk kisállat-PET leképezés során

Máté Gábor Témavezető: Prof. Dr. Galuska László



DEBRECENI EGYETEM MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2017.

Tartalomjegyzék

1.	Röv	vidítések jegyzéke1					
2.	2. Bevezetés						
3.	Iroc	dalmi áttekintés					
3	3.1.	Molekuláris képalkotás és PET technika5					
3	3.2.	A gallium 68-as tömegszámú radionuklidja11					
3	3.3.	Mikrofluidikai jelölések, radiogyógyszerészeti felhasználásuk					
3	3.4.	⁶⁸ Ga-izotóppal jelölt molekulák PET leképezéshez					
4.	Cél	kitűzések					
5.	Any	vagok és módszerek					
5	5.1.	Foszfin- és karboxil-csoportokkal eltérően szubsztituált TACN-vázas kelátorok					
6	⁸ Ga-j	jelölési sajátságainak összehasonlító vizsgálata27					
5	5.2.	⁶⁸ Ga-kelátorok komplexképzési reakcióinak mikrofluidikai optimalizálása					
5	5.3.	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) szintézise és alkalmazása Aminopeptidáz N (CD13) receptorok					
i	n viv	<i>o</i> leképezésére					
6.	Ere	dmények					
6 6	5.1. ⁸ Ga-j	Foszfin- és karboxil-csoportokkal eltérően szubsztituált TACN-vázas kelátorok jelölési sajátságainak összehasonlító vizsgálata45					
6	5.2.	⁶⁸ Ga-kelátorok komplexképzési reakcióinak mikrofluidikai optimalizálása47					
6	5.3.	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) szintézise és alkalmazása Aminopeptidáz N (CD13) receptorok					
i	n viv	<i>o</i> leképezésére					
7.	Me	gbeszélés					
7 6	7.1. ⁸ Ga-j	Foszfin- és karboxil-csoportokkal eltérően szubsztituált TACN-vázas kelátorok jelölési sajátságainak összehasonlító vizsgálata					
7	7.2.	⁶⁸ Ga-kelátorok komplexképzési reakcióinak mikrofluidikai optimalizálása71					
7 ii	7.3. n viv	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) szintézise és alkalmazása Aminopeptidáz N (CD13) receptorok o leképezésére					
8.	Öss	zefoglalás76					

9.	Summary	77
10.	Köszönetnyilvánítás	
11.	Tárgyszavak	
12.	Irodalomjegyzék	
13.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	
14.	Előadások, poszterek jegyzéke	91
1	4.1. Előadások jegyzéke	91
1	4.2. Poszterek jegyzéke:	
15.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	93

1. Rövidítések jegyzéke

¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-Fluoro-dezoxi-glükóz			
APN	Aminopeptidáz N			
BFC	Bifunctional chelator			
CBCT	Cone beam computed tomography			
СТ	Computer Tomography			
DAR	Differential absorption ration			
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-N,N',N'',N'''-tetraecetsav			
DOTANOC	DOTA-[Nal ³]-oktreotid			
DOTATATE	DOTA-[Tyr ³]-oktreotát			
DOTATOC	DOTA-[Tyr ³]-oktreotid			
GMP	Good Manufacturing Practice			
GRP	Good Radiopharmaceutical Practice			
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav			
HPLC	High Performance Liquid Chromatography			
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography			
MCS	Micro-Channel System			
MRI	Magnetic Resonance Imaging			
MVS	Micro-Vessel System			
NeDe	Mesoblastos nephroma			
NET	Neuroendokrin tumor			
NGR	Aszparaginil-glicinil-arginin			
NODAGA	1,4,7- triazaciklononán-1-glutársav-4,7-diecetsav			
NOPO	(1,4,7-triazaciklononán-1,4-bisz[metilén(hidroximetil)foszfinsav]-7-			
	[metilén(2-karboxi-etil)foszfinsav]			
NOTA	1,4,7-triazaciklononán-N,N',N''-triecetsav			
PBS	Foszfát-pufferes sóoldat			
PEEK	Poli(éter-éter-keton)			
PET	Pozitron Emissziós Tomográfia			
PTN	Parathymalis nyirokcsomó			
RCP	Radiokémiai Tisztaság (Radiochemical Purity)			
RGD	Arginil-glicil-aszparaginsav			
	I			

RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
SAX	Strong Anion Exchange
SCX	Strong Cation Exchange
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SRCA	Subrenal capsule assay
SUV	Standard uptake value
T/M arány	Tumor/izom arány
TACN	1,4,7-triazaciklononán
TRAP	Tri-Azacyclononane-Phosphinic acids
VOI	Volume of Interest

2. Bevezetés

A Pozitron Emissziós Tomográfia (PET) a nukleáris medicina eszköztárának egyik legfontosabb eleme, jelentősége az orvostudomány számos területén, különösképpen az onkológiai diagnosztikában tagadhatatlan.

Napjainkban a PET vizsgálatok döntő többségét egyetlen farmakonnal, a ¹⁸F-Fluoro-dezoxiglükózzal (¹⁸F-FDG) végzik. A ¹⁸F-FDG szervezetben történő disztribúciója során a glükóz transzportjával megegyező mechanizmussal lép be a sejtekbe, majd intracellulárisan egy hexokináz foszforilálja FDG-6-foszfáttá. Ezt követően, amennyiben a vonatkozó szövet glükóz-6-foszfatáz enzim koncentráció alacsony (agy, myocardium, legtöbb malignus sejt) a szövet szénhidrát-anyagcseréjével arányos mennyiségben halmozódik, további enzimatikus kölcsönhatásba nem lép; azon szövetekben, ahol pedig glükóz-6-foszfatáz enzim tartalom kimutatható, a halmozás mértéke csökkent. A megoszlás és metabolizáció mechanizmusából látható, hogy a ¹⁸F-FDG metabolikus tracer, mely számos szövetben fiziológiás körülmények között, illetve számos patológiás folyamatban (tumorok, gyulladásos folyamatok) jelentős halmozást mutat, mely a PET-leképezés során jelentős háttér-aktivitáshoz és a kimutatni kívánt folyamatra vonatkozóan bizonyos esetekben alacsony specificitáshoz, fals pozitív és fals negatív eredményekhez vezethet [1].

A személyre szabott gyógyászattal kapcsolatos igény megszületésével, a PET széleskörű elterjedésével és az ¹⁸F-FDG-PET ismeretanyagának bővülésével katalizálódtak azok a kutatások, melyek a ¹⁸F-FDG-nél specifikusabb, targetált PET-radiofarmakonok kifejlesztésével foglalkoznak. Ezt a folyamatot a nukleáris medicinában a molekuláris képalkotás és célzott radioterápia kombinációjának igénye - azonos molekuláris célpontot elérő, de más izotópokkal jelzett teragnosztikus kezelések tovább erősítik [2]. Erre példaként a neuroendokrin tumorok (NET) említhetőek, melyek jellemzően a ¹⁸F-FDG-t kevéssé halmozó, lassan növekvő tumorok, azonban szomatosztatin-receptor-expressziójuknak köszönhetően diagnosztikájukat (¹¹¹In-DTPA-Oktreotid - SPECT, ⁶⁸Ga-DOTATOC/TATE - PET) és terápiájukat (⁹⁰Yttrium-DOTATOC/DOTATATE, illetve ¹⁷⁷Lutécium-DOTATOC/DOTATATE/DOTATOC) is radioaktívan jelölt szomatosztatin-analógokkal végzik, ahogyan az látható különböző radiofémekkel [3].

Mint pozitron-forrás radiofém-izotóp, a gallium 68-as tömegszámú radionuklidja, mely a ⁶⁸Ga-DOTATOC/TATE jelölő izotópjaként már az említett klinikai relevanciával bír, a PETdiagnosztika egyik legmeghatározóbb izotópjává vált az elmúlt évtizedekben, melyet kiváló fizikai tulajdonságai és generátorból való könnyű elérhetősége tettek lehetővé. A Ga-68 67,7 perces felezési idejével kiválóan alkalmas gyors disztribúciójú peptidek, fehérjék *in vivo* leképezésére, így specifikus, targetált radiofarmakonok szintézisére. Mindemellett azonban a ⁶⁸Ga-jelölt radiofarmakonok megfelelő előállítása érdekében, a területhez kapcsolódó, alkalmazott radiokémia egyik legfontosabb feladatává vált új ⁶⁸Ga-kelátorok szintézise és jellemzése, illetve a ⁶⁸Ga-PET-hez alkalmazható biológiai vektorok feltérképezése.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Molekuláris képalkotás és PET technika

"A molekuláris képalkotás biológiai folyamatok molekuláris és sejt szinten történő vizualizálása, karakterizálása és mérése emberi és más élő szervezetekben. Ennek véghezviteléhez; a molekuláris képalkotás jellemzően 2- vagy 3-dimenziós képalkotást is magába foglal, illetve időbeni kvantifikálást. Az alkalmazott technikák közé tartoznak: radiojelzett leképezés/nukleáris medicina, MR képalkotás, MR spektroszkópia, optikai leképezés, ultrahang és mások."

(Mankoff és mtsai [4] által 2007-ben publikált definíció.)

A terület alapjai az ezért 1943-ban kémiai Nobel-díjjal jutalmazott magyar kémikus, Hevesy György úttörő munkásságáig vezethetőek vissza, aki megállapította, hogy, ha egy molekulában valamelyik atomot annak radioaktív izotópjára cseréljük, ez nem változtatja meg lényegesen az eredeti vegyület kémiai és biológiai tulajdonságait [5]. Hevesy megállapítása radioaktív izotóppal kapcsolatos, és habár a molekuláris képalkotás Mankoff és mtsai által megfogalmazott fenti definíciójából látható, hogy a vonatkozó eszköztár jelentősen bővült, azonban a klinikai gyakorlatban jelenleg nagy volumenben alkalmazott molekuláris leképezési technikák még ma is a radioaktív izotópokat alkalmazó SPECT (single photon emission computed tomography) és a PET (positron emission tomography).

SPECT-radiofarmakonok esetén biológiailag aktív molekula jelöléséhez γ -sugárzó izotópot alkalmaznak, a képalkotás pedig a vizsgált szervezetbe juttatott izotóp bomlásából származó γ -foton közvetlen detektálásával történik. A PET-nél alkalmazott radiofarmakonok ezzel szemben β^+ -sugárzóak, így a radioaktív izotóp bomlásakor pozitron lökődik ki az atommagból, mely a szövetekben lefékeződik és egy elektronnal annihilálódik. Az annihiláció során két 511 keV energiájú gamma foton keletkezik, melyek egy egyenes mentén (180°±0.25° szöggel), egymással ellentétes irányban szétsugárzódnak. PET esetében ennek megfelelően szintén gamma fotonok detektálása történik, azonban a két, annihilációból származó foton meghatározott időablakon belüli koincidenciájának detektálása lehetővé teszi az érzékenység nagymértékű növelését (**1. ábra**) [6].



1. ábra: Annihilációs reakció és az azt követő koincidencia detektálása PET leképezés során [7]

Mindkét technika alkalmazása során a radiojelölt molekula – ideális esetben – az endogén analóggal azonos biológiai útvonalat jár be, így indirekt módon a hozzákapcsolódó biológiai receptorok, enzimek, transzporterek tehetők láthatóvá kötődés után [8], így mind a SPECT, mind pedig a PET-leképezés funkcionális információkkal szolgál. A legmodernebb technológiák az így kapott funkcionális információkat pedig már egy készülékben (**2. ábra**) ötvözik anatómiai leképezési technikákkal nyert információkkal (PET/CT, PET/MRI) [9;10;11].



2. ábra: PET/CT készülék fényképe (balra) [12], példa humán PET/CT felvételre (jobbra) [13]

Mind a SPECT, mind pedig a PET jelentős hatással bírnak az orvostudomány számos területére – például az onkológiára [14;15], kardiológiára [16;17] és a neurológiára [18;19] és habár mindkét technika klinikai szempontból nagy fontosságú, a PET számos előnnyel rendelkezik a SPECT-hez képest. Talán a legfontosabbként említhetjük a magasabb érzékenységet (szükséges radiofarmakon koncentráció $\approx 10^{-8} - 10^{-10}$ M; SPECT esetében

megközelítőleg 10⁻⁶ M), és a jobb térbeli felbontást (~3-10 mm PET, ~8-20 mm SPECT), valamint az abszolút radioaktivitás felvétel kvantifikálásának lehetőségét a vizsgált szövetben [20]. Ezzel szemben a SPECT versenyképességéhez hozzájárul a PET-hez képest alacsonyabb ára (ami változhat a közeljövőben a ⁹⁹Mo előállítási kapacitásának csökkenése miatt) és a PET-kamerák számához viszonyítva kb. 10-szer több telepített SPECT-kamera is [21].

3.1.1. PET-radionuklidok és PET-radiofarmakonok

Michael Ter-Pogossian és mtsai 1975-ben közölték az első pozitron-emissziós transzaxiális tomográf leírását [22]. Az ezt követő években a PET története során elsősorban kismolekulájú farmakonok alkalmazásával próbálkoztak, melyek jelölése a rövid felezési idejű, ciklotronban előállítható nem-fém radionuklidokkal volt jellemző. A ciklotronban előállítható nem-fém radionuklidok túlsúlya és klinikumban való alkalmazásának dominanciája mind a mai napig egyértelmű, hiszen a leggyakrabban alkalmazott PET-radiofarmakonok továbbra is ¹⁸F, ¹¹C, ¹³N és ¹⁵O-nuklidokat tartalmaznak. (**1. táblázat**)

1. táblázat: Általánosan alkalmazott nem-fém PET-radionuklidok fizikai tulajdonságai és előállítási módjai [23], illetve néhány példa jelölt radiofarmakonként történő felhasználásukra

Radionuklid	β ⁺ -bomlás (%)	t _{1/2} (min)	E _{max} (MeV)	Előállítás	Fontosabb radiofarmakonok	Példa a vonatkozó radiofarmakon alkalmazási területére	
¹¹ C	99,8	20,38	0,96	$^{14}N(p,\alpha)^{11}C$	¹¹ C-kolin [24]	Prosztata tumorok	
						Killutatasa	
					¹ C-PiB [25]	Alzheimer-kór,	
						β-amyloid-kimutatás	
					¹¹ C-metionin	Agytumorok kimutatása	
					[26]		
¹³ N	99,8	9,96	1,19	$^{16}O(p,\alpha)^{13}N$	¹³ N-ammónia	Myocardialis perfúzió	
					[27]		
¹⁵ O	99,9	2,04	1,72	$^{14}N(d,n)^{15}O$	¹⁵ O-víz [28]	Myocardialis perfúzió	
18 F	96,9	109,70	0,63	$^{18}O(p,n)^{18}F$	¹⁸ F-FEC [29]	Prosztata tumorok	
						kimutatása	
					¹⁸ F-Florbetapir	Alzheimer-kór,	
					[30]	β-amyloid-kimutatás	
					¹⁸ F-FDG [31;32]	Megnövekedett glükóz-	
						felvétel	
					¹⁸ F-FMISO [33]	Hypoxiás szövetek	
						kimutatása	
					¹⁸ F-FLT [34]	Fokozott proliferáció	
						kimutatása	
					¹⁸ F-FET [35]	Agytumorok kimutatása	
					¹⁸ F-Fluorid [36]	Képalkotás csontokról	

Annak ellenére, hogy az említett nem-fém PET radionuklidokkal előállított radiofarmakonok felhasználási területe rendkívül széles körű és egyre bővül, ezen farmakonok dúsulása általában nem specifikus receptor-ligand kölcsönhatáson, hanem elsősorban a vonatkozó leképezendő terület a környezethez képest eltérő metabolikus igényeit mutatja ki (pl. fokozott

glükóz, aminosav, nukleotid-felvétel). A személyre szabott orvoslás és a bővülő orvostudományi – esetünkben elsősorban onkológiai – tudás specifikusabb radiofarmakonok elérhetőségét teszi szükségessé [37]. Az elérhető receptor-specifikus ligandok (peptidek, antitestek vagy antitest-fragmensek) alkalmazásával, azonban a makromolekulák kovalens kötéssel történő jelölése nehezen valósítható meg egyszerűen. Erre kiváló példa a ¹⁸F-Galakto-RGD, melynek jelölése glikozilált c(RGDfK) ¹⁸F-fluoroacilezésével valósítható meg [38;39]. Annak ellenére, hogy még klinikai vizsgálatokban is kiválóan alkalmasnak bizonyult $\alpha_{v}\beta_{3}$ -integrinek kimutatásán keresztül számos kórkép kimutatására (malignus melanoma, szarkóma, mellrák) [40;41], azonban a targetáló ágens PET-leképezésekhez való elérhetőségének érdekében a cGMP/GRP-megfelelőség biztosítása mellett a soklépéses szintézis miatt ¹⁸F- helyett ⁶⁸Ga-jelölt-analóg előállítását és alkalmazását javasolják az irodalomban [42].

Makromolekulák radionukliddal való nagyhatékonyságú jelölése megvalósítható ugyanakkor megfelelő kelátor-egységekkel való összekapcsolással akár linker-molekulákon keresztül. Az ilyen típusú jelöléseknél elvárás, hogy a targetált receptorral való kapcsolódáshoz szükséges makromolekula-alegység intakt maradjon, illetve a megfelelő linker kiválasztásával, a jelölt farmakon biodisztribúciója a receptor szervezeten belüli elérését ne akadályozza, lehetőség szerint maximalizálja. Ennek megfelelően számos PET-radiofém-radiofarmakont alkalmaznak PET vizsgálatokhoz preklinikai és néhány esetben már klinikai szinten is. (**2. táblázat**)

Radionuklid	β ⁺ -bomlás (%)	t1/2	E _{max} (MeV)	Előállítás	Fontosabb radiofarmakonok	Példa a vonatkozó radiofarmakon alkalmazási területére	
⁴⁴ Sc	94,3	3,9 h	1,47	a)	⁴⁴ Sc-DOTA-	$\alpha_v \beta_3$ -integrinek	
				⁴⁴ Ti/ ⁴⁴ Sc	$(cRGD)_{2}[43]$	kimutatása	
				b)	⁴⁴ Sc-DOTA-NOC	Szomatosztatin-	
				44 Ca(p,n) 44 Sc	[44]	analóg	
⁶⁴ Cu	17,6	12,7 h	0,66	⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu	⁶⁴ Cu-ATSM [45]	Нурохіа	
						kimutatása	
					⁶⁴ Cu-TETA-OC [45]	Szomatosztatin-	
						analóg	
⁶⁸ Ga	89,1	67,7 min	1,89	⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga	⁶⁸ Ga-DOTA-TOC/	Szomatosztatin-	
					⁶⁸ Ga-DOTA-TATE/	analóg	
					⁶⁸ Ga-DOTA-NOC		
					[46]		
					⁶⁸ Ga-DOTA-	Kemokin-receptor	
					CPCR4-2 [47]	CXCR4 kimutatása	
					⁶⁸ Ga-PSMA [48]	Prosztata tumorok	
						kimutatása	
⁸² Rb	95,5	1,3 min	3,15	82 Sr/ 82 Rb	⁸² RbCl [49]	Myocardialis	
						perfúzió	
⁸⁹ Zr	22,7	78,5 h	0,90	$^{89}Y(p,n)^{89}Zr$	⁸⁹ Zr-trastuzumab	HER2-receptor	
					[50]	kimutatása	

2. táblázat: Általánosan alkalmazott pozitron sugárzó radiofémek fizikai tulajdonságai és előállítási módjai [23;43], illetve néhány példa jelölt radiofarmakonként történő felhasználásukra

Mindemellett a PET-radiofémek egy része a SPECT ^{99m}Tc-radionuklidjához hasonlóan ciklotron helyett izotópgenerátorok segítségével is elérhető (pl. ⁴⁴Sc, ⁶⁸Ga, ⁸²Rb), amely figyelembe véve, hogy a SPECT világszintű elérhetőségéhez a vizsgálóhelyen, generátoron keresztül elérhető radionuklid-hozzáférés jelentősen hozzájárul [21], a PET-radiofémek

felhasználhatósági körének bővülése a PET, mint leképezési technika további terjedésének fontos tényezője lehet.

A **2. táblázat**ban feltüntetett izotópok felhasználási területét fizikai tulajdonságaik jelentősen befolyásolják. Rendkívül rövid felezési ideje miatt a ⁸²Rb-izotóppal nem lehetséges hosszabb jelölési protokollok, esetlegesen hosszabb biodisztribúciójú jelölt molekulával való targetálás és leképezés. A ⁶⁸Ga-izotóp felezési ideje azonban már jól illeszkedik kisebb peptidek farmakokinetikájához. A ⁶⁴Cu izotóp csak ciklotronban állítható elő, azonban ¹⁸F-izotópéhoz közelítő β⁺-energiája kisállat-PET leképezések végrehajtásakor is jó felbontást tesz lehetővé [51]. A ⁸⁹Zr hosszabb felezési ideje már antitestek vizualizációját is lehetővé teszi, hiszen injektálást követően napokig követhető a radiofarmakon a szervezetben [52].

A PET-radiofém-izotópok közül a ⁶⁸Ga-jelölt radiofarmakonok kerültek a tudományos érdeklődés középpontjába a 2000-es évektől kezdve részben kedvező fizikai-kémiai tulajdonságaik, részben a jelölő izotóp generátorból való elérhetősége miatt [53].

3.2.A gallium 68-as tömegszámú radionuklidja

3.2.1. ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátorok

A generátorból kinyerhető gallium-68 anya-radionuklidja a germánium-68, melynek előállítása a 69 Ga(p,2n) 68 Ge magreakcióval történik. A folyamatot 69 Ga-ban dúsított targetanyag vagy természetes gallium besugárzásával valósítják meg, mely legalább 60% 69 Ga-izotópot tartalmaz. Az anya-nuklid viszonylag hosszú felezési idővel rendelkezik ($t_{1/2} = 270$ nap), ennek megfelelően a hosszú generátor-életidő a gallium-68 alkalmazása során jelentős pozitívum [54]. (Itt azonban megjegyzendő, hogy a hosszú generátor-életidő a radiogyógyszergyártás szempontjából potenciálisan kritikus pontokat is tartalmaz úgy, mint a sterilitás és az eluátum minőségének fenntarthatósága a hosszú használat alatt, illetve a radiolízis miatt.)

A ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátor prototípusa, az ún. "positron cow", 1960-ban Gleason által került leírásra [55], mely még folyadék-folyadék extrakciót és hozzáadott stabil Ga^{III}-oldatot alkalmazott a hatékony Ge/Ga elválasztáshoz. Ezt Al₂O₃ alapú szilárd-fázisú kromatográfiás generátorok követték [56;57], melyek nagy hatékonysággal, hozzáadott hordozó nélkül voltak alkalmasak ⁶⁸Ga előállítására, ehhez azonban EDTA-val történő elúciót alkalmaztak. Az így nyert ⁶⁸Ga-EDTA-val zajlottak korai kísérletek agyi leképezések végrehajtására [58], azonban az EDTA-s elúció egyben korlátot is jelentett a további radiofarmakológiai fejlesztésekhez,

mivel a kémiailag inert EDTA komplexből (logK = 21.0) a radionuklid kinyerése nehezen volt megvalósítható. A további jelölésekhez, kiterjedt felhasználáshoz kationos formában pl. akvakomplexben vagy hasonló vegyes víz-klorid/víz-hidroxid komplexben volt az izotópra szükség. A generátor-fejlesztés további évtizedei során felismerték azonban, hogy Me^{IV}O₂-típusú mátrixok (Me=Sn, Ti, Zr, Ce, stb.) potenciálisan alkalmasak a ⁶⁸Ge^{IV} adszorbálására [59].

A modern ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátor története az oroszországi Obninsk-ból eredeztethető, ahonnan az első, új típusú, kereskedelmi forgalomban is elérhető ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátor származik [59]. Ezt követően további gyártók léptek a piacra 2008-tól kezdődően (Eckert & Ziegler, IDB Holland – iThemba LABs disztribútora, később ITG – **3. ábra**), melynek köszönhetően a ⁶⁸Ga ma már széles körben hozzáférhető. Az új típusú generátorok már TiO₂- vagy SnO₂, esetleg szerves gyanta alapú ólom-borítású, hordozható kromatográfiás oszlopok, és kezdetben 70-80%-os hozammal eluálható róluk a ⁶⁸Ga-izotóp kationos formában [59].



3. ábra: Kereskedelmi forgalomban elérhető ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátorok [60]: A) Cyclotron Co. (Oroszország (európai forgalmazó: Eckert & Ziegler), B) Eckert & Ziegler (Németország), C) ITG (Németország) D) iThemba LABS (Dél-Afrikai Köztársaság)

3.2.2. Generátorról eluált ⁶⁸Ga-oldat

A modern ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátorok a ⁶⁸Ge 270 napos felezési idejének köszönhetően 1 évig vagy akár további is hasznos mennyiségű aktivitást szolgáltatnak [53], és róluk a ⁶⁸Ga-izotóp néhány óránként eluálható. Ahogyan az a **4. ábrán** is látható, a megelőző eluálást követően ~68 perccel az egyensúly 50%-a már beáll, mely 4 órával az elúciót követően 90%<, illetve 8 órával az elúciót követően a generátorban a ⁶⁸Ga-aktivitás egyensúlyban van (99%<) [61].



4. ábra: ⁶⁸Ga-aktivitás elméleti növekedése (%) ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátorban elúciót követően [61]

Annak ellenére, hogy a ⁶⁸Ga-jelölések elméletileg egy egyszerű fémion – kelátoregység közötti komplexképzés – azaz egy egylépéses – reakcióból állnak, a ⁶⁸Ga-aktivitás generátoreluátumon keresztül való elérhetősége több szempontból is hátráltató tényezőt jelent az igazán egyszerűen kivitelezhető, hatékony, akár kit-alapú jelölési protokollok kidolgozásához [53]:

- A generátor-eluátum minősége hosszabb távon csökken, huzamosabb idő után megnő benne a ⁶⁸Ge-szennyezés (áttörés) mértéke
- A ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátor sem kémiailag, sem radionuklidosan nem tiszta, pl. Zn, Fe és egyéb szennyezők [62] (mátrixból eredő fémek, Ti, Sn, továbbá Cu, Al illetve a már említett ⁶⁸Ge) mutathatóak ki belőle; az említett fémionok potenciális kompetitorok a komplexképzés során
- Az erősen savas közeg, melyben a ⁶⁸Ga-aktivitás eluálható, protonálhat olyan funkciós csoportokat, melyek a hatékony kelátképzést akadályozzák, továbbá a relatíve nagy elúciós térfogat (milliliteres nagyságrend) növeli a prekurzor-igényt a jelölési reakciók során.

A fémszennyezők eltávolítására/mennyiségük minimalizálására több módszer ismeretes az irodalomban:

a.) Kationos tisztítás: Ezt a módszert elsősorban TiO₂-alapú generátoroknál alkalmazzák, ahol alacsonyabb HCl koncentrációval zajlik a generátor-elúció. Az eluátum ⁶⁸Ga^{III}, Fe^{III}, Zn^{II}, illetve Ti^{IV} tartalmát erős kationcserélő (SCX)-oszlopon adszorbeálják, míg a ⁶⁸Ge^{IV}-tartalom az átmenő folyadékfázisban marad. Ezt követően 80% aceton/0,15 M HCl-oldattal moshatóak a fémszennyezők az oszlop felületéről. A ⁶⁸Ga^{III} ezt követően kvantitatív mennyiségben eluálható 98% aceton/0,05 M HCl-oldat eleggyel. Az aceton-tartalom eltávolítása ezután a jelölési eljárás során történik [63].

A szakirodalomban elterjedtebb fentiekben leírt módszerrel szemben az egyszerűbb eluátumkezelés, szerves oldószertartalom és a hatékonyság növelése érdekében Schultz és mtsai [64] SCX alapú tisztítást javasolnak alternatív 5 M NaCl-oldattal történő elúcióval.

b.) Anionos tisztítás: A módszer alkalmazása során a generátor-eluátumot, erősen koncentrált (30%) HCl-oldattal elegyítik, melynek köszönhetően az oldatban [⁶⁸GaCl₄]⁻ komplex képződik, mely erős anioncserélő (SAX) oszlopon – a ⁶⁸Ge^{IV} elválasztásával párhuzamosan – adszorbeálható. A SAX-oszlopot ezután 5,5 M HCl-oldattal mossák, nitrogénnel átfúvatják; majd a ⁶⁸Ga-aktivitás kis mennyiségű vízzel eluálható [65]. (A vonatkozó publikációban egyéb fémszennyezők mérése nem került leírásra.)

c.) Frakcionálás: Az eljárás során a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátor eluálása során az eluátum legmagasabb aktivitás-koncentrációjú kb. 1,0-1,5 mL-es térfogatú részletét a többitől elválasztják, puffer-oldattal elegyítik és közvetlenül alkalmazzák a jelölési reakciókhoz. Ezzel az aktivitás-koncentráció növelése mellett a szennyező fémion-tartalom is csökken [61]. A módszert elsősorban SnO₂-alapú generátoroknál alkalmazzák, mivel itt a ⁶⁸Ge-áttörés nagyon alacsony.

3.2.3. Gallium-68 kelátorok

A biológiai targetáláshoz szükséges molekulák gallium-68 izotóppal történő jelölésének végrehajtásához a radioizotóphoz való megfelelő hozzáférésen túl ún. bifunkcionális kelátorok (BFC) szükségesek. Bifunkcionális kelátor lehet azon molekula, mely alkalmas a radiofémmel való kelátképzésre és tartalmaz olyan funkciós csoportot, melyen keresztül a vektor-egységhez kapcsolható [66]. Ideális esetben egy ilyen BFC a következő, gyakorlati szempontból fontos tulajdonságokkal rendelkezik [67]:

- Stabilitás: Nagy stabilitású legyen az adott radiofémmel alkotott komplexe mind kinetikai, mind termodinamikai szempontból. Fontos továbbá, hogy maga a vegyület kémiai szerkezete kémiailag ne legyen bomlékony.
- Gyors komplexképzés a jelöléshez használt radioizotóp, az ilyen típusú reakciókban szokásos koncentrációtartományban is hatékonyan működjön: lehetőség szerint alacsony hőmérsékleten, alacsony ligandkoncentráció mellett, nagy sebességgel menjen végre a komplexképzési reakció (Ideális esetben a komplexképzés nanomólos koncentráció mellett szobahőmérsékleten, perceken belül lezajlik.)
- Szelektivitás a jelzéshez használt fémionra: A kelátor szelektivitása fontos Ga³⁺ ionra nézve annak érdekében, hogy a szérumban jelen lévő pl. Ca²⁺, Mg²⁺-ionokkal megelőzzük a komplexben a radiofém cseréjét ezekre az ionokra (átkelálódás) *in vivo*, vagy a ⁶⁸Ga³⁺ bomlásából származó Zn²⁺-ion ne rontsa a jelölés során a radiokémiai hozamot.
- Lehetőség konjugációra: A keláló ágensnek olyan funkciós csoporttal kell rendelkezésre, mely lehetővé teszi a targetáló vektorral történő kovalens kapcsolódását a komplexképzés szignifikáns csökkenése nélkül.
- *Hozzáférhetőség:* lehetőség szerint egyszerű, olcsó, gyors kémiai szintézissel legyen előállítható.

A témában közölt irodalmat áttekintve számos, ⁶⁸Ga-jelölésre potenciálisan alkalmas kelátort találunk. A szakirodalomban általánosan alkalmazott ezen kelátorok "nyílt láncú" és "gyűrűs" csoportokra történtő felosztása, mely elsősorban nem a kelátorban fellelhető funkciós csoportok, hanem a kialakuló komplex szerkezetéhez igazodik. Gyűrűs kelátorok esetén a kelát a makrociklus funkciós csoportjainak segítségével alakul ki és a fémion a makrociklusba lép be. Nyílt láncú kelátorok esetén ilyen gyűrű nem veszi körül a fémiont a komplexben. A felosztás létjogosultságát az adja, hogy az ún. gyűrűs kelátoroknál nagyobb termodinamikai stabilitás érthető el, illetve a makrociklus tagszáma és funkciós csoportjai bizonyos szelektivitást is jelentenek arra nézve, hogy milyen méretű fémionnal képesek kelátképzésre. A nyílt láncú kelátorok esetén viszont kisebb energia kell a kelát létrejöttéhez, nincs energiagát a gyűrűbe való belépéshez, így a komplexképzés gyorsabb lehet.Ugyanakkor termodinamikailag kevésbé stabil kelátorokat találtak a csoportban, valamint a fémion-szelektivitás is kisebb [66].

Az elsők között vizsgált nyílt láncú kelátorok bár alkalmasak voltak a ⁶⁸Ga-mal kelátképzésre, azonban gyakorlati alkalmazásukkal kapcsolatosan kinetikai stabilitási (DFO) [68;69], illetve kémiai stabilitási (merkaptán-tartalmú ligandok) [70;71] problémák merültek fel. A nyílt láncú kelátorok közül előnyös sajátságokkal rendelkezik a HBED-CC [72], mely stabil komplexet képez ⁶⁸Ga-mal [73] és prosztata-specifikus membrán antigénnel kapcsolva a ⁶⁸Ga-HBED-CC-PSMA radiofarmakont prosztatarák kimutatásra már klinikai körülmények között is alkalmazzák [74]. Ígéretes nyílt láncú kelátor család még a DEDPA és származékai, melyekkel még preklinikai kísérletek zajlanak [75]. Néhány nyílt láncú kelátor szerkezeti képlete az **5. ábrán** látható.



5. ábra: Néhány ⁶⁸Ga-izotóppal történő komplexképzésre alkalmas, nyílt láncú kelátormolekula szerkezeti képlete: DFO, merkaptán-tartalmú ligandok (6SS, NS3), DEDPA, HBED-CC

A nyílt láncú kelátorokhoz képest nagyobb sikerrel kerülnek jelenleg is alkalmazásra a ⁶⁸Gajelölt radiofarmakonok esetében az aza-makrociklus alapú gyűrűs kelátorok. Előnyük, hogy általában nagyobb termodinamikai és kinetikai stabilitású komplexet képeznek a radiofémmel, illetve, hogy a ciklus méretéből adódóan a gyűrű belsejébe belépő fémion méretére szelektivitást mutatnak [67].

Annak ellenére, hogy kémiai tulajdonságait tekintve már hatékonyabb aza-makrociklus is rendelkezésre áll ⁶⁸Ga-kelátképzésre, a klinikumban leggyakrabban alkalmazott ⁶⁸Gafarmakonok DOTA kelátort tartalmaznak. Ez részben annak köszönhető, hogy a DOTA, mint kelátor a modern ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátorok megjelenésekor már ismeretes volt lantanoidákkal kapcsolatos koordinációs kémiai kutatásokból [67;76], másrészt a ⁶⁸Ga-DOTA-jelölt szomatosztatin receptor-analógok (TOC, NOC, TATE) a neuroendokrin tumorok diagnosztikájában ma is alkalmazott nagyjelentőségű radiofarmakonok [46]. A DOTA azonban 8 donoratomjával jobban illeszkedik nagyobb kationokkal (trivalens lantanoidák, Bi³⁺, Y³⁺, Sc³⁺) való komplexképzéshez, míg a Ga³⁺ koordinációs száma 6, melynek megfelelően a Ga³⁺-mal való kelátképzés lassabb kinetikát mutat, és emelt hőmérsékletet igényel [77;78], a jelölés szobahőmérsékleten rendkívül lassú, mely a ⁶⁸Ga-izotóp felezési idejével nem összeegyeztethető, amennyiben magas jelölési hatékonyságot szeretnénk elérni. Ennek megfelelően a szelektivitása is alacsonyabb és magasabb ligand-koncentráció szükséges a kompetitor fémszennyezők melletti hatékony kelátképzéshez a radiokémiai koncentrációban jelen lévő ⁶⁸Ga-mal [76]. Továbbá, a DOTA vizes oldatban viszonylag gyenge savként viselkedik (pKa 4,68) [79], melynek megfelelően erősebben savas közegben protonálódik és nem tartalmaz negatív töltésű funkciós csoportot a kationnal való könnyebb komplexképzéshez. Ezzel összhangban jelölési pH optimumot DOTA esetében 3 és 4 közötti tartományban találunk [80], ebben a pH tartományban azonban a vizes oldatban a gallium tartalom még nanomólos koncentrációban is kolloid oxid/hidroxid fázisba lép, mely a jelölési folyamatot akadályozhatja.(ld. 6. ábra) Habár maga a pH 3 – 4 tartományba eső optimum önmagában nem feltétlenül lenne probléma a jelölési reakciók kivitelezésében, ugyanakkor az alacsony szelektivitás ezen kelátor esetében magas kelátor-koncentrációt és emelt hőmérsékletet igényel, mely összességében szuboptimális specifikus aktivitással rendelkező terméket eredményezhet.



6. ábra: Ga^{III} kémiai formáinak megoszlása vizes oldatban a pH függvényében (c_{Ga} = 2mM, 0,15 M NaCl, 37°C)
[81]

Az "ideális" kelátor felé egy lépéssel közelebb jutunk, ha a DOTA 1,4,7,11tetrazacyclododekán vázát 1,4,7-triazaciklononán vázra cseréljük. A gyűrű megfelelően szubsztituált funkciós csoportjaival jutunk el a NOTA [82] kelátorhoz és származékaihoz (NOTGA [83], NODASA [84], NODAGA [85], NODAPA-OH [86], NODAPA-NCS [86]), melyek a Ga³⁺-ionnal már szobahőmérsékleten is jelölhetőek, vagy a DOTA-hoz képest alacsonyabb ligandkoncentrációval jelölhetőek emelt hőmérsékleten [80].

A NOTA foszforossavval történő első módosításait ⁶⁷Ga-mal való komplexképzésre Parker és mtsai írták le [87;88] az 1990-es években. Foszforossavas módosítást az új típusú ⁶⁸Ge/⁶⁸Gagenerátorok megjelenését követően Notni és mtsai alkalmaztak egy új kelátor, a TRAP-Pr szintézisére [67], mely kiváló sajátságokat mutatott ⁶⁸Ga-jelöléssel kapcsolatosan és három karboxil-csoporttal is rendelkezik, mely alkalmas biomolekulával való kapcsolásra, így már trimer [89;90] és bimodális [80] kísérleti radiofarmakonok is leírásra kerültek vele kapcsolatban. Hasonló foszforossavas származék továbbá a NOPO [91;92], mely szintén kiváló jelölési sajátságokkal rendelkezik és egyetlen karboxil funkciós csoportjának köszönhetően monomer kelátor-vektor adduktok szintézisére kínál lehetőséget. Néhány gyűrűs szerkezetű kelátor szerkezeti képlete a **7. ábrán** látható.



7. ábra: Néhány ⁶⁸Ga-izotóppal történő komplexképzésre alkalmas, gyűrűs szerkezetű kelátormolekula szerkezeti képlete: DOTA, NOTA, TRAP-Pr, NOPO.

3.3.Mikrofluidikai jelölések, radiogyógyszerészeti felhasználásuk

Mind a klasszikus PET-izotópokkal (¹¹C, ¹⁸F), mind pedig ⁶⁸Ga-izotóppal végzett jelölések során a tradicionális radiokémiai eszköztár áll rendelkezésünkre a szintézisek végrehajtásához, a szintézisek automata vagy félautomata rendszereken, milligrammos mennyiségű prekurzorokkal milliliteres oldattérfogatban zajlanak, mely lehetővé teszi a reakcióközeg megfelelő elegyítését, kezelését [93]. Ezek a szintézisek jól reprodukálhatóan elkülönített gyártási tételekben (batch alapon) zajlanak megfelelő hozammal és rövid reakcióidőkkel, ráadásul számos modul a szabályozó hatóságok és a Helyes Gyártási Gyakorlat (GMP) elvárásaival összhangban működik [94;95].

Kiemelendő azonban az is, hogy a megfelelő sugárvédelemhez ezeket a rendszereket nagyméretű, ólomárnyékolt fülkékben szükséges elhelyezni. Továbbá a szintézisek során a radioizotóp pikomólos tartományban kerül alkalmazásra [96] a már említett milliliteres térfogatban, így koncentrációja a prekurzorénál nagyságrendekkel kisebb, mely a jelölési reakciók hatékonyságát csökkenti.

A mikrofluidika egyik definíciója alapján leírható a folyadékok mikrométeres méretű csatornákban történő manipulálására szolgáló módszertan [97]. A mikrofluid technológiák kutatása az 1980-as években indult azzal a céllal, hogy a kémiai reakciók szelektivitását, hozamát növeljék, és ezzel párhuzamosan csökkentsék a reakcióidőt és a felhasznált reaktánsok mennyiségét [98;99;100;101]. Ennek megfelelően a mikroreaktorok alkalmazása számos előnyös tulajdonságot kínál biomolekulák radiojelölésének megvalósítására [93;102;103] úgy, mint nagyon kis térfogatok hatékony kezelése, megfelelő elegyítése, gyors hőátadás, a rendszer könnyebb árnyékolhatósága, kisebb felhasznált anyagmennyiség.

PET-radionuklidok jelölésére számos mikrofluid rendszer leírása található az irodalomban, melyek között már található kereskedelmi forgalomban elérhető mikrofluid szintézisplatform is [104;105;106]. Az eddig tanulmányozott mikrofluid rendszereket kétféleképpen csoportosíthatjuk [107]; az egyik csoportosítási lehetőség a mikrofluid rendszerekkel kapcsolatosan az alkalmazott hardverek típusából adódik. Ennek megfelelően beszélhetünk kapilláris alapú, hibrid és chip alapú mikrofluid rendszerekről.

A csoportosítás másik módja történhet a reagáló oldatok kezelése alapján, így beszélhetünk folyamatos áramlásos és batch alapú mikrofluid rendszerekről [107]:

- Folyamatos áramlásos rendszerek: A szintézis végrehajtása során minden részlépés (elegyítés, melegítés, hűtés) egy előre definiált folyadék útvonal mentén történik. Meghatározó paraméterek a rendszerben áramló folyadék sebessége, illetve az áramló folyadék geometriája. A rendszer előnye, hogy rendkívül flexibilis, továbbá, hogy kisebb és nagyobb mennyiségű termék is előállítható a segítségével. Hátránya azonban a magas nyomás/dugulásveszély a rendszerben, nagy kontaktfelület az áramló folyadék és a folyadékot vezető rendszer között (esetleges visszamaradó aktivitás).
- Batch alapú/megállított áramlású rendszerek: A rendszert úgy alakítják ki, hogy a reagáló oldatok elegyítése és reakciója az áramoltatott folyadék bizonyos funkciós elem(ek)ben történő leállításakor történik. Itt a reakció szempontjából fontos paraméter a vonatkozó elemben mérhető tartózkodási idő. A nagyfokú integrációból

következő hátránya ezen rendszereknek, hogy kevéssé rugalmasak, illetve összeállításuk (a megfelelő elemek kiválasztása, gyártása, összeállítása, vezérlése) technikailag rendkívül összetett feladat.

Pascali és mtsai összefoglalója [101] a folyamatos áramlásos rendszerekre az MCS - microchannel system, míg a batch alapú rendszerekre, mint a konvencionális reaktorokban történő szintézisek miniatürizált analógjaira az MVS – micro-vessel system megnevezést javasolja. Mindkét rendszer esetében találunk példát klasszikus radiofarmakonok mikrofluid szintézisére, mint például a ¹⁸F-FDG (ld. **8. ábra**)



8. ábra: ¹⁸F-FDG szintézisére is tesztelt MCS [108] (fent) és MVS [109] (lent) rendszerek felépítése

PET radiofémekkel kapcsolatosan azonban a rendelkezésre álló információk korlátozottak, kevés tanulmány foglalkozik ⁶⁴Cu, illetve ⁶⁸Ga-jelölésekkel és azok is inkább a MVS alapú technikát részesítik előnyben [110;111]. (**9. ábra**)



9. ábra: PDMS-mikroreaktor⁶⁴Cu-, illetve⁶⁸Ga-jelölésekhez[110]

Wheeler és mtsai [110] PDMS-chip alapú reaktorban végeztek batch-szintéziseket ⁶⁴Cu-DOTA-c(RGDfK) előállítására, illetve ehhez hasonló PDMS-chip alapú szintézis-módszert írtak le Zeng és mtsai [111] DOTA-RGD, NOTA-RGD és DOTA-BSA jelölésére Cu-64 és Ga-68 radionuklidokkal. Ezekben a tanulmányokban a PET-radiofarmakonok hatékony szintézisét ismertették úgy, hogy magasabb reakcióhozamot sikerült elérni a mikrofluid jelölési módszerekkel, mint a hagyományos jelölési technikával. A szerzők nem-radioaktív fém adagolásával állították be a pontos fémion koncentrációt - és így a kelátor/fémion arányt -, illetve hozzáadott hordozó nélkül is végeztek kísérleteket. Vizsgálataik során azt találták, hogy kvantitatív jelölések eléréséhez jelentős kelátortöbblet szükséges, melyet hordozó hozzáadása mellett optimalizáltak.

3.4. ⁶⁸Ga-izotóppal jelölt molekulák PET leképezéshez

A ⁶⁸Ga-PET a nagyszámú, egyre hatékonyabb kelátorrendszerek rendelkezésre állásával, az izotóp ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátorokból való könnyű elérhetőségével, illetve az eluátum koncentrálásával és tisztításával óriási fejlődésen ment keresztül. A megnövekedett érdeklődéshez és a fokozódó intenzitású kutatáshoz a **2. táblázatban** is említett szomatosztatin-receptor analógok áttörő klinikai sikere is hozzájárult. A fejlesztések jelentős részben a ^{99m}Tc-jelölt radiofarmakonok örökségén, részben pedig új utakon rendkívül széles skálán zajlanak, ennek megfelelően ⁶⁸Ga-jelölt farmakonokkal kapcsolatos tanulmányokat találhatunk kismolekuláktól kezdve makromolekulákon keresztül egészen nagyméretű partikulumok jelöléséig [53].

Fontosabb ⁶⁸Ga-jelölt radiofarmakon típusok PET leképezéshez, illetve néhány példa [53]:

Targetált radiofarmakonok: A ⁶⁸Ga-jelölések esetén a jelenleg legszélesebb radiofarmakon-palettával rendelkező csoport. A ⁶⁸Ga-izotóp fizikai tulajdonságaihoz igazodva a kisméretű peptid-vektorok kiválóan alkalmazhatóak PET-képalkotásra a jelölt konjugátumok gyors *in vivo* farmakokinetikájának köszönhetően. Az ilyen típusú leggyakrabban vizsgált és neuroendokrin tumorok diagnosztikájában nagyjelentőségű radiofarmakonok a ⁶⁸Ga-jelölt szomatosztatin-analógok (⁶⁸Ga-DOTA-TOC, ⁶⁸Ga-DOTA-TATE, ⁶⁸Ga-DOTA-NOC) utóbbival történő képalkotás látható az **10. ábrán.**



10. ábra: ⁶⁸Ga-DOTA-NOC PET/CT MIP (maximum intensity projection) (A) és transzaxiális felvételek (B,C) G2 hasnyálmirigy NET (A, B) és máj metasztázis (A, C) [112].

⁶⁸Ga-DOTA-TOC alkalmazásával történt továbbá Velikyan és mtsai [113] vizsgálata, mely kvantitatívan elemzi a vizsgálat ⁶⁸Ga-jelölt peptid és specifikus radioaktivitás kapcsolatát (ld. **11. ábra**).



11. ábra: Receptor-kötött és szabad ligand aránya a specifikus radioaktivitás függvényében konstans radioaktivitás koncentráció mellett [113]

Vizsgálati eredményük alapján látható, hogy a receptorhoz kötődött/szabad ligand arány azonos radioaktivitás-koncentráció mellett a specifikus radioaktivitás növekedésével növekszik, mely információ targetált radiofarmakonok tervezésekor jelentős.

Szomatosztatin-analógokon kívül számos egyéb biológiai vektor ⁶⁸Ga jelölését valósították már meg, melyek kutatása jelenleg is intenzíven zajlik. Felsorolásszerűen néhány ilyen targetként alkalmazott biológiai aktív vegyület: bombezin, humán epidermális növekedési faktor (HEGF), RGD-peptid integrin kimutatására, vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF), kolecisztokinin-2, melanocyta stimuláló hormon, glucagon-like peptid 1, gonadotropin-releasing hormon, folát, neurotenzin és neuropeptid Y [53].

Ezek között a biológiai targetmolekulák között külön emelném ki az NGR-peptidet, mely a CD13/Aminopeptidáz N makromolekulához kötődik specifikusan, mely molekuláris célpont számos tumor és a tumorok közelében újonnan képződő ér endotheliumában megtalálható. A makromolekula szelektív targetálására alkalmas NGR-motívumot *in vivo* phage display segítségével azonosították [114], melyet a doktori munkám során végzett projektek egyikében mi is vizsgáltunk.

2) Pre-targetált képalkotás: Ezzel a metodikával áthidalható lehet a radioimmunterápiában alkalmazott antitestek lassú farmakokinetikája, illetve a ⁶⁸Ga-izotóp gyors fizikai felezési ideje miatt fellépő látszólagos ellentmondás. A módszer lényege, hogy bispecifikus antitest vagy fehérje segítségével a vizsgálandó szervezetben pre-targetálást végzünk. Ez a molekula egyrészt specifikus pl. az adott

receptorra, de második funkciója szelektív a későbbiekben bejuttatandó, radioaktív jelet hordozó kismolekulához is, amit majd megfelelő időkülönbséggel második lépésként juttatnak a szervezetbe. A két vegyület *in vivo* körülmények között nagy affinitással kötődik egymáshoz. Ilyen technikájú leképezéssel találkozhatunk akár a ¹⁸F-FDG-nél magasabb specificitású leképezést biztosító Carcino-embrionális antigén – bispecifikus antitest – IMP-288 peptid esetén [115].

- 3) Nem targetált képalkotás: Ebbe a csoportba sorolhatóak radiojelölt részecskék (mikroés nanopartikulumok), melyek ⁶⁸Ga-jelölve alkalmazhatóak véráramlás becslésére (⁶⁸Ga-jelölt humán albumin mikroszféra [116]) vagy tüdőventilláció (⁶⁸Ga-jelölt szén nanorészecske aeroszol [117]).
- 4) Kis molekulatömegű farmakonok képalkotáshoz: A klasszikus PET-izotópokkal jelölt radiofarmakonokhoz hasonlóan ⁶⁸Ga esetében is találunk példát kis molekulatömegű biomolekulák jelölésére. DOTA és NOTA-konjugált aminosav-származékokat alkalmaztak már sejtproliferáció kimutatására [118], illetve találunk példát az FDG analógiájára ⁶⁸Ga-EC-deoxiglükózzal végzett preklinikai kísérletre is [119].
- 3.4.1. Tumor-neoangiogenezishez kapcsolódó képalkotás és az APN/CD13 makromolekula

A PET és SPECT alapú képalkotásban a tumorok neoangiogenezisének lokalizálása főleg integrin receptorokon keresztül történik, de az új molekuláris célpontok felfedezése napjaink egyik intenzíven kutatott területe a nukleáris medicinában [120;121]. Egyik ígéretes, már gyakorlati fázisba jutott próbálkozás az Aminopeptidáz N (APN/CD13) expressziójának kimutatása.

Az APN/CD13 egy membrán-asszociált exopetidáz, melynek szerepe van az angiogenezisben, másrészt az extracelluláris mátrix lebontásában [122], emellett az egyik legígéretesebb target daganatok és a hozzájuk kapcsolódó érképzés kimutatására, illetve reményteljes jelölt antiangiogén terápia célpontjaként is [123].

Az aszparaginil-glicinil-arginin (NGR) szekvenciát magukban foglaló peptidek már korábban azonosításra kerültek, mint az Aminopeptidáz N-hez kötődő specifikus ligandok, melyek így magasabb detektálási hatékonyságot eredményezhetnek a neoangiogén erek kimutatására, mint az integrin-specifikus RGD peptidek [124]. Néhány vizsgálat pedig már azt is előrevetítette már, hogy a jelölt NGR peptidek PET (⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga) és SPECT (^{99m}Tc)

izotópokkal jelölve az nukleáris medicinában is hasznos biológiai vektorként funkcionálhatnak [121;125].

4. Célkitűzések

A Ga-68 a PET képalkotási technika legfontosabb radiofém-izotópjává vált az elmúlt évtizedekben. Kedvező fizikai tulajdonságai (89% β^+ ; t_{1/2} = 67,7 min; E_{átl}(β^+) = 740 keV) és – a más, klasszikus pozitron-sugárzó izotópok (¹⁸F, ¹¹C) alkalmazásához szükséges ciklotrontelepítési költségekhez képest – olcsó elérhetősége ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátorokon keresztül alkalmassá teszi új típusú – a jövőben akár kit alapon is – a vizsgálóhelyen előállított PETradiogyógyszerek bevezetésére. Ehhez azonban előzetesen szükséges a kifejlesztendő ⁶⁸Gajelölt radiogyógyszerek gondos megtervezése, megfelelően optimalizált szintézise és jól körüljárt preklinikai tesztelése. Kutatómunkánk során ezekhez a folyamatokhoz szerettünk volna hozzájárulni, így vizsgálatainkkal két fontosabb terület további felderítését céloztuk:

- ⁶⁸Ga-jelölésre alkalmas kelátor molekulák tesztelése, a jelölési körülmények optimalizálása hatékony radioszintézisek megvalósításához.
- ⁶⁸Ga-jelölt kelátor-biológiai vektor konjugátumok előállítása preklinikai teszteléshez

Ezen célokat szem előtt tartva a kísérletes munkát három fontosabb projekt keretein belül végeztük:

Projekt 1: Ga-68 jelölésekhez használt kelátorok vizsgálata tradicionális, manuális jelölési metodikával; az 1,4,7-triazaciklononán vázas NOTA, NOPA, NO2AP és NOPO rendszerek összehasonlító radioanalitikai vizsgálata.

Projekt 2: A Ga-68 jelölések tanulmányozásához használt manuális jelölési metodika mellett alternatív, mikrofluidikai jelölési módszer fejlesztése.

Projekt 3: A Ga-68 jelölések alkalmazása biológiai rendszerekben történő leképezéshez, melyhez biológiai vektorként a ciklikus NGR peptidet, bifunkcionális kelátorként a NOTA-kelátort választottuk, illetve PET-leképezésre való alkalmasságát a jelölt ⁶⁸Ga- NODAGA-[c(RGD)₂] radiofarmakonnal összehasonlítva tanulmányoztuk. Az NGR-peptid által targetált makromolekula, az aminopeptidáz N, illetve az RGD-peptid által targetált integrin-receptor megnövekedett méretű expressziója a tumorok környezetében zajló angiogenezisre jellemző folyamat, és tudományosan megfelelően alátámasztott ismeret.

5. Anyagok és módszerek^{*}

A dolgozatban leírt vizsgálatok során elsődleges eszközként a reakciók során keletkező oldatok radiokémiai tisztaságát (Radiochemical Purity = RCP) vizsgáltuk, mely definíciószerűen az adott kémiai formában jelenlévő radionuklid radioaktivitásának százalékban kifejezett aránya a készítményben jelenlévő, ugyanezen radionuklid összes radioaktivitásához viszonyítva. Az így kapott értékből következtettünk az adott jelölési reakció hatékonyságára. Kvantitatívnek 95% feletti radiokémiai tisztaság fölött tekintettük a vizsgált reakcióinkat.

Ezzel az értékkel szoros összefüggést mutat egy adott termék specifikus aktivitása, azaz adott mennyiségű vektorhoz kötött radioaktivitása, mely meghatározó lehet a képalkotás szempontjából – emiatt is fontos a minél hatékonyabb kelátorok kutatása – hiszen nagyobb termodinamikai stabilitású és előnyösebb kémiai tulajdonságokkal rendelkező kelátorokkal kisebb anyagmennyiségű vektorhoz lehet azonos radioaktivitást kötni. A szervezetben egy adott leképezni kívánt folyamat mellett fix target (pl. receptor)-mennyiséget feltételezve a magasabb specifikus aktivitású készítménytől magasabb specifikus jelet várhatunk a leképezéshez, hiszen a receptorhoz kapcsolódó radiojelzett liganodok magasabb aránya, kedvezőbb jel/zaj arányhoz vezet.

5.1.Foszfin- és karboxil-csoportokkal eltérően szubsztituált TACN-vázas kelátorok ⁶⁸Ga-jelölési sajátságainak összehasonlító vizsgálata

5.1.1. Általános információk

A projekt során alkalmazott NOPO és NOTA szintézise az irodalomban már leírt módszerek szerint történt. A kapcsolódó vegyületek szerkezeti képlete és számozása az **1**. és **2**. **reakcióegyenletben** került feltüntetésre (ld. 5.1.2., illetve 6.1.1. fejezetekben). Az észter **7** és az 1,4,7-triazaciklononán a CheMatech-től (Dijon, Franciaország) került beszerzésre. Az NMR spektrumok Bruker (600 MHz), Varian UNITY Inova (400 MHz) vagy VNMRS (300 MHz) spektrométer segítségével készültek. ¹H- és ¹³C-NMR esetében *t*-BuOH-t, mint belső, ³¹P-NMR esetén 85% vizes H₃PO₄-oldatot, mint külső standardot alkalmaztunk. Az elektrospray tömegspektrumok mérése (ESI-MS) Varian Ion-trap 500 spekrométer segítségével történt pozitív vagy negatív mérési módban. A magas felbontású tömegspektrum

^{*} Az Anyagok és módszerek c. részben leírt vizsgálatokhoz alkalmazott vegyszerek mindegyike legalább analitikai tisztaságú volt, illetve amennyiben gyártó nem került jelölésre, a Sigma-Aldrich termékét alkalmaztuk.

(HR-MS) felvétele UPLC/MS rendszerrel történt, melynek összetétele: Accela 1250 kvaterner grádiens pumpa, LTQ Velos Pro/Orbitrap ELITE tömegspektrométer (Thermo, Waltham, MA, USA), az oldatok 50% vizes metanolban voltak feloldva. Analitikai mérések a következő összeállítású HPLC rendszerrel történtek: Beta 10 grádiens pumpa (ECOM, Prága, Cseh Köztársaság), Knauer A0285 és Topáz duál-UV detektor (ECOM), Luna RP8, 5 μm, 150 x 4,6-mm oszlop (Phenomenex, Torrance, CA, USA), C8-cartridge oszlopot tartalmazó Security Guard-rendszerrel ellátva (Phenomenex). A mozgó fázis gázmentesítése DG 3014 degasserrel (ECOM) történt. Szemipreparatív HPLC-re LCD50K grádiens pumpa (ECOM), UV-Vis detektor LCD2083 (ECOM), Luna RP8, 10 μm, 250 x 21,2-mm oszlop (Phenomenex) összeállítású rendszer szolgált. A projekt során végzett radiojelölési vizsgálatokhoz Traceselect minőségű víz valamint Ultrapur[®] HCl és NaOH beszerzése a Merck KGaA-tól (Darmstadt, Németország) történt. A ⁶⁸Ga-megkötést radio-TLC segítségével szilika-impregnált kromatográfiás papírral (Agilent, Santa Clara, CA, USA) és 1 M aq. NH₄OAc:MeOH (1:1) mozgófázissal végeztük. A szkennelés és értékelés MiniGITA Star TLC-szkenner (Raytest, Straubenhardt, Németország) alkalmazásával történt.

A projekt során alkalmazott kelátorokkal kapcsolatos szerves kémiai szintéziseket NOPA, illetve NO2AP esetén a Charles University in Prague Department of Inorganic Chemistry kollégái, míg NOPO esetén a TUM Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie munkatársai végezték és bocsátották rendelkezésünkre radioanalitikai vizsgálataink céljára pár mg-os mennyiségben, a munkacsoportok közötti kooperáció keretében.

5.1.2. Ligand szintézisek

I.) NOPA szintézise



reakcióegyenlet: NOPA szintézise. Reagensek és alkalmazott körülmények: (a) (MeO)₂CHNMe₂, dioxán,
 °C, 4h; (b) *t*BuO₂CCH₂Br, dioxán, szobahőmérséklet, 1 h; (c) NaOH, víz/EtOH, reflux, 72 h, 89% hozam TACN-ra; (d) paraformaldehid, H₃PO₂, víz, szobahőmérséklet, 12 h, 63%.

a.) (1,4,7-triazaciklononán-1-il)ecetsav szintézise[†]

30 mL dioxánban 4,00 g 1,4,7-triazaciklononánt (TACN) (31 mmol) oldunk, majd 4,40 g N,N-dimetil-formamid dimetilacetált (36,9 mmol) adtunk az oldathoz. Az elegyet 105 °C-os vízfürdőben 4 órán keresztül melegítettük, majd hűtöttük szobahőmérsékletre és cseppenként 7,24 g t-butil brómacetátot (37,1 mmol) adtunk hozzá. A képződött szuszpenziót további 10 mL dioxán hozzáadásával oldottuk és szobahőmérsékleten 1 órán keresztül kevertettük. Ezután 20 mL dietil-étert adtunk az elegyhez, a képződő sárga, mikrokristályos terméket szűrtük, további dietil-éterrel mostuk és oldottuk a következő oldatban: 5,00 g NaOH (125 mmol) 50% ag. EtOH-oldatban (40 mL). Az oldatot 72 órán keresztül refluxáltattuk, majd vákuum alatt száradásig pároltuk, a maradékot Dowex 50 segítségével tisztítottuk (H⁺forma – oszlopméret ~3 x 20 cm). Az oszlopot vízzel mostuk, a vegyület visszanyerését 5% aq. NH₃-oldattal végeztük. A terméket tartalmazó frakciót bepároltuk, vízben ismét feloldottuk, majd vákuum alatt száradásig pároltuk. Ezt az eljárást még kétszer megismételtük. A termék sárga olaj formájában volt izolálható (5,20 g, 89%), mely 4 °C-on való állás közben megszilárdult. ¹H-NMR (300 MHz, D2O):δ (ppm) 2.82-2.95 (m, HO₂CCH₂NCH₂CH₂NH, 8H), 3.11 (s, HNCH₂CH₂NH, 4H), 3.30 (s, CH₂CO₂H, 2H). ¹³C{1H} NMR (75.4 MHZ, D2O): δ (ppm) 43.88, 43.98, 50.09 (s $3\times$, ring CH₂), 58.26 (s, NCH₂CO₂H), 180.44 (s, CO₂H). MS (ESI, pozitív mód, m/z): 188.3 [M + H]⁺. Kalkulált M (C₈H₁₇N₃O₂) 187.2.

[†] Ld. 1. reakcióegyenlet/ 'a', 'b' és 'c' reakció

b.) 1,4,7-triazaciklononán-7-(karboximetil)-1,4-bisz(metilénfoszfinsav) (NOPA) szintézise[‡]

6,20 g (1,4,7-triazaciklononán-1-il)ecetsavat (4 vegyület, 1. reakcióegyenlet ld. 6.1.1) (33,2 mmol) oldottunk 36,3 mL 50%-os aq. H₃PO₂-oldatban (33,2 mmol), melyhez 1,96 g paraformaldehidet (65,3 mmol) adtunk. Az elegyet zárt lombikban szobahőmérsékleten 12 órán keresztül kevertettük, a paraformaldehid lassan feloldódott. A keveréket vákuum alatt száradásig pároltuk, kis mennyiségű vízben oldottuk és az oldatot Dowex 50-re (H⁺-forma – oszlopméret ~3 x 20 cm) vittük fel. Az oszlopot vízzel eluáltuk, az első savas frakció foszforossavat tartalmazott, a termék későbbi semleges frakciókban volt eluálható. A tiszta terméket tartalmazó frakciókat gyűjtöttük, vákuum alatt szárítottuk és végül fagyasztva szárítottuk. A művelet áttetsző szilárd anyagot (NOPA) (7,20g, 63%) eredményezett. ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ 3.34 (d, 2JPH = 9.9 Hz, NCH₂P,4H), 3.39–3.56 (m, gyűrű CH₂, 8H), 3.62 (s, gyűrű CH₂, 4H), 3.91 (s, NCH₂CO₂H, 2H), 7.23 (d, 2JPH = 546 Hz, PH, ₂H). ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, D₂O): δ 49.97 (s, gyűrű CH₂), 51.83 (d, 3JPC = 5.0 Hz, gyűrű CH₂), 52.07 (d, 3JPC = 3.8 Hz, gyűrű CH₂), 56.35 (s, NCH₂CO₂H), 56.21 (d, 2JPC = 88.0 Hz, NCH₂P), 172.33 (s, CO₂H). ³¹P-NMR (121 MHz, D2O): δ 16.76 (d, 1JPH = 542 Hz). MS (ESI, pozitív, m/z): 366.6 $[M + Na]^+$, 344.0 $[M + H]^+$; kalkulált M (C₁₀H₂₃N₃O₆P₂) 342.8. HR-MS (pozitív mód, m/z): 344.1143 $[M + H]^+$, kalkulált $C_{10}H_{23}N_3O_6P_2$: 343.1062.

[‡] Ld. 1. reakcióegyenlet/ 'd' reakció



2. reakcióegyenlet: NO2AP szintézise. Reagensek és alkalmazott körülmények: (a) HMDSA, 130 °C, 24 h, kvantitatív; (b) (i) paraformaldehid, HMDSA, 130 °C, 24 h; (ii) MeOH, HPLC tisztítás; 46% (hozam vegyület 7-re); (c) CF₃CO₂H:CH₂Cl₂ 1:1, szobahőmérséklet.

c.) 1,4,7-triazaciklononán-4,7-bisz(t-butiloxikarbonilmetil)-1-[metilén(2-karboxietil)foszfinsav] szintézise

0,260 g (2-karboxietil)foszfinsavat (5 vegyület, 2. reakcióegyenlet ld. 6.1.1) (1.9 mmol) 5 mL hexametil-diszilazánban (HMDS) oldottunk száraz üvegedényben argon alatt és az oldatot 140 °C-on (olajfürdőben) tartottuk 24 órán keresztül, amely a 6 intermediert eredményezte. 0,200 g 7 észtert (2. reakcióegyenlet ld. 6.1.1) (0,56 mmol) külön oldottunk 7 mL HMDS-ben és a 6 intermedier (2. reakcióegyenlet ld. 6.1.1) hűtött oldatához adtuk. 0,050 g, (1,6 mmol) szárított paraformaldehidet adtunk egyszerre az oldathoz, a reakcióedényt szorosan zártuk és az elegyet 130 °C-on (olajfürdőben) 24 órán keresztül melegítettük, majd lehűtöttük 25 °C-ra. A trimetilszilil-csoportok eltávolításához 5 mL MeOH-t adagoltunk, kis adagokban. A reakcióelegyet vákuum alatt óvatosan bepároltuk, mely sárga olajat eredményezett. A terméket 200 mg-os részletekre osztottuk és minden részletet 1 mL vízben oldottunk, az oldatot 0,5-µm-es fecskendőszűrőn keresztül szűrtük és szemipreparatív HPLC-n tisztítottuk grádiens módban A (20% MeCN, 20% 0,1 M aq. NH4OAc és 60% víz) és B (33% MeCN, 20% 0,1 M aq. NH₄OAc és 47% víz) eluensekkel; áramlási sebesség 20 mL/min, grádiens: 100% A-ról 100% B 19 perc alatt. A tiszta terméket tartalmazó frakciót (Rt = 5,7 perc) gyűjtöttük, vákuum alatt pároltuk és fagyasztva szárítottuk. Kitermelés 0,130 g (46% *t*Bu₂NO₂A-ra nézve). ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 1.49 (s, CH₃, 18H), 1.87 (m, PCH₂CH₂, 2H), 2.41 (m, PCH₂CH₂, 2H), 2.89 (bs, gyűrű CH₂, 4H), 3.30 (d, 2JPH=7.5 Hz, NCH₂P, 2H), 3.12 (bs, gyűrű CH₂, 4H), 3.35 (bs, gyűrű CH₂, 4H), 3.63 (s, NCH₂CO, 4H).

[§] Ld. 2. reakcióegyenlet/ 'a' és 'b' reakció

¹³C{¹H} NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 27.63 (d, 1JPC = 72.0 Hz, PCH₂CH₂), 28.03 (s, CH₃), 30.0 (d, 2JPC = 3.0 Hz, PCH₂CH₂), 47.56 (s, gyűrű CH₂), 49.66 (s, gyűrű CH₂), 53.30 (s, gyűrű CH₂), 53.77 (d, 1JPC = 88.0 Hz, NCH₂P), 56.62 (s, NCH₂CO), 84.27 (s, Cq), 172.98 (s, NCH₂CO), 181.29 (d, 3JPC = 16.7 Hz, PCH₂CH₂CO₂H). ³¹P{¹H} NMR (121 MHz, D₂O): δ (ppm) 32.42 (s). MS (ESI, pozitív, m/z): 508.3 [M + H]⁺, kalkulált M (C₂₂H₄₂N₃O₈P) 507.6. HR-MS (pozitív mód, m/z): 508.2797 [M + H]⁺, kalkulált C₂₂H₄₂N₃O₈P 507.2710.

d.) 1,4,7-triazaciklononán-4,7-bisz(karboximetil)-1-[metilén(2-karboxietil)foszfinsav]
 (NO2AP) szintézise^{**}

48,2 mg **8** észtert (2. reakcióegyenlet ld. 6.1.1) (0,095 mmol) 10 mL vízmentes CH₂Cl₂:TFA 1:1 elegyében oldottunk és az oldatot sötétben szobahőmérsékleten 12 órán keresztül kevertettük. Az oldószereket vákuum alatt pároltuk a maradékot vízben oldottuk, majd bepároltuk. Az eljárást kétszer megismételtük. A kapott anyagot ismételten vízben oldottuk és az oldatot fagyasztva szárítottuk. A terméket 37,1 mg trifluorecetsav-sóként nyertük vissza. ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ (ppm) 2.13 (m, PCH₂CH₂, 2H), 2.67 (m, PCH₂CH₂, 2H), 3.45 (d, 2JPH = 5.7 Hz, NCH₂P, 2H), 3.50–3.56 (m, gyűrű CH₂, 8H), 3.66 (s, gyűrű CH₂, 4H), 4.14 (s, NCH₂CO, 4H). ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, D₂O): δ (ppm) 24.72 (d, 1JPC = 92.3 Hz, PCH₂CH₂) , 27.01 (s, PCH₂CH₂), 51.44 (s, gyűrű CH₂), 52.19 (s, 2× ring CH₂), 55.01 (d, 1JPC = 96.4 Hz, NCH₂P), 57.39 (s, NCH₂CO), 116.7 (q, 1JCF = 290.4 Hz), 163.1 (q, 2JCF = 36.5 Hz), 170.92 (s, NCH₂CO), 177.14 (d, 3JPC = 13.5 Hz, PCH₂CH₂CO₂H). ³¹P{¹H} NMR (121 MHz, D2O): δ (ppm) 43.77 (s). MS (ESI, pozitív, m/z): 396.1 [M + H]⁺, kalkulált M (C₁₄H₂₆N₃O₈P) 395.3. HR-MS (pozitív, m/z): 396.1534 [M + H]⁺, kalkulált C₁₄H₂₆N₃O₈P: 395.1457.

5.1.3. Foszfin- és karboxil-csoportokkal eltérően szubsztituált TACN-vázas kelátorok ⁶⁸Ga-jelölése

A manuálisan végzett Ga-68-jelöléseket a Notni és mtsai [80] által leírt módszer szerint végeztük. SnO₂-alapú ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátort (iTHEMBA Labs, Fokváros, Dél-Afrikai Közt.), eluáltunk 1M HCl-val (aq.). A legmagasabb aktivitást (\approx 70 MBq) tartalmazó 1250 µL-es térfogatot összegyűjtöttük, majd HEPES-oldattal puffereltük (800 µL, aq, 2,7 M). Az így elkészített oldat 90 µL-es részleteit 10 µL jelölendő törzsoldathoz adtuk (pH \approx 3) és 5 percig 95 °C-on vagy szobahőmérsékleten inkubáltuk. A pH további beállítása aq. HCL vagy aq.

^{**} Ld. 2. reakcióegyenlet/ 'c' reakció

NaOH-oldat alkalmazásával történt. A reakcióelegy szobahőmérsékletű vízfürdőben történő gyors hűtését követően, vagy a szobahőmérsékleten végzett kísérleteknél megfelelő időpontoknál mintákat vettünk és ITLC segítségével szilika-impregnált kromatográfiás papíron (Varian Inc.), 1 M aq NH₄OAc/MeOH, 1:1 mozgófázis használatával mértük a ⁶⁸Gajelölés (%) értéket. A kromatográfiás papírokat MiniGITA Star TLC-szkennerrel (Raytest) szkenneltük és értékeltük. Minden esetben 95% fölötti radiokémiai tisztaság érték fölött tekintettük kvantitatívnak az adott jelölési reakciót.

5.2.68 Ga-kelátorok komplexképzési reakcióinak mikrofluidikai optimalizálása

5.2.1. Manuális jelölések ⁶⁸Ga-izotóppal

A manuálisan végzett Ga-68-jelöléseket ezen projektben is a Notni és mtsai [80] által leírt módszer szerint végeztük – a módszer leírását az 5.1.3. fejezet tartalmazza, annyi különbséggel, hogy ezen vizsgálatok idején nagyobb radioaktivitás-mennyiség volt eluálható a rendelkezésünkre álló generátorról, így a legmagasabb aktivitást tartalmazó 1250 µl-es térfogatban vizsgálataink során ≈500 MBq radioaktív Ga-68 izotóp volt.
5.2.2. A mikrofluidikai szintézismodul felépítése és működése



12. ábra: Kapilláris alapú mikrofluidikai rendszer felépítése Ga-68 jelölési reakciókhoz. 1: KONTRON HPLC pumpák, 2: Mintatartó Ga-68 oldathoz 3: Automata mintaadagoló reagensoldatokhoz 4 és 5: Loop injektorok 6 és 7: Fecskendők dupla fecskendőpumpában 8: PEEK reaktor (17.5 m x 0.15 mm) 9: Levegő termosztát 10: Kivezetés 11: HPLC pumpák (Waters LC module integrated HPLC system) 12: HPLC oszlop 13: ATOMKI RA (radioaktivitás) detektor 14: UV detektor (Waters LC module integrated HPLC system) 15: Adatfeldolgozó modul 16: PC

A mikrofluidikai jelölések elvégzéséhez PEEK-kapilláris alapú mikrofluidikai rendszert állítottunk össze, melynek felépítése az **12. ábrán** látható. A rendszerben történő áramlást két KONTRON HPLC pumpa (1) biztosította, amely hordozófolyadékként tisztított vizet szállított. A reakciókhoz a Ga-68 oldatot a (2), míg a jelölendő reagens-oldatot a (3) számú mintatartókból nyertünk. Minden előzetesen beprogramozott szintézisciklust a reagensoldatok loop-ba történő felszívása indít ((4) és (5)) a dupla fecskendőpumpában található fecskendők segítségével. Az automatizált radiojelölési reakciók a reaktánsoldatok PEEK-reaktorba (8) történő együttes injektálásával indultak, melyek elegye a hordozófolyadék által hajtva a légtermosztátba (9) tekercselt PEEK-kapilllárisban végighalad. A terméket tartalmazó reakcióelegy a (10) kivezetésnél gyűjthető, illetve – az alkalmazott protokolltól függően – azonnali analízishez online HPLC rendszerre injektálható (11-15). A rendszert Arduino Mega 2560R3 mikrokontroller kártya irányította. A programkód Arduino programozási nyelven íródott.

A mikrofluid rendszer tervezését és felépítését Intézetünk munkatársa, Dr. Szikra Dezső végezte, a rendszer tesztelését, illetve ⁶⁸Ga-jelölésekre való alkalmazását a leírt projekt során közösen kiviteleztük.

5.2.3. Mikrofluidikai jelölések és online analízis

A manuális jelölésnél leírtakhoz hasonlóan a ⁶⁸Ga-generátorból nyerhető legmagasabb aktivitáskoncentrációjú 1250 µL-es frakciót gyűjtöttük és a korábban leírtakkal (ld. 5.2.1.) azonos módon HEPES-oldattal puffereltük. Az így nyert oldatot a mikrofluid modul mintatartójába (2) helyeztük. Mivel a modul 1:1-es térfogatarányban képes reaktánsoldatokat keverni, ezért a jelölendő vizes oldatokat előzetes HEPES-puffereléssel és hozzáadott HCl/NaOH-oldattal készítettük oly módon, hogy a végső HEPES-koncentráció a teljes jelölőreakcióelegyre ≈1.76 M legyen (a manuális jelölés reakcióelegyével megegyező módon). A kelátorok vizsgálata során a 100-0,01 µM kelátorkoncentráció-sávban (lépték: 100; 30; 10; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01 µM) és 1-9 pH-értékeknél (egységnyi léptékkel) vizsgáltuk. Az előkészített reagensoldatokat a rendszer automata mintaadagolójába helyeztük (3). A mikrofluid jelölések optimalizálási vizsgálatánál, a reakcióelegyek analitikai értékelését a reakcióelegy 20 µL-es mintájának online HPLC rendszerre történő azonnali injektálásával végeztük. NOTA és NOPO esetében az RCP érték megállapításához Adsorbosphere® XL SCX oszlopot (250 x 4,6 mm) 5 µm-es szilika (90 Å pórusméret) használtunk lineáris grádiens elúcióval (3. táblázat bal oldal) eluensként vízzel (eluens A), 0,2 M borkősav vizes oldata (eluens B) és 5% NaCl vizes oldat (eluens C) 1 mL/min áramlási sebességgel.

HPLC elválasztási módszer a vizsgált Kelátorokhoz Alkalmazott eluensek: víz (A), 0,2 M borkősav-oldat		HPLC elválasztási módszer a vizsgált kelátor-konjugátumokhoz Alkalmazott eluensek: 0,1 % H ₃ PO ₄ -oldat (aq.) (A) és					
				(aq.), pH=2 (B) es 5	% NaCl-oldat (aq.) (C)	ACN (B)	
				Időpont (min)	Keverési arány (%)	Időpont (min)	Keverési arány (%)
				0	65% A, 30% B, 5% C	0	100% A
5	65% A, 30% B, 5% C	5	100% A				
7	0% A, 30% B, 70% C	7	20% A				
13	0% A, 30% B, 70% C	9.5	20% A				
		9.6	100% A				

3. táblázat: Adsorbosphere[®] SCX grádiens elúciója NOTA és NOPO reakcióelegyek (bal oldalon) és Kinetex XB grádiens elúciója NODAGA-c(RGD)₂ és NOPO-RGD reakcióelegyek (jobb oldalon) vizsgálatához.

RGD-konjugátumok esetében, a HPLC-elválasztáshoz Kinetex XB C18 2.6 µm 50x4,6 mm oszlopot alkalmaztunk grádiens elúcióval (**3. táblázat** jobb oldalon) eluensként 0,1% H₃PO₄oldattal (aq) (eluens A), illetve acetonitrillel (eluens B). Az UV detektort (Waters Integrated LC module Plus) 210 nm-es hullámhosszra állítva RA detektorral (ATOMKI) kombinálva alkalmaztunk. Az RCP (%) érték megállapítása az RA kromatogramon kapott csúcsok AUC értékeinek bomláskorrigált értékelésével történt.

5.2.4. Módszerösszehasonlítás

A manuális és mikrofluid jelölési metodika közvetlen összehasonlításához különböző ⁶⁸Gakötő sajátságokkal rendelkező kelátorokat alkalmaztunk. Minden jelölést a korábbiakban leírt protokolloknak megfelelően végeztünk a következő fix paraméterekkel: pH 3,0, 95 °C, 5 min reakcióidő. A jelölési sajátságokat széles koncentrációtartományban (100; 30; 10; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01 μM) végeztük mindkét módszerrel.

5.2.5. Multiparametrikus jelölési optimalizálás

A vizsgált vegyületeket széles koncentrációtartományban, 100-0,01 μM (lépték: 100; 30; 10; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,01 μM) és 1-9 pH-értékeknél (egységnyi léptékkel) teszteltük 5 perces reakcióidőkkel (0,066 mL/min áramlási sebesség 17,5 m x 0,15 mm PEEK-csőben) és állandó reakcióhőmérsékleten (95 °C). A radiokémiai tisztaságot a minták online HPLC-re történő automata injektálásával állapítottuk meg a korábbiakban leírt Adsorbosphere[®] XL SCX oszloppal végzett kationcserés elválasztási módszer segítségével.

5.2.6. ⁶⁸Ga-retenció meghatározása a PEEK-kapilláris rendszerben

A radionuklid PEEK-kapillárisrendszerben történő retencióját szintén teszteltük. A korábbiakban leírt (ld. 5.2.1.) "szabad" HEPES-sel pufferelt Ga-68-oldatot betöltöttük a

rendszerbe, majd vizes, a mikrofluid jelölési módszer leírásánál említett, HEPES-pufferelt, illetve HCl/NaOH-oldattal pH beállított "vak" oldatokkal keverve - tehát keláló ágens jelenléte nélkül - áramoltattuk át a rendszeren. A radionuklid retencióját a rendszerben a 10-10 µL HEPES-pufferelt "szabad" ⁶⁸Ga- és "vak" oldatok együttes injektálása után gyűjtött kifolyt oldatból, illetve 10 µL az automata loop-injektorból injektált teljes ⁶⁸Ga-aktivitás összehasonlításából számítottuk. A gyűjtött oldatok aktivitását 90 perc bomlási idő után Canberra Packard Cobra II gamma counter segítségével mértük. A ⁶⁸Ga-retencióját a rendszerben az egyes pH értékekre külön-külön vizsgáltuk.

5.2.7. Mikrofluidikai szintézisek ⁶⁸Ga-izotóppal

A mikrofluid rendszer teljes radiokémiai szintézisek elvégzésére való lehetséges alkalmazását kombinált mérési protokoll alkalmazásával végeztük, mely mind retenciós, mind pedig radiokémiai tisztáság vizsgálatokat magába foglalt a vizsgálat vegyületekre. A szintéziseket 10-10 µL térfogatokkal végeztük (az 5.2.3 részben leírtaknak megfelelően) azonban itt nem történt meg a reakcióelegyek injektálása online HPLC rendszerre. Ezeknél a reakcióknál a jelölt oldatokat cseppenkénti frakcionálással gyűjtöttük a rendszerből kifolyó folyamatos folyadékáramból. A radioaktivitás értékeket azonnal mértük Canberra gamma spektrométer segítségével az 511 keV energiacsúcs AUC értékének használatával. A retenció meghatározására alkalmazott vizsgálathoz hasonlóan a kiindulási radioaktivitás. Ezt követően az oldat mintáját HPLC-rendszerre injektáltuk a radiokémiai tisztaság meghatározásához.

A szintézis paramétereit (pH, ligand-koncentráció) a NOTA és NOPO multiparametrikus jelölési optimalizálási vizsgálatok eredményeire alapozva választottuk ki, illetve az adott kelátorra vonatkozó azonos paraméterekkel dolgoztunk a neki megfelelő peptid-konjugátumok, NODAGA-c(RGD)₂, illetve NOPO-RGD jelölési vizsgálatainál. A reakciókat minden esetben 95 °C-on végeztük, továbbá NOTA és NOPO esetében csökkenő reakcióidővel (5; 2,5 és 1,25 percnél) és végrehajtottunk kísérleteket a rendszerben történő áramlási sebesség (0,066 mL/min helyett 0,132, illetve 0,264 mL/min) növelésével.

A vizsgálatok során alkalmazott NODAGA-c(RGD)₂ kereskedelmi forgalomban elérhető, míg a NOPO analógként alkalmazott NOPO-RGD-t a TUM Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie munkatársai bocsátották pár mg-os mennyiségben a rendelkezésünkre.

5.3.⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) szintézise és alkalmazása Aminopeptidáz N (CD13) receptorok *in vivo* leképezésére

5.3.1. NOTA-c(NGR) prekurzor előállítása ⁶⁸Ga-jelölésekhez

Rink-Amide MBHA gyantán (0,52 mmol/g kapacitás), lineáris, részlegesen védett H-Lys(ClZ)-Asn-Gly-Arg-Glu-NH₂ szintézisét végeztük Fmoc/tBu stratégiával. A szintézishez standard Fmoc-védett aminosavak kerületek felhasználásra kivéve az N-terminálison lévő Boc-Lys(ClZ)-OH aminosav-származékot. A részlegesen védett peptid hasítását 95%TFA, 2,5% TIS és 2,5% víz (V/V/V) segítségével 3 óra alatt szobahőmérsékleten végeztük; a nyers peptidet dietil-éterrel kicsapattuk, majd jéghideg dietil-éterrel átmostuk. A terméket 100% ecetsavban oldottuk, ezután fagyasztva szárítottuk. A nyers peptidet szemipreparatív RP-HPLC-n tisztítottuk, majd a ciklizálást megelőzően a TFA elleniont kloridra cseréltük piridínium HCl alkalmazásával. A részlegesen védett lineáris peptid ciklizálása DMF-ben 0,2 mg/ml peptid koncentráció mellett, BOP/HOBt/DIEA hozzáadásával (a peptid anyagmennyiségéhez képest 6:6:12 ekvivalens mennyiségben), szobahőmérsékleten, 24 óra alatt történt. Ezután az oldószert bepároltuk, a szilárd maradékot feloldottuk 0,1 % TFA vizes oldatában, majd RP-HPLC-n tisztítottuk. Liofilizálás után a tisztított terméket deszikkátorban P2O5 fölött tovább szárítottuk, majd a ClZ csoportot is eltávolítottuk HF segítségével (HF- pkrezol = 10 ml:1 g). A terméket szemipreparatív RP-HPLC-n tisztítottuk. A tisztított ciklizált peptid kémiai tisztaságának ellenőrzése analitikai HPLC-vel történt, azonosítása pedig ESI-MS módszerrel (Esquire 3000+ ion trap mass spectrometer Bruker Daltonics, Bréma, Németország). A c[KNGRE]-NH₂ peptid leírt módon történő előállítását az MTA ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport munkatársai végezték.

A kész c[KNGRE]-NH₂ peptid NOTA kelátorral történő konjugációjához 11,7 mg-t (20 μmol) oldottunk 0,9 mL 0,1 M NaHCO₃ pufferben (pH 9,5). Majd, 12,3 mg (22 μmol) *p*-SCN-Bn-NOTA-t (Macrocycles Inc., Dallas, TX, USA) feloldottunk 0,1 mL DMSO-ban és hozzáadtuk a vizes fázishoz. Az elegyet 2 h szobahőmérsékleten történő kevertetés után dolgoztuk fel. Az így kapott NOTA-konjugált NGR-analógot (NOTA-c(NGR) szemipreparatív HPLC segítségével tisztítottuk és az összegyűjtött frakciókat liofilizáltuk. A tisztított terméket analitikai RP-HPLC segítségével ellenőriztük és ESI-MS (Shimadzu LCMS IT TOF Mass Spectrometer, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan) segítségével azonosítottuk.

5.3.2. NODAGA-[c(RGD)₂] és NOTA-c(NGR) jelölése ⁶⁸Ga-mal

A jelöléshez használt NODAGA-[c(RGD)₂] peptid-kelátor konjugátumot készen szereztük be az ABX GmbH-tól (Radeberg, Németország). Korábbi kísérleteinkhez hasonlóan a jelöléshez a Notni és munkatársai által leírt módszert alkalmaztuk [80]. SnO₂-alapú ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátort (iTHEMBA Labs, Fokváros, Dél-Afrikai Közt.), eluáltunk 1 M HCl-oldattal (aq.). A legmagasabb aktivitást (\approx 200 MBq) tartalmazó 1250 µL-es térfogatot összegyűjtöttük, majd HEPES-oldattal puffereltük (800 µL, aq, 2,7 M). Az így kapott törzsoldathoz 100 µL 100 µM NODAGA-[c(RGD)₂] aq. oldatot adtunk, majd a keveréket 5 percig 95 °C-on (pH = 3,0) inkubáltuk. A reakcióelegyből a radioaktívan jelölt származékot Empore[®] C18 SD 7 mm/3 mL extrakciós diszk felszínén kötöttük meg. (A diszk felszínét előzetesen 500 µL EtOH és 10 mL vizes mosással aktiváltuk). A diszk felszínén megkötött jelölt ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)₂]-t 15 mL vízzel mostuk, majd 500 µL EtOH/0,9% NaCl vizes oldatának 1:1 arányú keverékével eluáltuk. Az eluátum EtOH-tartalmát 5 perces időtartam alatt 60 mL/min He-áram alatt 95 °C-on pároltuk. A visszamaradó oldatot tisztított vízzel 250 µLre egészítettük ki.

Az általunk előállított NOTA-c(NGR) prekurzor esetében hasonló eljárást alkalmaztunk, mely a Wängler és mtsai [126] által leírt módszeren alapul. A korábbi módon leírt 1 M HCl (aq.)oldattal történő elúció során 1 mL eluátumot (≈160 MBq) gyűjtöttünk és 1 mL, 1 M nátriumacetát-oldattal (aq.) puffereltük. A törzsoldat pH-ját további NaOH-oldat hozzáadásával (10%, 0,2 mL aq.) ~ 4,5-re állítottuk. Az ily módon pufferelt oldathoz 15 µL 1 mM NOTAc(NGR)-oldatot (aq.) adtunk, majd az elegyet 5 percig szobahőmérsékleten kevertettük. Ezt követően a reakcióelegyet a már leírt módon aktivált Empore[®] C18 SD 7 mm/3 mL extrakciós diszk-en vezettük át cseppenként. A diszk felszínét ezután 5 mL vízzel mostuk, majd a radioaktívan jelölt származékot 0,35 mL EtOH-lal eluáltuk. Az eluált oldatot kb. 5 perc alatt száradásig pároltuk 60 mL/min He-áram alatt. A jelölt peptidet 250 µL izotóniás sóoldatban oldottuk további felhasználásra.

Mindkét jelölt peptid radiokémiai tisztaságát (%) HPLC-módszerrel határoztuk meg (ld. 5.3.3.).

5.3.3. Reverz fázisú HPLC módszerek

A c[KNGRE]-NH₂ peptid szintézise során a nyerstermékek és a konjugátumok tisztítása KNAUER HPLC rendszeren (KNAUER, Bad Homburg, Németország), szemipreparatív Phenomenex Luna C18 oszlopon (250 mm x 10 mm) 10 μm szilikán (100 Å pórusméret) (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) történt. Lineáris grádiens elúciót (0 min 5% B; 5 min 5% B; 50 min 50% B) alkalmaztunk 4 mL/min áramlási sebességgel, ahol az A eluens 0,1%TFA vízben, a B eluens 0,1%TFA MeCN-víz 80:20 (V/V) arányú elegyében. A csúcsokat 220 nm-en detektáltuk. Az analitikai RP-HPLC összeállítása hasonló elemekből állt, a kromatográfiás oszlop Phenomenex Luna C18 (250 mm x 4,6 mm) 5 µm szilikán (100 Å pórusméret) volt. Mozgófázisként az előzőekben leírt eluenseket használtuk, lineáris grádiens módban (0 min 0% B; 5 min 0% B; 50 min 90% B), áramlási sebesség: 1 mL/min. A csúcsokat 214 nm-en detektáltuk.

A NOTA konjugált NGR analóg tisztítása KNAUER HPLC rendszeren szemipreparatív Supelco Discovery[®] Bio Wide Pore C18 oszlopon (150 mm x 10 mm) 10 μm-es szilikával történt 4 mL/min áramlási sebességgel. Egy rövid izokratikus fázis után (3 min) lineáris grádiens elúciót alkalmaztunk (3 min 5% B; 25 min 65% B), ebben a szakaszban az A eluens 0,1% TFA vízben, a B eluens 0,1%TFA MeCN-víz 95:5 (V/V) arányú elegyében, a detektálás 254 nm-en történt.

A radiojelölt peptidek minőségellenőrzése során a NOTA-c(NGR) konjugátum tisztításával azonos HPLC rendszert használtunk, illetve azonos eluenseket, azonban ekkor analitikai Supelco Discovery[®] Bio Wide Pore C18 oszlopot (250 mm x 4,6 mm) alkalmaztunk 10 μm-es szilikával és 1,2 mL/min áramlási sebesség mellett. A grádiens profil: 0 min 0%, 3 min 0% B; 14 min 40% B volt. A radiojelölések minőségellenőrzése során radiodetektor és UV detektor (254 nm) szimultán detektálása történt.

5.3.4. ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) peptid partíciós koefficiensének és *in vitro* stabilitás vizsgálata

A 68 Ga-NOTA-c(NGR) partíciós koefficiensének megállapításához a radioaktívan jelölt vegyület 1-oktanol és PBS oldat közti megoszlásának logP értékeként fejeztük ki. Kb. 1,5 MBq 68 Ga-NOTA-c(NGR)-t 10 µL vizes oldatban 0,5 mL PBS (pH = 7,4) és 0,5 mL 1-oktanolt tartalmazó Eppendorf-csövekhez adtuk. Az elegyet 20 percen keresztül intenzíven kevertettük, majd 20000 rpm sebességgel 5 percen keresztül centrifugáltuk a rétegek teljes szétválasztásához. Az egyes rétegekből 100-100 µL-t kémcsövekbe pipettáztunk, melyek radioaktivitását gamma counter segítségével (Perkin-Elmer Packard Cobra, Waltham, MA, USA) mértük. A logP értéket 6 kísérlettel állapítottuk meg.

A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) stabilitását PBS-oldatban 95°C-on és patkány szérumban 37°C-on teszteltük. Kb. 8 MBq ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR)-oldatot pipettáztunk 0,5 mL PBS oldathoz vagy

patkány szérumhoz és a megfelelő hőmérsékleten inkubáltuk. Előbbi esetben az oldatot közvetlenül használtuk a radiokémiai tisztaság ismételt megállapításához (ld. 5.3.3.), különböző időpontokban (0, 5, 30 és 60 perc). A patkány szérum stabilitás értéket szintén több időpontban mértük (0, 30, 60, 90 és 120 perc). A vizsgálatokhoz szükség volt a megfelelő minta-előkészítésre is. A mérésekhez a vizsgált törzsoldat 50 µL térfogatú részletét elegyítettük 50 µL hideg absz. EtOH-lal. A kicsapódott frakciót 20000 rpm-en 5 perc centrifugálás segítségével választottuk el. A felülúszó fázist gyűjtöttük, vízzel hígítottuk és reverz-fázisú HPLC segítségével vizsgáltuk a radiokémiai tisztaság változását (ld. 5.3.3.).

5.3.5. Kisállatok kezelése és az alkalmazott tumormodellek

A kisállatvizsgálataink során alkalmazott állatokat (Fischer-344 patkányok) konvencionális körülmények között tartottuk légkondicionált szobákban $26 \pm 2^{\circ}$ C hőmérsékleten $50 \pm 10\%$ páratartalom mellett, mesterséges fényben, 12 h cirkadián körrel. Fél-szintetikus táplálék (Charles River Hungary Kft., Gödöllő, Magyarország) és ivóvíz *ad libitum* állt az állatok rendelkezésére. Az állatok kezelése humánus módon *a "Guideline for the welfare and use of animals in cancer research"* [127] kritériumainak megfelelő módon a Debreceni Egyetem Állatkísérleti Etikai Bizottságától szerzett engedéllyel (engedélyszám: 22/2007) történt. A laboratóriumi kisállatok tartása és kezelése a magyar törvényekkel (XXVIII/1998. tv.), illetve az Európai Unió vonatkozó előírásaival, szabályozásával (LXVII/2002) összhangban történt.

Kísérleteinkhez kémiailag indukált patkány mesenchymális mesoblastos nephroma (NeDe) tumort alkalmaztunk [128;129]. A kísérleti vese tumor Fischer 344 patkányokból került izolálásra, melyek újszülött korban 125 µg/állat N-nitrozo-dimetilamin sóoldat *i.p.* kezelésben részesültek. A tumorok eltávolításra kerültek 5-7 hónappal a kémiai tumorgenezis után, a tumorok szeletelése és fagyasztása [130] mellett a NeDe sejtvonal képzése is megtörtént [129].

A sejtvonal alkalmazásával felnőtt hím, 200-250 g-os Fischer-344 patkányokban (n=20) hoztunk létre tumor-transzplantált modelleket. Szubkután állatmodell esetében 5 x 10^6 NeDe tumor sejt 150 µL sóoldatban került injektálásra a bőr alá a bal combba. A tumornövekedést tolómércével követtük és a tumorméretet a következő képlettel számoltuk (legnagyobb átmérő x legkisebb átmérő²)/2. *In vivo* kísérleteinket 12 ± 2 nappal a tumor sejtek szubkután injektálása után végeztük, ekkor a tumortérfogat 1.5 ± 0.24 cm³. A másik tumormodell indukciójához a subrenal capsule assay (SRCA) módszert alkalmaztuk. Itt a sebészi operáció célja, hogy tumorsejteket tartalmazó Gelaspon[®] diszket (Germed, Rudolstadt, Németország)

helyezzünk a bal vese tokja alá. A beültetéshez 5 x 10^6 NeDe tumorsejtet tartalmazó 20 µL sóoldatot helyeztünk Gelaspon[®] diszkre [128]. Az állatok 3% izofluránnal (erre a célra szolgáló kisállat-altatóberendezésben) történő altatása után a retroperitoneum megnyitása történt alhasi bemetszéssel, a bal vese vesetokja alá pedig a Gelaspon[®] diszket helyeztük be. A sebszéleket ezt követően kapcsokkal összerögzítettük és a tumorokat kb. 1,4-1,6 cm³ térfogatig hagytuk növekedni az *in vivo* vizsgálatok elvégzéséig.

A kisállatok kezelését, leképezését, illetve a biológiai eredmények értékelését az Intézet Radiobiológiai munkacsoportjával kooperációban, Dr. Trencsényi György vezetésével végeztük.

5.3.6. Leképezés kisállat-PET alkalmazásával

12 ± 2 nappal a NeDe sejtek beültetését követően kontroll és tumor-hordozó patkányokat injektáltunk a farki vénán keresztül 7,4 ± 0,2 MBq ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR)-, illetve ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)₂]-oldatokkal. A radiofarmakon beadása után 90 perccel az állatokat 3% izofluránnal (kisállat-altatóberendezésben) elaltattuk és teljes test PET-vizsgálatokat végeztünk (10 perces statikus PET leképezés minden egyes ágy-pozícióban) MiniPET-II kisállat PET szkenner segítségével [131]. A tumorok anatómiai helyzetének meghatározására CBCT-t (3D Accuitomo, XYZ Slice View Tomograph, I. Morita MFG. Corp, Kyoto, Japan) használtunk. A Röntgen-sugár cső beállításai: 60 kVp, 8.0 μA, és 30,8 s felvételi idő vetületenként; voxel méret: 160 μm.

A PET leképezési eredmények adatfeldolgozásához a radiofarmakon halmozódását standard felvételi értékekben (standard uptake value = SUV) és tumor/izom (T/M) arányokban fejeztük ki. Ellipsoid háromdimenziós térfogatok (Volume of Interest = VOI) kerültek kirajzolásra a tumoraktivitás szélei közelében vizuális észlelés alapján BrainCad szoftver segítségével (http://www.minipetct.com). A SUV értékek számítása a következőképpen történt: SUV = [ROI aktivitás (Bq/mL)]/[injektált aktivitás (Bq)/állat tömege (g)], 1 g/mL sűrűséget feltételezve. A T/M arányokat a tumor VOI és a háttér (izom) VOI aktivitások arányaként számítottuk.

5.3.7. *Ex vivo* szervi megoszlási vizsgálatok

A PET leképezéseket követő napon a kontroll és tumor-hordozó patkányokat elaltattuk, majd 7,4 \pm 0,2 MBq ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) (kb. 1,9 µg peptid/állat) vagy ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ (kb. 3 µg peptid/állat)-oldatokkal injektáltuk a farki vénán keresztül. 90 min inkubációs időt követően az állatok 60 mg/kg pentobarbitál (Nembutal) peritoneális

injekcióval eutanáziáját végeztük és vérmintát vettünk a szívből. Három szövet-mintát vettünk az egyes szervekből (máj, lép, vese, bél, szív, gyomor, izom tüdő és tumor) és aktivitásukat kalibrált gamma counter (Perkin-Elmer Packard Cobra, Waltham, MA, USA) segítségével mértük. A minták tömege és radioaktivitása segítségével meghatároztuk DAR (differential absorption ration) értéküket.

(halmozott radioaktivitás/g szövet) DAR = (teljes injektált radioaktvitás/testtömeg)

5.3.8. Blokkolási kísérletek

Ex vivo és *in vivo* blokkolási kísérleteink során a kontroll és NeDe-tumor-hordozó patkányokat 200 µg jelöletlen NOTA-c(NGR) 100 µL sóoldat (a ⁶⁸Ga-jelölt peptid kb. 100-szoros mennyisége) intravénás injekció formájában történő beadásával kezeltük a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) beadása előtt 5 perccel. A radiofarmakon injektálását követő 90 perccel az *ex vivo* és *in vivo* megoszlási vizsgálatokat a fenti leírásoknak megfelelően végeztük.

5.3.9. Western blot analízis

A NeDe sejtvonal és az állatkísérletek során nyert szövetminták APN/CD13 expressziójának meghatározásához Western blot analízist használtunk. A sejteket közvetlenül, a szövetmintákat folyékony nitrogénnel fagyasztva mozsárral való törés után lizáló pufferben (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil)benzolszulfonil fluorid, proteáz inhibitor koktél hígítva 1:100) dolgoztuk fel. A szonikálás után kapott minták protein tartalmát módosított BCA protein assay (Pierce Protein Biology Products, Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL, USA) segítségével határoztuk meg. A mintákon ezután nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gél elektroforézist végeztünk (10 % gél sávonként azonos 20-60 ug fehérjét alkalmazva). A fehérjemintákat átvittük BioBond nitrocellulóz membránra (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Svédország) majd egér-anti-patkány CD13 (Santa-Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) antitesttel kötődési próbát végeztünk (1:100 hígítás 5%, PBS-t tartalmazó oldat). Második antitestként, torma peroxidázzal konjugált egér IgG Fc szegmens specifikus antitestet alkalmaztunk (kecskében termelt, 1:1000, Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA). Az immunreaktív sávokat SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Protein Biology Products) kemilumineszcens kit segítségével hívtuk elő ODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) alkalmazásával. Az azonos betöltés értékelésre, a membránokon anti-β-aktin antitestekkel újabb kötődési tesztet végeztünk (1:1000 hígítás 5%, PBS-t tartalmazó oldat) és hívtuk elő azonos módon.

A western blot vizsgálatokat a DE KK Élettani Intézet munkatársai végezték.

5.3.10. Kisállat-vizsgálati eredmények statisztikai analízise

Az adatokat átlag \pm SD formájában jegyezzük legalább 3 független kísérlet eredményeként. Szignifikanciát Student t test segítségével számítottunk. A szignifikancia szint p \leq 0,05 ha nincs másképp jelezve.

6. Eredmények

6.1.Foszfin- és karboxil-csoportokkal eltérően szubsztituált TACN-vázas kelátorok ⁶⁸Ga-jelölési sajátságainak összehasonlító vizsgálata

6.1.1. Ligand szintézisek

A NOPA szintézisét az 1. reakcióegyenletben feltüntetett módon végeztük.



reakcióegyenlet: NOPA szintézise. Reagensek és alkalmazott körülmények: (a) (MeO)₂CHNMe₂, dioxán,
°C, 4h; (b) *t*BuO₂CCH₂Br, dioxán, szobahőmérséklet, 1 h; (c) NaOH, víz/EtOH, reflux, 72 h, 89% hozam TACN-ra; (d) paraformaldehid, H₃PO₂, víz, szobahőmérséklet, 12 h, 63%.

1,4,7-triazaciklononánt (TACN) reagáltattunk *N*,*N*-dimetilformamid-dimetil-acetállal, mely az aminális **2** vegyületet eredményezte. A terméket *in situ* monoalkileztünk [132;133], a létrejövő ammónium-só a reakcióelegyből kikristályosodott. Annak ellenére, hogy többlépéses reakciósorozat végrehajtása szükséges, egy reakcióedényben az egymást követő lépések viszonylag egyszerűen és nagy tételben is végrehajthatóak. A **4** vegyületet lúgos hidrolízissel kaptuk **3**-ból. A **4** vegyület Moedritzer-Irani (foszfo-Mannich) reakciója foszforossavval és paraformaldehiddel eredményezte a NOPA vegyületet, az Nmonobenzilezett TACN analóg reakciójához hasonlóan. Az N-metilezett melléktermékek képződését a reakcióhőmérséklet alacsonyan tartásával minimalizáltuk. A tiszta NOPA kinyerése ikerionos formában, egyszerű, erős kationcserélő gyantán történő tisztítással történt, eltérően a korábban már publikált trisz(foszforossavas) ligand tisztításától, jelen esetben a kationcserélő gyanta az N-metilezett melléktermékektől való elválasztásra jóval hatékonyabbnak bizonyult [134].

A NO2AP előállításához két szintetikus útvonal látszott alkalmasnak. Az első megközelítés alapján, az **5** foszforossav reakciója TACN-1,7-diacetáttal (NO2A) és formaldehiddel tömény HCl-oldatban (aq) emelt hőmérsékleten (50-70 °C) összetett, nehezen szétválasztható reakcióelegyet eredményezett, nagyrészt az N-metilezett melléktermékek képződésének köszönhetően. Emiatt egy alternatív útvonal vizsgálata is megtörtént, mely során a prekurzor

észter-csoporttal védett N-acetát formáját alkalmazzuk. A reakció során a foszfit-intermedier 6 előállítása az 5 sav *in situ* hexametildiszilazán (HMDS) reakciójával történik. Utóbbi intermediert TACN-1,7-bisz(*t*-butil-acetáttal) (7) reagáltattuk vízmentes körülmények között, mely a 8-as észter eredményezte (2. reakcióegyenlet). Az irodalomban közölt reakciókhoz képest [135] ezt az eljárást az egyszerűbb tisztítás és magasabb kihozatal jellemezte. A szilil-csoportok eltávolítása metanollal való kezeléssel történt és a szabad, NO2AP kelátorról a védőcsoport-eltávolítást trifluorecetsavval hajtottuk végre.



2. reakcióegyenlet: NO2AP szintézise. Reagensek és alkalmazott körülmények: (a) HMDSA, 130 °C, 24 h, kvantitatív; (b) (i) paraformaldehid, HMDSA, 130 °C, 24 h; (ii) MeOH, HPLC tisztítás; 46% (hozam vegyület 7-re); (c) CF₃CO₂H:CH₂Cl₂ 1:1, szobahőmérséklet.

6.1.2. TACN-vázas kelátorok ⁶⁸Ga-radiojelölése

A rendelkezésre álló NOTA, NOPA, NO2AP és NOPO rendszerek ⁶⁸Ga-jelölő sajátosságait az 5.1.4. fejezetben leírt módszer alkalmazásával hasonlítottuk össze különböző ligand-koncentráció értékeknél, 5 perces reakcióidő alkalmazásával 25, illetve 95 °C-on. Az így kapott ⁶⁸Ga-jelölési értékeket a **13. ábrán** foglaltuk össze.



13. ábra: NOPO, NOPA, NO2AP, illetve NOTA kelátorok jelölési hatékonyságának összehasonlítása különböző kelátorkoncentrációk alkalmazásával 25 és 95 °C-on (pH = 3, t = 5 min, n = 3).

Mivel a **13. ábrán** látható eredmények alapján minden vizsgált vegyület esetében közel kvantitatív hatékonyságot találtunk 95 °C-on végzett reakciók esetén pH 3-nál 3 μM ligandkoncentráció mellett, és a 25 °C-on végzett reakciók során is sikeresek voltak a jelölési kísérletek 30 μM ligandkoncentrációt meghaladó értékeknél 5 perc reakcióidő mellett, ezért ezeket a koncentrációkat és az 5 perces reakcióidőt rögzítettük a további vizsgálatainkhoz a reakcióközegül szolgáló vizes oldat pH-jának és a jelölési hatékonyság közötti összefüggések vizsgálatára. A különböző pH-értékek beállítása mellett végzett jelölések eredménye a **14. ábrán** látható.



14. ábra: NOPO, NOPA, NO2AP, illetve NOTA kelátorok jelölési hatékonyságának összehasonlítása különböző pH-értékek alkalmazásával 25 és 95 °C-on, 30, illetve 3 μM ligandkoncentráció mellett. (t = 5 min, n = 3).

6.2.68 Ga-kelátorok komplexképzési reakcióinak mikrofluidikai optimalizálása

6.2.1. Online HPLC rendszerrel kombinált mikrofluidikai szintézismodul felépítése és működése

A mikrofluid rendszer automata, szekvenciális működése során kapott tipikus kromatogram, illetve a működés során zajló folyamatok sematikus jelölése a **15. ábrán** látható (fent, illetve lent). A rendszer felépítése korábban, a **12. ábrán** volt látható.



15. ábra: A mikrofluid rendszerben történő ⁶⁸Ga-jelölések szekvenciális analízise során nyert tipikus HPLC kromatogram RA detektorral (fent), azonos időskálán leírva a kombinált mikrofluid-HPLC rendszerben zajló folyamatok (lent). A szekvenciális analízis két fő folyamatból állt; reakcióelegy áramlása a PEEK-reaktorban – eközben az előző injektálás mosási fázisa a HPLC-oszlopon (A), illetve a radioaktív komponensek elválasztása a kész reakcióelegyből (B) a következő kapcsolódó eseményekkel: reaktánsoldatok kezdeti injektálása (C), a kész reakcióelegyből minta injektálása a HPLC-rendszerre – mindeközben grádiens NaCl-oldat egyidejű indítása (D), ⁶⁸Ga-NOTA (E) és "szabad" Ga-68 detektálása (F).

A folyamat 10-10 μ L reaktánsoldat loop-injektor segítségével történő összeinjektálásával indul a PEEK kapilláris rendszerben történő folyamatosan áramló folyadékba (a hordozó közeg injekcióhoz való víz). Az áramlás 5 min reakcióidő esetén 0,066 mL/min, a reaktorcső légtermosztátban van elhelyezve. Minden mérésnél 95 °C-ra állított hőmérséklettel dolgoztunk és a nagy hőátadó felületnek, valamint a kiváló hővezető képességének köszönhetően a hőeloszlás homogén a reakciózónán belül, ugyanakkor, a reaktor végén a kiáramló folyadék már ismételten szobahőmérsékletű volt. A reakció végeztével a folyadékot egy 20 μ L térfogatú loop-injektorba vezettük. Amennyiben online HPLC analízis is történt, megfelelő időzítéssel a kész reakcióelegy mintáját ezzel a loop-pal a HPLC rendszer pumpái által fenntartott áramlásba irányítottuk. Itt a radioaktív komponensek elválasztása (nem-konjugált kelátorok esetén) Adsorbosphere[®] XL SCX oszlop segítségével NaCl-oldat-grádiens segítségével történt (ld. 5.2.3). Az adatgyűjtés elindítása a reaktánsoldatok összeinjektálásával azonos időben történt, így retenciós időink az így kapott kromatogramokon 9,7 perc – ⁶⁸Ga-NOPO, 12,0 perc – ⁶⁸Ga-NOTA és 15,3 perc "szabad" Ga-68 esetén, ami magában foglalta a reakció 5 perces időtartamát is. (Nettó retenciós idők a

HPLC rendszerre nézve ⁶⁸Ga-NOPO, ⁶⁸Ga-NOTA és szabad ⁶⁸Ga esetében sorrendben: 4,7; 7,0 és 10,3 perc.). Az oszlop mosási fázisa két HPLC injektálás között, a következő ciklus reakcióelegyének a reaktorcsőben történő áramlásával párhuzamosan történt.

6.2.2. Módszerösszehasonlítás

Az újonnan összeállított mikrofluid rendszer alkalmazhatóságát jelölési sajátságok meghatározására NOTA és NOPO kelátorok alkalmazásával teszteltük. A konvencionális, kézi jelölési módszerrel és ITLC-vel meghatározott radiokémiai tisztaságot vetettük össze a mikrofluid rendszerben szekvenciálisan végzett reakciókból online HPLC-elválasztással meghatározott radiokémiai tisztaság-értékkel azonos reakciókörülmények között (5 perc, 95 °C és pH 3,0). Az összehasonlító vizsgálatok eredményei a **16. ábrán** láthatóak.

Ahogyan az a **16. ábrán** is látható, a radiokémiai tisztaság értékeket az alkalmazott ligandkoncentráció függvényében ábrázolva nagyon hasonló görbéket kapunk. A jelölési görbék NOTA esetében történő összevetésekor megfigyelhető, hogy mind a mikrofluid, mind a kézi jelölés azonos koncentrációtartományt jelöl ki a kvantitatív jelölési eredmények (>95%) eléréséhez, mely az 1 μ M koncentráció értéknél kezdődik. Továbbá, nagyon kis különbséget tapasztaltunk a kézi és mikrofluid jelölési módszerek között a köztes radiokémiai tisztaság értékekkel szolgáló ligand-koncentrációk (0,1-0,3 μ M) esetében.

Ezzel szemben a NOPO kelátornál nem teljesen azonos tendenciákat találunk a két módszer összevetésénél. A ligand-koncentráció értékek hasonló, párhuzamos lefutást mutatnak és mindkét görbéből kapott értékek alapján a 0,1 µM-tól kezdődő koncentráció tartomány alkalmas kvantitatív jelölések végrehajtására, azonban a mikrofluid jelöléssel végzett kísérlet 0,03 és 0,01 µM ligand-koncentrációnál végzett jelölésnél is magasabb radiokémiai tisztaságú elegyet eredményezett, sőt, még a 0,03 µM koncentráció esetében is kvantitatív jelölést tapasztaltunk.



16. ábra: Radiokémiai tisztaság (%) értékek összehasonlítása a manuális és mikrofluid jelölési protokollok alkalmazása mellett a vizsgált NOTA és NOPO kelátorokkal, reakciókörülmények: 5 perc, 95 °C és pH 3,0.

(n=3)

6.2.3. Multiparametrikus jelölési optimalizálás

A módszerösszehasonlítási vizsgálatokhoz hasonlóan, ezeknél a kísérleteknél is NOTA és NOPO molekulák ⁶⁸Ga-jelölési sajátságait vizsgáltuk. Ebben a kísérlet-sorozatban azonban több paraméter változtatását végeztük el a korábbiakban leírt automatizált, mikrofluid módszer segítségével. Az optimális jelölési paraméterek megtalálása érdekében mindkét kelátor ⁶⁸Ga-jelölési sajátságait a következő reakció körülmények mellett teszteltük: 100; 30; 10 ... 0,01 μM ligand-koncentráció, 1-9 pH-tartomány, standard reakciókörülmények minden esetben: 95 °C, 5 min reakcióidő. A mérési eredmények minden sorozat esetén néhány óra alatt, minimális kelátor-felhasználással készültek el, amelyhez az egyetlen szükséges emberi beavatkozás az időközben lebomlott, HEPES-pufferelt ⁶⁸Ga-oldat körülbelül 9 mérésenként történő cseréje.



17. ábra: A vizsgált NOTA és NOPO kelátorok jelölési sajátságai különböző ligand-koncentráció és reakcióelegy pH értékek mellett a következő fix reakciókörülményekkel: 5 perc reakcióidő és 95 °C hőmérséklet. Az eredményeket 3D-grafikonon a mérési pontok alapján generált felülettel (mért értékek fekete pontokkal jelölve) az egyes kelátorokra – NOTA (A), illetve NOPO (B) – ábrázoltuk. A kvantitatív jelölési tartomány (RCP ≥95%) értékelésére ugyanezen mérési eredményeket egy 2D-rácson ábrázoltuk NOTA (C) és NOPO (D) kelátorokhoz (mérési pontok a rácspontoknak felelnek meg). Itt a piros zóna az RCP ≥95% (rácspontokon kívül a mérési eredmények alapján kalkulált) értékeket ábrázolja.

Az eredmények során a radiogyógyszerészeti termékekkel szemben megfogalmazott elvárásokkal összhangban kizárólag RCP ≥95% értékű reakcióelegyet eredményező terméket értékeltünk alkalmasnak további szintetikus felhasználásra. A **17. ábra** A, illetve B részén lévő 3D-ábra alapján megállapítható, milyen paraméter-készlettel kaphatunk kvantitatív jelölést. Ennél könnyebben értékelhető képet ad az eredmények 2D-rácson történő ábrázolása (ekkor azonban az egyes görbék lefutása nem látható).

NOTA esetében (**17. ábra** A és C rész), megfelelően magas RCP értéket (piros zóna) elsősorban a 3-7 pH régióban találunk. A legmagasabb komplexképzési hatékonyságot, azaz kvantitatív jelölést a legalacsonyabb ligand-koncentráció mellett pH 3,0-4,0 és 3 µM NOTA reakciókörülmények mellett találunk.

Érdekes módon a NOPO esetében mért eredményeink ettől eltérő mintázatot mutatnak (**17. ábra** B és D). Itt ahhoz, hogy 95% és annál magasabb RCP értéket kapjunk a jelölési körülmények egy jóval szélesebb kombinációja bizonyult megfelelőnek. Kvantitatív jelölést láthatunk 1-7 pH skálán, amely a NOTA-hoz képest jóval kiterjedtebb eredményt jelent, amely azonos triazaciklononán gyűrűt tartalmaz, azonban a gyűrű eltérően van szubsztituálva. Ezenkívül a legmagasabb lehetséges specifikus aktivitás eléréséhez szükséges ligandmennyiség, (ami egyben jelenti a kvantitatív jelölésre alkalmas legalacsonyabb ligandkoncentrációt) jelentősen alacsonyabb a NOTA-hoz viszonyítva, hiszen RCP \geq 95% értéket találunk pH 3,0-s reakcióelegynél a 0,03 – 0,3 µM kelátor-koncentráció mellett is.

Ezekből a mérési eredményekből választottuk ki a további radioszintetikus vizsgálatainkhoz optimálisnak tekintett paramétereket, melyhez azonban a szintézis robosztusságának növelése érdekében a pH és a ligand-koncentráció szempontjából az áramló rendszerben végighaladó reakcióelegy lamináris áramlás miatt a hordozófolyadékkal való hígulását is figyelembe kellett vennünk. Ennek megfelelőn NOTA esetében a vizsgált körülmények mellett pH 3,0 és 10 µM kelátor-koncentrációt tekintettünk "optimálisnak", míg NOPO esetében azonos pH mellett 1 µM koncentrációt választottunk további kísérleteinkhez.

6.2.4. ⁶⁸Ga-retenció a PEEK-kapilláris rendszerben

Egységnyi léptékben, 1,0-9,0 pH-skálán vizsgáltuk a radionuklid retencióját a PEEKkapilláris rendszerben, amely a jelöléseink során nem-konvencionális reaktorként szolgált. Minden esetben a hőmérsékletet 95 °C-ra állítottuk és 0,066 mL/min áramlási sebesség mellett 5 perces tartózkodási időt (reakcióidő) értünk el a reaktortérben. A mért retencióértékek a **18. ábrán** láthatóak.



18. ábra: Ga-68-retenció (%) a PEEK-kapilláris rendszerben különböző pH értékek mellett a következő reakciókörülmények mellett: 5 perc tartózkodási idő alatt, 95 °C. (n=3).

Eredményeink alapján nem figyelhető meg radionuklid-visszatartás 8 és 9 pH-értéknél a reaktorban. 7,0-s pH-értéktől 3,0-s értékig egységenként csökkentve a pH-t azonban az injektált radioaktivitás egyre jelentősebb részét találjuk a rendszerben visszatartva. A folyamat maximumát pH 3,0 esetében éri el, ahol az eredetileg injektált aktivitásnak több, mint 90%-a hiányzik a kifolyó ágból gyűjtött oldatból. Érdekes módon az áramló elegy pH-jának további csökkentése után a visszatartás teljesen megszűnik, mivel az 1,0 és 2,0 pH értékeknél már nem találunk jelentős Ga-68-retenciót.

6.2.5. Mikrofluid szintézisek ⁶⁸Ga-radionukliddal

Az összeállított mikrofluid rendszer teszteléséhez, illetve radiokémiai szintézisekre való alkalmazhatóságának megállapításához NOTA és NOPO kelátorokkal, illetve az adott kelátor biológiai vektorhoz kapcsolt származékával, nevezetesen NODAGA-c(RGD)₂ és NOPO-RGD-vel végeztünk radiokémiai jelöléseket. Az elvégzett szintézisek reakciókörülményeit a 6.2.3. utolsó bekezdésében vázolt elvek alapján – kelátor és a hozzá tartozó konjugátum azonos - határoztuk meg. Minden reakciót 95 °C-on végeztünk. A végső reakcióelegyeket frakcionálással gyűjtöttük, áramlási sebességtől függően az összeinjektált 10-10 μL reaktánsoldat 30-50 μL végtérfogatban volt visszanyerhető.

Ligand	Ligand koncentráció (µM)	Áramlási sebesség	Reakcióidő (min)	⁶⁸ Ga- visszanyerés	Radiokémiai tisztaság (%)
		(mL/min)		(%)	
		0.066	5	99	99
NOTA	10	0.132	2.5	98	99
		0.264	1.25	98	99
		0.066	5	100	98
NOPO	1	0.132	2.5	97	98
		0.264	1.25	100	99
NODAGA-c(RGD) ₂	10	0.066	5	96	99
NOPO-RGD	1	0.066	5	99	97

4. táblázat: NOTA, NOPO, NODAGA-c(RGD)₂ and NOPO-RGD mikrofluid radiojelölése 95 °C-on és 3,0 pHértéknél (n=3).

Ahogyan az a **4. táblázatban** is látható a "visszanyert" aktivitás minden esetben 95%-nál nagyobb volt, jelentős aktivitás visszatartás nem volt megfigyelhető a PEEK-kapillárisban. Megállapítható továbbá, hogy a kapott reakcióelegyek radiokémiai tisztasága elérte az előzetesen betervezett értéket, hiszen minden alkalommal kvantitatív komplexképzést (RCP \geq 95%) mértünk, mind a kelátorok, mind pedig konjugátumaik esetében.

Mivel 5 perc reakcióidőnél kiváló szintéziseredményeket tapasztaltunk, kísérleteinket tovább folytattuk egy másik paraméter, a rendszerben való tartózkodási idő csökkentésével. Ezt könnyen megtehettük, mégpedig úgy, hogy 0,066 mL/percről 0,132, illetve 0,264 mL/percre növeltük a hordozó folyadék áramlási sebességét. Ennek megfelelően NOTA és NOPO esetében az eredeti 5 perc helyett 2,5, illetve 1,25 perc reakcióidővel végeztünk további reakciókat. Mérési eredményeink azt mutatták, hogy a kapott elegyek minősége (visszanyerés, radiokémiai tisztaság) nem csökkent, az adatok arra engednek következtetni, hogy nem a reakcióidő a meghatározó tényező a radiofém-komplexek kialakulásában az alkalmazott reakciókörülmények mellett.

6.3.⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) szintézise és alkalmazása Aminopeptidáz N (CD13) receptorok *in vivo* leképezésére

6.3.1. Kémiai és radiokémiai szintézisek

A radiofarmakon teljes szintézisének első lépéseként a targetáláshoz használt peptid előállítása történt 49%-os kalkulált ciklizációs- és majdnem kvantitatív hozammal a védőcsoport eltávolítási lépésben. Az előállított NGR analóg (c[KNGRE]-NH₂) tisztaságát analitikai HPLC-n vizsgálva ellenőriztük, ami 98%-nál jobbnak adódott. Szerkezetvizsgáló módszerként ESI-MS-t használtunk: $[M + 2H]^{2+} = 292.9$, illetve $[M + H]^{+} = 584.4$. A

konjugációs reakció termékét, amely *p*-SCN-Bn-NOTA és (c[KNGRE]-NH₂ összekapcsolása során keletkezett (izolált hozam: 73%), hasonló módszerekkel vizsgáltuk. A kémiai tisztaság ebben az esetben is 98% feletti volt, míg a molekulatömeg $[M + 2H]^{2+} = 517,75$ -nek adódott. A kémiai szintézis reakció sémája a **19. ábrán** látható.



19. ábra: NOTA-c(NGR) kémiai szintézisének reakcióegyenlete (A), ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) (B) és ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ (C) szerkezeti képlete

A NOTA-c(NGR), illetve a kereskedelmi forgalomban elérhető NODAGA-[c(RGD)]₂ teljes radioszintézise 30 min alatt, 65-75% bomláskorrigált hozammal történt, a radiokémiai tisztaság meghaladta a 95%-ot, specifikus aktivitás 5.13-5.92 GBq/µmol ⁶⁸Ga-NOTA-

c(NGR), illetve 9.34–10.77 GBq/μmol ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ esetében. Minden jelölt peptidet formulálás után közvetlenül használtunk további vizsgálatainkhoz. A ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂, illetve a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) szerkezeti képlete a **19. ábrán** látható.

6.3.2. ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) peptid partíciós koefficiensének és *in vitro* stabilitás vizsgálata

A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) partíciós koefficensét -2,77 \pm 0,12 értékben határoztuk meg, mely alapján a jelölt vegyület meglehetősen hidrofil. Ezenkívül a jelölt peptid stabilitását patkányszérumban 37°C-on és emelt hőmérsékleten (PBS; pH = 7,4; T=95°C) analitikai radio-HPLC segítségével vizsgáltuk. Patkányszérumban történő 2 h inkubálás után a jelölt peptid több, mint 95%-át intaktnak találtuk. Az emelt hőmérsékleten zajló stabilitási vizsgálat mérésekor a bomlás első mérhető jeleit 1 h inkubáció alatt tapasztaltuk, ekkor azonban még mindig több, mint 98% radiokémiai tisztaságot mértünk. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a vizsgált molekula nagymértékben stabil azon alkalmazott körülmények között, amelyek a további kísérleteink során érhetik.

6.3.3. In vivo és ex vivo szervi megoszlási vizsgálatok egészséges állatokon

In vivo és *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálatokat végeztünk egészséges Fischer-344 patkányokon, valamint kontroll állatokon. 7,4 \pm 0,2 MBq ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) vagy ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ beadását követő 90 perccel a szervi megoszlást teljes test PET leképezésekkel értékeltük. A reprezentatív bomlás korrigált koronális miniPET/CT felvételek a **20. ábra** A és B részén láthatóak. ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ esetében a máj, lép és belek közepes aktivitás-felvétele tisztán látható. Ezzel szemben ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR)-rel injektált állatok esetében csak minimális akkumulációt tapasztaltunk az adott területeken.

Ezek az *in vivo* szervi megoszlási eredmények jól korreláltak az *ex vivo* adatokkal. Az *ex vivo* vizsgálatok esetében az állatokat a jelölt peptid beadását követő 90 perccel altattuk el, boncoltuk és a szövetekben, szervekben felhalmozott aktivitást gamma counter segítségével mértük. Az eredmények összefoglalása a **20. ábrán** látható; ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) injektálást követő 90 perccel a vesék és húgyutak DAR értékei a kontroll patkányok esetében magasabb értéket mutat. Ezzel szemben ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ esetében a máj, belek, lép és gyomor esetében szignifikánsan magasabb ($p \le 0.01$) aktivitás-felvételt találtunk.





Egészséges állatokon végeztünk *ex vivo* blokkolási vizsgálatokat (ld. 5.3.8.). A vizsgált szervek DAR-értékei az **5. táblázatban** kerültek összefoglalásra. A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) felvétele szervekben, szövetekben alacsonyabb volt előzetes, 200 µg jelöletlen NOTA-c(NGR) injektálásakor. A radiofarmakon felvétele a vizsgált szervekben körülbelül kétszer olyan magas volt blokkolás nélkül.

5. táblázat: Radiofarmakon felvétel (DAR) a jelölt szervekben/szövetekben egészséges állatokban az injektálást követő 90. percben

Szerv/szövet	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) (n=5)	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) blokkolt (n=5)
Vér	$0,17 \pm 0,08$	$0,12 \pm 0,20$
Máj	$0,21 \pm 0,05$	$0,10 \pm 0,01$
Lép	$0,13 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,01$
Vese	$2,02 \pm 0,13$	$1,39 \pm 0,04$
Vastagbél	$0,14 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$
Vékonybél	$0,10 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,02$
Gyomor	$0,17 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,02$
Izom	$0,05 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$
Zsír	$0,04 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$
Tüdő	$0,24 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,04$
Szív	0,10 ± 0,010	$0,04 \pm 0,02$

6.3.4. *In vivo* és *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálatok szubkután tumor modell esetében A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) illetve a ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ tumor-targetáló hatékonyságának összehasonlítását NeDe tumort hordozó F-344 patkányokban PETleképezések segítségével hasonlítottuk össze 90 perccel a radiofarmakon injektálását követően. A reprezentatív bomlás korrigált axiális miniPET/CT felvételek a **21. ábra** A és B részén láthatóak. A szubkután növekvő NeDe tumorok könnyen azonosíthatóak voltak ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) segítségével magas tumor-izom (T/M) aránnyal, ahol a T/M SUVátlag, illetve T/M SUVmax 12,25 ± 3,08, illetve 16,28 ± 2,48 volt. Ezek az arányok körülbelül kétszeresen meghaladják a ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂-vel elérhető értékeket, ugyanis utóbbi vegyülettel a T/M SUVátlag, illetve T/M SUVmax 6,39 ± 0,38, illetve 7,8 ± 1,14 volt.



21. ábra: ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ illetve ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) *in vivo* szervi megoszlásának összehasonlítása 12 ± 2 nappal NeDe sejtek szubkután injekcióját követően. Reprezentatív axiális miniPET/CT képek azonos szubkután növekvő NeDe tumorokról (piros nyilak) 90 perccel ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ (A), illetve ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) (B) injektálását követően. C: Radiofarmakon-felvétel kvantitatív analízise NeDe tumorokban (n=6), szignifikancia szint: p ≤ 0,01 (*).

A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) specifikus, aminopeptidáz N (APN/CD13)-kötődésének vizsgálatára a szubkután növekvő NeDe tumorokban, *in vivo* szervi megoszlási vizsgálatokat végeztünk 90 perccel injektálást követően 200 µg jelöletlen NOTA-c(NGR) blokkoló dózisának beadásával, illetve anélkül. A **22. ábrán** jól látható, hogy a jelöletlen NOTA-c(NGR) szignifikánsan ($p \le 0,01$) csökkentette a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) felvételét NeDe tumorokban (**22. ábra** B és C). A SUV értékeket (SUVátlag, SUVmax, T/M SUVátlag és T/M SUVmax) áttekintve megállapítható, hogy a radiofarmakon-halmozás a tumorokban hatékonyan blokkolható inaktív származék adagolásával (végső soron a specifikus aktivitás csökkentésével). A paraméterek számszerű csökkenése a következő: $0,35 \pm 0,22, 2,26 \pm 0,43, 2,50 \pm 0,39$ és 2,48 \pm 1,14. Mindezek a kísérleti bizonyítékok megerősítik, hogy a jelölt vegyület kötődése specifikusan a CD13-hoz kapcsolható *in vivo*.



22. ábra: Felső sor: Reprezentatív axiális miniPET képek azonos NeDe tumorról, 90 perccel a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) beadását követően és 12 nappal a NeDe sejtek szubkután injektálása után. A: normál felvétel, B: blokkolást követően (ld. 5.3.8.). Piros nyíl: tumor. C: *In vivo* radiofarmakon felvétel-adatok kvantitatív analízise (90 perccel injektálást követően) s.c. NeDe tumorokban ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) (n = 5) jelölt peptiddel készült normál és blokkolást követő (n = 6) kísérletekkel 12 ± 2 nappal a tumor sejtek szubkután injektálását követően. Szignifikancia szint: p ≤ 0,01 (*).

A miniPET felvételek elemzéséből nyert eredmények jól korreláltak az *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálatok eredményeivel, melyeket *s.c.* NeDe tumor-hordozó patkányok boncolásából nyertünk 90 perccel a radiofarmakon beadását követően. A tumorokban és az izomban (háttér) halmozott aktivitást gamma counter segítségével mértük és a DAR értékeket számoltuk. Az eredmények a **6. táblázatban** kerültek összegzésre.

Szerv/szövet	⁶⁸ Ga-NODAGA- [c(RGD)] ₂ (n=5)	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) (n=5)	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) blokkolt (n=6)
NeDe tumor (s.c.)	$0,34 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,08$	$0,07\pm0,02$
Tumor/izom	$3,66 \pm 1,23$	$7,42 \pm 2,27$	$1,23 \pm 0,06$

6. táblázat: Radiofarmakon felvétel (DAR) s.c. NeDe tumorok esetében az injektálást követő 90. percben

6.3.5. *In vivo* és *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálatok SRCA tumor modell esetében A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR), illetve a ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ radiojelölt peptidek bal vesetok alatt növekvő NeDe tumorokban való halmozását PET leképezéssel vetettük össze 90 perccel a radiofarmakon beadása után. Bomlás-korrigált reprezentatív koronális miniPET/CT képek a **23. ábrán** láthatóak. Mindkét radiofarmakonnal sikeresen jelenítettük meg a vese tok alatt növekvő NeDe tumorokat (**23. ábra** A és B). Szignifikáns különbséget SUV átlag tekintetében nem találtunk, a két radiofarmakon: ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR), illetve ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ esetében ugyanis a mért értékek 1,73 ± 0.39 illetve 1,31 ± 0.24 voltak. Ezzel szemben szignifikáns különbséget (p ≤ 0,01) találtunk a SUVmax és T/M SUVmax értékek tekintetében. A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) SUVmax és T/M SUVmax értéke 11,47 ± 1,37, illetve 12,47 ± 2,19 volt, mely értékek körülbelül kétszeresei a ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ esetében mért értékeknek (SUVmax, illetve T/M SUVmax: 4,96 ± 0,47, illetve 6,98 ± 0,55).



23. ábra: ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ illetve ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) *in vivo* szervi megoszlásának összehasonlítása 12 ± 2 nappal NeDe sejtek SRCA implantációját követően. Reprezentatív koronális miniPET/CT képek a vesetokban növekvő NeDe tumorokról (piros nyilak) 90 perccel ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ (A), illetve ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) (B) injektálását követően. C: Radiofarmakon-felvétel kvantitatív analízise NeDe tumorokban (n=6), szignifikancia szint: p ≤ 0,01 (*).

A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) CD13-specificitását vesetok alatt növekvő NeDe tumorok esetében is vizsgáltuk. Blokkolási kísérleteink során *in vivo* PET leképezést végeztünk 90 perccel a radiofarmakon beadása után, előzetes 200 µg NOTA-c(NGR) blokkoló dózisának beadásával, illetve nélküle. Közvetlenül a felvételek elkészülte után CT leképezéseket is készítettünk azonos ágypozícióban. Ahogyan az a **24. ábrán** látható, a jelöletlen NOTAc(NGR) csökkentette a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) felvételét NeDe tumorokban (**24. ábra** B és C). A miniPET képek kvantitatív analízise (**24. ábra** C) alapján pedig megállapítható, hogy a SUV értékek szignifikánsan ($p \le 0,01$) csökkentek (SUVátlag: 0,63 ± 0,22, SUVmax: 2,8 ± 0,42, T/M SUVátlag: 1,71 ± 0,24 illetve T/M SUVmax: 1,96 ± 0,56) jelöletlen NOTAc(NGR) injektálását követően, azaz a radiofarmakon halmozódását a tumorban az inaktív származék hatékonyan csökkenti.



24. ábra: Reprezentatív koronális miniPET/CT képek azonos NeDe tumorról 90 perccel ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) injektálását követően, 12 nappal a NeDe sejtek SRCA implantációja után. A: normál felvétel, B: blokkolás után (ld. 5.3.8.). C: Radiofarmakon-felvétel kvantitatív analízise NeDe tumorokban ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) peptiddel (n=5) összehasonlítva ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) felvétellel blokkolás után. Szignifikancia szint: p ≤ 0,01 (*).

Vesetok alatti NeDe tumort hordozó patkányok *ex vivo* szervi megoszlási adatait a **7. táblázat** tartalmazza. A patkányokat 90 perccel a radiofarmakon beadása után elaltattuk, majd boncoltuk. A tumorokban és izomban (háttér) halmozott aktivitást gamma counter segítségével mértük és a DAR értékeket számoltuk.

Szerv/szövet	⁶⁸ Ga-NODAGA- [c(RGD)] ₂ (n=5)	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) (n=5)	⁶⁸ Ga-NOTA-c(NGR) blokkolás után (n=6)
NeDe tumor (SRCA)	$0,54 \pm 0,08$	$0,63 \pm 0,18$	$0,\!18 \pm 0,\!06$
Tumor/izom	$4,39 \pm 0,46$	$6,49 \pm 0,21$	$1,70 \pm 0,22$

7. táblázat: Radiofarmakon-felvétel (DAR) SRCA NeDe tumorok esetében az injektálást követő 90. percben

6.3.6. In vivo és ex vivo szervi megoszlási vizsgálatok áttétek esetében

A NeDe sejtek bal vesetok alá történő beültetését követően két héttel metasztatikus nyirokcsomók voltak találhatóak a tumorhordozó patkányokban. Az állatok boncolása során tumoros beszűrődés volt felfedezhető az alhasi és a mellkasban található parathymális nyirokcsomókban (**25. ábra**).



25. ábra: ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) felvétel értékelése metasztatikus nyirokcsomókban 12 nappal az SRCA implantálást követően. A: kontroll parathymalis nyirokcsomó a mellkasban (fekete nyíl), B: metasztatikus parathymalis nyirokcsomó (kék nyíl), C: metasztatikus mesenterikus nyirokcsomó (fehér nyilak), D: reprezentatív axiális miniPET felvétel NeDe tumorhordozó patkányról 90 perccel ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) injektálását követően és 12 nappal a NeDe sejtek SRCA implantálása után (piros nyíl: primer NeDe tumor, szürke nyíl: jobb vese, fehér nyíl: metasztatikus mesenterikus nyirokcsomó, E: *Ex vivo* radiofarmakon felvétel (90 perccel injektálás után) kvantitatív analízise NeDe tumorokban ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) peptiddel (n=5) összehasonlítva ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) felvétellel blokkolás után (n = 6). Szignifikancia szint: p ≤ 0,01 (*).

A metasztatikus nyirokcsomók CD13 expresszióját western blot analízis is megerősítette (**26. ábra**), 90 perces inkubációs időt követően ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) halmozásukat *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálat során is mértük. Blokkolási kísérletekhez itt is 200 µg jelöletlen NOTAc(NGR)-t alkalmaztunk. A DAR értékek számítása során a metasztatikus mesenterikus (0,30 ± 0,18), illetve parathymalis nyirokcsomók (0.69 ± 0.24) esetén is magas ⁶⁸Ga-NOTAc(NGR) felvételt találtunk. A blokkolási kísérletek során a ⁶⁸Ga-jelölt radiofarmakon előtt 5 perccel beadott jelöletlen NOTA-c(NGR) hatékonyan blokkolta a nyirokcsomók jelölt-peptid felvételét, mely szintén megerősíti a CD13-kötő specificitást.



26. ábra: A vizsgált vesetumorok és nyirokcsomó-metasztázisok APN/CD13 expressziójának western blot analízise. Pozitív kontrollként patkány vesét alkalmaztunk. SRCA: Subrenal Capsule Assay-indukált tumor. s.c. szubkután tumor, mesen. ny.cs.: mesenterikus nyirokcsomó metasztázis, parath. ny.cs.: parathymalis nyirokcsomó metasztázis.

7. Megbeszélés

A dolgozatom alapjául szolgáló három kísérletsorozatot egymástól elkülönülő projektekként végeztük, melyek centrumában a ⁶⁸Ga – TACN-vázas kelátorok alkalmazását helyeztük., Az aktuális feladatok tervezése során azonban több szempontot is figyelembe kellett vennünk, ezért az egyes projektekben használt kelátorok változatossága:

- Az első kísérletsorozatban egy, az irodalomban származékaival együtt rendkívül jól körbejárt makrociklusos kelátort – NOTA, illetve egy újabb, azzal analóg szerkezetű, de más szubsztituenseinek köszönhetően megnövekedett jelölési hatékonysággal rendelkező szintén makrociklusos kelátort – NOPO, mint egy skála két végpontját igyekeztünk szubsztituensek alapján köztesnek tekinthető kelátorokkal (NOPA, NO2AP) összevetni és ez alapján lehetséges szerkezet-hatékonyság összefüggéseket találni. Ezen "köztes" kelátorok szintézisét prágai kooperációs partnereink végezték korábbi vizsgálataik során, így a kísérleteinkhez szükséges mennyiségben közvetlenül tőlük tudtuk beszerezni.

- A második kísérletsorozat célja annak vizsgálata volt, hogy mikrofluid körülmények között képesek vagyunk-e ilyen jelöléseket végezni. Itt az előbb említettel azonos végpontokat választottunk ki (NOTA, NOPO), mivel eltérő jelölési eredményekre voltunk felkészülve az irodalmi és saját, korábbi manuális méréseink alapján. Mivel itt nem szerkezetjelölési hatékonyság összehasonlítás volt a kísérletsorozat célja, hanem elsősorban a módszertant igyekeztünk vizsgálni, ezért ezen projekt során nem szándékoztuk a vizsgálandó kelátorszámot növelni, újabb kelárotok (pl. az említett NOPA, NO2AP) bevonásával.

- A harmadik kísérletsorozatban a peptideknél konjugálásához alkalmazott kelátornál érdemes megemlíteni, hogy bár mindkét előző kísérletsorozatban a NOPO, illetve NOPO-RGD kiváló jelölési sajátságokat mutatott, azonban szerves kémiai szintézishez - amely a kisállat PET leképezéshez szükséges prekurzor alapjául szolgálhatott volna – a megfelelő mennyiségben nem állt rendelkezésünkre (szintézisét müncheni kooperációs partnereink végezték és bocsátották rendelkezésünkre a korábban tárgyalt kísérleteinkhez elégséges mennyiségben). A vizsgálat peptidszármazékok esetében leírt NOTA – NODAGA cserének olyan gyakorlati oka volt, hogy a referenciaként alkalmazott NODAGA konjugált peptid kereskedelmi forgalomban kapható volt. Fontos kiemelni, hogy az összehasonlítás során a kelátor cseréje szinte elhanyagolhatónak tűnik, hiszen sokkal jelentősebb változtatások történtek, egyrészt, hogy az RGD szekvencia más molekuláris célpontra specifikus, mint az NGR, ráadásul előbbiből egy dimerizált változatot szereztünk be. A közös bennük mindössze, hogy potenciálisan angiogenetikus folyamatok kimutatására lehetnek alkalmasak. Az általunk előállított, komplexképzésre is alkalmas peptidszármazék esetében viszont nagyon egyszerű és hatékony kapcsolást tudtunk végezni a *p*-SCN-Bn-NOTA segítségével is, ami ráadásul a laboratóriumunk készletében már megtalálható volt. Mind a NODAGA, mind az általunk végzett konjugációban alkalmazott *p*-SCN-Bn-NOTA, a NOTA jól konjugálható szerkezeti analógjai, ahol az előállított peptidben gyakorlatilag egy NOTA kelátor végzi a ⁶⁸Ga-mal történő kelátképzést. Ez utóbbi projektben elsősorban a cNGR – peptid ⁶⁸Ga-mal történő PET leképezésére és annak RGD-származékkal történő összevetésére koncentráltunk, így itt ezért nem történt további kelátor bevonása a projektbe.

7.1.Foszfin- és karboxil-csoportokkal eltérően szubsztituált TACN-vázas kelátorok ⁶⁸Ga-jelölési sajátságainak összehasonlító vizsgálata

A projekt során analóg szerkezetű 1,4,7-triazaciklononán vázzal rendelkező, eltérően Nszubsztituált kelátorsorozat összehasonlító vizsgálatát végeztük. Kiindulási sorozatként pH 3 értéknél 95 és 25 °C-on végeztük a méréseket. A szerkezeti hasonlóság, várakozásunknak megfelelően a vegyületek jelölési sajátságaiban is tükröződött, így hasonló alakú görbe ábrázolódott (13. ábra) a vizsgált NOTA, NOPA, NO2AP és NOPO vegyületekre. A szobahőmérsékleten végzett jelöléseknél magasabb ligand-koncentráció volt szükséges a kvantitatív jelölések végrehajtásához, mint emelt hőmérsékleten. Utóbbi vizsgálat- sorozatnál a NOPO minden esetben jobb jelölési sajátságokkal rendelkezett a kevert szubsztituensekkel rendelkező ligandokhoz és a NOTA-hoz képest. Érdekes módon egyetlen karboxil-donor jelenléte a NOPA esetében nem befolyásolja jelentősen a jelölési teljesítményt pH 3 értéknél a NOPO-val való összehasonlítás során. Hasonló módon, a monofoszfin-ligand NO2AP inkább a NOTA-hoz hasonló reakciókészséget mutatott 95 °C-on. Azonban 25 °C-on a NO2AP a NOTA-nál már jobb jelölési hatékonysággal rendelkezett, habár itt az elérhető maximális radiokémiai tisztaság nem haladta meg a 90%-ot még viszonylag magas kelátorkoncentrációknál sem. Összességében, a legnagyobb lépcsőt jelölési effektivitás tekintetében az egy vagy két karboxil-, illetve foszfin-csoporttal rendelkező kelátorok esetén mértünk. A NOPA, illetve a NO2AP jelölhetőségét az 50%-os aktivitás-kötési értéknél összevetve, mindkét hőmérsékletnél háromszor magasabb hatékonyságot találunk a NOPA esetében. A NOPO és a NOTA esetében ugyanez a különbség tízszeres.

Mivel minden vizsgált vegyület esetében közel kvantitatív jelölési hatékonyságot találtunk 95 °C-on végzett reakciók esetén 3 µM, illetve 25 °C-on végzett reakciók esetén 30 µM ligandkoncentráció értékeknél (5 perc reakcióidő mellett), ezért ezeket az értékeket
választottuk további vizsgálatainkhoz, mely során a reakcióelegy pH-változásának hatását mértük a jelölés hatékonyságára (**14. ábra**). 95 °C-on végezve reakcióinkat, a különböző pHértékeknél megfigyelhető, hogy a foszfin-tartalmú szubsztituensek számának növekedésével a foszfin-csoport erősebben savas jellegéből adódóan már alacsonyabb pH mellett is teljes mértékű komplex-képződést találunk. Ez összhangban van korábbi mérésekkel [80], a NOPOt akár még 0,5 pH-értéknél is lehetséges kvantitatívan jelölni. Ezzel szemben a NOTA jobb teljesítménnyel rendelkezik a semleges illetve enyhén savas értékek tartományában, azonban 8-as pH érték felett már egyik vegyület sem volt jelölhető.

Szobahőmérsékleten a kelátorok kvantitatív jelölhetősége jóval keskenyebb pH-sávban volt lehetséges a kiválasztott koncentrációnál (**14. ábra**). NOPO esetében ugyan kismértékű jelölhetőséget találtunk alacsonyabb pH mellett is, azonban minden alkalmazott kelátorunkra igaz, hogy a 3 és 4 pH értékek között mértük az optimumot. NO2AP esetében 90% fölötti értéket itt sem találtunk, míg a másik két kelátor itt kvantitatív ⁶⁸Ga-jelölést mutatott. 4-es pH-érték fölött a NOPO jelölési hatékonysága meredekebben csökkent szobahőmérsékleten a pH növelésével, mint más ligandok esetében. Ezzel szemben - a 95 °C-on végzett jelölésekhez hasonlóan - a NOTA jobb jelölhetőséget mutatott a többi vizsgált vegyülethez képest pH 4 és 7 között, pH 4-es optimumal.

Összességében, a radiojelölési vizsgálatokkal szerzett adatok összhangban vannak a TRAPligandokkal kapcsolatos korábbi mérések eredményeivel [62;80]. A foszfintartalmú TACNszármazékok nagyobb gallium(III) szelektivitásának köszönhetően alacsonyabb ligandkoncentráció is elegendő a hatékony radiojelöléshez a foszfin-szubsztituensek számának növelésével. Hasonló tendencia volt tapasztalható egy diacetát-foszfin TACN-származék esetében – a $CH_2CH_2(PO_3H_2)$ csoporttal. Több foszfin-csoportot tartalmazó szubsztituens eredményesebb ⁶⁸Ga-jelölést tesz lehetővé azonos ligandum-koncentráció esetében, valamint a savasabb oldatokban is használható, hiszen az oldallánc savi disszociációs állandója kisebb. Másrészről a karboxil-tartalmú oldalláncokkal rendelkező ligandok alkalmasabbnak bizonyulnak ⁶⁸Ga jelölésre pH > 4-5 esetén. Ezt okozhatja a hidroxid anionnal való kompetíció, hiszen a Ga-NOTA komplex a rendelkezésre álló adatok alapján stabilabb, mint a Ga-NOPO komplex (logK_{GaL}(NOPO) = 25.0; logK_{GaL}(NOTA) = 29.6), így a stabilitás növekedése esetén a pH emelkedése kevésbé befolyásolja a komplexképző sajátságokat [92;134].

7.2.68 Ga-kelátorok komplexképzési reakcióinak mikrofluidikai optimalizálása

Kísérleteink során folyamatos folyadék-áramlásos (MCS) mikrofluid módszert alkalmaztunk, ahol PEEK-kapilláris szolgált nem-konvencionális reaktorként ⁶⁸Ga-jelölt radiofarmakonok hozzáadott hordozó nélküli szintéziséhez, szemben a 3.3. fejezetben említett irodalomból ismeretes kísérletsorozatokkal [110;111], ahol batch alapú (MVS) szintéziseket végeztek. A reaktorcsövet légtermosztátban tekercseltük fel a megfelelő hőmérsékletszabályozás érdekében. A rendszer tesztelésére szolgáló vegyületekként NOTA és NOPO kelátorokat választottunk, hiszen ezen kelátorok ⁶⁸Ga-jelölési sajátságai már jól ismertek. Reakcióink online analitikai értékelése érdekében új HPLC módszert alkalmaztunk a jelölt kelátorok és a "szabad" Ga-68 elválasztására. Mikrofluid jelölési módszerünk eredményét hagyományos, manuális szintézisek eredményével vetettük össze. A két módszer nagyon alacsony NOPO koncentráció mellett eredményezett kismértékű eltérést, azonban ezt a különbséget elfogadtuk, mint mérési határérték közelében jelentkező különbséget, egyéb pontokon a két módszerrel kapott eredményeink megfeleltethetőek egymásnak.

Az összeállított, folyamatos-folyadékáramlásos mikrofluid rendszer további tesztelése a készülék nagy teljesítőképességének és automata működésének kihasználásával történt. NOTA és NOPO kelátorok jelölési sajátságait automatikus ciklusokban végrehajtott mikrofluid reakciók sorozatával végeztük a reakciókörülmények széles skáláján: 0,01 - 100 μM ligand-koncentráció és 1-9 pH; 95 °C rendszerhőmérséklet és 5 perc reakcióidő alkalmazása mellett.

A kelátorral kapcsolatban megjelent korábbi publikációkkal összhangban, a NOPO foszfinsav tartalmú szubsztituenseinek köszönhetően a NOTA kelátorhoz viszonyítva kedvezőbb jelölési sajátságokat mutat. Ez tapasztalható volt mind a kvantitatív jelölés eléréséhez szükséges legalacsonyabb kelátor-koncentráció, mind pedig azon pH-tartomány tekintetében, ahol RCP ≥95% reakcióelegyeket találhattunk a vizsgált körülmények között. Még a rendkívül savas 1 és 2 pH értékeknél is jelentős komplexképzési sajátságot tapasztaltunk a ⁶⁸Ga-radionukliddal.

A reaktorként alkalmazott PEEK kapillárist számos más radiokémiai rendszerben sikerrel alkalmazták már, mivel savas, bázikus körülményekkel, szerves oldószerekkel és magas hőmérséklettel (134 °C-ig) szemben kompatibilis. Ennek megfelelően, az organikus polimer PEEK-kel kapcsolatosan nem vártunk jelentős reakciókészséget a ⁶⁸Ga-jelölési reakcióink során alkalmazott reagensekkel. A ⁶⁸Ga-radionuklid-retenciós vizsgálataink során mégis egy

érdekes visszatartási mintázatot találtunk. A rendszerben hozzáadott kelátor nélkül a jelölési reakcióknak megfelelően pufferelt ⁶⁸Ga-oldatot áramoltatva pH 3 és 7 között jelentős aktivitás-maradványt mértünk. Ebben a pH-tartományban az összetételtől függően a vizes oldatban lévő gallium különböző hidroxo-komplexeket képez [Ga(OH)_n], mely folyamat egyre meghatározóbbá válik az oldat pH-jának emelésével, de ez nem magyarázza az általunk tapasztalt jelenséget. Ezzel szemben a retencióért felelős lehet egy másik feltételezett komplexképző, a jelölési reakciók puffereléséért felelős HEPES, melyről a szakirodalom is feltételezi [136], hogy gyenge komplexet képez Ga(III)(aq.)-mal és szerves molekula révén, nagyobb adszorpciós affinitást mutathat PEEK-cső falához (melytől kémiai szerkezetéből adódóan elsősorban inert, hidrofób sajátságokat feltételezhetünk), mint vizes Ga(III)(aq.) esetében. Mivel a pH csökkenésével kisebb a hidroxo-komplexek részesedési aránya, ez teret adhat a HEPES-kompex növekedésének, ami magyarázatul szolgálhat az általunk megfigyelt jelenségre. Mindemellett – és kicsit alátámasztva az előbbi hipotézisünket - a 3,0-s pH érték jelentős szerepe figyelhető meg a jelenlegi jelölések során, mivel a legmagasabb jelölési hatékonyságot a legalacsonyabb szükséges ligand-koncentrációval 3,0-s pH értéknél találtuk mindkét vizsgált vegyület esetében, mely akár eredhet egy gyenge HEPES-Ga-komplex-szel történő könnyebb reakcióból a különböző gallium-hidroxokomplexekhez képest.

A fentieken kívül, a mikrofluid rendszerrel a multiparametrikus jelölési vizsgálatok eredményei alapján teszt-szintéziseket végeztünk, ahol szintén vizsgáltuk az aktivitásretenciót a kapillárisban különböző kelátorok/kelátor-peptid konjugátumok jelenlétében. Ezeknél a méréseknél a szintézis paramétereinek kialakítása során szempont volt a megfelelő robosztusság elérése is, mivel az áramló rendszerben a reakcióelegy hordozófolyadékkal történő hígulása feltételezhető. Ennek megfelelően NOTA esetében 10 µM, NOPO esetében 1 µM kelátor-koncentrációval pH 3,0 értéknél végeztük ezeket a vizsgálatainkat, mivel ezek a pontok legalább egy lépcsővel feljebb találhatóak a kvantitatív jelöléshez szükséges legalacsonyabb ligand-koncentrációnál és a környező pH tartományban is még RCP ≥95% található. Így a végtermék minőséget a hordozófolyadékkal történő kétszeres hígítás sem befolyásolhatja. Sőt, a kísérletekhez választott 3,0 pH-érték, megfelelő a korábbiakban megfigyelt radionuklid-visszatartás jelölési reakciókra gyakorolt hatásának vizsgálatára is. Mind kelátorok, mind pedig azok analóg-konjugátuma esetében azonos а reakciókörülményeket alkalmaztunk.

Sikeres szintéziseket végeztünk NOTA, NOPO és RGD-peptid-konjugátumaik; NODAGAc(RGD)₂ és NOPO-RGD, mint keláló ágensek használatával, továbbá a vizsgált vegyületek jelenlétében elhanyagolható mértékű (<5%) aktivitás-retenciót tapasztaltunk.

7.3.⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) szintézise és alkalmazása Aminopeptidáz N (CD13) receptorok *in viv*o leképezésére

Munkánk során a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR), mint új, ciklikus peptidmotívumot tartalmazó radiofarmakon szintézisét és értékelését végeztük kísérletes tumormodell APN expressziójának kimutatására.

A ciklikus NGR peptid (c[KNGRE]-NH₂) előállítását Negussie és mtsai [137] írták le először, mely során a ciklikus peptid cikluszárását a gyantán végezték. Mi egy hatékony, alternatív szintetikus útvonalat választottunk ugyanezen peptid előállítására. A lineáris védett peptidet (Boc-Lys(ClZ)-Asn(Trt)-Gly-Arg(Pbf)-Glu(OtBu)-R) Fmoc/*t*Bu standard stratégiával építettünk fel, melyet a védőcsoportok részleges eltávolítása és a részlegesen védett peptid (H-Lys(ClZ)-Asn-Gly-Arg-Glu-NH₂) gyantáról való lehasítása követett TFA-val. Az Nterminális amino-csoport és a glutaminsav y-karboxil-csoportja közötti amid-kötés kialakítását DMF oldatban, kapcsolószer hozzáadásával végeztük. A ClZ védőcsoport folyékony HF-dal távolítottuk el, előzetesen a részlegesen védett ciklikus peptidet RP-HPLCn tisztítottuk. A ciklikus NGR peptid előállítását így olyan formában tudtuk végezni, hogy a szintézis egyetlen lépése során sem tapasztaltunk deamidálást szukcinimid gyűrűzáráson keresztül. Következő lépésként, a tiszta c[KNGRE]-NH₂ peptidet sikeresen konjugáltuk p-SCN-Bn-NOTA-val, majd az így kialakult NOTA-c(NGR) már egyszerűen jelölhető volt ⁶⁸Ga-izotóppal 95% < radiokémiai tisztasággal és 5.13–5.92 GBq/µmol specifikus aktivitással egy a Wängler és mtsai által leírt [126] protokoll alapján kidolgozott jelölési eljárással. A referencia-vegyületként használt ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ jelölését Notni és mtsai [80] leírása alapján végeztük.

A ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) peptiddel végzett *in vitro* vizsgálataink alapján az előállított radiofarmakon erősen hidrofil (log P = -2.77 ± 0.12), illetve méréseink alapján stabil mind PBS-ben emelt hőmérsékleten (T = 95°C) több, mint 1 órán keresztül, illetve két óráig patkányszérumban 37°C-on történő inkubálás mellett. Ezek alapján a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) alkalmas molekulának bizonyult a biológiai vizsgálataink elvégzésére.

A kontroll állatokon végzett *ex vivo* és *in vivo* szervi megoszlási vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a vizsgált ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) főleg a vesén keresztül kerül

kiválasztásra, mely összhangban van a mért, erősen hidrofil jellegre utaló partíciós koefficienssel. Másrészről a radiofarmakon felvétele más szervekben, különösen a hasüregben, nagyon alacsony, szemben a ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂-vel, ahol a hasüregi szervekben (máj, lép, belek) jelentősebb mértékű radiofarmakon-felvételt tapasztaltunk 90 perc inkubációs időt követően (**20. ábra**). Ez a ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂-hez képest kismértékű hasüregi halmozás jól korrelál más tanulmányokkal, ahol a ⁶⁸Ga-DOTA-NGR [125], illetve a ⁶⁸Ga-NOTA-NGR [138;139] szervi megoszlását vizsgálták. Továbbá, az egyes szervek alacsony aktivitása magasabb minőségű leképezést tesz lehetővé az alacsony háttérnek és a magas elérhető tumor/izom aránynak köszönhetően.

Ezt követően, ebben a projektben a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR), mint angiogenezis-marker tumorspecifikus halmozását hasonlítottuk össze az $\alpha_{v}\beta_{3}$ -integrin receptor specifikus ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]2-ével [42] két, különböző állatmodellen. Vizsgálatainkhoz két különböző, nephroblastoma (NeDe) tumor sejtek segítségével kialakított tumormodell APN/CD13 expresszióját teszteltük. A tumormodellek kialakítása során egyrészt helyi tumorképzést indukáltunk a sejtek szubkután injektálásával, másrészt a NeDe tumoros sejtvonal SRCA implantálásával. A két különböző modellel készült vizsgálatok összevetésekor azt találtuk, hogy mindkét alkalmazott radiofarmakon esetében magasabb halmozás tapasztalható a primer tumorokban az SRCA modell esetében (ld. 6. és 7. táblázatok), mely különbség a tumorsejt implantálás helyéből ered. Primer tumorok indukciójának legáltalánosabban elterjedt módszere a rákos sejtek szubkután injektálása. Ennél a típusú, ektopikus beültetésnél azonban hiányoznak az ortotopikus szöveti mikrokörülmények. A tumornövekedés és vaszkularizáció jóval intenzívebb abban az esetben, ha a tumorsejtek beültetése ortotopikus helyre (pl. vese tumorok a vese vagy vesetok alatti térbe) történik, így a kedvező mikrokörnyezet elősegíti a magasabb angiogén marker expressziót, illetve a tumorsejt-proliferációt és a metasztázisok kialakulását [140].

A SUVátlag értekek ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) esetében relatíve magasabbak a primer tumorokban (szubkután növekvő NeDe tumor **21. ábra** és bal vesénél növekvő tumor **23. ábra**), mint a ⁶⁸Ga-NODAGA-[c(RGD)]₂ felvétele, és ez a különbség szignifikáns ($p \le 0,01$) SUVmax és T/M arányok esetében az injektálást követő 90. percen. Érdekes módon Shao és mtsai [139] nem találtak szignifikáns különbséget a T/M arányokban az NGR- és RGD-alapú radiofarmkonok között HT-1080 tumorokban. Ezzel szemben az általunk vizsgált modellben a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) magában hordozza annak lehetőségét, hogy akár még a dimer-RGD

alapú radiofarmkonoknál is magasabb halmozást mutasson, mely különbség a ciklikus NGR peptid eltérő molekuláris célpontjának expressziós többletéből eredhet.

Jelöletlen NOTA-c(NGR)-rel történő blokkolást követően a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) felvétele szignifikánsan ($p \le 0,01$) csökkent mind a két primer tumorban. Más, korábbi humán xenograft tumorokkal és ⁶⁸Ga-jelölt NGR-konjugátumokkal végzett [125;138;139] vizsgálatokhoz hasonlóan, esetünkben is a sikeres blokkolás a ⁶⁸Ga-jelölt NOTA-c(NGR) specifikus APN/CD13 kötődésre utal, melynek jelenlétét a NeDe tumorok és metasztázisok esetében western blot vizsgálataink is igazolták. (**26. ábra**).

Az angiogenezis a metasztázis létrejöttéhez kapcsolódó többlépcsős folyamat egyik előfeltétele, mely során a rákos sejt a primer tumor helyéről távoli helyre vándorol [141]. Az APN/CD13 szerepet játszik ebben a folyamatban, ugyanis növeli a rákos sejtek invazivitását és metasztázisképzési hajlamát [142], illetve a malignus sejtek vándorlását az extracelluláris mátrix bontásával is elősegítheti [143]. Jelen projektünkben egy szingénikus állatmodellt [128] használtunk az APN/CD13 expresszió ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR)-rel történő vizsgálatára nem csak primer tumorokban, hanem metasztatikus nyirokcsomókban is. A NeDe tumor sejtek bal vesetok alá történő implantációja a thoracalis parathymalis (PTN) és a mesenterális nyirokcsomókban tumor metasztázis kialakulását generálja. *Ex vivo* vizsgálataink alapján az APN/CD13 receptor-specifikus halmozás metasztatikus nyirokcsomókban is tapasztaltható ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR), mint radiofarmakon alkalmazásával. Ez alapján az újonnan szintetizált ⁶⁸Ga-jelölt NOTA-c(NGR) ígéretes nyomjelző lehet metasztázisok kimutatására is.

8. Összefoglalás

A gallium-68 radioizotóp egy generátorból nyerhető pozitron-forrás, mely lehetőséget teremt PET-radiofarmakonok gyors, hatékony, a jövőben akár kit alapon történő előállítására is, ugyanis fémes tulajdonságainak köszönhetően kelátor-alegységen keresztül biológiai vektorok széles skálája jelölhető vele. Vizsgálataink során a nukleáris medicinában egyre nagyobb jelentőséggel rendelkező ⁶⁸Ga-jelölt komplexek szintézisével, karakterizálásával és preklinikai szinten történő felhasználásával foglalkoztunk.

⁶⁸Ga-PET-radiogyógyszerek előállítása során meghatározó szerepe van a radioizotóppal komplexet képző kelátor-alegység kémiai sajátságainak. Egyik kísérletsorozatunk során TACN-alapú kelátorok összehasonlító radioanalitikai vizsgálatát végeztük el, mely alapján megállapítható, hogy legalább két foszfin-tartalmú szubsztituens elengedhetetlen a TRAPtípusú kelátorok esetében ismert rendkívüli nagyhatékonyságú komplexképzéshez ⁶⁸Gaizotóppal. Ennek megfelelően a TRAP mintázat egy foszfin-csoportja cserélhető egyéb donorra. Karboxil-csoportok jelenléte a semleges és gyengén savas pH-n segíti a komplexképzést. Ezekkel a szerkezet-komplexképzési sajátosság összefüggésekkel a jövő kelátorainak tervezését igyekeztünk segíteni.

Az előzőekben ismertetett karakterizálásra az irodalomban elsősorban kézi jelöléseket használnak, amelyek azonban csak lassú, nehezen reprodukálható mérési eredményekkel és viszonylag magas felhasznált anyagmennyiséggel végezhetőek. Ezzel szemben mikrofluidikával kapcsolatos kutatási projektünk megvalósítása során sikeresen teszteltünk egy olyan, általunk előállított mikrofluid rendszert, amely képes ⁶⁸Ga-jelölési reakciók automata elvégzésére és analízisére. A rendszer használatával lehetőségünk nyílt makrociklusos kelátorok radiojelzési hatékonyságának széleskörű jellemzésére is automatizált módon, továbbá demonstráltuk, hogy folyamatos áramlásos mikrofluid rendszerben lehetséges ⁶⁸Ga-jelölések végrehajtása kiváló radiokémiai tisztasággal (95%<), illetve jelentős aktivitás retenció nélkül (<5%).

További vizsgálataink során magas radiokémiai tisztasággal és stabilitással állítottunk elő egy új, ⁶⁸Ga-jelölt radiofarmakon-készítményt, a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR)-t, melyet APN/CD13+ NeDe sejtvonallal létrehozott szingénikus kisállat-tumormodell segítségével teszteltünk tumorok és metasztázisok kimutatására sikeresen.

9. Summary

Radioisotope gallium-68 is a positron-source, which is available from generator, which makes quick, efficient and in the future even kit-based synthesis of PET-radiopharmaceuticals possible, as due to its metallic properties a wide scale of biological vectors can be labelled with it using a chelator moiety. Our experiments focused on the synthesis, characterization and preclinical application of ⁶⁸Ga-labelled complexes as they are gaining increasing relevance in nuclear medicine.

Chemical properties of the chelator moiety have a determinative role during the synthesis of ⁶⁸Ga-PET-radiopharmaceuticals. During one of our series of experiments we performed the comparative radioanalytical examination of TACN-based chelators, based on which two substituents containing is essential for the excellent ⁶⁸Ga-complex-formation efficiency described by TRAP-type chelators, therefore one of the phosphinic group of the TRAP pattern can be changed to other donor. The presence of carboxyclic group can help complex-formation at neutral and mildly acidic pHs, with these structure-complex-formation property relationships we intend to help the planning of the chelators of the future.

For the previously described characterisation, primarily manual labellings are used in the literature, which however is slow, can be hard to reproduce and can be produced with relatively high amount of substance. Contrarily, we successfully tested such a microfluidic system during our research project related to microfluidics, which is suitable for performing and analysing ⁶⁸Ga-labelling reactions automatically. We were able to provide complete characterization of radiolabelling efficiency of macrocyclic chelators in an automated manner, furthermore we demonstrated that it is possible to performe ⁶⁸Ga-labellings in a continuous-flow microfluidic system with an excellent radiochemical purity (95%<) without significant activity retention (<5%).

In our further studies, we synthesized a new, ⁶⁸Ga-labelled radiopharmaceutical, the ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) with high radiochemical purity and stability, which we tested with APN/CD13+ NeDe cell line and syngeneic small animal tumour model for the detection of tumours and metastases successfully.

10. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni Prof. Dr. Berényi Ervin jelenlegi, Dr. Varga József és Prof. Dr. Galuska László korábbi igazgatóknak, hogy doktori értekezésem elkészítését lehetővé tették a Nukleáris Medicina Intézetben.

Hálás köszönettel tartozom Prof. Dr. Galuska László témavezetőmnek és Dr. Kertész István csoportvezetőmnek, akik a doktori munkám kezdete óta törekedtek arra, hogy minél jobban elsajátítsam a tudományos gondolkodás és megértés módszereit.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Nukleáris Medicina Intézet Radiokémiai Központ és Gyógyszerészeti Minőségbiztosítási Csoport minden kollégájának, akik támogatták és inspirálták a munkámat, biztosították a szükséges technikai és szakmai segítséget a projektek elvégzése során felmerülő kérdésekben. Külön köszönöm Dr. Szikra Dezsőnek, a Radiokémiai Központ kollégájának a mikrofluidikai projekt sikeressége érdekében tett erőfeszítéseit.

Köszönet illeti az Intézet Radiobiológia kutatócsoportját, a biológiai mérésekben és azok eredményének értelmezésében nyújtott segítségükért, külön köszönöm Dr. Trencsényi György segítségét a ⁶⁸Ga-NOTA-c(NGR) farmakon vizsgálatával kapcsolatos vizsgálatsorozat során.

Köszönöm továbbá a DE KK Nukleáris Medicina Intézet minden munkatárásának folyamatos támogatásukat, segítségüket.

Hálával tartozom még az egyetemen belüli és kívüli kooperációs partnereink munkájáért, az MTA ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport (c(KNGRE)-NH₂ szintézise), DE Parodontológiai Tanszék (CBCT vizsgálatok), DE Élettani Intézet (western blot vizsgálat), TUM Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie (NOPO szintézise) és a Charles University in Prague Department of Inorganic Chemistry (NOPA, NO2AP szintézise) kollégáinak, mert hozzáadott szaktudásuk, szakértelmük elengedhetetlen segítséget jelentett kutatásaink kivitelezésében, értékelésében.

Végül, de nem utolsó sorban külön köszönöm feleségemnek, családomnak, akik megteremtették azt a biztos magánéleti hátteret, mely nélkülözhetetlen volt doktori munkám elvégzéséhez.

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

11.Tárgyszavak

Pozitron emissziós tomográfia; fém-komplexek; makrociklusos liganok; radiofarmakonok; TACN-származékok; foszfin-komplexek; gallium-68 izotóp; gallium komplexek; radiojelölés; PET radiofarmakon-fejlesztés; molekuláris képalkotás

Keywords:

Positron emission tomography; metal complexes; macrocyclic ligands; radiopharmaceuticals; TACN derivative; phosphinate complexes; gallium-68 isotope; gallium complexes; radiolabelling; PET tracer development; molecular imaging

12. Irodalomjegyzék

[1] Delbeke, D., Martin, W.H., Patton, J.A. et al.: Practical FDG Imaging: A Teaching File. Springer-Verlag NewYork, **2002**

- [2] Velikyan, I. Theranostics, 2012, 2(5), 424-426
- [3] Oberg, K. Theranostics, 2012, 2(5), 448-458
- [4] Mankoff, D.A. J Nucl Med, 2007, 48(6), 18N, 21N
- [5] Galuska, L. LAM, 2005, 15(10), 753-757
- [6] Wernick, M.N., Aarsvold, J.N.: Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT.. Academic Press, **2004**
- [7] van der Veldt, A.A.M., Smit, E.F., Lammertsma, A.A. Front Oncol, 2013, 3, 208
- [8] Weissleder, R., Pittet, M.J. Nature, 2008, 452, 580-589
- [9] Bockisch, A., Freudenberg, L.S., Schmidt, D. et al. Semin Nucl Med, 2009, 39, 276-289
- [10] Sauter, A.W., Wehrl, H.F., Kolb, A. Trends Mol Med, 2010, 16, 508-515
- [11] Gaertner, F.C., Fürst, S., Schwaiger, M. Cancer Imaging, 2013, 13, 36-52

[12] http://www3.gehealthcare.in/en/products/categories/pet-ct/pet-ct-scanners/optima-pet-ct-560 Utoljára letöltve: 2016. december 30.

- [13] http://www.jupitermed.com/pet-ct Utoljára letöltve: 2016. december 30
- [14] Hicks, R.J., Hofman, M.S. Nat Rev Clin Oncol, 2012, 12, 712-720
- [15] Holland, J.P., Cumming, P., Vasdev, J. J Nucl Med, 2012, 53, 1333-1336
- [16] Rischpler, C., Nekolla, S., Schwaiger, M. Curr Cardiol Rep, 2013, 15, 337-348
- [17] McArdle, B.A., Dowsley, T.D., de Kemp, R.A. J Am Coll Cardiol, 2012, 60, 1828-1837
- [18] Torosyan, N., Silmerman, D.H. Semin Nucl Med, 2012, 42, 415-422
- [19] Murray, A.D. Am J Neuroradiol, 2012, 33, 1836-1844
- [20] Smith, S.V. J Inorg Biochem, 2004, 98, 1874-1901

- [21] Zimmermann, R.G. Nucl Med Biol, 2013, 40, 155-166
- [22] Ter-Pogossian, M.M., Phelps, M.E., Hoffman, E.J. et al. Radiology, 1975, 114, 89-98

[23] Welch, M.J., Redvanly, C.S.: Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications. Wiley, New York, **2003**

- [24] Hara, T., Kosaka, N., Kishi, H. J Nucl Med, 1998, 39, 90-99
- [25] Mathis, C.A., Wang, Y., Holt, D.P. et al. J Med Chem, 2003, 46, 2740-2754
- [26] Jager, P.L., Vaalburg, W., Pruim, J. et al. J Nucl Med, 2001, 42, 432-445
- [27] Hutchins, G.H. Cardiology, 1997, 88, 106-115
- [28] Schwaiger, M., Muzik, O. Am J Cardiol, 1991, 67, 35D-43D
- [29] Würchmid, F., Petersen, C., Wahl, A. et al. Radiat Oncol, 2011, 6, 44
- [30] Romano, M., Buratti, E. Drugs Today, 2013, 49, 181-193
- [31] Ido, T., Wan, C.N., Casella, V. J Labelled Compd Radiopharm, 1978, 24, 174-183
- [32] Rohren, E.M., Turkington, T.G., Coleman, R.E. Radiology, 2004, 231, 305-332
- [33] Jerabek, P.A., Patrick, T.B., Kilbourn, M.R. et al. *Int J Rad Appl Instrum*, **1986**, *37*, 599-605
- [34] Rasey, J.S., Grierson, J.R., Wiens, L.W. et al. J Nucl Med, 2002, 43, 1210-1217
- [35] Dunet, V., Rossier, C., Buck, A. et al. J Nucl Med, 2012, 53, 207-214
- [36] Wong, K.K., Piert, M. J Nucl Med, 2013, 54, 590-599
- [37] Kraeber-Bodéré, F., Berbet, J. Front Med, 2014, 1, 42430
- [38] Haubner, R., Wester, H.J., Weber, W.A. et al. Cancer Res, 2001, 61, 1781-1785
- [39] Haubner, R., Kuhnast, B., Mang, C. et al. Bioconjugate Chem, 2004, 15, 61-69
- [40] Beer, A.J., Niemeyer, M., Carlsen, J. et al. J Nucl Med, 2008, 49, 255-259
- [41] Beer, A.J., Haubner, R., Goebel, M. et al. J Nucl Med, 2005, 46, 1333-1341
- [42] Pohle, K., Notni, J., Bussemer, J. et al. Nucl Med Biol, 2012, 39, 777-784

[43] Hernandez, R., Valdovinos, H.F., Yang, Y. et al. *Mol Pharmaceutics*, **2014**, *11*, 2954-2961

[44] Domnanich, K.A., Müller, C., Farkas, R. et al. EJNNMI Radiopahrm Chem, 2016, 1, 8

[45] Anderson, C.J., Ferdani, R. Cancer Biother Radiopharm, 2009, 24(4), 379-393

[46] Yang, J., Kan, Y., Ge, B.H. et al. Acta Radiol, 2014, 55(4), 389-398

[47] Gourni, E., Demmer, O., Schottelius, M. et al. J Nucl Med, 2011, 52, 1803-1810

[48] Eder, M., Schafer, M., Buder-Wüst, U. et al. Bioconjugate Chem, 2012, 23, 688-697

[49] deKemp, R.A., Renaud, J.M., Klein, R. et al. Cardiol Clin, 2016, 34, 37-46

[50] Dijkers, E.C.F., Munnink, T.O., Kosterink, J.G.W. et al. *Clin Pharmacol Ther*, **2010**, *87*(5), 586-592

[51] Sanchez-Crespo, A., Andreo, P., Larsson, S.A. Eur J Nucl Med Mol Imagin, 2004, 31, 44-51

[52] Deri, M.A., Zeglis, B.M., Francesconi, L.C. et al. *Eur J Nucl Med Mol Imagin*, **2013**, 40, 41699

[53] Baum, R.P., Rösch, F.: Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides. Springer-Verlag Berlin, **2013**

[54] Sudbrock, F., Fischer, T., Zimmermanns, B. et al. EJNMMI Research, 2014, 4, 36

[55] Gleason, G.I. Int J Appl Radiat Isot, 1960, 8, 90

[56] Greene, M.W., Tucker, W.D. Int J Appl Radiat Isot, 1961, 12, 62

[57] Yano, Y., Anger, H.O. J Nucl Med, 1964, 5, 184

- [58] Gottschalk, A., Anger, H.O. Am J Roent-genol, 1964, 92, 174
- [59] Rösch, F. Appl Rad and Isot, 2013, 76, 24-30
- [60] A) http://www.cyclotronzao.ru/en/products/generator-gallium-68/;
- B) http://www.radiustech.it/brands-it/eckert-ziegler

C) http://www.primetech.co.jp/Portals/0/db/product/ITG/GMP-Ge-68_Ga-68_generator_L_tube-connected.jpg

D) http://www.tlabs.ac.za/wp-content/uploads/2013/08/ge_generator_small.jpg

Utoljára letöltve: 2016. december 30.

[61] de Blois, E., Chan, H.S., Naidoo, C. et al. Appl Rad and Isot, 2011, 69, 308-315

[62] Simecek, J., Hermann, P., Wester, H.J. et al. ChemMedChem, 2013, 8, 95-103

[63] Zhernosekov, K.P., Filosofov, D.V., Baum, R.P. et al. J Nucl Med, 2007, 48, 1741-1748

[64] Schultz, M.K., Müller, D., Baum, R.P. et al. Appl Rad and Isot, 2013, 76, 46-54

[65] Meyer, G.J., Macke, H., Schuhmacher, J. et al. *Eur J Nucl Med Mol Imagin*, **2004**, *31*, 1097-1104

- [66] Wester, H.J.: Pharmaceutical Radiochemistry (I). Scintomics, Fürstenfeldbruck, 2010
- [67] Notni, J., Hermann, P., Havlickova, J. et al. Chem Eur J, 2010, 16, 7174-7185
- [68] Wang, S., Lee, R.J., Mathias, C.J. et al. Bioconjugate Chem, 1996, 7, 56-62
- [69] Caraco, C., Aloj, L., Eckelman, W.C. Appl Rad and Isot, 1998, 49, 1477-1479
- [70] Sun, Y., Anderson, C.J., Pajeau, T.S. et al. J Med Chem, 1996, 39, 458-470
- [71] Notni, J., Pohle, K., Peters, J.A. Inorg Chem, 2009, 48, 3257-3267

[72] Schuhmacher, J., Klivény, G., Hull, W.E. et al. Nucl Med Biol, 1992, 19, 809-824

[73] Eder, M., Wangler, B., Knackmuss, F. et al. *Eur J Nucl Med Mol Imagin*, **2008**, *35*, 1878-1886

[74] Afshar-Oromieh, A., Malcher, A., Eder, M. et al. *Eur J Nucl Med Mol Imagin*, **2013**, *40*, 486-495

- [75] Boros, E., Ferreira, C.L., Yapp, D.T. Nucl Med Biol, 2012, 39(6), 785-794
- [76] Viola-Villegas, N., Doyle, R.P. Coord Chem Rev, 2009, 253, 1906-1925
- [77] Kubicek, V., Havlickova, J., Kotek, J. et al. Inorg Chem, 2010, 49, 10960-10969

- [78] Bandoli, G., Dolmetella, A., Tisato, F. et al. Coord Chem Rev, 2009, 253, 56-57
- [79] Lukes, I., Kotek, J., Vojtisek, P. Coord Chem Rev, 2001, 216-217, 287-312
- [80] Notni, J., Simecek, J., Hermann, P. et al. Chem Eur J, 2011, 17, 14718-14722
- [81] Hacht, B. Bull Korean Chem Soc, 2008, 29, 372-376
- [82] Velikyan, I., Macke, H., Langstrom, B. Bioconjugate Chem, 2008, 19, 569-573
- [83] Guerra Gomez, F.L., Uehara, T., Rokugawa, T. et al. *Bioconjugate Chem*, **2012**, *23*, 2229-2238
- [84] Andre, J. P., Macke, H.R., Zehnder, M. et al. Chem Commun, 1998, 1301-1302
- [85] Eisenwiener, K.P., Prata, M.I.M., Buschmann, I. et al. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13, 530-541
- [86] Riss, P.J., Kroll, C., Nagel, V. et al. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18, 5364-5367
- [87] Cole, E., Parker, D., Ferguson, G. et al. J Chem Soc Chem Commun, 1991, 1473-1475
- [88] Cole, E., Copley, R.C.B., Howard, J.A.K. et al. *J Chem Soc Dalton Trans*, **1994**, 1619-1625
- [89] Notni, J., Plutnar, J., Wester, H.J. EJNMMI Res, 2012, 2, 13
- [90] Notni, J., Pohle, K., Wester, H.J. Nucl Med Biol, 2013, 40, 33-41
- [91] Simecek, J., Notni, J., Kapp, T.G. et al. Mol Pharm, 2014, 11, 1687-1695
- [92] Simecek, J., Zemek, O., Hermann, P. et al. Mol Pharm, 2014, 11, 3893-3903
- [93] Elizarov, A.M., van Dam, R.M., Shen, Y.S. et al. J Nucl Med, 2010, 51, 282-287
- [94] Boschi, S., Malizia, C., Lodi, F. Recent Results Cancer Res, 2013, 194, 17-31
- [95] Boschi, S., Lodi, F., Malizia, F. et al. Appl Rad and Isot, 2013, 76, 38-45
- [96] Fuchtner, F., Preusche, S., Mading, P. et al. Nucl Med, 2008, 47, 116-119
- [97] Whitesides, G.M. Nature, 2006, 442, 368-373
- [98] Lee, C.C., Sui, G., Elizarov, A. et al. Science, 2005, 310, 1793-1796

- [99] Roberge, D.M., Ducry, L., Bieler, N. et al. Chem Eng Technol, 2005, 28, 318-323
- [100] Kang, L., Chung, B.G., Langer, R. et al. Drug Discov Today, 2008, 13, 1-13
- [101] Pascali, G., Watts, P., Salvadori, P.A. Nucl Med Biol, 2014, 40, 776-787
- [102] Gillies, J.M., Prenant, C., Chimon, G.N. et al. J Appl Rad Isot, 2006, 64, 333-336
- [103] Lebedev, A., Mirahaie, R., Kotta, K. et al. Lab Chip, 2013, 13, 136-145
- [104] Briard, E., Zoghbi, S.S., Simeon, F.G. et al. J Med Chem, 2009, 52, 688-699
- [105] Wester, H.J., Schoultz, B.W., Hultsch, C. et al. *Eur J Nucl Med Mol Imagin*, 2009, 36, 653-658
- [106] Pascali, G., Mazzone, G., Saccomanni, G. et al. Nucl Med Biol, 2010, 37, 547-555
- [107] Rensch, C., Jackson, A., Lindner, S. et al. Molecules, 2013, 18, 7930-7956
- [108] Bejot, R., Elizarov, A.M., Ball, E. et al. *J Labelled Compd Radiopharm*, **2011**, *54*, 117-122
- [109] Lee, C.C., Sui, G., Elizarov, A. et al. Science, 2005, 310, 1793-1796
- [110] Wheeler, T.D., Zeng, D., Desai, A.V. et al. Lab Chip, 2010, 10, 3387-3396
- [111] Zeng, D., Desai, A.V., Ranganathan, D. et al. Nucl Med Biol, 2013, 40, 42-51
- [112] Ambrosini, V., Campana, D., Polverari, G. et al. J Nucl Med, 2015, 56(12), 1843-1848
- [113] Velikyan, I., Beyer, G.J., Bergstrom-Pettermann, E. et al. *Nucl Med Biol*, **2008**, *35*(5), 529-536
- [114] Babickova, J., Tothova, L., Boor, P. et al. *Biotechnology Advances*, **2013**, *31*, 1247-1259
- [115] Schoffelen, R., Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M. et al. *Mol Cancer Ther*, **2010**, *9*(4), 1019-1027
- [116] Richter, T., Bergmann, R., Pietzsch, J. et al. J Appl Physiol, 2010, 108(2), 422-429
- [117] Borges, J.B., Velikyan, I., Langstrom, B. et al. J Nucl Med, 2011, 52, 206-209

- [118] Shetty, D., Jeong, J.M., Ju, C.H. et al. Bioorg Med Chem, 2010, 18(21), 7388-7347
- [119] Yang, D.J., Kim, E.E. Eur J Nucl Med Mol Imagin, 2005, 32(9), 1001-1002
- [120] Faintuch, B.L., Oliviera, E.A., Targino, R.C. et al. Appl Rad and Isot, 2014, 86, 41-45
- [121] Ma, W., Kang, F., Wang, Z. et al. Amino Acids, 2013, 44, 1337-1345
- [122] Su, L., Cao, J., Jia, Y. et al. ACS Med Chem Lett, 2012, 3, 959-964
- [123] Yang, Y., Yang, Y., Xie, X. et al. Biomaterials, 2014, 35, 4368-4381
- [124] Arap, W., Pasqualini, R., Ruoslahti, E. Science, 1998, 279, 377-380
- [125] Zhang, J., Lu, X., Wan N. et al. Nucl Med Biol, 2014, 41, 268-275
- [126] Wangler, C., Wangler, B., Lehner, S. et al. J Nucl Med, 2011, 52, 586-591
- [127] Workman, P., Twentyman, P., Balkwill, F. et al. Br J Cancer, 1998, 77, 1-10
- [128] Trencsenyi, G., Kertai, P., Bako, F. et al. Anticancer Res, 2009, 29, 2121-2126
- [129] Rozsa, D., Trencsenyi, G., Kertai, P. et al. Histol Histopathol, 2009, 24, 1367-1379
- [130] Dezso, B., Rady, P., Morocz, I. et al. J Cancer Res Clin Oncol, 1991, 116, 372-378
- [131] Lajtos, I., Emri, M., Kis, S.A. et al. Nucl Instrum Method, 2013, 707, 26-34
- [132] Schulz, D., Weyhermüller, T., Wieghard, K. et al. Inorg Chim Acta, 1995, 240, 217-229
- [133] Warden, A.C., Spiccia, L., Hearn, M.T.W. et al. Dalton Trans, 2005, 1804-1813
- [134] Simecek, J., Schulz, M., Notni, J. et al. Inorg Chem, 2012, 51, 577-590
- [135] Huskens, J., Sherry, A.D. J Am Chem Soc, 1996, 118, 4396-4404
- [136] Martins, A.F., Prata, M.I.M, Rodrigues, S.P.J. et al. *Contrast Media Mol Imaging*, 2013, 8, 265-273
- [137] Negussie, A.H., Miller, J.L., Reddy, G. et al. J Control Release, 2010, 143, 265-273
- [138] Shao, Y., Liang, W., Kang, F. et al. Molecules, 2014, 19, 11600-11612
- [139] Shao, Y., Liang, W., Kang, F. et al. Amino Acids, 2014, 46, 2355-2364

[140] Borgstrom, P., Oh, P., Czarny, M. et al. F1000Res, 2013, 2, 129

[141] Chaffer, C.L., Weinberg, R.A. Science, 2011, 331, 1559-1564

[142] Fontijn, D., Duyndam, M.C.A., van Berkel, M.P.A. et al. *Br J Cancer*, **2006**, *94*, 1627-1636

[143] Antczak, C., De Meester, I., Bauvois, B. J Biol Regul Homeostasis Agents, 2001, 15, 130-139

13. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények





Nyilvántartási szám: Tárgy: DEENK/232/2016.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Máté Gábor Neptun kód: ORZAVL Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Máté, G., Szikra, D., Simecek, J., Szilágyi, S., Trencsényi, G., Wester, H. J., Kertész, I., Galuska, L.: Multiparametric labeling optimization and synthesis of 68Ga-labeled compounds applying a continuous-flow microfluidic methodology. *Journal of Flow Chemistry*. 6 (2), 86-93, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1556/1846.2016.00004 IF: 1.942 (2015)

- Máté, G., Kertész, I., Enyedi, K. N., Mező, G., Angyal, J., Vasas, N., Kis, A., Szabó, É., Emri, M., Bíró, T., Galuska, L., Trencsényi, G.: In vivo imaging of Aminopeptidase N (CD13) receptors in experimental renal tumors using the novel radiotracer 68Ga-NOTA-c(NGR). *Eur. J. Pharm. Sci.* 69, 61-71, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.002
 IF; 3.773
- Máté, G., Simecek, J., Pniok, M., Kertész, I., Notni, J., Wester, H. J., Galuska, L., Hermann, P.: The Influence of the Combination of Carboxylate and Phosphinate Pendant Arms in 1,4,7-Triazacyclononane-Based Chelators on Their 68Ga Labelling Properties. *Molecules*. 20 (7), 13112-13126, 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/molecules200713112 IF: 2.465

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>



DEBRECENI EGYETEM Egyetemi és Nemzeti Könyvtár



További közlemények

 Trencsényi, G., Kertész, I., Krasznai, Z. T., Máté, G., Szalóki, G., Péli-Szabó, J., Kárpáti, L., Krasznai, Z., Márián, T., Goda, K.: 2' [18F]-fluoroethylrhodamine B is a promising radiotracer to measure P-glycoprotein function. *Eur. J. Pharm. Sci.* 74, 27-35, 2015.
 DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.026
 IF: 3.773

5. Sipos, A., Máté, G., Röth, E., Borbás, A., Batta, G., Bereczki, I., Kéki, S., Jóna, I., Ostorházi, E., Rozgonyi, F., Vanderlinden, E., Naesens, L., Herczegh, P.: Synthesis of fluorescent ristocetin aglycon derivatives with remarkable antibacterial and antiviral activities. *Eur. J. Med. Chem.* 58, 361-367, 2012.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.030
IF: 3.499

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,452 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,18

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

Debrecen, 2016.09.20.

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ¤ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ¤ Tel.: (52) 410-443 E-mail: <u>publikaciok@lib.unideb.hu</u> ¤ Honlap: <u>www.lib.unideb.hu</u>

14. Előadások, poszterek jegyzéke

14.1. Előadások jegyzéke

- Máté Gábor, Szikra Dezső, Šimeček Jakub, Kertész István, Wester Hans-Jürgen, Galuska László Microfluidic Labelling - an Efficient Way for the Optimization and Production of ⁶⁸Ga-Radiopharmaceuticals Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2014. október 18-22. Göteborg, Svédország
- Szikra Dezső, Máté Gábor, Nagy Gábor ⁶⁸Ga-microfluidics, COST meeting, 2014. július
 12. Varsó, Lengyelország
- Máté Gábor, Szikra Dezső, Šimeček Jakub, Kertész István, Wester Hans-Jürgen, Galuska László Taking Ga-68 labeling optimization to the fast line with a new microfluidic system, Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, St. Louis, USA, 2014. június 7-11.
- Máté Gábor, Šimeček Jakub, Notni Johannes, Galuska László, Wester Hans-Jürgen, Kertész István Radiochemical Evaluation of Phosphinic, Carboxylic and Mixed Chelators for Gallium-68; Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2013. október 19-23. Lyon, Franciaország; Absztrakt elérhetőség: Eur. J. Nucl. Med. 2013 40:S116-S116.
- Máté Gábor, Szikra Dezső, Kertész István, Galuska László ⁶⁸Ga-kelátorok komplexképzési reakcióinak mikrofluidikai optimalizálása; Őszi Radiokémiai Napok, 2013. október 16-18. Eger. (az előadás a konferencián a Vértes Attila Nívódíj – Különdíj kitüntetésben részesült.)
- Máté Gábor, Kertész István, Galuska László, Šimeček Jakub, Notni Johannes: Aszimmetrikusan szubsztituált ⁶⁸Ga-kelátorok összehasonlító vizsgálata; Hevesy György Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság XVIII. Kongresszusa, Pécs, Tudásközpont, 2013. június 30 – július 2.
- Kertész István, Máté Gábor, Márián Teréz, Leiter Éva, Trencsényi György: Sziderofórok jelölése ⁶⁸Ga-mal; Hevesy György Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság XVIII. Kongresszusa, Pécs, Tudásközpont, 2013. június 30 – július 2.
- Máté Gábor: Experimental Investigation of Highly-Efficient ⁶⁸Ga-Chelators for Radiopharmaceutical Purposes; European Medical Students' Conference, Debrecen, 2012. október 19-22.

- Máté Gábor, Kertész István, Šimeček Jakub, Wester Hans-Jürgen: Nagy hatékonyságú
 ⁶⁸Ga-kelátorok vizsgálata radiogyógyszerészeti felhasználásra; MKE Őszi Radiokémiai Napok 2012, Siófok, 2012. október 8-10.
- Kertész István, Máté Gábor, Trencsényi György, Márián Teréz: Sziderofórok radiojelölése ⁶⁸Ga-mal az aszpergillózis kimutatására PET technikával; MKE Őszi Radiokémiai Napok 2012, Siófok, 2012. október 8-10.
- 11. Kertész István, Máté Gábor, Trencsényi György, Márián Teréz: Trial-labelling of Siderophores with Ga-68; MTA DAB II. sz. Orvostudományi és Biológiai Szakbizottság Nukleáris Medicina Munkabizottság tudományos ülése, Debrecen, 2012. szeptember 13.
- Kertész István, Máté Gábor, Halmos Gábor, Mező Gábor: Peptidek nyomjelzése pozitron-sugárzó izotópokkal; MTA Peptidkémiai Munkabizottság 2012. évi tudományos ülése, Balatonszemes, 2012. május 30.
- 13. Sipos Attila, Máté Gábor, Török Zsolt, Rőth Erzsébet, Borbás Anikó, Batta Gyula, Bereczki Ilona, Kéki Sándor, Jóna István, Rozgonyi Ferenc, Ostorházi Eszter, Evelien Vanderlinden, Lieve Naesens, Herczegh Pál: Fluoreszcens teikoplanin-pszeudo-aglikon és risztocetin-aglikon származékok szintézise és farmakológiai jellemzése; MTA Szénhidrát, Nukleinsav és Antibiotikum Munkabizottsága 2012. évi tudományos ülése, Debrecen, 2012. május 31. június 1.

14.2. Poszterek jegyzéke:

- Kertész István, Máté Gábor, Enyedi N. Katalin, Szikra Dezső, Trencsényi György, Márián Teréz, Mező Gábor Design, synthesis and radiolabelling of NGR peptides with ⁶⁸Ga; Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2014. október 18-22. Göteborg, Svédország
- Kertész István, Kárpáti Levente, Máté Gábor, Péliné Szabó Judit, Nagy Tamás, Trencsényi György, Márián Terész: Synthesis and in vitro application of 2'-[¹⁸F]fluoroethylrhodamine B for detecting multidrug resistance; Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2013. október 19-23. Lyon, Franciaország; Absztrakt elérhetőség: Eur. J. Nucl. Med. 2013 40:S283-S283.
- P. Szabó Judit, Trencsényi György, Nagy Tamás, Máté Gábor, Kertész István, Krasznai Zoárd T., Márián Teréz: A [¹⁸F]fluoroetil-rodamin B a multidrog-rezisztencia kimutatására alkalmas PET tracer; Hevesy György Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság XVIII. Kongresszusa, Pécs, Tudásközpont, 2013. június 30 július 2.

15. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai