Doktori (PhD) értekezés

Kismolekulák és peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából

Stéfánné Dénes Noémi

Témavezető: Prof. Dr. Hunyadi János

Dr. Kertész István

DEBRECENI EGYETEM

PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021.

„A tudományos munkát nem a közvetlen haszna alapján kell megítélni. Önmagáért, a tudomány szépségéért kell végezni.”

(Marie Curie)

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke 5

2. Bevezetés 8

3. Irodalmi áttekintés 10

3.1 Képalkotó módszerek az orvostudomány területén 10

3.1.1 A PET képalkotásnál használt radionuklidok és radiofarmakonok 12

3.2 Radionuklid generátorok 16

3.2.1 A ^{68}Ge/^{68}Ga generátor-rendszerek 18

3.2.2 A gallium kémiája 23

3.2.3 A gallium koordinációs kémiája 24

3.3 Makrociklusos kelátorok 25

3.4 Aciklusos kelátorok 27

3.5 Bifunkciós kelátorok építésének szempontjai 29

3.6 Melanoma malignum 31

3.6.1 Melanoma malignum kimutatására alkalmas PET-radiofarmakonok 33

3.7 Angiogenezis 36

3.7.1 Az angiogenezis kimutatására alkalmas egyéb molekuláris célponttal rendelkező radiofarmakonok 39

3.8 Multimerizációs technika alkalmazása PET képalkotás során 43

4. Célkitűzés 47

5. Metodikák 49

5.1 Anyagok és módszerek 49

5.2 Kismolekulák nyomjelzése PET képalkotás céljából 52

5.2.1 4-Amino-*N*-(2-dietilaminoetil)benzamid-hidroklorid konjugálási reakciója NODAGA-NHS-észter kelátorral 52

5.2.2 HBED-CC-trisz (tBu) tetra-fluor-fenil-észter szintézise 52

5.2.3 4-Amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidroklorid konjugációs reakciója HBED-CC-trisz(tBu)tetra-fluoro-fenil-észter kelátorral 53

5.2.4 NODAGA-PCA és HBED-CC-PCA radioizotópos jelölése ^{68}Ga-mal 53

5.2.5 Félpreparatív és analitikai HPLC 55
5.2.6 A ^{68}Ga-mal jelzett kismolekulák oktanol/PBS megoszlási hányadosának (LogP) meghatározása 55
5.2.7 A ^{68}Ga-mal jelzett kismolekulák *in vitro* stabilitásának meghatározása 56
5.2.8 A sejttenyésztés során alkalmazott körülmények 56
5.2.9 *In vitro* telítés kötődési vizsgálatok 57
5.2.10 Sejtfelvétel és kiáramlási vizsgálatok 57
5.2.11 Az alkalmazott tumor modellek 58
5.2.12 PET/CT és PET/MRI képalkotás 59
5.2.13 *Ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok 60
5.2.14 Statisztikai analízis 61
5.3 Peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából 61
5.3.1 Az APRPG-COOH és APRPG-NH_2 peptidek előállítása peptid-szintézissel 61
5.3.2 Szerkezetazonosítás tömegspektrometriával 61
5.3.3 A NODAGA-APRPG-COOH, NODAGA-APRPG-NH_2, NOTA-NGR-APRG és a NODAGA-YEVGHRC peptid-származékok előállítása 62
5.3.4 Félpreparatív és analitikai HPLC 63
5.3.5 A peptid-származékok radioizotópos jelölése ^{68}Ga-mal 66
5.3.6 A ^{68}Ga-mal jelzett peptid-származékok oktanol/PBS megoszlási hányadosának (logP) meghatározása 67
5.3.7 A ^{68}Ga-mal jelzett kismolekulák *in vitro* stabilitásának meghatározása 67
5.3.8 A sejttenyésztés során alkalmazott körülmények 67
5.3.9 Állattartás körülményei 68
5.3.10 Az állatmodell 68
5.3.11 *In vivo* állatkísérlet és kvantitatív PET-elemzés 69
5.3.12 *Ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok 69
5.3.13 Statisztikai analízis 70
6. Eredmények 71
6.1 Kismolekulák nyomjelzése PET képalkotás céljából 71
6.1.1 Kémiai és radiokémiai szintézis 71

6.1.2 A ^{68}Ga-mal jelzett kismolekulák oktanol/PBS megoszlási hányadosának (LogP) és *in vitro* stabilitásának meghatározása 75
6.1.3 *In vitro* kísérletek a melanin-specificitás meghatározására 76
6.1.4 Szervi eloszlási vizsgálatok egészséges egereken 80
6.1.5 PET/MRI képalkotás és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok tumoros egereken 83
6.2 Peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából 91
6.2.1 Kémiai és radiokémiai szintézis 91
6.2.2 A ^{68}Ga-mal jelölt peptid-származékok oktanol/PBS megoszlás hányadosának (logP) és in vitro stabilitásának eredményei 98
6.2.3 *In vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok egészséges állatokon 98
6.2.4 *In vivo* és *ex vivo* összehasonlító tanulmányok szubkután tumoros állatmodellen 100
7. Megbeszélés 102
7.1 Melanoma malignum kimutatására használt vegyületek képalkotási tulajdonságainak értelmezése 102
7.2 Angiogenezis kimutatására használt vegyületek képalkotási tulajdonságainak értelmezése 109
8. Összefoglalás 113
9. Summary 114
10. Irodalomjegyzék 115
10.1 A hivatkozott közlemények jegyzéke 115
10.2 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények 133
11. Tárgyszavak 135
12. Köszönetnyilvánítás 136
13. Függelék 137

1. Rövidítések jegyzéke

^{11}C-MBZA	4-[^{11}C]-metoxi *N*-(2-dietilaminoetil)benzamid
^{11}C-PIB	[^{11}C]-Pittsburgh compound-B
^{18}F-5-FPN	[^{18}F]-5-fluor-*N*-(2-dietilamino-etil)pikolinamid
^{18}F-DAFBA	(*N*-(2-dietil-amino-etil)-4-[^{18}F]fluor-benzamid
^{18}F-DOPA	[^{18}F]-dihidroxi-fenilalanin
^{18}F-FAZA	[^{18}F]-fluor-azomicin-arabinozid
^{18}F-FCH	[^{18}F]-fluor-kolin
^{18}F-FDG	2-[^{18}F]fluor-2-dezoxi-D-glükóz
^{18}F-FEC	[^{18}F]-fluor-etil-kolin
^{18}F-FET	[^{18}F]-fluor-etil-tirozin
^{18}F-FLT	[^{18}F]-fluor-3'-dezoxi-3'-L-fluorotimidin
^{18}F-FPBZA	[^{18}F]-*N*-(2-dietil-amino-etil)-4-[2-(2-(2-fluor-etoxi)-etoxi)-etoxi]-benzamid
^{18}F-FPBZA	[^{18}F]-*N*-(2-dietilaminoetil)-4-[2-(2-(2-fluoretoxi) etoxi)etoxi]benzamid
^{18}F-FPPRGD2	[^{18}F]-2-fluorpropionil dimer arginil-glicil-aszparaginsav
^{18}F-galakto-RGD	[^{18}F]-fluor-galakto-arginil-glicil-aszparaginsav
^{18}F-MISO	[^{18}F]-fluor-mizonidazol
^{18}F-ML-10	[^{18}F]-2-(5-fluorpentil)-2-metil malonsav
^{64}Cu-ATSM	[^{64}Cu]-diacetil-bisz(*N*-metil-tioszemikarbazon)
^{64}Cu-TETA-OC	[^{64}Cu]-1,4,8,11-tetraazaciklotetradekán-*N*,*N*',*N*'',*N*'''-tetraecetsav-oktreotid
APN	aminopeptáz N
APRPG	alanin-prolin-arginin-prolin-glicin
BFC	bifunkcionális kelátor
BZA	benzamid
CBCT	cone bean computed tomography
CB-DO2A	4,10-bisz(karboximetil)-1,4,7,10-tetraazabiciklo[5.5.2]tetradekán
DAR	differenciál abszorpciós ráta
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-*N*,*N*',*N*'',*N*'''-tetraecetsav
DOTA-NOC	DOTA-[Nal^3]-oktreotid
DOTA-TATE	DOTA-[Tyr^3]-oktreotát
DOTA-TOC	DOTA-[Tyr^3]-oktreotid

DTPA	dietilén-triamin-pentaecetsav
E_{av}	átlagos kinetikus energia
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
E_{max}	maximális energia
ESI-MS	elektroporlasztásos ionizációs-tömegspektrometria
FDA	élelmiszer- és gyógyszerfelügyeleti hivatal
GBq	gigabecquerel
GE	general electric
GLUT	glükóz transzporter
GMP	helyes gyógyszergyártási gyakorlat
H2dedpa	(1,2-[[6-karboxipridin-2-il]metil-amino]etán)
HBED	*N*,*N*-bisz(2-hidroxibenzil)etiléndiamin-*N*,*N*-diecetsav
HEPES	(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav)
keV	kiloelektronvolt
MeV	megaelektronvolt
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
MS	tömegspektrometria
NaOAc	nátrium-acetát
NEX	excitációk száma
NGR	aszparagin-glicin-arginin
NHS	*N*-hidroxiszukcinimid
NMR	mágneses magrezonancia
NODAGA	1,4,7-triazaciklononán,1-glutársav-4,7-diecetsav
NODASA	1,4,7-triazaciklononán-1-borostyánkősav-4,7-diecetsav
NOTA	1,4,7-triazaciklononán-*N*,*N*',*N*''-triecetsav
NOTP	1,4,7-triazaciklononán-*N*',*N*''-*N*'''tris(metil-foszfinsav)
NOTPME	1,4,7-triazacikononán-*N*',*N*'',*N*''-trisz(metilén-foszfonát-monoetilészter)
PBS	foszfát pufferált sóoldat
PCA	prokainamid
PCTA	3,6,9,15-tetraazabiciklo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trién-3,6,9-triecetsav
PET	pozitron emissziós tomográfia
PSMA	prosztata specifikus membrán antigén
RGD	arginin-glicin-aszparagin sav
RNG	radionuklid generátor
RNS	ribonukleinsav
RP-HPLC	fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia
SAX	erős anioncserélő
SCID	kombinált immunhiányos állapot
SCX	erős kationcserélő
SPECT	egyfoton-kibocsátásos számítógépes metszeti képalkotás
TACD	tetraazaciklododekán

TACN	tetraazaciklononán
TFP	tetrafluorfenil
TLC	vékonyréteg kromatográfia
TRAP	triazaciklononán-foszfinsav
UV-sugárzás	ultraibolya sugárzás
X-ray	röntgen-sugárzás
YEVGHRC	tirozil-glutamil-valil-glicil-hisztidil-arginil-cisztein
β+	pozitron
γ	gamma

2. Bevezetés

A melanoma malignum az egyik legagresszívabb bőrdaganat, amely előrehaladott állapotban rendkívül rossz prognózissal rendelkezik. Ezt a negatív tulajdonságát a fokozott metasztatikus és angiogén hajlama, valamint a különböző kezelésekkel szemben mutatott rezisztenciája okozza. Az angiogenezis indukciója kritikus pont a legtöbb humán daganat - beleértve a melanoma malignumot is - kialakulásában. A rosszindulatú daganatok döntő hányadában (a szolid daganatok több mint 90%-ban), beindul az új erek képzésnek folyamata. A melanoma esetében a primer tumor korai felismerése, majd műtéti úton történő eltávolítása, és a folyamatos szűrővizsgálatok ellenére a betegek és a betegség előrehaladott stádiumában lévők száma folyamatosan növekszik. A kórfolyamat agresszivitása abból adódik, hogy képesek gyorsan növekedni a helyi kapillárisok felé, majd távoli metasztázisokat képezni több szervben (pl.: tüdő, agy, vese, máj és belek), még akkor is, ha az elsődleges daganat mérete nem látványos. A metasztázisok jelenléte nagymértékben csökkenti a várható élettartam hosszát, ezért ezen áttétek korai felismerése és lokalizálása döntő fontosságú a betegek életkilátásai szempontjából. A betegek életének meghosszabbítása szempontjából az orvosi képalkotó technikák kulcsszerepet játszhatnak. A nem invazív képalkotó módszerek közül a pozitron emissziós tomográfia (PET) nagy érzékenysége és felbontása miatt hasznos módszer a rosszindulatú daganatok kimutatására, valamint a stádium meghatározására. A primer daganatok és áttétek képalkotására a leggyakrabban alkalmazott radiogyógyszer a [^{18}F]-fluor-2-dezoxi-D-glükóz (^{18}F-FDG). A ^{18}F-FDG egy glükóz-analóg, amely magas metabolikus aktivitással rendelkező sejtekben, például daganatokban halmozódik fel. A széles körű használat ellenére a ^{18}F-FDG bizonyos korlátokkal rendelkezik: nem specifikus a rosszindulatú melanomára, ráadásul gyulladásos elváltozások és a központi idegrendszer sejtjei is halmozzák, ami megnehezíti a PET-képeken az egészséges és beteg szövetek elkülönítését. A ^{18}F-FDG ezen korlátai a melanoma diagnosztikájának javítása céljából specifikus nyomjelzők szintézisét és jellemzését igényli, amelyek növelik a PET képek alkalmazásának hatékonyságát.

A generátor alapú radioizotópok kényelmes alternatívái a ciklotronnal előállítható izotópoknak. Ilyen PET-izotóp a ^{68}Ga, amely közel ideális fizikai tulajdonságokkal rendelkezik (89% β^+; $t_{1/2}$ = 68 perc; E_{av} (β^+) = 740 keV), a radionuklidhoz könnyű helyszíni hozzáférhetőség biztosítható a kereskedelemben kapható ^{68}Ge/^{68}Ga-generátorokon keresztül. A ^{68}Ga fizikai és kémiai tulajdonságai lehetővé teszik a hatékony radiojelölést kis molekulatömegű vegyületek alkalmazásakor, döntően peptideknél, viszont antitesteknél és fehérjéknél a rövid felezési ideje

miatt inkább az indirekt jelölés megvalósítása során lehet hasznos. Az előbbi területen már jól bevált radiojelölési módszerek állnak a rendelkezésre, amelyek számos, a klinikai gyakorlatban-, illetve kutatásban alkalmazott vegyületet eredményeztek már. Azonban a különböző daganatok, valamint élettani folyamatok hatékony, rövid időn belüli és minél pontosabb feltérképezése még több specifikus radiofarmakon fejlesztését indokolja, amely komoly kihívás napjaink PET radiokémiája számára.

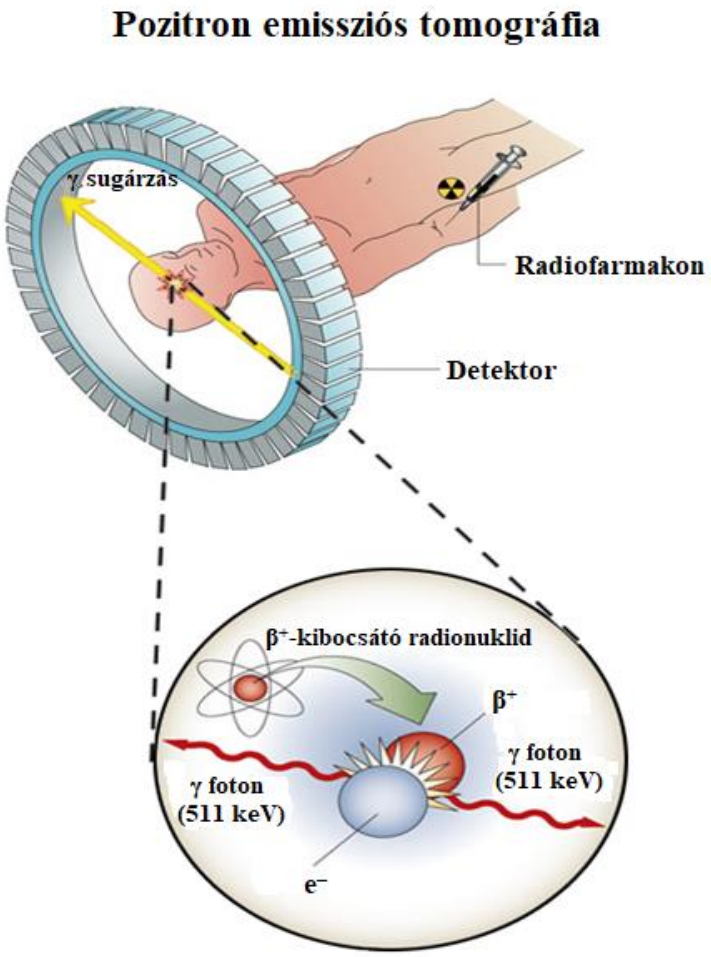
3. Irodalmi áttekintés

3.1 Képalkotó módszerek az orvostudomány területén

A nagy felbontású képalkotó technikák bevezetése áttörést eredményezett az egészségügyben és forradalmasította a diagnosztikát a klinikai gyakorlatban. A radiológia eszköztárába tartozó MRI (magnetic resonance imaging – mágneses rezonancia képalkotás) [1], CT (computer tomography – komputer tomográfia) [2;3], röntgen (X-ray) [4] és UH (ultrasound – ultrahang) vizsgálatok, morfológiai információt szolgáltatnak. Ezek a módszerek tehát a betegség későbbi szakaszában bekövetkező anatómiai elváltozás megjelenítését lehetővé tevő modalitások [5;6].

A radioaktív izotópokkal történő nyomjelzéses módszer alapját Hevesy György magyar származású kémikus fektette le, amiért 1943-ban Nobel-díjjal jutalmazták, és a nukleáris medicina atyjaként tekintenek rá [7]. A nukleáris medicina tárgykörében alkalmazott két fő molekuláris képalkotó technika a PET (positron emission tomography – pozitron emissziós képalkotás) [8;9] és a SPECT (single photon emission computed tomography – egyfoton-kibocsátásos számítógépes metszeti képalkotás) [10], amelyek funkcionális képalkotó eljárások. Mindkét vizsgálat esetében radioaktívan jelölt vegyületet használnak, azonban az alkalmazott radiofarmakonokat különböző sugárzást kibocsátó izotóppal jelölik. A radiogyógyszereket a szervezetbe juttatják, ahol részt vesznek az élettani folyamatokban, miközben a radioizotóp bomlásakor emittált sugárzást detektálják.

A PET technikánál β^+-kibocsátó radionuklidokat használnak a radiojelölésnél. A magból kilökődött pozitron elveszti a kinetikus energiáját, ezután egy elektronnal ütközve annihilálódik és két 511 keV energiájú, ellentétes irányba mozgó γ fotont bocsájt ki ($180° \pm 0.25°$) (1. ábra). A PET esetében nem a bomló izotóp pozícióját, hanem az annihiláció helyét lokalizáljuk. Mivel a képalkotás két gamma foton egyidejű detektálása alapján történik, ezért a PET számos „véletlen esemény” mérésből való kiszűrésére képes. A magasabb jel/zaj aránynak köszönhetően a módszer érzékenysége és felbontása felülmúlja a SPECT képalkotás paramétereit. További kedvező tulajdonsága, hogy a biomolekulák radiojelölésére olyan izotópokat is használhatunk (pl.: ^{18}F, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O), amely elemek részt vesznek az élő rendszerek felépítésében [8;9]. A megfelelő pozícióban történő elem cseréje radioaktív izotópra olyan radioligandumokat eredményez, amelyeknek kémiai struktúrája változatlan, ezért nem kell tartani a biokémiai tulajdonságokban történő változásoktól sem.



1. ábra: A PET képalkotás elve [11].

A nukleáris képalkotás funkcionális technika, amely molekuláris szinten képesek láthatóvá tenni kóros folyamatokat a szervezetben, még mielőtt anatómiai változást okozna a betegség. Az emissziós- és transzmissziós tomográfiát magában foglaló eljárások mindegyike rendelkezik előnyös tulajdonságokkal, ráadásul együttes használatuk és kombinálásuk során, plusz adatokat is szolgáltatnak egy vizsgálat alatt [12]. Pontosan az ilyenfajta többletinformáció elérése céljából 2001-ben, a Discovery LS (GE Healthcare) létrehozta az első kereskedelmi forgalomban kapható PET/CT hibrid készüléket, amellyel egy betegen egy vizsgálat alkalmával, azonos testhelyzetben kaphatunk képet a funkcionális és morfológiai elváltozásokról egyaránt [13]. 2010-ben a Siemens vezette be elsőként a hibrid PET/MRI-t a klinikai gyakorlatba, mely készülékeknek nagy előnye, hogy az MRI leképzés során nagy lágyszöveti felbontás érhető el. Az új technológia bizonyos vizsgálatok során jelentős előnyt nyújt a PET/CT-hez képest, azonban összetettebb és magasabb költségű hibrid eljárás (1. táblázat).

1. táblázat: A főbb képalkotó eljárások tulajdonságainak összehasonlítása [14]

	CT	MRI	PET	SPECT
Információ	Szerkezeti	Szerkezeti és funkcionális	Funkcionális	Funkcionális
Felbontás (mm)	~1	~1	3-5	8-10
Ionizáló sugárzás	Igen	Nem	Igen	Igen
Költség (dollár)	500	1000	2000	1000
Vizsgálati idő (perc)	1-2	30	20	30

3.1.1 A PET képalkotásnál használt radionuklidok és radiofarmakonok

A PET képalkotó vizsgálatok elterjedésének sikere alapvetően összefügg a rendelkezésre álló radiofarmakonok spektrumának szélességével. Az 1970-es évektől fejlesztették ki azokat a hatékony és gyors reakciókat, amelyek lehetővé tették, hogy egyre több vegyülettípust vonjanak be a potenciális radioligandumok körébe. Ter-Pogossian és munkatársai 1980-ban már egy 30 vegyületről szóló listát tettek közzé, amelyek a már fent említett négy izotóp alkalmazásán alapultak, nevezetesen: ^{15}O, ^{11}C, ^{13}N és ^{18}F [15;16;17]. A „négy klasszikus" radionuklid - talán a fluor kivételével - a szervezetünket alkotó szerves molekulákban számottevő mennyiségben fellelhető elemek radioaktív izotópjai. Ezeket alkalmazva megvalósítható a radioaktív nyomjelzés, így elméletileg szinte bármilyen biológiai jelentőségű molekula jelölhető, anélkül, hogy a vegyület kémiai szerkezetét megváltoztatnánk [18]. A Ter-Pogossian és munkatársai által közölt lista manapság már több száz radiofarmakonnal bővült, amelyeket a mindennapokban felhasználnak az onkológia, neurológia, pszichiátria, kardiológia és gyógyszerkutatás területén egyaránt. Az említett négy radionuklid előállítása ciklotronban történik (2. táblázat). A rövid felezési idejű ^{15}O, ^{11}C és ^{13}N ($t_{1/2}$ = 2-20 perc) radioizotópok, csak és kizárólag az előállítás helyén használhatóak fel kutatáshoz vagy humán célú vizsgálatokhoz. Ellenben a ^{18}F, 110 perces felezési ideje már lehetővé teszi a szállítását közeli PET centrumok számára [19].

Az eddig előállított radiofarmakonok felhasználási köre széles spektrumot ölel át, azonban a rutin PET [20] vizsgálatok során leggyakrabban a [^{18}F]-fluor-2-dezoxi-D-glükóz (^{18}F-FDG) alkalmazzák mind a mai napig. A ^{18}F-FDG egy glükóz-analóg, a szervezetbe intravénás injekció formájában juttatják, majd a véráramból a glükóz-transzporterek szállítják

a sejtekbe. A sejtekben 2-fluor-2-dezoxi-glükóz-6-foszfáttá az intracelluláris hexokináz foszforilálja, azonban tovább már nem metabolizálódik [21], így felhalmozódik a sejtekben, s a radiofarmakon egyensúlyi eloszlását – ennek mértéke arányos a cukoranyagcsere intenzitásával – PET kamera segítségével detektálják. A ^{18}F-FDG széles körű felhasználása abból adódik, hogy a daganatsejtek jelentős hányadára jellemző a fokozott glükózanyagcsere, aminek részben oka a glükóz transzporter membránprotein túlzott kifejeződése. Szerepet játszhat még a daganatszövet érhálózatának fokozódása, valamint a tumorsejtek nagy osztódási rátája. Ezért ez a radiogyógyszer napjaink legfontosabb, nem specifikus tumormarkere. Az onkológiai alkalmazásokon túl számos egyéb kórképben, pl. gyulladások kimutatásában is egyre több adat áll rendelkezésre a vegyülettel végzett diagnosztika hasznosságáról. Mivel a gyulladás helyén sejtosztódás indul be, valamint citokinek is felszabadulnak, ezért a GLUT-1 és GLUT-3 transzporterek expressziója ebben az esetben is emelkedett, a megnövekedett hexokináz aktivitás pedig a ^{18}F-FDG felhalmozódásához vezet [22]. Napjainkban a szívizom betegségeinek diagnosztikájában szintén növekszik a ^{18}F-FDG jelentősége, mivel az intakt metabolikus aktivitás bizonyítékul szolgálhat a szívizom életképességére [23].

Ahogy a fentiekből is látszik, a ^{18}F-FDG radiofarmakonnal történő vizsgálatok számos betegség esetében jelenthetnek hatékony diagnosztikát. De éppen ez a sokoldalú felhasználhatóság mutatja azt, hogy ez a radiofarmakon nem specifikus kölcsönhatások alapján dúsul fel a tumoros szövetekben. Bizonyos tumorok nem halmozzák hatékonyan az ^{18}F-FDG-t. Ilyen eset áll fent például a low-grade tumorok esetében. A prosztata daganatnál a közeli húgyhólyag magas aktivitás-szintje zavarja az érintett terület/ek vizsgálatát.

Az utóbbi évtizedekben megjelentek olyan tumorterápiák is (célzott tumorterápia vagy irányított tumorterápia), amelyek specifikus kölcsönhatások alapján működnek. A célzott tumorterápia lényege, hogy a szervezetbe olyan hatóanyagot (pl. citotoxikus szerek, amelyek mérgezik a sejteket) juttatunk, amely nagyobb valószínűséggel találja meg a tumoros sejteket és általában szelektív kölcsönhatással kötődik hozzájuk. Ezért hatékonyabban fejti hatását a tumor környezetében. Ezzel elkerülhetővé válik, hogy azonos hatóanyag-koncentráció alakuljon ki az egészséges szervekben és szövetekben, valamint a daganatokban, mint ami a kemoterápiánál elő szokott fordulni, és nagyban felelős a mellékhatások megjelenéséért. A daganatoknak a környező, nem malignus szövetektől *in vivo* jelzéssel történő elkülönítésére és felismerésére elméletileg lehetőséget ad a tumorokat alkotó sejtek egyedi fehérjestruktúráinak megjelenése, vagy az egészséges sejtekben csak kis mennyiségben található proteinek megemelkedett expressziója. Amennyiben a kemoterápiában használt hatóanyag egy olyan

célba juttató alegységhez kapcsolódik, amely szelektíven megtalálja, felismeri a tumoron fokozottan kifejeződött receptort, akkor az lokálisan feldúsul a beteg szövet környezetében, ezért lehetőség van kisebb dózis alkalmazására. Ennek következtében pedig esély nyílik a mellékhatások csökkentésére. Abban az esetben, ha irányított terápiát kívánnak alkalmazni, nem elégséges csak a tumort szimplán lokalizálni (pl. ^{18}F-FDG-s képalkotással), hanem szükségszerű meggyőződni arról is, hogy az adott beteg daganatában fellelhető-e az a molekuláris célpont (receptor, enzim), amelyen keresztül a terápiás hatást ki szeretnék váltani. Ez a koncepció megfelel a személyre szabott gyógyításnak. Ezért nagy jelentősége van olyan PET radiofarmakonok fejlesztésének, amelyek specifikus kölcsönhatások alapján dúsulnak. Ilyen célba juttató molekulák lehetnek például peptidek, kismolekulák, de akár makromolekulák is. A kis molekulatömeggel, és gyors biodisztribúcióval rendelkező vegyületek radiojelölésére kiváló PET radionuklid a ^{68}Ga (3. táblázat). A ^{68}Ga közel ideális fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, felezési ideje pedig jól illeszkedik a kismolekulák és peptid-származékok farmakokinetikájához. A ^{68}Ga jelentősége abban rejlik, hogy hosszú távon megoldást jelenthet a biomolekulák jelölésére ciklotronnal nem rendelkező egészségügyi központok számára is, lehetővé és elérhetővé téve a célzott terápia alkalmazását, ahol a gallium-jelölt vegyületek jelenthetik a szükséges diagnosztikai hátteret. A ^{68}Ga nuklid megnövekedett jelentőségét mutatja a PET képalkotás területén, hogy az utóbbi években komoly erőfeszítések történtek az izotóp ciklotronban történő előállítása érdekében. A növekvő igényekkel már nem tud lépést tartani a generátorok gyártása, illetve a készülékek csak limitált aktivitás leadására képesek, ezért nagyszámú vizsgálat esetén költséghatékonyabb megoldás lehet a ciklotronos előállítás.

2. táblázat: A négy klasszikus PET izotóp fizikai tulajdonságai, előállításuk, gyakran alkalmazott radiofarmakonjaik és felhasználásuk

Radio-nuklid	β^+ bomlás (%)	$T_{1/2}$ (perc)	E_{max} (MeV)	Előállításuk magreakciója	Leggyakoribb radio-farmakonok	A radio-farmakonok felhasználása
^{11}C	99,8	20,4	0,96	^{14}N(p,α)^{11}C	^{11}C-Kolin [24]	prosztata tumor
					^{11}C-Metionin [25]	agytumorok
					^{11}C-PIB [26]	Alzheimer kór, β-amiloid detektálás
					^{11}C-Acetát [27]	máj-, hólyag-, vese- és tüdőrák, szívizom perfúzió
^{13}N	99,8	10	1,19	^{16}O(p,α)^{13}N	^{13}N-Glutamát [28]	tumor metabolizmus
					^{13}N-Ammónia [29]	myocardialis perfúzió
^{15}O	99,9	2,05	1,72	^{14}N(d,n)^{15}O	^{15}O-Víz [30]	myocardialis perfúzió
^{18}F	96,9	110	0,63	^{18}O(p,n)^{18}F	^{18}F-FDG [31;32]	tumorok/áttétek leképezése, terápiakövetés
					^{18}F-FET [33]	agytumorok
					^{18}F-FLT [34]	proliferáció
					^{18}F-FEC és ^{18}F-FCH [35;36]	prosztata tumor
					^{18}F-MISO és ^{18}F-FAZA [37;38;39]	hypoxia
					^{18}F-Fluorid [40]	csontok képalkotása
					^{18}F-ML-10 [41]	apoptózis
					^{18}F-DOPA [42]	neuroendokrin tumorok
					^{18}F-Fluorbetapir [43]	Alzheimer kór, β-amyloid kimutatás
					^{18}F-Galakto-RGD [44]	neoangiogenezis kimutatása

3. táblázat: A gyakorlatban legtöbbször előforduló PET-radiofém izotópok fizikai tulajdonságai, előállításuk, gyakran alkalmazott radiofarmakonjaik és felhasználásuk

Radio-nuklid	β^+ bomlás %	További bomlási mód	$T_{1/2}$	E_{max} MeV	Elő-állítás	Leg-gyakoribb radio-farmakonok	A radio-farmakonok felhasználása
^{68}Ga	89,1	Elektron befogás 10,9%	67,7 perc	1,89	^{68}Ge/^{68}Ga	^{68}Ga-DOTA-TOC, ^{68}Ga-DOTA-NOC, ^{68}Ga-DOTA-TATE [45;46;47]	szomatosztatin receptor
^{44}Sc	94,3	Eletron befogás 5,7%	3,92 7 óra	1,47	^{44}Ti/^{44}Sc	^{44}Sc-PSMA-617 [48]	prosztata tumor
						^{44}Sc-DOTA-RGD$_2$ [49]	$\alpha_v\beta_3$ integrinek
						^{44}Sc-DOTA-TOC [50]	szomatosztatin receptor
^{89}Zr	22,7	Elektron befogás 77,3%	75,8 óra	0,90	^{89}Y(p,n) ^{89}Zr	^{89}Zr-trastuzumab [51]	HER-2

3.2 Radionuklid generátorok

Az OGYÉI az alábbi definíciót fogalmazta meg a radioizotóp generátorokról [52]:

„Radionuklid generátorok: minden olyan rendszer, amely meghatározott anya-radionuklidot (anyaelem) foglal magában; ez az anya-radionuklid leány-radionuklidot (leányelem) termel, amelyet elúcióval vagy egyéb módszerrel nyerünk és radioaktív gyógyszerkészítményekben alkalmazzuk.”

Tehát a radionuklid generátor (RNG) egy olyan önálló, kompakt, szállítható és ciklotront nem igénylő izotóp előállítására alkalmas eszköz, amelynek mindkét eleme radioaktív. Az anyaelem egy viszonylag hosszú felezési idejű izotóp, ez biztosítja a szállíthatóságát és a rentábilis idejű felhasználhatóságát. A radionuklid generátor nem csak „előállítja" a szükséges radioizotópot, de a megfelelő elválasztást is biztosítja a magas radionuklidos tisztaság érdekében. A leányelem elválasztását az anyaelemtől általában valamilyen kromatográfiával oldották meg. A kezdeti időszakban még jellemző volt, hogy nem elegyedő oldószerekben, a megoszlási hányados segítségével nyertek ki tiszta radionuklidot, de ezek a megoldások nem segítették elő az adott radionuklid generátor széleskörű terjedését. Hiszen a mindennapi használathoz egyszerű, kevésbé képzett személyzet által is reprodukálhatóan elvégezhető módszerre volt szükség. Ezeknek a kívánalmaknak nagyon jól megfelelhet az oszlopkromatográfia. Ebben az esetben az anyaelem egy megfelelő állófázison van adszorbeálva (különböző generátorok esetében különböző adszorbensek szolgálnak az anyaelem megkötésére), s az ezen történő radioaktív bomlásból keletkezik a leányelem [53]. Az anya- és leányelem eltérő fizikai-kémiai tulajdonságai miatt lehetséges a két radioizotóp megfelelő hatékonyságú elválasztása, így könnyen kinyerhető a csak és kizárólag felhasználni kívánt leányelem. A leányelem aktivitását az anyaelem bomlása folyamatosan pótolja. A radioaktív generátorokat ezen megállapítások alapján „radionuklid teheneknek" is hívják a szakirodalomban [54].

A leányelem aktivitása egy meghatározott időpontban az 1. és a 2. egyenlet alapján állapítható meg:

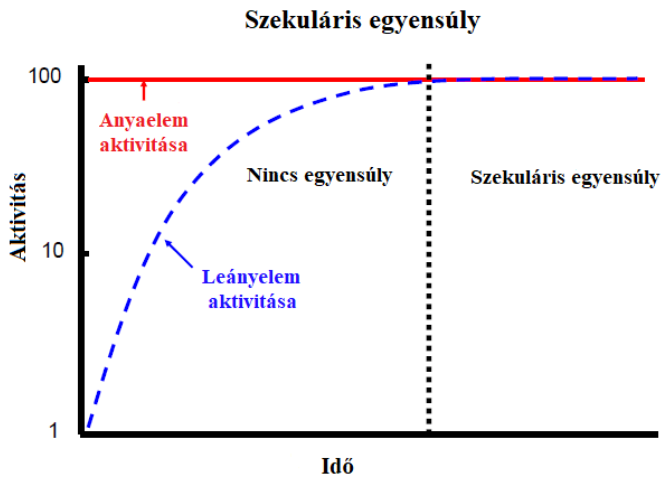
$$\lambda_1 = \frac{ln2}{t^1_{1/2}}; \quad \lambda_2 = \frac{ln2}{t^2_{1/2}} \qquad \textbf{(1)}$$

$$A_2 = \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} A_1^0 \left(e^{-\lambda_1 \Delta t} - e^{-\lambda_2 t}\right) + A_2^0 \, e^{-\lambda_2 \Delta t} \textbf{ (2)}$$

Ahol: $\boldsymbol{\lambda}$ a bomlási állandó, $\boldsymbol{\lambda_1}$ és $\boldsymbol{\lambda_2}$ az anyaelem és a leányelem bomlási állandója, $\boldsymbol{t_{1/2}}$ a felezési idő, $\boldsymbol{\Delta t}$ a $\boldsymbol{t}$ és a $\boldsymbol{t_0}$ időpontok között eltelt idő, $\boldsymbol{A_2}$ a leányelem $\boldsymbol{t}$ időpontbeli aktivitása, $\boldsymbol{A_1^0}$ és $\boldsymbol{A_2^0}$ az anyaelem és a leányelem $\boldsymbol{t_0}$ időpontbeli aktivitása.

A radionuklid generátorokat az anya- és leányelem felezési idejének aránya alapján is lehet csoportosítani az 1. és a 2. egyenletek figyelembevételével [55]. Attól függően, hogy milyen arányosság áll fenn a bomlási állandók (vagy felezési idők) között, három fő esetet különböztetünk meg:

1. Tranziens egyensúly – az anyaelem felezési ideje hosszabb (nagyságrendben tízszeres), mint a leányelemé, de nem tekinthető végtelennek, tehát $t_{1/2,1} > t_{1/2,2}$; azaz $\lambda_1 < \lambda_2$.
2. Szekuláris egyensúly – az anyaelem felezési ideje sokkal nagyobb, mint a leányelemé, azaz: $t_{1/2,1} >> t_{1/2,2}$; azaz $\lambda_1 << \lambda_2$ (2. ábra)
3. Nincs egyensúly – az anyaelem felezési ideje kisebb, mint a leányelemé, azaz: $t_{1/2,1} < t_{1/2,2}$; azaz $\lambda_1 > \lambda_2$.



2. ábra: A szekuláris egyensúly bemutatása

A radionuklid generátorok fejlesztését az elmúlt három évtizedben elsősorban az motiválta, hogy széles spektrumban felhasználják az ilyen módon előállított radioizotópokat nyomjelző/jelölő vegyületekként az élettudományokban. Napjainkig főként a diagnosztikai alkalmazásai váltak be a nukleáris medicina területén. Az elmúlt években ígéretes generátor-eredetű diagnosztikai és terápiás radionuklidokat fejlesztettek ki a nukleáris medicina, az onkológia, valamint az intervenciós kardiológia területére. A fokozódó igény miatt, elindult a generátor-rendszerek fejlesztése, amely az anyaelemek előállítását, a még hatékonyabb elválasztást, valamint a generátor-rendszerek megbízható műszaki tervezését célozza meg [48].

3.2.1 A $^{68}Ge/^{68}Ga$ generátor-rendszerek

A galliumnak 31 izotópja ismert, amelyek 56-86 közötti tömegszámmal fordulnak elő, ebből két stabil izotóp található meg a természetben: a ^{69}Ga (60,11%) és a ^{71}Ga (39,89%). Két gallium izotóp, a ^{66}Ga ($t_{1/2}$ = 9,5 óra) és a ^{68}Ga ($t_{1/2}$ = 68 perc) β^+ sugárzó, ezért a PET képalkotáshoz alkalmas; a ^{67}Ga-mot ($t_{1/2}$ = 78 óra) γ-sugárzó izotóp lévén SPECT képalkotás során használják.

A ^{68}Ga-mot a nukleáris medicinai alkalmazásokhoz egy ^{68}Ge/^{68}Ga generátor-rendszer szolgáltatja. Számos előnye van a ciklotronnal előállítható PET radioizotópokkal szemben:

- könnyen hozzáférhető, egyszerű, kompakt kivitelezés;
- nem igényel olyan infrastrukturális hátteret, mint egy ciklotron – alacsony beüzemelési és működési költségek, fenntarthatóság, helyigény;
- magasan képzett szaktudású emberek jelenléte nélkül is megbízhatóan szolgáltatja az izotópot;
- elérhetőséget teremt PET képalkotás alkalmazásához olyan vizsgálóhelyek számára, amelyek ciklotronnal nem rendelkeznek;
- lehetőséget biztosít preklinikai és klinikai vizsgálatokban való részvételre, ciklotron nélkül is [56].

A ^{68}Ga 89%-ban pozitron kibocsátással és 11%-ban elektronbefogással stabilizálódik. A bomlása során átlagos pozitron energiája 890 keV, maximális pozitron energiája 1899 keV. felezési ideje 67,71 perc. A ^{68}Ge/^{68}Ga generátor-rendszer anyaeleme a ^{68}Ge ($t_{1/2}$ = 270,8 nap), amelyet ciklotron segítségével állítanak elő nagy tisztaságú $^{69}Ga_2O_3$-ból (p,2n) magreakció segítségével. A leányelem, a ^{68}Ga, amelyből bomlása során stabil ^{68}Zn keletkezik [56].

Az első ^{68}Ge/^{68}Ga generátort 1960-ban Gleason és munkatársai állították elő, amely folyadék-folyadék extrakciós technológián alapult, acetil-aceton és ciklohexán alkalmazásával, azonban csak hozzáadott Ga (III)-oldat használatával volt hatékony a Ge/Ga elválasztás [57]. Eredményeiket „A pozitron tehén” címen publikálták. A folyadék-folyadék extrakció limitáló tényezői, valamint a ^{68}Ga-mal jelölt radiogyógyszerek előállításánál támasztott minőségi és tisztasági körülmények miatt – amelyek ennél a rendszernél csak három-négy tisztítási lépéssel érhető el – a szilárd-fázisú technikák alkalmazása irányába mozdították el a további fejlesztéseket [57].

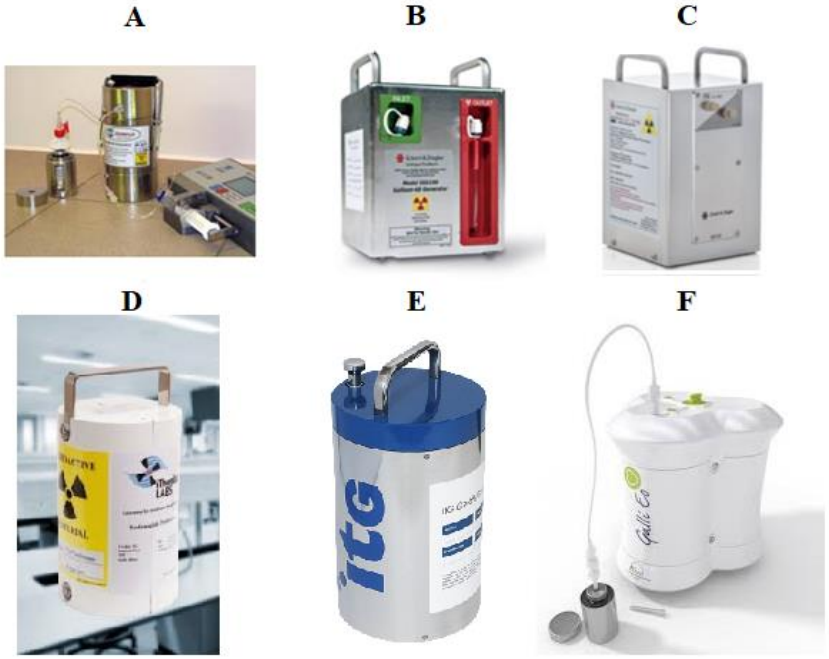
A szilárd-fázisú technikát először alkalmazó generátor töltete Al_2O_3-ot tartalmazott és a ^{68}Ga-mot 10 mL 5 mmol/dm^3 koncentrációjú EDTA oldat (pH = 7,0) alkalmazásával kapták, ^{68}Ga-EDTA komplex formájában, 95%-os hozammal, hozzáadott inaktív Ga (III)-oldat nélkül [58]. A ^{68}Ga-EDTA radiofarmakont agydaganatok megnövekedett véráramlásának a mérésére használták [59;60], azonban a generátor elterjedésének egy leküzdhetetlen hátránya volt. Gyakorlatilag a komplex magas termodinamikai stabilitása miatt ($\log \beta_1 = 21,7$) csak a ^{68}Ga-EDTA szintézisére korlátozódott a felhasználása [58].

Az 1970-es évek végén a ^{68}Ga-mal történő képalkotás megfeneklett, aminek két fő oka volt: egyrészt a generátor felépítése nem tűnt megfelelőnek a különböző ^{68}Ga-mal jelölt radiofarmakonok szintézisére, továbbá klinikai jelentőségük is csekély volt a meglévő technológiák alkalmazásával; másrészt ebben az időszakban párhuzamosan jelentős fejlődést értek el a ^{99m}Tc és a ^{18}F radiojelölt radiofarmakonok fejlesztésében és klinikai alkalmazásaiban.

Ugyanakkor a ’70-es és ’80-as években számos alapvető radiokémiai tanulmány született, amelyekben szervetlen mátrixokat, valamint szerves gyantákat alkalmaztak a ^{68}Ge szelektív adszorbeálására. Ezeken a fázisokon hatékony ^{68}Ga deszorpció volt lehetséges 0,1-1 mol/dm^3 HCl használatával. A fő kihívást az effektív radiokémiai elválasztási módszer kifejlesztése jelentette, amely során a ^{68}Ga-mot kationként nyerik le a generátorról. A fémionként rendelkezésre álló radionuklid már sokoldalú radiojelölést tett és tesz lehetővé mind a mai napig. A Ga (III) kationos formában van jelen például vizes akvakomplexekben. A további fejlesztések során $Me^{IV}O_2$ (Me = Sn, Ti, Zr, Ce) típusú mátrixok és a szerves-gyantát (pirogallol-formaldehid) alkalmazó rendszerek sikeresnek bizonyultak a Ge (IV) kation adszorbeálására és a Ga (III) kation deszorpciójára [61;62;63;64].

Egy gallium generátor alkalmazásánál számos paraméter van, amelyek befolyásolhatják a radiojelölés hatásfokát, a radionuklidos tisztaságot és a moláris aktivitást. Ezen negatív limitáló tényezők – nem beszélve még a sterilitás kérdéséről – meggátolták a humán felhasználásra alkalmas ^{68}Ga-mal jelölt radiofarmakonok előállítását és elterjedését a nukleáris medicina területén. A többféle generátor az eltérő minőségű termékével pedig gátat szab a „kit alapú” radioaktív gyógyszergyártás irányába tett erőfeszítéseknek. A sósav magas koncentrációja megakadályozza a közvetlen felhasználást a radiojelölések során, ezért nagy mennyiségű pufferrel lehet csak beállítani a jelöléshez szükséges pH-át, illetve korábban problémát okozott, hogy az alacsony pH-n a ligandumok vagy bifunkcionális kelátorok funkcionális csoportjai protonálódtak, gátolva ezzel a komplexképződést. A puffer-rendszer alkalmazásának ez csak az egyik oka; a másik, hogy koordinálja és megtartja a Ga (III)-mat oldat fázisban, amely nélkül a Ga (III) $Ga(OH)_3$ csapadékként lenne jelen 3-7 közötti pH tartományban [65]. Számos puffert teszteltek e célok megvalósítása érdekében, ilyenek például a HEPES 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etán-szulfonsav, NaOAc, oxalát, szukcinát, tartarát, formiát, glutamát és laktát [66;67]. E vegyületek közül a HEPES biológiailag kompatibilis puffer és a kísérletek során is jól teljesített, hiszen magas radiokémiai hozamot (> 95%) és moláris aktivitást értek el a használatával, azonban gyógyszerbiztonsági szempontból problémás az alkalmazása. Jelenleg a gyógyszerkönyvben még nem szerepel, így klinikai

felhasználása során további tisztítási és minőségellenőrzési méréseket von maga után, amennyiben mégis az alkalmazása mellett döntenek. A gyógyszerkönyvben jegyzett NaOAc puffer-rendszert használják általánosságban a radiokémiai gyakorlatban [48].



3. ábra: **Kereskedelmi forgalomban kapható ^{68}Ge/^{68}Ga generátorok:** *A:* Cyclotron Co. (Oroszország) (Eckert & Ziegler az európai forgalmazó); *B:* Eckert Eckert & Ziegler IGG100 (Németország); *C:* Eckert & Ziegler IGG101, Pharm. Grade (Németország), *D:* iThemba LABS (Dél-Afrikai Köztársaság); *E:* Isotope Technologies Garchnig (Németország); *F:* Galli Eo (Belgium).

A kromatográfiás oszlopok kapcsán fontos a magas radionuklidos tisztaság. Kardinális problémát jelenthet ugyanis a ^{68}Ge áttörése az eluált oldatban, hiszen az anyaelem hosszú felezési ideje (270 nap) radiotoxicitási problémákat okoz a humán felhasználás során, így ezt orvosolni kellett a Pharm. Grade engedéllyel rendelkező generátorok esetében. Továbbá a kromatográfiás oszlop anyagából származó fémionok (Sn, Ti) is negatív hatást gyakorolnak a jelölés során [53;68;69], valamint egyéb szennyeződések, mint pl. Fe (III), illetve az Al (III) ionok – amelyek a generátor szerkezeti elemeiből, vagy az egyéb felhasznált vegyszerekből kerülhetnek bele a reakcióelegybe – jelenlétét minimalizálni kell. Ezek a fémek hasonló fizikai-kémiai tulajdonságaik miatt, versengő fémionná válhatnak a kelátorok komplexálásánál a Ga-mal szemben. Ezen kívül – ha nem is feltétlenül humán alkalmazásra szánják a radioligandumot

–, a Zn (II) hátrányosan befolyásolja a ^{68}Ga-jelölési hozamokat és a moláris aktivitást. Mivel jelentős mennyiségű Zn (II) keletkezik a ^{68}Ga lebomlásából, ezért a generátort állás után „tisztító elúcióval" kell használható állapotba hozni, jellemzően legfeljebb 24 órával a szintézis megkezdése előtt.

A Pharm. Grade gyártási engedéllyel rendelkező, kereskedelmi forgalomban kapható generátorok (3. ábra) esetében a fent említett limitáló tényezőket a fejlesztéseik során kiküszöbölték, azonban a hatósági követelmények igényeinek való megfeleléséhez, valamint a jelölési hatékonyság növelése érdekében – amely célja a moláris aktivitás és a kvantitatív komplexálási reakció elérése –, illetve a radionuklid koncentrálása érdekében az irodalomban három Ga utófeldolgozási lépést is kidolgoztak:

Anioncserés tisztítás: Ennél az eljárásnál a generátor termékét, amely 10 mL, 0,1 mol/dm^3 sósav-eluátum, 15 mL 9,5 mol/dm^3 HCl-dal elegyítik, ennek következtében a sósav végső koncentrációja 5,5 mol/dm^3 lesz. Ilyen körülmények között a gallium már anionos komplexként van jelen $[GaCl_4]^-$. Erős anioncserélő oszlopot (SAX; AG 1-X8) alkalmaznak, amely képes immobilizálni az aniont, miközben a szennyező pozitív töltésű fémionok visszatartás nélkül átjutnak a kromatográfiás oszlopon. Ezt követően az 1 mL 5,5 mol/dm^3 sósavval történő mosási lépés után a gyantát N_2 gázzal átfújják, majd az aktivitást kis mennyiségű vízzel visszanyerik. A módszer előnye, hogy a ^{68}Ge elválasztása jó hatásfokkal történik, magas aktivitás-koncentráció érhető el a kis térfogatú vizes elúció miatt, azonban nem alkalmas az összes fémszennyeződés pl.: Zn(II) és Fe(II) eltávolítására [70].

Kationcserés tisztítás: Főként olyan generátorok esetében alkalmazható, amelyeknél az eluáló oldat 0,1-0,05 mol/dm^3 HCl. A folyamatnál erős kationcserélő oszlopot (SCX; AG 50W-X8) használnak, amely a kezdeti generátor eluátum – ^{68}Ga tartalmának – >99%-át képes adszorbeálni, ezzel a lépéssel a $^{68}Ge^{IV}$-tól sikeresen elválasztják, hiszen a gyantán átfolyt folyadékfázisban marad, visszatartás nélkül átjut az oszlopon. A még esetlegesen megmaradt zavaró fémszennyeződésektől 80% aceton/0,15 mol/dm^3 HCl elegyével tisztítják a ^{68}Ga-mot, majd ezt követően 98% aceton/0,05 mol/dm^3 HCl elegyével nyerhető vissza a termék. A módszer előnye a kis térfogatú elúció, a tisztítás gyorsasága – mindössze 4 percet vesz igénybe az egész folyamat –, továbbá szinte teljes mértékben eltávolítja a fémszennyeződéseket, beleértve a ^{68}Ge-mot is. A folyamat hátrányaként említhető a reakcióelegyben lévő magas aceton tartalom, azonban ennek a negatív hatása (toxikus anyag) a radiojelölés további szakaszában kiküszöbölhető, a formulázási lépésnél [71].

Frakcionált elúció: Az egyik legegyszerűbb módszer. Az alapját az képezi, hogy a radionuklid koncentráció-profilja nem egyenletes az elúció során, ráadásul ez a profil eltér a potenciális szennyező fémionok karakterisztikájától. A generátor elúciója során frakciókat gyűjtenek, majd a legtöményebb aktivitás-koncentrációjú frakciót használják a további radiojelölési lépés folyamán, amely a teljes aktivitás kb. 2/3-a, a térfogata 1-2 mL. Ebben az esetben a $^{68}Ge^{IV}$ és a fémszennyeződések összemennyisége csökken, az alacsonyabb térfogatnak köszönhetően, valamint további előnye a módszer egyszerűségében rejlik. Hátránya, hogy a generátor teljes aktivitás-kapacitását nem lehet felhasználni [72].

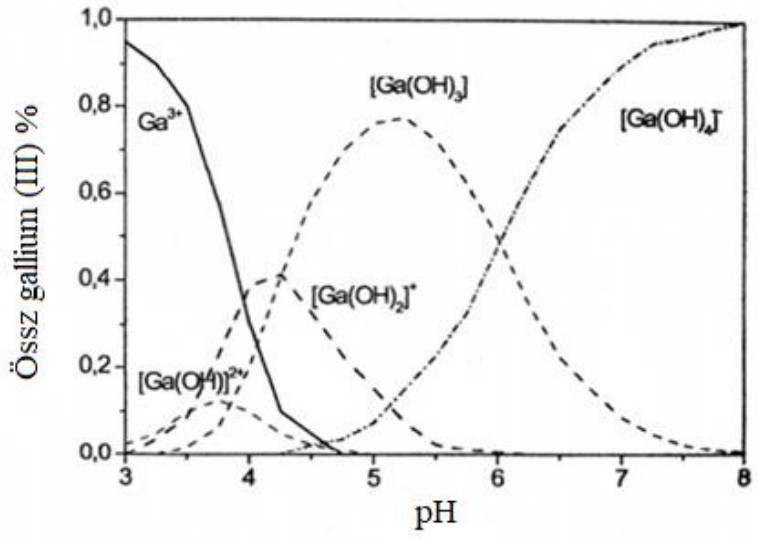
3.2.2 A gallium kémiája

A gallium a periódusos rendszer 31. kémiai eleme, a harmadik periódusban és a 13. csoportban található, vegyjele Ga. Létezését Dmitrij Mengyejelev, a periódusos rendszer megalkotója, 1871-ben előre megjósolta, számításai és feltételezett tulajdonságai alapján „eka-alumíniumnak" (alumínium alatti) nevezte el. Végül Paul-Émile Lecoq de Boisbaudran 1875-ben azonosította a szfaleritből spektroszkópiai mérések segítségével. A felfedezett elemnek a gallium nevet adta, egyes források szerint hazája, Franciaország tiszteletére. Érdekesség, hogy Mengyelejev 1871-ben közétett periódus rendszere az akkori tudós társadalom körében nem volt teljes mértékben elfogadott, sokan csak a gallium felfedezése után tekintették valósnak és megalapozottnak az alkalmazását.

A gallium elektron konfigurációja ([Ar] $3d^{10}$ $4s^2$ $4p^1$), a 3d alhéj már telített, viszont a 4-es főkvantumszámú héjon három elektron található, ezért vegyületeiben leggyakrabban a +3-as oxidációs számmal rendelkezik. Előfordulnak +1-es oxidációs számú vegyületei is, amelyek bomlékonyak, ezért meglehetősen ritkák. A harmadik periódus elemeihez hasonlóan a Ga (III) hard sav, főként ionos és apoláris Lewis-bázisokkal képez sókat. Az ionsugara 62 pm, elektronnegativitása 1,81 (Pauling-skála), p*K*a = 2,6 [73;74].

A Ga (III) egyik fő jellemzője a vizes hidrolízis iránti nagy érzékenysége savas és lúgos pH értékeknél egyaránt. Vizes oldatban pH = 3-ig döntően kationos formában van jelen, majd magasabb pH-án a gallium különböző hidroxo-komplexei jelennek meg (4. ábra). Számos különféle alacsony oldhatóságú forma található pH = 3,5-7,5 között, amelyek hajlamosak kolloid vagy pszeudo-kolloid csapadékot képezni. Az ismételten jó oldhatósággal rendelkező, stabil gallát $[Ga(OH)_4]^-$ anion pH = 7,4-9 között kezd el képződni. Ebben a formában a gallium nagyon lassú ligandum cserére képes más komplexképző anyagokkal, ezért a transzkelálódás

nehezen valósítható meg. Radioaktív nyomjelzési reakciók során szükséges a fémiont „védeni” a nukleofilek támadásától [75].



4. ábra: A gallium különböző formái vizes oldatban a pH függvényében [76]

3.2.3 A gallium koordinációs kémiája

A Ga (III) kation számos makrociklusos és nyílt láncú kelátorral képes stabil komplexet képezni. Ezekben a komplexekben a gallium általában 4-6-os koordinációval rendelkezik [77]. Bár a nukleáris medicinai gyakorlatban a DOTA kelátorral kapcsolatban használják a legtöbbször, az ion viszonylag kis méretének köszönhetően inkább a kisebb üregméretű kelátor gyűrűkkel képez extrém stabil komplexeket. A gallium ion fizikai-kémiai tulajdonságai alapján hard donoratomokkal rendelkező vegyületekkel képez stabil koordinációs kötéseket, ilyen donoratomok lehetnek például az oxi- és aminocsoportok. A makrociklusos származékokban a központi ion 6-os koordinációs számmal rendelkezik és torzult oktaéderes geometriát alakít ki. Minél kisebb a torzulás mértéke, általában annál nagyobb a termodinamikai stabilitás [78;79].

A kelátorokat szerkezetük alapján két nagy családba szokták osztani, nyílt láncú (vagy aciklusos) és gyűrűs (vagy makrociklusos) típusokat különböztetnek meg. A korábbi kutatási eredmények, amelyek kelátorok tervezéséről és tulajdonságaik összehasonlításáról szóltak, rámutattak arra, hogy a makrociklusok általában nagyobb kinetikai inertséggel bírnak, míg a két csoport közel hasonló termodinamikai stabilitással rendelkezik [80;81;82]. A makrociklusos kelátorok esetében makrociklusnak nevezik azt a központi szerkezeti egységet, amiben a fémion elhelyezkedik, az aciklusosak estében a fémiont ilyen gyűrű nem öleli körül, viszont emiatt általában kisebb energia kell a kelát kialakításához. A makrociklusok esetében a

funkciós csoportok és a kialakult gyűrű mérete szelekciós hatással rendelkezik a fémionok komplexálása során [83].

Olyan kutatásokat is végeztek, amely során vizsgálták a $^{68}Ge/^{68}Ga$ generátor eluátum szervezeten belüli eloszlását 21 hím és 21 nőstény patkány bevonásával. A mérések során 0,5 mL $^{68}GaCl_3$ oldatot injektáltak intravénásan az állatokba (47 ± 4 MBq). A ^{68}Ga a vizeletkiválasztó rendszeren keresztül ürült ki a szervezetből. A nőstény és hím patkányok ^{68}Ga adataiból extrapolálva a becsült effektív dózis egy 57 kg tömegű nő esetében 0,0308 mSv/MBq, míg egy 70 kg tömegű férfinél 0,0191 mSv/MBq dózisterhelést okoz [84].

Fiziológiás körülmények között a vas szállítására specializálódott fehérjék potenciális célpontjai lehetnek a nem koordinált $^{68}Ga^{3+}$-nak, mivel a radionuklid és a Fe^{3+} fizikai-kémiai tulajdonságai hasonlóak, valamint koordinációs kémiájuk is nagyjából megegyező. Emellett ionsugaruk közel azonos: a gallium ion sugara 62 pm, a vasé 65 pm. Ezért a plazmában jelen lévő Fe^{3+}-at kötő fehérjék, a transzferin, laktoferin és ferritin nagy affinitást mutatnak a Ga^{3+} irányába ($\log \beta_1 = 23,7$) [85]. Egy esetleges, nem kívánt ligandum csere a Fe^{3+} és $^{68}Ga^{3+}$ között, a $^{68}Ga^{3+}$ felhalmozódását okozná a májban és a tüdőben, ezzel jelentős dózissal terhelné ezeket a szerveket, valamint csökkentené a képalkotás kiértékelhetőségét [86].

3.3 Makrociklusos kelátorok

A DOTA, az egyik legszélesebb körben alkalmazott kelátor, amelyet számos radiofém esetében felhasználnak. Alkalmazása a ^{68}Ga-alapú radiojelöléseknél is gyakori, különösen a régebbi fejlesztésű radiofarmakonok esetében, amelyek a humán klinikai vizsgálatokban, illetve a rutin betegvizsgálatokban szerepelnek. Talán legismertebb példaként említhetjük a szomatosztatin receptort fokozottan expresszáló neuroendokrin tumorok kimutatásra alkalmas ^{68}Ga-mal jelölt DOTA-TOC, DOTA-NOC és DOTA-TATE vegyületeket [87]. Az 5. ábrán néhány makrociklusos kelátor szerkezeti képlete látható.

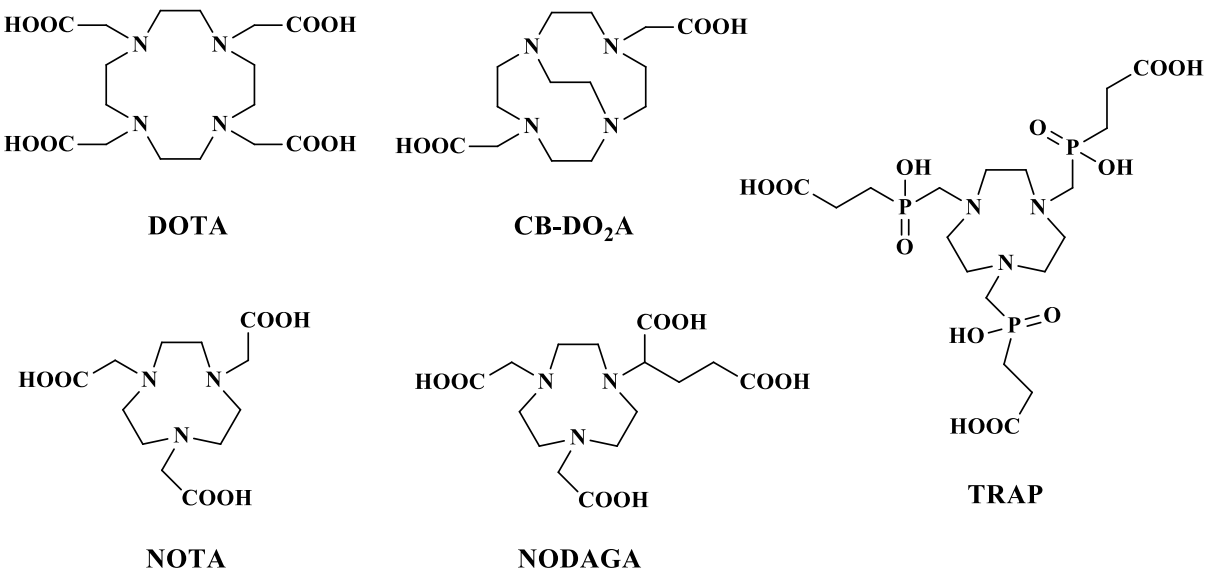
A DOTA ^{68}Ga-mal alkotott komplexének kialakításában a makrociklus N-atomjai és a karboxil csoport O-atomjai játszanak szerepet (N_4O_2), a kétszeresen deprotonált $[Ga(H_2DOTA)]^+$ szerkezet erősen torzult oktaéderes geometriát mutat [88]. A torzulást a viszonylag nagy gyűrűméret eredményezi, és ennek következtében a termodinamikai stabilitás ($\log \beta_1 = 21,3–26,1$) viszonylag alacsony. A kereszthidakkal ellátott DOTA (CB-DO_2A, 4,10-bisz[karboximetil]-1,4,7,10-tetraazabiciklo[5.5.2]tetradekán) kifejlesztése javított ezen az

értéken, mivel a Ga-N és Ga-O kötési távolságok csökkentek a kereszthidak által, minek következtében a kötési szögek közelebb kerültek az ideálishoz [89].

A piridin-tartalmú DOTA származék, a PCTA (3,6,9,15-tetraazabiciklo[9.3.1]-pentadekán-1(15),11,13-trién-3,6,9,-triecetsav), egy eredetileg lantanoidák komplexálására kidolgozott kelátor, amelyet MRI kontrasztanyagok előállításánál használtak. A ^{68}Ga-mal történő radiojelölését a p-NO_2-Bn-PCTA kelátorral tesztelték és kvantitatív jelölést (98,9%) értek el (20 μmol/dm^3 kelátor, 5 perc) szobahőmérsékleten történő reakcióban. Az így elkészült radioligandumok kinetikailag stabilnak bizonyultak az apo-traszferinnel történő kompetíció során [90; 91].

Azt láthatjuk tehát, hogy bár találunk példát a DOTA kelátorok biológiai felhasználására ^{68}Ga-mal, illetve bizonyos hordozók esetében ki is elégíti azokat a követelményeket, amelyeket támasztanak vele szemben, azonban mégsem mondható ideális választásnak minden típusú radioligandumhoz. A legfontosabb korlát a felhasználása során, hogy hatékony radiojelölést csak emelt hőmérsékleten lehet megvalósítani vele (95 °C), ezért hőre érzékeny biológiai vektorok esetében – ilyenek például az antitestek – nem alkalmazható. A gyűrű méretét (tetraazaciklododekán-TACD) csökkentve készült el egy új kelátor család, amelyet NOTA típusú kelátoroknak neveztek el, ez már központi szerkezeti elemként triazaciklononán-gyűrűt (TACN) tartalmaz [92]. A TACN gyűrűt alapul véve számos vegyületet dolgoztak ki, amelyek az oldalláncok kémiai szerkezetében különböznek. Ilyen kelátorok pl: a 1,4,7-triazaciklononán-1-borostyánkősav-4,7-diecetsav (NODASA) [93], 1,4,7-triazaciklononán-*N',N'',N'''*-tris(metil-foszfinsav) (NOTP) [94], 1,4,7-triazacikononán-*N',N'',N'''*-trisz(metilén-foszfonát-monoetilészter) (NOTPME) [95], 1,4,7-triazaciklononán,1-glutársav-4,7-diecetsav (NODAGA) [96].

Ezek a kelátorok már sokkal hatékonyabbnak bizonyultak a Ga^{3+} felhasználás szempontjából. A megfelelőbb gyűrűméret következtében a kötések feszültsége csökkent, ezért a [Ga(NOTA)] komplex termodinamikai stabilitása (log β_1 = 29,0-31,0), körülbelül kilenc nagyságrenddel nagyobb, mint a [Ga(DOTA)]-é [97]. A NOTA kelátorral végzett kísérleti munkában kvantitatív radiojelölés érhető el ^{68}Ga-mal (5 μmol/dm^3, 5 perc, 25 °C), ezzel szemben hasonló körülmények között a DOTA nagyjából 20%-os hozamra volt képes [98,99]. A különbözőség okainak kiderítése céljából ^{71}Ga NMR spektroszkópiás mérésekkel vizsgálták a [Ga(NOTA)] térszerkezetét. A komplex torzult oktaéderes geometriáját ebben az esetben is azonosították, amely az N_3O_3 donoratomok koordinációjával létrejövő szerkezet. Viszont a kötési szögek mindössze 5-8°-kal térnek el az ideális 90°-os oktaéderes állapottól [100].



5. ábra: Gyűrűs kelátorok szerkezeti képlete

A TACN-gyűrű felhasználásával, de foszfonát- és foszfinátot tartalmazó oldallánccal is készültek kelátorok. Ennek a fejlesztésnek a fő hajtóereje az volt, hogy mint korábban láttuk, a sikeres komplexáláshoz szükség van a karboxil csoportok deprotonálódására. Ehhez viszont magasabb, mint pH > 4 érték szükséges, amely értéken a gallium (III) kationos formában nem kedvezményezett, ezért a jelölési reakciók versenyeznek a hidroxo-komplexek képződésével. Mivel a foszfonsavak erősebb savak a karbonsavaknál, ezért már alacsonyabb pH-n elérhető a deprotonálódás, aminek következtében hatékonyabb radiojelölési reakciókat várhatunk a savas tartományban is. Az új fejlesztésű vegyületek közül talán a TRAP (triazaciklononán-foszfinsav) az egyik legismertebb. Ennél a vegyületnél a NOTA-hoz képest a karbonsav csoportokat foszfinátokra cserélték, s így ezekkel történik meg a komplexképződés [101]. A TRAP Ga (III)-mal termodinamikailag stabil komplexet képez (log β_1 = 26,2) szobahőmérsékleten, továbbá magas radiokémiai hozam érhető el alacsony, nM-os prekurzor koncentráció mellett, ami kiemelkedően magas moláris aktivitást eredményez [102].

3.4 Aciklusos kelátorok

A nukleáris medicinában alkalmazott kelátorok másik csoportja az úgynevezett aciklusos kelátorok. Bár az általános vélekedés szerint ezek a típusú vegyületek nem képesek elegendően stabil komplexeket képezni az *in vivo* alkalmazás megvalósítására, továbbra is érdeklődésre tartanak számot, hiszen a gyors komplexképzés szobahőmérsékleten egy olyan vonzó tulajdonság, ami miatt kutatásuk nem állt le. Az eddigi erőfeszítések első eredményei már be is értek, egy HBED (*N'*,*N'*-bisz-[2-hidroxi-5-(karboxietil)benzil]etiléndiamin-*N'*,*N'*-diecetsav)-

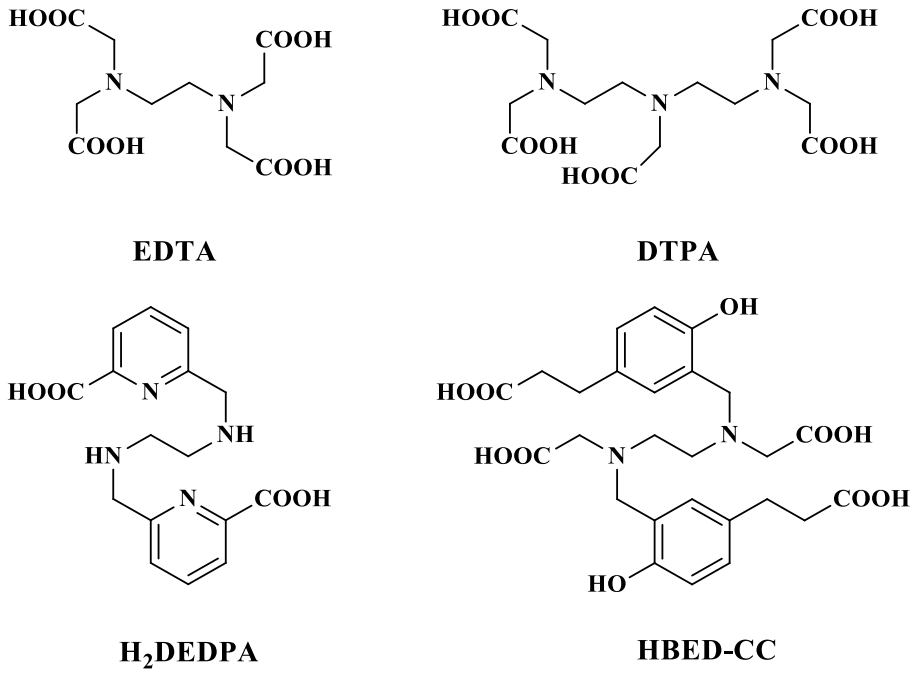
konjugált radiofarmakon napjainkra kivívta helyét a rutin PET-képalkotás területén. A PSMA-11 HBED-CC-vel konjugált származéka a ^{68}Ga-HBED-CC-PSMA, egy prosztata daganatok feltérképezésére, valamint a terápia utáni kiújulás nyomon követésre alkalmazott radiogyógyszer. A HBED-CC galliummal történő komplexképződés során diasztereomereket képez, amely származékok NMR mérések során azonosíthatók. A diasztereomerek egymáshoz viszonyított aránya függ a reakciókörülményektől, mint például a hőmérséklet és a reakcióidő. Ezen paraméterek ideális alkalmazásával a termodinamikailag kedvezőbb állapotú diasztereomer irányába tolódik el a komplexképződés. Tudományos eredmények a PSMA-val történő alkalmazása során azt bizonyítják, hogy a másik két diasztereomer jelenléte nem befolyásolja negatív irányba a képalkotást [103;104]. A HBED gallium-komplexe kiemelkedő termodinamikai stabilitással rendelkezik (log β_1 = 38,5-39,6) [105]. A ^{68}Ga jelöléseknél szobahőmérsékleten, magas moláris aktivitással rendelkező, kvantitatív módon jelölt HBED-konjugált biológiai vektorokat lehet előállítani (2,7 μmol/dm^3, 142 GBq/μmol), amelyeknek a kinetikai stabilitása is kiemelkedően magas. A leggyakoribb bifunkciós – tehát a hordozóhoz kötődést elősegítő funkciós csoporttal módosított – HBED-származék a HBED-CC, amely etilén-karbonsav-csoportokat tartalmaz, amelyek para-fenol-hidroxil csoporthoz kapcsolódnak [106;107].

Az acikusos kelátorok alkalmazásának előnye különösen rövid felezési idővel rendelkező radiofémek esetén mutatkozhat meg a legjobban, hiszen a gyors kinetika – a hasonló stabilitású makrociklusokhoz viszonyítva – gyorsabb radioaktív jelölést eredményez [108;109]. A már említett származék mellett pl. a H_2dedpa (1,2-[[6-karboxipiridin-2-il]metil-amino]etán magas termodinamikai stabilitású komplexeket képez a ^{68}Ga-mal. A komplex képzéséhez, két karboxilát, két piridin-N donor-atom veszi körbe a központi fémiont, és a származék termodinamikai stabilitása magasabb (log β_1 = 28,1), mint a DOTA kelátoré (közel hasonló a NOTA értékével). A tesztek során szobahőmérsékleten kvantitatív radiojelölés volt elérhető 10 perc alatt. A [Ga(dedpa)]$^+$ szerkezete is torzult oktaéderes geometriát mutat, magas kinetikai stabilitással rendelkezik, amelyet apo-transzferinnel történő kompetíciós-mérések során bizonyítottak. Farmakokinetikai tulajdonsága alapján a vesén keresztül ürül ki a nem célzott szövetekből [110].

A DTPA nyílt láncú kelátor alkalmazhatóságát is vizsgálták ^{68}Ga-mal. Viszonylag alacsony stabilitási állandót kaptak (log β_1 = 24,3) és a komplex disszociációja hátrányos a biológiai felhasználás szempontjából, ezért napjainkban már nincs jelentősége a gallium-alapú radiokémiában [111].

Az L_1 - egy biszpidin-alapú aciklusos kelátor, amely ötfogú vagy ötkarú ligandumként a diazabiciklonán két aminján, a piridil két nitrogénjén és az acetát csoportján keresztül komplexálja az adott fémiont. A nyíltláncú L_1 kelátor komplexképzési tulajdonságait először a ^{64}Cu radiofémen tesztelték. Az eredmények kapcsán ismertették, hogy hatékony (90%) radiojelölést értek el (5 * 10^{-6} mol/dm^3, 5 perc) szobahőmérsékleten [112]. A pozitív tapasztalatok után, a ^{68}Ga-mal történő radiojelölés során is vizsgálták a kelátor teljesítőképességét. Azonban az eredmények azt tükrözték, hogy csak emelt hőmérséklet mellett sikerült elérni közel kvantitatív radiojelölési hatásfokot (94%, 200 μmol/dm^3), amelyet a kelátor merev szerkezetével magyaráztak [113].

A 6. ábrán néhány nyílt láncú kelátor szerkezeti képlete látható.

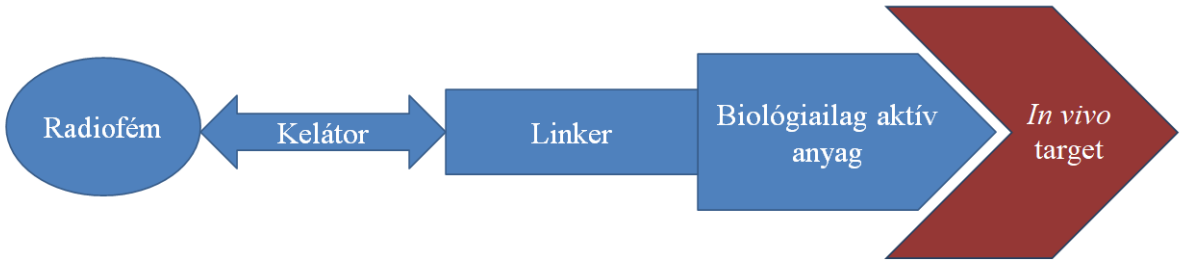


6. ábra: Nyílt láncú kelátorok szerkezeti képlete

3.5 Bifunkciós kelátorok építésének szempontjai

Ahhoz, hogy a megfelelő radiofémet egy biológiailag aktív molekulához kapcsolják, szükséges, de nem elégséges feltétel a molekula jó komplexképző tulajdonságának megléte. Éppen ezért a ^{68}Ga-alapú radiogyógyszer-jelölt vegyületek fejlesztésének egyik alapvető fontosságú eleme, hogy optimális bifunkciós kelátorok (BFC) álljanak rendelkezésre. Ezeknek a szerkezeti elemeknek a fémek koordinációja mellett azt is biztosítaniuk kell, hogy stabil kovalens kötéssel lehessen őket rögzíteni a hordozóhoz. Amennyiben a biológiai vektor több

reaktív funkciót is tartalmaz, akkor pedig különösen nagy jelentősége lehet a különböző kemoszelektív funkciós csoportoknak, hogy a sztereospecifikus kapcsolás könnyen megvalósítható legyen. A bifunkciós kelátorok tehát olyan ligandumok, amelyeket a radiofém-alapú radiofarmakonok előállítása során a részletezett kettős szereppel bírnak, ugyanakkor ezen felül tulajdonságaikkal a farmakokinetikai módosító szerepét is betölthetik. A BFC-ken általános használt funkciós csoportok lehetnek karbonsavak, anhidridek vagy aktivált észterek (pl.: *N*-hidroxi-szukcinimid NHS-észter, TFP-észter), amelyek, amid kötés kialakítására alkalmasak. Szintén gyakori amin-szelektív funkciós csoport az izotiocionát, amely tiourea kötést eredményezhet. A maleimideket tiol-szelektív funkciós csoportként alkalmazzák, amely tioéter kötés kialakításához használhatók. Napjainkban egyre inkább népszerű kapcsolási eljárás a kelátorok konjugálásánál a „Click" kémia témakörébe tartozó reakciók – egyaránt használható a réz (I) katalizált Huisgen 1,3 dipoláris cikloaddíció, de gyakori megoldás a rézmentes, gyűrűfeszültség katalizált azid-alkin cikloaddíció, illetve az inverz elektronigényű Diels-Alders reakció is [114;115]. A 7. ábrán egy radiofém-jelzett biológiailag aktív molekulának az általános felépítése látható.



7. ábra: Radiofém-jelzett biológiailag aktív molekula általános felépítése

A BFC kiválasztásakor az ideális jelöltnek a következő követelményeknek kell megfelelnie [116]:

1: Termodinamikai stabilitás és kinetikai inertség – A BFC-nek termodinamikailag stabilnak és kinetikusan inert komplexeket kell képeznie az alkalmazni kívánt radiofémmel, hogy elkerülhető legyen a ligandumok cseréje vagy a hidrolízis *in vivo* körülmények között, ezzel elkerülve, hogy a nem célzott szövetek feleslegesen dózisterhelést kapjanak.

2: Gyors komplexképződési kinetika – A BFC radioaktív jelölésének hatékonynak és gyorsnak kell lennie mérsékelt hőmérsékleten és alacsony koncentrációban, olyan pH-n, amely a biológiai célvektorhoz megfelelő.

3: Szelektivitás – A BFC-nek lehetőség szerint szelektíven kell megkötnie a jelöléshez használt fémiont. A radioaktív munkavégzés során az izotóp rendkívül kis koncentrációban van jelen a reakcióelegyben. Ezzel szemben a bomlástermékek, vagy a kromatográfiás oszlopról származó szennyező fémionok mennyisége lényegesen magasabb lehet. A szelektivitással elkerülhető, hogy a versengő szennyező fémionok lerontsák a jelölés hatásfokát, ezzel pedig csökkenteni lehet a kvantitatív jelöléshez szükséges ligandum-koncentrációt. A szelektivitás ezért a magas moláris aktivitás elérésének egyik kulcskérdése (lásd: *3.2.1* fejezet).

4: Sokoldalú konjugációs kémia – A BFC konjugációjának rugalmassága a célvektorokon előforduló funkciós csoportokon lehetővé teszik azok sokoldalú felhasználását, kombinálásukkal a farmakokinetika optimalizálását a konjugátum polaritásának beállításával.

5: Hozzáférhetőség – A BFC előállításának lehetőség szerint egyszerűnek, gyorsnak és költséghatékonynak kell lennie, a kapcsolási reakció elvégzése ne igényeljen specifikusan képzett személyzetet.

A radiofémet és a kelátort tartalmazó molekula szerkezete és tulajdonságai nagy hatással vannak a radiogyógyszer általános farmakokinetikai viselkedésére. Ilyen sajátság az általában tapasztalt erős hidrofilicitás, amelynek következtében a farmakonok kiürülése döntően a vesén keresztül történik meg. Amennyiben a hordozó molekula kis molekulatömegű (pl.: peptid, nukleotid), akkor a kelátorok megváltoztatása drasztikus hatást gyakorolhat a biológiai eloszlásra [117;118]. Fontos szempont a megfelelő kelátor kiválasztása abból a szempontból is, hogy a már egyszer komplexált radiofémnek a biológiai rendszerben kötve kell maradnia a hordozó molekulához, tehát a komplex kinetikai stabilitásnak elegendőnek kell lenni a transzkelálódási folyamatok kivédésére.

3.6 Melanoma malignum

A melanoma malignum a bőrdaganat egyik formája a basalioma és a spinalioma mellett. A melanoma egy olyan rosszindulatú daganat, amely a bőr pigmenttermelő sejtjeiből (melanocyták) indul ki, és bár az esetszámokat tekintve a malignus bőrelváltozások közül a legkevésbé elterjedt forma, azonban a legnagyobb mortalitással rendelkezik [119].

A melanoma kialakulásának – és előfordulásának leggyakoribb helye a bőr, bár elvétve előfordulhat primer melanoma tumor más szervekben (szem-, száj- és orrnyálkahártya, női szeméremtest, végbélnyílás, gyomor-bélrendszer és központi idegrendszer). Jelenleg évente világszerte kb. 132.000 melanoma tumoros betegség fordul elő, amely szám folyamatos

növekedést mutatott az elmúlt évtizedekben. Egy fontos rizikó faktornak tekinthető a napégés. Az emberek napozás közben – bár a jelenlegi egészségkultusz pozitív hatásokkal kapcsolja össze – nem számolnak napjaink egyik legfontosabb környezetvédelmi problémájával, az ózonréteg elvékonyodásával. Mivel a földfelszínt egyre több UV-sugárzás éri, ezért a korábban veszélytelennek gondolt napozásnál is fontos a mértékletesség elvét figyelembe venni. Egyes mérések szerint az ózonréteg 10%-os csökkenése világszerte 4500 új melanomás esetet eredményez évente [120].

A melanocyták a bőr felső rétegében található bőrsejtek, melanin pigmentet állítanak elő, amely a bőr színéért felelős. Háromféle melanin létezik: az eumelanin, pheomelanin és a neuromelanin. Amikor a bőrt UV-sugárzás éri napozás, napégés vagy szolárium következtében, akkor az olyan bőrkárosodást okoz, amely a melanocyták nagyobb melanin termeléséhez vezet. Ilyenkor csak az eumelanin-pigment termelődik. Ez a folyamat próbálja megvédeni a bőrt, ami a bőr elsötétüléséhez, lebarnulásához vezet. Melanoma malignum akkor jelentkezik, ha a napégés vagy barnulás következtében DNS-károsodás történik és az UV-sugárzás változásokat (mutációkat) idéz elő a melanocyták termelésében, amely szabályozatlan sejtnövekedést eredményez. A természetesen sötétebb bőrű emberek több eumelanin pigmenttel rendelkeznek, míg a világosabb, fehér bőrű embereknél a pheomelanin van többségben jelen. Míg az eumelanin képes megvédeni a bőrt a nap káros hatásaitól, addig a pheomelanin nem. Ez az oka annak, hogy a sötétebb bőrű embereknél alacsonyabb a melanoma kialakulásának kockázata, mint a fehér bőrűeknél [119;121].

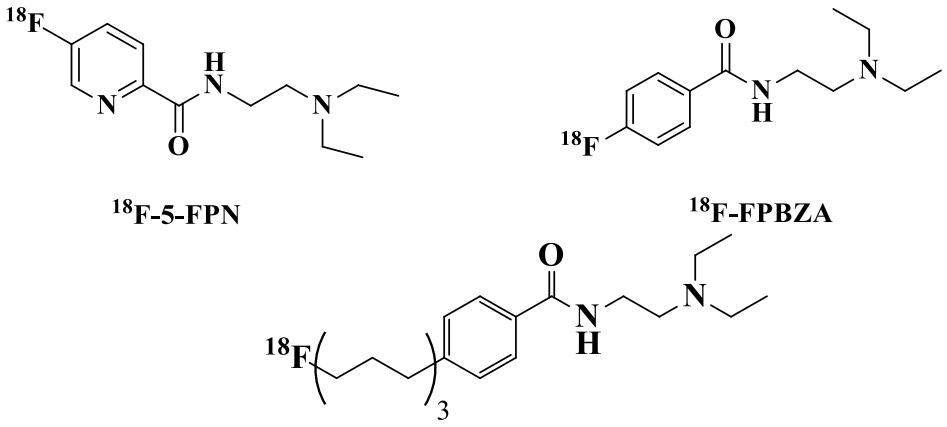
A melanoma korai felismerése óriási jelentőséggel bír a gyógyulás szempontjából, mert a melanoma az egyetlen olyan rosszindulatú daganat, amelyet, ha a betegség kezdeti szakaszában megfelelően eltávolítanak, akkor valószínűsíthető a teljes felépülés, további alacsony mortalitás mellett [122]. A tumor a bőr hámrétegében jelenik meg először, még nem érintve a nyirok- és véréreket, ez az úgynevezett *in situ* stádium vagy 0. stádium. Ennek a kórállapotnak a diagnosztizálása után, a sebészei beavatkozást követően a melanoma kiújulásának kockázata 3-5% [123].

Annak ellenére, hogy folyamatos szűrőprogramok állnak rendelkezésre az elsődleges, primer daganat korai felismerésére és sebészi úton történő eltávolítására, mégis egyre inkább növekszik a betegség előrehaladott stádiumában lévők száma. A melanoma agresszivitása abból adódik, hogy képes gyorsan növekedni a helyi kapillárisok felé, majd távoli áttéteket képezni több szervben (pl.: tüdő, agy, vesék, máj és bél) [124]. Melanoma tumoros megbetegedésnél a metasztázisok nagymértékben csökkentik a túlélés időtartamát (az ötéves túlélési arány 5-19%

között van) [125]. Az előrehaladott állapotban lévő melanomás betegek kezelési módja jelentősen megváltozott az elmúlt 10 évben a melanoma molekuláris patogenezisének fokozatos megértésével. Új módszerek jelentek meg e területen is, mint például a már említett (lásd: *3.1.1* fejezet) célzott terápiák, amelyek citosztatikus anyagok segítségével gátolják a daganat sejtosztódását. Új irány az immunterápiák alkalmazása, amikor a tumorellenes immunitást próbálják fokozni. Ezen eljárások kapcsán új vegyületek jelentek meg, amelyek célja a betegség minél hatékonyabb feltérképezése. [126;127].

3.6.1 Melanoma malignum kimutatására alkalmas PET-radiofarmakonok

Rutin klinikai alkalmazásban, a PET képalkotó vizsgálatokhoz a nem specifikus tumor-markert – a ^{18}F-FDG-t használják még mindig a leggyakrabban [128]. Ennek ellenére egy tanulmány már rávilágított arra, hogy a ^{18}F-FDG-vel végzett PET vizsgálat nem mindig képes kimutatni a melanoma malignum meglétét olyan betegekben, akiknél biopsziával pozitív őrszem-nyirokcsomót azonosítottak [129]. Továbbá, a ^{18}F-FDG-vel alacsony valószínűséggel sikerült kimutatni tüdő- és agyi áttéteket az előrehaladott melanoma tumoros betegek esetében [130]. Jelenleg, a gadolíniummal végzett MRI a legérzékenyebb és reprodukálható eredményeket felmutató módszer az agyi metasztázisok kimutatására, valamint egy adott kezelés nyomon követésére daganatos betegséggel küzdő emberek körében, így a melanomában szenvedő pácienseknél is [131].



^{18}F-5-FPN **^{18}F-FPBZA**

^{18}F-DAFBA

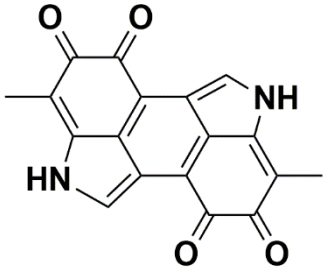
8. ábra: Melanom malignum kimuatatására alkalmas PET-radiofarmakonok

Az utóbbi időben [132], – köszönhetően a megnövekedett esetszám következtében kialakult érdeklődésnek –, számos radioaktívan jelzett hordozómolekulát teszteltek melanoma malignum képalkotó vizsgálatának céljából (8. ábra), hogy a korábbinál hatékonyabb és

specifikusabb módszer álljon rendelkezésre a korai diagnózishoz. Többféle csoportosítás alapján lehet bemutatni a melanoma kimutatására javasolt radiofarmakonok listáját, jelen esetben a kismolekula- és peptid-alapú PET képalkotó vegyületek felosztását tartom a legcélravezetőbbnek.

3.6.1.1 Melanint célzó PET képalkotás kismolekulákkal

A melanin, amorf, szabálytalan, funkcionális biopolimer. Egy monomer alegység kémiai öszegképlete $C_{18}H_{10}N_2O_4$, molekulatömege 318 g/mol. A melanin monomer alegységét három hattagú és két öttagú gyűrű építi fel. Az öttagú gyűrűkön található a két N-atom, a hattagú gyűrű mindkét végén C=O csoportok láthatóak, 2-2 db oldalanként (9. ábra). Természetes festékanyagként több szervben megtalálható, ilyen például az emberi bőr is [133]. Melanoma malignum esetén a melanin képződése erősen megnövekszik a tironáz aktivitás szignifikáns emelkedésével egyetemben [134;135]. Kémiai szerkezete miatt a policiklusos aromás szénhidrogének és a szerves aminok képesek kötődni a melaninhoz, ezért a megnövekedett festékanyag-koncentráció – a felsorolt vegyülettípusok radioaktívan jelzett analógjainak esetében –, a radiofarmakon akkumulációját eredményezheti. [136]. Számos gyógyszerről bebizonyították, hogy *in vitro* és *in vivo* kötődnek a melaninhoz, ilyenek a metilénkék (MTB), klorokin, akridin narancs, benzamidok (BZA) és ezek analógjai [137;138], ezért ezek a származékok mind potenciális jelöltek lehetnek.



9. ábra: A melanin monomer alegysége

Radiojelölt benzamidok és benzamid-származékok

Az utóbbi évek fejlesztései során különféle radiojelölt benzamidokat és ezek származékait készítették el, hogy a klinikai gyakorlatban kipróbálhassák a melanin-specifikus képalkotása céljából [139;140;141;142]. Egy III. fázisú klinikai vizsgálat eredményeit bemutató tanulmány beszámolt arról, hogy a ^{123}I-BZA$_2$ (amely egy benzamidszármazék) [140;143], a melanoma malignum tumort hordozó beteg esetében a melanin pigmentekhez kötődött, valamint magasabb specificitással rendelkezett az áttétek kimutatásában, mint a ^{18}F-

FDG [144]. Katsifis és munkatársai az előző vegyület benzamid részét nikotinamid csoportra cserélték, ^{123}I-dal jelölték meg, az így kapott ^{123}I-MEL008-t biodisztribúciós vizsgálatoknak vetették alá. Az injektálást követő 1 óra alatt a radiojelölt vegyület 66%-a kiürült a véráramból megnövekedett hidrofilicitásának köszönhetően. A vegyület a 60. perc körül mutatta a legmagasabb tumor felvételi értéket is [145]. Különböző tanulmányokban aromás és heteroaromás BZA analógokat vizsgáltak B16 melanint termelő tumoros egereken, és megállapították, hogy a ^{123}I vagy ^{125}I-dal jelölt ICF1012 vegyület alkalmazható a melanoma malignum diagnosztikájában és terápiájában egyaránt [146;147].

Ezekkel párhuzamosan elindultak PET-izotópos jelzésen alapuló benzamid-bázisú fejlesztések is. ^{11}C-gyel jelölt benzamid származékokat állítottak elő az elmúlt években. A 4-^{11}C-MBZA, azonban hiába mutatott specifikus kötődést B16-F10 sejtekhez *in vitro* körülmények között, a preklinikai alkalmazás során magas radiofarmakon halmozás volt megfigyelgető a vesékben [148]. Ennek következtében a ^{11}C-gyel jelölt vegyületek háttérbe kerültek, s megindult a ^{18}F-os származékok fejlesztése. Egy ilyen benzamid alapú fejlesztés, a ^{18}F-FBZA, amely a tesztek alkalmával magas tumor felvételt mutatott, így ígéretes jelöltként jelent meg a klinikai kutatásban [149]. Wu és munkatársai a vegyületet rövid szénláncú PEG-el módosították, majd ^{18}F-ral jelölték, az így kapott ^{18}F-FPBZA kiváló T/M (tumor/izom) arányt mutatott, továbbá a radiofarmakon képes volt a daganat és a gyulladásos szövetek megkülönböztetésére is [150]. Ezenfelül még számos ^{18}F-ral jelölt benzamid típusú vegyületet állítottak elő és vizsgálták képalkotási tulajdonságaikat melanin pozitív melanoma malignum esetében. Egy ígéretes gyógyszerjelölt és értékes példa a „kevert ligandumokon" alapuló radiojelölés gyakorlati alkalmazhatóságára: a ^{18}F-NOTA-BZA, amely kiváló farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkezik, alacsony csontfelvételt és magas tumor akkumulációt mutatott [151].

3.6.1.2 A melanoma malignum peptid-alapú PET képalkotása

A peptidek, hatékony és szelektív ligandumok lehetnek a melanoma PET képalkotása céljából is, hiszen úgy lehet megtervezni őket, hogy nagy affinitással és specificitással kötődjenek a daganat sejtfelszínén fokozottan kifejeződött receptorokhoz [152]. A jelenlegi trendek két fő molekuláris célpontra fókuszálnak ezen a területen: a melanokortin 1-es altípusra (MC1R), amelynek liganduma az α-melanocitákat stimuláló hormon (α-MSH), és a tumor angiogenezissel kapcsolatos integrinekre. Történtek próbálkozások a két ligandum együttes használatára is, az MC1R-t és az integrint célzó heterodimer peptidekkel.

α-melanocita stimuláló hormon-alapú vegyületek (α-MSH)

Több kutatás bizonyította, hogy az MC1R-t a melanint-nem termelő és melanint-termelő humán melanoma sejtek túlzott mértékben fejezik ki, ezért ligandumait széles körben használják hordozóként melanoma célzott képalkotásához és terápiájához egyaránt [153;154].

Az eredeti α-MSH, egy 13 aminosavból álló lineáris peptid (Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH_2), *in vivo* biológiai felezési ideje kevesebb, mint 3 perc [155], ezért ez a tulajdonsága tulajdonképpen ellehetetlenítette képalkotó vegyületként történő elterjedését. Az elmúlt bő 20 év fejlesztéseinek köszönhetően, számos módosított analógot és szintézis stratégiát dolgoztak ki annak érdekében, hogy növeljék a vegyület biológiai felezési idejét, ezzel javítva az alkalmazásával történő képalkotást.

Az angiogenezist kimutató peptid-alapú vegyületek

A melanoma kimutatása angiogenezist kimutató peptidekkel a szó eredeti értelmében véve nem specifikus, ugyanakkor mégis hatékony lehet, mivel ez a tumortípus gyors áttétképzésre hajlamos, gyors metasztatizáló tulajdonsága kapcsán kutatások támasztják alá az új erek képzésére való fokozódott hajlamot, ezért azok a vegyületek, amelyek alkalmasak az angiogenezis kimutatására, hasznos vegyületekként szolgálhatnak a melanoma diagnosztizálására is. Ennek következtében gyakran alkalmazzák a vegyületcsaládot mindkét folyamat feltérképezésére. Ezt a megállapítást bizonyítja az a tény, hogy számos peptid-alapú radiofarmakont sikeresen alkalmaztak preklinikai környezetben az integrin receptor (angiogenezis kimutatására használt radiofarmakonok: lásd: *3.7* fejezetben) expressziójának képalkotására különféle daganatokban, beleértve a melanomát is [156].

3.7 Angiogenezis

Az angiogenezisnek nevezett folyamat során új érrendszer fejlődik a már meglévőből olyan szövet irányba, amely korábban nem volt erezett [157]. A születés után már csak kevés fiziológiai helyzetben indul be a folyamat, hiszen rendkívül szabályozottan működik, angiogén aktivátorok (proangiogén faktorok) és inhibitorok (angiogenezist gátló tényezők) biztosítják az egyensúlyt. Az egészséges érképződés folyamata figyelhető meg olyan hormonális szabályozású növekedés esetén, mint pl. prosztata, vagy az emlő mirigy szöveteinek fejlődése, de sebgyógyuláskor, nők nemi ciklusa során, vagy akár a méhlepény kifejlődésekor kismamák esetében, szintén időszakos érképződést figyelhetünk meg. Azonban köszönhetően az erős szabályozottságnak, ezek az érfejlődési szakaszok meghatározott időn belül leállnak [158].

Általánosságban azt mondhatjuk, hogy egy egészséges felnőtt emberben az endotél sejtek száma korlátozott és meghatározott, nagyjából egy adott időpontban 10000 endotél sejtből csak egy van osztódási szakaszban [159]. Előfordul azonban az az eset, amikor az angiogén aktivátorok és inhibitorok egyensúlya felborul, emiatt az érképződést támogató folyamatok felerősödnek, hatékony szabályozás nélkül működnek tovább. Ez a fokozott érképződés figyelhető meg daganatos megbetegedések [160], pangásos szívelégtelenség [161] és perifériás artériás kórképek estében egyaránt [162].

Az angiogenezis kutatásában úttörő munkát végzett Judah Folkman, aki megalapozta azt a hipotézist, hogy a daganatok növekedése angiogenezis-függő [163]. Azóta a kutatási eredmények alátámasztották a felismerését. A szolid tumorok nagy többsége a pár mm-es átmérőt meghaladva növekedésükben lelassul, és csak új véredények képzése után gyorsul fel ismét. Az újonnan képződött ereken keresztül kaphatnak oxigén és tápanyag utánpótlást. Elérve azt a stádiumot, amikor a tumor már angiogenezist generál a környező érrendszerben (ún.: „angiogenetic switch”), utána képessé válik az invazív növekedésre is, és később a metasztázis képzésére [164]. Az újonnan képződött erek nem állnak direkt kapcsolatban a malignus sejtekkel, tehát feltételezhető, hogy az érképződés beindulásáért a lézió által termelt faktorok a felelősek. Az angiogenezis szabályozásának lehetősége tumorterápiához vezethet, amely napjainkban is intenzíven kutatott szakterület. Míg 1970-ben mindössze két angiogenezissel foglalkozó kéziratot publikáltak, 2009-ben pedig több mint 5200 cikket tettek közzé e témakörben [165].

Az angiogenezis gátlásán alapuló ún. irányított tumorterápia lehetőségét még az 1900-ban Paul Erlich által közölt „magic bullet” elmélet szolgáltatja. Ennek lényege, hogy a sejteken sejtfelszíni struktúrák, ún. receptorok találhatók, amelyek jellemzőek az adott sejt típusára. Mivel ezáltal minden fajtájú sejt egyedi „ujjlenyomattal” rendelkezik, ezért az eltérő sejttípusok megkülönböztethetők az egyedi ligandum specificitásuknak köszönhetően [166]. Vagyis, adott receptorok csak bizonyos fajta sejteken fejeződnek ki, ez pedig az adott sejttípus szelektív célzását teszi lehetővé. Ideális esetben az ilyen, rendkívül receptorspecifikus ligandumok optimális gyógyszermolekulák lennének, hiszen, ha megfelelően sikerül kiválasztani a molekuláris célpontot, az egészséges szövetek nem károsodnának. Számos ígéretes kutatás folyik az angiogenezis gátlásának módozatait vizsgálva, a kérdéskör a nukleáris medicina érdeklődésére is számot tarthat. A nyomjelzéses módszerrel nem invazív módon lehet monitorozni az érképződés fokozott voltát, illetve feltérképezni a gyors metasztázisokat adó tumoros betegségeket [124].

A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) egy 232 aminosavból álló jelátviteli fehérje. Első ismert hatása a kapilláris érfalra gyakorolt megnövekedett permeábilitás volt. A fehérjét 1997-ben izolálták, ezután fedezték fel, hogy mitogén hatást gyakorol az angiogenezisre. A fehérje elnevezése is ennek a mechanizmusnak a nyomán történt [167]. A VEGF kiemelkedő élettani fontosságát, illetve az általa közvetített jelátviteli folyamatok nélkülözhetetlenségét bizonyította az a vizsgálat, miszerint a VEGF receptorainak esetleges hiánya halált okozott már az embrionális fejlődés 8-9. napján genetikailag módosított egerek esetében [168]. A VEGF-n alapuló jelátvitel nemcsak szabályozza a már meglévő erek hálózatának fennmaradását, valamint az új erek képződését, hanem emellett még közvetett módon hatással vannak pl. az endotél sejtek túlélésére, osztódásukra. Továbbá befolyással rendelkeznek a tumorok mikrokörnyezetének kialakulására is, vagyis szerepük kiemelkedő a daganatos megbetegedések fennmaradásában, illetve az áttét-képzés sikerességében [169]. Ezen túlmenően is találunk adatokat a VEGF-rendszer fontosságával kapcsolatban. Az utóbbi évtizedben több bizonyíték is összegyűlt a VEGF szerepéről az idegszövet fejlődésében, illetve jelentőségéről annak regenerációjában. A VEGF a központi idegrendszerben is növeli az erek – így a vér-agy gát permeábilitását [170], segíti a neurogenezist és a neuronproliferációt a felnőtt hippokampuszban [171], illetve a hippokampusz-függő tanulási- és memóriafolyamatokban esszenciális a szinaptikus plaszticitás fenntartásában [172]. Preklinikai mérésekben szorongásoldó és hangulatjavító hatást is leírtak, ennek kapcsán pedig a VEGF és a depresszió kialakulásának lehetséges kapcsolatát feltételezik [173].

A VEGF-családnak több receptora ismert, a VEGF-A például a VEGFR-1/2 receptorokon keresztül fejti ki hatását, amelyek a II-es típusú transzmembrán tirozin kináz receptorok közé tartoznak, és főként az endotél sejteken expresszálódnak [174]. Napjainkig az FDA már több, mint 10 olyan hatóanyagot engedélyezett különböző tumorok kezelésére, amelyek a VEGFR-t célozzák [175]. Ezért – különösen a VEGFR-1/2 receptort célzó molekulák nagy jelentőségre tehetnek szert a receptor-pozitív páciensek kiválasztásában, illetve a terápiás kezelés hatékonyságának követésében.

A sejtek kommunikálnak a környezetükkel, ennek a folyamatnak fontos elemei az ún. adhéziós receptorok. Ezek a fehérjék teremtik meg a kapcsolatot az extracelluláris mátrix (ECM) és a citoszkeleton között. Az adhéziós receptornak számos fajtája ismert, ugyanakkor több szempontból is a legfontosabb ilyen receptor-család az integrinek. Az integrinek két, kovalens kötéssel nem rögzített α- és β-alegységből épülnek fel, amelynek jelenleg 24 fajtáját ismeri a szakirodalom [176]. A tumorok növekedése és a sejtek migrációja szempontjából e

sokféle receptorból azoknak jut hangsúlyos szerep, amelyek szelektíven képesek felismerni és kötni az Arg-Gly-Asp tripeptidet tartalmazó szekvenciákat [177]. Az eddig kísérletek alapján ezek az $\alpha_V\beta_3$, illetve az $\alpha_5\beta_1$ típusú receptorok.

Szintén a neoangiogenezis nagy jelentőségű molekuláris célpontja a kutatási eredmények alapján az Aminopeptidáz *N* enzim (APN vagy CD13 receptor). Az APN egy cink-függő metalloproteáz, amely az M1 családba tartozik, 967 aminosavból áll, felépítése szerint dimer, 7 doménből áll. Három fő funkciója van, enzim, receptor és szignalizációs molekula [178]. Fontos szerepet játszik a metasztatikus tumorsejtek inváziójában az extracelluláris mátrix komponensek enzim katalizált lebontása révén [179]. Ezenkívül, a CD13 fokozott expressziója kimutatható számos humán szolid tumorban, ideértve a melanoma malignumot [180], prosztata-, tüdő- és petefészekrákot [181]. Bár az APN a szervezetben széles körben elterjedt, különösen fontos szerepet tölt be tumorsejtek áttétképzésében, illetve, hogy a malignus sejtek elkerülhessék a programozott sejthalált [182]. *In vivo* rendszereken történő „fág könyvtárak" alkalmazásával sikerült egy olyan új szekvenciát azonosítani, amely a későbbiekben az APN ligandumának bizonyult, ez pedig az NGR tartalmú peptidek családjának fejlesztését hozta magával [183]. Rövidesen az irodalomban megjelent közlemények rámutattak arra, hogy a radioligandum-fejlesztés területén nem csak az RGD-integrinek, hanem a CD13 receptor is jó célpontja lehet a specifikus kölcsönhatásokon alapuló tumor-diagnosztikának, illetve a hozzá kapcsolódó tumorterápiának. Bebizonyították azt is, hogy háromszor nagyobb hatékonysággal mutathatók ki a neoangiogén erek NGR peptid-szekvenciával, mint az RGD-vel [184].

3.7.1 Az angiogenezis kimutatására alkalmas egyéb molekuláris célponttal rendelkező radiofarmakonok

A ^{18}F-FDG PET/CT szerepe a tumor angiogenezis előrejelzésében, illetve az anti-angiogenetikus kezelés hatékonyságának jóslásában megkérdőjelezhetetlen. Több tanulmányban is leírták, hogy korreláció van a ^{18}F-FDG felvétel és a tumor angiogenetikus aktivitása között, valamint bizonyítékot szolgáltattak arra, hogy kapcsolat van a hypoxia indukált faktor (HIF) és a megnövekedett glükóz-metabolizmus között [185].

Számos klinikai és kísérletes megfigyelés bizonyítja, hogy a nem megfelelő oxigénellátás (szöveti hipoxia) következtében a daganatok agresszívebbé válnak, és megnövekszik az áttétképző képességük – ahogy ezt pár sorral korábban már megállapítottuk. A hipoxia, a HIF-1 túlzott kifejeződésén túl, kapcsolatba hozható a kaotikus és primitív tumor mikroerezettség kialakulásával is, amely nem működik teljes értékű érhálózatként [186]. A csökkent szöveti

oxigénszint mérésére szintén fejlesztettek ki radiofarmakonokat. A [^{18}F]-fluoromizonidazol (^{18}F-FMISO) egy, a PET/CT vizsgálatokban már évtizedek óta használt radiogyógyszer, amely alkalmas a hipoxia kimutatására. Alacsony szöveti oxigénszint esetében a nitroimidazol alegység redukálódik, és képes kovalens kötéssel a sejten belüli makromolekulákhoz kötődni, ezáltal a hipoxiás sejtekben feldúsulni [187].

További ígéretes kísérletek történtek a neoangiogenetikus folyamatokban részt vevő mátrix metalloproteázok (MMP) célzásával. Öt különböző osztálya ismert az MMP-nek, ezek közül különösen az MMP-2 és MMP-9 expresszálódik túl tumoros szövetekben. Ez a túlzott kifejeződés korrelál a tumorok agresszivitásával, és metasztázis-képző hajlamával [188].

Egy további lehetséges molekuláris célpont a radionuklidokon alapuló specifikus diagnosztika számára a fibronektin. Ez a mátrixfehérje két, diszulfidhidakkal összekapcsolt polipeptidláncból álló dimer, amely többek között részt vesz a sejtmigrációs folyamatokban azzal, hogy gyakran rostokká polimerizálódik. Ezek az alegységek hálózattá állnak össze, és biztosítják az útvonalat a vándorlásnak induló sejtek számára. Kötőhelyeket hordoz többek között az integrinek számára is, a már korábban említett RGD tripeptid szekvencia segítségével. Ezek alapján fejlesztették ki pl. egy ^{99m}Tc-jelölt antitest fragmentumot, amely specifikusan kötődik a fibronektin egyik izoformájához, és a radioligandum preklinikai vizsgálatokban bizonyította használhatóságát [189].

Szintén több tanulmány jelent meg olyan radioligandumokról, amelyek az előző fejezetben felsorolt molekuláris célpontokhoz kötődnek specifikus kölcsönhatások alapján. Ezek a vegyületek egy része a VEGF-mediált angiogenetikus útvonalat célozzák, például a daganat környékén fejlődő erekben nagy mennyiségben található, a VEGF megkötését lehetővé tevő kötőhelyeket, az endotélium-specifikus tirozin kináz receptorokat [190]. A korábbi kutatások főleg monoklonális antitesteket tartalmaztak, amelyeket ^{64}Cu és ^{89}Zr izotóppal jelöltek [191], azonban a legújabb próbálkozások már inkább kisebb peptidekkel folynak, amelyeket ^{64}Cu vagy ^{68}Ga-mal nyomjeleznek [192].

Bár mint látható, számos eszköz és molekuláris célpont állhat rendelkezésre az angiogenezis PET alapú képalkotására, a gyakorlatban mégis inkább a rövid peptideket tartalmazó, főleg integrin receptort célzó radiogyógyszer-molekulák terjedtek el. Az RGD peptidek nagy előnye, hogy nagy affinitással és specificitással képesek kötődni az integrin $\alpha v\beta_3$-hoz. Az első ilyen típusú radiofarmakont már 1999-ben leközölték, igaz, ez még SPECT ligandum volt és ^{125}I-dal jelölték. Három különböző tumormodellen tesztelték preklinikai

szinten (melanoma, emlő karcinoma, és oszteoszarkóma). Azóta számos fejlesztést valósítottak meg ezen a vegyületcsoporton, az első PET ligandum, amely humán felhasználásra is került, a ^{18}F-galakto-RGD volt. A vegyületcsoport sikerességét bizonyítja, hogy azóta számtalan új analógot fejlesztettek ki, mint pl. ^{18}F-fluciclatide, ^{18}F-RGD-K5, ^{18}F-FPPRGD$_2$, ^{18}F-alfatide, ^{68}Ga-NOTA-RGD vagy ^{68}Ga-NOTA-PRGD$_2$.

Bár ebben az összevetésben az APN-szelektív radiojelölt NGR peptidek száma nem éri el az RGD-s változatok mennyiségét, az új molekuláris célpontok felfedezése napjaink egyik intenzíven kutatott területe a nukleáris medicinának. Az NGR-alapú célba juttató szekvencia felhasználásával olyan, nagy jelentőségű, és CD13 receptor-pozitív tumorok korai diagnózisa válhat könnyebbé, mint a melanoma, prosztata-, tüdő vagy petefészek rákos megbetegedések, illetve segítheti a célzott gyógyszerek alkalmazását [193]. Ugyanakkor ennek a biológiai vektornak a stabilitása nem éri el az ideális szintet, hiszen azt már korábban bebizonyították, hogy az Asn szukcinimid-képződésen keresztül viszonylag könnyen deamidálódik – különösen akkor, ha a szekvenciában Gly következik [194]. Ezért, fontos lenne olyan rövid peptideket tesztelni radioligandumként, amelyek az APN-t célozzák, de kémiai stabilitásuk felülmúlja az NGR családot.

A 4. táblázatban foglaltam össze azokat a legjelentősebbnek tűnő fejlesztéseket, amelyeket a nukleáris medicina területén a tumorok okozta hipoxia/neoangiogenetikus folyamatok kimutatása céljából teszteltek.

4. táblázat: Az angiogenezis kimutatására alkalmas radiofarmakonok listája

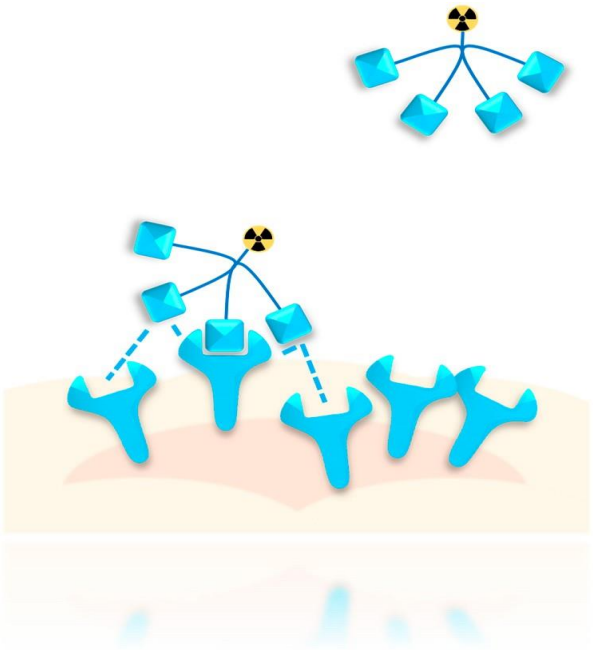
Radiofarmakon	Képalkotás módja	Biológiai analóg	Célfolyamat
^{18}F-FDG	PET	Glükóz	Glükóz metabolizmus, GLUT-1 expresszió [195;196;197]
^{123}I vagy ^{125}I-VEGF165/121	SPECT	VEGF izoformák	VEGF-útvonal, VEGFR-hez kötődik [198;199;200]
^{99m}Tc-VEGF121	SPECT	VEGF izoformák	VEGF-útvonal, VEGFR-2-höz kötődik [201;202]
^{64}Cu-VEGF121	PET	VEGF izoformák	VEGF-útvonal, VEGFR2-höz kötődik [203;204]
^{111}In Bevacizumab	SPECT	VEGF	VEGF útvonal, VEGF-A elleni antitest [205]
^{89}Zr Bevacizumab	PET	VEGF	VEGF útvonal, VEGF-A elleni antitest [205;206]
^{18}F-Galakto-RGD peptidek	PET	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Az integrin RGD szekvenciájához kötődik [207;208;209]
^{68}Ga-NOTA-PRGD$_2$	PET	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Az integrin RGD szekvenciájához kötődik [210]
^{64}Cu-DOTA-RGDyK	PET	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Az integrin RGD szekvenciájához kötődik [211]
^{99m}Tc-scFvL19	SPECT	Fibronektin	Fibronektin útvonal, antitest az ED-B domén ellen [212]
^{123}I-scFvL19	SPECT	Fibronektin	Fibronektin útvonal, antitest az ED-B domén ellen [213]
^{18}F-SAV 03M	PET	Mátrix metallo-proteinázok	Gelatináz útvonal, az MMP-2 inhibitorai [214]
^{68}Ga-NOTA-C6	PET	Mátrix metallo-proteinázok	Gelatináz útvonal, az MMP-2 inhibitorai [215]
^{18}F-MISO	PET	Nitroimidazol	Hipoxia [216;217;]

3.8 Multimerizációs technika alkalmazása PET képalkotás során

A PET-el és SPECT-el végzett funkcionális képalkotó vizsgálatok kimagasló szerepet játszanak a neuorológiai, kardiológiai és főként az onkológiai betegségek kimutatásában és jellemzésében. Ennek eredményeként egyrészt nőtt a PET radiotracerek száma – ahogyan az előzőekben már szó volt róla –, másrészt pedig olyan kutatások indultak el, amelyek célul tűzték ki specifikus és az adott receptor irányába nagyobb affinitásra mutató vegyületek fejlesztését. Különböző vegyületcsaládokat alkalmaznak képalkotó ágensként az ilyen jellegű vizsgálatoknál, mint például kismolekulákat, peptideket, peptid-származékokat, RNS-eket és antitesteket. A rosszindulatú daganatos betegségek kimutatásához többnyire a magas specificitással rendelkező radioaktívan jelölt peptideket alkalmazzák az antitestek mellett. Ezek a peptidek nagy affinitással és specificitással képesek kötődni a sejtfelszínen fokozottan kifejeződött receptorokhoz, ezáltal lehetővé teszik a pontos megkülönböztetést a jóindulatú és rosszindulatú szöveti elváltozások között. A peptidek alacsony toxicitással, valamint immunogenitással rendelkeznek, emellett könnyen előállíthatóak és különböző kémiai módosításokkal egyedi tulajdonságokkal rendelkező termékek állíthatóak elő. Ráadásul előnyös farmakokinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek az erősen célspecifikus antitestekkel szemben (gyors szöveti penetráció és felhalmazódás, a nem célzott szövetekből való gyors kiürülés) [218;219]. Eddig számos peptidet alkalmaztak radiofarmakonként diagnosztikus és terápiás célból egyaránt, beleértve a többértékű, multimer peptideket, amelyek a célzó peptid egynél több részegységéből állnak. Ez a koncepció számos pozitív tulajdonságot hordoz magában. Először is, a peptid multimerek metabolikus stabilitása megnő a monomerekhez képest – az endogén peptidázok általi lebomlás gátlása révén –, amely a mesterséges szerkezeti elemeknek és a sztérikus akadálynak köszönhető [220]. Másodszor, magasabb cél aviditást érünk el (több kötés együttes erőssége, tehát a kötések affinitásának összege), amely kiváló célmegkötést, magasabb tumor felvételeket, ezáltal magasabb tumor/háttér arányt és meghosszabbított tumor retenciót eredményez [221;222].

A peptid multimerek fokozott dúsulása különböző tényezőkből ered. Az egyik lehetőség az, hogy a multimer egyidejűleg egynél több részegységgel kötődik a célsejthez, amely szorosabb célmegkötést eredményez. Ez az úgynevezett „kényszerített közelítés” hatás (10. ábra), amely során a multimerek még receptorhoz nem kötött részei a sejtfelszín közelében

maradnak, ezáltal megnövelve annak a lehetőségét, hogy a még nem kötött alegységek kölcsönhatásba lépjenek a tumorsejt felületén megtalálható szabad receptorral [223].



10. ábra: A „kényszerített közelítés" hatásának sematikus ábrázolása [224]

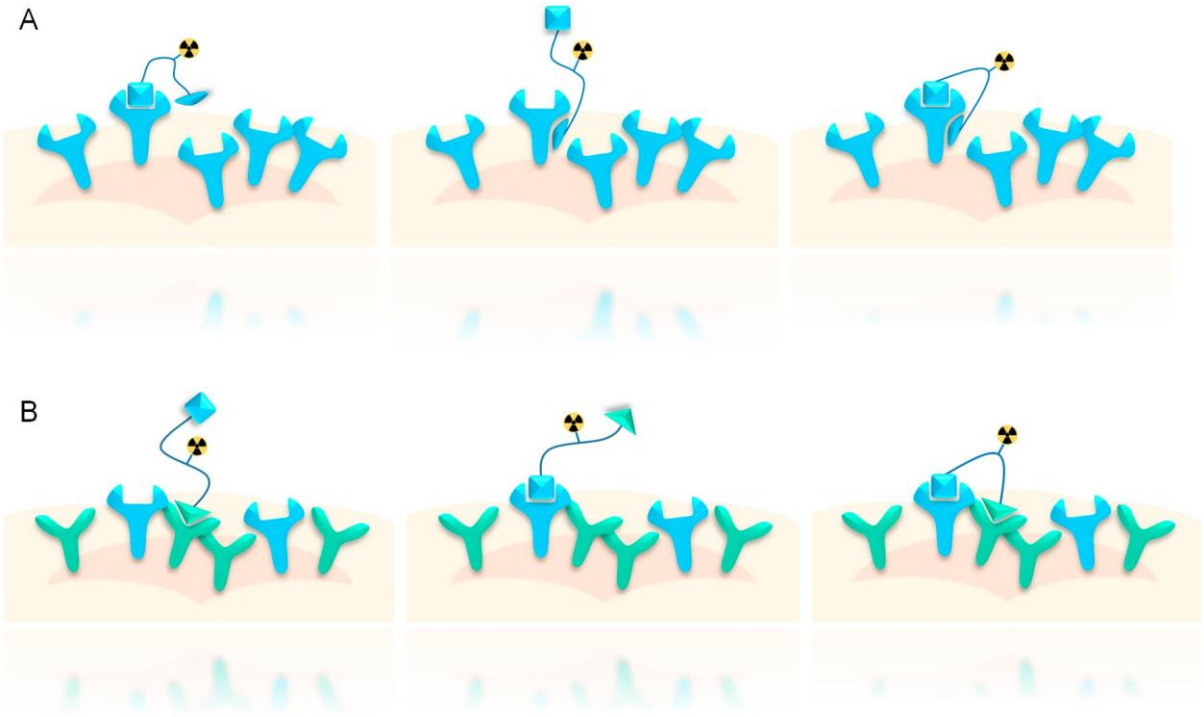
A peptidek multimerizációjának technikáját – a fentiekben felsorolt előnyös tulajdonságok miatt – számos esetben alkalmazták, például RGD-alapú peptidek esetében [225;226]; bombezin-analógoknál, mely a gasztrin felszabadító peptid-receptorhoz kapcsolódik [227], szomatosztatin származékok esetében, melyek a szomatosztatin receptorokat célozzák [228], vagy az α-melanocita stimuláló hormon analógjainál (α-MSH), amelyek a melanokortin receptorokhoz kötődnek [229].

A kötések megnövekedett aviditásának másik lehetősége a heterobivalens kapcsolódás (11. B. ábra). A heterodimer vagy heteromultimer származékoknál különböző peptid-származékok építik fel a molekulát, amelyek más-más receptort céloznak meg egyidejűleg. Így ugyanolyan kiváló tulajdonságokkal rendelkeznek a képalkotás szempontjából, mint a homodimer vagy homomultimer társaik. Olyan vegyületek is ismertek, amelyek nem feltétlenül két eltérő receptort céloznak együttesen, hanem egyazon receptortípust, de két különböző peptid-részegységgel. Ezt a vegyületosztályt bitopikus ligandumoknak nevezzük (11. A ábra).

Habár a bitopikus ligandumok jobb megkötődést mutatnak a monomerekhez képest, valamint a homodimerek legtöbb előnyével is rendelkeznek, mégsem tudják teljes mértékben kihasználni a heterodimer-megközelítés előnyeit [230]. Mivel csak egy receptort tudnak

megcélozni, amely viszont nem feltétlenül eredményez jobb képalkotást, főként abban az esetben, amikor a receptor sűrűsége léziónként változik.

Ennek következtében a radioaktívan jelölt heterodimer (vagy heteromultimer) peptid-származékok tűnnek a legígéretesebb vegyületcsaládnak a rosszindulatú betegségek rendkívül érzékeny és specifikus képalkotása és terápiája céljából.



11. ábra A bitopikus (A) és heterobivalens (B) kötés sematikus ábrázolása. [224]

Bitopikus kötés esetén ugyanazon a receptoron két különböző kötési helyen (legalább egy alloszterikus) csatlakozik a radioligand, míg heterobivalens kötés esetén két különböző receptor két ortoszterikus kötési helyen kötődik.

A linker kémiai struktúrájának közvetlen befolyása van a receptor-kötődési tulajdonságokra. A linkernek elegendő hosszúságúnak kell lennie ahhoz, hogy az alegységek szimultán be tudjanak kötődni a kérdéses receptorokhoz. Ezzel tudják a leghatékonyabban kifejteni a multimerizációs koncepcióban rejlő szinergikus hatásukat. Másrészről, a nagyon hosszú linkerek növelik a rendszer entrópiáját, ezzel csökkentik a másik alegység lokális koncentrációját a receptorok környezetében, végső soron a multimer akkumulációját a tumor felszínén [224].

A linker hosszán túl azok merevsége is befolyásolhatja a receptorhoz való kötődést. A sztérikus gátlás az egységeket bizonyos pozíciókba irányíthatja egymáshoz képest, a

konstrukció geometriáját rögzíti. Ennek lehetnek pozitív vagy negatív hatásai a receptor kötődéshez. Másrészről, a flexibilis linker használata megkönnyítheti az első alegység bekötődését, de egyben megnöveli az entrópiát, aminek a hatásait az előzőekben taglaltuk. Összességében elmondhatjuk, hogy a linkerek hatását a multimerek kötődésére bár a közelmúltban több tanulmányban vizsgálták, általános érvényes eredményre azonban nem jutottak; az adott tumormodell esetében empirikusan lehet csak optimalizálni az adott vegyület esetében a linker kémiai tulajdonságait [224].

4. Célkitűzés

Az orvosi képalkotó módszerek, közülük is a PET, kulcsszerepet tölthet be a rutin onkológiai betegellátásban. Az utóbbi években a melanoma malignum előfordulásának gyakorisága dinamikusan nő, ezért célul tűztük ki olyan PET-radiofarmakonok fejlesztését, amelyek növelik a PET szerepét ennek a daganattípusnak a diagnosztikájában. Bár ez a betegség időben felfedezve a teljes gyógyulás reményében gyógyítható, a gyorsan kialakuló távoli áttétek miatt később a túlélés időtartama lecsökken. Napjainkban már rutinszerűen alkalmaznak PET radiofarmakont melanoma malignum kimutatására, azonban ez nem specifikus az adott daganattípusra. Kutatómunkánk fő célkitűzése olyan specifikus kölcsönhatások alapján dúsuló radioligandumok fejlesztése, amelyek a melanoma diagnosztikáját tehetik hatékonyabbá, illetve magukban hordozzák a teranosztikus analógok kidolgozásának lehetőségét:

- A melanoma malignum daganatokban található melanin kimutatására alkalmas kismolekulák előállítása, radiojelölése PET izotóppal (^{68}Ga-mal) és fizikai-kémiai-biológiai karakterizálása.
- A metasztázis képzésben kulcsszerepet betöltő élettani folyamat, az angiogenezis megjelenítése, a fokozottan kifejeződő receptorokon keresztül.

A kitűzött célokat két nagyobb projekt során végeztük:

Projekt 1: A melanin pigmenthez specifikusan kötődő benzamid-analógot, a prokainamidot konjugáltuk makrociklusos és nyíltláncú kelátorokkal, majd az előállított vegyületeket radiojelöltük ^{68}Ga-mal, ezt követően pedig *in vitro, in vivo* és *ex vivo* biológiai körülmények között teszteltük PET képalkotás segítségével. A méréseink során egészséges, kontroll egereket; melanint termelő B16-F10 sejtvonalakat, majd ebből létrehozott tumoros egereket; valamint melanint nem termelő Melur és A375 sejtvonalakat, továbbá szintén ezen sejtek felhasználásával indukált tumoros állatmodelleket alkalmaztuk.

Projekt 2: Különböző molekuláris célpontok kimutatására alkalmas PET radioligandumokat fejlesztettünk, amelyek alkalmasak az angiogenezis megjelenítésére.

a) Az Aminopeptidáz N (CD13) receptor célzására alkalmas ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC fejlesztése és tesztelése.
b) A VEGFR-1 receptor kimutatására képes ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 előállításuk és vizsgálataik.

c) Egy olyan heterodimer származék előállítása, amely egyik alegysége az Aminopeptidáz N-t, míg másik része a VEGFR-1-es receptorát célozza, ezzel elősegítve a PET képalkotás minőségének javulását. Ez a radioligandum a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG.

A második projekt során előállított peptid-származékokat kelátorral konjugáltuk, ^{68}Ga-mal radiojelöltük, minőségellenőrzési protokollt dolgoztunk ki, majd pedig *in vivo* és *ex vivo* PET mérések során teszteltük képalkotási tulajdonságaikat B16-F10 melanoma tumoros és egészséges állatokon.

5. Metodikák

5.1 Anyagok és módszerek

A kémiai munka során az alábbiakban felsorolt vegyszereket és reagenseket alkalmaztam. A kutatás két fő irányvonalát magában foglaló projektek esetében együttesen ismertetem az anyagok és módszerek fejezetet. (zárójelben a gyártót/forgalmazót tüntettem fel, továbbá a cégek székhelyét).

96%-os Etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Németország); abszolút etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Németország); Ultra tiszta sósav 30%-os (Merck KGaA, Darmstadt, Németország); Ultra tiszta nátrium hidroxid (Merck KGaA, Darmstadt, Németország); Acetonitril (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország); Etil-acetát (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország); Ammónium-acetát (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország); Dimetil-formamid (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország); N-(3-dimetilaminopropil)-*N′*-etilkarbodiimid-hidroklorid (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország); Dimetil-szulfoxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); *N*,*N*-diizopropiletilamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); 4-Amino-*N*-(2-dietilaminoetil)benzamid hidroklorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); Nátrium karbonát (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); Oktanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); Ultra tiszta víz (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); Izotóniás sóoldat (TEVA, Debrecen, Magyarország); Trifluoroecetsav (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok); Foszfát pufferes sóoldat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok); Tetrafluorofenol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok); p-SCN-Bn-NODAGA (CheMatech, Dijon, Franciaország); Maleimid-NODAGA (CheMatech, Dijon, Franciaország); NODAGA-NHS-észter (CheMatech, Dijon, Franciaország); p-SCN-Bn-NOTA (Macrocyclics, An Orano Med Company, Texas, Amerika); Víz (Mili-Q).

A kémiai munka folyamán használt eszközök és műszerek a következők voltak (zárójelben a gyártót/forgalmazót tüntettem fel, továbbá a cégek székhelyét).

KNAUER HPLC (KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Németország); Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlop (150 mm * 10 mm; 10 µm átmérő) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország); Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlop (250 mm *

4.6 mm; 10 µm átmérő) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország); HALO oszlop (100 mm * 3.0 mm; 5 µm átmérő) (dr. Weber Consulting, Göd, Magyarország); Kromasil EternityXT-10-C18 oszlop (10 mm * 150 mm, 10 µm átmérő) (Lab-Comp Kft., Budapest, Magyarország; ESI-MS (Shimadzu LC-MS IT-TOF Mass Spectrometer, Shimadzu Corp., Tokió, Japán); ^{1}H-NMR (Bruker WP 360 SY, Billerica, Massachusetts, Egyesült Államok); ^{68}Ge/^{68}Ga-generátor Obninsk (Cyclotron Co., Obninsk, Oroszország); ^{68}Ge/^{68}Ga-generátor GalliaPharm® (Eckert-Ziegler, Berlin, Németország); Pipetták (BIOHIT HealthCare, Helsinki, Finnország); MiniGITA Star TLC-szkenner (Raytest, Straubenhardt, Németország); Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Németország); Centrifugacső (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország); OASIS® HLB (30mg) oszlop (Waters, Milford, Massachusetts, Egyesült Államok); Dóziskalibrátor (Capintec CRC 15PET, New Jersey, Egyesült Államok); Szilikával-impregnált kromatográfiás papír (Agilent, Santa Clara, Kalifornia, Egyesült Államok); Szárazfürdő: MyBlock™ mini dry bath block (Merck KGaA, Darmstadt, Németország); Radiodetektor: házi készítésű detektor (ATOMKI, Debrecen, Magyarország); UV-detektor: Waters 486, Tunable absorbance detector (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Egyesült Államok); pH-mérő: Consort C831, Multi-parameter analyser (Spektrum 3D Kft., Debrecen, Magyarország); pH-szenzor (Mettler-Toledo Kft., Budapest, Magyarország), Analitikai mérleg: Explorer Ohaus (Spektrum 3D Kft., Debrecen, Magyarország), Keverőgép: Thermolyne, SYBRON (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok); Centrifuga: Rotina 35R (Dialab Kft., Budapest Magyarország); Liofilizátor (S-Biotech Kft., Budapest, Magyarország); Rotációs vákuumbepárló: Rotavapor R-300 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Svájc); Mágneses keverő (VELP Scientifica, Usmate, Olaszország).

A második projekt során felhasznált peptid-származékok közül kettőt (APRPG-COOH és APRPG-NH_2) az MTA-ELTE Peptidkémiai Munkacsoport állította elő, amelyeket Prof. Dr. Mező Gábor bocsátotta részünkre, egy közös együttműködés eredményeként. A peptid-szintézis során alkalmazott vegyszerek, reagensek, eszközök és műszerek a következők voltak (zárójelben a gyártót/forgalmazót tüntettem fel, továbbá az említett cégek székhelyét).

1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-én (Merck KGaA, Darmstadt, Németország); Piperidin (Reanal, Budapest, Magyarország); Triizopropilszilán (Reanal, Budapest, Magyarország); Dimetil-formamid (Molar Chemicals Kft, Halásztelek, Magyarország); *N*,*N*′-diizopropilkarbodiimid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); 1-hidroxi-benzotriazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); Trifluoroecetsav (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); Víz (Mili-Q).

Rink-Amid 4-metilbenzhidrilamin gyanta (IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Németország); 2-klorotritil gyanta (IRIS Biotech GmbH, Marktredwitz, Németország); Esquire 3000^{+} ioncsapda tömegspektrométer (Bruker Daltonics, Bréma, Németország); KNAUER 2501 HPLC rendszer (H. Knauer, Bad Homburg, Németország); Phenomenex Luna C18(2) oszlop (100 Å, 10µm, 250 mm * 21,2 mm) (Torrance, Kalifornia, Egyesült Államok); Phenomenex Luna C18 oszlop (100 Å, 5µm, 250 mm * 4,6 mm) (Torrance, Kalifornia, Egyesült Államok); UV detektor (ECOM, Prága, Csehország).

Az NGR-APRPG (heterodimer peptid) és a YEVGHRC peptid-származékok kivételt képeznek a peptid-szintézis előállításának módjában, hiszen ezeket az analógokat a Bankpeptide Biological Tech Co., LTD (Hefei, Kína) gyártotta számunkra, általunk előre megtervezett szerkezeti képlet alapján.

A biológiai mérésekhez és vizsgálatokhoz a következő anyagokat, eszközöket és műszereket használtuk (zárójelben a gyártót/forgalmazót tüntettem fel, továbbá az említett cégek székhelyét).

PET/MRI (nanoScan PET/MRI, Mediso Ltd., Budapest, Magyarország); Egérkamra (Mediso Ltd., Budapest, Magyarország); 3D-OSEM (Tera-Tomo, Mediso Ltd., Budapest, Magyarország); miniPET (DE ÁOK OKI Nukleáris Medicina nem Önálló Tanszék és az MTA-ATOMKI munkatársainak saját fejlesztésű eszköze, Debrecen, Magyarország); Sejttenyésztő inkubátor: ESCO CelCulture® (Dialab kft., Budapest, Magyarország); B16-F10 sejtvonal (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Egyesült Államok); A375 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Egyesült Államok); MELUR sejtvonal (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Egyesült Államok); Dulbecco's Modified Eagle's medium (GIBCO Life Technologies, Dublin, Írország); 10%-os Fetal Bovine szérum Gamma számláló (Perkin-Elmer Packard Cobra, Watham, Massachusetts, Egyesült Államok); IVC rendszer (Egyedileg szellőztetett ketrec-rendszer, Techniplast, Buguggiate, Olaszország); Fél-szintetikus táplálék (Charles River Hungary Kft., Gödöllő, Magyarország); Kisállat altatógép (Tec3 Isoflurane Vaporizer forannal, Vetland Medical Sales & Services LLC, Louisville, Kentucky, Egyesült Államok); Egérkamra (MultiCell Imaging Chamber, Mediso Ltd., Budapest, Magyarország); Állatok (C57BL/6J és CB17 SCID) (Animalab Ltd.-től a The Jackson Laboratory viszonteladója, Vác, Magyarország); T75 tenyésztő flaska (Sarstedt, Sarstedt, Németország); 1%-os MEM nem eszenciális aminosav oldat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); 1%-os MEM vitamin oldat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); antimiotikum és antibiotikum oldat (Sigma-Aldrich,

St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); Tripán kék oldat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); Foszfát pufferes sóoldat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok); Tripszin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Egyesült Államok); PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok); Forán oldat (AbbVie Kft., Budapest, Magyarország).

5.2 Kismolekulák nyomjelzése PET képalkotás céljából

5.2.1 4-Amino-N-(2-dietilaminoetil)benzamid-hidroklorid konjugálási reakciója NODAGA-NHS-észter kelátorral

A melanoma szelektív kismolekula előállítása során 4-amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidrokloridból indultunk ki, amelyet egy makrociklusos NODAGA-NHS-észter kelátorral konjugáltunk a következők szerint: 27,2 mg (100 μmol) 4-amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidrokloridot 2 mL acetonitril/0,1 mol/dm^3 nátrium-karbonát puffer (pH = 9,5) 3:1 arányú elegyében feloldottunk, majd ehhez 69,5 mg (95 μmol) NODAGA-NHS-észtert adtunk. A pH-t 2%-os NaOH-dal 8,5 és 9 közötti értékre állítottuk be. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 2 óráig kevertettük, majd a termékként kapott NODAGA konjugált benzamid-analógot (NODAGA-PCA) félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk, összegyűjtöttük a frakciókat, ezt követte a fagyasztva szárítás lépés. A tiszta terméket analitikai RP-HPLC-vel elenőriztük a *5.2.5* fejezetben leírtak alapján, valamint ESI-MS és ^{1}H-NMR segítségével végeztük a szerkezetazonosításukat. A jelölési reakciókhoz 3 mmol/dm^3 koncentrációjú törzsoldatot készítettünk ultratiszta víz segítségével.

5.2.2 HBED-CC-trisz (tBu) tetra-fluor-fenil-észter szintézise

A szintézis első lépéseként 70 mg (100 μmol) *N,N'*-bisz[2-hidroxi-5-(karboxi-etil)-benzil]-etilén-diamin-*N,N'*-diecetsav trisz-terc-butil-észter (HBED-CC-trisz (tBu) észter) és 20 mg (120 μmol) 2,3,5,6-tetrafluor-fenolt feloldottuk 1 mL acetonitrilben. Ezután, 23 mg (120 μmol) *N*-(3-dimetil-amino-propil)-*N'*-etil-karbodiimid-hidrokloridot és 50 μL (286 μmol) *N,N*-diizopropil-etil-amint adagoltunk az elegyhez. A reakcióoldatot szobahőmérsékleten 2 órán át kevertettük, majd ez idő leteltét követően bepároltuk, rotációs vákuumbepárló segítségével. Az itt kapott elegyet 0,75 mL etil-acetátban feloldottuk, majd szilícium-oxiddal töltött kromatográfiás oszlopra (állófázis: 3 g SiO_2) vittük fel. Az oszlopot először etil-acetát/metanol 10:1 arányú elegyével mostuk, ezt követően a terméket etil-acetát/metanol 4:1 arányú elegyével nyertük vissza az állófázisról. A HBED-CC-trisz(tBu)tetra-fluor-fenil-észtert tartalmazó

szerves fázisokat egyesítettük és bepároltuk. A szintézis során 68,3 mg fehér szilárd anyagot kaptunk, 80,4%-os hozammal. A tiszta köztiterméket ESI-MS-el vizsgáltuk (M_w = 849,4 $[M + H]^+$), majd ezt követően tovább reagáltattuk.

5.2.3 4-Amino-N-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidroklorid konjugációs reakciója HBED-CC-trisz(tBu)tetra-fluoro-fenil-észter kelátorral

A második benzamid vázas vegyületünk szintézise során, amely a HBED-CC-PCA, a 4-amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidroklorid-ot egy nyíltláncú kelátor (HBED-CC-trisz(tBu)tetra-fluoro-fenil-észter) aktív észterével konjugáltuk. A kapcsolási lépés során 13,6 mg (50 μmol) 4-amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidrokloridot oldottunk 1 ml acetonitril/0,1 mol/dm^3 nátrium-karbonát-puffer (pH 9,5) 9:1 arányú oldatában és 65 mg (75 μmol) HBED-CC-tris(tBu)tetra-fluoro-fenil-észtert adtunk az oldathoz. A keverék pH-ját folyamatosan 8,5 és 9 közötti értéken tartottuk, amelyet 2%-os NaOH oldat hozzáadásával értünk el. A teljes eljárás szobahőmérsékleten, állandó kevertetés mellett, 24 órát vett igénybe, ezt követően szárazra pároltuk az elegyet, majd 4 mL acetonitril/víz (3:1) elegyben újra oldottuk. A védőcsoportok (-tBu) eltávolítása céljából 2 mL trifluoroecetsavat adtunk az oldathoz, amelyet 60 perc, szobahőmérsékleten történő kevertetés mellett hagytunk, ezt követően az oldatot ismét bepároltuk rotációs vákuumbepárlóval. A lombik falán lévő száraz, szilárd, fehér színű anyagot vízben oldottuk és félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk. A tisztítási lépésnél kapott frakciókat lombikba gyűjtöttük, majd fagyasztva szárítottuk, ezt követően 3 mmol/dm^3 koncentrációjú törzsoldatot készítettünk a radioaktív jelölési lépéshez. A tiszta terméket ESI-MS és ^{1}H-NMR segítségével jellemeztük.

5.2.4 NODAGA-PCA és HBED-CC-PCA radioizotópos jelölése ^{68}Ga-mal

A radioizotópos jelölési folyamat kidolgozása során számos paramétert optimalizáltunk, annak érdekében, hogy megtaláljuk az ideális reakciókörülményeket, ilyen volt a hőmérséklet, amely előkísérleteket szoba-, illetve emelt hőmérsékleten is elvégeztünk. Az előállított vegyületek nem bizonyultak hőérzékenynek, és a mérések során a megemelt hőmérséklet kisebb alkalmazott ligandum-koncentráció mellett is kvantitatív jelölést biztosított. Ennek következtében nagyobb moláris aktivitást sikerült elérnünk ekkor. Ezen tapasztalatok alapján a biológiai kísérletekhez 95 °C-os hőmérsékleten történtek a radioizotópos jelölések. Az optimális reakcióidőt öt percben definiáltuk, hiszen egy rövid felezési idejű radioizotóppal történő munkavégzés során az idő, az egyik legnagyobb limitáló tényező, és módszerünkkel a teljes szintézis nem vesz igénybe többet, mint 15 perc. Vizsgáltuk az általunk használt puffer

minőségének hatását is a radioizotópos jelölésre, ennek a fontosságát már korábban tárgyaltuk (lásd: *3.2.1* fejezetben). A mérésekhez a két szóba jöhető puffer-rendszert – HEPES és NaOAc –, négy különböző pH értéken teszteltünk 95 °C-os hőmérsékleten. A kísérletek során egyértelműen megállapítottuk, hogy mind a HEPES, mint a NaOAc alkalmas puffer-rendszer a ^{68}Ga-mal történő radioizotópos jelölés során, az optimális pH értéknek 4,5-öt tekintettük. Az irodalmi részben említett előnyök miatt (*3.2.1* fejezet) a NaOAc puffert alkalmaztuk a továbbiakban (a HEPES nem szerepel a gyógyszerkönyvben) [46]. Végezetül, meghatároztuk azt a prekurzor határértéket, amely során még robusztus módon kvantitatív radiojelölést tudtunk elérni. Humán vizsgálatok során a PET radiofarmakonok esetében 95%-os radiokémiai tisztaság az alkalmazhatóság alapfeltétele, ezért preklinikai méréseinkhez mi is ezzel az értékkel számoltunk. Bár a vegyületek formulázása során a szilárd fázison történő megkötés következtében a radiokémiai tisztaság növelhető, ennek mértéke előre bizonytalan, tehát magától a radiojelöléstől vártuk el, hogy a 95%-ot meghaladó radiokémiai tisztasággal rendelkező vegyületet eredményezzen. Az optimalizálási mérések során radio-TLC-vel követtük nyomon a reakciók előrehaladását szilika-impregnált kromatográfiás papírral vizsgáltuk a kísérletek hatékonyságát (futtatóelegy: 1 mol/dm^3 ammónium-acetát/metanol 4:1 arányú elegye). A biológiai-mérés célzattal elvégzett radioizotópos jelölések a továbbiakban az optimalizált paraméterek alkalmazásával valósultak meg.

A NODAGA-PCA és a HBED-CC-PCA vegyületek radioizotópos jelöléséhez Obninsk típusú, TiO_2 állófázist tartalmazó ^{68}Ge/^{68}Ga generátort használtunk, amelyet 5 mL 0,1 mol/dm^3 ultratiszta HCl-dal frakcionáltan eluáltunk. Az aktivitás koncentrációra legtöményebb (≈350 MBq) frakciót összegyűjtöttük (1 mL), majd 0,16 mL ultratiszta NaOAc-tal (1 mol/dm^3) pufferelтük, a reakcióelegy pH-ját 4,5-re állítottuk be 0,06 mL 2%-os NaOH-dal. Ezután 5 µL 3 mmol/dm^3 koncentrációjú prekurzort (NODAGA-PCA vagy HBED-CC-PCA) adtunk a reakcióelegyhez, amit 5 percig, 95 °C-on inkubáltunk. A fűtőblokkból történő kivételt követően a reakcióoldatot szobahőmérsékleten hagytuk lehűlni, majd ezután egy előre aktivált OASIS HLB 1 cc 30 mg töltettérfogatú oszlopra vittük át (aktiválás: 5 mL 96% EtOH, majd 10 mL vizes mosás; gyártói ajánlás). A radioaktivitás immobilizálása után az oszlopot 2 mL vízzel mostuk, az esetleges fémszennyeződések és a nem komplexált szabad ^{68}Ga eltávolítása céljából. A ^{68}Ga radiojelölt prokainamid származékokat 0,5 mL izotóniás nátrium klorid oldat/96% etanol 2:1 arányú elegyével nyertük vissza az oszlopról. A radioizotóppal jelölt terméket tovább hígítottuk 2 mL NaCl oldattal, hogy az alkoholtartalmat 10% alá csökkentsük, ezután pedig

steril szűrőn szűrtük. Minden egyes esetben a végtermék radiokémiai tisztaságát (%) analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztük, UV- és radiodetektor együttes alkalmazásával.

5.2.5 Félpreparatív és analitikai HPLC

A különböző kelátorral konjugált prokainamid származékok tisztítása KNAUR HPLC rendszer segítségével történtek, félpreparatív Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlopon (hossz és belső átmérő: 150 mm * 10 mm; részecske méret: 10 μm), 4,4 mL/perc áramlási sebesség alkalmazásával. Egy rövid izokratikus periódust követően (3 perc) lineáris gradiens (3 perc 0% B; 20 perc 50% B) elúciót alkalmaztunk, az eluens rendszert az A eluens (0,1% TFA vízben) és a B eluens (0,1% TFA; acetonitril/víz 95:5 (v/v%)) alkotta, a csúcsokat 254 nm-en detektáltuk UV detektor segítségével.

A radioaktív izotóppal jelzett vegyületek minőségellenőrzéséhez a fentiekben ismertetett KNAUER HPLC-t használtuk, viszont az UV detektor elé egy radiodetektort kapcsoltunk és együttesen használtuk a továbbiakban őket; a csúcsokat továbbra is 254 nm-en detektáltuk, a kolonnát egy analitikai Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlopra cseréltük le (hossz és belső átmérő: 250 mm * 4,6 mm; részecske méret: 10 μm), az áramlási sebességet 1,2 mL/percre csökkentettük, a következő gradiens profil mellett: (0 perc 2% B; 6 perc 2% B; 30 perc 40% B); az eluensek megegyeztek a félpreparatív RP-HPLC-s módszernél leírtakkal.

5.2.6 A ^{68}Ga-mal jelzett kismolekulák oktanol/PBS megoszlási hányadosának (LogP) meghatározása

A ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA származékok megoszlási hányados (LogP) értékeit is vizsgáltuk, amely a vegyületek adott pH értéken való vízoldékonyságára utalnak. Ezt a paramétert – különösen korábban – rendkívül fontosnak gondolták, hiszen ez alapján próbáltak következtetéseket levonni a kifejlesztett új radioizotóp jelölt vegyület szervezeten belüli viselkedéséről, farmakokinetikai tulajdonságairól.

A megoszlási hányados értékének meghatározását – mindkét prokainamid származék esetében – a következőként végeztük el: körülbelül 1,5 MBq aktivitású radioizotóppal jelölt komplexet (10 μL) összekevertünk 500 μL 1-oktanol és 490 μL PBS (pH = 7,4) oldattal egy centrifugacsőben. Az elegyet 20 percig kevertettük egy Vortex segítségével, majd ezt követően 20000 fordulat/perc sebességgel 5 percig centrifugáltuk a rétegek teljes szétválása érdekében. Ezután meghatározott mennyiségeket (100 μL) vettünk ki a centrifugacsövekből és a mintákat kémcsövekbe helyeztük át. A radioaktivitást Perkin Elmer Packard Cobra gamma-számlálóval

határoztuk meg, az eredményt cpm-ben kaptuk meg, amelyből pedig kiszámoltuk a radiojelölt kismolekulák LogP értékeit.

5.2.7 A ^{68}Ga-mal jelzett kismolekulák in vitro stabilitásának meghatározása

Az *in vitro* stabilitás vizsgálatnál a radioizotóppal jelölt vegyületeket teszteljük általában vér szérumban, abból a célból, hogy megbecsüljük, a szervezeten belül meddig marad intakt állapotban az alkalmazott radiojelölt vegyület. Az általunk használt radioizotóp, a ^{68}Ga esetében, a szabad gallium ion radiotoxicitási problémákat okozna a nem célzott szervekben és szövetekben, illetve a metabolitok kiszámíthatatlan dúsulási profillal rendelkeznek, ezért a képalkotás megfelelő értelmezéséhez fontos a stabilitás ismerete.

A ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA vegyületek stabilitását 37 °C-on patkány- és egér szérumban teszteltük. A kísérlet során körülbelül 8 MBq-nyi radiojelölt ligandumot adtunk a 0,5 mL egér- vagy patkány szérumhoz, majd 37 °C-on inkubáltuk a keveréket. Az elegyből különböző időpontokban (0, 30, 60, 90 és 120 perc) 50 µL mennyiségű mintát vettünk és összekevertük 50 µL hideg abszolút etanollal. A kicsapódott frakciót centrifugálással választottuk el 20000 fordulat/perc sebességgel, 5 perc alatt. A felülúszót összegyűjtöttük, ezt követően vízzel tovább hígítottuk és fordított fázisú HPLC-vel vizsgáltuk a radioizotóppal jelölt vegyületeink (^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA) radiokémiai tisztaságát (%) (lásd *5.2.5* fejezetben leírtak alapján).

5.2.8 A sejttenyésztés során alkalmazott körülmények

A melanoma malignum képalkotásához használt prokainamid származékokat *in vitro* és *in vivo* körülmények között, három különböző sejtvonal segítségével teszteltük. B16-F10 egér eredetű melanint termelő (melanotikus) és A375 és MELUR humán eredetű melanint nem termelő (amelanotikus) sejtvonalakat használtunk, amelyeket a American Type Culture Collection (ATCC) cégtől vásároltuk meg. A B16-F10 sejteket DMEM (Dulbecco módosított sas tápoldat) tápközegben, 10% FBS (magzati borjú fehérje) szérummal növesztettük, amihez 1% (v/v) MEM-et (nem esszenciális aminosav), 1% MEM vitamint, 1% antibiotikus és antimiotikus oldatot adagoltunk. Az A375 és MELUR sejteket DMEM médiumban, 10% FBS-ben, valamint további 1% antibiotikus és antimiotikus oldattal növesztettük. A sejttenyésztések során az általánosan alkalmazott körülményeket tartottuk fent (5% CO_2, 37 °C). A sejteket a fagyasztott állapotból történő megszűntetést követő 6-8 passzálás után használtuk fel az *in vitro* mérésekhez és a tumor indukciójához egyaránt. A passzálást akkor érdemes megkezdeni,

amikor a sejttenyészet még nem konfluens, azaz a sejtek nincsenek teljesen összemosódva (70 – 80%-os konfluencia). Ennél magasabb arány fölött fennáll a sejtek differenciálódásának veszélye. Továbbá a sejtek életképességét tripán kék festési módszerrel teszteltük, amely után a 90%-ot meghaladó értékkel rendelkező sejteket alkalmaztuk a soron következő vizsgálatok elvégzése céljából.

5.2.9 In vitro telítés kötődési vizsgálatok

Az *in vitro* kötődési vizsgálatokhoz melanint termelő B16-F10 sejtvonalat használtunk. A sejteket 24 lyukú lemezeken ($5 * 10^4$ sejt/lyuk) tenyésztettük 24 óra időintervallum alatt. Különböző koncentrációjú (20-1600 nmol/dm^3) ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA vegyületeket adtunk minden egyes üreghez 200 µL térfogatban. Az egy órás inkubációs idő után (CO_2 inkubátorban, 37 °C-on) a tápközeget eltávolítottuk, a sejteket kétszer mostuk mind PBS-sel, mind 0,2 mol/dm^3 koncentrációjú glicin oldattal, majd ezt követően NaOH-dal (1 mol/dm^3) lizáltuk őket 10 percig 37 °C-on. Gamma számlálóval megmértük a minták radioaktivitását.

A biológiai kísérletsorozatok és ezen mérésekhez tartozó eredmények kiértékelése a Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszék Radiobiológiai Munkacsoportjával együttműködés során valósultak meg, Dr. Trencsényi György – a Kutatócsoport és a Tanszék vezetőjének –, szakmai irányításával.

5.2.10 Sejtfelvétel és kiáramlási vizsgálatok

A módszer: A B16-F10, A375 és MELUR sejteket egyrétegű sejttenyészetként szaporítottuk szövettenyésztő lombikokban ($2 * 10^5$ sejt/lombik) 24 órán át. Ezután 0,37 MBq ^{68}Ga-NODAGA-PCA-t és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA-t adtunk az egyes lombikokhoz, majd 30 és 90 percig inkubáltuk a sejteket 37 °C-on. Az inkubációs idő leteltével a sejteket kétszer mostuk PBS-sel és tripszinnel, majd ezt követően megszámoltuk azokat. A radioaktivitást gamma számlálóval a ^{68}Ga érzékeny energiaablakon egy percig mértük, majd a bomlás korrigált radioizotóppal jelölt vegyület felvételt cpm értékben fejeztük ki 10^6-os sejtszám esetében. A cpm értéket ID%-ban tüntettük fel.

A ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA kiáramlásának meghatározásához az egyrétegű tenyészetben növekvő sejteket először feltöltöttük a radioligandumokkal (0,37 MBq, 37 °C, 90 perc), majd kétszer mostuk PBS-sel. Ezután mindegyik tenyésztőedénybe 5 mL DMEM oldatot adagoltunk és az összetapadt sejteket további 10 percig inkubáltuk 37 °C-on.

Az idő elteltével a sejteket PBS-sel és tripszinnel kétszer mostuk, majd a sejteket megszámoltuk. A radioaktivitást gamma számlálóval mértük.

B módszer: A B16-F10, A375 és MELUR sejtekből egyrétegű sejttenyészetként szaporítottuk szövettenyésztő lombikokban (2 * 10^5 sejt/lombik) 24 órán át. Ezt követően a sejteket tripszinizáltuk, centrifugáltuk és DMEM-ben újra szuszpendáltuk, majd a kémcsövekbe 1 * 10^6 mL^{-1} sejtkoncentrációval alikvot részleteket adtunk. Mindegyik csövet 0,37 MBq aktivitású ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA jelenlétében 30 és 90 percig inkubáltuk 37 °C-on. Az inkubációs idő eltelte után a mintákat háromszor jéghideg PBS-sel mostuk és a radioaktivitást gamma számlálóval mértük, az eredményt cpm-ben kaptuk. A kiáramlási vizsgálatoknál először a radioizotóppal jelölt vegyületeket adtuk hozzá a sejtekhez (0,37 MBq, 37 °C, 30 és 90 perc). Az inkubálást követően a sejteket szobahőmérsékleten mostuk 1 mmol/dm^3 koncentrációban glükózt (gl-PBS) tartalmazó PBS oldattal. A mintáinkat centrifugáltuk, majd ezután a felülúszót eltávolítottuk, a sejteket 2 mL gl-PBS-ben újra szuszpendáltuk és további 10 percig inkubáltuk 37 °C-on radioligandum nélkül. A kiáramlási mérést jéghideg PBS hozzáadásával állítottuk le. A sejteket kétszer jéghideg PBS-sel mostuk és a radioaktivitást gamma számlálóval mértük meg.

5.2.11 Az alkalmazott tumor modellek

A mérések során használt C57BL/6J és a CB17 SCID típusú egereket steril körülmények között, 26 ± 2 °C hőmérsékleten, 50 ± 10% páratartalommal, egyedileg szellőztetett ketrecekben (IVC rendszerben) tartottuk mesterséges megvilágítás (automatizált 12 órás ciklussal) mellett. Steril félszintetikus táppal, továbbá steril ivóvízzel *ad libitum* történt az etetésük és az itatásuk mindegyik állat esetében. A laboratóriumi állatok tartásánál, kezelésénél a Magyar Törvények és az Európai Unió előírásait vettük figyelembe, minden erre vonatkozó szakasz pontos és szigorú betartásával. Tehát a *„3 R”* betartása mellett történtek az *in vivo* állatkísérletek, [231], amely a következőket jelenti: *replacement* – az állati modellek helyettesítése egyéb mintapéldánnyal, ilyen például az abszolút pótlás (számítógépes programok segítségével), valamint a relatív pótlás (gerinces állatok helyettesítése gerinctelenekkel, mivel a tudomány mai állása szerint, az utóbbiak fájdalom érzékelése lényegesen alacsonyabb); *reduction* – ezen eljárásmód lényege, hogy kevesebb állatot használ fel ahhoz, hogy elegendő adatot szerezzen a kutatási kérdés megválaszolásához; *refinement* – az állatoknál felmerülő fájdalom, szorongás és szenvedés minimalizálása, a tudományban használt állatok jólétének biztosítása a születéstől a halálig [232]. Az *in vivo* tumor modellek

indukciójához felnőtt nőstény CB17 SCID (n = 30) és C57BL/6J (n = 20) egerek álltak a rendelkezésünkre. Az amelanotikus tumor modellek indukálásakor 1 * 10^5 amelanotikus MELUR vagy A375 tumorsejteket injektáltunk az egér bal váll régiójába a bőr alá 0,9%-os NaCl oldatban (100 µL). A melanint termelő melanoma létrehozása céljából a C57BL/6J egereket B16-F10 tumorsejtekkel (1 * 10^5 sejt; 100 µL NaCl-ban) injektáltuk, szubkután a bal váll területén. A daganatok növekedését tolómércével követtük és a következő formula alkalmazásával számítottuk ki az aktuális térfogatot: (legnagyobb átmérő * legkisebb átmérő^2)/2. Az *in vivo* és az *ex vivo* kísérleteket 21 ± 2 nappal a tumorsejtek szubkután történő injektálását követően történtek, amely időpontokban a tumor térfogata 110 ± 10 mm^3 volt.

5.2.12 PET/CT és PET/MRI képalkotás

A kontroll és a daganatos állatokba 7,0 ± 0,2 MBq ^{68}Ga-NODAGA-PCA-t vagy ^{18}F-FDG-t injektáltunk a farokvénán keresztül 21 ± 2 nappal a B16-F10, vagy Melur sejtek beültetése után. 90 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA, illetve a kontrollvizsgálatok során 60 perccel a ^{18}F-FDG injekció után 3%-os izoflurránnal (Forane), dedikált kisállati érzéstelenítő eszköz segítségével altattuk el az egereket, ezt követően az egész test PET-vizsgálat (10 perc felvételi idő) a MiniPET-II szkenner segítségével történt [23]. A mért adatokon szkenner normalizálást és véletlenszerű korrekciót alkalmaztunk, továbbá a képeket standard EM iteratív algoritmus segítségével rekonstruáltuk. A voxel mérete 0,5x0,5x0,5 mm volt, a térbeli felbontás pedig 1,4 és 2,1 mm között változik annak függvényében, hogy az adott voxel milyen távolságban helyezkedik el a detektorgyűrű középpontjától. A szervek és daganatok anatómiai lokalizációjához kúpnyalábos számítógépes tomográfiát (CBCT, 3D Accuitomo, Japán) használtunk. A röntgencső beállításai 60 kVp; feszültség 8,0 µA áram; expozíciós idő 30,8 s vetítésenként; voxel méret: 160 µm.

A kvantitatív radiogyógyszerjelölt vegyület felvételt standardizált felvételi értékben (SUV), SUV = [VOI aktivitás (Bq/ml)]/[injektált aktivitás (Bq)/állat tömege (g)] kifejezéssel számoltuk, 1 g/ml sűrűséget feltételezve. Az értékes térfogatot (VOI) kézzel rajzoltuk a szerv vagy a tumor pereme köré a BrainCad szoftver segítségével. A tumor/izom (T/M) és a tumor/tüdő (T/L) arányokat a tumor VOI és a háttér (izom vagy tüdő) VOI aktivitásának arányaként számoltuk ki. Az egészséges kontroll egerek tüdejét alkalmaztuk a T/L arány kiszámításához háttérként.

Az állatok PET/MRI vizsgálata a debreceni ScanoMed Kft. Transzlációs Kutató Központjának Preklinikai Laboratóriumában történt. A kontroll és tumoros állatokba a laterális

farokvénán keresztül 10,3 ± 0,3 MBq ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA radioizotópjelzett vegyületet injektáltunk. 90 perccel a radioligandum injekció beadását követően az egereket 3% izoflurránnal (Forán) elaltattuk speciális inhalációs altatógép segítségével. A teljes test PET vizsgálatok (20 perces statikus PET vizsgálat) a preklinikai nanoScan PET/MRI készüléken lettek elvégezve. Az esetleges elmozdulás megakadályozása érdekében az állatokat (egereket) egérkamrába rögzítettük, és a látómező középpontjába (FOV – Field of View) helyeztük a mérés ideje alatt. A szervek és szövetek anatómiai lokalizációjának megállapítására T1-súlyozott MRI méréseket eszközöltünk (3D GRE EXT multi-FOV; TR/TE 15/2 ms; FOV 40 mm; NEX 2). A PET eredmények adatfeldolgozását (rekonstrukcióját) egy háromdimenziós iteratív (3D-OSEM) algoritmussal végeztük. A PET és az MRI képek egyaránt automatikus mentések során, a PET/MRI készülék Nucline szoftvere segítségével készültek. A képeket az InterView™ FUSION (Mediso Kft., Magyarország) képelemző szoftverrel tanulmányoztuk. A radiogyógyszerjelölt vegyület dúsulásának mennyiségi értékét a standard felvételi értékkel fejeztük ki (SUV). A vizsgált területek (például a szövetek és különböző szervek) aktivitás koncentrációjának a meghatározása céljából a szerveket és szöveteket kézzel körbe rajzoltuk, majd a 3D VOI alapján az InterView™ FUSION szoftver kiszámolta a SUVmean (átlag), SUVmax (maximum), SUVmin (minimum) értékeket. A standard felvételi értéket (SUV) az alábbiak szerint számítottuk: SUV = [VOI aktivitás (Bq/mL)]/[injektált aktivitás (Bq)/állat tömege (g)]. A tumor-izom (T/M) arány pedig a tumor VOI és a háttér (izom) VOI aktivitás értékének a hányadosa.

5.2.13 Ex vivo biodisztribúciós vizsgálatok

Az *in vivo* PET/MRI képalkotást követő napon a kontroll és a tumoros egerekbe intravénásan 10,3 ± 0,3 MBq ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA radioizotópjelzett vegyületeket injektáltunk. A ^{68}Ga-mal jelölt prokainamid származékok beadását követően az egereket túlaltattuk, 3%-os izoflurránnal. Mindegyik szervből szövetmintákat vettünk, a súlyukat analitikai mérleggel-, a radioaktivitásukat gamma számlálóval mértük, és kiszámítottuk a DAR (Differenciális abszorpciós arány) értéket a következő képlet segítségével: ([halmozott radioaktivitás (MBq) / szövet (g)] / [teljes injektált radioaktivitás (MBq) / testtömeg (g)]).

5.2.14 Statisztikai analízis

A szignifikancia szinteket Mann-Whitney U-teszttel számítottuk ki. Az adatokat legalább három független kísérlet átlag ± szórás (SD) eredményének értéke alapján adtuk meg. A szignifikancia szint $p \leq 0,05$, a kivételt képező eseteket minden alkalommal jeleztük.

5.3 Peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából

5.3.1 Az APRPG-COOH és APRPG-NH_2 peptidek előállítása peptid-szintézissel

Az APRPG-COOH és az APRPG-NH_2 peptidek előállítását Prof. Dr. Mező Gábor, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport vezetője készítette el számunkra, az általunk megtervezett szerkezet alapján.

Az APRPG-COOH peptid előállítása 2-ClTrt gyantán történt, míg az APRPG-NH_2 peptid Rink-Amid MBHA gyantán, SPPS-módszerrel szintetizálták, a szokásos Fmoc-kémia alkalmazásával. Az oldallánc egyetlen aminosav számazék esetében, a Fmoc-Arg (Pbf)-OH részén volt védve. A Fmoc védőcsoport eltávolítására 2% DBU és 2% piperidin DMF-ben készült keverékét használták, 3 ekvivalens feleslegben alkalmazva. Az aminosav származékok kapcsolására kapcsolószerként a DIC/HOBt-t alkalmazták, szintén 3 ekvivalens mennyiségben. A védőcsoport nélküli, nyers peptideket a gyantákról 95% TFA; 2,5% víz és 2,5% TIS hasító elegy segítségével hasították le. A nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztították, majd a tisztítási lépést követően a termékeket (APRPG-COOH és APRPG-NH_2) analitikai RP-HPLC és ESI (lásd: *5.3.2. fejezet*) módszerekkel vizsgálták és azonosították (lásd: *5.3.4* fejezet). A végtermékek hozama mindkét esetben meghaladta a 70%-ot.

Az NGR-APRPG és az YEVGHRC peptideket a Bankpeptide Biological Tech Co., LTD (Hefei, Kína) szintetizálta számunkra, az általunk kért tulajdonságok és szerkezet alapján.

5.3.2 Szerkezetazonosítás tömegspektrometriával

A fagyasztva szárított peptideket a felhasználás előtt ismételt ESI-MS vizsgálatnak vetették alá a szerkezetigazolás céljából Esquire 3000^+ ioncsapda tömepspektrométerrel. A spektrumokat az 50-2500 m/z tartományban vizsgáltuk. A mintaelőkészítés során a peptideket acetonitril/víz (v/v) 1:1 arányú elegyében és 0,1% hangyasavban oldottuk fel.

5.3.3 A NODAGA-APRPG-COOH, NODAGA-APRPG-NH_2, NOTA-NGR-APRG és a NODAGA-YEVGHRC peptid-származékok előállítása

Az APRPG-COOH lineáris peptid konjugációs reakciója a *p*-SCN-Bn-NODAGA kelátorral

A NODAGA-APRPG-COOH peptid prekurzor előállításához a makrociklusos NOTA családjába tartozó *p*-SCN-Bn-NODAGA amin funkciós csoportra szelektív kelátort választottuk, amely során egy amid kötést alakítottunk ki a hordozó peptid és a kelátor összekapcsolásával. A reakciót a következő módon valósítottuk meg: 10,5 mg (21 µmol) lineáris APRPG-COOH peptidet 0,5 mL dimetil-formamidban oldottunk, majd ezt követően 15,05 mg (25 µmol) *p*-SCN-Bn-NODAGA kelátort adtunk hozzá, végezetül pedig 7,4 µL *N,N*-diizopropil-etilamint a reakcióedénybe. A reakcióelegyet 24 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettük, majd a nyers terméket (NODAGA-APRPG-COOH) félpreparatív RP-HPLC eljárással tisztítottuk. A tisztítást követően a termékeket tartalmazó frakciókat egy lombikba gyűjtöttük, majd liofilizáltuk. Az anyagot ESI-MS (Shimadzu LCMS IT-TOF tömegspektrométer, Shimadzu Corp., Tokió, Japán) és analitikai RP-HPLC-vel jellemeztük (a félpreparatív és az analitikai RP-HPLC-s körülményeket a *5.3.4* fejezetben részletezzük).

Az APRPG-NH_2 lineáris peptid konjugációs reakciója a *p*-SCN-Bn-NODAGA kelátorral

A kelátor, és maga a konjugációs reakció lépései is megegyeztek az előző alfejezetben leírtakkal, mindössze a kimért anyagmennyiségek és a lineáris peptid karboxil terminálisa különbözött.

5,8 mg (12 µmol) APRPG-NH_2 peptidet mértünk ki egy reakcióedénybe, amelyet 0,5 mL DMF-ben oldottunk, majd 8,3 mg (14 µmol) *p*-SCN-Bn-NODAGA makrociklusos kelátort és 4,7 µL DIPEA-t, valamint 50 µL vizet adtunk hozzá. A konjugálási lépés körülményei a következőek voltak: 24 órán át tartó folyamatos kevertetés szobahőmérsékleten. A reakcióelegy feldolgozása, valamint a tiszta termék azonosítása a NODAGA-APRPG-COOH előállításánál ismertetett lépések szerint történtek.

Az YEVGHRC lineáris peptid konjugációs reakciója a Maleimid-NODAGA kelátorral

A NODAGA-YEVGHRC peptid-származék előállításához szintén egy makrociklusos kelátort, a maleimid-NODAGA-t alkalmaztuk Ebben az esetben az volt a tervünk, hogy nem az amino terminálison létesítünk kémiai kötést, hanem a cisztein oldalláncon keresztül végezzük el a konjugációt. Ezért egy olyan kemoszelektív csoporttal ellátott kelátor-származékot

kerestünk, amely a védőcsoport nélküli amin mellett is jó hatékonysággal reagál a tiol funkciós csoporttal. Ilyen esetekben kitűnő választás a maleimid-funkcionalizált NODAGA. A tervezett ligandum előállításához 9,7 mg (11 μmol) maleimid-NODAGA-t és 6,7 mg (13,5 μmol) YEVGHRC-t DMF/víz 3:1 arányú elegyében oldottuk, amelyet előtte oxigénmentesítettünk hélium buborékoltatással. Az elegy pH-ját ~7-7,5 közé állítottuk be. A kapcsolási reakció 2 óra alatt zajlott le, szobahőmérsékleten, folyamatos keverés és hélium atmoszféra alatt. A nyers terméket (NODAGA-YEVGHRC) félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk, majd az egyes termékfrakciókat lombikba gyűjtöttük és fagyasztva szárítottuk. A végterméket analitikai RP-HPLC-vel és ESI-MS-sel azonosítottuk.

A c[KNGRE]-APRPG heterodimer peptid konjugációs reakciója a *p*-SCN-Bn-NOTA kelátorral

A heterodimer vegyület előállításával a már korábban kifejlesztett és sikeresnek bizonyuló aminopeptidáz N-szelektív ciklikus pentapeptidünket [233] kívántuk továbbfejleszteni a multimerizációs technika segítségével. Ehhez olyan „partner" alegység beépítését terveztük, amely egy nyíltláncú pentapeptid, nevezetesen az APRPG-COOH-t tartalmazza. A heterodimer vegyület előállításával, egy olyan peptid-származék állt a rendelkezésünkre, amely két különböző típusú peptid-alegységgel (ciklikus NGR és aciklusos APRPG) rendelkezik egy molekulán belül, ez a konstrukció feltételezésünk szerint elősegítheti a képalkotás minőségi javulását.

A heterodimer vegyület, amelyet előállítottunk a NOTA-NGR-APRPG volt. 10,1 mg (7,5 μmol) peptidet 700 μL DMF-ben oldottuk, 300 μL DMF-ben, pedig a 6,3 mg (11 μmol) kelátort (*p*-SCN-Bn-NOTA). A reakcióelegyhez 300 μL MiliQ vizet adtunk, majd a pH-át 8,5-re állítottuk be 2%-os NaOH-dal. A konjugálási reakció 2 órát vett igénybe szobahőmérsékleten, állandó kevertetés mellett. A reakció idő leteltét követően a reakcióelegyet feldolgoztuk, első lépésben félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk, az itt kapott összesített frakciót liofilizáltuk, majd ezt követően a szerkezet azonosítása céljából ESI-MS-el és analitikai RP-HPLC-vel vizsgáltuk a tiszta terméket.

5.3.4 Félpreparatív és analitikai HPLC

A nyers termékek tisztítása (lineáris peptidek: APRPG-COOH; APRPG-NH_2) a KNAUER HPLC rendszeren, félpreparatív Phenomenex Luna C18 oszlopon (részecske méret: 100 μm, hossz és belső átmérő: 250 mm * 21,2 mm) történt. Lineáris gradiens elúciós profilt alkalmaztunk (0 perc 5% B; 5 perc 5% B; 50 perc 50% B) 4 mL/perc áramlási sebességgel, az

eluensek a következőek voltak: A eluens (0,1% TFA vízben); B eluens (0,1% TFA; acetonitril/víz 80:20 (v/v%) arányú elegye). A komlexeket UV detektor segítségével detektáltuk 220 nm-en.

5. táblázat: A kelátorral konjugált peptid-származékok tisztításánál alkalmazott HPLC-s körülmények

Vegyület neve	Idő (perc)	A (%)	B (%)
NOTA-NGR-APRPG	0	90	10
	2	90	10
	27	40	60
	35	0	100
	40	0	100
NODAGA-YEVGHRC	0	95	5
	4	95	5
	15	65	35
	20	30	70
	30	30	70
NODAGA-APRPG-NH_2 és NODAGA-APRPG-COOH	0	100	0
	6	100	0
	14	40	60
	20	20	80
	30	20	80

A tiszta termékeket (lineáris peptidek: APRPG-COOH; APRPG-NH_2) az izoláláshoz alkalmazott műszeren vizsgáltuk, hogy megállapítsuk a vegyületeink kémiai tisztaságát. Az analitikai RP-HPLC-nél (részecske méret: 5 μm, hossz és belső átmérő: 250 mm * 4,6 mm) Phenomenex Luna C18 oszlopot használtunk állófázisként, a mozgófázis áramlási sebessége 1 mL/perc volt, lineáris gradiens elúcióval valósult meg a termékek azonosítása. A csúcsokat 220 nm hullámhosszon detektáltuk. Az elúciós profil a fentiekben már ismertetett eluensekkel következőképpen nézett ki: (0 perc 0% B; 5 perc 0% B; 50 perc 90 % B).

A következő folyadékkromatográfiás eljárás, a négy, kelátorral konjugált peptid-származék tisztítására szolgált. A KNAUER HPLC (KNAUER Wissenschaftliche Geräte

GmbH, Berlin, Németország) készüléket, félpreparatív Supelco Discovery Bio Wide Pore C18 oszloppal (részecske méret: 10 µm, hossze és belső átmérő: 150 mm * 10 mm) és 4 mL/perc áramlási sebességgel használtuk, gradiens elúcióval. A eluens (0,1% TFA vízben); B eluens (0,1% TFA; acetonitril/víz 95:5 (v/v%) arányú elegye alkotta). A csúcsokat 254 nm-en UV detektorral detektáluk (5. táblázat).

6. táblázat: A radiojelölt peptid-származékok minőségellenőrzésénél alkalmazott HPLC-s körülmények

Vegyület neve	Idő (perc)	A (%)	B (%)
^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG	0	100	0
	2	100	0
	8	50	50
	12	10	90
	25	10	90
^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC	0	100	0
	4	100	0
	10	60	40
	15	55	45
^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH	0	88	12
	2	88	12
	18	55	45

A ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG radioizotóppal jelölt peptid-prekurzorok radiokémiai tisztaságának meghatározásához radio- és UV detektorral felszerelt KNAUER HPLC-t használtunk (a kelátorral konjugált peptid-származékoknál alkalmazott RP-HPLC), amelyet analitikai HALO C18 oszloppal (részecske méret: 5 µm, hossz és belső átmérő: 100 mm * 3,0 mm) működtettük, 0,7 mL/perc áramlási sebesség mellett, az alábbi gradiens profillal: (mozgó fázisok a korábban említett oldószerekkel azonosak). A komplexeket radio- és UV detektorral (254 nm) azonosítottuk (6. táblázat).

5.3.5 A peptid-származékok radioizotópos jelölése ^{68}Ga-mal

A radiojelölési protokoll meghatározását optimalizálási kísérletek előzték meg, mindegyik vegyület esetében, a *5.2.4* fejezetben leírtakkal megegyezően.

A biológiai mérésekhez szükséges radioizotópos jelölésekhez és az optimalizációs mérésekhez GalliaPharm® ^{68}Ge/^{68}Ga-generátort (Eckert-Ziegler, Berlin, Németország) alkalmaztunk. A generátor TiO_2 állófázissal rendelkezik, 5 mL 0,1 mol/dm^3 koncentrációjú ultra tiszta sósavval történt meg az elúció, frakcionált technika alkalmazásával, amely folyamat során az 1,8-3,0 mL közötti részt gyűjtöttük. Előzetesen a generátor használatba vételekor kimértük, hogy ennek a frakciónak az aktivitáskoncentrációja legtöményebb (5 mérésből megállapítva). Ebből az 1,2 mL térfogatú elegyből 1 mL-t pufferéltünk 0,16 mL (1 mol/dm^3) ultra tiszta nátrium-acetáttal, amellyel a reakcióelegy pH-ját ~4-4,1-re állítottuk be, mindegyik vegyület esetében. Ezt követően a 3 mmol/dm^3 koncentrációjú törzsoldatból (NODAGA-APRPG-COOH, NODAGA-APRPG-NH_2, NODAGA-YEVGHRC és NOTA-NGR-APRPG) 5 µL-t adtunk a reakcióhoz, majd 95 °C-on 5 perces inkubáció mellett, kevertetés nélkül zajlott le a radiojelölési reakció a NODAGA-YEVGHRC és a NOTA-NGR-APRPG peptid-származékok esetében. Méréseink közben az derült ki, hogy a NODAGA-APRPG-COOH és a NODAGA-APRPG-NH_2 peptidek vélhetőleg érzékenyebbek a radiolízisre, ezért az említett módszer alacsony radiokémiai tisztasággal rendelkező terméket eredményezett. A melléktermékek esetleges keletkezése miatt, a radioizotópos jelölést szobahőmérsékelten, 5 percig végeztük, illetve 0,1 mL abszolút EtOH-t adtunk a reakciós elegyhez gyökfogó tulajdonsága miatt. Ezután mindegyik vegyület esetében a szobahőmérsékletre való lehűlést követően a reakcióelegyet OASIS HLB 1 cc 30 mg töltettérfogatú oszlop felületére vittük fel (aktiválás: 5 mL 96% EtOH, majd 10 mL vizes mosás; gyártói ajánlás), amelyen megkötöttük a radiojelölt peptideinket, majd 2 mL vizes mosást követően a ^{68}Ga-mal jelölt peptid-származékokat 0,2 mL izotóniás sóoldat/96% etanol 2:1 arányú oldatával eluáltuk. A biológiai vizsgálatok során a kisállatok a maximum 10%-os alkohol-koncentrációt tolerálják, ezért a terméket hígítottuk izotóniás sóoldat segítségével, amely során az etanol koncentrációja mindegyik vegyület esetében a megengedett érték alá csökkent, ezt követően pedig steril szűrést végeztünk el. Minden egyes esetben a végtermék radiokémiai tisztaságát (%) analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztük és határoztuk meg, UV- és radiodetektor együttes alkalmazásával.

5.3.6 A ^{68}Ga-mal jelzett peptid-származékok oktanol/PBS megoszlási hányadosának (logP) meghatározása

A LogP értékeinek meghatározása a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG vegyületek esetében a *5.2.6* fejezetben leírtak alapján valósult meg. Röviden, ~1,5 MBq (10 µL) aktivitású radioizotóppal jelölt peptid-származékot (^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG) helyeztünk egy centrifugacsőbe, amihez 0,49 mL PBS-t (pH = 7,4) és 0,5 mL 1-oktanol-t adtunk. 20 percig Vortex segítségével erőteljesen kevertettük a csöveket, majd 20000 fordulat/perc sebességgel történő centrifugálás következett a rétegek szétválása érdekében. A két rétegből 100 µL mintákat vettünk, amiket kémcsövekbe helyeztünk, majd Perkin-Elmer Packard Cobra gamma számlálóval mértük a radioaktivitásukat, amelyeket cpm-ben kaptunk meg.

5.3.7 A ^{68}Ga-mal jelzett kismolekulák in vitro stabilitásának meghatározása

A ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG vegyületek stabilitását egér szérumban 37 °C-on vizsgáltuk a *5.2.7* fejezetben leírtak szerint. A radiojelölt peptid-származékokból ~ 8 MBq-t az egér szérumhoz adagoltunk, majd 37 °C-on inkubáltuk az elegyet. Ezután 50 µL mennyiséget vettünk a mintákból 0, 30, 60, 90 és 120 percnél, további 50 µL hideg absz. EtOH-lal elegyítettük. A kivált csapadékot 20000 fordulat/perc sebességgel, 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó fázist összegyűjtöttük, vízzel hígítottuk, ezután pedig analitikai RP-HPLC segítségével vizsgáltuk a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG vegyületek radiokémiai tisztaságát a *5.3.4* fejezet alapján.

5.3.8 A sejttenyésztés során alkalmazott körülmények

Az angiogenezis kimutatására alkalmas vegyületeink receptor-kötődési tulajdonságait B16-F10 tumort hordozó egereken teszteltük, ezért a már korábban is említett egér eredetű melanint termelő sejtvonallal dolgoztunk.

A sejttenyésztési módszer során a B16-F10 sejteket DMEM (Dulbecco módosított sas tápoldat) tápközegben, 10% FBS (magzati borjú fehérje) szérummal növesztettük, amihez 1% (v/v) MEM-et (nem esszenciális aminosav), 1% MEM vitamint, 1% antibiotikus és antimiotikus oldatot adagoltunk, amelyek biztosították a sejtek számára a fejlődéshez

elengedhetetlen tápanyagokat, növekedési faktorokat, továbbá a megfelelő fizikai, valamint kémiai környezetet. Az általánosan alkalmazott körülmények között történt a tenyésztés (5% CO_2, 37 °C), amelyek az optimális feltételeket biztosították a növekedéshez. A sejteket két naponta passzáltuk steril fülkében, hiszen a mikroszkóppal történő folyamatos napi megfigyelések során, azt tapasztaltuk, hogy ez az az időpont, amely alatt a sejtosztódás véget ér, innentől a sejtszám állandósult. Ezt követően újabb médiumot és vitaminokat adtunk a T75 tenyésztőflaskába, ezáltal meghígítva a sejttenyésztést, elősegítettük azt az ideális környezetet, amely körülmények között a sejtek újra osztódásra képesekké váltak. 5-6 passzálást követően értük el azt a sejtszámot ($5 * 10^6$ B16-F10 sejt), amely már elegendő a tumor létrehozásához.

5.3.9 Állattartás körülményei

Az *in vivo* kísérletsorozathoz – amely során a ^{68}Ga-mal jelölt peptid-származékaink képalkotási tulajdonságait teszteltük –, 12 hetes hím, C57BL/6 egereket (n = 60) az Animalab Ltd.-től (a The Jackson Laboratory viszonteladója) vásároltuk. A kísérleti munka során felhasznált egereket konvencionális körülmények között (26 ± 2 °C hőmérsékleten, 55 ± 10% páratartalommal, egyedileg szellőztetett ketrecekben, IVC rendszerben), valamint automatizált 12 órás ciklusú mesterséges világítás mellett éltek. Az egerek táplálékául a VRF-1 rágcsáló táplálék szolgált (Speciel Diets Services, Akronom Ltd.), továbbá az itatásuk steril ivóvízzel *ad libitum* történt.

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Állatkutatás Etikai Bizottsága engedélyezte (engedély száma: 8/2016 / DEMÁB). A laboratóriumi állatokat a magyar törvények, valamint az Európai Unió állatjóléti irányelvei és szabályai szerint tartottuk.

5.3.10 Az állatmodell

A B16-F10 melanotikus sejtvonal tenyésztési folyamata során, általában 5-6 passzálás elegendő volt a kívánt sejtszám elérése érdekében, amely a már említett $5 * 10^6$ mennyiségű sejtszám. A B16-F10 sejtek életképességét tripán kékkel vizsgáltuk, ahol minden esetben megbizonyosodtunk afelől, hogy a sejtek életképessége a 90%-ot meghaladta. C57BL/6 egereket alkalmaztunk állatmodellként, és a tumorsejtek beoltását megelőzően érzéstelenítést hajtottunk végre, majd a bal vállak régióját szőrtelenítettük. Ezt követően pedig a már előkészített bal váll környékébe 150 µL sóoldatot injektáltuk, amely $5 * 10^6$ B16-F10 egér eredetű melanint termelő sejteket tartalmazott. A tumornövekedés mértékét minden második

napon tolómércével mértük, majd a tumor méretét a *5.2.11* fejezetben leírtakkal megegyezően határoztuk meg:

5.3.11 In vivo állatkísérlet és kvantitatív PET-elemzés

A B16-F10 tumor indukciót követő 8. vagy 9. napon történt meg a képalkotó vizsgálat mindegyik peptid-származék esetében miniPET kamera segítségével. A tumort hordozó (n = 40) és az egészséges, kontroll (n = 20) egerek érzéstelenítését követően 5,5 ± 0,7 MBq ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG vegyületeket injektáltunk a laterális farokvénán keresztül. 90 perces inkubációt követően az állatokat 3% izoflurránnal (Forán) elaltattuk speciális inhalációs altatógép segítségével. Az altatást fenntartva statikus PET-vizsgálatot (t = 20 perc) végeztünk a MiniPET-II. kamera használatával. A felvételek rekonstrukciója BrainCad szoftver alkalmazásával történt. A szubkután kialakított B16-F10 tumort és az izmot (amely háttérként szolgált) kézzel körbe rajzoltuk, azzal a céllal, hogy meghatározzuk ezen egységek VOI-ját. A radioizotóppal jelölt peptid-prekurzorok dúsulásának mennyiségi értékét a standard felvételi értékkel (SUV) és tumor/izom hányados SUV értékeivel fejeztük ki (SUVmean, SUVmax, SUVmin).

5.3.12 Ex vivo biodisztribúciós vizsgálatok

Az *ex vivo* biológiai eloszlást vizsgáló méréssorozat alkalmával, a kísérleti állatokat (n = 9) az *in vivo* vizsgálatokkal azonos módon, 5,5 ± 0,7 MBq ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG vegyületeket injektáltunk a laterális farokvénán keresztül altatás alatt. 90 perccel a radiogyógyszerjelölt vegyületek beadását követően az állatokat 3% izoflurránnal túlaltattuk, ezt követően különféle mintákat gyűjtöttünk: vért, vizeletet, továbbá kis méretű szövetmintákat is vettünk a májból, lépből, vesékből, vékonybélből, vastagbélből, gyomorból, izomból, zsírból és magából a B16-F10 daganatból, amelyeket előre lemért kémcsövekbe helyeztünk, a mintákat analitikai mérlegen mértük, majd a kémcsövek radioaktivitását gamma számlálóval. Az eredményeket ID%-ban fejeztük ki. Az ID%-ot a következő képlet alapján számoltuk: ([halmozott radioaktivitás (MBq) / szövet (g)] / [1 / teljes injektált radioaktivitás (MBq)]) * 100.

5.3.13 Statisztikai analízis

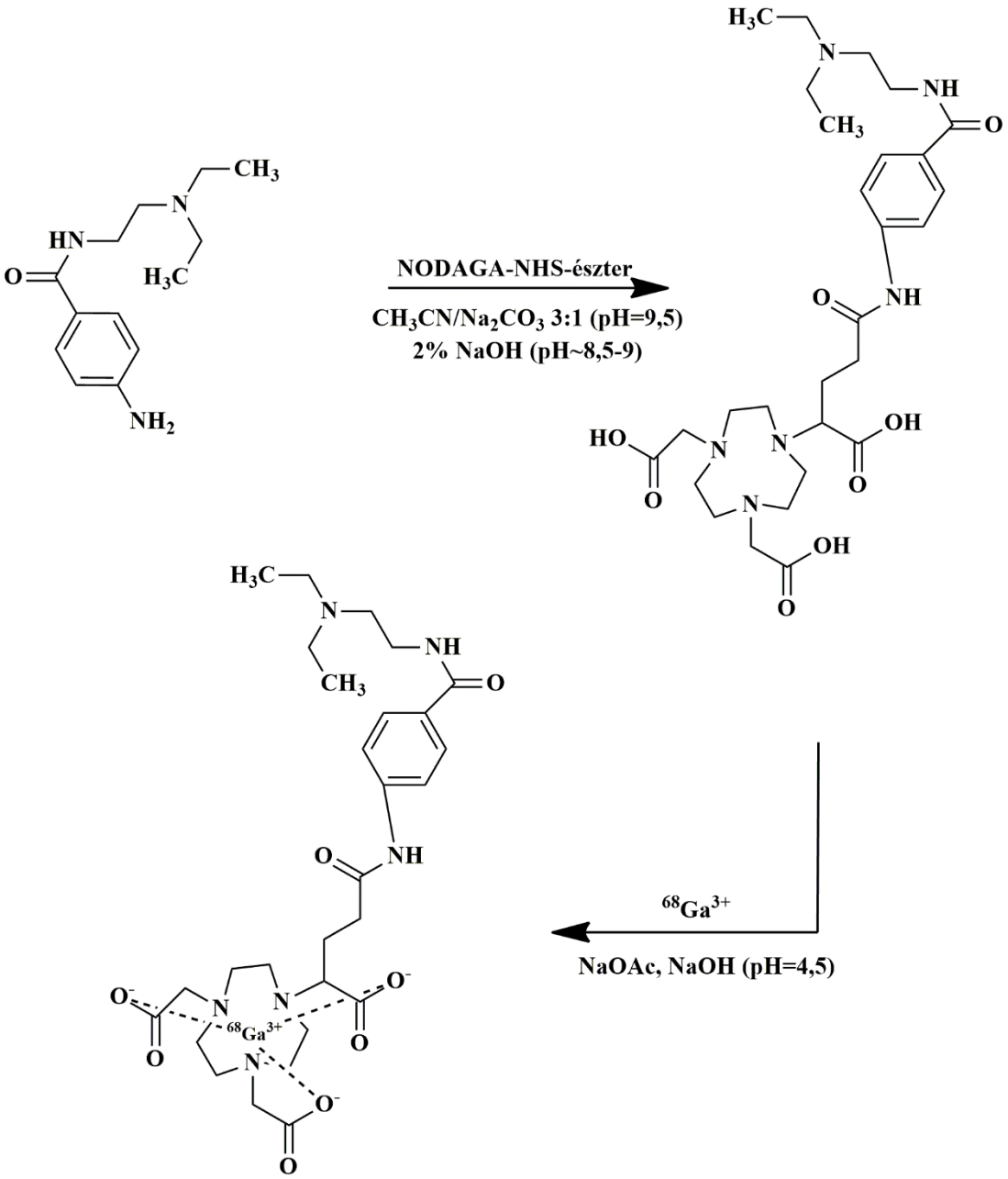
A kísérleti adatokat legalább három független kísérlet átlag ± szórás értékkel adtuk meg. A szignifikanciát kétmintás Student t-próbával és kétutas ANOVA módszerrel számoltuk. A szignifikancia szint $p \leq 0,05$ volt, amennyiben ettől eltérő, akkor azt jeleztük.

6. Eredmények

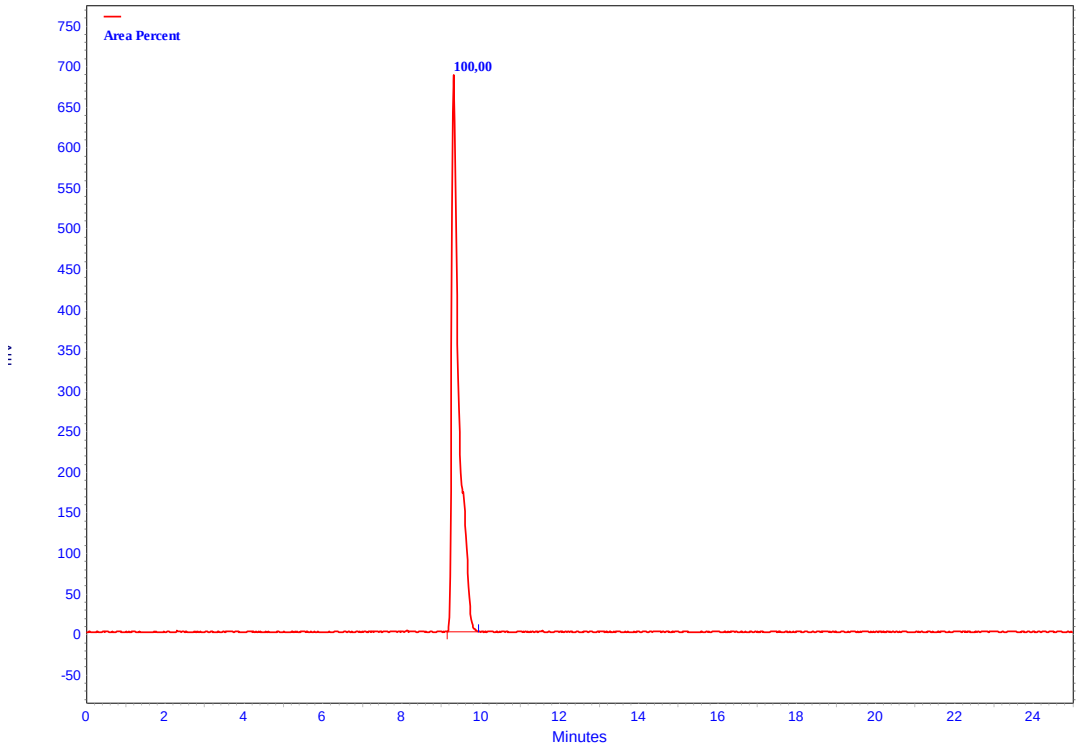
6.1 Kismolekulák nyomjelzése PET képalkotás céljából

6.1.1 Kémiai és radiokémiai szintézis

A NODAGA-PCA-ot a 12. ábrán látható reakcióséma alapján állítottuk elő. A prekurzor kémiai tisztasága 99%-os volt a félpreparatív RP-HPLC-s tisztítást követően. Szerkezetvizsgálat céljából ^{1}H-NMR-t és ESI-MS-t alkalmaztunk, a mérések megerősítették, hogy a célmolekulát sikerrel állítottuk elő. A felsorolt méréseink eredményeként a következőket kaptuk: ^{1}H-NMR (DMSO-d6-400 MHz) δ = 1,27-1,32 (t, 6H), 2,05-2,25 (m, 2H), 2,65-2,68 (t, 2H), 3,07-3,1 (m, 4H), 3,15-3,25 (m, 8H), 3,28-3,32 (m, 4H), 3,35-3,42 (m, 2H), 3,6-3,65 (t, 1H), 3,7-3,85 (m, 6H), 7,55-7,65 (d, 2H), 7,75-7,85 (d, 2H); ESI-MS-nél a számított és mért értékek megegyeztek, amely $[M + H]^{+}$ = 593,32-nek adódott. A ^{68}Ga-NODAGA-PCA teljes szintézise, beleértve a tisztítás és a formulázás lépést is 15-20 percet vett igénybe. A bomláskorrigált hozam átlagos értéke 68,1 ± 6,7% (n = 12) volt, a radiokémiai tisztaság minden esetben meghaladta a 98%-ot (13. ábra). A radioizotópot tartalmazó kismolekula moláris aktivitása 14,95 ± 3,9 GBq/μmol volt.

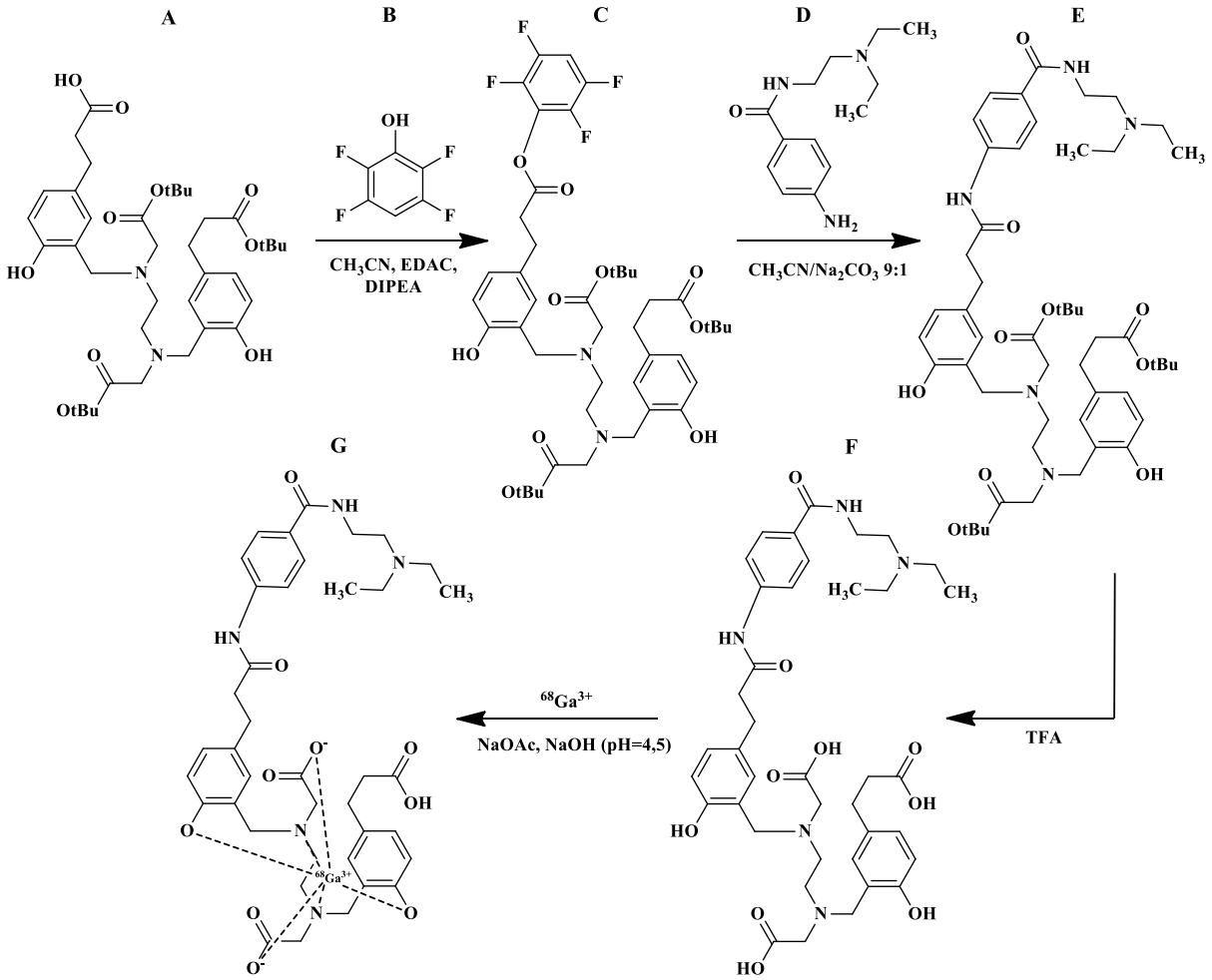


12. ábra: A prokainamid konjugációja makrociklusos kelátorral és a radiojelölés lépései



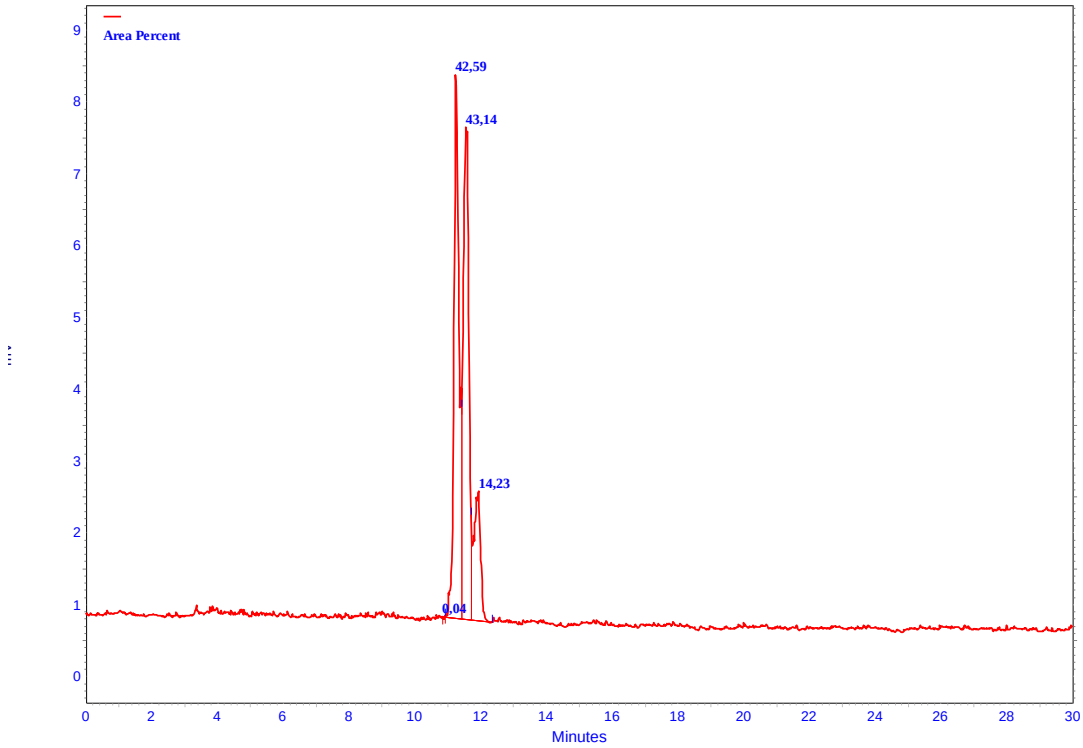
13. ábra A ^{68}Ga-NODAGA-PCA RP-HPLC kromatogramja (a mérések körülményeit az „Anyagok és módszerek” részben részleteztem)

A HBED-CC-PCA előállítását a 14. ábrán részletezem. 4-amino-*N*-(2-dietil-amino-etil)-benzamid-hidroklorid és HBED-CC-tris(tBu)-észter tetrafluorofenil észterének konjugációjával alakítottuk ki a ligandum vázát, majd ezt követően a védőcsoportok eltávolításával kaptuk meg a nyers terméket, amelyet félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk. A HBED-CC-PCA tisztaságát analitikai HPLC-vel ellenőriztük, amely érték 98%-nak adódott. A termék kémiai szerkezetét ^{1}H-NMR-t és ESI-MS segítségével igazoltuk. Az ESI-MS-nél a számított és mért érték megegyezettek: $[M + H]^{+}$ = 750,4. A ^{1}H-NMR mérési eredményei a következők voltak: (DMSO-d6-400 MHz) δ = 1-1,07 (t, 6H), 2,5-2,7 (m, 8H), 2,78-2,97 (m, 10H), 3,55-3,63 (m, 6H), 4,12-4,25 (m, 4H), 6,7-6,75 (m, 2H), 6,8-6,85 (m, 2H), 6,95-7 (m, 4H), 7,65-7,75 (m, 2H). A radioizotópos jelölés teljes reakcióideje 15-20 perc volt, beleértve a formulázást is.



14. ábra: A prokainamid konjugációja nyíltláncú kelátorral és a radiojelölés sémája

A bomláskorrigált hozam 68,87 % ± 8,25 volt (n = 12), a radiokémiai tisztaság ellenőrzése során minden alkalommal 98%-nál magasabb értéket mértünk, továbbá a három sztereoizomer, jól láthatóan megkülönböztethető a radiodetektor segítségével (15. ábra). A radioizotópjelölt HBED-CC-PCA vegyület moláris aktivitása 14,81 ± 1,71 GBq/µmol volt. A minőségellenőrzési mérések azt mutatták, hogy a végtermékben a lehetséges izomerek különböző arányban megjelentek.



15. ábra: A ^{68}Ga-HBED-CC-PCA RP-HPLC kromatogramja (a mérések körülményeit az „Anyagok és módszerek” részben részleteztem)

6.1.2 A ^{68}Ga-mal jelzett kismolekulák oktanol/PBS megoszlási hányadosának (LogP) és in vitro stabilitásának meghatározása

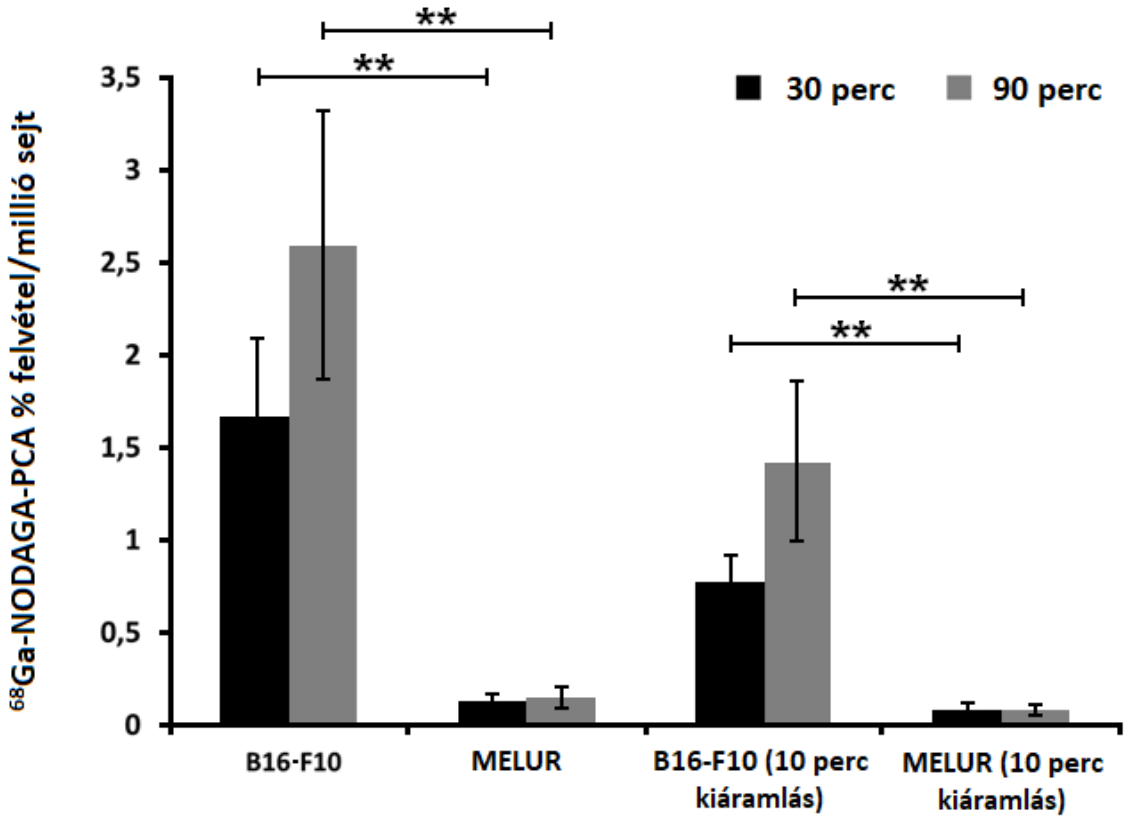
Meghatároztuk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA megoszlási hányados (LogP) értékét, amely -2,79 ± 0,10 adódott, ami arra utal, hogy a radiojelölt kismolekula hidrofil tulajdonságokkal rendelkezik, tehát a farmakokinetikai tulajdonságaiból következőleg döntően a vizelettel fog ürülni. A metabolikus stabilitás meghatározása céljából radiojelölt molekulát *in vitro* patkány és egér szérumban, 37 °C hőmérsékleten vizsgáltuk analitikai radio-HPLC segítségével. Az egér szérumban végzett inkubálás során 0, 30, 60, 90 és 120 percnél vettünk mintákat, amely során az eredeti jelölt vegyület radiokémiai tisztasága a következően alakult: 0 perc = 98,8%; 30 perc = 98,2%; 60 perc = 96,8%; 90 perc = 96,5%; 120 perc = 95,7%. A patkány szérumban végzett 2 órás inkubálás után az eredeti vegyület szintén kb. 95%-a maradt intakt. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az alkalmazott körülmények között a vegyület megfelelő stabilitással rendelkezett, és számíthatunk arra, hogy az *in vivo* vizsgálatok során a PET felvételeken tapasztalható dúsulások a radiogyógyszertől származnak.

A ^{68}Ga-HBED-CC-PCA megoszlási hányados (logP) értéke -2,19 ± 0,12 volt. A ^{68}Ga-NODAGA-PCA-dal (-2,79 ± 0,10) összehasonlítva ez azt jelenti, hogy a második vegyület

lipofilitása kissé magasabb, de a vegyület még mindig erősen hidrofil. Feltételezhető tehát, hogy a kiürülése a szervezetből hasonló útvonalon zajlik, mint korábban írtuk. Ugyancsak elvégeztük a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA vegyület stabilitási méréseit patkány és egér szérumban 37 °C-on, az előbbivel azonos metodika szerint. A méréssorozat során a radiokémiai tisztaságra a következő értékeket kaptuk: 0 perc = 91,8%; 30 perc = 91,3%; 60 perc = 90,2%; 90 perc = 87,5%; 120 perc = 74,5%. A patkány szérumban végzett 2 órás inkubálás után az eredeti vegyület kb. 75% -a sértetlennek bizonyult.

6.1.3 In vitro kísérletek a melanin-specificitás meghatározására

Az *in vitro* kísérleti körülmények között először a ^{68}Ga-NODAGA-PCA melanin-specificitását vizsgáltuk melanin pozitív B16-F10 és melanin negatív Melur sejtvonalak alkalmazásával (16. ábra). 30 és 90 perces inkubációs idő után szignifikáns ($p \leq 0,01$) különbségeket figyeltünk meg a melanin pozitív (1,66 ± 0,43 – 30 percnél; 2,60 ± 0,72 – 90 percnél) és a melanin negatív (0,12 ± 0,04 – 30 percnél; 0,14 ± 0,06 – 90 percnél) sejtvonalak farmakon-felvétele között. A kiáramlási vizsgálatoknál is szignifikáns ($p \leq 0,01$) különbséget találtunk a melanin pozitív és negatív sejtvonalakon a radiogyógyszerjelölt vegyület viselkedése között. Ezekben a kísérletekben a sejteket először ^{68}Ga-NODAGA-PCA-dal töltöttük fel, majd intenzív mosási lépések következtek, ezután pedig a sejteket tovább inkubáltuk radioaktivitás nélkül 10 percig. A melanin tartalmú B16-F10 sejtvonal mindkét időpontban szignifikánsan magasabb ^{68}Ga-NODAGA-PCA tartalmat mutatott (0,78 ± 0,15 – 30 percnél; 1,42 ± 0,43 – 90 percnél), mint a melanin-negatív Melur sejtvonal (0,08 ± 0,04 – 30 percnél; 0,08 ± 0,02 – 90 percnél). A B16-F10 sejtvonal esetében a radiogyógyszerjelölt vegyület dúsulás mértéke körülbelül 13-szor magasabb volt a 30. percben, és 18-szor a 90. percben, mint a Melur sejtekben. Ezek az arányok nem változtak jelentősen a kiáramlási vizsgálatoknál sem, ahol 30 és 90 perc inkubációs időt 10 perc kiáramlás követett, ezt követően a B16-F10 sejtek radiogyógyszerjelölt vegyület felvétele 30 percnél 9-szer, 90 percnél 17-szer nagyobb volt, mint az amelanotikus Melur sejteknél.

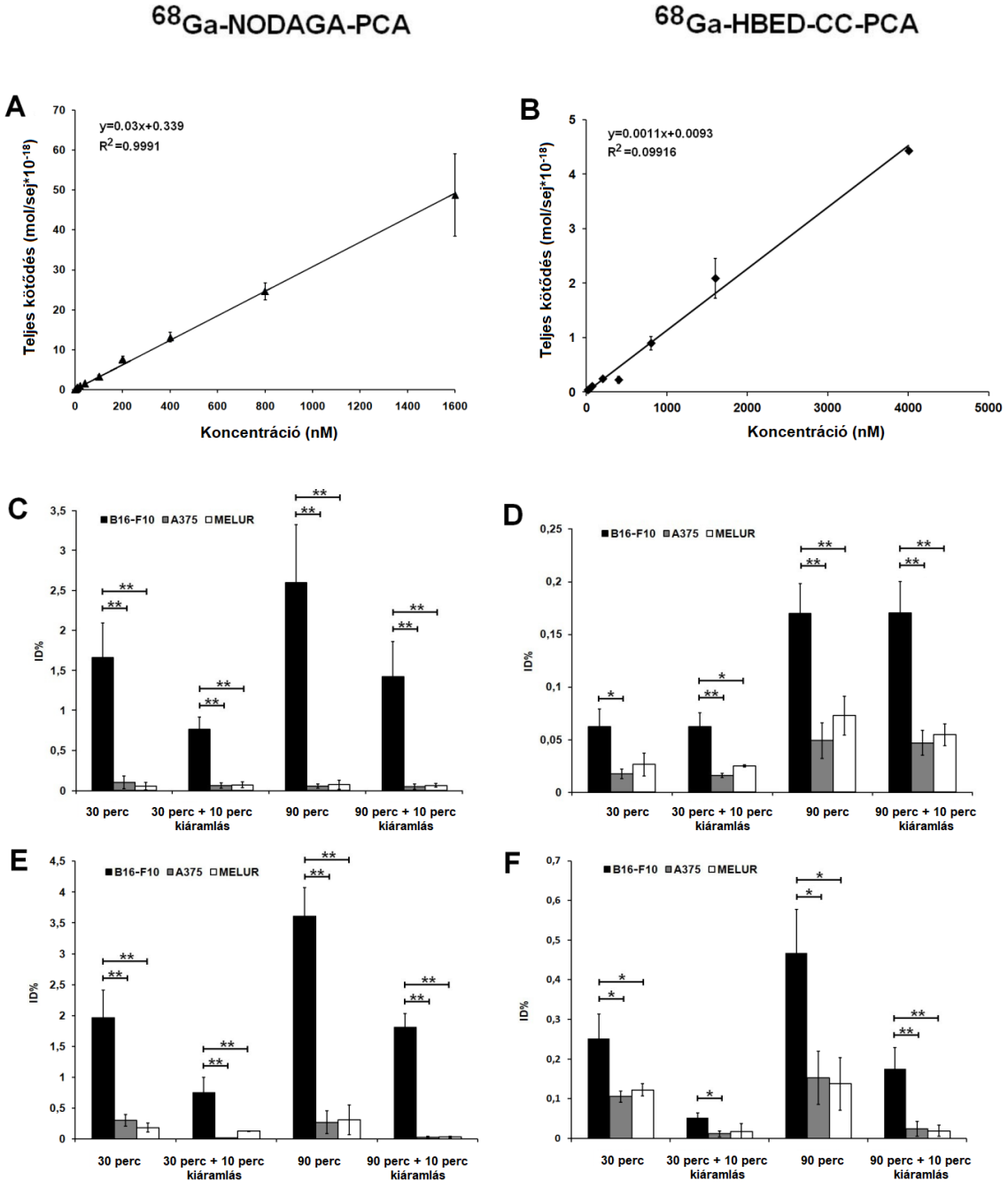


16. ábra: Időfüggő *in vitro* vizsgálatok (felvétel és kiáramlás) ^{68}Ga-NODAGA-PCA vegyülettel melanotikus (B16-F10) és amelanotikus (Melur) melanoma sejtvonalakon. Szignifikancia szint: $p \leq 0.01$ (**). Az eredmények három független mérés átlagának és a szórásnak felelnek meg, minden egyes sorozatot háromszor ismételtünk meg.

In vitro telítés kötődési vizsgálatokat végeztünk a két radiogyógyszerjelölt vegyülettel B16-F10 sejteken. Az *in vitro* telítés kötődési mérések során pozitív korrelációt találtunk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA koncentrációja és a megkötődött radioaktivitás között (17. A ábra). Hasonló összefüggés látható a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA esetében is, azonban ennél a vegyületnél szignifikánsan alacsonyabb a meredekség (17. B ábra). A ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA melanin specifikusságát melanotikus B16-F10, amelanotikus A375 és MELUR sejtvonalakon teszteltük. A sejtek felvételét és kiáramlását melanoma sejtek felhasználásával vizsgáltuk szuszpenzióban és egyrétegű kultúrákban (lásd *5.2.10* fejezetben). A szuszpenzióban a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA felhalmozódása a B16-F10 sejtekben szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,05$ és $p < 0,01$), mint az amelanotikus A375 vagy MELUR sejtekben (17. C és D ábra). Azokban a kísérletekben, amelyekben összehasonlítottuk a két melanin-specifikus radiogyógyszerjelölt vegyület sejtfelvételét, azt

találtuk, hogy a ^{68}Ga-NODAGA-PCA felhalmozódása a B16-F10 sejtekben szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$) (1,56 ± 0,39 – 30 percnél; 2,58 ± 0,69 – 90 percnél), mint a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA-é (0,06 ± 0,017 – 30 percnél; 0,17 ± 0,03 – 90 percnél). Hasonló eredményeket kaptunk, amikor tapadó sejteket alkalmaztunk (B módszer) a két radioizotópjelölt vegyület melanin-specifikusságának meghatározása céljából (17. E és F ábra). Amikor ezt a technikát használtuk a sejtfelvétel vizsgálatához, szignifikánsan nagyobb ($p < 0,01$) ^{68}Ga-NODAGA-PCA akkumulációt találtunk a melanint termelő B16-F10-ben (1,97 ± 0,44 – 30 percnél; 3,61 ± 0,46 – 90 percnél), mint az amelanotikus A375 (0,30 ± 0,09 – 30 percnél; 0,27 ± 0,18 – 90 percnél) vagy a MELUR (0,18 ± 0,07 - 30 percnél; 0,31 ± 0,24 - 90 percnél) sejtekben. A melanotikus B16-F10 sejtekben a ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvétel értéke mindegyik időpontban megközelítőleg hétszerese volt, mint a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA-é, amely eredmény igazolja a NODAGA kelátorral konjugált prokainamid magasabb melanin-kötődési képességét, vagy pedig a sejthártyán történő könnyebb átjutását. Ezen általános tapasztalatok mellett azt is megfigyeltük, hogy ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA felhalmozódása fokozottabb a tapadó melanoma sejteknél, mint a szuszpenzióban.

A kiáramlási (efflux) kísérletekben a sejteket először ^{68}Ga-NODAGA-PCA-dal vagy ^{68}Ga-HBED-CC-PCA-dal „töltöttük fel”, majd alapos mosási ciklusok után a sejteket radioaktivitás nélkül további 10 percig inkubáltuk. Ezt a fajta kísérleti elrendezést használva is szignifikáns ($p \leq 0,01$) különbségeket találtunk a melanin pozitív és negatív sejtvonalak ^{68}Ga-NODAGA-PCA felhalmozódása között (17. C és E ábra), függetlenül a sejtkultúra típusától. Általánosságban elmondható, hogy a radiofarmakon nélkül történt inkubációs periódus csökkenő akkumulációt eredményezett, vélhetőleg abból az okból kifolyólag, hogy a sejtekbe bejutott radioligandum két formáját is mérhettük egyszerre – a melaninhoz kötődött állapotot, illetve azt a mennyiséget is, amelyik csak beáramlott a sejtekbe a külső, magasabb koncentráció eredménye következtében. Egyedül a szuszpenziós sejttenyészetek esetében, a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA ligandumot használva tapasztaltuk azt, hogy gyakorlatilag nem csökkent a kötődött farmakon koncentrációja, igaz, ebben az esetben volt a legalacsonyabb a felvétel, és feltételezhetjük, hogy a stabilan kötődött mennyiség még megfelelt a rendelkezésre álló melanin mennyiségének. Az elméletet alátámasztja, hogy a kitapadó sejtek esetében a kimosási szakasz után nagyságrendben ugyanolyan mértékű felvételt tapasztaltunk, mint a szuszpenziós sejtek esetében, kimosás előtt és után mérve.



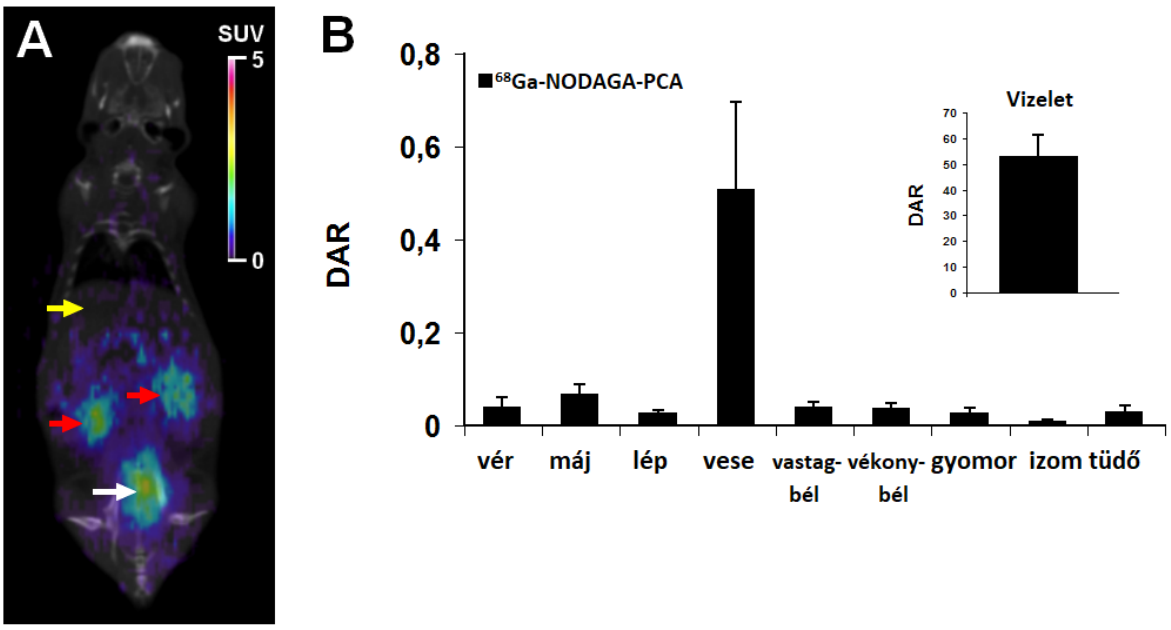
17. ábra: A melanin-specifikus ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA különböző sejtvonalakon végzett telítési kötődési, sejtfelvételi és kiáramlási vizsgálata. *In vitro* telítési kötődési vizsgálatok B16-F10 sejtekben, különböző koncentrációjú ^{68}Ga-NODAGA-PCA-dal (A) és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA-dal (B) inkubálva 37 °C-on, 1 órán keresztül. A B16-F10, A375 és MELUR sejtek ^{68}Ga-NODAGA-PCA (C, E) és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA (D, F) felvételének és kiürülésének időfüggő vizsgálata szuszpenzióban (C, D), valamint letapadó sejtekben (E, F). Szignifikancia szint: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**). A bemutatott adatértékek három független kísérlet eredményének ± SD átlagai, amelyek mindegyikét három alkalommal hajtottunk végre.

6.1.4 Szervi eloszlási vizsgálatok egészséges egereken

Az *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok egészséges kontroll C57BL/6 egereken történtek, 7,0 ± 0,2 MBq aktivitást injektáltunk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA radiogyógyszerjelölt vegyületből, majd 90 perc elteltével teljes test miniPET-vizsgálatot végeztünk, ahol a biológiai eloszlást értékeltük. A bomlás-korrigált reprezentatív koronális miniPET/CT felvételt a 18. A ábra mutatja be. A kontroll állatok esetében alacsony dúsulást figyeltünk meg a hasi szervekben, szövetekben (máj, lép, belek) és a mellkasi régióban. A vizeletkiválasztás szervezeten belüli útvonal (vese és a hólyag) egyértelműen láthatóvá vált 90 perccel a radiogyógyszerjelölt vegyület beadását követően (18. A ábra).

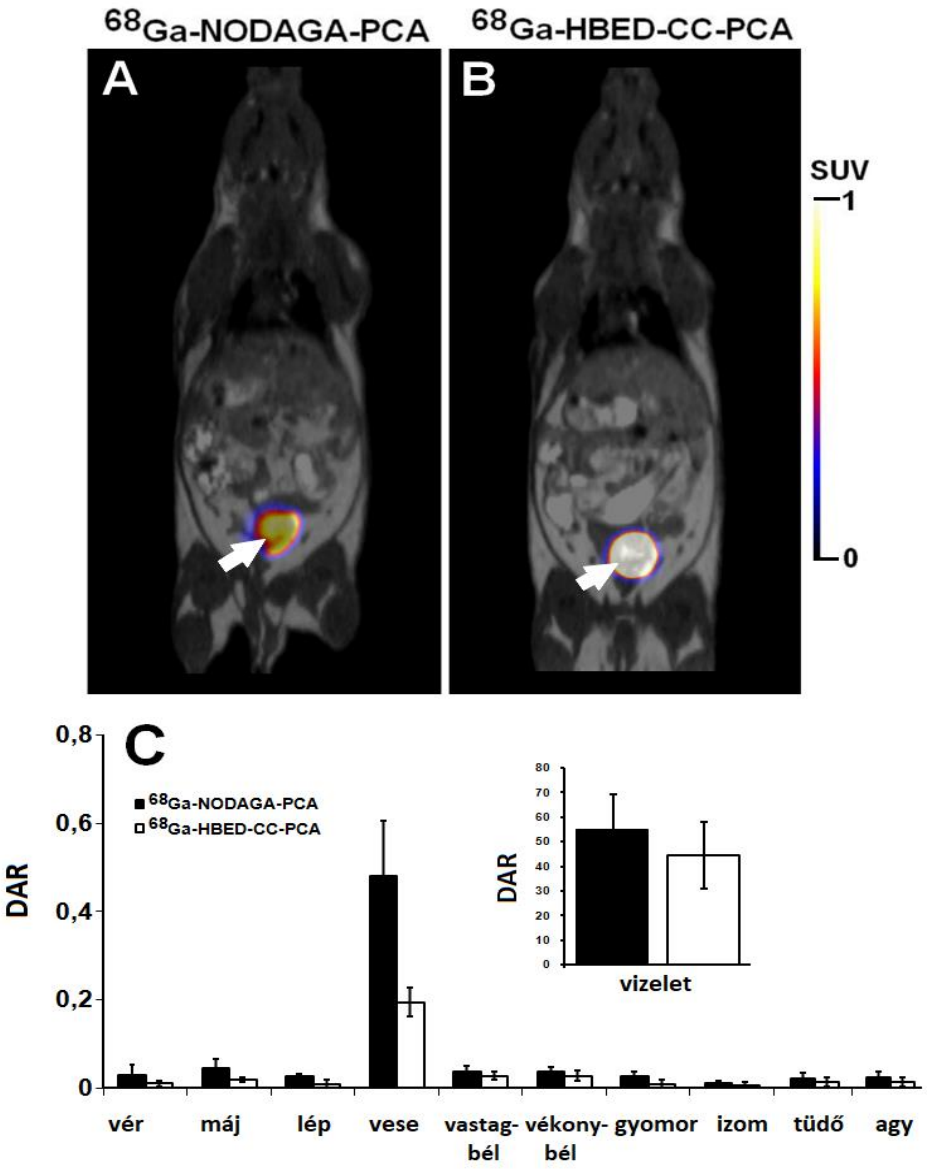
Ezek az *in vivo* miniPET/CT biodisztribúciós eredmények jól korreláltak a 18. B ábrán összefoglalt *ex vivo* adatokkal. Az *ex vivo* szervi- és szöveteloszlási vizsgálatokhoz az állatokat 90 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA injekció beadását követően túlaltattuk 3%-os izoflurránnal, ezt követően felboncoltuk, mintákat vettünk, majd a szövetek és szervek felhalmozódott aktivitását gamma számlálóval mértük. 90 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA injekció után a vesék (0,51 ± 0,19) és a vizelet (0,53 ± 8,24) DAR-értékei magasak voltak a kontroll egerekben. Ezzel szemben nagyon alacsony volt a ^{68}Ga-mal jelölt prokainamid-származék halmozás mértéke a májban (0,07 ± 0,02), a belekben (0,04 ± 0,01), a lépben (0,03 ± 0,01), a gyomorban (0,03 ± 0,01), a tüdőben (0,02 ± 0,01) és az izomban (0,01 ± 0,005).

Ezt követően a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA vegyületek *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatának eredményeit hasonlítottuk össze kontroll egereken. A teljes test PET/MRI képalkotási és az *ex vivo* szervi megoszlási vizsgálatát 90 perccel a 10,3 ± 0,3 MBq ^{68}Ga-NODAGA-PCA vagy ^{68}Ga-HBED-CC-PCA intravénás injekcióját követően, ugyancsak egészséges C57BL/6 egereken végeztük. A reprezentatív koronális PET/MRI képeket a 19. ábra szemlélteti. A PET képek kvalitatív elemzésével látható, hogy a vesékben és a hólyagban találjuk a legnagyobb dúsulást. Ez a megállapítás egyértelműen korrelál a *6.1.1* fejezetben leírt feltételezésünkkel, hogy a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA hidrofil vegyületek, ezért valószínűleg a vizelettel fognak kiválasztódni a szervezetből. A 19. ábrán az is jól megfigyelhető, hogy mindkét radiogyógyszerjelölt vegyület – a 90 percig tartó inkubációs idő után –, alacsony akkumulációt mutat a has és a mellkasi régióban.



18. ábra: *In vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós eredmények a ^{68}Ga-NODAGA-PCA esetében. A: Az egészséges kontroll C57BL/6 egér reprezentatív koronális miniPET/CT képe 90 perccel a radioizotópjelzett vegyület injektálása után. Sárga nyíl: máj; piros nyilak: vesék; fehér nyíl: hólyag vizelettel. B: a nyomjelző felvételének kvantitatív elemzése kontroll állatokban (n = 5) 90 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA injekció beadása után. A DAR átlag ± SD értékekkel vannak feltüntetve.

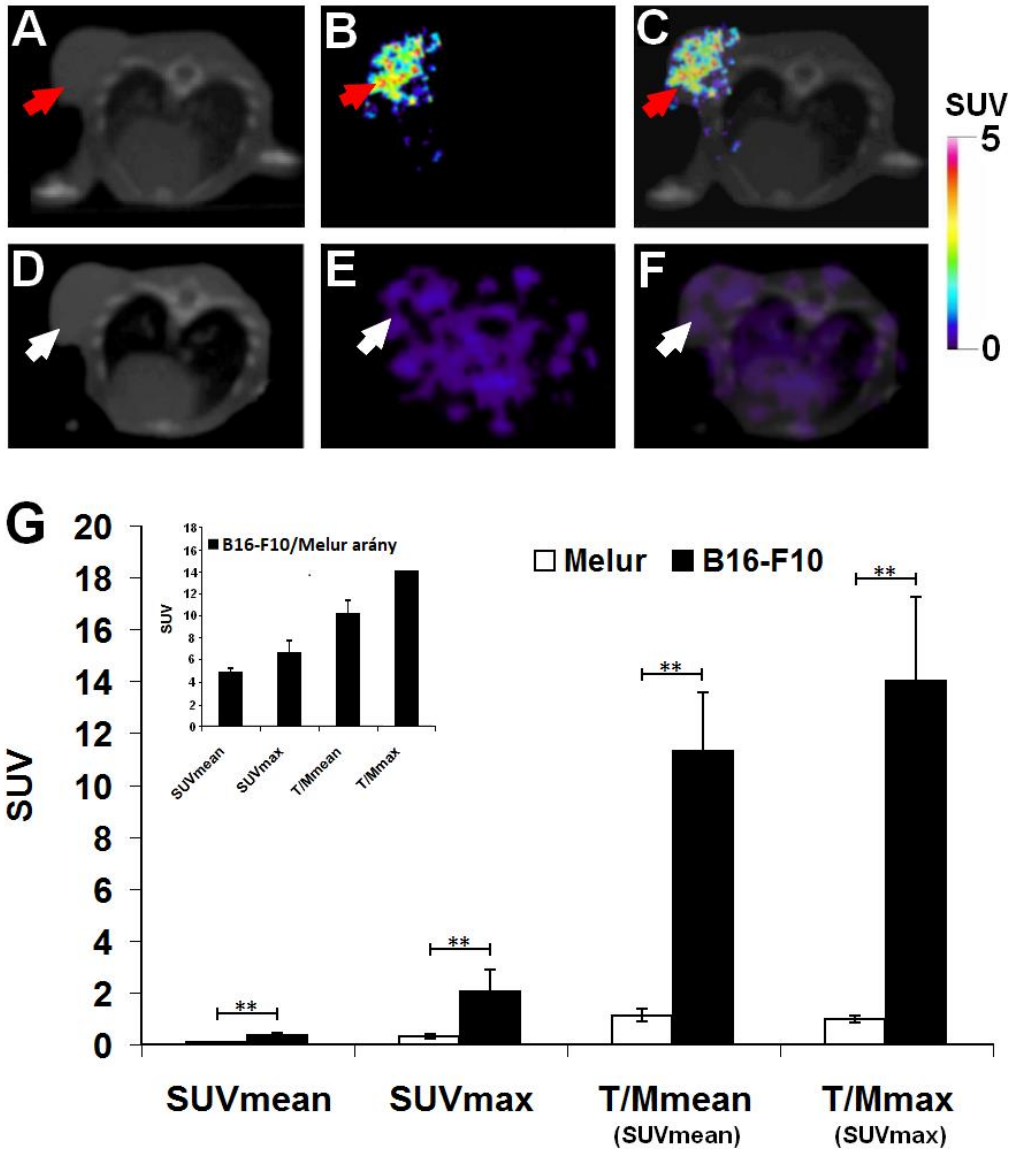
A kontroll állatok, *in vivo* PET/MRI eredményei jól egyeznek a 19. C ábrán bemutatott *ex vivo* adatokkal. Ezekhez a mérésekhez az állatokat 90 perccel a radiogyógyszerjelölt vegyület injektálását követően túlaltattuk, majd a boncolás után a szervekben és a szövetekben felhalmozódott radioaktivitást gamma számlálóval meghatároztuk. Kvantitatív elemzéssel nem találtunk szignifikáns különbséget a szervek és szövetek DAR-értékei között a két vegyület alkalmazása során (19. C ábra). Figyelemre méltó akkumulációt találtunk a vesékben (kb. DAR: 0,2-0,5) és a vizeletben (kb. DAR: 44-55) mindkét radioizotópjelzett vegyület használatakor. Ezzel szemben mérsékelt felvételt mértünk alacsony DAR-értékekkel az agyban (0,02 ± 0,01), májban (0,05 ± 0,02), bélben (0,04 ± 0,01), lépben (0,03 ± 0,01), tüdőben (0,02 ± 0,01) és az izomban (0,01 ± 0,008) ^{68}Ga-NODAGA-PCA alkalmazásával. Alacsonyabb a dúsulás mértéke az agyban (0,01 ± 0,007), a májban (0,02 ± 0,01), a bélben (0,03 ± 0,01), a lépben (0,01 ± 0,008), a tüdőben (0,01 ± 0,008) és az izomban (0,01 ± 0,006) a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA esetében.



19. ábra: *In vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós eredmények ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA esetében. A: Egészséges C57BL/6 egér reprezentatív koronális microPET/MRI képe 90 perccel az radioizotópjelzett vegyület injektálását követően. Fehér nyíl: hólyag vizelettel. B: A radiogyógyszerjelölt vegyület kvantitatív elemzése a kontroll állatokban (n = 5) 90 perccel a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA injektálása után. A DAR értékeket átlag ± SD-ként adtuk meg.

6.1.5 PET/MRI képalkotás és ex vivo biodisztribúciós vizsgálatok tumoros egereken

Először a ^{68}Ga-NODAGA-PCA ligandum alkalmazhatóságát igyekeztünk bizonyítani *in vivo* és *ex vivo* körülmények között, bőr alá beültetett melanotikus B16-F10 és amelanotikus Melur daganatokon 21 ± 2 nappal a tumorsejtek beoltása után.



20. ábra: A ^{68}Ga-NODAGA-PCA B16-F10 (A-C) és Melur (D-F) daganatok *in vivo* képalkotási tulajdonságainak összehasonlítása 90 perccel a radiogyógyszerjelölt vegyület injektálását követően. A bőr alatt növekvő melanin pozitív B16-F10 (piros nyilak) és amelanotikus Melur (fehér nyilak) daganatok reprezentatív axiális CT (A, D), miniPET (B, E) és miniPET/CT (C, F) képei. G: *in vivo* radiogyógyszerjelölt vegyület akkumulációjának kvantitatív elemzése B16-F10 (n = 5) és Melur (n = 5) tumorokban. G ábra beszúrása: A B16-F10 és a Melur daganatok ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvételi aránya. Az adatokat átlag ± SD-ként adtuk meg. T/M: tumor/izom arány. Szignifikancia szint: $p \leq 0{,}01$ (**).

A kísérleti állatokról készült PET felvételeket (bomlás korrigált reprezentatív axiális) a 20. ábra mutatja be. A B16-F10 tumor jól kivehető a ^{68}Ga-NODAGA-PCA injektálása után 90 perccel (20. B és C ábra). A PET-képek kvantitatív elemzése után szignifikáns különbségeket találtunk ($p \leq 0,01$) a vizsgált B16-F10 és Melur daganatok SUV-értékeiben. A melanint termelő B16-F10 tumorok a következő értékeket mutatták: SUVmean, SUVmax, T/M SUVmean és T/M SUVmax 0,35 ± 0,09, 2,03 ± 0,87, 11,3 ± 2,28, illetve 13,99 ± 3,25. Összevetve az adatsort az amelanotikus Melur tumorok mérésénél kapott hasonló paraméterekkel (0,07 ± 0,03, 0,30 ± 0,06, 1,12 ± 0,25, illetve 0,97 ± 0,14) megállapítottuk, hogy előbbiek szignifikánsan magasabbak voltak ($p \leq 0,01$). Ezzel a kísérleti elrendezéssel igazoltuk *in vivo* körülmények között, hogy a ^{68}Ga-NODAGA-PCA vegyület kötődése a tumorban melanin specifikus (20. G ábra).

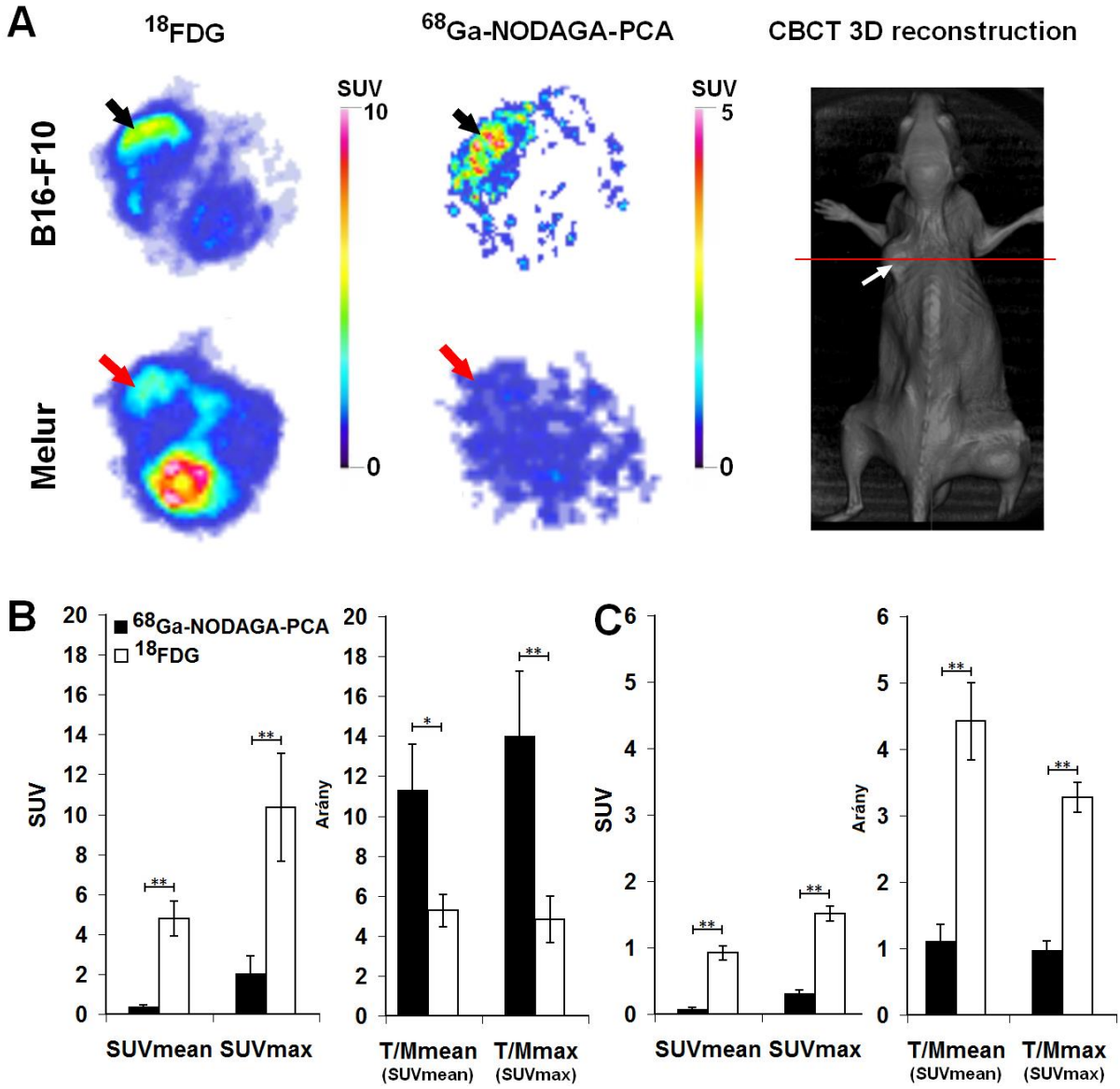
A ^{68}Ga-NODAGA-PCA melanin-specificitásának további megerősítéséhez szubkután növekvő B16-F10 és amelanotikus Melur tumorokon *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat is elvégeztünk 90 perccel az radioizotópjelzett vegyület beadását követően. A 7. táblázat bemutatja, hogy a B16-F10 tumor ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvétele szignifikánsan ($p \leq 0,01$(**)) magasabb volt, mint a Melur tumoré. Ez a körülbelül harmincszor nagyobb halmozás a B16-F10 melanomában *ex vivo* körülmények között alátámasztotta a hipotézist, hogy a radiogyógyszerjelölt származék a melanin pigmenthez specifikusan kötődik. A két tumor között szintén szignifikáns különbséget találtunk (szignifikancia szint: $p \leq 0,01$), amikor a tumor/izom (háttér) arányt értékeltük ki (7. táblázat).

7. táblázat: ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvétel (DAR) B16-F10 és Melur daganatok esetében; 90 perccel a vegyület beadását követően és 20 ± 2 nappal a tumorsejt beoltása után. Szignifikancia szint a B16-F10 és a Melur adatai között: $p \leq 0,01$ (**).

Szerv/szövet	DAR B16-F10 (n = 5)	DAR Melur (n = 5)
Tumor (s. c.)	0,31 ± 0,04**	0,01 ± 0,01
Tumor/izom	16,86 ± 3,14	1,29 ± 0,31

A ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{18}F-FDG dúsulását a bőr alatt növekvő melanoma daganatokban miniPET-vizsgálatokban vetettük össze 90, illetve 60 perccel a radioligandumok injektálása után (21. ábra). A B16-F10 és Melur daganatok egyértelműen láthatóvá váltak a leggyakrabban használt, de nem specifikus tumormarker ^{18}F-FDG-vel. A melanin-specifikus ^{68}Ga-NODAGA-PCA alkalmazásával magas jel-zaj értéket találtunk a melanint termelő B16-F10 tumorokban, amely éles kontrasztot adott alacsony háttéraktivitással. Ezzel szemben a

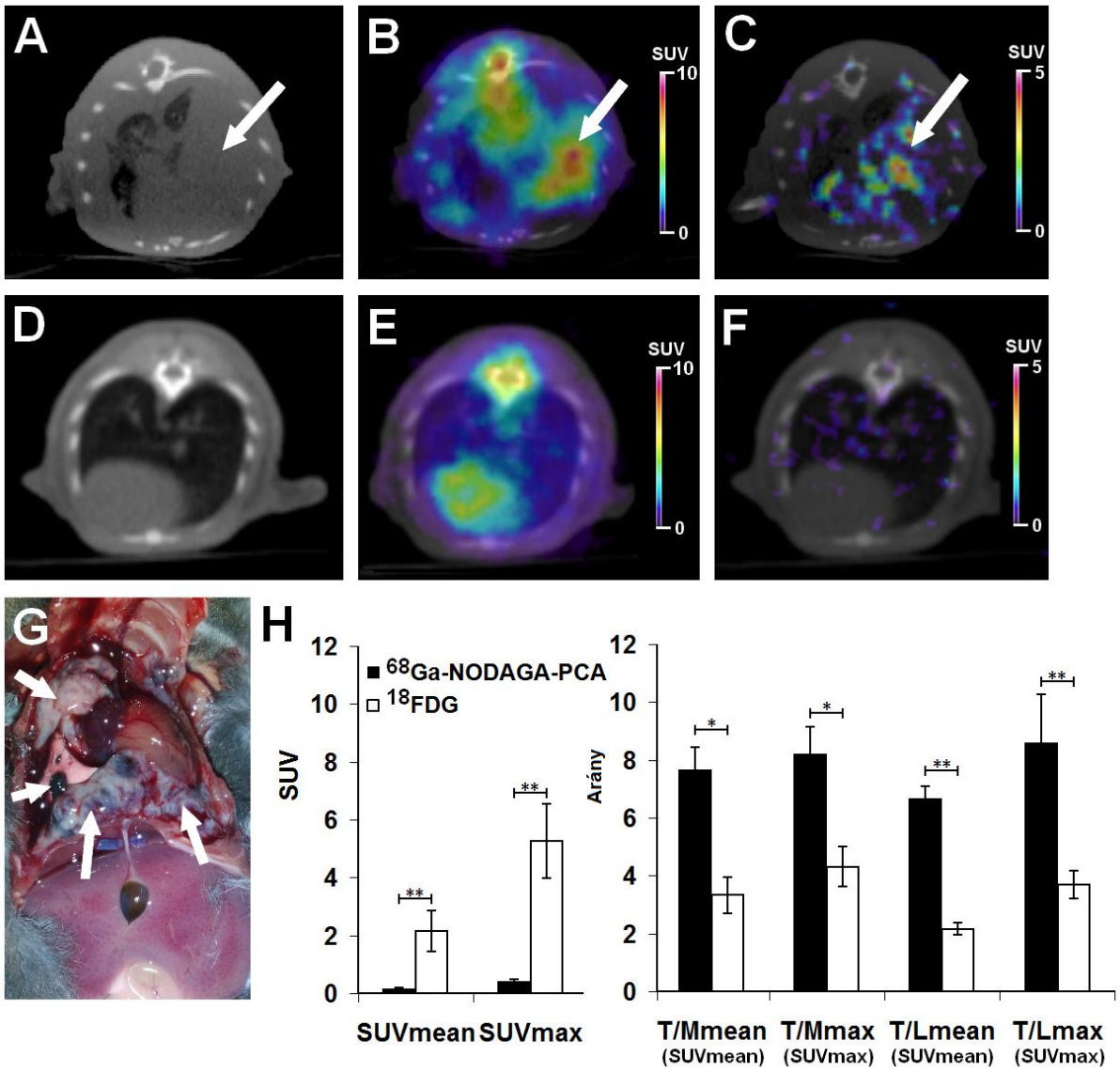
melanin negatív Melur daganatok minimális ^{68}Ga-NODAGA-PCA akkumulációt mutattak (21. A ábra).



21. ábra: A: B16-F10 (fekete nyilak) és Melur (piros nyilak) daganatok reprezentatív axiális miniPET képei a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{18}F-FDG injektálása után. A felvételek 20 és 21 nappal a tumorsejtek injektálását követően történtek, különböző radioligandumokkal, de ugyanazon a tumoron. A CBCT képen a piros vonal mutatja a PET-nél kiválasztott axiális szeletek helyzetét. Fehér nyíl: szubkután növekvő Melur tumor. B: az *in vivo* körülmények között az izotópjelzett vegyületek akkumulációjának kvantitatív elemzése B16-F10 (n = 5) daganatokban 90, illetve 60 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{18}F-FDG injekció után. C: az *in vivo* körülmények között az izotópjelzett vegyületek akkumulációjának kvantitatív elemzése amelanotikus Melur (n = 5) daganatokban 90, illetve 60 perccel ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{18}F-FDG injekció után. Szignifikancia szint: $p \leq 0,05$(*); $p \leq 0,01$(**).

A PET-képek kvantitatív elemzése után a B16-F10 melanoma tumorok szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb ^{18}F-FDG felvételt mutattak (SUVmean: 4,79 ± 0,88, SUVmax: 10,35 ± 2,7), mint a ^{68}Ga-NODAGA-PCA (SUVmean: 0,35 ± 0,09, SUVmax: 2,03 ± 0,87). Ezzel szemben, amikor a tumorok ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvételi értékeit összehasonlítottuk a háttér (izom) aktivitással, azt találtuk, hogy a T/M SUVmean és a T/M SUVmax a következőek szerint alakultak 11,3 ± 2,28, illetve 13,99 ± 3,25. Ezek az értékek körülbelül kétszer vagy háromszor magasabbak voltak a ^{18}F-FDG megegyező paramétereinél, ahol a T/M SUVmean és T/M SUVmax értékek 5,27 ± 0,81 és 4,83 ± 1,17 voltak (21. B ábra). A Melur daganatok PET leképezése során nem kizárólag a daganatok radiofarmakon-halmozó képessége volt szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb a ^{18}F-FDG injekciók után, de a jel-zaj viszony is, (SUVmean: 0,92 ± 0,10, SUVmax: 1,51 ± 0,11, T/M SUVmean: 4,42 ± 0,58 és T/M SUVmax: 3,27 ± 0,23) összevetve a melanin specifikus ^{68}Ga-NODAGA-PCA hasonló értékeivel (21. C ábra).

A ^{18}F-FDG és a ^{68}Ga-NODAGA-PCA viselkedését nem kizárólag bőr alá ültetett tumorokban hasonlítottuk össze, hanem vizsgáltuk B16-F10 sejtek okozta tüdő metasztázisokban is. Ezeket a kis állat PET *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós méréseket 21 ± 2 nappal a tumorsejtek intravénás injekciója után végeztük el. A kontroll és a daganatot hordozó egerek bomlással korrigált axiális miniPET/CT képeit a 22. ábra mutatja. A tüdőben előforduló metasztatikus elváltozások mindkét vegyülettel egyértelműen láthatóvá váltak (22. B és C ábra). A PET-képek kvantitatív elemzése után kiderült, hogy hasonlóan a korábbi modellben tapasztalhatókhoz, a ^{18}F-FDG felvétel SUV-értékei (SUVmean: 2,14 ± 0,7 és SUVmax: 5,26 ± 1,27) szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb voltak, mint a melaninra specifikus ^{68}Ga-NODAGA-PCA (SUV-átlag: 0,15 ± 0,04, SUVmax: 0,42 ± 0,06) (22. H ábra) paraméterei. Azonban a tumor/izom (T/M) és a tumor/tüdő (T/L) értékek elemzése során a ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvételi arány szignifikánsan ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) magasabb volt, mint a ^{18}F-FDG-é. A ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvétel a B16-F10 tüdő-áttétekben körülbelül hat- vagy nyolcszorosan magasabb volt a jel/zaj viszony. Amikor a tüdő szolgált referenciaként, akkor T/L SUV: 6,66 ± 0,43, T/L SUVmax: 8,4 ± 0,77 értéket mértünk, míg az izom esetében T/M SUVmean: 7,66 ± 0,78, T/M SUVmax: 8,2 ± 0,94 arányokat kaptunk. A ^{18}F-FDG alkalmazásával ezek a paraméterek alacsonyabbnak bizonyultak (T/M SUVmean: 3,32 ± 0,62; T/M SUVmax: 4,3 ± 0,68; T/L SUVmean: 2,15 ± 0,21; T/L SUVmax: 3,68 ± 0,48) (22. H ábra).



22. ábra: A ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{18}F-FDG képalkotási tulajdonságának értékelése metasztatikus B16-F10 tumorokon, 20 nappal a tumorsejtek intravénás injektálása után. Felső sor: Reprezentatív axiális CT és PET/CT felvételek (CT (A), ^{18}F-FDG-PET/CT (B) és ^{68}Ga-NODAGA-PCA-PET/CT (C)) ugyanazon a tumoros egérről. Fehér nyilak: metasztatikus B16-F10 elváltozások a tüdőben. Középső sor: egészséges kontroll egér reprezentatív axiális CT és PET/CT képei (CT (D), ^{18}F-FDG-PET/CT (E) és ^{68}Ga-NODAGA-PCA-PET/CT (F)). Alsó sor: metasztatikus B16-F10 elváltozások (fehér nyilak) 20 nappal a tumorsejt injektálása után (G), valamint *in vivo* körülmények között a radioizotópjelzett vegyületek halmozás értékeinek (H) kvantitatív elemzése B16-F10 tumorokban ^{68}Ga-NODAGA-PCA (n = 5) és ^{18}F-FDG (n = 5) felhasználásával. Szignifikancia szint: $p \leq 0,05$(*); $p \leq 0,01$(**).

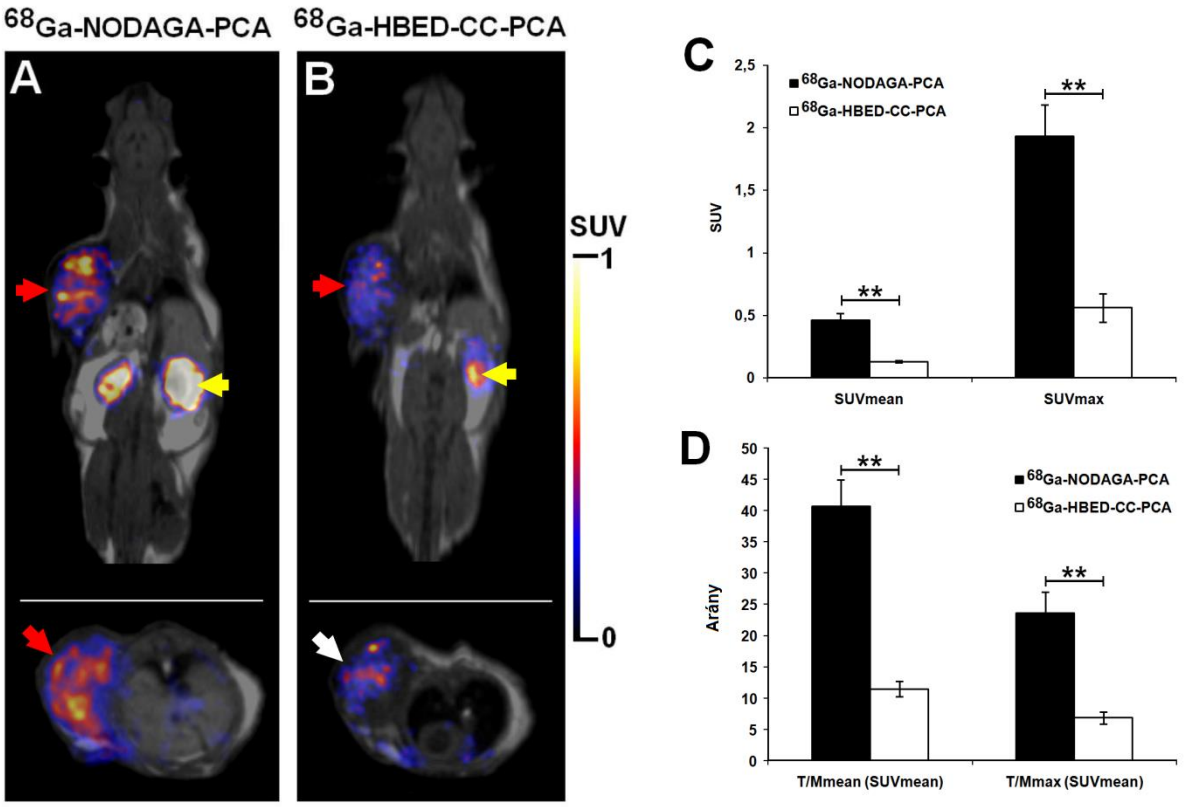
Egy nappal a képalkotása után *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat végeztünk ugyanazokon az állatokon. Az *in vivo* adatok korreláltak az *ex vivo* eredményekkel. A B16-F10

daganatot hordozó egereket túlaltattuk és felboncoltuk 90 vagy 60 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA vagy a ^{18}F-FDG injektálását követően. A daganatok, az izom és a tüdő radioizotópjelzett vegyületének akkumulációját kalibrált gamma számlálóval mértük és kiszámítottuk a DAR értékeket. A boncolást követően tumor metasztázisokat találtunk a tüdőben (22. G ábra). A metasztatikus tüdő melanoma daganatokban a magas ^{18}F-FDG és a viszonylag alacsony ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvételi érték ellenére (8. táblázat), a ^{68}Ga-NODAGA-PCA tumor/háttér (tüdő, izom) aránya kb. háromszor nagyobb, mint a ^{18}F-FDG esetében.

8. táblázat: A vegyületek felvétele (i.v. 20 ± 2 nappal a tumorsejt beoltása után) a B16-F10 tüdődaganatokban (DAR). Szignifikancia szint a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{18}F-FDG értékei között: $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**).

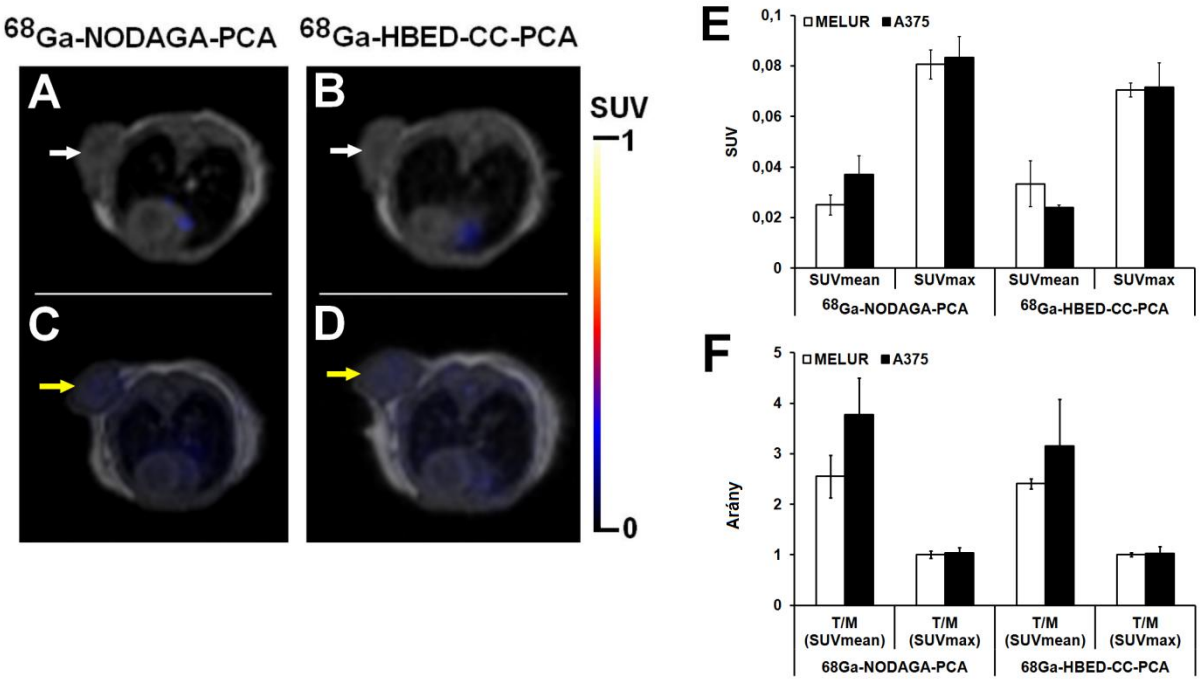
Szerv/szövet	DAR ^{68}Ga-NODAGA-PCA (n = 5)	DAR ^{18}F-FDG (n = 5)
Tumor (B16-F10)	0,16 ± 0.07**	2,12 ± 0,46
Tumor/izom arány	7,91 ± 1,26*	2,84 ± 0,69
Tumor/tüdő arány	6,73 ± 1,48-	2,53 ± 0,58

A ^{68}Ga-mal jelölt két PCA-származék melanin-specifikus kötődését melanotikus B16-F10, amelanotikus A375 és MELUR tumoros állatokon hasonlítottuk össze *in vivo* körülmények között. Az *in vivo* vizsgálatok során 10,3 ± 0,3 MBq ^{68}Ga-NODAGA-PCA vagy ^{68}Ga-HBED-CC-PCA a laterális farokvénán keresztül injektáltunk az egerekbe, majd 90 perc inkubációs idő elteltével teljes test PET vizsgálatot végeztünk preklinikai PET/MRI készülékkel. A B16-F10 melanoma daganatok reprezentatív teljes test koronális és axiális PET/MRI képét a 23. ábrán mutatjuk be. A PET/MRI képek kvalitatív elemzésével a szubkután növekvő B16-F10 daganat egyértelműen láthatóvá vált 90 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA injektálása után (23. A ábra, piros nyilak). A PET-képek kvantitatív elemzése után szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,01$) találtunk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA (SUV érték: 0,46 ± 0,05, SUVmax: 1,93 ± 0,25) és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA (SUV érték: 0,13 ± 0,01, SUVmax: 0,56 ± 0,11) vegyületek akkumulációjában melanin pozitív B16-F10 daganatokban (23. C ábra). A B16-F10 daganatok ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvételének az izom (háttér) aktivitással történő normálása után a következő értékeket kaptuk: T/M SUVmean = 40,7 ± 4,23; T/M SUVmax = 23,55 ± 3,45. Ezek a T/M SUV értékek megközelítőleg négyszeresen magasabbak voltak, mint a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA hasonló paraméterei, ahol a T/M SUVmean és T/M SUVmax értékek 11,43 ± 1,24 és 6,82 ± 0,96-nak bizonyultak (23. C ábra).



23. ábra: Reprezentatív teljes test koronális (A és B: felső sor), valamint axiális (A és B: alsó sor) nanoScan PET/MRI képek ugyanazon a B16-F10 melanoma daganatot hordozó C57BL/6J egérről 21 nappal a tumorsejt oltását követően és 90 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA (A, piros nyilak) és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA (B, fehér nyilak) intravénás injekciója után (sárga nyilak: vese). A ^{68}Ga-NODAGA-PCA (n = 10) és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA (n = 10) kvantitatív SUV elemzése a B16-F10 daganatokban (C) SUVmean, SUV max értékkel feltüntetve, továbbá a tumor/izom arány T/Mmean, TMmax értékekkel (D). Szignifikancia szint: $p \leq 0,01$ (**).

Mint azt korábban elvégzett méréseink alapján megjósolható volt, nagyon alacsony ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA felvételt figyeltünk meg, amikor az amelanotikus daganatokat (MELUR, A375) PET/MRI-vel vizsgáltuk (24. ábra). A PET-képek kvantitatív elemzésével megállapítottuk, hogy az amelanotikus daganatok SUV-értékei (24. E ábra) és a tumor/izom arány (24. F ábra) szignifikánsan ($p \leq 0,01$) alacsonyabbak, mint a B16-F10 daganatok esetén. Ezenkívül nem találtunk szignifikáns különbséget a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA radiogyógyszerjelölt vegyületek halmozása között az amelanotikus MELUR és A375 daganatokban.



24. ábra: A melanint nem termelő daganatokban a radioizotópjelzett vegyületek akkumulációjának *in vivo* értékelése. A MELUR (A, B; fehér nyilak) és az A375 (C, D; sárga nyilak) melanoma daganatot hordozó SCID egerek reprezentatív axiális PET/MRI képei 23 nappal a daganatsejt-injektálása után és 90 perccel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA (A, C), és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA (B, D) radiogyógyszerjelölt származékok intravénás beadását követően. A ^{68}Ga-NODAGA-PCA (n = 10) és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA (n = 10) felvételének kvantitatív SUV-elemzése amelanotikus daganatokban (E), valamint a tumor/izom arányuk (F). Szignifikancia szint: $p \leq 0,01$ (**)

A ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA melanin-specifikusságának további bizonyítására *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat is végeztünk a radioligandumok beadása után 90 perccel, a szubkután létrehozott B16-F10 melanotikus, valamint az amelanotikus A375 és MELUR daganatok alkalmazásával. A 9. táblázat bemutatja, hogy a ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvétele szignifikánsan ($p \leq 0,01$ (**)) magasabb volt a B16-F10 tumor esetében, mint az A375 vagy MELUR daganatokban, megerősítve ezzel a ^{68}Ga-NODAGA-PCA melanin kötés specifikus voltát *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatban. A tumor/izom arány elemzésével a B16-F10 és az amelanotikus daganatok (A375 és MELUR) közötti különbség szintén szignifikáns volt, szignifikancia szint $p \leq 0,01$. A ^{68}Ga-HBED-CC-PCA szignifikánsan ($p \leq 0,05$ (*)) nagyobb felvételt mutatott a melanin pozitív B16-F10 daganatokban, mint az amelanotikus daganatokban, azonban a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA halmozása a melanoma sejtvonalakban

alacsonyabb volt, amikor a DAR értékeket összehasonlítottuk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA DAR-értékeivel.

9. táblázat: ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA halmozása (DAR) B16-F10, A375, valamint MELUR daganatok esetében, 90 perccel a vegyületek beadása után (vizsgálat időpontja: a tumorsejtek indukcióját követő 21 ± 2 nap). Szignifikancia szint a melanotikus (B16-F10) és az amelanotikus (A375, MELUR) daganatok között a ^{68}Ga-NODAGA-PCA esetében: $p \leq 0.01$ (**), a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA-nál: $p \leq 0.05$ (*)

Tumor	**DAR ^{68}Ga-NODAGA-PCA (n = 5)**	**DAR ^{68}Ga-HBED-CC-PCA (n = 5)**
B16-F10 tumor (n = 5)	0,42 ± 0,07**	0,13 ± 0,03*
B16-F10 tumor/izom	23,64 ± 2,73**	8,05 ± 0,99*
A375 tumor	0,06 ± 0,02	0,03 ± 0,01
A375 tumor/izom	1,85 ± 0,25	1,62 ± 0,18
MELUR tumor	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
MELUR tumor/izom	1,32 ± 0,19	1,11 ± 0,09

6.2 Peptid-származékok nyomjelzése PET képalkotás céljából

6.2.1 Kémiai és radiokémiai szintézis

Az APRPG-COOH peptidet 2-ClTrt gyantán készítettük SPPS-sel, standard Fmoc-kémia alkalmazásával. Az APRPG-NH_2 peptidet Rink-amid MBHA segítségével állítottuk elő. A nyers peptideket RP-HPLC-vel tisztítottuk, és a végtermékek izolált hozama meghaladta a 70% -ot. Az APRPG-COOH, APRPG-NH_2 peptidek tisztaságát analitikai HPLC-vel vizsgáltuk, és a méréseink alapján a peptidek tisztasága ≥ 99%-nak bizonyult. (a tiszta peptidek retenciós ideje t_R = 13,7 perc APRPG-COOH; t_R = 12,9 perc APRPG-NH_2). A peptidek molekulatömegét MS-el igazoltuk, amely során a következő értékeket kaptuk: m/z = 249,1 $[M + H]^{2+}$ és m/z = 497,3 $[M + H]^{+}$ az APRPG-COOH-nál, az APRPG-NH_2 esetében pedig m/z = 248,7 $[M + H]^{2+}$ és m/z = 496,3 $[M + H]^{+}$.

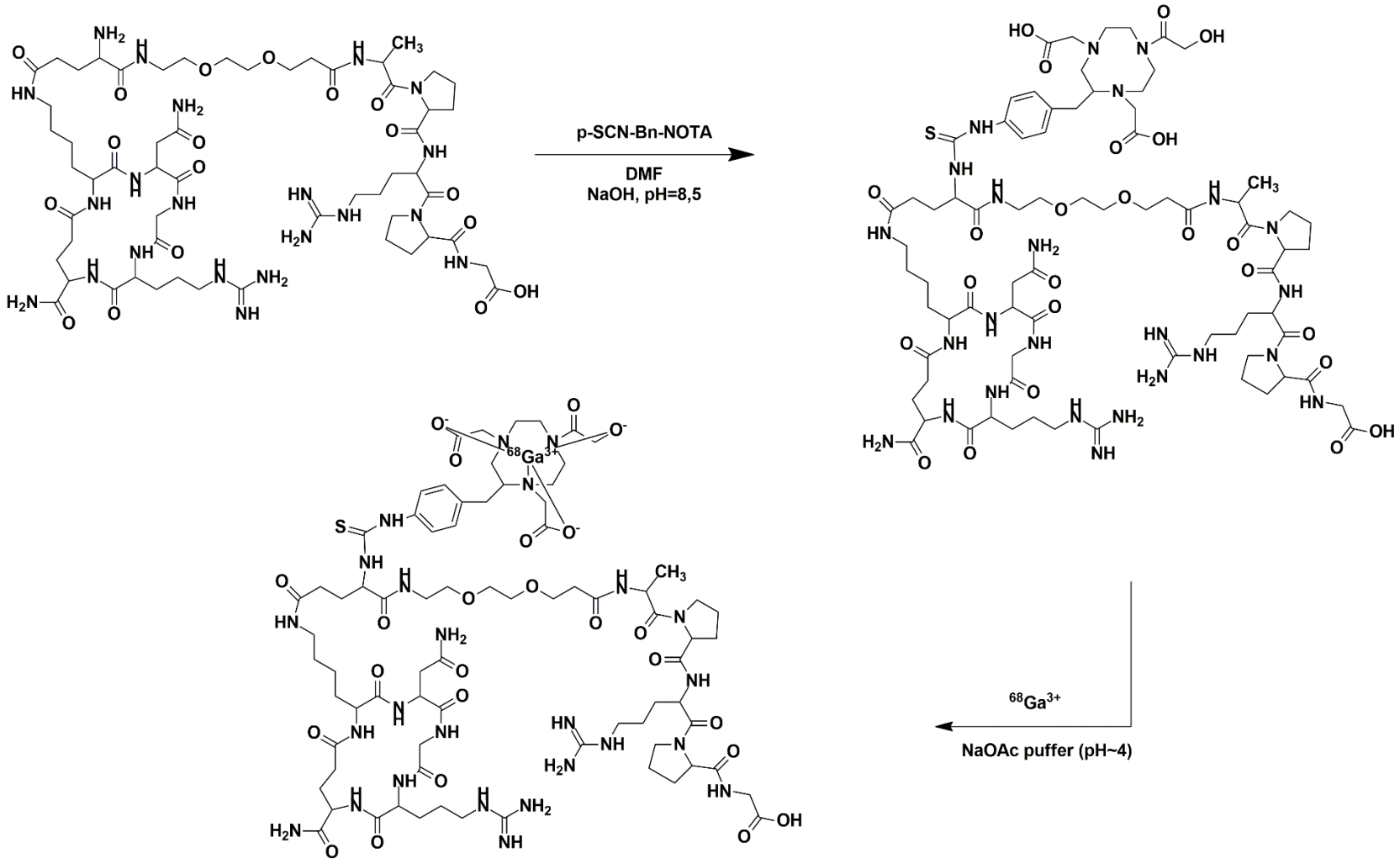
Az APRPG peptidek alanin-alegységén lévő szabad aminocsoportot *p*-SCN-Bn-NODAGA kelátorral reagáltattuk. A kelátorral konjugált peptid ligandumokat RP-HPLC-vel tisztítottuk, majd liofilizáltuk. A YEVGHRC peptid-származék esetében a cisztein oldalláncán

található tiol csoporton keresztül történt meg a kelátorral való konjugációs lépés, amely a NODAGA-YEVGHRC vegyületet eredményezte. A heterodimer peptid-származékot *p*-SCN-Bn-NOTA kelátorral reagáltattuk, így kapva meg a NOTA-NGR-APRPG ligandumot. A prekurzor peptidek kémiai szerkezetazonosításához MS-t használtunk, a kapott eredményeket a radioligandumok HPLC-s tulajdonságaival a 10. táblázatban foglaltuk össze.

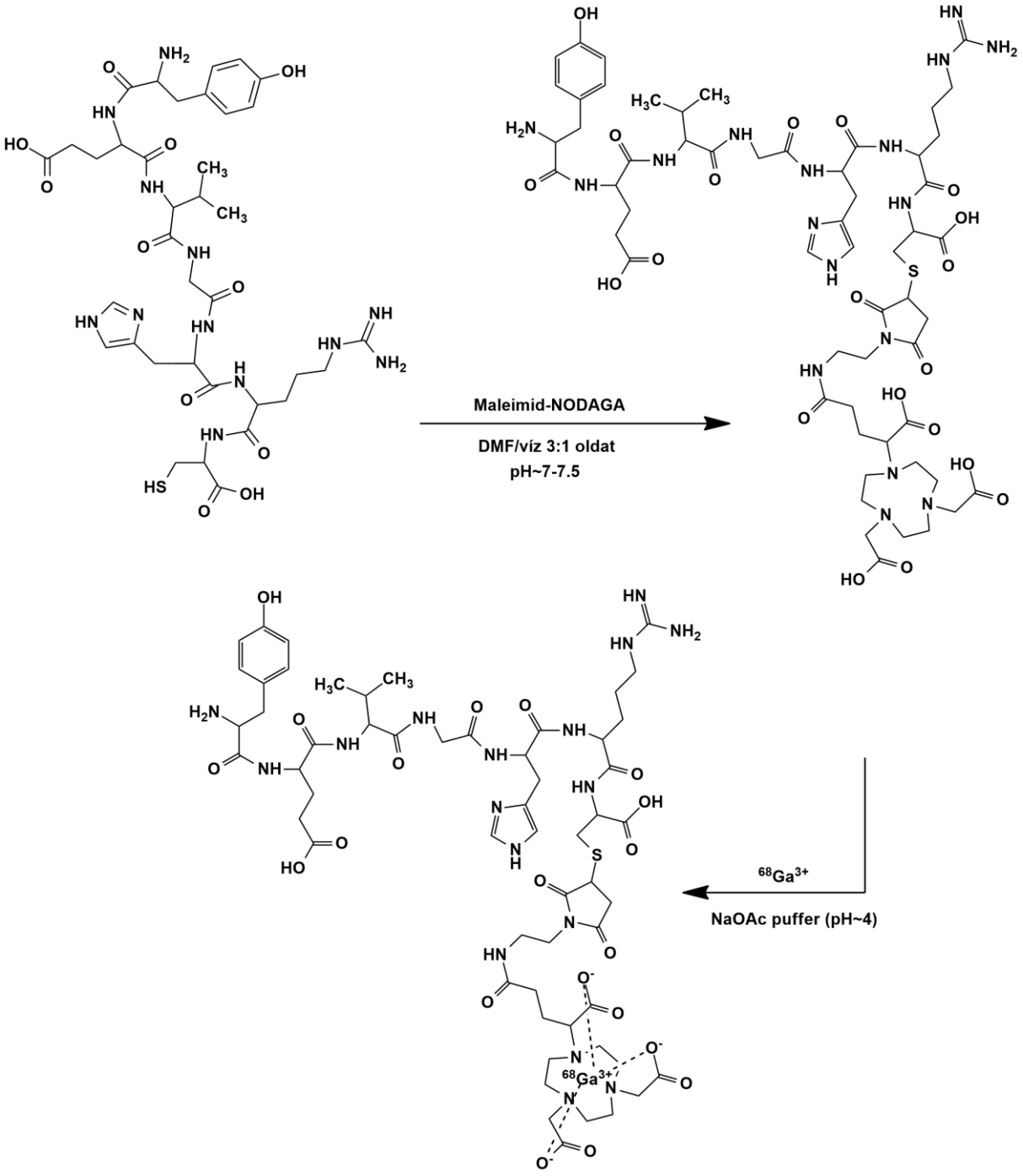
10. táblázat: Az újonnan szintetizált peptid-származékok reprezentatív paraméterei, a *-gal jelölt rész tulajdonságait lásd az „Anyag és módszerek" részben

Radioizotóppal jelölt peptid-származékok	Retenciós idő (min)*	M_w (számolt) peptid-prekurzor	M_w (mért) peptid-prekurzor
^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG	9,91	1799,87	1799,72
^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC	12,53	1359,59	1359,66
^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2	7,38	1016,49	1016,41
^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH	10,06	1017,47	1017,35

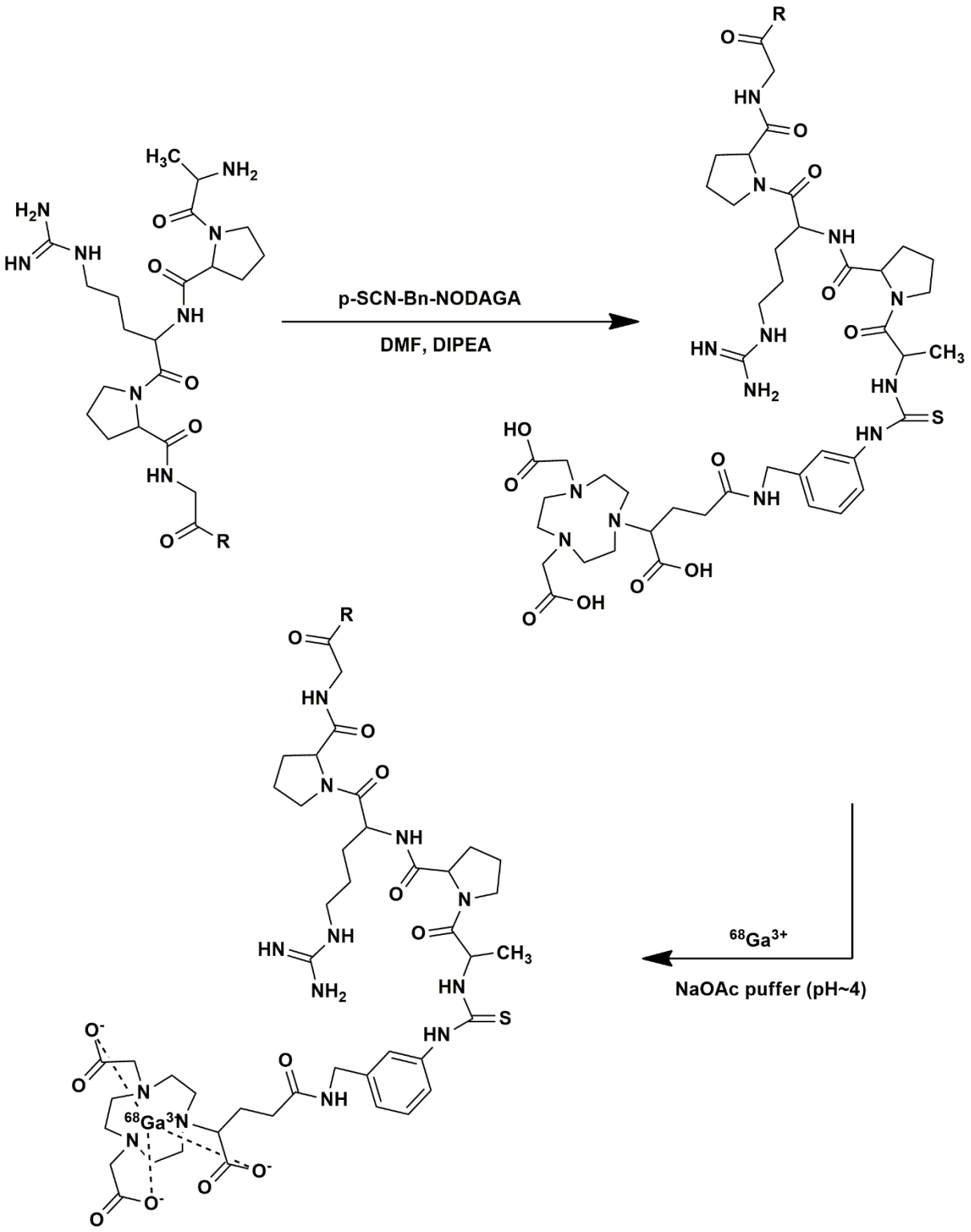
Mindegyik peptid-származék jelölése manuális körülmények között zajlott, a teljes szintézis idő 25 perc volt, beleértve a tisztítást és a formulázási lépést is (25-27. ábra). A bomláskorrigált hozam értéke 67-73% (n = 12) tartományban volt, a radiokémiai tisztaság minden esetben meghaladta a 95%-ot, kivéve a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 esetében, ahol a tisztaság értéke a 90%-ot érte el (28-31. ábra). A vegyületek moláris aktivitás értékeit az 11. táblázatban tüntettem fel.



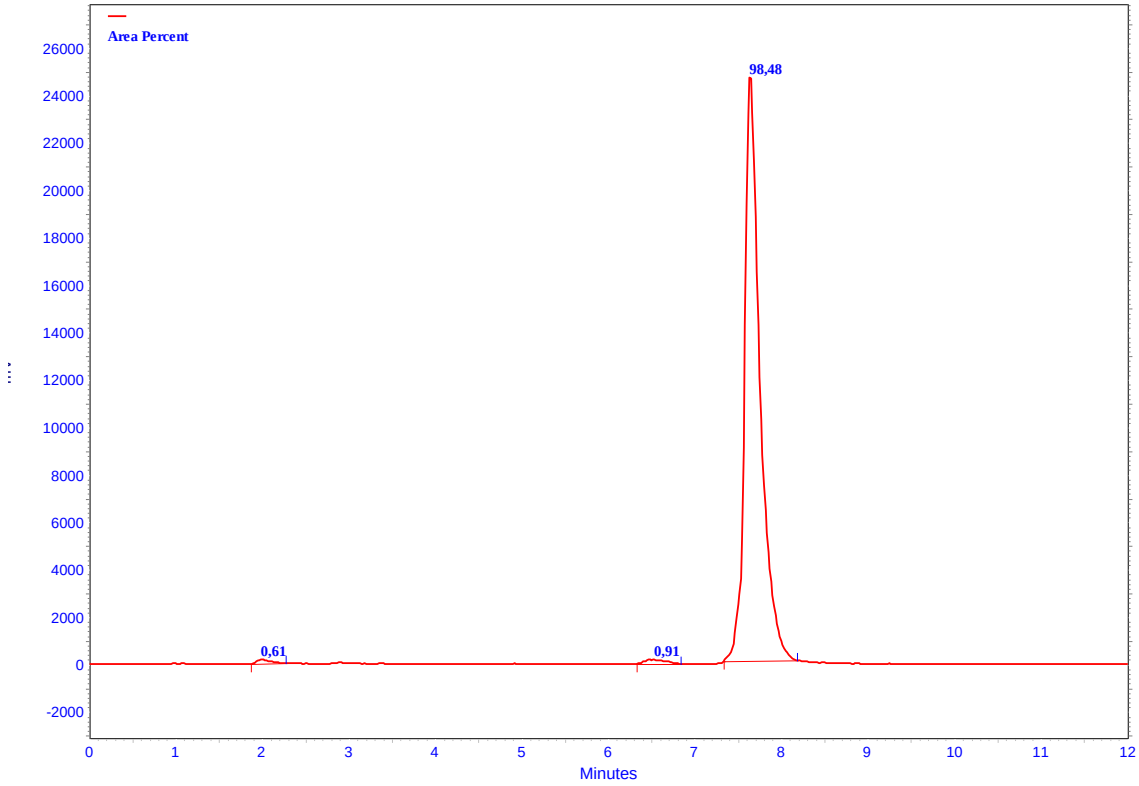
25. ábra: A NGR-APRPG heterodimer peptid konjugációja a makrociklusos kelátorral és a radiojelölés sémája



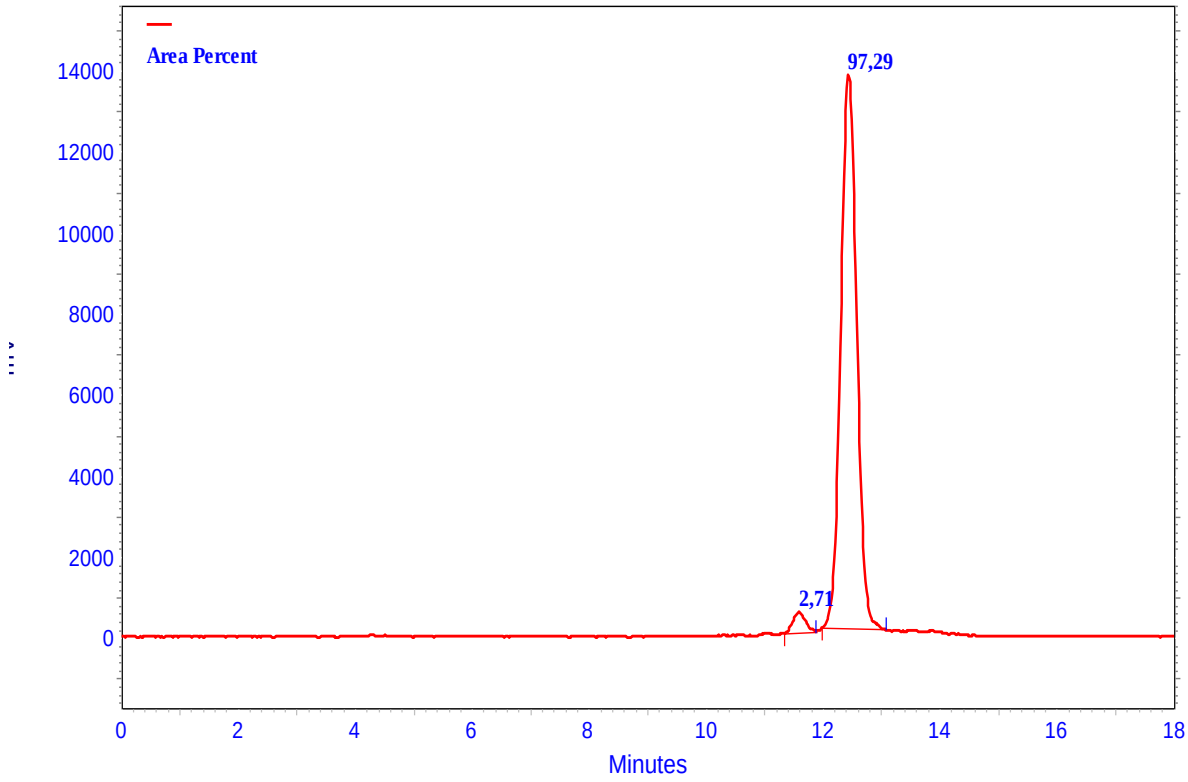
26. ábra: Az YEVGHRC konjugációja makrociklusos kelátorral és a radiojelölés sémája



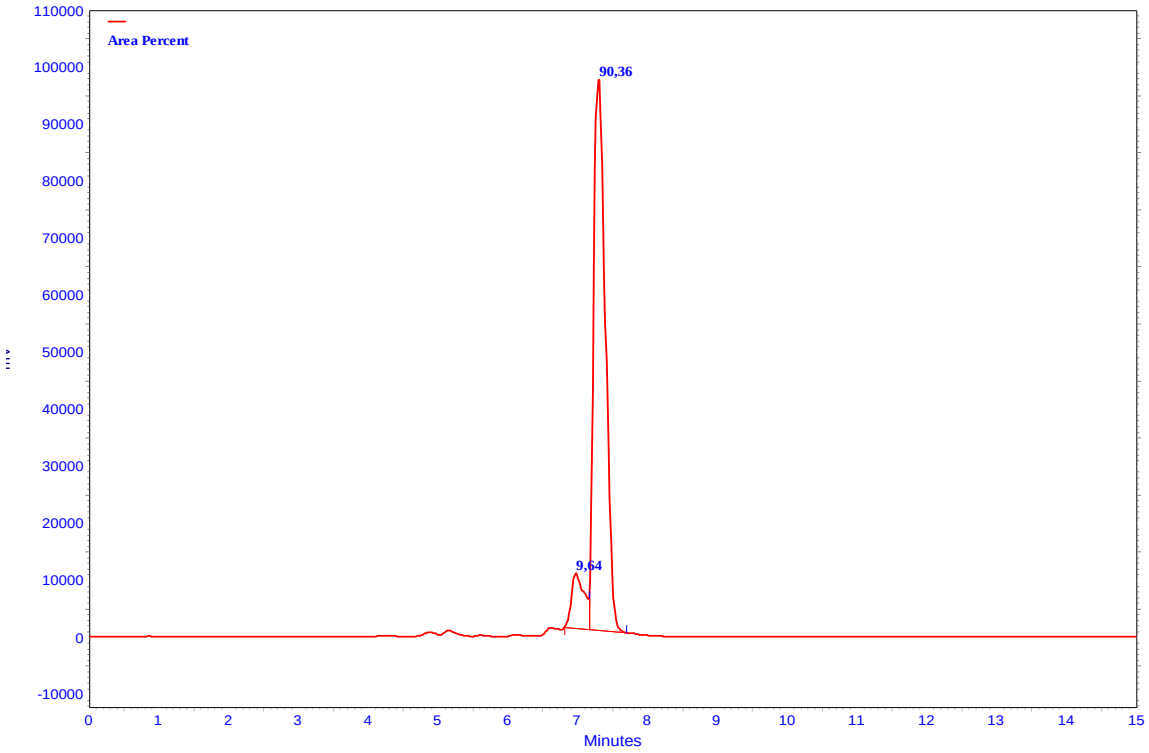
27. ábra: Az APRPG peptidek konjugációja makrociklusos kelátorral és a radiojelölés sémája: R = OH ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH; R = NH_2 ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2



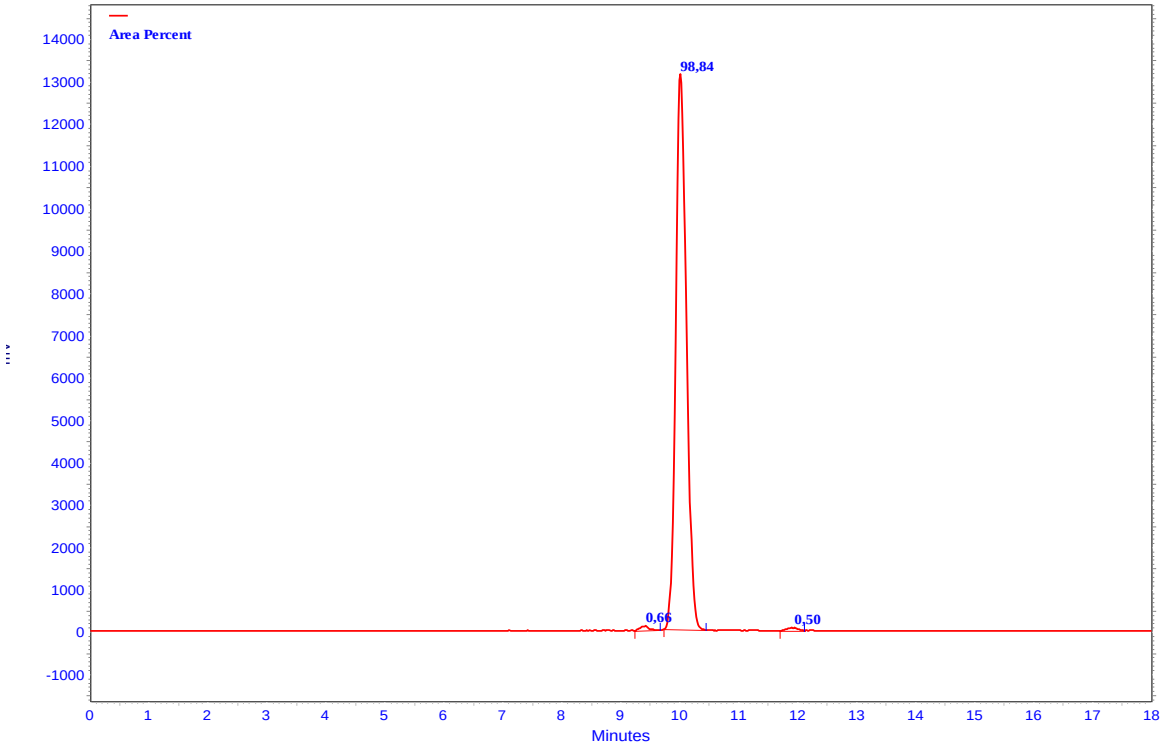
28. ábra: A ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG reprezentatív RP-HPLC kromatogramja (a mérések körülményeit az „Anyagok és módszerek” részben részleteztem)



29. ábra: A ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC reprezentatív RP-HPLC kromatogramja



30. ábra: A ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH$_2$ reprezentatív RP-HPLC kromatogramja



31. ábra: A ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH reprezentatív RP-HPLC kromatogramja

11. táblázat: A peptid-származékok moláris aktivitása a radioizotópos jelölést követően

Radioizotóppal jelölt peptid-származékok	Moláris aktivitás (GBq/µmol)
^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG	14,68 ± 0,07
^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC	14,87 ± 0,13
^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH$_2$	15,40 ± 0,09
^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH	19,47 ± 0,12

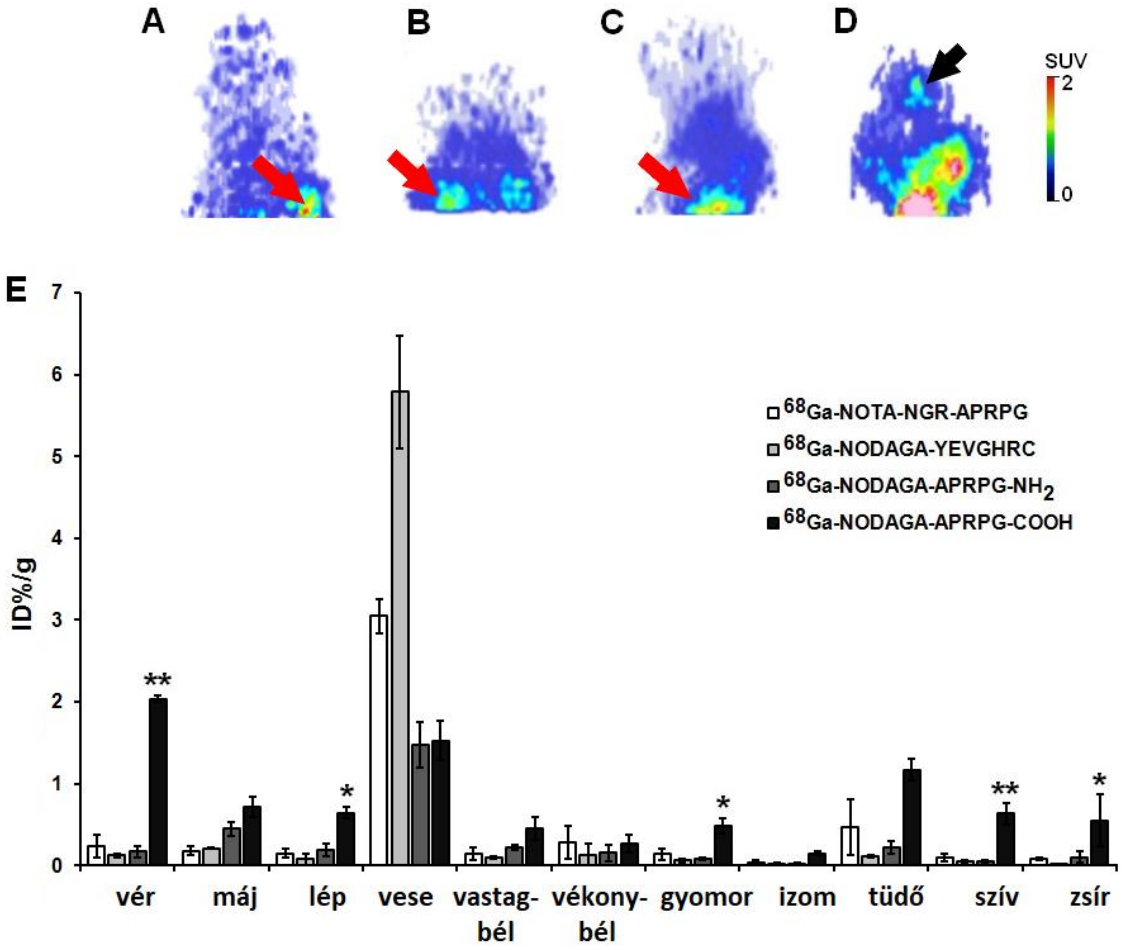
6.2.2 A ^{68}Ga-mal jelölt peptid-származékok oktanol/PBS megoszlási hányadosának (logP) és in vitro stabilitásának eredményei

A megoszlási hányados (logP) értékeket a négy, újonnan előállított radioligandum esetében meghatároztuk. A ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC logP értéke -4,421-nek adódott; a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH$_2$-é -3,024; a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH-é -2,370 és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG vegyületé -3,981. Ezek a mérések azt bizonyították, hogy a radiojelölt vegyületek erős hidrofil tulajdonságokkal rendelkeznek, noha a származékok között jelentős eltérés mutatkozik. A kapott paraméterek azonban azt vetítik előre, hogy a radioligandumok gyorsan ürülnek a véráramból, és döntően a vesén keresztül fognak ürülni a szervezetből. A jelölt anyagok patkány- és egér szérumban való stabilitását 37 °C-on vizsgáltuk analitikai radio-HPLC segítségével. 2 órás szérumban történő inkubálás után a kiindulási radioizotópjelzett peptidek több mint 80%-a intakt maradt, mindegyik vizsgálat esetében, ezért feltételezhetjük, hogy a képalkotás során kapott jelek nagy többsége a radioligandumoktól származik majd, és nem pedig valamelyik radioaktív metabolittól.

6.2.3 In vivo és ex vivo biodisztribúciós vizsgálatok egészséges állatokon

Az előállított ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH$_2$ és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH vegyületek szervezeten belüli eloszlásának meghatározásához *in vivo* és *ex vivo* vizsgálatokat végeztünk egészséges, kontroll

C57BL/6 egerek felhasználásával. A bomlás korrigált PET képek kvalitatív elemzése után azt találtuk, hogy a vesék nagy halmozást mutattak 90 perccel a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH injekció beadását követően (32. ábra).



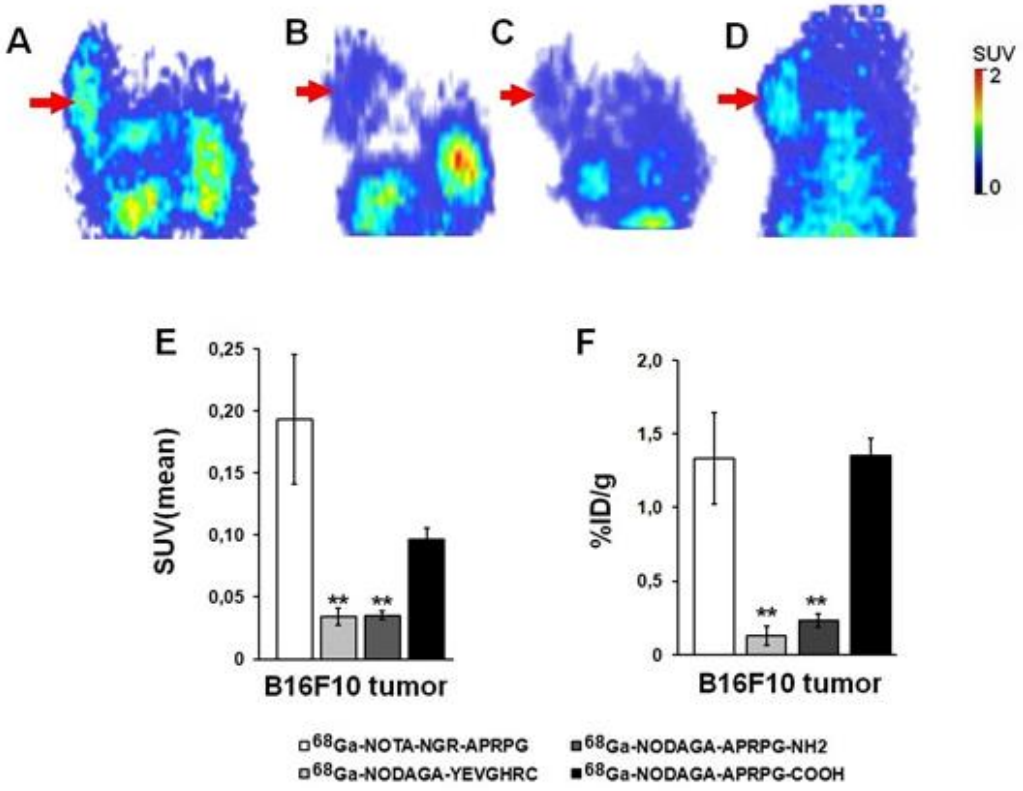
32. ábra: *In vivo* PET képalkotás és *ex vivo* biodisztribúciós mérések a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH és a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG radiogyógyszerjelölt vegyületek esetében. Az egészséges kontroll C57BL/6 egerek bomlás korrigált koronális PET képei láthatóak – ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG (A), ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC (B), ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 (C) és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH (D) –, 90 perccel az intravénás injektálást követően. Fekete nyíl: máj; piros nyíl: vese. E: *ex vivo* biodisztribúciós adatok kvantitatív elemzése 90 perccel a nyomjelző injektálása után. Az eredmények ID%/g-ban vannak feltüntetve átlag ± SD-al együtt. Szignifikancia szintek: $p \leq 0,05$ (*) és $p \leq 0,01$ (**).

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján már tudtuk, hogy a ^{68}Ga-mal jelölt, alacsony molekulatömeggel és erős hidrofil tulajdonságokkal rendelkező APN/CD13 specifikus peptidek (^{68}Ga-NOTA-cNGR, ^{68}Ga-NODAGA-cNGR, ^{68}Ga-NODAGA-cNGR (MG1) vagy ^{68}Ga-NODAGA-cNGR (MG2)) a kísérleti állatok vizeletrendszerén keresztül ürülnek [234; 233]. Az általunk vizsgált analógok között azonban jelentős különbség volt a logP értékek között. A ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH vegyület kevésbé hidrofil karaktert mutatott (logP: -2,37), amit az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok is megerősítettek. A ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH injektálását követően szignifikánsan magasabb ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) ID/g szöveti értéket figyeltünk meg a vérben, a lépben, a gyomorban, a tüdőben, a szívben és a zsírban, mint a három másik vizsgált radiojelölt vegyületeknél (32. E ábra). Ebben az esetben tehát bebizonyosodott, hogy a radioligandum a kevésbé hidrofil tulajdonsága miatt hosszabb ideig marad a keringésben, ami magasabb háttér radioaktivitást eredményez. A ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 és a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC ID%/g értékei között a vizsgált szervekben és szövetekben sem találtunk szignifikáns különbséget ($p \leq 0,05$-nél), kivétel a vese esetében, ahol a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG-nél az ID%/g értéke 3,048, míg a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC-é 5,785 lett, amely különbség a LogP értékekből adódtak, hiszen ezek a vegyületek hidrofil jellege a legerősebb (^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG = -3,981; ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC = -4,421) a négy újonnan előállított peptid-származék közül.

6.2.4 In vivo és ex vivo összehasonlító tanulmányok szubkután tumoros állatmodellen

A ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH radioligandumok APN/CD13 és VEGFR-1 specificitásának értékeléséhez *in vivo* és *ex vivo* összehasonlító vizsgálatokat végeztünk B16-F10 tumoros egereken. Az *in vivo* PET képalkotás során láthatóvá váltak a B16-F10 tumorok. A vizsgált radioizotópjelzett vegyületek közül az APN/CD13 és VEGFR-1 receptor-specifikus alegységgel is rendelkező ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG heterodimer vegyület mutatta a legnagyobb halmozást a szubkután növekvő B16-F10 daganatokban (33. A ábra). A bomlással korrigált PET-képek kvantitatív SUV-elemzése után a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC (SUVmean: $0,03 \pm 0,01$) és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 injekció után szignifikánsan ($p \leq 0,01$) alacsonyabb felvételt találtunk a B16-F10 tumorokban (SUVmean: $0,04 \pm 0,003$), mint a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG (SUVmean = $0,193 \pm 0,05$), a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH-nál a SUV átlagos értéke $0,097 \pm 0,01$ volt (33. E Ábra). A ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG kimagasló

SUVmean értéke azzal magyarázható, hogy egy olyan vegyületről beszélünk, amely egyidőben célozza meg a B16-F10 tumorban található Aminopeptidáz N és a VEGFR-1 receptorait, tehát a multimerizációs technika alkalmazása elősegíti a képalkotás tulajdonságainak javítását. Az *in vivo* eredmények jól korrelálnak az *ex vivo* eredményekkel, ahol szintén figyelemre méltó ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG (ID%/g: 1,33 ± 0,31) és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH (ID%/g: 1,35 ± 0,12) felvételt találtunk a B16-F10 daganatokban. Jelentősen alacsonyabb felvételt figyeltünk meg a daganatokban a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC (ID%/g: 0,13 ± 0,06), ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 (ID%/g: 0,23 ± 0,05) injektálása után (33. F ábra).



33. ábra*: In vivo* PET képalkotás és *ex vivo* biodisztribúciós adatok ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG, ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC, ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH esetében tumort hordozó állatmodellen. A B16-F10 daganatot hordozó C57BL/6 egerek bomlás korrigált reprezentatív koronális PET képei 90 perccel a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG (A), ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC (B), ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 (C) és a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH (D) intravénás injekció beadása után. Piros nyilak: szubkután B16-F10 tumor. A biodisztribúciós adatok kvantitatív SUV (E) és ID%/g (F) elemzése (n = 10 B16-F10 tumor/radiojelölt vegyület) 90 perccel a nyomjelző injektálása után. A SUV és az ID%/g értékek három független mérés átlagának és a szórásának felelnek meg. Szignifikancia szint: $p \leq 0,01$ (**).

7. Megbeszélés

7.1 Melanoma malignum kimutatására használt vegyületek képalkotási tulajdonságainak értelmezése

A bőrrák legagresszívebb formája a melanoma malignum, amelynek előfordulási gyakorisága az utóbbi évtizedek megfigyelései alapján folyamatosan növekszik. Mivel az áttétes betegek prognózisa nagyon rossz, ez a rosszindulatú daganat magas halálozással jár. Ezért a korai metasztatikus elváltozások felismerése a nagy felbontású, nem invazív képalkotó modalitások segítségével (pl.: PET) kritikus a betegek túlélésében [235]. A nukleáris medicinában a ^{68}Ga ideális radionuklid; fizikai tulajdonságai, továbbá jól megalapozott kémiai háttere miatt a kis molekulatömegű biomolekulák és peptidek jelölésének egyik hatékony eszköze, ráadásul előállításához ciklotron sem szükséges [236;237]. Ezen megfontolások alapján feltételeztük a munkánk kezdetén, hogy a ^{68}Ga-mal jelzett prokainamid vegyületek hatékony diagnosztikai lehetőséget nyújthatnak a melanin pigmentet termelő melanoma tumorok kimutatása kapcsán [238].

A prokainamid-típusú vegyületek diagnosztikai hatékonyságának bizonyítása érdekében két különböző szerkezetű kelátorral konjugált származékot állítottunk elő. Munkánk során a 4-amino-*N*-(2-dietilaminoetil)-benzamid-hidroklorid alapvázat NODAGA-NHS észter makrociklusos kelátorhoz, illetve aciklusos HBED-CC-trisz(tBu)tetra-fluoro-fenil-észterhez kapcsoltuk.

A NODAGA-4-amino-*N*-(2-dietilaminoetil)-benzamid radiojelölését ^{68}Ga-mal valósítottuk meg (^{68}Ga-NODAGA-PCA). A teljes szintézis 15 percet vett igénybe, beleértve a végső formulázási lépést is, amely kényelmes szintézis időkeretet biztosított a rövid felezési idejű radioizotóppal történő munkavégzéshez (12. ábra). A radiojelölt vegyület radiokémiai tisztasága meghaladta a 98%-ot (13. ábra), a moláris aktivitása 15-17 GBq/μmol érték között mozgott. Ezért ez a radioszintézis módszer lehetővé tette számunkra, hogy *in vitro* és *in vivo* alkalmazásokhoz robusztus módon előállítsuk a melaninra specifikus ^{68}Ga-NODAGA-PCA-t, illetve a radioligandum minőségi paraméterei alkalmasak voltak a preklinikai vizsgálatok eredményes elvégzéséhez.

A ^{68}Ga-NODAGA-PCA melanin-specificitását *in vitro* körülmények között bizonyítottuk melanin pozitív B16-F10 és melanin negatív Melur sejtvonal felhasználásával. A

radioligandum sejtekben történő dúsulása a melanint tartalmazó B16-F10 sejtekben szignifikánsan magasabb volt, mint az amelanotikus Melur sejtekben, a vizsgált (30, 90 perc) időpontokban (16. ábra). Korábban arról számoltak be az irodalomban, hogy egy hasonló kémiai szerkezetű radioaktív vegyület – nevezetesen a ^{68}Ga-SCN-DOTA-PCA – idő-függően dúsult a B16-F10 sejtekben [239; 240]. *In vitro* méréseink során megfigyeltük, hogy a ^{68}Ga-NODAGA-PCA dúsulása időfüggő folyamat, vagyis az eltelt idővel arányosan monoton növekvő dúsulást találtunk a B16-F10 sejtekben Azonban ez a különbség méréseink során nem bizonyult szignifikánsnak. Sejtes kísérleteink megerősítették továbbá a ^{68}Ga-NODAGA-PCA melanin-specificitását. Kim és mtsai. kutatásaik során [239; 240] azt is megállapították, hogy a radioaktívan jelzett benzamid-származékok (például ^{68}Ga-SCN-DOTA-PCA, ^{68}Ga-SCN-NOTA-BZA) specifikusan kötődnek a melanin pigmenthez, vagy a melanint termelő B16-F10 melanoma sejtekhez. Továbbá, megnövekedett radioligandum felvételt találtak a B16-F10 sejtekben L-tirozin (döntő fontosságú a melanin bioszintézise szempontjából) kezelés után. A melanin pozitív B16-F10 sejtvonalban a ^{68}Ga-NODAGA-PCA radioligandum felvétel értékei magasabbak voltak a 30. és 90. percben, mint a szakirodalomban korábban megjelent hasonló, radiofém-jelölt molekulák (pl.: ^{68}Ga-SCN-DOTA-PCA) *in vitro* paraméterei 2 óra alatt (0,56% ± 0.02%) [240], ugyanakkor, az általunk mért értékek alacsonyabbnak bizonyultak a Ren és mtsai. ^{18}F-ral jelölt FBZA-dal (N-[2-(dietilamino)-etil]-4-^{18}F-fluor-benzamid) kapott eredményeinél [241]. A farmakon-felvételi vizsgálatokat követően arra voltunk kíváncsiak, hogy az egyszer megkötődött aktivitás milyen stabilitással rendelkezik a sejten belül. Ezért vizsgáltuk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA vegyület kiáramlását is mindkét sejtvonal (B16-F10, Melur) esetében. A B16-F10 és Melur sejtek kiáramlási vizsgálatához 30 vagy 90 inkubációs idő után, még további 10 percig inkubáltuk a sejteket, de a médium nem tartalmazott radiojelölt vegyületet. Megállapítottuk, hogy a kötött ^{68}Ga-NODAGA-PCA mennyisége a 10 perc extra időtartam után csökkent. Feltételeztük, hogy a sejtek melanin tartalmának telítése után a „felesleges” radiojelölt vegyület a koncentráció-gradiens megváltozása miatt kiürül a sejtekből. Mindazonáltal a melanin pozitív B16-F10 és melanin negatív Melur sejtvonalak felvételi aránya nem különbözött szignifikánsan a kezdeti arányoktól. Számos tanulmány arról számolt be, hogy a benzamid-származékok sejtfelvétele passzív diffúzióval történik, és a nagy vízoldékonyság csökkenti a sejthártyán való átjutás sebességét. Tesztelve ezeket az elméleteket [240; 242; 243; 244], megmértük a logP értékeket is. A ^{68}Ga-NODAGA-PCA logP-je -2,79 ± 0,10 volt, ami arra utal, hogy a radioligandum erősen hidrofil. Moins és mtsai. [243] leírták, hogy a logP önmagában nem elégséges és elegendő tulajdonság a radioaktívan jelzett benzamid vegyületek szervezetn belüli megoszlásának előrejelzéséhez, mivel az alacsonyabb logP-érték alacsonyabb

hátteret eredményez a nem célzott szövetekben is, ennek következtében pedig magas tumor/háttér (T/M) arány értékeket lehet elérni relatíve alacsony célszöveti dúsulással is. Méréseink szerint ez történt ebben az esetben is, ugyanakkor a radioligandum jövőbeli hasznosítása érdekében érdemes lenne alaposabban tisztázni a sejtbe való bejutás transzportfolyamatait a benzamid-származékok tekintetében.

Egészséges állatokon végzett *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok azt mutatták, hogy a ^{68}Ga-NODAGA-PCA a vizeletkiválasztó útvonalon ürül ki a szervezetből. Erre a tényre a logP érték alapján előre számítottunk is. A radiojelölt vegyület dúsulása egészséges szövetekben és szervekben alacsony volt, még a májban való dúsulás is elhanyagolhatónak tekinthető 90 perces inkubációs idő után (18. ábra). Ezek az eredmények jól korreláltak az *in vitro* méréseink megállapításával, valamint más tanulmányok eredményeivel, ahol a ^{68}Ga-NODAGA-PCA-dal strukturálisan hasonló radioaktívan jelzett benzamidokat vizsgáltak [239; 240; 241; 243].

A ^{68}Ga-NODAGA-PCA melanin-specificitását *in vivo* és *ex vivo* biodisztribúciós mérésekkel támasztottuk alá bőr alatt növekvő melanotikus B16-F10 (C57BL/6 egerekben) és amelanotikus Melur tumorok alkalmazásával (SCID egerekben) 20 ± 2 nappal a tumorsejt beoltása után. 10 perces statikus PET képeket készítettünk 90 perccel a radioaktív injekció intravénás beadását követően. A szubkután növekvő B16-F10 tumorok egyértelműen láthatóvá váltak a miniPET képeken alacsony háttér aktivitással (20. B és C ábra), majd a PET képek kvantitatív elemzése után azt találtuk, hogy a ^{68}Ga-NODAGA-PCA akkumulációja a melanint tartalmazó B16-F10 tumorban szignifikánsan ($p \leq 0,01$) nagyobb volt, mint az amelanotikus Melur daganat esetében (20. G ábra). Ezek az *in vivo* eredmények egyeznek az *ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok tapasztalataival (7. táblázat), amelyek megerősítették a ^{68}Ga-NODAGA-PCA melanin-specificitását. Eredményeink az irodalomban található mérésekkel összhangban vannak. A PET-izotópokkal (^{18}F, ^{68}Ga) jelzett benzamid-származékok relatíve magas felhalmozódást mutattak a B16-F10 daganatokban, kiváló tumor/háttér értékekkel [239; 240; 241; 243]. Munkánk során a ^{68}Ga-NODAGA-PCA hatékonyságát B16-F10 sejtek okozta tüdő metasztázisokban is vizsgáltuk, egérmodellen. Az általunk is használt szingenikus C57BL/6 állatmodellt széles körben alkalmazzák a preklinikai melanoma kutatásokban [32,33]. Tanulmányunkban tüdő metasztázisokat indukáltunk $1x10^5$ B16-F10 melanoma sejteket tartalmazó intravénás injekció beadását követően. A miniPET/CT képek elemzésével a metasztatikus tumorelváltozások a tüdőben jól láthatóvá váltak a ^{68}Ga-NODAGA-PCA injektálást követő 90 perc után (22. C ábra), alacsony háttér dúsulással. A PET képek kvantitatív

kiértékelése után a B16-F10 metasztázisokban körülbelül 6-8-szor nagyobb ^{68}Ga-NODAGA-PCA halmozást figyeltünk meg, mint a háttér (tüdő vagy izom) esetében.

Bár a szubkután növekvő B16-F10 daganatokban (SUVmérték: 0,35 ± 0,09, SUVmax: 2,03 ± 0,87) vagy tüdő metasztázisokban (SUVmérték: 0,15 ± 0,04, SUVmax: 0,42 ± 0,06) csak mérsékelt akkumulációt találtunk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA-dal, azonban a más szervekben halmozódó alacsony aktivitás kiváló minőségű képek felvételét tette lehetővé alacsony háttéraktivitással, és magas tumor/izom vagy tumor/tüdő arányokkal. Hozzánk hasonlóan, korábban Kim és mtsai. [239] azt állapították meg, hogy 2 órával a ^{68}Ga-SCN-DOTA-PCA intravénás injekciója után a tumor/izom arány 9,47 ± 2,36 volt, ami magas képkontrasztot eredményezett.

Egyes tanulmányokban a benzamid-, illetve nikotinamid-alapú radioligandumok akkumulációját kísérleti melanoma daganatokban ^{18}F-FDG-vel is összehasonlítottak PET képalkotás segítségével, mivel az ^{18}F-FDG-t – korlátjai ellenére is – gyakran használják ezen típusú rosszindulatú daganatok diagnosztizálására, stádium meghatározásra és terápia hatékonyságának ellenőrzésére, valamint műtéti és sugárterápia tervezésére is [245; 246]. Nem specifikus tulajdonsága azonban megnehezíti a ^{18}F-FDG-PET képek értékelését, mivel a metabolikusan aktív egészséges szövetekben viszonylag magas a háttérfelvétel [247; 248]. A kísérleti daganatok kimutatására szolgáló ^{18}F-FDG intravénás injektálása után mi is magas felvételi értéket találtunk mind a szubkután növekvő amelanotikus Melurban, mind a melanin-pozitív B16-F10 tumorban (21. ábra), valamint a B16-F10 tüdő metasztázisokban (22. ábra). A PET képek kvantitatív elemzése után a B16-F10 melanoma tumorok szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb ^{18}F-FDG felvételt mutattak a ^{68}Ga-NODAGA-PCA-nál. Ezen megállapítás ellenére, amikor a daganatok ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvételi értékeit összehasonlítottuk a háttér (izom vagy tüdő) aktivitással, akkor körülbelül kétszer vagy háromszor magasabb kontraszt értéket kaptunk, mint a ^{18}F-FDG-vel. A melaninhoz való specifikus kötődés és az alacsonyabb háttér halmozás miatt a ^{68}Ga-NODAGA-PCA jobb kontrasztot nyújtott, mint a ^{18}F-FDG.

A HBED-CC-4-amino-N-(2-dietilaminoetil)-benzamid radiojelölése szintén ^{68}Ga-mal valósult meg. Hasonlóan, mint a ^{68}Ga-NODAGA-PCA esetében, a radiojelölés ideje kb.15-20 percet vett igénybe, beleértve a tisztítási és az újra formulázási lépéseket is (14. ábra). Az ezt követő minőségellenőrzési mérések megerősítették, hogy a vegyület radiokémiai tisztasága ennél a vegyületnél is megbízható, jobb, mint 98% (15. ábra). A királis állófázison különvált a termék három sztereoizomerje is, ami jól látható a radiokromatogramon. A radiojelölt származék moláris aktivitása 13-16 GBq/µmol között mozgott. Mindkét melanin specifikus

vegyület esetében hasonló bomláskorrigált hozamokat (kb. 65-68%) kaptunk. A ^{68}Ga-HBED-CC-PCA vegyület radojelölésénél és a minőségellenőrzési mérések során kapott eredmények biztosították számunkra, hogy gyorsan és egyszerűen, kiváló radiokémiai tisztasággal, valamint magas moláris aktivitással állítsuk elő a radiogyógyszerjelölt vegyületet a preklinikai alkalmazásokhoz. A patkány szérumban végzett 2 órás inkubálás után az eredeti vegyület kb. 75%-a maradt intakt a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA esetében. Érdekes módon ez a megállapítás nem támasztja alá Eder és munkatársai [104] megfigyelését, miszerint a HBED-CC alkalmazása NODAGA kelátor helyett növelheti a radioaktív ligandum metabolikus stabilitását. A ^{68}Ga-HBED-CC-PCA ugyanakkor még mindig elegendően stabil molekula, alkalmas a biológiai mérésekhez.

A ^{68}Ga-mal jelölt különféle kelátorral konjugált prokainamid származékok melanin-specifikusságának vizsgálatához melanin-pozitív (B16-F10) és melanin-negatív melanoma sejtvonalakat (MELUR, A375) alkalmaztunk egyrétegű és szuszpenziós sejttenyészet formájában (17. ábra). Korábbi vizsgálatok ugyanis kimutatták, hogy a transzportfolyamatok (felvétel/kiáramlás) különbözhetnek, ha a sejteket *in vitro* vizsgálatokhoz egyrétegben vagy szuszpenzióban használják fel [249; 250]. Méréseink során mi is különbségeket állapítottunk meg a melaninra specifikus radiojelölt vegyületek felvétele között, amikor a szuszpenziós technikát (17. C és D ábra) összehasonlítottuk az egyrétegű technikával (17. E és F ábra). Nagyobb ^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA felvételt találtunk minden egyes időpontban, amikor a melanoma sejteket egyrétegben alkalmaztuk. Ezen *in vitro* adatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az egyrétegű sejttenyészet fiziológiai tulajdonsága a tapadó melanoma sejtek számára közelebb áll az élő rendszeréhez. Amikor mindkét *in vitro* módszerrel megvizsgáltuk a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA felvételét (17. D és F ábra), szignifikánsan ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) nagyobb felvételt találtunk a melanint termelő B16-F10 sejtekben, mint az amelanotikus MELUR vagy A375 sejtek esetében, továbbá ez a halmozás az idő múlásával növekedett, és 10 perc kiáramlás után is megmaradt a B16-F10 sejteknél. A relatíve alacsony felvételi értékek ellenére is, ezek az eredmények megerősítették az új vegyület melanin-specificitását. Eredményeink összhangban vannak más csoportok korábbi munkáival [239; 240], ahol a ^{68}Ga-mal jelzett benzamid-származékok (^{68}Ga-SCN-NOTA-BZA és ^{68}Ga-SCN-DOTA-PCA) specifikusan kötődnek a melaninhoz a B16-F10 melanoma sejtekben, és a kötődés időfüggősége is kimutatható. Ahogy kutatócsoportunk és mások korábban beszámoltak róla [240; 238; 243; 244; 251], a ^{68}Ga-mal jelölt prokainamid felvétele passzív diffúzióval történik, ezért a jelölt vegyületek logP értéke informatív a folyamat sebességének

megbecslésében. A^{68}Ga-NODAGA-PCA logP értéke -2,79 ± 0,10 és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA logP értéke -2,19 ± 0,12-nek adódott. A ^{68}Ga-NODAGA-PCA-hoz viszonyítva ez azt jelenti, hogy a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA kissé erősebb lipofil karakterrel rendelkezik, de mégis erősen hidrofil.

Ezekkel a paraméterekkel rendelkező radioligandumoktól általában az várható el – és egészséges egerek felhasználásával végzett szervi megoszlás vizsgálatok ezt alá is támasztották –, hogy a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA vegyületek, egymáshoz hasonlóan, főleg a vizeletrendszeren keresztül ürülnek ki a szervezetből. Továbbá, jellemző rájuk a véráramból történő gyors kiürülés is, hiszen 90 perc inkubációs idő után alacsony halmozást figyeltünk meg más szervekben és szövetekben (19. ábra). Ezek az *in vivo* és *ex vivo* eredmények jól korrelálnak számos olyan vizsgálattal [239; 240; 243], ahol más radioaktívan jelzett (^{18}F, ^{68}Ga, ^{125}I) benzamid-származékok szervezeten belüli viselkedését, megoszlását vizsgálták.

A ^{68}Ga-HBED-CC-PCA vegyület target-specificitását szubkután melanoma tumort hordozó egér modellen vizsgáltuk, és összehasonlítottuk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA-nál kapott eredményekkel. A melanotikus B16-F10 (C57BL/6 egerekben) és az amelanotikus A375 és Melur tumorokat (SCID egerekben) 21 ± 2 nappal a tumorsejt beoltása után vizsgáltuk. 20 perces statikus PET/MRI képeket készítettünk, 90 perccel a radiogyógyszerjelölt vegyület injektálását követően. A melanint tartalmazó B16-F10 tumorok egyértelműen láthatóvá váltak PET/MRI képalkotással, alacsony háttér aktivitással mindkét vegyület esetében (23. A és B ábra). Ezzel szemben, amikor az amelanotikus MELUR (24. A és B ábra) és A375 (24. C és D ábra) daganatokat használtuk PET képalkotáshoz, nagyon alacsony ^{68}Ga-HBED-CC-PCA és ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvételt találtunk, amely megerősítette, hogy a radiojelölt vegyületek akkumulációja függ a sejtek melanin tartalmától. Az *in vivo* PET/MRI képek kvantitatív SUV-elemzése és az *ex vivo* DAR (9. táblázat) adatok feldolgozása után, azt az eredményt kaptuk, hogy a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA és a ^{68}Ga-NODAGA-PCA felvétel melanotikus B16-F10 daganatban (23. C és D ábra) szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabb volt, mint az amelanotikus MELUR vagy A375 daganatoknál (24. E és F ábra). *In vivo* és *ex vivo* adataink jól korreláltak más kutatási tapasztalatokkal, ahol ^{18}F-ral és ^{68}Ga-mal jelölt melanin-specifikus benzamid-származékokat vizsgáltak melanint tartalmazó B16-F10 tumorok esetében, és viszonylag magas halmozást, valamint kiváló tumor/háttér arányt írtak le eredményeikben [239; 240; 243; 252]. A ^{68}Ga-HBED-CC-PCA (SUV-átlag: 0,13 ± 0,01, SUVmax: 0,56 ± 0,11) és a ^{68}Ga-NODAGA-PCA (SUV-értéke: 0,46 ± 0,06, SUVmax: 1,93 ± 0,25) vegyületek mérsékelt halmozódását

figyeltük meg a szubkután növekvő B16-F10 daganatokban, azonban ennek ellenére azt tapasztaltuk, hogy az egészséges szövetek alacsony aktivitása miatt, magas kontrasztú, kiváló minőségű képeket eredményezett alkalmazásuk. Összevetve egy hasonló szerkezeti elemeket tartalmazó vetélytárssal azt tapasztaltuk, hogy az újonnan előállított vegyületeink magasabb tumor/izom arányt mutattak (a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA T/M SUV-értéke 40,7 ± 4,23, illetve 11,43 ± 1,24 volt), mint a ^{68}Ga-SCN-DOTA-PCA (9,47 ± 2,36) [240].

A munkánk során szignifikáns különbségeket találtunk a ^{68}Ga-NODAGA-PCA és a ^{68}Ga-HBED-CC-PCA molekulák *in vitro, ex vivo* és *in vivo* felvétele között, amennyiben melanint tartalmazott a lézió, illetve, ha nem. Eredményeink minden esetben arra mutatnak, hogy a prokainamid molekula megkötődése melanin-függő, azonban az alkalmazott bifunkcionális kelátképző tulajdonságai befolyásolják a jelzett vegyület mennyiségét a melanin-pozitív melanoma sejtekben és tumorokban – vélhetőleg a transzportfolyamat sebességére van hatásuk. Érdemes mégis erőfeszítéseket fordítani – ahogy mi is próbálkoztunk – az ideális kelátor kiválasztására, hiszen a végső radiojelölt vegyületnek ellenállónak kell lennie a különböző endogén ligandumok, például a transzferrin vagy a laktoferrinnel szemben is [253]. Ezért a megfelelő kelátképző kiválasztása nagyban függ az alkalmazott izotóptól, mi is két korszerű, a gallium-kémiában már komoly előélettel bíró származék felhasználása mellett döntöttünk. Az aciklusos kelátorok (pl. HBED-CC) alkalmazása általában gyors komplexképzési kinetikát biztosít, de ezeknek a komplexeknek a kinetikailag inertsége általában alul marad a makrociklusokéhoz (pl. NODAGA) képest [254; 255]. Figyelembe véve, hogy a kelátorok farmakokinetikai módosító szerepet is betölthetnek, a különböző BFC alkalmazása a teljes molekula akkumulációs viselkedésre is hatással lehet, mint ahogyan pozitív módon befolyásolta a HBED-CC-PSMA (prosztata-specifikus membrán antigén) vegyület biológiai viselkedését az a tény, hogy aciklikus komplexképzőt (HBED-CC) alkalmaztak a konjugálási lépés során. Ugyanakkor az eredményeink bebizonyították, hogy HBED-CC univerzálisan nem feltétlenül jobb kelátor, mint a NOTA család különböző elemei, hiszen a mi ligandumunk kisebb *in vitro* stabilitással, és vélhetőleg kisebb transzportsebességgel rendelkezett, mint a NODAGA-analógja. Előbbi kelátor esetében problémát jelenthet az is, hogy a HBED-CC galliummal történő komplexképződése során három diasztereoizomert képez. A képződött izomerek aránya függ a hőmérséklettől, a pH-tól és a komplexképződés során a kelátor koncentrációjától [253]. Nemrégiben arról számoltak be, hogy a standard jelölési protokoll alkalmazásakor (pH ~ 4, hőmérséklet 95 °C) a ^{68}Ga-HBED-CC-PSMA esetében főleg a termodinamikailag kedvezőbb diasztereoizomer forma képződött; azonban a többi izomer mérhető mennyisége is

megtalálható volt a beteg számára elkészített végső készítményben, amelyek elválasztására jelenleg nem nagyon van lehetőség [104]. Ez a tulajdonság lehet az egyik limitáló tényező a HBED-CC széleskörű alkalmazása előtt a klinikai gyakorlatban, mert nagy jelentősége lehet a diasztereoizomerek esetleg eltérő biológiai viselkedésének [104]. Ezért arra a következtetésre lehet jutni, hogy a biológiai alkalmazáshoz a BFC kiválasztása során a termodinamikai stabilitás és a kinetikai inertség kritikus szintjének elérése szükséges, de a határérték után a fő hangsúly az ideális farmakokinetikai tulajdonságok, valamint az egységes tiszta termék meglétére korlátozódik.

7.2 Angiogenezis kimutatására használt vegyületek képalkotási tulajdonságainak értelmezése

A daganatok térbeli növekedésének egyik alapvető folyamata között szerepel az angiogenezis (új érképződés), amely fontos szerepet játszik többek között a tumorok metasztázisképzésében is [157; 163; 256]. Többféle molekuláris célpont szabályozza az új érképződést, ilyenek a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorok (VEGF), az integrinek (pl.: $\alpha_v\beta_3$), a mátrix metalloproteinázok (MMP), vagy az aminopeptidáz N (CD13). Ezeket a molekuláris célpontokat PET-képalkotással láthatóvá lehet tenni. Például ^{68}Ga-mal jelölt specifikus peptid-származékkal célozhatjuk meg őket. Így ez a módszer, alkalmas lehet a tumorok kimutatására és azok terápiás reakciójának követésére egyaránt.

Kutatócsoportunkban korábban számos ^{68}Ga-mal jelölt NGR-alapú (Asn-Gly-Arg) peptid-motívumot magában hordozó vegyületet állítottunk elő (^{68}Ga-NOTA-cNGR, ^{68}Ga-NODAGA-cNGR, ^{68}Ga-NODAGA-cNGR (MG1) vagy ^{68}Ga-NODAGA-cNGR (MG2)), amelyek specifikus kötődést mutattak az APN/CD13 receptorhoz. Azonban az NGR szekvencia hajlamos nem enzimatikus deamidálódásra, amely szukcinimid gyűrű képződéssel jár, illetve annak hidrolízissel történő tovább alakulásával [257]. Éppen ezért fontos az új, javított kémiai stabilitással rendelkező szekvenciák utáni kutatás – amelyek kiküszöbölhetik a stabilitásbeli hiányosságokat, és még kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező radiofarmakonok előállítását tehetik lehetővé –, az angiogenezis kimutatása céljából.

Munkánk során négy új, ^{68}Ga-mal jelölt radiofarmakon előállítását és hatékonyságának tesztelését végeztük kísérletes tumormodell APN és VEGFR-1 expressziójának kimutatására. Kiemelt figyelmet fordítottunk arra, hogy az angiogenezis megjelenítésére ne csak az előzetes munkáinkban használt APN molekuláris célpontot vegyük figyelembe, hanem egy másik

receptort is, ezzel is elősegítve a minél hatékonyabb radiofarmakon fejlesztést, a komplexebb biológiai tesztelés és képalkotás által. Továbbá, látva a ligandum fejlesztésben sikeresnek mutatkozó multimerizációs koncepció sikerességét, egy olyan heterodimer peptid-származékot is előállítottunk, amely egyszerre célozza meg az APN és a VEGFR-1 receptorokat - egy vegyületen belül. Ennek az analógnak az egyik alegysége az NGR peptid-motívumot hordozza magában az APN/CD13 kimutatása céljából, míg a másik alegysége – az APRPG -, a VEGFR-1 receptor megjelenítésére tervezett specifikus rész. Egy más vegyülettel – az YEVGHRC peptid-származékkal – az APN receptort céloztuk. A harmadik és a negyedik vegyület az APRPG-COOH és APRPG-NH_2 voltak, amelyek a VEGFR-1 receptor kimutatására alkalmas peptid-származékok.

Az NGR-APRPG heterodimer peptid-származékot *p*-SCN-Bn-NOTA kelátorral reagáltattuk, amely eredményeként a NOTA-NGR-APRPG-t kaptunk. Az YEVGHRC peptid-származéknál a cisztein tiol csoportján történt meg a kelátorral való konjugálási lépés, amely a NODAGA-YEVGHRC ligandumot eredményezte. A lineáris APRPG-COOH és APRPG-NH_2 peptideket *p*-SCN-Bn-NODAGA kelátorral konjugáltuk az alanin-alegységen lévő szabad aminocsoporton keresztül, így megkapva a NODAGA-APRPG-COOH és a NODAGA-APRPG-NH_2 ligandumokat. Az előállított vegyületeket (NOTA-NGR-APRPG, NODAGA-YEVGHRC, NODAGA-APRPG-COOH, NODAGA-APRPG-NH_2) sikeresen jelöltük ^{68}Ga-mal (25. - 27. ábra), a legtöbb esetben 95%-ot meghaladó radiokémiai tisztasággal, kivétel a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 vegyületnél, ahol a radiokémiai tisztaság a 90%-ot érte el (28. – 31. ábra). A vegyületek specifikus aktivitása 14,68 – 19,47 GBq/μmol között mozgott (11. táblázat).

Meghatároztuk az előállított négy új peptid-származék megoszlási hányados értékeit, az eredmények alapján megállapítható, hogy eltérő mértékben ugyan, de a vegyületeink erős hidrofil tulajdonságokkal rendelkeznek. A vizsgálatok során a következő logP értékeket kaptuk: ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG: -3,981; a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2: -3,024; a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH: -2,370 és a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC: -4,421. A radioligandumok stabilitását patkány- és egér szérumban 2 órás inkubálás mellett, 37 °C-on vizsgáltuk. A mérés vége után a kiindulási vegyületek több mint 80%-a intakt maradt. Ezek alapján a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG, a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH és a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC alkalmas vegyületeknek bizonyultak a biológiai vizsgálataink elvégzésére.

A ligandumok biológiai tesztelésekor – a kontroll állatokon végzett *in vivo* és *ex vivo* szervezeten belüli eloszlás vizsgálatok során –, megállapítottuk, hogy a vesék nagy halmozást mutattak a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG, a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH és a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC radioligandumok beadását követően (32. A-D ábra). Mivel az analógok logP értékei között jelentős különbség mutatkozott, így eltérő viselkedést vártunk a vegyületek szervezetből való kiürülésével kapcsolatban is. A ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH partíciós koefficiense (logP: -2,37), kevésbé hidrofil jellegre utal, amelyet az *ex vivo* szervezeten belüli eloszlás vizsgálatok alá is támasztottak, mivel a radioligandum injektálását követően szignifikánsan ($p \leq 0,05$ és $p \leq 0,01$) magasabb ID%/g értéket kaptunk a vérben, a lépben, a gyomorban, a tüdőben, a szívben és a zsírban, mint a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG, a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 és a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC vegyületeknél (32. E ábra). Ennek következtében a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH radioligandum esetében az egyes szervek és szövetek megnövekedett aktivitása alacsonyabb minőségű leképzést tett lehetővé a magasabb háttér miatt. A megoszlási koefficiens értékekkel magyarázható az is, hogy a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG és a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC ID%/g értékei a vese esetében szignifikánsan magasabbak lettek (^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG-nél az ID%/g értéke 3,048, míg a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC-é 5,785) a többi szerv és szövethez képest (32. E ábra).

A további biológiai vizsgálatokban a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG, a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2, a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH és a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC vegyületek képalkotási tulajdonságait (SUVátlag, ID%/g) hasonlítottuk össze B16-F10 sejtekből szubkután indukált egér tumormodellen, amelyen a vegyületek APN/CD13 és VEGFR-1 kötődését teszteltük (33. ábra). Korábbi tanulmányokból már ismert, hogy a B16-F10 tumorsejtek APN/CD13 és VEGFR-1 pozitivitást mutatnak, amelyet molekuláris biológiai módszerekkel és PET képalkotással bizonyítottak [258; 259; 260]. Az *in vivo* PET képalkotás során az újonnan előállított négy új ^{68}Ga-mal jelölt vegyülettel látható vált a szubkután létrehozott B16-F10 tumor a C57BL/6 egereken mindegyik esetben, tehát ezen vegyületek alkalmasak voltak a daganattal társuló új érképződés kimutatására, azonban jelentős különbséggel. Ugyanis, a vizsgált radioligandumok közül a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG heterodimer vegyület rendelkezett a legjobb képalkotási tulajdonságokkal az általunk mért *in vivo* és *ex vivo* mérések alapján. A heterodimer vegyület szignifikánsan magas SUVátlag értéket ($0,193 \pm 0,05$) mutatott a vizsgált körülmények között a többi három vegyülettel szemben, ahogy azt a multimerizációs koncepció alapján korábban feltételeztük. Ez a kiemelkedő eredmény vélhetőleg annak

köszönhető, hogy a vegyület egyidőben két alegységével, két különböző molekuláris célponthoz is képes kötődni, ezáltal hatékonyabb eszköz lehet az angiogenezis kimutatása céljára. Ezen eredménynek köszönhetően elmondható, hogy a multimerizációs eljárás felhasználásával sikeresen előidéztük a PET képalkotás minőségi javulását. A többi vegyület esetében a következő felvételi értékeket kaptuk a B16-F10 tumorokban, amely értékek szignifikánsan alacsonyabbnak ($p \leq 0,01$) adódtak a heterodimer vegyülethez képest: ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC (SUVmean: 0,03 ± 0,01); ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 (SUVmean: 0,04 ± 0,003); a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH a SUVmean értéke 0,097 ± 0,01 volt (33. E ábra). Bár korábbi vizsgálatok [261] azt mutatták ki, hogy a YEVGHRC peptid-funkcionalizált liposzómák hatékonyan célozták meg az APN/CD13-pozitív tumorokat. Vizsgálatunkban a radioaktívan jelölt YEVGHRC-t tartalmazó vegyület nem mutatott megfelelő célzási hatékonyságot. Az *in vivo* és az *ex vivo* eredmények jól korreláltak egymással, a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG és a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH vegyületeknél találtunk jelentős ID%/g felvételi értékeket, míg az előzőnél ID%/g: 1,33 ± 0,31, utóbbinál ID%/g: 1,35 ± 0,12. A két másik radioligandum esetében számottevően alacsonyabb felvételt tapasztaltunk méréseink eredményeként: ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC (ID%/g: 0,13 ± 0,06), ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 (SUVmean: (ID%/g: 0,23 ± 0,05).

Jelen munkában, a tudomásunk szerint mások által még nem használt, négy új PET radioligandum hatékonyságát vizsgáltuk angiogenezis kimutatása céljából. Annak ellenére, hogy a NGR-APRPG, APRPG-COOH és APRPG és az YEVGHRC még nem optimalizált vektorok, mégis az állatmodellen kialakított B16-F10 tumoron a radioligandumok mérsékelt halmozását tapasztaltuk, sőt a heterodimer (^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG) vegyület kimagasló specifikus kötődését figyeltük meg. Úgy gondoljuk, hogy ezek a vegyületek ígéretes jelöltek lehetnek a további fejlesztés szempontjából, amely során optimalizálnánk a származékok farmakokinetikai tulajdonságait.

8. Összefoglalás

A ^{68}Ga egy generátor-izotóp, amely könnyű, gyors és egyszerű elérhetőséget biztosít PET-radiofarmakonok fejlesztéséhez. Munkánk során specifikus kölcsönhatások alapján dúsuló kis molekulatömegű vegyületek és peptid-származékok előállításával, karakterizálásával, valamint preklinikai körülmények közötti tesztelésével foglalkoztunk. Reményeink szerint eredményeink hozzájárulnak a melanoma malignum és tumornövekedéshez kötött angiogenezis minél hatékonyabb kimutatásához.

Első projektünkben két új (^{68}Ga-NODAGA-PCA és ^{68}Ga-HBED-CC-PCA), a melanoma malignum kimutatására alkalmas vegyületet állítottunk elő, majd a sikeres radiojelölésüket követően széles spektrumú preklinikai biológiai vizsgálatoknak vetettük alá a radioligandumokat *in vitro, in vivo* és *ex vivo* körülmények között. Ezek alapján egyértelműen megállapíthatóvá vált, hogy az újonnan előállított radiojelölt vegyületek a melanoma malignumban található melaninhoz specifikusan kötődnek mind sejt- és állatmodell esetén, feleslegük a vizeletkiválasztó rendszeren keresztül ürül ki a szervezetből, továbbá nem kötődnek melanint nem termelő melanoma sejtvonalakhoz és tumorokhoz. Bebizonyosodott, hogy az alkalmazott kelátképzők tulajdonságai befolyásolják a radioligandum felvételét a melanint tartalmazó sejtvonalakban és tumorokban, amely folyamatot feltehetően a transzport sebeségében okozott változás eredményezett.

További projektünkben pedig az angiogenezis során fokozottan jelenlévő receptorokat céloztuk különböző, ^{68}Ga-mal jelölt vegyületekkel. Az Aminopeptidáz N kimutatására a ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC-t; a VEGFR-1-re a ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH és ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 vegyületeket alkalmaztuk, míg a ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG heterodimert a képalkotás paramétereinek további javulása érdekében használtuk a két receptort egyidejűleg kifejező sejtvonalon. Sikeresen előállítottuk, radiojelöltük és karakterizáltuk az előbb felsorolt vegyületeket, kontroll és B16F10 tumoros állatmodellen, valamint vizsgáltuk a PET képalkotási tulajdonságaikat. Mindegyik származékot alkalmasnak ítéltük meg a tumorok megjelenítésére, a heterodimer vegyület képalkotási tulajdonságai pedig kimagaslóak voltak.

Mindkét munkaszakaszban sikeres, és a preklinikai PET képalkotás során hatékonynak bizonyuló radioligandumokat állítottunk elő. Ezen vegyületek további felhasználásának lehetősége ígéretes, azonban a bennük rejlő potenciált a származékok további optimalizálásával és a farmakokinetikai tulajdonságaik fejlesztésével lehet realizálni.

9. Summary

^{68}Ga is a generator isotope that provides simple, reliable, fast, and easy access to the development of PET radiopharmaceuticals. In our work, we focused on the preparation, characterization and preclinical testing of small molecules and peptide derivatives which can accumulate based on specific interactions of certain tumors. We hope that our results will contribute to the most effective detection of malignant melanoma and angiogenesis.

In our first project, we have prepared two new compounds (^{68}Ga-NODAGA-PCA and ^{68}Ga-HBED-CC-PCA) for the detection of melanin-positive melanoma, and after their successful radiolabeling, we have used these radioligands on a wide range of *in vitro, in vivo* and *ex vivo* preclinical biological studies. Based on these experiments, it has become clear that the newly produced radiolabeled compounds bind specifically to melanin in melanoma malignum in both cell and animal models, their excess is excreted through the urinary system, and they do not bind to non-melanin-producing melanoma cell lines and tumors. We have also collected evidence, that the properties of the applied chelating agents can dramatically affect the radioligand uptake in melanin-containing cell lines and tumors. This observation is presumably the result of the different transport rates.

In another project, we have targeted receptors that are overexpressed during the angiogenesis with various ^{68}Ga-labeled compounds. ^{68}Ga-NODAGA-YEVGHRC was intended to detect Aminopeptidase N; ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-COOH and ^{68}Ga-NODAGA-APRPG-NH_2 were used for visualization of VEGFR-1, while the ^{68}Ga-NOTA-NGR-APRPG heterodimer was used to further improve imaging parameters cell lines expressing both proteins. We successfully prepared, radiolabeled, and characterized the compounds listed above in a control and B16-F10 tumor-bearing animal model, and examined their PET imaging properties. Each derivative was suitable for tumor imaging, however, the imaging properties of the heterodimeric compound were outstanding.

Our novel radioligands were promising in both phases of the research and proven to be effective in preclinical PET imaging. We have successfully presented proof of concept studies with the new substances and the further application of these compounds are possible, but the realization of the diagnostic value of these radioligand requires further optimization.

10. Irodalomjegyzék

10.1 A hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Johnson CS. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Elsevier BV; 1999 May;34(3-4):203–56.

2. Müller NL. Computed tomography and magnetic resonance imaging: past, present and future. Eur Respir J Suppl. 2002 Feb;35:3s-12s.

3. Müller NL, Miller RR. Computed Tomography of Chronic Diffuse Infiltrative Lung Disease: Part 1. American Review of Respiratory Disease. American Thoracic Society; 1990 Nov;142(5):1206–15.

4. Roentgen diagnosis of diseases of the head. by Arthgr Schuller. translated by Dr. Fred S. Stocking. The Laryngoscope. Wiley; 1919 Apr;29(4):261–261.

5. Colby TV, Swensen SJ. Anatomic distribution and histopathologic patterns in diffuse lung disease: correlation with HRCT. J Thorac Imaging. 1996 Winter;11(1):1-26.

6. Sommer T, Fehske W, Holzknecht N, Smekal AV, Keller E, Lutterbey G, Kreft B, Kuhl C, Gieseke J, Abu-Ramadan D, Schild H. Aortic dissection: a comparative study of diagnosis with spiral CT, multiplanar transesophageal echocardiography, and MR imaging. Radiology. 1996 May;199(2):347-52.

7. Galuska L. Molekuláris képalkotás és terápia hazánkban LAM, 2005, 15(10), 753–757

8. Cartwright L. Naked to the Bone: Medical Imaging in the Twentieth Century. Bettyann Holtzmann Kevles. Isis. University of Chicago Press; 1997 Dec;88(4):738–9.

9. Cherry SR. Fundamentals of positron emission tomography and applications in preclinical drug development. J Clin Pharmacol. 2001 May;41(5):482-91.

10. Holman BL, Devous MD Sr. Functional brain SPECT: the emergence of a powerful clinical method. J Nucl Med. 1992 Oct;33(10):1888-904.

11.https://multimodalneuroimaging.wordpress.com/2015/04/28/c-positron-emission-tomography/ Utoljára megtekintve: 2020.04.05

12. Rahmim A, Zaidi H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. Nucl Med Commun. 2008 Mar;29(3):193-207.

13. Townsend DW. Combined positron emission tomography-computed tomography: the historical perspective. Semin Ultrasound CT MR. 2008 Aug;29(4):232-5.

14. Tune LE. Book Review Principles and Practice of Geriatric Psychiatry Edited by Marc E. Agronin and Gabe J. Maletta. 762 pp. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006. $149. 978-0-7817-4810-0. New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society; 2007 Mar 22;356(12):1283–1283.

15. Rich DA. A brief history of positron emission tomography. J Nucl Med Technol. 1997 Mar;25(1):4-11.

16. Ter-Pogossian MM, Raichle ME, Sobel BE. Positron-emission tomography. Sci Am. 1980 Oct;243(4):170-81.

17. Gallagher BM, Ansari A, Atkins H, Casella V, Christman DR, Fowler JS, Ido T, MacGregor RR, Som P, Wan CN, Wolf AP, Kuhl DE, Reivich M. Radiopharmaceuticals XXVII. 18F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose as a radiopharmaceutical for measuring regional myocardial glucose metabolism in vivo: tissue distribution and imaging studies in animals. J Nucl Med. 1977 Oct;18(10):990-6.

18. Cherry SR, Gambhir SS. Use of positron emission tomography in animal research. ILAR J. 2001;42(3):219-32.

19. Wang J, Sánchez-Roselló M, Aceña JL, del Pozo C, Sorochinsky AE, Fustero S, Soloshonok VA, Liu H. Fluorine in pharmaceutical industry: fluorine-containing drugs introduced to the market in the last decade (2001-2011). Chem Rev. 2014 Feb 26;114(4):2432-506.

20. Jones T, Townsend D. History and future technical innovation in positron emission tomography. J Med Imaging (Bellingham). 2017 Jan;4(1):011013.

21. Delbeke D, Martin WH, Patton JA, Sandler MP, editors. Practical FDG Imaging: A Teaching File. Springer New York; 2004.

22. Vaidyanathan S, Patel CN, Scarsbrook AF, Chowdhury FU. FDG PET/CT in infection and inflammation--current and emerging clinical applications. Clin Radiol. 2015 Jul;70(7):787-800.

23. Patel H, Mazur W, Williams KA Sr, Kalra DK. Myocardial viability-State of the art: Is it still relevant and how to best assess it with imaging? Trends Cardiovasc Med. 2018 Jan;28(1):24-37.

24. Hara T, Kosaka N, Shinoura N, Kondo T. PET imaging of brain tumor with [methyl-11C]choline. J Nucl Med. 1997 Jun;38(6):842-7.

25. De Witte O, Goldberg I, Wikler D, Rorive S, Damhaut P, Monclus M, Salmon I, Brotchi J, Goldman S. Positron emission tomography with injection of methionine as a prognostic factor in glioma. J Neurosurg. 2001 Nov;95(5):746-50.

26. Mintun MA, LaRossa GN, Sheline YI, Dence CS, Lee SY, Mach RH, et al. [11C]PIB in a nondemented population: Potential antecedent marker of Alzheimer disease. Neurology. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2006 Aug 7;67(3):446–52.

27. Grassi I, Nanni C, Allegri V, Morigi JJ, Montini GC, Castellucci P, Fanti S. The clinical use of PET with (11)C-acetate. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2012;2(1):33-47.

28. Knapp WH, Helus F, Sinn H, Ostertag H, Georgi P, Brandeis WE, Braun A. N-13 L-glutamate uptake in malignancy: its relationship to blood flow. J Nucl Med. 1984 Sep;25(9):989-97.

29. Kitsiou AN, Bacharach SL, Bartlett ML, Srinivasan G, Summers RM, Quyyumi AA, Dilsizian V. 13N-ammonia myocardial blood flow and uptake: relation to functional outcome of asynergic regions after revascularization. J Am Coll Cardiol. 1999 Mar;33(3):678-86.

30. Yamamoto Y, de Silva R, Rhodes CG, Araujo LI, Iida H, Rechavia E, Nihoyannopoulos P, Hackett D, Galassi AR, Taylor CJ, et al. A new strategy for the assessment of viable myocardium and regional myocardial blood flow using 15O-water and dynamic positron emission tomography. Circulation. 1992 Jul;86(1):167-78.

31. Shukla AK, Kumar U. Positron emission tomography: An overview. J Med Phys. 2006 Jan;31(1):13-21. doi: 10.4103/0971-6203.25665.

32. Ben-Haim S, Ell P. 18F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response. J Nucl Med. 2009 Jan;50(1):88-99.

33. Dunet V, Rossier C, Buck A, Stupp R, Prior JO. Performance of 18F-fluoro-ethyl-tyrosine (18F-FET) PET for the differential diagnosis of primary brain tumor: a systematic review and Metaanalysis. J Nucl Med. 2012 Feb;53(2):207-14.

34. Been LB, Suurmeijer AJ, Cobben DC, Jager PL, Hoekstra HJ, Elsinga PH. [18F]FLT-PET in oncology: current status and opportunities. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004 Dec;31(12):1659-72.

35. DeGrado TR, Baldwin SW, Wang S, Orr MD, Liao RP, Friedman HS, Reiman R, Price DT, Coleman RE. Synthesis and evaluation of (18)F-labeled choline analogs as oncologic PET tracers. J Nucl Med. 2001 Dec;42(12):1805-14.

36. Evangelista L, Cervino AR, Guttilla A, Zattoni F, Cuccurullo V, Mansi L. ^{18}F-fluoromethylcholine or ^{18}F-fluoroethylcholine pet for prostate cancer imaging: which is better? A literature revision. Nucl Med Biol. 2015 Apr;42(4):340-8.

37. Xu Z, Li XF, Zou H, Sun X, Shen B. ^{18}F-Fluoromisonidazole in tumor hypoxia imaging. Oncotarget. 2017 Oct 7;8(55):94969-94979.

38. Alawneh JA, Moustafa RR, Marrapu ST, Jensen-Kondering U, Morris RS, Jones PS, Aigbirhio FI, Fryer TD, Carpenter TA, Warburton EA, Baron JC. Diffusion and perfusion correlates of the 18F-MISO PET lesion in acute stroke: pilot study. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2014 Apr;41(4):736-44.

39. Savi A, Incerti E, Fallanca F, Bettinardi V, Rossetti F, Monterisi C, Compierchio A, Negri G, Zannini P, Gianolli L, Picchio M. First Evaluation of PET-Based Human Biodistribution and Dosimetry of ^{18}F-FAZA, a Tracer for Imaging Tumor Hypoxia. J Nucl Med. 2017 Aug;58(8):1224-1229.

40. Jadvar H, Desai B, Conti PS. Sodium 18F-fluoride PET/CT of bone, joint, and other disorders. Semin Nucl Med. 2015 Jan;45(1):58-65.

41. Höglund J, Shirvan A, Antoni G, Gustavsson SÅ, Långström B, Ringheim A, Sörensen J, Ben-Ami M, Ziv I. 18F-ML-10, a PET tracer for apoptosis: first human study. J Nucl Med. 2011 May;52(5):720-5.

42. Ito K, Morrish PK, Rakshi JS, Uema T, Ashburner J, Bailey DL, Friston KJ, Brooks DJ. Statistical parametric mapping with 18F-dopa PET shows bilaterally reduced striatal and nigral dopaminergic function in early Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1999 Jun;66(6):754-8..

43. Murphy KR, Landau SM, Choudhury KR, Hostage CA, Shpanskaya KS, Sair HI, Petrella JR, Wong TZ, Doraiswamy PM; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Mapping the effects of ApoE4, age and cognitive status on 18F-florbetapir PET measured regional cortical patterns of beta-amyloid density and growth. Neuroimage. 2013 Sep;78:474-80.

44. Beer AJ, Haubner R, Goebel M, Luderschmidt S, Spilker ME, Wester HJ, Weber WA, Schwaiger M. Biodistribution and pharmacokinetics of the alphavbeta3-selective tracer 18F-galacto-RGD in cancer patients. J Nucl Med. 2005 Aug;46(8):1333-41.

45. Henze M, Schuhmacher J, Hipp P, Kowalski J, Becker DW, Doll J, Mäcke HR, Hofmann M, Debus J, Haberkorn U. PET imaging of somatostatin receptors using [68GA]DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotide: first results in patients with meningiomas. J Nucl Med. 2001 Jul;42(7):1053-6.

46. Treglia G, Castaldi P, Rindi G, Giordano A, Rufini V. Diagnostic performance of Gallium-68 somatostatin receptor PET and PET/CT in patients with thoracic and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: a meta-analysis. Endocrine. 2012 Aug;42(1):80-7.

47. Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, Baum RP, Fanti S, Gabriel M, Papathanasiou ND, Pepe G, Oyen W, De Cristoforo C, Chiti A. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010 Oct;37(10):2004-10.

48. Eppard E, de la Fuente A, Benešová M, Khawar A, Bundschuh RA, Gärtner FC, Kreppel B, Kopka K, Essler M, Rösch F. Clinical Translation and First In-Human Use of [^{44}Sc]Sc-PSMA-617 for PET Imaging of Metastasized Castrate-Resistant Prostate Cancer. Theranostics. 2017 Sep 26;7(18):4359-4369.

49. Hernandez R, Valdovinos HF, Yang Y, Chakravarty R, Hong H, Barnhart TE, et al. 44Sc: An Attractive Isotope for Peptide-Based PET Imaging. Molecular Pharmaceutics [Internet]. American Chemical Society (ACS); 2014 Jul 23;11(8):2954–61.

50. Pruszyński M, Majkowska-Pilip A, Loktionova NS, Eppard E, Roesch F. Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter 44Sc. Appl Radiat Isot. 2012 Jun;70(6):974-9.

51. Ulaner GA, Hyman DM, Lyashchenko SK, Lewis JS, Carrasquillo JA. 89Zr-Trastuzumab PET/CT for Detection of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastases in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Primary Breast Cancer. Clin Nucl Med. 2017 Dec;42(12):912-917.

52. OGYEI: „Radioaktív gyógyszerkészítmények”; 01-2014:0125:Ph.Hg.VIII.-Ph.Eur. 8.0.-1.10, 2014. Utoljára megtekintve: 2021. január 12.

53. Dash A, Chakravarty R. Radionuclide generators: the prospect of availing PET radiotracers to meet current clinical needs and future research demands. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2019 Feb 15;9(1):30-66.

54. Knapp FF Jr, Mirzadeh S. The continuing important role of radionuclide generator systems for nuclear medicine. Eur J Nucl Med. 1994 Oct;21(10):1151-65.

55. Vértes A, Nagy A, Klencsár Z, Rezso G. Lovas, Frank Rösch (eds.), Handbook of Nuclear Chemistry, ISBN 978-1-4419-0719-6

56. Velikyan I. 68Ga-Based radiopharmaceuticals: production and application relationship. Molecules. 2015 Jul 16;20(7):12913-43.

57. GLEASON GI. A positron cow. Int J Appl Radiat Isot. 1960 Jul;8:90-4.

58. Greene MW, Tucker WD. An improved gallium-68 cow. The International Journal of Applied Radiation and Isotopes. Elsevier BV; 1961 Nov;12(1-2):62–3. 5.

59. GOTTSCHALK A, ANGER HO. THE SENSITIVITY OF THE POSITRON SCINTILLATION CAMERA FOR DETECTING SIMULATED BRAIN TUMORS WITH GALLIUM 68-EDTA. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med. 1964 Jul;92:174-6.

60. YANO Y, ANGER HO. A GALLIUM-68 POSITRON COW FOR MEDICAL USE. J Nucl Med. 1964 Jun;5:484-7.

61. Kopecký P, Mudrová B. 68Ge/68Ga generator for the production of 68Ga in an ionic form. The International Journal of Applied Radiation and Isotopes. Elsevier BV; 1974 Jun;25(6):263–8.

62. Malyshev, K.V., Smirnov, V.V., 1975. Gallium-68 yield from hydrated zirconium oxide-based generators. Sov. Radiochem. 17, 137.

63. Neirinckx RD, Davis MA. Potential column chromatography for ionic Ga-68. II: Organic ion exchangers as chromatographic supports. J Nucl Med. 1980 Jan;21(1):81-3.

64. Arino H, Skraba WJ, Kramer HH. A new 68Ge/68Ga radioisotope generator system. The International Journal of Applied Radiation and Isotopes. Elsevier BV; 1978 Feb;29(2):117–20.

65. Velikyan I. Positron emitting [68Ga]Ga-based imaging agents: chemistry and diversity. Med Chem. 2011 Sep;7(5):345-79.

66. Bauwens M, Chekol R, Vanbilloen H, Bormans G, Verbruggen A. Optimal buffer choice of the radiosynthesis of (68)Ga-Dotatoc for clinical application. Nucl Med Commun. 2010 Aug;31(8):753-8.

67. Velikyan I, Beyer GJ, Långström B. Microwave-supported preparation of (68)Ga bioconjugates with high specific radioactivity. Bioconjug Chem. 2004 May-Jun;15(3):554-60.

68. Rösch F. Past, present and future of 68Ge/68Ga generators. Appl Radiat Isot. 2013 Jun;76:24-30.

69. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Rösch F. Processing of generator-produced 68Ga for medical application. J Nucl Med. 2007 Oct;48(10):1741-8.

70. Meyer GJ, Mäcke H, Schuhmacher J, Knapp WH, Hofmann M. 68Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2004 Aug;31(8):1097-104.

71. Asti M, De Pietri G, Fraternali A, Grassi E, Sghedoni R, Fioroni F, Roesch F, Versari A, Salvo D. Validation of (68)Ge/(68)Ga generator processing by chemical purification for routine clinical application of (68)Ga-DOTATOC. Nucl Med Biol. 2008 Aug;35(6):721-4.

72. Breeman WA, de Jong M, de Blois E, Bernard BF, Konijnenberg M, Krenning EP. Radiolabelling DOTA-peptides with 68Ga. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005 Apr;32(4):478-85.

73. Green MA, Welch MJ. Gallium radiopharmaceutical chemistry. Int J Rad Appl Instrum B. 1989;16(5):435-48.

74. Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the Elements 2nd Edition, 1997, ISBN-13: 978-075063365.

75.Meisenheimer M, Saenko Y, Eppard E. Gallium-68: Radiolabeling of Radiopharmaceuticals for PET Imaging - A Lot to Consider. Medical Isotopes. IntechOpen; 2021 Jan 7.

76. Wester HJ. Munich Molecular Imaging Handbook Series, Pharmaceutical Radiochemistry (I) 2010, ISBN # 9783981352306.

77. Shannon RD. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. Acta Crystallographica Section A. International Union of Crystallography (IUCr); 1976 Sep 1;32(5):751–67.

78. Ramogida CF, Orvig C. Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy. Chem Commun (Camb). 2013 May 25;49(42):4720-39.

79. Zeng D, Zeglis BM, Lewis JS, Anderson CJ. The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. J Nucl Med. 2013 Jun;54(6):829-32.

80. Byegård J, Skarnemark G, Skålberg M. The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. Springer Science and Business Media LLC; 1999 Aug;241(2):281–90.

81. Stimmel JB, Stockstill ME, Kull FC Jr. Yttrium-90 chelation properties of tetraazatetraacetic acid macrocycles, diethylenetriaminepentaacetic acid analogues, and a novel terpyridine acyclic chelator. Bioconjug Chem. 1995 Mar-Apr;6(2):219-25.

82. Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Wu C, Brechbiel MW, Pai LH, McMurry TJ, Gansow OA, Pastan I, Paik CH, et al. Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. J Nucl Med. 1994 May;35(5):882-9.

83. Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. Chem Soc Rev. 2014 Jan 7;43(1):260-90.

84. Autio A, Virtanen H, Tolvanen T, Liljenbäck H, Oikonen V, Saanijoki T, Siitonen R, Käkelä M, Schüssele A, Teräs M, Roivainen A. Absorption, distribution and excretion of intravenously injected (68)Ge/ (68)Ga generator eluate in healthy rats, and estimation of human radiation dosimetry. EJNMMI Res. 2015 Dec;5(1):117

85. Maecke HR, Hofmann M, Haberkorn U. (68)Ga-labeled peptides in tumor imaging. J Nucl Med. 2005 Jan;46 Suppl 1:172S-8S.

86. Chitambar CR. Medical applications and toxicities of gallium compounds. Int J Environ Res Public Health. 2010 May;7(5):2337-61.

87. Yang J, Kan Y, Ge BH, Yuan L, Li C, Zhao W. Diagnostic role of Gallium-68 DOTATOC and Gallium-68 DOTATATE PET in patients with neuroendocrine tumors: a meta-analysis. Acta Radiol. 2014 May;55(4):389-98.

88. Kubícek V, Havlícková J, Kotek J, Tircsó G, Hermann P, Tóth E, Lukes I. Gallium(III) complexes of DOTA and DOTA-monoamide: kinetic and thermodynamic studies. Inorg Chem. 2010 Dec 6;49(23):10960-9.

89. Niu W, Wong EH, Weisman GR, Peng Y, Anderson CJ, Zakharov LN, et al. Structural and Dynamic Studies of Zinc, Gallium, and Cadmium Complexes of a Dicarboxylate Pendant-Armed Cross-Bridged Cyclen. European Journal of Inorganic Chemistry. Wiley; 2004 Aug;2004(16):3310–5. 5

90. Aime S, Botta M, Geninatti Crich S, Giovenzana GB, Jommi G, Pagliarin R, Sisti M. Synthesis and NMR Studies of Three Pyridine-Containing Triaza Macrocyclic Triacetate Ligands and Their Complexes with Lanthanide Ions. Inorg Chem. 1997 Jul 2;36(14):2992-3000.

91. Ferreira CL, Lamsa E, Woods M, Duan Y, Fernando P, Bensimon C, Kordos M, Guenther K, Jurek P, Kiefer GE. Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals. Bioconjug Chem. 2010 Mar 17;21(3):531-6.

92. Hicks RJ. Should positron emission tomography/computed tomography be the first rather than the last test performed in the assessment of cancer? Cancer Imaging. 2012 Sep 28;12(2):315-23.

93. Treglia G, Castaldi P, Rindi G, Giordano A, Rufini V. Diagnostic performance of Gallium-68 somatostatin receptor PET and PET/CT in patients with thoracic and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: a meta-analysis. Endocrine. 2012 Aug;42(1):80-7.

94. Öberg K. Gallium-68 somatostatin receptor PET/CT: is it time to replace (111)Indium DTPA octreotide for patients with neuroendocrine tumors? Endocrine. 2012 Aug;42(1):3-4.

95. Schreiter NF, Brenner W, Nogami M, Buchert R, Huppertz A, Pape UF, Prasad V, Hamm B, Maurer MH. Cost comparison of 111In-DTPA-octreotide scintigraphy and 68Ga-DOTATOC PET/CT for staging enteropancreatic neuroendocrine tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2012 Jan;39(1):72-82.

96. Velikyan I, Maecke H, Langstrom B. Convenient preparation of 68Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. Bioconjug Chem. 2008 Feb;19(2):569-73.

97. Clarke ET, Martell AE. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles. Inorganica Chimica Acta. Elsevier BV; 1991 Dec;190(1):37–46.

98. Jeong JM, Hong MK, Chang YS, Lee YS, Kim YJ, Cheon GJ, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Preparation of a promising angiogenesis PET imaging agent: 68Ga-labeled c(RGDyK)-isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid and feasibility studies in mice. J Nucl Med. 2008 May;49(5):830-6.

99. Tsionou MI, Knapp CE, Foley CA, Munteanu CR, Cakebread A, Imberti C, Eykyn TR, Young JD, Paterson BM, Blower PJ, Ma MT. Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. RSC Adv. 2017 Oct 24;7(78):49586-49599.

100. Jyo A, Kohno T, Terazono Y, Kawano S. Crystal Structure of Gallium(III) Complex of 1,4,7-Triazacyclonane-N,N',N″-Triacetate. Anal. Sci. 1990, 6, 323−324. 3.

101. Máté G, Šimeček J, Pniok M, Kertész I, Notni J, Wester HJ, 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. 2015 Jul 21;20(7):13112-26.

102. Notni J, Hermann P, Havlícková J, Kotek J, Kubícek V, Plutnar J, Loktionova N, Riss PJ, Rösch F, Lukes I. A triazacyclononane-based bifunctional phosphinate ligand for the preparation of multimeric 68Ga tracers for positron emission tomography. Chemistry. 2010 Jun 25;16(24):7174-85.

103. Eder M, Knackmuss S, Le Gall F, Reusch U, Rybin V, Little M, Haberkorn U, Mier W, Eisenhut M. 68Ga-labelled recombinant antibody variants for immuno-PET imaging of solid tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010 Jul;37(7):1397-407.

104. Eder M, Neels O, Müller M, Bauder-Wüst U, Remde Y, Schäfer M, Hennrich U, Eisenhut M, Afshar-Oromieh A, Haberkorn U, Kopka K. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. Pharmaceuticals (Basel). 2014 Jun 30;7(7):779-96.

105. Ma R, Murase I, Martell AE. Synthesis and characterization of metal complexes with N,N″-bis(2-hydroxybenzyl)-diethylenetriamine-N, N′,N″-triacetic acid and the stabilities of its complexes with divalent and trivalent metal ions. Inorganica Chimica Acta. Elsevier BV; 1994 Aug;223(1-2):109–19.

106. Weineisen M, Simecek J, Schottelius M, Schwaiger M, Wester HJ. Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. EJNMMI Res. 2014 Dec;4(1):63.

107. Eder M, Wängler B, Knackmuss S, LeGall F, Little M, Haberkorn U, Mier W, Eisenhut M. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: a versatile conjugation agent for 68Ga-labeled small recombinant antibodies. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008 Oct;35(10):1878-86.

108.Liu S, Edwards DS. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. Bioconjug Chem. 2001 Jan-Feb;12(1):7-34.

109. Moreau J, Guillon E, Pierrard JC, Rimbault J, Port M, Aplincourt M. Complexing mechanism of the lanthanide cations Eu3+, Gd3+, and Tb3+ with 1,4,7,10-tetrakis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (dota)-characterization of three successive complexing phases: study of the thermodynamic and structural properties of the complexes by potentiometry, luminescence spectroscopy, and EXAFS. Chemistry. 2004 Oct 11;10(20):5218-32.

110. Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, Price EW, Patrick BO, Wester DW, Adam MJ, Orvig C. Acyclic chelate with ideal properties for (68)Ga PET imaging agent elaboration. J Am Chem Soc. 2010 Nov 10;132(44):15726-33.

111. Kojima S, Jay M. Comparisons of labeling efficiency, biological activity and biodistribution among 125I-, 67Ga-DTPA-and 67Ga-DFO-lectins. Eur J Nucl Med. 1987;13(7):366-70.

112. Roux A, Gillet R, Huclier-Markai S, Ehret-Sabatier L, Charbonnière LJ, Nonat AM. Bifunctional bispidine derivatives for copper-64 labelling and positron emission tomography. Org Biomol Chem. 2017 Feb 7;15(6):1475-1483.

113. Price TW, Yap SY, Gillet R, Savoie H, Charbonnière LJ, Boyle RW, Nonat AM, Stasiuk GJ. Evaluation of a Bispidine-Based Chelator for Gallium-68 and of the Porphyrin Conjugate as PET/PDT Theranostic Agent. Chemistry. 2020 Jun 18;26(34):7602-7608.

114. Ramogida CF, Orvig C. Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy. Chem Commun (Camb). 2013 May 25;49(42):4720-39.

115. Zeng D, Zeglis BM, Lewis JS, Anderson CJ. The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. J Nucl Med. 2013 Jun;54(6):829-32.

116. Bartholomä MD. Recent developments in the design of bifunctional chelators for metal-based radiopharmaceuticals used in Positron Emission Tomography. Inorganica Chimica Acta. Elsevier BV; 2012 Jul;389:36–51.

117. Nayak TK, Garmestani K, Baidoo KE, Milenic DE, Brechbiel MW. PET imaging of tumor angiogenesis in mice with VEGF-A-targeted (86)Y-CHX-A″-DTPA-bevacizumab. Int J Cancer. 2011 Feb 15;128(4):920-6.

118. Rösch F, Baum RP. Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: on the way to THERANOSTICS. Dalton Trans. 2011 Jun 21;40(23):6104-11.

119. Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. J Cell Physiol. 2010 Jan;222(1):38-41.

120. https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html Utoljára megtekintve: 2020.03.14.

121. Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. Dermatol Ther (Heidelb). 2017 Jan;7(Suppl 1):5-19.

122. Grant-Kels JM. Melanoma and pigmented lesions, part 1. Clinics in Dermatology. Elsevier BV; 2009 Jan;27(1):1–2.

123. Ranieri JM, Wagner JD, Wenck S, Johnson CS, Coleman JJ. The Prognostic Importance of Sentinel Lymph Node Biopsy in Thin Melanoma. Annals of Surgical Oncology. Springer Science and Business Media LLC; 2006 May 22;13(7):927–32.

124. Janczak M. The role of radiopharmaceuticals in diagnosis of melanoma malignum. Nucl Med Rev Cent East Eur. 2009;12(2):83-8.

125. Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. J Med Life. 2014 Oct-Dec;7(4):572-6.

126. McIvor J, Siew T, Campbell A, McCarthy M. FDG PET in early stage cutaneous malignant melanoma. J Med Imaging Radiat Oncol. 2014 Apr;58(2):149-54; quiz 266.

127. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. Nat Rev Clin Oncol. 2017 Aug;14(8):463-482.

128. Jiang L, Tu Y, Shi H, Cheng Z. PET probes beyond (18)F-FDG. J Biomed Res. 2014 Nov;28(6):435-46.

129. Acland KM, Healy C, Calonje E, O'Doherty M, Nunan T, Page C, et al. Comparison of Positron Emission Tomography Scanning and Sentinel Node Biopsy in the Detection of Micrometastases of Primary Cutaneous Malignant Melanoma. Journal of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology (ASCO); 2001 May 15;19(10):2674–8.

130. Fletcher JW, Djulbegovic B, Soares HP, Siegel BA, Lowe VJ, Lyman GH, et al. Recommendations on the Use of 18F-FDG PET in Oncology. Journal of Nuclear Medicine. Society of Nuclear Medicine; 2008 Feb 20;49(3):480–508.

131. Lin NU, Lee EQ, Aoyama H, Barani IJ, Barboriak DP, Baumert BG, et al. Response assessment criteria for brain metastases: proposal from the RANO group. The Lancet Oncology. Elsevier BV; 2015 Jun;16(6):e270–e278.

132. Ghasemi M, Nabipour I, Omrani A, Alipour Z, Assadi M. Precision medicine and molecular imaging: new targeted approaches toward cancer therapeutic and diagnosis. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2016 Nov 30;6(6):310-327.

133. d'Ischia M, Wakamatsu K, Cicoira F, Di Mauro E, Garcia-Borron JC, Commo S, Galván I, Ghanem G, Kenzo K, Meredith P, Pezzella A, Santato C, Sarna T, Simon JD, Zecca L, Zucca FA, Napolitano A, Ito S. Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. Pigment Cell Melanoma Res. 2015 Sep;28(5):520-44.

134. Dadachova E, Casadevall A. Melanin as a potential target for radionuclide therapy of metastatic melanoma. Future Oncol. 2005 Aug;1(4):541-9.

135. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. Lancet. 2005 Feb 19-25;365(9460):687-701.

136. Larsson BS. Interaction between chemicals and melanin. Pigment Cell Res. 1993 Jun;6(3):127-33.

137. Ings RM. The melanin binding of drugs and its implications. Drug Metab Rev. 1984;15(5-6):1183-212.

138. Michelot JM, Moreau MF, Labarre PG, Madelmont JC, Veyre AJ, Papon JM, Parry DF, Bonafous JF, Boire JY, Desplanches GG, et al. Synthesis and evaluation of new iodine-125 radiopharmaceuticals as potential tracers for malignant melanoma. J Nucl Med. 1991 Aug;32(8):1573-80.

139. Sillaire-Houtmann I, Bonafous J, Veyre A, Mestas D, D'Incan M, Moins N, Kemeny JL, Chossat F, Bacin F. Etude clinique en phase 2 de la BZA2 (123IN-(2-diéthylaminoéthyl)-2-iodobenzamide) dans le diagnostic du mélanome malin oculaire et de ses métastases [Phase 2 clinical study of 123I-N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide in the diagnostic of primary and metastatic ocular melanoma]. J Fr Ophtalmol. 2004 Jan;27(1):34-9.

140. Moins N, D'Incan M, Bonafous J, Bacin F, Labarre P, Moreau MF, Mestas D, Noirault E, Chossat F, Berthommier E, Papon J, Bayle M, Souteyrand P, Madelmont JC, Veyre A. 123I-N-(2-diethylaminoethyl)-2-iodobenzamide: a potential imaging agent for cutaneous melanoma staging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2002 Nov;29(11):1478-84.

141. Dittmann H, Coenen HH, Zölzer F, Dutschka K, Brandau W, Streffer C. In vitro studies on the cellular uptake of melanoma imaging aminoalkyl-iodobenzamide derivatives (ABA). Nucl Med Biol. 1999 Jan;26(1):51-6.

142. Larisch R, Schulte KW, Vosberg H, Ruzicka T, Müller-Gärtner HW. Differential accumulation of iodine-123-iodobenzamide in melanotic and amelanotic melanoma metastases in vivo. J Nucl Med. 1998 Jun;39(6):996-1001.

143. Labarre P, Papon J, Moreau MF, Moins N, Veyre A, Madelmont JC. Evaluation in mice of some iodinated melanoma imaging agents using cryosectioning and multi-wire proportional counting. Eur J Nucl Med. 1999 May;26(5):494-8.

144. Cachin F, Miot-Noirault E, Gillet B, Isnardi V, Labeille B, Payoux P, Meyer N, Cammilleri S, Gaudy C, Razzouk-Cadet M, Lacour JP, Granel-Brocard F, Tychyj C, Benbouzid F, Grange JD, Baulieu F, Kelly A, Merlin C, Mestas D, Gachon F, Chezal JM, Degoul F, D'Incan M. (123)I-BZA2 as a melanin-targeted radiotracer for the identification of melanoma metastases: results and perspectives of a multicenter phase III clinical trial. J Nucl Med. 2014 Jan;55(1):15-22..

145. Liu X, Pham TQ, Berghofer P, Chapman J, Greguric I, Mitchell P, Mattner F, Loc'h C, Katsifis A. Synthesis and evaluation of novel radioiodinated nicotinamides for malignant melanoma. Nucl Med Biol. 2008 Oct;35(7):769-81.

146. Bonnet-Duquennoy M, Papon J, Mishellany F, Labarre P, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Gardette M, Maublant J, Penault-Llorca F, Miot-Noirault E, Cayre A, Madelmont JC, Chezal JM, Moins N. Targeted radionuclide therapy of melanoma: anti-tumoural efficacy studies of a new 131I labelled potential agent. Int J Cancer. 2009 Aug 1;125(3):708-16.

147. Degoul F, Borel M, Jacquemot N, Besse S, Communal Y, Mishellany F, Papon J, Penault-Llorca F, Donnarieix D, Doly M, Maigne L, Miot-Noirault E, Cayre A, Cluzel J, Moins N, Chezal JM, Bonnet M. In vivo efficacy of melanoma internal radionuclide therapy

with a 131I-labelled melanin-targeting heteroarylcarboxamide molecule. Int J Cancer. 2013 Sep 1;133(5):1042-53.

148. Garg PK, Nazih R, Wu Y, Singh R, Garg S. 4-^{11}C-Methoxy *N*-(2-Diethylaminoethyl) Benzamide: A Novel Probe to Selectively Target Melanoma. J Nucl Med. 2017 May;58(5):827-832.

149. Ren G, Miao Z, Liu H, Jiang L, Limpa-Amara N, Mahmood A, Gambhir SS, Cheng Z. Melanin-targeted preclinical PET imaging of melanoma metastasis. J Nucl Med. 2009 Oct;50(10):1692-9.

150. Wu SY, Huang SP, Lo YC, Liu RS, Wang SJ, Lin WJ, Shen CC, Wang HE. Synthesis and preclinical characterization of [18F]FPBZA: a novel PET probe for melanoma. Biomed Res Int. 2014;2014:912498.

151. Chang CC, Chang CH, Lo YH, Lin MH, Shen CC, Liu RS, Wang HE, Chen CL. Preparation and characterization of a novel Al(18)F-NOTA-BZA conjugate for melanin-targeted imaging of malignant melanoma. Bioorg Med Chem Lett. 2016 Aug 15;26(16):4133-9.

152. Sun X, Li Y, Liu T, Li Z, Zhang X, Chen X. Peptide-based imaging agents for cancer detection. Adv Drug Deliv Rev. 2017 Feb;110-111:38-51.

153. Singh M, Mukhopadhyay K. Alpha-melanocyte stimulating hormone: an emerging anti-inflammatory antimicrobial peptide. Biomed Res Int. 2014;2014:874610.

154. Garg PK, Alston KL, Welsh PC, Zalutsky MR. Enhanced binding and inertness to dehalogenation of alpha-melanotropic peptides labeled using N-succinimidyl 3-iodobenzoate. Bioconjug Chem. 1996 Mar-Apr;7(2):233-9.

155. Cowell SM, Balse-Srinivasan PM, Ahn JM, Hruby VJ. Design and synthesis of peptide antagonists and inverse agonists for G protein-coupled receptors. Methods Enzymol. 2002;343:49-72.

156. Cai W, Chen X. Multimodality molecular imaging of tumor angiogenesis. J Nucl Med. 2008 Jun;49 Suppl 2:113S-28S.

157. Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? Circulation. 2005 Mar 29;111(12):1556-66.

158. Thakur C. Angiogenesis in Brain Tumors. Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors, 2018 p:27–47. ISBN: 978-0-12-812218-1.

159. Vermeulen AH, Keltjens HM, van't Hof MA, Kayser AF. Ten-year evaluation of removable partial dentures: survival rates based on retreatment, not wearing and replacement. J Prosthet Dent. 1996 Sep;76(3):267-72.

160. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.

161. Higuchi T, Bengel FM, Seidl S, Watzlowik P, Kessler H, Hegenloh R, Reder S, Nekolla SG, Wester HJ, Schwaiger M. Assessment of alphavbeta3 integrin expression after myocardial infarction by positron emission tomography. Cardiovasc Res. 2008 May 1;78(2):395-403.

162. Wu C, Li F, Niu G, Chen X. PET imaging of inflammation biomarkers. Theranostics. 2013 Jun 24;3(7):448-66.

163. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.

164. Ishigami SI, Arii S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. Br J Cancer. 1998 Nov;78(10):1379-84.

165. Angiogenesis Foundation. Historical highlights of the angiogenesis field. http://www.angio.org/understanding/highlight.php. Utoljára megtekintve: 2020.03.15

166. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. Nat Rev Cancer. 2008 Jun;8(6):473-80.

167. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev. 1997 Feb;18(1):4-25.

168. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. J Cell Sci. 2001 Mar;114(Pt 5):853-65.

169. Török S, Döme B. A tumorindukált angiogenezis gátlásának lehetõségei: eredmények multi-target tirozinkináz-gátlókkal [Possibilities for inhibiting tumor-induced angiogenesis: results with multi-target tyrosine kinase inhibitors]. Magy Onkol. 2012 Mar;56(1):3-15. Hungarian. Epub 2012 Jan 3.

170. Rigau V, Morin M, Rousset MC, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, Picot MC, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Crespel A, Lerner-Natoli M. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. Brain. 2007 Jul;130(Pt 7):1942-56.

171. Udo H, Yoshida Y, Kino T, Ohnuki K, Mizunoya W, Mukuda T, Sugiyama H. Enhanced adult neurogenesis and angiogenesis and altered affective behaviors in mice overexpressing vascular endothelial growth factor 120. J Neurosci. 2008 Dec 31;28(53):14522-36.

172. Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. Nat Genet. 2004 Aug;36(8):827-35.

173. Elemery M, Kiss S, Gonda X, Dome P, Lazary J. Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) mint potenciális biomarker major depresszióval összefüggésben [Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a potential biomarker in major depressive disorder]. Neuropsychopharmacol Hung. 2017 Dec;19(4):183-188. Hungarian.

174. Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M, Vesin A, Ezponda T, Zudaire I, Torre W, Lozano MD, Brambilla E, Brambilla C, Wistuba II, Behrens C, Timsit JF, Pio R, Field JK, Montuenga LM. Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. J Clin Oncol. 2012 Apr 1;30(10):1129-36.

175. Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. Cancer Res. 2012 Apr 15;72(8):1909-14.

176. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. J Cell Sci. 2006 Oct 1;119(Pt 19):3901-3.

177. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002;110:673–687.

178. Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. Curr Med Chem. 2007;14(6):639-47.

179. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J Cell Mol Med. 2005 Apr-Jun;9(2):267-85.

180. van Hensbergen Y, Broxterman HJ, Rana S, van Diest PJ, Duyndam MC, Hoekman K, Pinedo HM, Boven E. Reduced growth, increased vascular area, and reduced response to cisplatin in CD13-overexpressing human ovarian cancer xenografts. Clin Cancer Res. 2004 Feb 1;10(3):1180-91.

181. Chen K, Ma W, Li G, Wang J, Yang W, Yap LP, Hughes LD, Park R, Conti PS. Synthesis and evaluation of 64Cu-labeled monomeric and dimeric NGR peptides for MicroPET imaging of CD13 receptor expression. Mol Pharm. 2013 Jan 7;10(1):417-27.

182. Guzman-Rojas L, Rangel R, Salameh A, Edwards JK, Dondossola E, Kim YG, Saghatelian A, Giordano RJ, Kolonin MG, Staquicini FI, Koivunen E, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 31;109(5):1637-42.

183. Corti A, Curnis F, Arap W, Pasqualini R. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. Blood. 2008 Oct 1;112(7):2628-35.

184. Buehler A, van Zandvoort MA, Stelt BJ, Hackeng TM, Schrans-Stassen BH, Bennaghmouch A, Hofstra L, Cleutjens JP, Duijvestijn A, Smeets MB, de Kleijn DP, Post MJ, de Muinck ED. cNGR: a novel homing sequence for CD13/APN targeted molecular imaging of murine cardiac angiogenesis in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Dec;26(12):2681-7.

185. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. Trends Mol Med. 2002;8(4 Suppl):S62-7.

186. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. Oncologist. 2004;9 Suppl 5:4-9.

187. Lee ST, Scott AM. Hypoxia positron emission tomography imaging with 18f-fluoromisonidazole. Semin Nucl Med. 2007 Nov;37(6):451-61.

188. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. Int J Biochem Cell Biol. 2001 Oct;33(10):960-70.

189. Berndorff D, Borkowski S, Moosmayer D, Viti F, Müller-Tiemann B, Sieger S, Friebe M, Hilger CS, Zardi L, Neri D, Dinkelborg LM. Imaging of tumor angiogenesis using 99mTc-labeled human recombinant anti-ED-B fibronectin antibody fragments. J Nucl Med. 2006 Oct;47(10):1707-16.

190. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol. 2005 Feb 10;23(5):1011-27.

191. Luo H, England CG, Graves SA, Sun H, Liu G, Nickles RJ, Cai W. PET Imaging of VEGFR-2 Expression in Lung Cancer with 64Cu-Labeled Ramucirumab. J Nucl Med. 2016 Feb;57(2):285-90.

192. Hu K, Shang J, Xie L, Hanyu M, Zhang Y, Yang Z, Xu H, Wang L, Zhang MR. PET Imaging of VEGFR with a Novel ^{64}Cu-Labeled Peptide. ACS Omega. 2020 Apr 8;5(15):8508-8514.

193. Ishii K, Usui S, Sugimura Y, Yoshida S, Hioki T, Tatematsu M, Yamamoto H, Hirano K. Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. Int J Cancer. 2001 Apr 1;92(1):49-54.

194. Enyedi KN, Czajlik A, Knapp K, Láng A, Majer Z, Lajkó E, Kőhidai L, Perczel A, Mező G. Development of cyclic NGR peptides with thioether linkage: structure and dynamics determining deamidation and bioactivity. J Med Chem. 2015 Feb 26;58(4):1806-17.

195. Sun X, Yan Y, Liu S, Cao Q, Yang M, Neamati N, Shen B, Niu G, Chen X. 18F-FPPRGD2 and 18F-FDG PET of response to Abraxane therapy. J Nucl Med. 2011 Jan;52(1):140-6.

196. Strauss LG, Koczan D, Klippel S, Pan L, Cheng C, Willis S, Haberkorn U, Dimitrakopoulou-Strauss A. Impact of angiogenesis-related gene expression on the tracer kinetics of 18F-FDG in colorectal tumors. J Nucl Med. 2008 Aug;49(8):1238-44.

197. Groves AM, Shastry M, Rodriguez-Justo M, Malhotra A, Endozo R, Davidson T, Kelleher T, Miles KA, Ell PJ, Keshtgar MR. ^{18}F-FDG PET and biomarkers for tumour angiogenesis in early breast cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011 Jan;38(1):46-52.

198. Kadambi A, Mouta Carreira C, Yun CO, Padera TP, Dolmans DE, Carmeliet P, Fukumura D, Jain RK. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A. Cancer Res. 2001 Mar 15;61(6):2404-8.

199. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? Nat Rev Cancer. 2008 Dec;8(12):942-56.

200. Li S, Peck-Radosavljevic M, Koller E, Koller F, Kaserer K, Kreil A, Kapiotis S, Hamwi A, Weich HA, Valent P, Angelberger P, Dudczak R, Virgolini I. Characterization of (123)I-vascular endothelial growth factor-binding sites expressed on human tumour cells: possible implication for tumour scintigraphy. Int J Cancer. 2001 Mar 15;91(6):789-96.

201. Yoshimoto M, Kinuya S, Kawashima A, Nishii R, Yokoyama K, Kawai K. Radioiodinated VEGF to image tumor angiogenesis in a LS180 tumor xenograft model. Nucl Med Biol. 2006 Nov;33(8):963-9.

202. Blankenberg FG, Backer MV, Levashova Z, Patel V, Backer JM. In vivo tumor angiogenesis imaging with site-specific labeled (99m)Tc-HYNIC-VEGF. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006 Jul;33(7):841-8.

203. Cai W, Chen K, Mohamedali KA, Cao Q, Gambhir SS, Rosenblum MG, Chen X. PET of vascular endothelial growth factor receptor expression. J Nucl Med. 2006 Dec;47(12):2048-56.

204. Wang H, Cai W, Chen K, Li ZB, Kashefi A, He L, Chen X. A new PET tracer specific for vascular endothelial growth factor receptor 2. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007 Dec;34(12):2001-10.

205. Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, Mulder NH, de Jong JR, Hollema H, Brouwers AH, van Dongen GA, Perk LR, Lub-de Hooge MN. In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. J Nucl Med. 2007 Aug;48(8):1313-9.

206. Oosting SF, Brouwers AH, van Es SC, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Lub-de Hooge MN, Hollema H, de Jong JR, de Jong IJ, de Haas S, Scherer SJ, Sluiter WJ, Dierckx

RA, Bongaerts AH, Gietema JA, de Vries EG. 89Zr-bevacizumab PET visualizes heterogeneous tracer accumulation in tumor lesions of renal cell carcinoma patients and differential effects of antiangiogenic treatment. J Nucl Med. 2015 Jan;56(1):63-9.

207. Cai W, Sam Gambhir S, Chen X. Multimodality tumor imaging targeting integrin alphavbeta3. Biotechniques. 2005 Dec;39(6 Suppl):S14-25.

208. Beer AJ, Haubner R, Sarbia M, Goebel M, Luderschmidt S, Grosu AL, Schnell O, Niemeyer M, Kessler H, Wester HJ, Weber WA, Schwaiger M. Positron emission tomography using [18F]Galacto-RGD identifies the level of integrin alpha(v)beta3 expression in man. Clin Cancer Res. 2006 Jul 1;12(13):3942-9.

209. Decristoforo C, Hernandez Gonzalez I, Carlsen J, Rupprich M, Huisman M, Virgolini I, Wester HJ, Haubner R. 68Ga- and 111In-labelled DOTA-RGD peptides for imaging of alphavbeta3 integrin expression. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008 Aug;35(8):1507-15.

210. Li D, Zhao X, Zhang L, Li F, Ji N, Gao Z, Wang J, Kang P, Liu Z, Shi J, Chen X, Zhu Z. (68)Ga-PRGD2 PET/CT in the evaluation of Glioma: a prospective study. Mol Pharm. 2014 Nov 3;11(11):3923-9.

211. Chen X, Park R, Tohme M, Shahinian AH, Bading JR, Conti PS. MicroPET and autoradiographic imaging of breast cancer alpha v-integrin expression using 18F- and 64Cu-labeled RGD peptide. Bioconjug Chem. 2004 Jan-Feb;15(1):41-9.

212. Tarli L, Balza E, Viti F, Borsi L, Castellani P, Berndorff D, Dinkelborg L, Neri D, Zardi L. A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. Blood. 1999 Jul 1;94(1):192-8.

213. Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, Leprini A, Borsi L, Castellani P, Zardi L, Neri D, Riva P. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):571-9.

214. Furumoto S, Takashima K, Kubota K, Ido T, Iwata R, Fukuda H. Tumor detection using 18F-labeled matrix metalloproteinase-2 inhibitor. Nucl Med Biol. 2003 Feb;30(2):119-25.

215. Liu Q, Pan D, Cheng C, Zhang A, Ma C, Wang L, Zhang D, Liu H, Jiang H, Wang T, Xu Y, Yang R, Chen F, Yang M, Zuo C. Targeting of MMP2 activity in malignant tumors with a 68Ga-labeled gelatinase inhibitor cyclic peptide. Nucl Med Biol. 2015 Dec;42(12):939-44.

216. Lee ST, Scott AM. Hypoxia positron emission tomography imaging with 18f-fluoromisonidazole. Semin Nucl Med. 2007 Nov;37(6):451-61.

217. Ueda S, Saeki T, Osaki A, Yamane T, Kuji I. Bevacizumab Induces Acute Hypoxia and Cancer Progression in Patients with Refractory Breast Cancer: Multimodal Functional Imaging and Multiplex Cytokine Analysis. Clin Cancer Res. 2017 Oct 1;23(19):5769-5778.

218. Opalinska M, Hubalewska-Dydejczyk A, Sowa-Staszczak A. Radiolabeled peptides: current and new perspectives. Q J Nucl Med Mol Imaging. 2017 Jun;61(2):153-167.

219. Schottelius M, Wester HJ. Molecular imaging targeting peptide receptors. Methods. 2009 Jun;48(2):161-77.

220. Summer D, Rangger C, Klingler M, Laverman P, Franssen GM, Lechner BE, Orasch T, Haas H, von Guggenberg E, Decristoforo C. Exploiting the Concept of Multivalency with ^{68}Ga- and ^{89}Zr-Labelled Fusarinine C-Minigastrin Bioconjugates for Targeting CCK2R Expression. Contrast Media Mol Imaging. 2018 Apr 10;2018:3171794.

221. Dijkgraaf I, Yim CB, Franssen GM, Schuit RC, Luurtsema G, Liu S, Oyen WJ, Boerman OC. PET imaging of αvβ3 integrin expression in tumours with ^{68}Ga-labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011 Jan;38(1):128-37.

222. Liu S. Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin alpha(v)beta(3)-targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. Bioconjug Chem. 2009 Dec;20(12):2199-213.

223. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002 Sep 20;110(6):673-87. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00971-6. PMID: 12297042.

224. Judmann B, Braun D, Wängler B, Schirrmacher R, Fricker G, Wängler C. Current State of Radiolabeled Heterobivalent Peptidic Ligands in Tumor Imaging and Therapy. Pharmaceuticals (Basel). 2020 Jul 30;13(8):173.

225. Liu Z, Niu G, Shi J, Liu S, Wang F, Liu S, Chen X. (68)Ga-labeled cyclic RGD dimers with Gly3 and PEG4 linkers: promising agents for tumor integrin alphavbeta3 PET imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2009 Jun;36(6):947-57.

226. Liu Z, Liu S, Wang F, Liu S, Chen X. Noninvasive imaging of tumor integrin expression using (18)F-labeled RGD dimer peptide with PEG (4) linkers. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2009 Aug;36(8):1296-307.

227. Lindner S, Michler C, Wängler B, Bartenstein P, Fischer G, Schirrmacher R, Wängler C. PESIN multimerization improves receptor avidities and in vivo tumor targeting properties to GRPR-overexpressing tumors. Bioconjug Chem. 2014 Mar 19;25(3):489-500.

228. Yim CB, van der Wildt B, Dijkgraaf I, Joosten L, Eek A, Versluis C, Rijkers DT, Boerman OC, Liskamp RM. Spacer effects on in vivo properties of DOTA-conjugated dimeric [Tyr3]octreotate peptides synthesized by a "Cu(I)-click" and "sulfo-click" ligation method. Chembiochem. 2011 Mar 21;12(5):750-60.

229. Vagner J, Handl HL, Gillies RJ, Hruby VJ. Novel targeting strategy based on multimeric ligands for drug delivery and molecular imaging: homooligomers of alpha-MSH. Bioorg Med Chem Lett. 2004 Jan 5;14(1):211-5.

230. Valant C, Robert Lane J, Sexton PM, Christopoulos A. The best of both worlds? Bitopic orthosteric/allosteric ligands of g protein-coupled receptors. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012;52:153-78.

231. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. London, UK: Universities Federation for Animal Welfare; 1959.

232. Three Rs Microsite. Canadian Council on Animal Care Ottawa: Canadian Council on Animal Care launched 2008.

233. Máté G, Kertész I, Enyedi KN, 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 (68)Ga-NOTA-c(NGR). Eur J Pharm Sci. 2015 Mar 10;69:61-71.

234. Kis A, Dénes N, Szabó JP, Arató V, Jószai I, Enyedi KN, Lakatos S, Garai I, Mező G, Kertész I, Trencsényi G. In vivo assessment of aminopeptidase N (APN/CD13) specificity of different ^{68}Ga-labelled NGR derivatives using PET/MRI imaging. Int J Pharm. 2020 Nov 15;589:119881.

235. Wu SY, Huang SP, Lo YC, Liu RS, Wang SJ, Lin WJ, Shen CC, Wang HE. Synthesis and preclinical characterization of [18F]FPBZA: a novel PET probe for melanoma. Biomed Res Int. 2014;2014:912498.

236. Smith DL, Breeman WA, Sims-Mourtada J. The untapped potential of Gallium 68-PET: the next wave of ^{68}Ga-agents. Appl Radiat Isot. 2013 Jun;76:14-23..

237. Velikyan I. Prospective of ^{68}Ga-radiopharmaceutical development. Theranostics. 2013 Dec 10;4(1):47-80.

238. Kertész I, Vida A, Nagy G, Emri M, Farkas A, Kis A, Angyal J, Dénes N, Szabó JP, Kovács T, Bai P, Trencsényi G. *In Vivo* Imaging of Experimental Melanoma Tumors using the Novel Radiotracer ^{68}Ga-NODAGA-Procainamide (PCA). J Cancer. 2017 Feb 25;8(5):774-785.

239. Kim HJ, Kim DY, Park JH, Yang SD, Hur MG, Min JJ, Yu KH. Synthesis and characterization of a (68)Ga-labeled N-(2-diethylaminoethyl)benzamide derivative as potential PET probe for malignant melanoma. Bioorg Med Chem. 2012 Aug 15;20(16):4915-20.

240. Kim HJ, Kim DY, Park JH, Yang SD, Hur MG, Min JJ, Yu KH. Synthesis and evaluation of a novel 68Ga-labeled DOTA-benzamide derivative for malignant melanoma imaging. Bioorg Med Chem Lett. 2012 Aug 15;22(16):5288-92.

241. Ren G, Miao Z, Liu H, Jiang L, Limpa-Amara N, Mahmood A, Gambhir SS, Cheng Z. Melanin-targeted preclinical PET imaging of melanoma metastasis. J Nucl Med. 2009 Oct;50(10):1692-9.

242. Garg S, Kothari K, Thopate SR, Doke AK, Garg PK. Design, synthesis, and preliminary in vitro and in vivo evaluation of N-(2-diethylaminoethyl)-4-[18F]fluorobenzamide ([18F]-DAFBA): a novel potential PET probe to image melanoma tumors. Bioconjug Chem. 2009 Mar 18;20(3):583-90.

243. Moins N, Papon J, Seguin H, Gardette D, Moreau MF, Labarre P, Bayle M, Michelot J, Gramain JC, Madelmont JC, Veyre A. Synthesis, characterization and comparative biodistribution study of a new series of p-iodine-125 benzamides as potential melanoma imaging agents. Nucl Med Biol. 2001 Oct;28(7):799-808.

244. Wolf M, Bauder-Wüst U, Mohammed A, Schönsiegel F, Mier W, Haberkorn U, Eisenhut M. Alkylating benzamides with melanoma cytotoxicity. Melanoma Res. 2004 Oct;14(5):353-60.

245. McIvor J, Siew T, Campbell A, McCarthy M. FDG PET in early stage cutaneous malignant melanoma. J Med Imaging Radiat Oncol. 2014 Apr;58(2):149-54; quiz 266.

246. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. Nat Rev Cancer. 2002 Sep;2(9):683-93.

247. Beadsmoore C, Newman D, MacIver D, Pawaroo D. Positron Emission Tomography Computed Tomography: A Guide for the General Radiologist. Can Assoc Radiol J. 2015 Nov;66(4):332-47.

248. Hess S, Hansson SH, Pedersen KT, Basu S, Høilund-Carlsen PF. FDG-PET/CT in Infectious and Inflammatory Diseases. PET Clin. 2014 Oct;9(4):497-519, vi-vii.

249. Griffin SJ, Houston JB. Prediction of in vitro intrinsic clearance from hepatocytes: comparison of suspensions and monolayer cultures. Drug Metab Dispos. 2005 Jan;33(1):115-20.

250. Mueller HL, Guilmette RA, Muggenburg BA. Uptake of inert particles by dog alveolar macrophages in vitro--a comparison of monolayer and suspension techniques. J Appl Toxicol. 1989 Jun;9(3):135-43.

251. Wolf M, Bauder-Wüst U, Haberkorn U, Mier W, Eisenhut M. Alkylating benzamides with melanoma cytotoxicity: role of melanin, tyrosinase, intracellular pH and DNA interaction. Melanoma Res. 2005 Oct;15(5):383-91.

252. Ren G, Miao Z, Liu H, Jiang L, Limpa-Amara N, Mahmood A, Gambhir SS, Cheng Z. Melanin-targeted preclinical PET imaging of melanoma metastasis. J Nucl Med. 2009 Oct;50(10):1692-9.

253. Bass LA, Wang M, Welch MJ, Anderson CJ. In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver. Bioconjug Chem. 2000 Jul-Aug;11(4):527-32.

254. Harrison A, Walker CA, Parker D, Jankowski KJ, Cox JP, Craig AS, Sansom JM, Beeley NR, Boyce RA, Chaplin L, et al. The in vivo release of 90Y from cyclic and acyclic ligand-antibody conjugates. Int J Rad Appl Instrum B. 1991;18(5):469-76.

255. Stimmel JB, Stockstill ME, Kull FC Jr. Yttrium-90 chelation properties of tetraazatetraacetic acid macrocycles, diethylenetriaminepentaacetic acid analogues, and a novel terpyridine acyclic chelator. Bioconjug Chem. 1995 Mar-Apr;6(2):219-25.

256. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. Vasc Health Risk Manag. 2006;2(3):213-9.

257. Curnis F, Longhi R, Crippa L, Cattaneo A, Dondossola E, Bachi A, Corti A. Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibronectin. J Biol Chem. 2006 Nov 24;281(47):36466-76.

258. Graziani G, Ruffini F, Tentori L, Scimeca M, Dorio AS, Atzori MG, Failla CM, Morea V, Bonanno E, D'Atri S, Lacal PM. Antitumor activity of a novel anti-vascular endothelial growth factor receptor-1 monoclonal antibody that does not interfere with ligand binding. Oncotarget. 2016 Nov 8;7(45):72868-72885.

259. Guzman-Rojas L, Rangel R, Salameh A, Edwards JK, Dondossola E, Kim YG, Saghatelian A, Giordano RJ, Kolonin MG, Staquicini FI, Koivunen E, Sidman RL, Arap W, Pasqualini R. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 31;109(5):1637-42.

260. Satpati D, Sharma R, Kumar C, Sarma HD, Dash A. 68Ga-Chelation and comparative evaluation of *N*,*N*'-bis-[2-hydroxy-5-(carboxyethyl)benzyl]ethylenediamine-*N*,*N*'-diacetic acid (HBED-CC) conjugated NGR and RGD peptides as tumor targeted molecular imaging probes. Medchemcomm. 2017 Feb 16;8(3):673-679.

261. Jia X, Han Q, Wang Z, Qian Y, Jia Y, Wang W, Hu Z. Targeting peptide functionalized liposomes towards aminopeptidase N for precise tumor diagnosis and therapy. Biomater Sci. 2017 Feb 28;5(3):417-421.

10.2 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/418/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dénes Noémi
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057296

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dénes, N.**, Kis, A., Péli-Szabó, J., Jószai, I., Hajdu, I., Arató, V. Z., Enyedi, K. N., Mező, G., Hunyadi, J., Trencsényi, G., Kertész, I.: In vivo preclinical assessment of novel 68Ga-labelled peptides for imaging of tumor associated angiogenesis using positron emission tomography imaging.
Appl. Radiat. Isot. 174, 1-10, 2021.
IF: 1.513 (2020)

2. Trencsényi, G., **Dénes, N.**, Nagy, G., Kis, A., Vida, A., Farkas, F., Péli-Szabó, J., Kovács, T., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hunyadi, J., Kertész, I.: Comparative preclinical evaluation of 68Ga-NODAGA and 68Ga-HBED-CC conjugated procainamide in melanoma imaging.
J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 139, 54-64, 2017.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.049
IF: 2.831

3. Kertész, I., Vida, A., Nagy, G., Emri, M., Farkas, A., Kis, A., Angyal, J., **Dénes, N.**, Péli-Szabó, J., Kovács, T., Bai, P., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Experimental Melanoma Tumors Using The Novel Radiotracer 68Ga-NODAGA-Procainamide (PCA).
J. Cancer. 8 (5), 774-785, 2017.
DOI: http://dx.doi.org/10.7150/jca.17550
IF: 3.249

További közlemények

4. Kis, A., **Dénes, N.**, Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Beke, L., Matolay, O., Enyedi, K. N., Méhes, G., Mező, G., Bai, P., Kertész, I., Trencsényi, G.: In Vivo Molecular Imaging of the Efficacy of Aminopeptidase N (APN/CD13) Receptor Inhibitor Treatment on Experimental Tumors Using 68Ga-NODAGA-c(NGR) Peptide.
BioMed Res. Inter. 2021, 1-11, 2021.
IF: 3.411 (2020)

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

5. Kis, A., **Dénes, N.**, Péli-Szabó, J., Arató, V. Z., Jószai, I., Enyedi, K. N., Rácz, S., Garai, I., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo assessment of aminopeptidase N (APN/CD13) specificity of different 68 Ga-labelled NGR derivatives using PET/MRI imaging.
Int. J. Pharm. 589, 1-11, 2020.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119881
IF: 5.875

6. Kis, A., Péli-Szabó, J., **Dénes, N.**, Vágner, A., Nagy, G., Garai, I., Fekete, A., Szikra, D. P., Hajdu, I., Matolay, O., Méhes, G., Mező, G., Kertész, I., Trencsényi, G.: In vivo Imaging of Hypoxia and Neoangiogenesis in Experimental Syngeneic Hepatocellular Carcinoma Tumor Model Using Positron Emission Tomography.
Biomed Res. Int. 2020, 1-10, 2020.
DOI: http://dx.doi.org/10.1155/2020/4952372
IF: 3.411

7. Nagy, G., **Dénes, N.**, Kis, A., Péli-Szabó, J., Berényi, E., Garai, I., Bai, P., Hajdu, I., Szikra, D. P., Trencsényi, G.: Preclinical evaluation of melanocortin-1 receptor (MC1-R) specific 68 Ga- and 44 Sc-labeled DOTA-NAPamide in melanoma imaging.
Eur. J. Pharm. Sci. 106, 336-344, 2017.
DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.026
IF: 3.466

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,756
A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,593

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, 2021.08.26.

DEBRECENI EGYETEM * Egyetemi és Nemzeti Könyvtár *

11. Tárgyszavak

Pozitron emissziós tomográfia, radiojelölés, kismolekulák, peptid-származékok, melanoma malignum, angiogenezis, VEGFR-1, Aminopeptidáz N, heterodimer vegyület, PET radiofarmakon-fejlesztés

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Berényi Ervin jelenlegi, valamint Dr. Varga József korábbi intézetvezető uraknak és Dr. Trencsényi György jelenlegi tanszékvezető úrnak, hogy doktori értekezésem elkészítését lehetővé tették a Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszéken.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Hunyadi János témavezetőmnek, hogy a doktori éveim alatt hasznos tanácsokkal látott el, segítette munkámat és előre haladásomat.

Szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni Dr. Kertész István téma- és csoportvezetőm felé, ő ismertette és szerettette meg velem a radiokémia világát még egyetemi hallgató koromban, bátorított, bíztatott, tanított és motivált. Nélküle ez a tudományos munka nem valósulhatott volna meg.

Köszönöm a DE OKI Nukleáris Medicina Nem Önálló Tanszék minden munkatársának, valamint a közlemények társszerzőinek a folyamatos támogatást, segítségnyújtást és tanácsokat, amelyek ösztönzőleg hatottak rám. Szeretnék külön kiemelve köszönetet mondani Dr. Trencsényi György vezetésével a Radiobiológiai Kutatócsoport minden tagjának, hálás vagyok, hogy ilyen emberekkel dolgozhattam együtt.

Köszönöm a kooperációs partnereink munkáját a Scanomed Ltd. (PET/MRI vizsgálatok), DE Parodontológiai Tanszék (CBCT vizsgálatok) és MTA ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport (APRPG-NH_2 és APRPG-COOH szintézise) kollégáinak, hiszen munkájukkal és szakértelmükkel nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a tudományos munka létrejöttéhez.

Végül, de nem utolsó sorban szívem minden szeretetével köszönöm a férjem, a szüleim, a testvérem és csodálatos keresztlányom támogatását és szeretetét. Mellettem álltak ezen az úton is, bíztattak, támogattak és mindig tudták, hogy mivel is tudnak igazán segítséget nyújtani a céljaim elérése érdekében.

Munkám létrejöttéhez anyagi támogatást nyújtottak a következő pályázatok: Új Nemzeti Kiválóság Program – ÚNKP-18-3-I-DE-27, az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, a Richter Gedeon Nyrt. Centenáriumi Alapítvány – rövid kutatási támogatás és az Új Nemzeti Kiválóság Program – ÚNKP-19-3-I-DE-195.

13. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatait tartalmazza.