

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Radiojelölt ciklodextrin származékok
farmakokinetikai karakterizálása pozitron emissziós
tomográfia segítségével**

Csige Katalin

Témavezető: Dr. Hajdu István, PhD



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

Radiojelölt ciklodextrin származékok farmakokinetikai karakterizálása pozitron emissziós tomográfia segítségével

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Csige Katalin okleveles környezetkutató- vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Hajdu István, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Halmos Gábor Miklós, PhD
Dr. Sohajda Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Halmos Gábor Miklós, PhD
Dr. Sohajda Tamás, PhD
Prof. Dr. Bay Péter, MTA doktora
Dr. Besenyi Zsuzsanna, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet A épület tanterme
2024. 02.22-én 13:00 órakor

Tartalomjegyzék

1. A doktori értekezés előzményei és célitűzései	4
2. Anyagok és módszerek.....	6
3. Az értekezés új tudományos eredményei	12
5. Megbeszélés	19
6. Összefoglalás.....	25
7. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	26
8. Köszönetnyilvánítás	27

1. A doktori értekezés előzményei és célitűzései

Napjainkban a hasnyálmirigy rosszindulatú daganatos megbetegedések száma világszerte elképesztő ütemben emelkedik. Magyarországon a halálozást okozó daganatok körében az ötödik helyen áll, és a betegek 5 éves túlélési esélye 5% alatti. A legtöbb esetben a daganat felfedezésekor a betegség már előrehaladott állapotban van, és már az egy éves túlélési esélyek is nagyon alacsonyak. A hasnyálmirigyrákot néma gyilkosnak nevezik, mert a kezdeti megbetegedés tünetszegény, és a későbbi panaszok sem specifikusak. Emiatt egyre nagyobb az igény olyan érzékeny képalkotó és terápiás eljárások bevezetése iránt, amelyek segítségével a legkisebb morfológiai elváltozások és a korai áttétek is időben felismerhetők, hiszen ezzel a betegek élete megmenthető, vagy meghosszabbítható.

Rendkívüli érzékenysége és nagy felbontása miatt a pozitron emissziós tomográfia (PET) olyan nem invazív képalkotó módszer, amely alkalmas többek között a hasnyálmirigy adenokarcinóma kimutatására, stádiumának meghatározására, és a korai áttétek felismerésére. Ezzel párhuzamosan egyre nagyobb igény mutatkozik az olyan specifikus képalkotó kontrasztanyagok fejlesztésére is, amelyek alkalmazásával hatékonyan elkülöníthetők az egészséges szövetek, a beteg szövetektől. A ciklodextrinek olyan csonka kúp alakú semleges glükóz oligomerek, amelyek kiváló gyógyszerhordozó tulajdonságokkal rendelkeznek. Intenzív gyógyszeripari kutatások folynak olyan ciklodextrinek fejlesztésére, amelyek kiváló gyógyszerhordozók, önálló gyógyszerek, illetve adalékként javítják más készítmények biológiai hozzáférhetőségét, biohasznosulását, eltarthatóságát. A random metilezett β -ciklodextrin (RAMEB) nagy affinitással rendelkezik a humán eredetű rosszindulatú tumorokban, mint pl. hasnyálmirigy rákban túlexpresszálandó prosztaglandin-E2 és receptoraival történő komplex kialakítására, ezért radioaktívan jelölve ígéretes radiofarmakon lehet a hasnyálmirigy tumorok diagnosztikájában és terápiájában.

Az intenzív kutatások ellenére korlátozott információ áll rendelkezésre a ciklodextrinek farmakokinetikai tulajdonságáról és biológiai eloszlásáról. Ezen okok miatt kutatócsoportunk elkezdte vizsgálni a radioaktívan jelölt ciklodextrinek viselkedését az élő szervezetben PET képalkotó eljárás segítségével.

Napjainkban a hasnyálmirigy rosszindulatú daganatos megbetegedések száma világszerte elképesztő ütemben emelkedik. Magyarországon a halálozást okozó daganatok körében az ötödik helyen áll, és a betegek 5 éves túlélési esélye 5% alatti. A legtöbb esetben a daganat felfedezésekor a betegség már előrehaladott állapotban van, és már az egy éves túlélési esélyek is nagyon alacsonyak. A hasnyálmirigyrákot néma gyilkosnak nevezik, mert a kezdeti megbetegedés tünetszegény, és a későbbi panaszok sem specifikusak. Emiatt egyre nagyobb az igény olyan érzékeny képalkotó és terápiás eljárások bevezetése iránt, amelyek segítségével a legkisebb morfológiai elváltozások és a korai áttétek is időben felismerhetők, hiszen ezzel a betegek élete megmenthető, vagy meghosszabbítható.

Rendkívüli érzékenysége és nagy felbontása miatt a pozitron emissziós tomográfia (PET) olyan nem invazív képalkotó módszer, amely alkalmas többek között a hasnyálmirigy adenokarcinóma kimutatására, stádiumának meghatározására, és a korai áttétek felismerésére. Ezzel párhuzamosan egyre nagyobb igény mutatkozik az olyan specifikus képalkotó kontrasztanyagok fejlesztésére is, amelyek alkalmazásával hatékonyan elkülöníthetők az egészséges szövetek, a beteg szövetektől. A ciklodextrinek olyan csonka kúp alakú semleges glükóz oligomerek, amelyek kiváló gyógyszerhordozó tulajdonságokkal rendelkeznek. Intenzív gyógyszeripari kutatások folynak olyan ciklodextrinek fejlesztésére, amelyek kiváló gyógyszerhordozók, önálló gyógyszerek, illetve adalékként javítják más készítmények biológiai hozzáférhetőségét, biohasznosulását, eltarthatóságát. A random metilezett β -ciklodextrin (RAMEB) nagy affinitással rendelkezik a humán eredetű rosszindulatú tumorokban, mint pl. hasnyálmirigy rákban túlexpresszáldó prosztaglandin-E2 és receptoraival történő komplex kialakítására, ezért radioaktívan jelölve ígéretes radiofarmakon lehet a hasnyálmirigy tumorok diagnosztikájában és terápiájában.

Az intenzív kutatások ellenére korlátozott információ áll rendelkezésre a ciklodextrinek farmakokinetikai tulajdonságáról és biológiai eloszlásáról. Ezen okok miatt kutatócsoportunk elkezdte vizsgálni a radioaktívan jelölt ciklodextrinek viselkedését az élő szervezetben PET képalkotó eljárás segítségével.

A doktori tanulmányaim során folytatott kutatásaink célja, olyan radioaktívan jelzett ciklodextrin származékok - mint új radiofarmakonok - előállítás, amelyek új utat nyithatnak a PGE2 pozitív hasnyálmirigy daganatok *in vivo* képalkotásában, diagnosztikájában és terápiájában, tovább bővítve a ciklodextrinek alkalmazását. Ezen cél megvalósításához és a létrehozott radiofarmakonok széleskörű vizsgálatához az alábbi projektek megvalósításával kívántunk hozzájárulni:

Az első projekt során célunk volt a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radiojelölt ciklodextrin származék előállítás, karakterizálása, *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* farmakokinetikai és biodisztribúciós vizsgálata prosztaglandin E2 pozitív BxPC-3 tumor modellben, pozitron emissziós tomográfia alkalmazásával. Munkánk során random metilezett béta-ciklodextrin (RAMEB) származékot konjugáltuk NODAGA kelátorral, majd az előállított vegyületet gallium-68 izotóppal radiojelöltük. A minőség-ellenőrzés után a radiofarmakont *in vitro*, *ex vivo*, és *in vivo* körülmények között teszteltük. A PET vizsgálatok során egészséges, kontroll egereket, valamint PGE2 pozitív (BxPC-3), illetve PGE2 negatív (PancTu-1) tumoros sejtek felhasználásával indukált tumoros állatmodelleket alkalmaztunk.

A második projekt során célunk volt a komplexképző és a diagnosztikus radioizotóp lecserélése, ezáltal olyan RAMEB származék előállítás és vizsgálata, mely alkalmas lehet a PGE2 receptort túlexpresszáldó BxPC-3 hasnyálmirigy tumor radioterápiás kezelésére. A RAMEB származékot DOTAGA kelátorral konjugáltuk, majd gallium-68 illetve bizmut-205/206 izotópokkal jelöltük. A farmakonokat ezután az előző projekthez hasonlóan *in vitro*, *ex vivo*, és *in vivo* körülmények között

teszteltük. A biológiai vizsgálatok során egészséges kontroll, illetve BxPC-3 tumort hordozó állatmodelleket alkalmaztunk.

2. Anyagok és módszerek

Monoamino-RAMEB konjugálási reakciója NODAGA kelátorral

A NODAGA kelátort az NH₂-RAMEB aminocsoportján keresztül konjugáltuk - az alábbiak szerint: NH₂-RAMEB-et feloldottunk vízben, majd az oldatot 4 °C-ra hűtöttük és 15 percig kevertettük. A NODAGA-t DMSO-ban oldottuk, és az oldatot keverés közben a lehűtött NH₂-RAMEB oldathoz adtuk. A reakcióelegy pH-ját DIPEA cseppenként történő hozzáadásával 8,5-re állítottuk be. A reakcióelegyet 24 órán át szobahőmérsékleten kevertettük. A terméket liofilizáltuk, vízben újra feloldottuk és preparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk. A szintézis hozama 74% volt. A NODAGA-RAMEB tisztaságának meghatározására analitikai RP-HPLC -t használtunk. A kapott termék pontos molekulatömegét nagyfelbontású tömegspektrometriával (MS), a szerkezetét ¹H-NMR-rel igazoltuk.

Preparatív és analitikai RP-HPLC

A különböző kelátorral konjugált RAMEB származékok tisztítása KNAUER RP-HPLC rendszer segítségével történt, 150 mm x 10 mm preparatív Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlopon (részecskeméret: 10 µm) az áramlási sebesség 4 ml/perc volt a következő gradiens alkalmazása mellett: A eluens: 0 perc 90%, 2 perc 90%, 20 perc 40%, 30 perc 20%. Az eluens rendszert A eluens (0,1% TFA vízben) és B eluens (0,1% TFA; acetonitril /víz 95:5 (v/v%)) alkotta. A detektálást abszorbancia detektorral végeztük, 254 nm-en

A radioaktív izotóppal jelölt vegyületeink minőségellenőrzéséhez szintén KNAUER RP-HPLC rendszert használtunk, kiegészítve az UV detektor elé kapcsolt radiodetektorral, a továbbiakban együttesen alkalmazva őket. A detektálás 254 nm-en történt, analitikai Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlopon, melynek mérete 250 mm x 4,6 mm, a részecskemérete pedig 10 µm. Az áramlási sebességet 1ml/perc értékre változtattuk, a gradienst pedig így alkalmaztuk: A eluens: 0 perc 100%, 15 perc 10%, 17 perc 10%, 20 perc 100%. Az eluensek megegyeznek a tisztításnál alkalmazott eluensekkel.

Monoamino-RAMEB konjugálási reakciója DOTAGA kelátorral

A DOTAGA kelátort szintén az NH₂-RAMEB aminocsoportján keresztül konjugáltuk a következőképpen: az NH₂-RAMEB-et feloldottuk vízben, majd az oldatot 4 °C-ra hűtöttük és 15 percig kevertettük. DOTAGA-t adtuk a lehűtött NH₂-RAMEB oldathoz, majd a reakcióelegy pH-ját 8,5-re állítottuk DIPEA cseppenkénti hozzáadásával. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 24 órán át kevertettük. A terméket (DOTAGA-RAMEB) liofilizáltuk, majd vízben újra feloldottuk és preparatív RP-HPLC rendszeren tisztítottuk. A kész termék tisztaságát, analitikai RP-HPLC rendszerrel ellenőriztük. A kapott termék pontos molekulatömegét MS-sel igazoltuk. Az utolsó lépésben az

azonosított termékből (DOTAGA-RAMEB) ultratiszta vízzel 3 mM törzsoldatot készítettünk a radioaktív jelöléshez.

A $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor megfelelő elúciójának kidolgozása

A Ga izotóppal történő radiojelölés során Eckert & Ziegler típusú, $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátort használtunk, amelyet (5 ml) 0,1 M ultratiszta sósavval frakcionáltan eluáltunk. A jelölés során minden esetben 1 ml generátor eluátumból indultunk ki. Ahhoz, hogy megkapjuk a legaktívabb 1-1,2 ml-es frakciót, a generátor használatba vételét követően a legelső alkalommal frakcionált elúciót végeztünk a következő módon: A generátort 5 ml-es fecskendővel, 0,1 M ultratiszta sósavval eluáltuk, és 25 db (200 μl) frakciót vettünk 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe. A frakciók aktivitását dóziskalibrátorral mértük le. A méréseink alapján a 9. és 14. frakciók közötti térfogatban (1,2 ml) található a legaktívabb része az eluátumnak.

$^{205/206}\text{Bi}$ izotópok előállítás és tisztítása.

A $^{205/206}\text{Bi}$ izotóp keveréket az intézetünkben működő GE PETtrace ciklotronban állítottuk elő, ólom céltárgy besugárzásával. Az ólom céltárgyat a ciklotron szilárd target tartó egységébe helyeztük majd 10 μA nyalábárammal 60 percen keresztül sugaraztuk a Manna és munkatársai által 2020-ban leírtak szerint. A 60 perces besugárzást követően, 24 órát vártunk, hogy a rövid felezési idejű izotópok lebomoljanak, ezután a besugárzott céltárgyat ultratiszta HNO_3 -val feloldottuk, majd a tiszta oldatot lepipettáztuk a fel nem oldódott szilárd anyagról. Az oldatot ezt követően vízzel 10 ml-re hígítottuk és Millipore 0,22 μm -es szűrővel megszűrtük, hogy a fel nem oldódott szilárd részeket teljesen eltávolítsuk. Ezután a megszűrt oldatot 150 mg TK 200 gyantát tartalmazó extrakciós oszlopra vittük föl, mely megkötötte az általunk kívánt bizmut izotópokat. Az oszlopot ezután mostuk ultratiszta HNO_3 -mal a maradék Pb szennyezés eltávolítása érdekében, ezt követően a $^{205/206}\text{Bi}$ izotópokat HNO_3 -val eluáltuk. A tiszta eluátumot mely ~ 30 MBq aktivitású $^{205/206}\text{Bi}$ izotópot tartalmazott, szárazra pároltuk majd újra feloldottuk u.p. HCl-ban.

NODAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal

A $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátort az előzőekben leírtak szerint frakcionáltan eluáltuk, majd a legmagasabb aktivitású frakcióból pipettával kivettünk pontosan 1 ml-t. Ezt az 1 ml-t nátrium-acetáttal puffereltük 4,3–4,5 pH értékre, majd hozzáadtuk a NODAGA-RAMEB vizes oldatát. A reakcióelegyet 10 percig 95 °C-on inkubáltuk. A 10 perc elteltével az elegyet hagytuk szobahőmérsékletre hűlni, majd Light C18 Sep-Pak oszlopra vittük fel. A jelölt farmakon megkötése után az oszlopot vízzel mostuk, hogy a puffert, illetve a nem komplexált szabad ^{68}Ga ionokat eltávolítsuk. A ^{68}Ga -mal jelölt NODAGA-RAMEB (^{68}Ga)(Ga-NODAGA-RAMEB) terméket 96%-os EtOH és izotóniás nátrium-klorid-oldat 1:2 arányú elegyével (0,2 ml) nyertük vissza az oszlopról. A jelölt terméket sóoldattal hígítottuk, ezzel csökkentve az etanol-tartalmat 10% alá, majd sterilre szűrtük az állatokon való felhasználás előtt.

DOTAGA-RAMEB radiojelölése ⁶⁸Ga izotóppal

1ml ⁶⁸Ga eluátumot nátrium-acetáttal puffereztünk, hogy biztosítsuk a megfelelő pH értéket. Ezt követően hozzáadtuk a DOTAGA-RAMEB vizes oldatát. A reakciót 95 °C-on 10 percig inkubáltuk. Majd az oldatot egy aktivált Light C18 Sep-Pak oszlopra vittük fel. A megkötés után az oszlopot vízzel mostuk. A ⁶⁸Ga jelölt termékünket [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB szintén 96%-os EtOH/izotóniás NaCl oldat 1:2 arányú elegyével eluáltuk le. A radiokémiai tisztaság meghatározásához radio detektorral kombinált RP-HPLC rendszert használtunk. A jelölt terméket sóoldattal hígítottuk, ezzel csökkentve az etanol-tartalmat 10% alá, majd sterilre szűrtük az állatokon való felhasználás előtt.

DOTAGA-RAMEB radiojelölése ^{205/206}Bi izotóppal

A ^{205/206}Bi izotópokat tartalmazó oldatból kivettünk 100 µL-t, és ultratiszta sósavval 300 µl-re hígítottuk. A hígítás után TRIS pufferral puffereztük, hogy biztosítsuk a megfelelő pH értéket, majd hozzáadtunk 20%-os aszkorbinsavat, és a DOTAGA-RAMEB-et. A reakcióelegyet 95 °C-on, 10 percig inkubáltuk, majd hagytuk szobahőmérsékletre hűlni. Ezt követően az oldatot egy aktivált Oasis HLB gyantát tartalmazó szeparációs oszlopra vittük föl. A farmakon megkötődése után az oszlopot vízzel mostuk, hogy a puffert, illetve a nem komplexált szabad ^{205/206}Bi ionokat eltávolítsuk. A ^{205/206}Bi radioizotóppal jelzett terméket ([^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB 96%-os EtOH/izotóniás NaCl oldat elegyével eluáltuk. A radiokémiai tisztaság meghatározásához radio detektorral kombinált RP-HPLC rendszert használtunk. A jelölt terméket sóoldattal hígítottuk, ezzel csökkentve az etanol-tartalmat 10% alá, majd sterilre szűrtük az állatokon való felhasználáshoz.

A LogP-értékek: a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB, [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB származékok oktanol/PBS megoszlási hányadosának (megoszlási együttható) meghatározása

A LogP értékének meghatározását mindhárom ciklodextrin származék esetében a következőképpen végeztük el: a radiojelölt ciklodextrin származékot összekevertük 1-oktanol és PBS keverékével egy centrifugacsőben. Az elegyet 20 percig kevertettük Vortex segítségével, majd 5 percig centrifugáltuk 20000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on a rétegek teljes szétválásáig. A szétvált fázisokból 3 x 100 µl térfogatú mintákat kémcsövekbe pipettáztunk, ezután megmértük a radioaktivitásukat Perkin Elmer Packard Cobra kalibrált gamma-számlálóval. Több párhuzamos kísérlet mérési eredményeit átlagolva kaptuk meg a LogP-értéket.

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB gyantakötés vizsgálata

Gyantakötés vizsgálatot végeztünk annak érdekében, hogy megtudjuk, hogy az általunk előállított ciklodextrin származékok milyen mértékben kötődnek a PGE2-höz, előre jelezve ezzel az élő szervezetben a tumor általi felvételt.

Ennek első lépése, a gyanta PGE2-höz való kötése, melyet az alábbi reakció szerint végeztünk: a H-Gly-HMPB-ChemMatrix® gyantát beáztattuk DCM-ba és kondicionáltuk 10 percig. Ezt követően a prosztaglandin E2-t (PGE2), és a PyBOP-ot hozzáadtuk, majd DIPEA-val beállítottuk a pH-t, és 2 órán keresztül kevertettük szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő leteltével a gyantát üvegszűrőn leszűrtük, és 5 ml hideg DCM-mel kétszer mostuk, hogy eltávolítsuk az el nem reagált anyagokat. Az így nyert gyantát teljesen megszáritottuk, majd visszamérve 775 mg konjugált gyantát kaptunk. A kapcsolási reakció 98%-os hozamot mutatott. Ezt követően párhuzamos kísérletekben a 10 mg módosítatlan gyantát és 10 mg PGE2-vel konjugált gyantát egy polipropilén frittel ellátott 1 ml-es polipropilén csőbe helyeztünk. A mintákhoz először 700-700 µl PBS-t adtunk, összeráztuk, majd 3 perc elteltével [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et pipettáztunk rájuk, melyet enyhe rázás közben 10 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten. Az inkubálás után a gyantákról a folyadékot eltávolítottuk, majd 1 ml PBS-sel mostuk. Ezt követően a gyanták, illetve a felülúszók aktivitását megmértük.

Az *in vitro* metabolikus stabilitás meghatározása

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB; [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB *in vitro* stabilitását egér szérumban vizsgáltuk, külön kísérletben. Mindegyik radioizotóp jelölt anyagból 10-10 µl-t adtunk 0,5 ml egér szérumhoz, amelyet keverés nélkül 37 °C-on inkubáltuk. Ezután 30, 60, 90 és 120 perces időpontokban 50 µl-es mintákat vettünk ki és jég hideg abs. EtOH-al kevertük össze. Ezután a kicsapódott frakciót úgy választottuk el, hogy 5 percig centrifugáltuk 10.000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on. A felülúszót összegyűjtöttük, vízzel hígítottuk és analitikai radio- RP-HPLC-vel vizsgáltuk a radioizotóppal jelölt vegyületek radiokémiai tisztaságát.

Az *in vivo* metabolikus stabilitás meghatározás

Az *in vivo* metabolikus stabilitás meghatározásának célja, hogy teszteljük, hogyan viselkedik a radioizotóppal jelölt vegyület az élő szervezetben, hiszen vérkoncentrációját számos felszívódási, hatóanyag átalakulási és lebontási azaz metabolikus folyamat befolyásolja. Ezért az egészséges SCID egerek farokvénáján keresztül [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et injektáltunk, majd az injekció beadása után 60 perccel vizeletmintákat gyűjtöttünk. A kapott mintát 50 µl jég hideg abs. etanollal összekevertük és 10 000 fordulat/perc sebességgel 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót összegyűjtöttük, és analitikai radio- RP-HPLC módszerrel elemeztük.

Alkalmazott tumor modellek

A tumor modellek indukálásakor BxPC-3 vagy PancTu-1 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejteket injektáltunk 12 hetes hím CB17 SCID immunhiányos egerek bal váll régiójába a bőr alá 0,9%-os NaCl oldatban (5×10^6 sejt; 100 µl NaCl-ban). A daganatok növekedését tolmérővel követtük, és a $(\text{legnagyobb átmérő} * \text{a legkisebb átmérő}^2) / 2$ képlettel meghatároztuk az aktuális térfogatukat. *Ex vivo*

és *in vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat 12 ± 1 nappal a tumorsejtek injektálása után végeztük, ekkor a tumor térfogata $95 \pm 8 \text{ mm}^3$ volt.

MiniPET képalkotás

A kísérleti állatokat körülbelül 12 nappal a tumorsejtek beültetése után kisállat inhalációs altatógéppel 3% isofluránnal elaltattuk. Ezt követően a BxPC-3 és PancTu-1 daganatokat hordozó egerek, valamint az egészséges kontroll egerek laterális farokvénájába [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et injektáltunk. Külön kísérletben hasonlóan jártunk el a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyület esetén is: inhalációs anesztézia mellett [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületet injektáltunk a laterális farokvénába. Az injektálást követően, *in vivo* statikus és dinamikus (0-90 perc) PET képalkotást végeztünk a radiotracer biológiai eloszlásának meghatározása céljából kisállat PET-szkennel segítségével inhalációs érzéstelenítés alatt.

Annak érdekében, hogy feltárjuk a PGE2 szerepét a tumorhalmozás folyamatában, *in vivo* vizsgálat során miniPET felvételeket készítettünk PGE2 alkalmazása mellett. A PGE2 pozitív BxPC-3 tumort hordozó SCID egerekbe intravénásán injektáltunk 100 μl 4% etanol tartalmú sóoldattal hígított [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyület és 1 mg PGE2 keverékével, a radiotracer *in vivo* biodisztribúciójának meghatározása végett. Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan PET-szkennel használatával statikus és dinamikus felvételeket készítettünk (0-90perc) inhalációs anesztézia alkalmazása mellett.

MiniPET adatok elemzése és értékelése

A PET felvételek elemzése szempontjából a tumorok kvantitatív radiógyógyszer jelölt vegyület felvételét a standardizált felvételi értékkel (SUV-standardized uptake value,) illetve daganat / izom aránnyal (T / M SUV átlag) jellemezhetjük. Ha a radiofarmakon egyenletesen oszlan el a szervezetben, akkor a SUV értéke 1 lenne. A SUV érték kiszámításához az értékes térfogatot a VOI-kat (Volume Of Interest) manuálisan rajzoltuk a tumor pereme köré a BrainCad képelemző szoftver segítségével. Ha feltételezzük, hogy a sűrűség 1 g/ml, akkor a standardizált felvételi érték egyenlő a radioaktivitás koncentráció VOI-n belüli értéke (MBq/ml) elosztva a beadott dózis (MBq) és az állat súlyának (g) hányadosával. A tumor/izom arányt pedig úgy kapjuk, hogy elosztjuk a tumor SUV mean értékét a háttérként használt izom SUV átlag értékével. Tehát így megkapjuk, hogy a tumor hányszor annyi radiofarmakot képes felvenni, mint az izom.

***Ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok**

A BxPC-3 vagy PancTu-1 tumorokat hordozó SCID-egereket és a kontroll egereket az *ex-vivo* szervi eloszlás vizsgálatához intravénásán injektáltuk [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyülettel, majd az injekció beadását követő 30. 60. illetve 90. percben 5% izofluránnal eutanizáltuk őket.

A kiválasztott szervekből 3 szövetmintát vettünk, megmértük a súlyukat analitikai mérlegen, valamint a radioaktivitásukat kalibrált gammaszámlálóval. A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felvételt %ID/g szövetben fejeztük ki.

Majd külön kísérletekben az *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatokhoz szintén kontroll és tumor hordozó (BxPC-3) SCID egereket használtunk. Intravénás injekcióban [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületet vagy [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB- radioizotóp jelzett vegyületet ($0,86 \pm 0,17$ MBq) adtunk, majd 30, 60 és 90 perccel a radioaktív nyomjelzők beadása után, az állatokat 5%-os izofluránnal túlaltattuk. Három szövetmintát vettünk a kiválasztott szervekből, azok radioaktivitását kalibrált gamma számlálóval, tömegét analitikai mérlegen mértük. A [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB- radioizotóp jelzett vegyületeink felvételét százalékos injektált dózis per gramm szövet értékben fejeztük ki (%ID/g).

Immunhisztokémia

A BxPC-3 és PancTul daganatokat hordozó egerek boncolását követően a tumormintákat formaldehidben fixáltuk és paraffinba ágyaztuk, majd paraffinmentesítést, rehidrációt és antigén-visszanyerést (pH 6,0) végeztünk. Ezt követően nyúl monoklonális anti-prosztata glandin E receptor EP2/PTGER2 antitesttel (1:1000 hígítás) inkubáltuk. A specifikus antitest kötés megjelenítésére HRP-vel (másodlagos antitesthez konjugált tormaperoxidáz) jelölt anti-nyúl polimer antitestet és Envision DAB (3,3 Diaminobenzidin) kimutatási rendszert használtunk. A mintákat 15 percig inkubáltuk a tormaperoxidáz polimerrel, ezután PBS-el mostuk. Majd hematoxilin festést végeztünk, és egy Leica DM2500 kutatómikroszkóppal készítettünk mikroszkópos felvételeket.

Statisztikai elemzés

Student-féle t próbával (kétmintás) és Mann-Whitney U-teszttel szignifikanciát számoltunk, és a szignifikancia szintjét $p \leq 0,05$ -re állítottuk, eltérő esetben ezt jelezzük. Az adatok ábrázolását legalább három független kísérlet átlaga \pm SD szerint végeztük.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

A NODAGA-RAMEB előállítás

NODAGA kelátort kapcsoltunk a random metilezett β -ciklodextrinhez (NH₂-RAMEB), mely által alkalmassá vált a ⁶⁸Ga-izotóppal történő jelölésre. A kapcsolási reakciót követően a terméket liofilizáltuk, vízben újra feloldottuk (1ml) és preparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk. A szintézis hozama 74%, a tisztított prekursor kémiai tisztasága 99% volt.

Az alkalmazott analitikai RP-HPLC módszer esetében a termék retenciós ideje 9,8 perc volt. A kromatogrammon a termék jelén kívül más jel nem észlelhető, mely bizonyítja, hogy a termék tisztasága közel 100%. Tisztítás után a termék szerkezetét ¹H-NMR-rel ellenőriztük, és UHR-ESI-TOF tömegspektrométerrel igazoltuk. Az ¹H-NMR mérést (DMSO)-d₆-ban végeztük. A kémiai eltolódásokat δ ppm-ben ábrázoltuk. A kapott csúcsokat a megfelelő protonokhoz rendeltük.

A tömegspektrometriás vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a szintetizált termék elméleti és mért tömege korrelál egymással, vagyis a NODAGA-RAMEB m/z számított tömege 1781,7283 [M]¹⁺. A spektrumot asszignáltuk. A ciklodextrinben lévő protonokat számokkal, a kelátorban lévő protonokat betűkkel jelöltük.

Monoamino-RAMEB konjugálási reakciója DOTAGA kelátorral

DOTAGA kelátort kapcsoltunk a random metilezett β -ciklodextrinhez (NH₂-RAMEB), mely által alkalmassá vált a ⁶⁸Ga és ^{205/206}Bi izotópokkal történő jelölésre. A szintézis hozama 77%, a tisztított prekursor kémiai tisztasága 98% volt. Tisztítás után a termék szerkezetét ¹H-NMR-rel ellenőriztük, és UHR-ESI-TOF tömegspektrométerrel igazoltuk. Az ¹H-NMR mérést (DMSO)-d₆-ban végeztük. A kémiai eltolódásokat δ ppm-ben ábrázoltuk. A kapott csúcsokat a megfelelő protonokhoz rendeltük.

A tömegspektrometriás vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a szintetizált termék elméleti és mért tömege korrelál egymással, vagyis a DOTAGA-RAMEB m/z számított tömege 1882,7721 [M]¹⁺, mért tömege pedig 1882,7764 [M]¹⁺. Az alkalmazott analitikai RP-HPLC módszer esetében a termék retenciós ideje 9,8 perc volt. A kromatogrammon a termék jelén kívül más jel nem észlelhető, mely bizonyítja, hogy a termék tisztasága közel 100%.

NODAGA-RAMEB jelölése ⁶⁸Ga izotóppal

A ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generátort frakcionáltan eluáltuk, majd a legmagasabb aktivitású frakcióval dolgoztunk tovább. A NODAGA-RAMEB-et ólomárnyékolt kézi munkahelyen manuálisan jelöltük ⁶⁸Ga-mal. A termék moláris aktivitása $15,34 \pm 1,93$ GBq / μ mol, a radiokémiai tisztasága (RPC) 98% feletti volt. A

radiokémiai tisztaság meghatározásához RP-HPLC rendszert használtunk. Az alkalmazott analitikai vizsgálat során látható, hogy a termék csúcs mellett nem található egyéb csúcs, mely azt jelzi, hogy a termék nem tartalmaz szabad ^{68}Ga ionokat, sem egyéb aktív szennyezőket. A termék retenciós ideje 9,13 perc volt.

A DOTAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal

A DOTAGA-RAMEB radiojelölését szintén ólomárnyékolt kézi munkahelyen végeztük. 1 ml ^{68}Ga eluátumot nátrium acetáttal puffereltük, majd hozzáadtuk a DOTAGA-RAMEB prekuzort. A reakció 10 perc alatt ment végbe, 95 °C-on. A jelölt terméket [^{68}Ga](Ga-DOTAGA-RAMEB) szeparációs oszlopon tisztítottuk, steril fiziológiás sóoldat és etanol elegyével eluáltuk, majd sterilre szűrtük. A reakcióséma az A ábrán látható. A radiokémiai tisztaság meghatározásához radio detektorral kombinált RP-HPLC rendszert használtunk. A termék radiokémiai tisztasága (RPC) 98% feletti volt. A vizsgálat során egy monomodális csúcsot kaptunk, melynek retenciós ideje megegyezik a DOTAGA-RAMEB retenciós idejével. A jelzés sikeres volt, a termék sem szabad ^{68}Ga izotópot, sem egyéb mellékterméket nem tartalmaz.

DOTAGA-RAMEB radiojelölése $^{205/206}\text{Bi}$ izotóppal

A DOTAGA-RAMEB radiojelölését manuálisan végeztük az általunk előállított $^{205/206}\text{Bi}$ izotópokat felhasználva. A $^{205/206}\text{Bi}$ izotópokat tartalmazó oldatból kivettünk 100 μl -t és ultratiszta sósavval (0,1 M) 300 μl -re hígítottuk. A hígítás után TRIS pufferrel (50 μl , 2 M) puffereltük, hogy biztosítsuk a megfelelő pH értéket (pH 8,4), majd hozzáadtunk 20%-os aszkorbinsavat (25 μl), és a DOTAGA-RAMEB-et (10 μl 3 mM). A reakcióelegyet 95 °C-on 10 percig inkubáltuk, majd hagytuk szobahőmérsékletűre hűlni. Ezt követően az oldatot szeparációs oszlopra vittük fel, és vízzel mostuk, eltávolítva így a szennyezőket és a szabad $^{205/206}\text{Bi}$ izotópokat, majd a [$^{205/206}\text{Bi}$](Bi-DOTAGA-RAMEB) terméket eluáltuk. A radiokémiai tisztaság meghatározásához radio detektorral kombinált RP-HPLC rendszert használtunk. A termék radiokémiai tisztasága (RPC) 98% feletti volt. A vizsgálat során egy monomodális csúcsot kaptunk, melynek retenciós ideje megegyezik a DOTAGA-RAMEB retenciós idejével. A jelzés sikeres volt, a termék sem szabad $^{205/206}\text{Bi}$ izotópot, sem egyéb mellékterméket nem tartalmaz.

A LogP-értékek: a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB, [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB származékok oktanol/PBS megoszlási hányadosának (megoszlási együttható) meghatározása

A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB megoszlási hányados (LogP) értéke $-3,63 \pm 0,04$ -nek adódott, ami nagyon erősen hidrofíll tulajdonságra utal, tehát a radiojelölt ciklodextrin molekula farmakokinetikai tulajdonságaiból következőleg a vesén keresztül, vizelettel fog ürülni.

Abban az esetben, amikor PGE2 jelenlétében vizsgáltuk a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB megoszlási hányados értékét, hidrofilitása mérsékelten csökkent, $-3,08 \pm 0,03$ értékre.

A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB megoszlási hányados értéke $-3,47 \pm 0,04$, amely szintén hidrofil tulajdonságra utal, tehát kiürülése a szervezetből szintén a fent leírt módon történik.

A [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB származék oktanol/PBS megoszlási hányadosa értéke $-3,45 \pm 0,03$, tehát szintén nagyon erősen hidrofil tulajdonágú, a vesén keresztül a vizelettel ürül.

A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB gyantakötés vizsgálata

Annak érdekében, hogy megtudjuk, hogy az általunk előállított ciklodextrin származékok milyen mértékben kötődnek a PGE₂-höz, előre jelezve ezzel az élő szervezetben a tumor általi felvételt, úgynevezett gyantakötés vizsgálatot végeztünk.

Ennek első lépése, a gyanta PGE₂-höz való kötése volt, melynek eredményeként 775 mg konjugált gyantát kaptunk. A kapcsolási reakció 98%-os hozamot mutatott.

Ezt követően párhuzamos kísérletekben összevetettük a módosítatlan és a PGE₂-vel módosított gyanták [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB kötő képességét, és azt találtuk, hogy a PGE₂ konjugált gyanta $18,1 \pm 1,3\%$ -kal több [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et kötött meg, mint a nem módosított gyanta, ami határozott kötődésre utal.

***In vitro* metabolikus stabilitás meghatározása**

A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB (10 μL , $5,5 \pm 0,2$ MBq); [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB (10 μL , $5 \pm 0,5$ MBq) és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB (10 μL , $4 \pm 0,6$ MBq) *in vitro* stabilitását egér szérumban vizsgáltuk, külön kísérletben. Mindhárom radioaktívan jelölt RAMEB esetében a vizsgálatokat 37 °C hőmérsékleten végeztük, majd mintákat vettünk 30, 60, 90 és 120 percnél, és radio- RP-HPLC segítségével meghatároztuk radiokémiai tisztaságukat.

A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB stabil maradt a mért időszakban, és a radiokémiai tisztasága 99% felettinek bizonyult.

A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB stabilak maradtak a mért időszakban és radiokémiai tisztaságuk 98% felettinek bizonyult.

Ebből arra következtethetünk, hogy az *in vivo* vizsgálatokban a PET felvételeken a dúsulások a radiógyógyszertől származnak. Az általunk használt radioizotópok, a ^{68}Ga és a $^{205/206}\text{Bi}$ szabad ion formájában nem okoznak majd radiotoxicitási problémákat az egyéb, általunk nem célzott szövetekben vagy szervekben.

***In vivo* metabolikus stabilitás**

Az *in vivo* stabilitás vizsgálata céljából a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et, a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB-et külön kísérletekben egerekbe injektáltuk, majd egy óras inkubációs idő után az egerek vizeletét gyűjtöttük össze. A kapott vizeletet radio- RP-HPLC módszerrel vizsgáltuk. Nem találtunk mérhető mennyiségű radioaktív metabolitot radio- RP- HPLC módszerrel, ami kiváló *in vivo* metabolikus stabilitást jelez.

MiniPET képképzés

Szervi eloszlás vizsgálatok egészséges kontroll egereken

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB biológiai eloszlásának meghatározása

A radioaktívan jelzett vegyületek élő szervezetben történő szereloszlásának, viselkedésének és eliminációjának megfigyelése céljából képképző vizsgálatokat végeztünk. A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB biológiai eloszlásának meghatározásához egészséges kontroll CB17 SCID egerekkel dinamikus PET képképzést és *ex vivo* vizsgálatokat végeztünk. A kísérleti állatokat körülbelül 12 nappal a tumorsejtek beültetése után kisállat inhalációs altatógéppel 3% isofluránnal elaltattuk, majd a laterális farokvénába $7,3 \pm 0,3$ MBq aktivitású [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et injektáltunk. A PET képek bomlás korrigált elemzésével a vesék és a hólyag (vizeletrendszer) egyértelműen látható volt és nagyon alacsony felvételt figyeltünk meg más szervekben és szövetekben. 90 perccel az injekció beadása után a radioaktivitás csak a vesében és a hólyagban volt azonosítható és háttérfelhalmozódást nem mutatott. A PET felvételek kvantitatív elemzésével a SUV átlag adatok és a TAC mutatták a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB gyors kimosódását a vizsgált szervekből. A vizsgált szövetek radiotracer felvétele szignifikánsan csökkent 5 perc után, és 90 perccel az injekció beadása után nagyon alacsony [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB akkumulációt figyeltünk meg a mellkasi szervekben: a tüdőben (SUV átlag: $0,31 \pm 0,07$), a szívben (SUV átlag: $0,12 \pm 0,04$). A hasi régióban: a belekben (SUV átlag: $0,13 \pm 0,03$), a májban (SUV átlag: $0,16 \pm 0,06$), a gyomorban (SUV átlag: $0,12 \pm 0,04$). Az agyban (SUV átlag: $0,12 \pm 0,04$). Csak a vizelet radioaktivitása nőtt szignifikánsan (SUV-átlag: $7,91 \pm 2,92$ és $55,24 \pm 9,65$); 5, illetve 90 perccel az injekció beadása után.

[⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB szervi eloszlásának vizsgálata

Inhalációs anesztézia mellett $6,4 \pm 0,3$ MBq aktivitású [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB-et injektáltunk az egerek laterális farokvénájába. Az injektálást követően, *in vivo* statikus és dinamikus (0-90 perc) PET képképzést végeztünk a radiotracer biológiai eloszlásának meghatározása céljából kisállat PET-szkenner segítségével inhalációs érzéstelenítés alatt. A PET képek bomlás korrigált elemzésével a vesék és a hólyag (vizeletrendszer) egyértelműen látható volt, és nagyon alacsony felvételt figyeltünk meg más szervekben és szövetekben. 90 perccel az injekció beadása után a radioaktivitás csak a vesében és a hólyagban volt azonosítható és háttérfelhalmozódást nem mutatott. A PET felvételek kvantitatív elemzésével a SUV átlag adatok a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB gyors kimosódását mutatták a vizsgált

szervekből. Kilencven perccel az injekció beadása után mérhető radioaktivitás csak a vesében és a hólyagban látható. Háttéraktivitás nem található. A vizsgált szövetek nyomjelző felvétele jelentősen csökkent, és 90 perccel az injekcióbeadása után a mellkasi szervekben a hasi régiókban csak nagyon alacsony [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB felhalmozódást találtunk a tüdőben (SUV-átlag: 0,21 ± 0,05), a szívben (SUV-átlag: 0,38 ± 0,08). A hasi szervekben (SUV-átlag: 0,25 ± 0,06), a májban (SUV-átlag: 0,25 ± 0,06), a gyomorban (SUV-átlag: 0,14 ± 0,03) A vizelet radioaktivitása azonban jelentősen megnőtt 5 és 90 perccel az injekció beadása után (SUV-átlag: 3,93 ± 1,85 és 11,46 ± 2,75)

***In vivo* biológiai eloszlási vizsgálatok daganatos SCID egereken**

[⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitása BxPC-3 tumort hordozó SCID egerekben PGE2 alkalmazása mellett

Annak érdekében, hogy feltárjuk a PGE2 szerepét a tumorhalmozás folyamatában, *in vivo* vizsgálat során miniPET felvételeket készítettünk PGE2 alkalmazása mellett. A korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan PET- szkennert használatával statikus és dinamikus felvételeket készítettünk (0-90perc) inhalációs anesztézia alkalmazása mellett. A reprezentatív bomláskorrigált kisállat PET-képeket A PET-felvételek kvalitatív elemzésével megállapítottuk, hogy a szubkután növekvő BxPC-3 daganatok egyértelműen azonosíthatók voltak az injekció beadása után 30 perccel, azonban magas háttér radioaktivitást észleltünk. Ezenkívül az inkubációs idő növekedésével a háttéraktivitás a 30. perctől a 90. percre csökkent, és a daganat hangsúlyosabbá vált. Ezt a megfigyelést megerősítette a kvantitatív SUV adatelemzés ahol megállapítottuk, hogy a T/M SUV-átlag adatok az injekció beadása után a 10. perctől kezdődően (T/M SUV átlag: 7,80 ± 1,64) a 90. percre (T/M SUV átlag: 18,57 ± 2,64) nőttek. A BxPC-3 tumorok SUV értékei nagyon lassan csökkentek az injekció beadását követően 10 perccel. (SUV átlag: 0,45 ± 0,06). Annak ellenére, hogy a BxPC-3 daganatoknak viszonylag alacsony a radiotracer felvétele (SUV átlag: 0,14 ± 0,04) 90 percnél, a magas daganat-izom arány (T/M) eredménye kiváló képkontrasztot biztosított. Különböző farmakokinetikai tulajdonságokat figyeltünk meg, amikor dinamikus PET képalkotást végeztünk [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB és PGE2 együttes injektálása után BxPC-3 daganatot hordozó egerekben. A PGE2 jelenlétében a BxPC-3 daganat az injekció beadása utáni első 5-10 percben nem azonosítható. Ezt követően a radiotracer felhalmozódása a BxPC-3 daganatban növekszik, szignifikánsan magas SUV-értékekkel (SUV átlag: 0,95 ± 0,20) 30 percnél, és az injekció beadása után 90 perccel (SUV átlag: 1,12 ± 0,21). Ezek a SUV átlagértékek körülbelül 8-9-szer magasabbak (szignifikancia: $p \leq 0,01$), mint a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB akkumuláció egyidejűleg történő PGE2 injektálásával. Továbbá a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB jelentős felhalmozódást mutatott a háttérszövetekben (izom, mellkas és hasi szervek) Ezt jelzi egy jelentősen ($p \leq 0,01$) körülbelül 10-szer alacsonyabb tumor-izom arány (T/M SUV átlag: 1,36 ± 0,15) 30 percnél és (T/M SUV átlag: 1,56 ± 0,23) 90 percnél, mint amely a PGE2 molekula távollétében volt megfigyelhető.

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitása PancTu-1 daganatot hordozó SCID egerekben

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitását az alacsony prosztaglandin E2 receptort expresszáló PancTu-1 tumorokat használva igazoltuk. Reprezentatív bomláskorrigált PET képeket készítettünk, 80-90. perccel az injekció beadása után a miniPET-felvételek kvalitatív elemzésével azt találtuk, hogy a BxPC-3 daganatok egyértelműen láthatóak voltak, azonban a PancTu-1 daganat-alacsonyabb prosztaglandin E2 receptor (EP2) expressziója miatt nem tért el élesen a háttérben lévő szövetektől. 80-90 perccel a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB injektálása után a BxPC-3 daganatok SUV értékei: (SUV átlag: $0,15 \pm 0,04$), (SUV max: $0,25 \pm 0,03$), (T/M SUV átlag: $18,85 \pm 2,64$) és (T/M SUV max: $18,32 \pm 3,21$) Az értékelés szerint a PET-képek közül 80-90 percnél szignifikánsan ($p \leq 0,01$) kisebb akkumuláció mutatkozott a PancTu-1 daganatokban, mint a BxPC-3 daganatokban (SUV átlag: $0,04 \pm 0,01$), (SUV max: $0,08 \pm 0,02$), (T/M SUV-átlag: $1,33 \pm 0,19$) és (T/M SUV max: $1,66 \pm 0,22$) Ezek az értékek körülbelül 3-14- szer alacsonyabbak voltak, mint a BxPC-3 tumoroknál, ami megerősíti a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB magas PGE2-szelektivitását.

A [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB biológiai eloszlásának *in vivo* értékelése BxPC-3 daganatot hordozó egerekben

A [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyület esetén inhalációs anesztézia mellett $6,4 \pm 0,3$ MBq aktivitású [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületet injektáltunk a laterális farokvénába. Az injektálást követően, *in vivo* statikus és dinamikus (0-90 perc) PET képalkotást végeztünk a radiotracer biológiai eloszlásának meghatározása céljából kisállat miniPET-szkennel segítségével inhalációs érzéstelenítés alatt. A kvalitatív képelemzéssel azt találtuk, hogy a BxPC-3 daganatok egyértelműen azonosíthatóak a PET-felvételeken a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakon felvétele által. Azután a bomláskorrigált PET képek kvantitatív elemzése során azt találtuk, hogy az injekció beadását követő 3. perctől (SUV átlag: $0,36 \pm 0,04$) a BxPC-3 tumorok felvétele folyamatos csökkenést mutat az 50. percig (SUV átlag: $0,20 \pm 0,04$), majd eléri az egyensúlyi állapotot. Ezen adatok alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a daganat/háttér (izom) arány a legmagasabb a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB beadása után 90 perccel, amikor a T/M arány $2,5 \pm 0,2$ volt.

***Ex vivo* biodisztribúciós vizsgálatok**

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatok egészséges kontroll egereken

Az *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatokat, a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB injekció intravénás beadását követően 30, 60 és 90 perces inkubációs idők leteltével. A szervek és szövetek [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felvételét kalibrált gamma-számlálóval mértük. A kvantitatív elemzés után az *ex*

vivo eredmények és az *in vivo* SUV adatok jól korreláltak egymással. A % ID/g adatokból kiderült, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB gyorsan kiürült a vesékből és koncentrációja megnövekedett a hólyagban, ahogyan azt a LogP vizsgálat alapján vártuk, mert a ⁶⁸Ga-mal jelölt ciklodextrin erősen hidrofil tulajdonságot mutatott. Nincsenek jelentős különbségek a vizsgált időpontok % ID/g értékei között a 30, 60 és 90 perces időpontokban, a vizelet, a vesék, a belek, a zsírszövet a tüdők és az agy akkumulációját tekintve. A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódása más szervekben és szövetekben szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,01$) mutatott a 30 és 90 perces % ID/g értékek között. Nagyon alacsony [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódást az izomban, az agyban, a zsírban és a hasnyálmirigyben mértünk. Ezenkívül az *ex vivo* % ID/g adatok azt mutatták, hogy a radiotracer akkumulációja 30 percről 90 percre az összes vizsgálatnál időfüggő módon csökkent a szervekben és szövetekben.

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatok daganatot hordozó SCID egereken

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitásának értékeléséhez *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatokat végeztünk 30, 60 és 90 perccel a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyület ($7,31 \pm 0,32$ MBq) injektálását követően, BxPC-3 és PancTu-1 daganatot hordozó egereken. A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódások a PGE2 pozitív BxPC-3 daganatokban tumor-izom arányban (T/M) szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabbak voltak minden vizsgált időpontban, mint más szervekben és szövetekben, ami megerősíti radioaktívan jelölt ciklodextrin erős PGE2 kötési tulajdonságát. Kivételt képez ez alól a vese és a húgyhólyag. Azt is megállapítottuk, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódása szignifikánsan ($p \leq 0,01$) csökkent az injekció beadása után 90 perccel a legtöbb vizsgált mellkasi és hasi szervben és BxPC-3 daganatokban.

Az *in vivo* PET adatokhoz hasonlóan BxPC-3 és PancTu-1 daganatok összevetése esetén is, szignifikánsan ($p \leq 0,01$) alacsonyabb [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB *ex vivo* akkumulációt figyeltünk meg a PancTu-1 daganatokban 90 perccel az injekció beadása után. A % ID/g adatok körülbelül 5-ször alacsonyabb [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felvételt mutattak a PancTu-1 daganatokban, mint a BxPC-3 daganatokban 90 perccel az injekció beadása után. Ráadásul miután a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB és PGE2 együttes befecskendezésekor, körülbelül 20-szor nagyobb tumorfelvétel (% ID/g) és 6-szor alacsonyabb T/M arány volt megfigyelhető a BxPC-3 daganatokban az injekció beadása után 90 perccel, mint PGE2 adása nélkül, ez a különbség szignifikánsnak bizonyult. ($p \leq 0,01$)

A [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB *ex vivo* biológiai eloszlás elemzése BxPC-3 daganatot hordozó egereken

Az *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatokhoz kontroll és tumort hordozó (BxPC-3) SCID egereket egyaránt használtunk. Intravénás injekcióban [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületet ($6,2 \pm 0,2$ MBq) vagy külön kísérletben [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett

vegyületet ($0,86 \pm 0,17$ MBq) adtunk, majd 30, 60 és 90 perccel a radioaktív nyomjelzők beadása után meghatároztuk a szervek és a szövetek radioaktivitását gamma-számlálóval. Statisztikailag nincs szignifikáns különbség a vizsgált szervek és szövetek % ID/g értékei között a két radioizotóp jelölt RAMEB esetében 30 és 60 perccel az injekció beadása után. 90 perccel a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB befecskendezése után alacsony halmozódás volt kimutatható a vizsgált szervekben és szövetekben. Ezzel szemben a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB magas felvétele volt megfigyelhető a lépben, a vastagbélben, a gyomorban és a zsírszövetben, ugyanabban a vizsgálati időpontban. A felhalmozás elemzésével a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB a prosztaglandin E2 pozitív BxPC-3 daganatokban nem mutatott szignifikáns ($P \leq 0,05$) különbséget bármely vizsgált időpontban.

Immunhisztokémia

Az *ex vivo* vizsgálatok után a prosztaglandin E receptor (EP2) jelenléte immunhisztokémiai vizsgálatokkal igazolható volt a szubkután növekvő BxPC-3 és PancTu-1 daganatokban. Erős EP2 receptor pozitívitás és intenzív citoplazma/membrán expresszió mutatkozott a xenograft hasnyálmirigy karcinóma sejtekben. Ezzel szemben alacsonyabb jelintenzitást figyelhettünk meg a PancTu-1 daganatoknál. Ezek az eredmények jól korreláltak az *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatok eredményeivel, tovább erősítve a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB erős kötődési affinitását a PGE2 molekulához. Külön kísérletekben vizsgáltuk a szubkután növekvő BxPC-3 PGE2 receptorának jelenlétét. Erős receptor pozitívitás jellemezte a daganatokat mind a citoplazmában és a sejtmembránban. Ezek az eredmények összhangban az *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatokkal erősítik a PGE2 receptor magas kötési affinitását a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB esetében is.

5. Megbeszélés

Kutatómunkánk első szakaszában az NH_2 -RAMEB-t módosítottuk NODAGA kelátképzővel, és Gallium-68 radioizotóppal jelöltük egy PGE2 pozitív daganatok *in vivo* PET képalkotása szempontjából ígéretes radiotracer [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB előállításához.

A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB molekula szintéziséhez a NODAGA kelátképzőt választottuk, mivel képes stabil kötést kialakítani a kapcsolási reakció során. A szintézis során a NODAGA-t a RAMEB elsődleges aminjához hagyományos robusztus és reprodukálható protokoll szerint kapcsoltuk. A radioaktív jelölési eljárást az előző kísérleteink során alkalmazott jól bevált protokoll szerint hajtottuk végre, amely magas radiokémiai tisztaságú komplexet eredményezett. A radiokémiai tisztasága (98,0% felett) és moláris aktivitása $15,34 \pm 1,93$ GBq/ μmol volt. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor kutatócsoportunk a ^{68}Ga -NODAGA-HP β CD -t szintetizálta és jellemezte. a ^{68}Ga -NODAGA-HP β CD radiokémiai tisztasága is magasabb volt, mint 98%, és a fajlagos aktivitás körülbelül 17 GBq/ μmol volt,

ami megerősíti, hogy módszerünk optimális a ciklodextrin és származékai radioaktív jelölésére ^{68}Ga -NODAGA-val.

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB alkalmazhatóságát *in vitro* és *in vivo* módszerekkel értékeltük és stabilitási vizsgálatokat végeztünk. Az *in vitro* metabolikus stabilitást 30, 60, 90 és 120 perc inkubációs idő elteltével figyeltük. A stabilitási teszt kimutatta, hogy a 120 perces értékelési időszak alatt nem volt ^{68}Ga veszteség az egérszérumban. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB farmakon szérum jelenlétében igen stabil, amely fontos szerepet játszik az intravénás beadásnál. Az *in vivo* metabolikus stabilitást a farmakon injektálása után 60 perccel határoztuk meg. Az *in vivo* stabilitási eredmények jól korreláltak az *in vitro* eredményekkel, mivel a vizeletben nem találtunk radioaktív-metabolitot. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy az újonnan szintetizált radiotracer stabil maradt a szervezetben a keringés és a kiválasztás során, és ez elegendő volt további *in vivo* kísérletek elvégzéséhez. A megoszlási együttható meghatározásával azt találtuk, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB logP értéke $-3,63 \pm 0,04$ volt, ami erősen hidrophil tulajdonságokra utal. Ezt megerősítették a dinamikus *in vivo* PET képalkotó és *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatok, mert a várakozásoknak megfelelően a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB elsősorban a vesén keresztül ürült ki. Ugyanezen tulajdonságokat igazolták korábban a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-HP β CD esetén, amely szintén erősen hidrophil volt (logP: $-3,07 \pm 0,11$). A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-HP β CD felhalmozódása a SCID egerek más szerveiben elhanyagolható volt, és az időaktivitás görbék azt mutatták, hogy gyorsan eliminálódott a testből. Ezek az eredmények összhangban vannak más kutatók eredményeivel, ahol a vesén keresztüli gyors eliminációt figyelték meg embereken és patkányokon végzett vizsgálatok során jelöletlen és radioaktívan jelölt HP β CD-vel. Az *ex vivo* (ID%/g) és az *in vivo* (SUV-k) összehasonlítása során alacsonyabb $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB felhalmozódást figyeltünk meg a hasi és mellkasi szervekben és szövetekben, mint a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-HP β CD esetén. A szervek felvételi aránya azonban egymáshoz viszonyítva megegyezett. Továbbá a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB esetében mérsékelt tüdőakkumulációt is megfigyeltünk az *ex vivo* mérések során. A lehetséges okokat már leírták a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-HP β CD vizsgálataiban: ez alapján az erősen hidrophil RAMEB képes a tüdő vízrekeszeiben felhalmozódni, és onnan egy idő után visszatérni az egerek keringési rendszerébe. Azonban mikor biológiai eloszlási vizsgálatokat végeztünk PGE2 jelenlétében, a NODAGA-RAMEB-et intravénásan 1 mg PGE2-vel együtt adtuk be. Megállapítottuk, hogy a radiotracer nem ürül ki gyorsan a szervezetből. A radioaktivitás a szervezetben maradt 90 perccel az injekció beadását követően. Ennek a megfigyelésnek az egyik magyarázata lehet, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB -PGE2 komplex egy közepesen megnagyobbodott molekula, kevésbé hidrophil, és ezek a tulajdonságok megakadályozzák a gyors vesén keresztüli eliminációt így növelve a keringési időt a vérben. Egy másik ok lehet a PGE2 és a vérplazmafehérjék kölcsönhatása, amelyek szintén növelhetik a keringési időt.

A szakirodalomban megjelent, hogy a prosztaglandinok képesek komplexet alkotni a béta-ciklodextrinokkal (Inoue és mtsai., 2016). Azt szeretnénk volna megnézni, hogy ez a komplexképződés

in vivo is megtörténik-e, és hogyan hat a radioaktívan jelölt [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódására az olyan tumoros szövetekben, amelyek megnövekedett PGE2 receptor sűrűséget mutattak. Emiatt egy kémiai kísérletet hajtottunk végre, mely során összehasonlítottuk a radiotracer-kötő képességet egy szilárd fázisú gyanta és egy PGE2-vel konjugált gyanta között. A mért eredmények alátámasztják a közzétett hipotézist, miszerint a PGE2 konjugált gyanta lényegesen nagyobb aktivitást mutat, mint a módosítatlan gyanta. Ez az eredmény azt bizonyíthatja, hogy a PGE2 jelentős szerepet játszik a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB tumorfelvételét illetően.

Munkánk következő szakaszában *in vivo* PET képalkotással kívántuk igazolni a ⁶⁸Ga-mal jelölt NODAGA-RAMEB molekula PGE2-szelektivitását. Tumor indukcióhoz CB17 SCID egerekben BxPC-3 és PancTu-1 hasnyálmirigy karcinóma sejtvonalatokat használtunk. Kutatásunk során az EP2 receptorok figyelemre méltó jelenlétét találtuk BxPC-3 daganatokban, míg alacsonyabb receptor expressziót a PancTu-1 daganatokban. Eredményeinket immunhisztokémiával is megerősítettünk, miszerint szubkután növekvő BxPC-3 daganatok megőrizték ezt a tulajdonságot *in vivo* kísérletek során is.

Ezek a különbségek a BxPC-3 és a PancTu-1 daganatok között világosan láthatóvá váltak az *in vivo* PET képalkotás és az *ex vivo* gamma számláló mérések segítségével, a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB intravénás injekciója után. Az kísérleteink alapján a BxPC3 daganatok legmagasabb tumor-izom arányt (T/M) 80-90 perccel a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB injekció beadása után mutattak. A PancTu-1 daganatok és az együtt injektált PGE2 ebben a kísérletsorozatban összehasonlító vizsgálatként szolgáltak. A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB szignifikánsan magasabb felhalmozódást mutatott a ($p \leq 0,01$) a BxPC-3 daganatokban, mint a PancTu-1 daganatokban, melyeket alacsonyabb EP2 receptor expresszió és PGE2 termelés jellemez. A dinamikus PET képeket elemezve azt találtuk, hogy a legmagasabb tumor-háttér arányt (T/M) az injekció beadása után 80-90 perccel kaptuk meg, és ez a magas T/M érték nagyban befolyásolta a kontrasztot és a PET-képek értékelhetőségét a daganatok azonosítása szempontjából. A T/M arány és a PancTu-1 daganatok M SUV értékei körülbelül 10-szer alacsonyabbak voltak, mint a BxPC-3 daganatoké, ami megerősíti a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB magas PGE2-szelektivitását.

Kísérleteinkben a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB és PGE2 együttes injektálása után eltérő farmakokinetikai tulajdonságokat figyeltünk meg. Megállapítottuk, hogy a BxPC-3 daganatok SUV-átlagértékei szignifikánsan ($p \leq 0,01$) magasabbak (kb. 8-9-szeres), mint a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB akkumuláció az együtt injektált PGE2 nélkül. Emellett jelentős radiotracer felhalmozódást figyeltünk meg a háttérszövetekben. Ezekből az adatokból arra a következtetésre jutottunk, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-PGE2 komplex megakadályozza a gyors vese clearance-t és növeli a radioaktívan jelölt RAMEB-PGE2 keringési idejét a vérben, ami a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB lassabb, de magasabb felhalmozódását eredményezi a BxPC-3 daganatokban.

Összességében eredményeink azt sugallják, hogy szoros kapcsolat van a PGE2-EP2 és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB között, de a pontos célzási mechanizmus megértéséhez további vizsgálatokra lesz szükség annak tisztázása érdekében, hogy a radiotracer először a PGE2-höz kötődik, majd együtt kötődik-e az EP2 receptorhoz vagy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB kötődik a már amúgy is EP2 receptor-kötött PGE2-höz? Vagy az is lehetséges, hogy a két folyamat egyidejűleg játszódik le. Dinamikájuk azonban nem teljesen meghatározott.

Továbbá ezeket a folyamatokat nagyban befolyásolhatja a daganat mikrokönyezete, tulajdonságai (pl.: prosztaglandin termelés, hipoxia stb.), valamint az EP2 receptor sűrűség. Összességében a vizsgálatainkban alkalmazott módszerekkel, azelért eredmények megerősítették a szoros kapcsolatot a PGE2 molekula és a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB között, mely eredmények megerősítették a PGE2-célzott *in vivo* PET diagnosztika alapjait. Ezen korábbi eredményeink alapján egy olyan RAMEB származék szintetizálását tűztük ki célul, amely nagy affinitással kötődik a PGE2-pozitív daganatokhoz, és diagnosztikai, valamint terápiás izotópokkal is jelölhető radioaktívan.

Ebből a célból DOTAGA kelátort választottunk a ⁶⁸Ga-mal és ^{205/206}Bi-tal jelölhető farmakonok előállításához (Bernhard és mtsai., 2012). A DOTA és származékai nagy jelentőséggel bíró komplexképző szerek csoportjába tartoznak az orvosi biológiai alkalmazásokban, mivel kiváló komplexképző tulajdonságot mutatnak számos fémionnal szemben és fémkomplexeik kinetikai stabilitása magas (Lattuada és mtsai., 2011; Wadas és mtsai., 2010). Kutatómunkánk során a DOTAGA bifunkcionális kelátképzőt konjugáltuk az NH₂-RAMEB aminocsoportján keresztül. A DOTAGA négy szabad karboxil csoporttal rendelkezik és egy aktivált izotiocianát csoporttal, amely specifikusan képes kapcsolódni a RAMEB aminocsoportjával (Levy és mtsai., 2009; Overoye-Chan és mtsai., 2008). Az olyan típusú bifunkcionális kelátképzők használata során, amelyek aktivált csoportot tartalmaznak, mint például az izotiocianát, nem igényelnek védőcsoport-eltávolítási reakciókat és időigényes kromatográfiás munkát. Az ily módon újonnan szintetizált DOTAGA-RAMEB alkalmas radioaktív jelölésre mind ⁶⁸Ga-mal (A. Anderson & McAnulty, 2013; Filippi és mtsai., 2020) mind ^{205/206}Bi-tal. (Suthiram és mtsai., 2021).

A radioaktív jelölési eljárásokat kutatócsoportunk által korábban kifejlesztett jól bevált protokollok szerint végeztük (Hajdu és mtsai., 2019; Trencsényi és mtsai., 2020), ami magas radiokémiai tisztaságú termékeket eredményezett, a tisztaság RCP 98,0% feletti volt. A ⁶⁸Ga jelölések esetén a generátort ultratiszta sósavval eluáltuk (c = 0,1 M, pH = 1). Az erősen savas közeg (pH < 2) nem megfelelő a radioaktív jelöléshez, ezért az eluátumokat 1 M nátrium-acetáttal puffereltük, hogy a pH-t 4,3–4,5-re állítsuk be (Hacht, 2008; Tsionou és mtsai., 2017). Minden reakció előtt a ⁶⁸Ga-eluátumot puffereltük, és közvetlenül a DOTAGA-RAMEB-hez adtuk amely hatékony, robusztus radioaktív jelölési reakciót eredményezett. A ^{205/206}Bi jelölés esetén a radioaktív jelölési reakciót 8,2–8,5 pH-n kell végrehajtani.

Ebben az esetben a $^{205/206}\text{Bi}$ -oldatot közvetlenül hozzáadtuk az előre pufferelt DOTGA-RAMEB prekursorhoz.

A radioaktívan jelölt DOTAGA-RAMEB származékok alkalmazhatóságát *in vitro* és *in vivo* stabilitási tesztekkel értékeltük. Az *in vitro* metabolikus stabilitás vizsgálatokat 30, 60 és 90 perces inkubációs idő után monitoroztuk a korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan (Hajdu és mtsai., 2019; Trencsényi és mtsai., 2020). A stabilitási vizsgálatok azt mutatták, hogy nem volt szabad ^{68}Ga és $^{205/206}\text{Bi}$ izotóp bomlástermék a 90 perces vizsgálati idő alatt. Az eredmények azt mutatták, hogy a ^{68}Ga vagy $^{205/206}\text{Bi}$ jelölt ciklodextrin származékok egérszérum jelenlétében stabilak maradtak, hasonlóan korábbi vegyületeinkhez, ami fontos az intravénás beadás szempontjából. Az *in vivo* metabolikus stabilitást 60 perccel a ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB intravénás beadását követően értékeltük. Mivel a vizeletben nem találtunk radioaktív metabolitot, megállapítottuk, hogy az *in vivo* stabilitási eredmények összhangban vannak az *in vitro* adatokkal. Ezek a kísérleti eredmények azt bizonyították, hogy az újonnan szintetizált ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB az élő szervezetben stabilak a keringés és a kiválasztás során, ami elengedhetetlen a további *in vivo* kísérletekhez.

A megoszlási hányados meghatározása során megállapítottuk hogy a ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB származék logP értéke $3,47 \pm 0,04$ volt, a $^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB logP értéke $3,45 \pm 0,03$ volt, ami arra utal, hogy ezek az anyagok erősen hidrofílek.

A preklinikai vizsgálatok során először a ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB biológiai eloszlását határoztuk meg egészséges kontroll CB17 SCID egerekben *in vivo* PET képalkotás alkalmazásával. A ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB vizelettel történő kiválasztása volt látható a bomláskorrigált PET képeken. Az átlagos logP-érték -3,5 ami erősen hidrofíli tulajdonságot jelez, alátámasztja ezt a megfigyelést. Ez az eredmény összhangban van a kutatócsoportunk által korábban vizsgált ^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB biológiai eloszlási adataival ahol a vesén keresztüli kiválasztás történt, összhangban a logP értékekkel. (Trencsényi és mtsai., 2020). A többi szervben és a szövetekben alacsony felhalmozódást figyeltünk meg az *in vivo* PET képalkotás során mind a korábban vizsgált ^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB esetében, mind a jelenlegi ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB-nél amelyet a kelátor cseréjével állítottunk elő. Az időaktivitás görbék a nyomjelző gyors kiürülését mutatják. Eliminációs eredményeink összhangban vannak a korábbi, más típusú ciklodextrinekkal (HP β CD) végzett kutatási eredményekkel, amelyek hasonló vizsgálatok során vesén keresztül történő kiválasztódásról számoltak be, embereken és rágcsálókön végzett jelöletlen és radioaktívan jelölt HP β CD esetén.

A preklinikai kutatás második szakaszában a ^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB tumor célzó képességét vizsgáltuk PGE2-pozitív tumort hordozó egerekben *in vivo* PET képalkotással. A PGE2 túlzott expressziója és az EP2 receptor upregulációja jellemezte azokat a BxPC-3 rákos sejteket, amelyeket kísérleteinkben használtunk (Takahashi és mtsai., 2014). A PGE2 receptorok jelenlétét szubkután

növekvő BxPC-3 daganatokban immunhisztokémiai módszerekkel ellenőriztük. Az erős receptor sűrűség miatt túlexpresszálo daganatok pontosan lokalizálhatók *in vivo* PET képalkotás segítségével a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB intravénás injekciója után. A legmagasabb T/M arányt ($2,5 \pm 0,2$) 90 perccel az injekció beadását követően lehetett tapasztalni, ami az értékelés szempontjából a legnagyobb jelentőséggel bír a PET képek közül. Összehasonlítva ezt korábbi vizsgálatainkkal a BxPC-3 daganatok esetében a legmagasabb tumor-háttér arány szintén az injekció beadását követő 80-90 percben volt megfigyelhető (Trencsényi és mtsai., 2020). Összegezve az *in vivo* képalkotás eredményeit arra a következtetésre jutottunk, hogy a kelátképző cseréje nem befolyásolta a biológiai eloszlást, sem a PGE2 pozitív tumorsejtek célzását a ⁶⁸Ga-val jelölt RAMEB esetén. Mivel a ^{205/206}Bi fizikai jellemzői miatt nem lehetett PET szkennelvel elvégezni a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB összehasonlító szerveoszlás vizsgálatát, ezért azt gammaszámláló segítségével vizsgáltuk. Az *ex vivo* kísérletek %ID/g eredményei alapján statisztikailag szignifikáns különbséget nem észleltünk szervek és szövetek felvétele között 30 és 60 perccel az injekció beadása után a két radiotracer esetében. Azonban a 90. percben eltérő radiofarmakon felvételt figyeltünk meg. A [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGARAMEB felhalmozódás mindvégig alacsony volt az egyes szervekben. Ezek az adatok összhangban vannak az *in vivo* PET vizsgálat eredményeivel és a korábbi [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB, valamint a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-HPβCD kutatások eredményeivel (Hajdu és mtsai., 2019; Trencsényi és mtsai., 2020). Ezzel szemben a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB mérsékelt felhalmozódását figyeltük meg a lépben, a vastagbélben és a zsírszövetben, mely nem jellemző a hidrofil molekulákra. Ezen eredmények megértése további kutatásokat igényel.

6. Összefoglalás

A ciklodextrinek felhasználása a gyógyszeriparban nagyon sokrétű. Kiváló gyógyszerhordozó tulajdonságaik mellett egyes ciklodextrinek önmagukban is gyógyszernek minősülnek. Doktori tanulmányaim során kelátorral módosított random metilezett béta ciklodextrin származékok radiojelölését, karakterizálását és *in vivo* illetve *ex vivo* vizsgálatát tűztük ki célul. Ezen származékok potenciálisan új radiofarmakonokként szolgálhatnak a hasnyálmirigy tumor diagnosztikájában és terápiájában.

Első kísérlet-sorozatunkban olyan radiojelzett ciklodextrin származékot [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB állítottunk elő, mely alkalmasnak bizonyult a BxPC-3 hasnyálmirigy adenokarcinóma tumor kimutatására. A RAMEB-et NODAGA kelátorhoz kapcsolva sikeresen jelöltük ⁶⁸Ga izotóppal, ezután analitikai vizsgálatoknak vetettük alá. Reprodukálható, magas radiokémiai tisztaságú radiofarmakont kaptunk, melyet széles körben teszteltünk preklinikai *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* vizsgálatok során. Ezen vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB metabolikus stabilitása kiváló, képes specifikusan halmozódni a tumorban, a vizeletkiválasztó rendszeren keresztül eliminálódik a szervezetből, és nem halmozódik más szervekben.

Második kísérletsorozatunkban a diagnosztikus izotópot terápiás izotópra cseréltük, ezáltal olyan ciklodextrin származékot állítottunk elő, mely alkalmas lehet BxPC-3 hasnyálmirigy adenokarcinóma tumor terápiájára. A RAMEB-hez DOTAGA kelátort kapcsolunk, melyet első kísérletünkben ⁶⁸Ga izotóppal, majd külön kísérletben ^{205/206}Bi izotóppal radioaktívan jelöltünk. Két magas radiokémiai tisztaságú, reprodukálható, radiofarmakont kaptunk, a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB- et és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB- et. Mindkét radiógyógyszert széleskörű biológiai vizsgálatoknak vetettük alá, mely során megállapítottuk, hogy specifikusan halmozódnak a hasnyálmirigy tumor sejtekben, jellemzően renálisan ürülnek, és nem mutatnak specifikus halmozódást más szervekben.

Ezen eredmények alapján a ciklodextrinek rendkívül széleskörű gyógyszeripari felhasználása új területtel bővíthet.

7. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**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/420/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csige Katalin
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Csige, K.**, Péli-Szabó, J., Kálmán-Szabó, I., Dénes, N., Szikra, D. P., Képes, Z., Opposits, G., Méhes, G., Kertész, I., Fenyvesi, F., Trencsényi, G., Hajdu, I.: In vivo investigation of Gallium-68 and Bismuth-205/206 labeled beta cyclodextrin for targeted alpha therapy of prostaglandin E2 receptor-expressing tumors in mice.
Int. J. Pharm. 625, 1-10, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122132>
IF: 5.8
2. Trencsényi, G., Kis, A., Péli-Szabó, J., Ráti, Á., **Csige, K.**, Fenyvesi, É., Sente, L., Malanga, M., Méhes, G., Emri, M., Kertész, I., Vecseryés, M., Fenyvesi, F., Hajdu, I.: In vivo preclinical evaluation of the new 68Ga-labeled beta-cyclodextrin in prostaglandin E2 (PGE2) positive tumor model using positron emission tomography.
Int. J. Pharm. 576, 1-35, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118954>
IF: 5.875



8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Hajdu Istvánnak a kitartó támogatást és szakmai segítséget, mellyel hozzájárult kutatómunkám elkészítéséhez. Köszönöm, hogy bármikor számíthattam szaktudására ötleteire, tanácsaira, rengeteg türelmére, emberségére. Köszönöm az építő kritikáit és áldozatos munkáját.

Köszönöm Prof. Dr. Berényi Ervin intézetigazgató úrnak, és Dr. Trencsényi György tanszékvezető úrnak, hogy lehetőséget és helyet biztosítottak kutatómunkám elvégzésére. Hálásan köszönöm a közlemények társszerzőinek áldozatos munkáját.

Köszönettel tartozom a jelenlegi munkahelyemnek, a Richter Gedeon Nyrt. Nőgyógyászati Marketing Osztály vezetőjének Kassainé Dr. Tánczos Rózsának, és Dr. Kristály Zsuzsannának, hogy engedélyezték a PhD képzésbe való belépésemet.

Szeretettel köszönöm a családom, a kislányom, a vőlegényem és szüleim szeretetét és türelmét, hogy nyugodt körülményeket biztosítottak céljaim eléréséhez.

Munkám létrejöttéhez anyagi támogatást nyújtott a következő pályázat: EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 „Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése”