

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Csige Katalin

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

**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2023.**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Csige Katalin

Témavezető: Dr. Hajdu István



**DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2023.**

Tartalom

1. Bevezetés.....	9
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1. Ciklodextrinek.....	10
2.2. A ciklodextrinek felhasználási területei a gyógyszeriparban	10
2.2.1. A Ciklodextrinek segédanyagként történő alkalmazása a gyógyszerformulálásban	10
2.2.2. A ciklodextrin a gyógyszer biológiai hozzáférhetőségére gyakorolt hatása.....	11
2.2.3. A CD gyógyszerbiztonságosságra gyakorolt hatása.....	12
2.2.4. A CD-k hatása a gyógyszerstabilitásra.....	12
2.2.5. Ciklodextrinek mint új gyógyszer szállító rendszerek	12
2.3. Ciklodextrin-származékok, mint aktív gyógyszerek. (Active Pharmaceutical Ingredients (API)).....	13
2.3.1. A (2-Hidroxi-propil) - β -ciklodextrin (HP- β -CD) alkalmazása a C-típusú Niemann-Pick- (NPC) kór kezelésére.....	13
2.3.2. CD-k a GM1-gangliosidózis kezelésére.....	13
2.3.3. HP- β -CD mint anti leukémiás gyógyszer.....	14
2.3.4. Folsavhoz kötött metil- β -CD.....	14
2.3.5. Metil- β -CD, mint a megtermékenyítést elősegítő szer.....	14
2.4. Orvosi képalkotás	15
2.4.1. Radiojelölt ciklodextrin alapú kontrasztanyagok	17
2.4.2. A ciklodextrinek felhasználása pozitron emissziós tomográfia PET képalkotó szerként....	18
2.5. Orvosi képalkotási eljárások.....	19
2.5.1. Molekuláris képalkotás definíciója.....	19
2.5.2. Funkcionális képalkotás	19
2.5.3. Anatómiai vizsgálatok	20
2.5.4. Pozitron emissziós tomográfia- mágneses rezonancia képalkotás (PET/MRI)	21
2.5.5. Laboratóriumi Kisállat PET	21
2.5.6. A PET lehetőségei a kisállat-képalkotásban.....	23
2.5.7. Kihívások a kisállat-PET alkalmazásokban	23
2.5.8. Kisállat PET az onkológiában	24
2.6. Alkalmazott PET-radionuklidok és PET-radiofarmakonok	24
2.6.1. Radionuklid generátorok	25
2.6.2. A gallium.....	26
2.6.3. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorok	26
2.6.4. A Bizmut	28
2.7. Kelátorok	29

2.7.1. A DTPA (dietilén- triamin-pentaecetsav) kelátor	30
2.7.2. A DOTA (1,4,7,10,-tetraazaciklododekán-N, N', N'',N'''-tetraecetsav) kelátorok	30
2.7.3. A NOTA (1,4,7- triazaciklononán- N, N', N'' -triecetsav) kelátorok	31
2.8. Hasnyálmirigy karcinóma	32
2.8.1. A hasnyálmirigy tumor diagnosztikája	34
2.8.2. Proszttaglandin E2	35
3. Célkitűzés	36
4. Anyagok és módszerek	37
4.1. Anyagok és eszközök	37
4.2. Monoamino-RAMEB konjugálási reakciója NODAGA kelátorral	39
4.3. Preparatív és analitikai RP-HPLC	39
4.4. Monoamino-RAMEB konjugálási reakciója DOTAGA kelátorral	40
4.5. A $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor megfelelő elúciójának kidolgozása	40
4.6. $^{205/206}\text{Bi}$ izotópok előállítása és tisztítása.	41
4.7. NODAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal	41
4.8. DOTAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal	42
4.9. DOTAGA-RAMEB radiojelölése $^{205/206}\text{Bi}$ izotóppal	42
4.10. 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 hányados (megoszlási együttható) meghatározása	43
4.11. A ^{68}Ga Ga-NODAGA-RAMEB gyantakötés vizsgálata	43
4.12. Az <i>in vitro</i> metabolikus stabilitás meghatározása	44
4.13. Az <i>in vivo</i> metabolikus stabilitás meghatározás	44
4.14. Alkalmazott tumor modellek	44
4.15. MiniPET képalkotás	45
4.16. MiniPET adatok elemzése és értékelése	46
4.17. <i>Ex vivo</i> biodisztribúciós vizsgálatok	46
4.18. Immunhisztokémia	47
4.19. Statisztikai elemzés	47
5. Eredmények	48
5.1. Kémia	48
5.1.1. NODAGA-RAMEB előállítása	48
5.1.2. Monoamino -RAMEB konjugálási reakciója DOTAGA kelátorral	51
5.2. Radiokémia	53
5.2.1. NODAGA-RAMEB jelölése ^{68}Ga izotóppal	53
5.2.2. A DOTAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal	54
5.2.3. DOTAGA-RAMEB radiojelölése $^{205/206}\text{Bi}$ izotóppal	56

5.3. 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 hányados (megoszlási együttható) meghatározása	57
5.4. A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB gyantakötés vizsgálata.....	57
5.5. <i>In vitro</i> metabolikus stabilitás meghatározása.....	58
5.6. <i>In vivo</i> metabolikus stabilitás	59
5.7. MiniPET képalkotás	60
5.7.1. Szervi eloszlás vizsgálatok egészséges kontroll egereken.....	60
5.7.1.1. A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB biológiai eloszlásának meghatározása.....	60
5.7.1.2. [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB szervi eloszlásának vizsgálata	62
5.8. <i>In vivo</i> biológiai eloszlási vizsgálatok daganatos SCID egereken.....	64
5.8.1. A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitása BxPC-3 tumort hordozó SCID egerekben PGE2 alkalmazása mellett	64
5.8.2. A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitása PancTu-1 daganatot hordozó SCID egerekben.....	66
5.9. A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB biológiai eloszlásának <i>in vivo</i> értékelése BxPC-3 daganatot hordozó egerekben	68
5.10. <i>Ex vivo</i> biodisztribúciós vizsgálatok	69
5.10.1. A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB <i>ex vivo</i> biológiai eloszlási vizsgálatok egészséges kontroll egereken.....	69
5.10.2. A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB <i>ex vivo</i> biológiai eloszlási vizsgálatok daganatot hordozó SCID egereken	70
5.10.3. A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB <i>ex vivo</i> biológiai eloszlás elemzése BxPC-3 daganatot hordozó egerekben.....	72
5.11. Immunhisztokémia	75
6. Megbeszélés	76
7. Összefoglalás.....	84
8. Summary	85
9. Irodalomjegyzék.....	86
9.1. Az előző fejezetekben hivatkozott közlemények jegyzéke	86
9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke.	109
10. Tárgyszavak.....	111
11. Ábrák és táblázatok jegyzéke	112
12. Köszönetnyilvánítás	115
13. Függelék.....	116

Rövidítések jegyzéke

AML	akut limfoblaszt leukémia
API	aktív gyógyszer
BxPC-3	humán adenokarcinóma sejtek
CB17 SCID	immunhiányos egerek
CD	ciklodextrin
CDP	konjugált kamptotecin béta-ciklodextrin molekula
CML	krónikus mieloid leukémia
COX-2	ciklooxygenáz- 2
CT	computer tomográf
D/CD	gyógyszer-ciklodextrin komplex
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DCM	diklórmétán
DIPEA	N,N-diizopropil-etil-amin
DMSO	dimetil szulfoxid
DM-α-CD	dimetil alfa ciklodextrin
DOTA	1,4,7,10- tetraazaciklododekán-N, N', N'', N'''-tetraecetsav
DOTATOC	DOTA- [Tyr ³]-oktreotid
DTPA	dietilén- triamin-pentaecetsav
EA1	ganglioizidózis betegek fibroblasztjaiból származó sejt
EUS	endoszkópos ultrahang
FA-M-β-CD	foláthoz kötött metil béta ciklodextrin
GM1	ganglioizidózis
HB-β-CD	2-hidroxi-butyl-p-ciklodextrin

HE-β-CD	2-hidroxi-etil-béta-ciklodextrin
HP-β-CD	2-hidroxi-propil-béta-ciklodextrin
HP-γ-CD	a 2-hidroxi-propil-gamma-ciklodextrin
logP	oktanol/PBS megoszlási hányados
MDCT	multidetektoros komputertomográfia
MiniPET-II	dedikált kisállat PET-szkenner
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
MS	tömegspektrometria
M-β-CD	metil béta ciklodextrin
NODAGA	1,4,7-triazaciklononán,1-glutársav-4,7-diecetsav
NOTA	1,4,7- triazaciklononán- N, N', N'' -triecetsav
NPC	C-típusú Niemann-Pick-kór
PAI	fotoakusztikus képalkotáshoz
PancTu-1	humán adenokarcinóma sejtek
PBS	foszfát pufferolt sóoldat
PC	pankreász karcinóma
PET	pozitron emissziós tomográf
PGE2	prostaglandin E2
PyBOP hexafluorophosphate	benzotriazol-1-yloxytrypirrolidinophosphonium
RAMEB	random metilezett béta ciklodextrin
RP-HPLC	fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia
siRNS	rövid interferáló ribonukleinsav
SPECT	egyfoton emissziós számítógépes tomográf
SUV	standardizált szövetfelvétel

T1	relaxációs idő
Tf	transzferin
TRIS	2-amino-2-(hidroxi-metil)-1,3-propándiol
u.p. HCl	ultratiszta sósav
US	ultrahang
VOI	hasznos térfogat
α-CD	alfa ciklodextrin
β-CD	béta-ciklodextrin
γ-CD	gamma-ciklodextrin

1. Bevezetés

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 tünete szegény, 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.

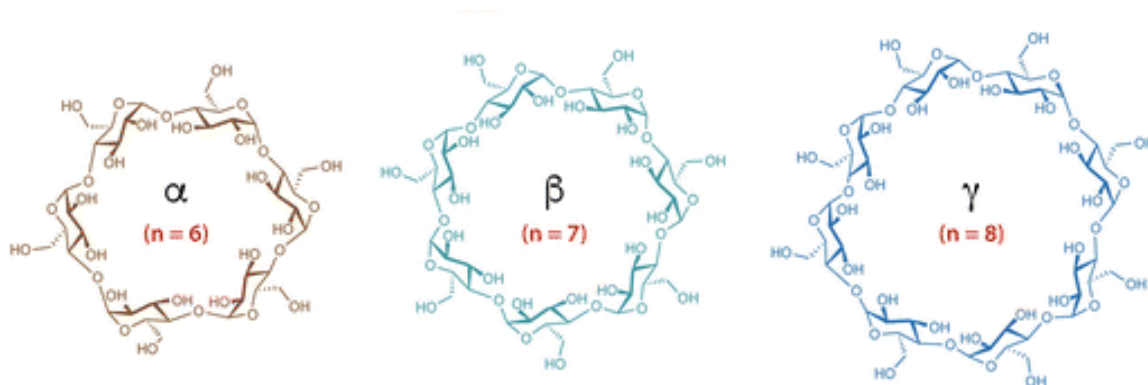
Rendkívüli érzékenysége és nagy felbontása miatt a pozitron emissziós tomográfia (PET) olyan nem invazív képalkotó módszer, amely alkalmas többek között a hasnyálmirigy adenokarcinóma kimutatására, stádiumának meghatározására, és a korai áttétek felismerésére. Ezzel párhuzamosan egyre nagyobb igény mutatkozik 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.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Ciklodextrinek

A ciklodextrinek (CD) olyan a természetben is előforduló nem redukáló ciklusos oligoszacharidok, amelyek α -1,4 glükózid kötésekkel összekapcsolódó glükóz egységekből állnak. (Stella & He, 2008), (Jansook és mtsai., 2018) Három fő típusuk van, aszerint, hogy hány glükóz alegységet tartalmaznak: az α -CD hatot, a β -CD hetet, a γ -CD pedig nyolcat tartalmaz, gyűrű formát alkotva. A gyűrű formájú ciklodextrin makromolekulák külső rétege hidrofil, vízben jól oldódik, a belső rétege hidrofób, poláros (Del Valle, 2004). Mind a nem-toxikus természetüknek (Stella & He, 2008), (Lai, 2014), (Bellringer és mtsai., 1995), mind a vízdékony tulajdonságuknak (Lofsson és mtsai., 2005; Saokham és mtsai., 2018) köszönhetően számos biotechnológiai (Jambhekar & Breen, 2016; Lofsson és mtsai., 2005, 2005) és gyógyszerészeti felhasználásuk lehetséges, mint oldást könnyítő segédanyag, vagy gyógyszerivő rendszer (Adeoye & Cabral-Marques, 2017; Morin-Crini és mtsai., 2020), illetve nukleinsav transzfer (Lai, 2019; Malhotra és mtsai., 2018).



1.ábra: Az α -ciklodextrin, a β -ciklodextrin és a γ -ciklodextrin kémiai szerkezete

2.2. A ciklodextrinek felhasználási területei a gyógyszeriparban

2.2.1. A Ciklodextrinek segédanyagként történő alkalmazása a gyógyszerformulálásban

A ciklodextrin nagyon fontos szerepet játszik a vízben rosszul oldódó gyógyszerek formulálásában azáltal, hogy javítja a gyógyszer látszólagos oldhatóságát és oldódását komplexképző sajátossága, vagy szilárd diszperzió révén. Hidrofil hordozóként működik a

rosszul oldható gyógyszerek számára komplexképzés által. Tablettákban segíti a gyógyszerek kioldódását, azonban a helyes gyógyszer/CD arány megválasztása sokszor nehéz lehet (Tasic és mtsai., 1992).

A kereskedelemben kapható különféle ciklodextrinek közül a kis moláris százalékban metilezett ciklodextrin tűnik a legerősebb szolubilizátornak. A gyógyszer kristályosságának csökkentése a ciklodextrinekkel való komplexképzés vagy szilárd diszperzió által növeli a látszólagos gyógyszeroldékonyságot és a kioldódási sebességet (Londhe & Nagarsenker, 1999). Ennek eredményeként a ciklodextrinek képesek in situ zárványkomplexekeket képezni az oldóközegben, fokozva ezáltal a hatóanyag oldódását akkor is, ha szilárd állapotban nincs komplexképződés (Becket és mtsai., 1999). A megfigyelések azt mutatták, hogy a HP- β -CD komplexképződése az antibiotikumokkal jelentősen javítja a vízben való oldhatóságot és az antibiotikumok oldhatósága lineárisan nő a koncentrációval (Qian és mtsai., 2008).

2.2.2. A ciklodextrin a gyógyszer biológiai hozzáférhetőségére gyakorolt hatása

A ciklodextrin fokozza a rosszul oldódó gyógyszerek biológiai hozzáférhetőségét azáltal, hogy növeli az oldható hatóanyag mennyiségét, és gyógyszer permeabilitást. Ezt a gyógyszer elérhetővé tételével éri el a biológiai gát felületén, például a bőrön, a nyálkahártyán vagy a szem szaruhártyáján, anélkül, hogy megzavarná a barrierfunkciót lipidrétegekben (Challa és mtsai., 2005). Ilyen esetekben fontos, hogy csak annyi ciklodextrint használjunk, hogy szállítószerként a hatóanyagot a vizes közegbe oldjuk, mivel a többlet csökkentheti a gyógyszer hozzáférhetőségét. (Loftsson és mtsai., 2007; Vandoorne, 1993) A vízben oldódó gyógyszerek esetében a ciklodextrinek növelik a gyógyszer permeabilitását a nyálkahártyákra gyakorolt közvetlen hatás révén, és fokozzák a gyógyszer felszívódását és biohasznosulását (Uekama és mtsai., 1983). Beszámoltak arról, hogy a ciklodextrinek koleszterin eltávolító képességük miatt növelhetik a membrán folyékonyságát, ezáltal a sejt lízist. Másrészt a foszfolipidek, különösen a foszfatidil-kolin és a szfingomielin eltávolítása a membránból felboríthatja az egyensúlyi állapotot. A ciklodextrinekkel történő gyógyszer-stabilizálás (Miyake és mtsai., 2000; Uekama és mtsai., 1983) enyhítheti a gyógyszerirritációt, mert csökkentik a gyógyszerrel való érintkezési időt nazális, okuláris, rektális és transzdermális bejuttatás esetén, és jobb biológiai hozzáférhetőséget tesznek lehetővé.

2.2.3. A CD gyógyszerbiztonságosságra gyakorolt hatása

A ciklodextrineket a gyógyszerek okozta irritáció enyhítésére is használják. (Rajewski & Stella, 1996). A megnövekedett gyógyszerhatékonyság és -potenciál, amelyet a ciklodextrin megnövekedett gyógyszer oldékonysága okoz, csökkentheti a gyógyszer toxicitását azáltal, hogy a gyógyszert alacsonyabb dózisokban is hatásossá teszi. A vizsgálatok kimutatták, hogy a β -CD fokozta a ganciklovir antivirális aktivitását a humán citomegalovírus klinikai törzseken, és a gyógyszer hatékonyságának ebből eredő növekedése csökkentette a gyógyszer toxicitását (Nicolazzi és mtsai., 2002). A vízben rosszul oldódó gyógyszerek parenterálisan történő kristályosodásával kapcsolatos toxicitások gyakran csökkenthetők oldható D/CD komplexek képzésével. A gyógyszerek ciklodextrinbe záródása molekuláris szinten megakadályozza azok közvetlen érintkezését a biológiai membránokkal, így drasztikusan csökkenti azok mellékhatásait és helyi irritációját a terápiás előnyök megőrzésével (Uekama és mtsai., 1998).

2.2.4. A CD-k hatása a gyógyszerstabilitásra

A ciklodextrinek javíthatják számos kiszáradás elleni gyógyszer stabilitását, csökkenthetik a hidrolízist, az oxidáció és fotodekompozíció mértékét, és ezáltal növelik a gyógyszerek eltarthatóságát. A ciklodextrin által kiváltott gyógyszerstabilitás-növekedés abból adódhat, hogy gátolja a kölcsönhatást a hordozókkal és a gyógyszer biokonverzióját a felszívódás helyén. Azáltal, hogy a ciklodextrin molekuláris pajzsot biztosít komplexként kapszulázva a gyógyszert a molekulák szintjén, elszigeteli azokat a különféle lebontó folyamatokkal szemben. A ciklodextrinek stabilizáló hatása szerkezeti sajátosságának köszönhető.

2.2.5. Ciklodextrinek mint új gyógyszer szállító rendszerek

A ciklodextrinek azon képességük miatt, hogy komplexet képeznek vagy funkcionálisan működnek, a gyógyszerkészítményekben potenciális jelöltként szolgálhatnak, mint hordozóanyagok, mivel képesek célzottan eljuttatni és stabilizálni gyógyszereket a szervezetben. Alkalmazzák néhány újszerű szállítórendszer tervezésében, mint a liposzómák, mikrogömbök, ozmotikus pumpa, peptid- és fehérjeszállítás, konkrét helycélzás és nanorészecskék esetén, ahol célzottan kell kiengedni a hatóanyagot a megfelelő terápiás hatások elérése érdekében. Például kémiai gyógyszeradagolás, vastagbél-specifikus gyógyszeradagolás, agyi gyógyszeradagolás vagy agyi célzás stb. A tanulmány azt sugallta, hogy különböző felszabadulás-szabályozott készítmények megtervezhetők különböző CD-konjugátumok alkalmazásával. (Kamada és mtsai., 2002).

2.3. Ciklodextrin-származékok, mint aktív gyógyszerek. (Active Pharmaceutical Ingredients (API))

A CD-k első alkalmazása API-ként a Bridion® nevű gyógyszerben történt, amely jól tolerálható, neuromuszkuláris blokádnak visszafordítására szolgáló szer. (Jahr és mtsai., 2015) Ez paradigmaváltás volt a CD-k tanulmányozásában. Ezt követően számos kísérletet végeztek új, CD-alapú API-k készítésére.

2.3.1. A (2-Hidroxipropil) - β -ciklodextrin (HP- β -CD) alkalmazása a C-típusú Niemann-Pick-(NPC) kór kezelésére

Az NPC egy gyógyíthatatlan betegség, amely során egy enzim hibája folytán szfingomielin (a zsírsavak egyik terméke) vagy koleszterin halmozódik fel az endoszómákban, amelyek akadályozzák a koleszterin intracelluláris transzportját, vagy lizoszómák általi felvételét. Több vizsgálat is kimutatta, hogy a HP- β -CD javítja a koleszterin anyagcserét a lizoszómákban, és több héttel meghosszabbíthatja a túlélést. (Camargo és mtsai., 2001; Loftsson és mtsai., 2007; Ottinger és mtsai., 2014; Rosenbaum & Maxfield, 2011). Egy amerikai NPC-beteg ikerpárnál HP- β -CD infúziót alkalmaztak orvos által vezetett klinikai vizsgálatban, melynek eredményeként sikerült csökkenteniük a betegek tüdőkárosodását. Mindeközben (Kondo és mtsai., 2016) különböző koleszterinoldó képességű hidroxilalkilezett β -CD-kről számoltak be, mint például a 2-hidroxietil- β -CD (HE- β -CD) és 2-hidroxibutil- β -CD (HB- β -CD). A két vegyületet vizsgálva az eredmények alapján a koleszterin szolubilizáló képességét, az NPC-rendellenességek csökkentését citotoxicitását tekintve, a HB- β -CD biztonságosabb és hatásosabb lehet NPC1 nullsejtekben, mint a HE- β -CD. Másrészt Soga és mtsai. (Soga és mtsai., 2015) összehasonlították a 2-hidroxipropil- γ -CD-t és a HP- β -CD-t. Arról számoltak be, hogy a 2-hidroxipropil- γ -CD (HP- γ -CD) hatékonyabban csökkentheti a koleszterinszintet és a funkcionális és molekuláris rendellenességek felhalmozódása és helyreállítása tekintetében NPC-beteg eredetű sejtekben, hatékonyabbnak bizonyult, mint HP- β -CD kezelés. Ezenkívül az NPC-s egér modellek azt mutatták, hogy javult a máj állapota és meghosszabbodott a túlélés HP- γ -CD-vel. Így a HP- γ -CD potenciális új gyógyszerjelölt a jövőben ennek a betegségnek a kezelésére.

2.3.2. CD-k a GM1-gangliosidózis kezelésére

A GM1-gangliosidózis a GM1- által kiváltott örökletes betegség, a gangliosidok felhalmozódását jelenti számos szövetben és szervben, elsősorban az agyban. Jelenleg nincsenek kezelési módok, számos kutatás ellenére sem. Azonban 2015-ben Maeda és

munkatársai (Maeda és mtsai., 2015) arról számoltak be, hogy a CD számos fajtája közül a dimetil- α -CD (DM- α -CD) csökkenti GM1-gangliozid szintjét az EA1 sejtekben, amelyet GM1-gangliozidózisban szenvedő betegek fibroblasztjaiból származó egérmodelleken teszteltek egyszeri intravénás injekció formájában. Ezenkívül a DM- α -CD csökkenti a GM1-gangliozid szintet az agyban egy GM1-gangliozid egér- modell vizsgálat alapján. Szerencsére a koleszterin, illetve a foszfolipidek kiáramlását a sejtekből a CD-s kezelés után nem figyelték meg. Ennek eredményeként a CD-k potenciális API-k lehetnek GM1-gangliozidózis esetén is.

2.3.3. HP- β -CD mint anti leukémiás gyógyszer

Kimutatták (Yokoo, 2015), hogy a HP- β -CD önmagában is rákellenes hatással rendelkezik akut myeloidból származó különböző leukémiás sejtvonalakon (AML). Akut limfoblaszt leukémia és krónikus mieloid leukémia (CML) esetén a HP- β -CD csökkentette a koleszterinszintet a sejtekben, ezáltal nyilvánvaló G2/M sejtciklus leálláshoz és apoptózishoz vezetett. Ezenkívül a HP- β -CD alkalmazásával szignifikánsan javult a túlélés leukémiás egér-modellekben. Eközben a HP- β -CD elhanyagolható mellékhatásokat mutatott *in vivo* kísérletekben. Ezek az eredmények lehetővé teszik, hogy a HP- β -CD-t hatékony rákellenes szerként alkalmazzák.

2.3.4. Folsavhoz kötött metil- β -CD

Nemzetközi publikációban számoltak be arról (Grosse és mtsai., 1998), hogy a metil- β -CD (M- β -CD) daganatellenes hatást fejt ki, de nincs szelektivitása a tumorsejteken. Kimutatták (Onodera és mtsai., 2013), hogy a foláthoz kötött M- β -CD (FA-M- β -CD) kiváló és tumorszelektív daganatellenességet mutat mind *in vitro*, mind *in vivo*. Megjegyzendő, hogy FA-M- β -CD intravénás injekció alkalmazását követően daganatos egerekben minden állat több mint 4 hónapig életben volt, elhanyagolható mellékhatásokkal. A legérdekesebb a FA-M- β -CD autofágia által indukált daganatellenes hatása, nem pedig az apoptózis (Onodera és mtsai., 2014). Ezek az adatok arra utalnak, hogy az FA -M- β -CD potenciális egyedülálló daganatellenes API.

2.3.5. Metil- β -CD, mint a megtermékenyítést elősegítő szer

Az *in vitro* megtermékenyítési technológia széles körben elérhető meddőség kezelésére, állattenyésztési célokra és laboratóriumi állatok esetében. Arról számoltak be (Takeo és mtsai., 2008), hogy az M- β -CD hatására drámaian javul az egérsperma megtermékenyítési aránya, a spermium plazmamembránjából történő koleszterin kiáramlásának elősegítésével. Mindamellet fagyasztott spermánál, a termékenységi arány javult az M- β -CD alkalmazásával.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az M- β -CD hasznos lehet, mint a megtermékenyítési arány javítására alkalmazott vegyület.

2.4. Orvosi képalkotás

Több irodalmi példát is találunk arra vonatkozóan, hogy a ciklodextrineket orvosi képalkotó eljárásokhoz használják, gyógyszer szállító rendszerként (Wankar és mtsai., 2020; Ye és mtsai., 2012). Jellemzően robosztusságuk, és jó komplexképző sajátságai miatt esik rájuk a választás (X. Wang és mtsai., 2020; Wankar és mtsai., 2020). A ciklodextrinek esetében a választott kismolekulák általában hidrofóbok, és képesek kötődni a hordozó hidrofób üregéhez. Ennek megfelelően a ciklodextrinek számos hidrofób molekulával alkotnak zárványkomplexet. (Hadagura, é. n.; Rekharsky & Inoue, 1998; X. Wang és mtsai., 2020). Zárványkomplexeknek nevezzük azt a formát, amikor a vendégmolekula, jellemzően kismolekula teljesen vagy részben a hordozó molekula belső üregében enkapszulálódott (Del Valle, 2004; Stella & He, 2008).

Ezen molekuláris enkapszulázási folyamatok befolyásolják a hidrofób vendég molekulák fizikokémiai sajátosságait, javítják az oldhatóságát, valamint a kioldódási sebességét (Del Valle, 2004). A CD-ket vízhez adják, hogy javítsák a vízben nehezen oldódó gyógyszer molekulák oldódását. (Del Valle, 2004). A ciklodextrin külseje kiterjedt hidrogén-kötés hálózatának köszönhetően hidrofil, amely széles körben felhasználható biokompatibilis molekulává teszi. (Del Valle, 2004; Jansook és mtsai., 2018; Stella & He, 2008). Egyrészt ezen strukturális tényezők okán használható fel a ciklodextrin zárványkomplexek képzésére. A töltés és a termodinamika együttesen befolyásolják, hogyan képes komplexet képezni egy CD egy vendégmolekulával (Stella & He, 2008). A komplex képzés hajtóereje számos nemkovalens kölcsönhatást foglal magában, mint például deszolváció, víz eltávolítása a molekula belső gyűrűjéből, Van der Waals kölcsönhatás, hidrofil és hidrogén interakciók (L. Liu & Guo, 2002). A ciklodextrin komplexképződés fő hajtóereje a van der Waals kölcsönhatás és a hidrofób kölcsönhatás, míg a hidrogénkötés és az elektrosztatikus kölcsönhatás leginkább a konformációt befolyásolja a komplexen belül (L. Liu & Guo, 2002).

A CD-ek komplexképző képessége szerves kismolekulákkal úttörő szerepet játszott a szupramolekuláris kémia területén. A közelmúltban sikeresen alkalmaztak CD-ket különböző molekuláris struktúrákban, pl katenánok, rotaxánok, pszeudorotaxánok, polyrotaxánok és más molekuláris gépek felépítéséhez (Hashidzume, 2019; Hashidzume és mtsai., 2014).

Az elmúlt évtizedekben a CD-k kontrasztanyagként és potenciális bioszenzorokként váltak érdekessé az orvosdiagnosztikai képalkotás területén (Lai és mtsai., 2017). A képalkotási eljárások során a ciklodextrineket elsősorban hordozóként használják, kisebb molekulák oldódásának elősegítésére. Néhány esetben azonban a CD egyedülálló szupramolekuláris szerkezete nélkülözhetetlen a képalkotáshoz szükséges jel előállításához. Számos példák vannak CD-t tartalmazó konstrukciókra, amelyek a legkülönbözőbb modern képalkotó technológiákkal leképezhetők (Lai és mtsai., 2017).

A mágneses rezonancia képalkotás (MRI) volt az első olyan képalkotó módszer, amely ciklodextrin alapú kontrasztanyagokat alkalmazott (Aime, 1991). A CD-alapú MRI kontrasztanyagok kontrasztot hoztak létre a víz protonjainak spinrács relaxációs (T1) idejének csökkentésével. Két különböző bevett módszer létezik a CD-alapú MRI kontrasztanyagok szintézisére: (1) host-guest kölcsönhatások a CD-üreg és a fém-szerves komplexek között (Aime, 1991; Aime és mtsai., 1997) és (2) a CD-k fém-szerves komplexekhez való közvetlen konjugálásával a CD-molekula külső hidroxil csoportjain keresztül (Barge és mtsai., 2007). A T1 relaxációs idő csökkentésével a CD-alapú kontrasztanyagok képe jelentősen kontrasztosabb, mint a fém-szerves molekula komplexeké önmagukban (Aime és mtsai., 1997; Carrera és mtsai., 2007).

A közelmúltban volt arra példa, hogy a ciklodextrineket kontrasztanyagként alkalmazták ultrahang (US) és fotoakusztikus képalkotáshoz (PAI). A kontraszt létrehozásának mechanizmusa a biológiai szövet és a CD-alapú szerek közötti lényeges impedancia különbségeken alapul (Yao és mtsai., 2014). A PAI képalkotás mechanizmusa bonyolultabb: a PAI tracer melegítés hatására elnyeli a fényt. Amikor emelkedik a hőmérséklet, a kontrasztanyag thermoelasztikus táguláson megy keresztül, amelynek eredménye ultrahang hullámokat emittál, amelyek ultrahang vevővel érzékelhetőek (Laramie és mtsai., 2018; Weber és mtsai., 2016). A kifejlesztett CD-alapú fotoakusztikus kontrasztanyagok az infravörös tartományban nyelték el a fényt (Y. Wang és mtsai., 2017; Yu és mtsai., 2017).

Végül több CT (computer tomográf) vizsgálatot is végeztek a CD-alapú kontrasztanyagok hatékonyságát vizsgálva (Lin, W és mtsai., 2017; Zhou és mtsai., 2014). Valamennyi fejlesztés a CD-alapú nanorészecskékre összpontosított, amelyek fématomokat (Au, Yb, Dy) tartalmaztak (Lin, W és mtsai., 2017; C. Zhang és mtsai., 2019; Zhou és mtsai., 2014, 2014). A nagy rendszámú elem jelenléte növeli a röntgen adszorpciók együtthatót, így növelve a kontrasztot.

Ezek a CD-alapú kontrasztanyagok jobb teljesítményt mutattak a hagyományos jódot alapú CT-szerekhez képest (Lin, W és mtsai., 2017).

2.4.1. Radiojelölt ciklodextrin alapú kontrasztanyagok

A PET és a SPECT olyan képalkotó eljárások, amelyek radioaktív jelölést igényelnek a tomográfiai képek előállításához. Ezek a rendszerek jobb érzékenységgel és mélyebb szöveti behatolással rendelkeznek, mint a lumineszcencia alapú képalkotás (Sk és mtsai., 2020); működésükhöz kisebb dózisu képalkotó szerre van szükségük. A PET/SPECT nyomjelzők alkalmazása azonban a radioaktívan jelölt izotópok felezési idejére korlátozódik, ill. ezen anyagok biológiai eloszlására az élő szervezetben. Az első CD-alapú PET képalkotást 2007-ben Bartlett és mtsai. végezték. (Bartlett és mtsai., 2007). Az első CD-alapú transzferin (Tf) targetált nanorészecskéket siRNS szállítóként alkalmazták a tumorsejtekhez. A nem-targetált, és a Tf- targetált siRNS nanorészecskéket ciklodextrint tartalmazó polikation felhasználásával szintetizálták. Az adamantán PEG-et tartalmazó nanorészecskék felszínét 1%-ban Tf-fel módosították. Az siRNS-t az 50-es végen DOTA-val konjugálták a további ^{64}Cu jelölés okán. (Bartlett és mtsai., 2007) A MicroPET a Tf -targetálás elhanyagolható hatását tárta fel ligandum célba juttatása valamint NP-k a biológiai eloszlásának befolyásolása terén.

Érdekes módon a CD jelenléte a terápiás vegyületekben lehetővé teszi a radioizotópos jelölést a gyógyszer cirkuláció vizsgálatára PET képalkotási eljárással. Az IT-101, klinikailag kifejlesztett, a rák kezelésére szolgáló gyógyszer *in vivo* biológiai eloszlását Neuro2A daganatos egereken vizsgálták. Az IT-101 egy β -CD alapú polimerekkel (CDP) (amely az aktív molekula hordozórendszere) konjugált kamptotecin molekula (CPT). A CDP jelölése DOTA komplexen ^{64}Cu -val történt a micro PET képalkotáshoz; az így kapott nanorészecske hasonló volt az IT-101 szerkezetéhez. A ^{64}Cu -IT-101 plazma farmakokinetikáját 1, 4 és 24 órával az injekció beadása után vizsgálták microPET/CT -vel. Kimutatták, hogy egy kis molekulatömegű frakció gyorsan kiürül a veséken keresztül, míg a fennmaradó NP-k ≈ 13 óra terminális felezési idővel keringtek, két fázisu eliminációs profilt adva. Biodisztribúciót az IT-101 beadása után 24 órával megvizsgálták; a legmagasabb szöveti koncentrációt a daganat, majd a máj mutatott.

Egy másik tanulmány, a CD gyógyszerbejuttatásra gyakorolt hatását vizsgálta, valamint CD-alapú SPECT képalkotó ágens kifejlesztésének lehetőségét (Areses és mtsai., 2011). Areses és munkatársai összehasonlították az orálisan beadott poli(anhidrid) nanorészecskék és a ciklodextrint tartalmazó nanorészecskék szerveeloszlását patkányokban. A jelölést a SPECT képalkotáshoz $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -vel végezték.

Liu és munkatársai 2011-ben (Q. Liu és mtsai., 2011) tanulmányozták a NP-k biológiai eloszlásának javítását CD segítségével. Ritkaföldfém ritkaföldfém-olajsav nanorészecskéket állítottak elő és α -CD-vel módosították a vízdékonyság növelése érdekében. Ezeket a komplexeket ^{18}F -ral jelölték mikroPET-képalkotás céljából. Az *ex vivo* és *in vivo* biológiai megoszlást egerekben 5 perc és 2 óra elteltével vizsgálták. Az *ex vivo* képalkotás a nanorészecskék gyors felhalmozódását mutatta a májban (~90,8% injektált dózis (ID)/g) és lépben (~62,5% ID/g) 5 percnél; a májfelvétel további csökkentést mutatott ~57,6% ID/g-ra, míg a lépben való felhalmozódás 18,9% ID/g-kal nőtt az injekció beadása után 2 órával. Az *in vivo* microPET képek összhangban voltak az *ex vivo* biológiai eloszlási eredményekkel, és intenzív radioaktív jeleket mutattak a májban és lépben 5 perccel az injekció beadása után.

2.4.2. A ciklodextrinek felhasználása pozitron emissziós tomográfia PET képalkotó szerként

Másodsorban a PET- pozitron emissziós tomográfia esetén is van arra példa, hogy CD alapú molekulákat használnak képalkotó szerként.(Bartlett és mtsai., 2007). A PET izotópok pozitront emittálnak, amelyek annihiláció során elektronnal párt képeznek és két, egymással ellentétes irányban távozó gamma-fotonná alakulnak át, amelyeket detektálunk (Gomes és mtsai., 2020) A CD- alapú PET tracerek két osztályra bonthatók: az első osztály radioaktívan jelölt, CD-alapú nanorészecskéket (NP-ket) tartalmaz, általában ^{64}Cu (Bartlett és mtsai., 2007) vagy ^{18}F izotópot (Gomes és mtsai., 2020). Egy másik, nemrég kifejlesztett PET képalkotó anyag ^{68}Ga -mal jelölt p-NCS-benzil-NODA-GA (NODAGA) kelátképzőhöz konjugált CD-molekulákat tartalmaz (Hajdu és mtsai., 2019; Trencsényi és mtsai., 2020). Illetve, emellett CD-alapú kontrasztanyagokat fejlesztettek SPECT (single photon emission computed tomography) eljárásokhoz. A SPECT kontrasztanyagként használt ciklodextrin alapú nanorészecskéket $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mal (Areses és mtsai., 2011) vagy ^{125}I -dal jelölték.

2.5. Orvosi képalkotási eljárások

2.5.1. Molekuláris képalkotás definíciója

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

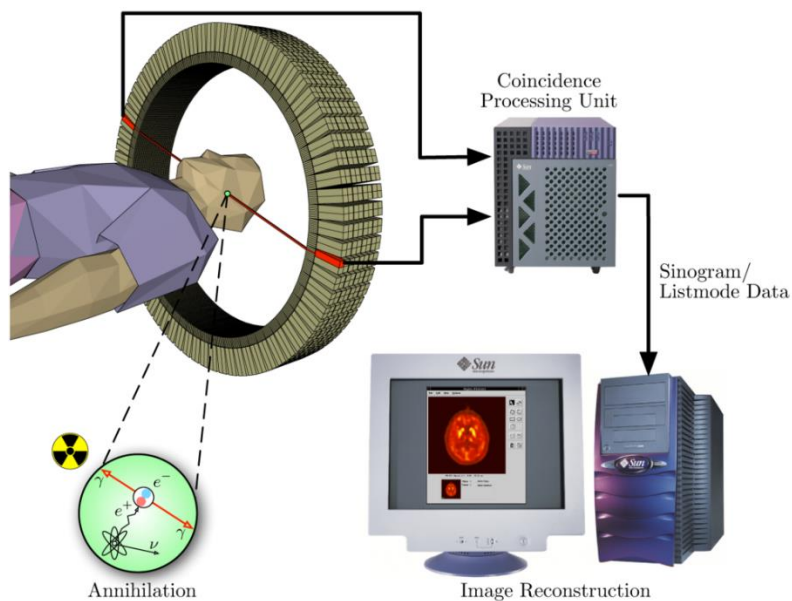
(Mankoff és mtsai által publikált definíció(Mankoff, 2007))

2.5.2. Funkcionális képalkotás

Pozitron emissziós tomográfia (PET)

A PET az egyik legmodernebb orvosi képalkotó eljárás, mely során pozitront sugárzó izotópokkal jelölt molekulák segítségével ábrázolja a szervezet biokémiai folyamatait. A radioaktív izotóp bomlásakor pozitront bocsát ki, amely a szövetekben megtett út végén az ún. annihiláció során elektronnal párt képez és két, egymással ellentétes irányban távozó gamma-fotonná átalakul.

A pozitronemissziós tomográfia (PET) képeket generál a pozitronsugárzók eloszlásáról az élő szervezetben. A PET-rendszereknél β^+ sugárzó radionuklidokat alkalmaznak. A magból kilökődött pozitron elektronnal ütközve annihilálódik, és két γ fotont bocsájt ki, melyek ellentétes irányba mozognak, energiájuk 511keV. A páciens körülvevő detektorok az annihiláció helyét lokalizálják. (2. ábra) Az egyes detektorok az eseményeknek csak kis részét detektálják. A PET képalkotás térbeli felbontását korlátozza a pozitronok megsemmisülésének alapvető természete, ahogy a pozitronok az emberi szöveteken keresztül haladnak, az elektronnal párt képezve jelentős irányeltérésen mennek keresztül és kanyargós utat követnek, ahogy feladják mozgási energiájukat.



2.ábra A PET működési sémája

2.5.3. Anatómiai vizsgálatok

PET-CT rendszer

A PET/CT rendszer egyesíti a pozitron emissziós tomográfia (PET) és röntgen komputertomográfia (CT) rendszerét egyetlen betegasztallal rendelkező készülékbe és egységes operációs rendszerbe, hogy a páciens beszkennelhető legyen mindkét módszerrel egy munkamenet során anélkül, hogy elmozdulna az asztalról. Ez egy kombinált rendszer, amely képes összevont képet előállítani, funkcionális és anatómiai összetevőkről, így az orvos mindkét típusú információt együtt tudja értékelni. (3.ábra)



3.ábra PET-CT gép

A jelenleg elérhető leggyorsabb szkennerek 15 perc alatt felvételt készítenek a teljes testről és képesek 1mm-nél kisebb területek detektálására. Ez a szkennelési eljárás lényegesen gyorsabb, informatívabb, mint egy összehasonlítható önálló PET-vizsgálat.

2.5.4. Pozitron emissziós tomográfia- mágneses rezonancia képalkotás (PET/MRI)

A pozitronemissziós tomográfia–mágneses rezonancia képalkotás (PET–MRI) egy olyan hibrid képalkotó technológia, amely magában foglalja a mágneses rezonancia képalkotás (MRI) lágyrész-morfológiai képalkotását és a pozitronemissziós tomográfia (PET) funkcionális képalkotását(Antoch & Bockisch, 2009)

A szimultán PET/MR-detektálást először 1997-ben mutatták be, azonban további 13 évtelt el mire az új detektorteknológiáknak köszönhetően, ezen klinikai rendszerek kereskedelmi forgalomba kerültek.(Luna és mtsai., 2013)

Jelenleg a PET-MRI fő klinikai területei az onkológia (Buchbender és mtsai., 2012a, 2012b; Martinez-Möller és mtsai., 2012) kardiológia (Rischpler és mtsai., 2013) a neurológia(Dimou és mtsai., é. n.) és az idegtudomány(Cho és mtsai., 2013). Jelenleg aktív kutatások folynak az új PET-MRI diagnosztikai módszer fejlesztésére. A technológia egyesíti a szövetek MRI általi funkcionális jellemzését a PET anyagcsere leképezésének érzékenységevel. Ezáltal lehetővé teszi a radioaktívan jelölt sejttípusok és receptorok funkcionális és anyagcsere folyamatainak megismerését

2.5.5. Laboratóriumi Kisállat PET

Számos hagyományos orvosi képalkotó technológia, beleértve a pozitronemissziós tomográfiát (PET) alkalmas kistestű laboratóriumi állatok leképezésére. A PET, mivel rendkívül érzékeny, alkalmas a más eljárások esetén detektálási küszöb alatt maradó alacsony koncentrációjú anyagok vizsgálatára akár receptorszinten is. Ezen készülékek megegyeznek a betegellátásban alkalmazott berendezésekkel, csak kisebb méretben. A PET előnye, hogy nem invazív képalkotó technika, mellyel egy radioaktívan jelölt anyag biológiai eloszlásának teljes időtartama egyetlen élő állatban is meghatározható. Ezenkívül az állat később újra tanulmányozható napokig, hetekig, sőt hónapokig. Mivel ugyanaz az állat minden időpontban használható, önmaga kontrolljaként szolgál kiküszöbölve ezzel a szórást, amely az állatok közötti különbségekből adódik. Egyetlen állat vizsgálható többször PET-tel így biztosíthatva ugyanazokat az adatokat, amelyekhez több tíz állatra lett volna szükség, így kevesebb áldozatot

igénylő a hagyományos invazív technikák alkalmazásához képest. Ez egyértelműen összhangban van a kísérletekben használatos laboratóriumi állatok számának csökkentésére irányuló elvárással, de ugyanolyan fontos, hogy jelentősen csökkentheti a kísérletek költségeit és felgyorsítja az eredmények elérhetőségét. Az adatok minőségének javulását is eredményezheti. Számos pozitronnal jelölt vegyületet szintetizáltak már az elmúlt évtizedekben (Wolf & Fowler, 1987), ezáltal lehetővé téve a mennyiségileg mérendő biológiai folyamatok széles skáláját nem invazívan és ismételten PET által. (Phelps, 2000). A radiotracer nagyon magas érzékenységevel kombinált módszerek, és a rugalmasság az élő biológiai lekérdezéshez specifikus enzimek, fehérjék, receptorok és gének szintjén működő rendszerek teszik a PET-et rendkívül vonzóvá a laboratóriumi állatokon végzett vizsgálatokban. A technika másik fontos előnye az, hogy hidat biztosít az állatmodell és a humán tanulmányok között. Fontos kérdés az állat modellek felhasználásával kapcsolatban, hogy a modell mennyire jósolja meg a humán eredményeket. A PET-hez hasonló technikák biztosítják pontosan ugyanazon kísérletek elvégzésének lehetőségét egérben és emberben, megkönnyítve a közvetlen összehasonlítást és az állatmodell adatainak megfelelő értelmezését. Napjainkban a PET alkalmazási köre kicsi, a laboratóriumi állatok még mindig meglehetősen korlátozott számának köszönhetően, valamint magas a kezdeti felszerelési költség, az állatok korlátozott száma, a PET szkennernek, és a PET nyomjelzők beszerzési költsége miatt. Ennek a technológiának a megismerése, és felhasználása iránti érdeklődés gyorsan növekszik a biológiai tudományok, valamint a gyógyszerészet és a biotechnológia területén is



4.ábra: Kisállat PET-scanner

2.5.6. A PET lehetőségei a kisállat-képalkotásban

A PET kihívása az előzőek fényében egyértelmű. Kompakt, megfizethető, elegendő mennyiségű és teljesítményű (térbeli és időbeli felbontás és érzékenység) tomográfra van szükség. A PET-szkennerek alkalmazása, azért, hogy kvantitatívan mérhessük a biológiai folyamatokat az egér és patkánymodelleken, hatékony eszköz lenne a modern biológiában. A transzgenikus állatok *in vivo* tanulmányozásának képessége, a PET technikák gyors fejlődése, az új gyógyszerek *in vivo* vizsgálatában szinte korlátlan lehetőségeket nyit a kisállatmodelleken végzett kutatások számára. De a PET alkalmazása nem triviális, mert a felbontási és érzékenységi követelmények szigorúak, foglalkozni kell a PET költséggel és összetettségével, mindemellett a PET nyomjelzőkhöz való hozzáférés is nyilvánvalóan korlátozó tényező. Azonban, a PET fontos szerepet játszhat kihasználva a genomprojekt előnyeit, mivel olyan eszköz, amely segíti a fejlesztést és a megfigyelést új genetikai és molekuláris terápiák esetén, az egértől az emberig, méltóvá téve az eljárást a kutatási erőfeszítésekre.

2.5.7. Kihívások a kisállat-PET alkalmazásokban

Számos olyan kérdés merül fel, amelyeket körültekintően kell kezelni állatkísérletekben. Ezek közül néhány hasonló az emberi felhasználásra tervezett PET szkennekerek optimalizálásához.

A PET képalkotó technológia első kihívása egyértelműen a vizsgált alanyok méretbeli különbségből származik. Míg az ember (súlya ~70 kg) a laboratóriumi patkány tömege ~300 g. Ez több mint 200-szoros térfogat csökkenést jelent. A laboratóriumi egerek, ~30 g tömege esetén ez újabb nagyságrendű térfogatcsökkenés. A hasonló képminőség elérése céljából az emberi és kisállat PET-et hasonlóan kell fejleszteni. A rekonstruált térbeli felbontás a miniPET esetén <1 mm minden irányban (<1 μ l térfogatban) szemben a ~10 mm-rel (~1 ml térfogattal) az emberi egészségre jellemző rekonstruált képfelbontású testtanulmányoknál. Ezen méretkülönbségek miatt új megközelítéseket kell alkalmazni mind a detektor anyagában, mind a kialakításában.

A képalkotó műszer abszolút detektálási érzékenységének (a radioaktív bomlás azon része, amely az észlelt esemény) legalább olyan jónak kell lennie, sőt lehetőleg sokkal jobbnak, mint a tipikus klinikai PET-szkennereké. Az észlelt beütések száma felbontási elemenként közvetlenül meghatározza a rekonstruált képek jel-zaj szintjét. Ha az érzékenységi kritérium

nem teljesül, akkor a rekonstruált képeken látható zaj, rontja a térbeli felbontás minőségét. Bár ez a relatív érzékenységsökkenés egérben az emberhez képest, részben nagyobb mennyiségű radioaktivitás injektálással kezelhető, de felmerül néhány alapvető kérdés, amelyek korlátozzák az dózis emelésének mértékét. Egy másik megközelítés az érzékenységi probléma kompenzációjára kifinomultabb rekonstrukciós algoritmusok alkalmazása, amelyek jobban kihasználják a beütések számát.

A beadható radioaktivitás mennyiségét az injekció fizikai térfogata is korlátozza. Ugyanis az egér vér mennyisége mindössze 2,5 ml és maximum körülbelül 0,25 ml a biztonságosan beadható térfogat

Az állatot mozdulatlanul kell tartani a képalkotó vizsgálat időtartama során, ezért szinte minden állati PET-vizsgálat altatásban történik.(Wernick & Aarsvold, 2004).

2.5.8. Kisállat PET az onkológiában

Az onkológiai alkalmazások talán a legjobb lehetőségeket kínálják a kisállat PET számára. A tumormodelleknek nagy a variabilitása egyik állatról a másikra, PET segítségével azonban elérhető az alanyon belüli tervezés. Ezenkívül az elsődleges daganatok vizsgálata gyakran egyszerű, mert ezeket elhelyezhetik a szervtől távol a combban, a vállban vagy az állat hátán. Ebben a háttérkörnyezetben könnyebb a számszerűsítés és a részleges térfogatkorrektciók becsülhetők. A PET képes a teljes állat felmérésére is, lehetővé téve a metasztatázisok terjedésének megfigyelését és nyomon követését.(Wernick & Aarsvold, 2004)

2.6. Alkalmazott PET-radionuklidok és PET-radiofarmakonok

1975-ben megjelent az első pozitron-emissziós transzaxiális tomográf leírása (Ter-Pogossian és mtsai., 1975). A kezdeti időkben a PET története során kismolekulájú farmakonokat alkalmaztak, melyeket a rövid felezési idejű, ciklotronban előállítható nem-fém radionuklidokkal jelöltek. Ezen anyagok dominanciája a klinikumban való alkalmazásban mind a mai napig fennáll, mivel a leggyakrabban továbbra is a ^{18}F , a ^{11}C , ^{13}N és ^{15}O -nuklidokat tartalmazó PET-radiofarmakonokat alkalmazzák.

Az orvoslás egyre személyre szabottabb mivolta és a bővülő orvostudományi tudás miatt specifikusabb radiofarmakonok kifejlesztése szükséges (Kraeber-Bodéré & Barbet, 2014). Receptorszpecifikus ligandok, például antitestek vagy peptidek jelölése kovalens kötéssel nehezen megvalósítható, ezért az irodalomban ^{68}Ga -jelölt-analóg alkalmazását javasolják ^{18}F helyett.(Pohle és mtsai., 2012) Makromolekulák nagy hatékonysággal jelölhetőek

radionukliddal linker-molekulán keresztüli kelátor-egységekkel történő összekapcsolással. Ebben az esetben a targetált receptorral való kapcsolódáshoz szükséges makromolekula-alegységnek intaktnak kell maradnia, és a linker kiválasztásánál fontos, hogy a jelölt farmakon biodisztribúciója a receptor elérését a szervezetben ne akadályozza, vagy ha lehetséges akkor fokozza. Emiatt sok PET-radiofém-radiofarmakont használnak a PET vizsgálatok során preklinikai, elvértve klinikai szinten is.

1.táblázat Leggyakrabban alkalmazott radiofémek, tulajdonságaik, és alkalmazásuk

Radionuklid	β^+ - bomlás (%)	$t_{1/2}$	E_{max} (MeV)	Fontosabb radiofarmakonok	Alkalmazás
^{44}Sc	94,3	3,9h	1,47	^{44}Sc -DOTA-(cRGD)2 (Hernandez és mtsai., 2016) ^{44}Sc -DOTA-NOC (Domnanich és mtsai., 2017)	$\alpha\beta$ 3-integrinek kimutatása Szomatosztatin analóg
^{64}Cu	17,6	12,7h	0,66	^{64}Cu -ATSM (C. J. Anderson & Ferdani, 2009) ^{64}Cu -TETA-OC (C. J. Anderson & Ferdani, 2009)	Hypoxia kimutatása, szomatosztatin analóg
^{68}Ga	89,1	67,7min	1,89	^{68}Ga -DOTA-TOC/ ^{68}Ga -DOTA-TATE/ ^{68}Ga -DOTA-NOC (Yang és mtsai., 2014) ^{68}Ga -DOTA-CPCR4-2 (Gourni és mtsai., 2011) ^{68}Ga -PSMA (Eder és mtsai., 2012)	szomatosztatin analóg, Kemokin-receptor CXCR4 kimutatása, Prosztata tumorok kimutatása
^{82}Rb	95,5	1,3min	3,15	$^{82}\text{RbCl}$ (deKemp és mtsai., 2016)	Myocardialis perfúzió
^{89}Zr	22,7	78,5min	0,9	^{89}Zr -trastuzumab (Dijkers és mtsai., 2010)	HER2-receptor kimutatása

2.6.1. Radionuklid generátorok

A radionuklid generátor az OGYÉI definíciója szerint a következő: „minden olyan rendszer, amely meghatározott anya- radionuklidot (anyaelem) foglal magában; ez az anyaradionuklid leány-radionuklidot (leányelem) termel, amelyet elúcióval vagy egyéb módszerrel nyerünk és radioaktív gyógyszerkészítményekben alkalmazunk. „

(RADIOAKTÍV GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK. Radiopharmaceutica - PDF Free Download, é. n.)

2.6.2. A gallium

A Gallium a periódusos rendszerben a 31.rendszámot viseli, a 13. csoportba (III. főcsoport) tartozó, elemi állapotban ezüstös színű, lágy, mérgező hatású, könnyen nyújtható fém. Paul-Émile Lecoq de Boisbaudran fedezte fel 1875-ben, bár létezését Mengyelejev már 1871-ben megjósolta. A gallium elektronkonfigurációja miatt vegyületeiben + 3-as oxidációs számmal rendelkezik, azonban + 1-es oxidációs számú vegyületei is előfordulnak, amelyek meglehetősen bomlékonyak, éppen ezért ritkák. A gallium hard sav, tehát jellemzően ionos és apoláris Lewis-bázisokkal képez sókat.

A galliumnak összesen 30 izotópja ismert, melyből a legjelentősebb a ^{68}Ga , mert PET képalkotásra használják.

A 68 germánium/68 gallium generátorok fejlesztése az 1970-es évektől (Green & Welch, 1989; Hnatowich, 1977) napjainkig tart, részletes leírások születtek, mind kémiai, mind radiofarmáciai szempontból Meacke által. (Maecke & André, 2007) Azonban klinikailag jelentős fejlődés, valódi előrelépés a ^{68}Ga PET képalkotásban a kétezres évek elejéig a ^{68}Ga -DOTATOC PET képalkotó szer bevezetéséig nem történt. Az első publikált releváns áttörést jelentő klinikai munka a ^{68}Ga -DOTATOC PET képalkotásról meningiomában szenvedő betegeknél 2001-ben történt a Henze és mtsai (Henze és mtsai., 2005) által. Azóta köztudott a meningiomák magas fokú SSTR2-expressziója, amely a ^{68}Ga -DOTATOC segítségével történő PET képalkotás által megkülönböztethető a neurofibromáktól és áttétektől.

Annak ellenére, hogy a ^{68}Ga pozitron emitterként több mint harminc éve rendelkezésre áll, széles körű alkalmazása a PET képalkotásban viszonylag új. Önmagában, vagy új molekulák részeként potenciálisan felhasználható emberi betegségek állatmodelljeiben történő kutatásra.

2.6.3. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátorok

A ^{68}Ga izotóp használata a nukleáris medicinában a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor kifejlesztése miatt, terjedt el, mert így a szükséges radionuklid könnyedén előállítható nagy költségigényű ciklotron nélkül is. A generátorból a germánium-68 anya-radionuklidból $^{69}\text{Ga}(p,2n) ^{68}\text{Ge}$ magreakcióval nyerhető a gallium-68. Ezen folyamat két módon valósítható meg: vagy ^{69}Ga -ban dúsított targetanyag, vagy legalább 60% ^{69}Ga -izotópot tartalmazó természetes gallium besugárzásával. Mivel az anya-nuklid 270 nap felezési idővel rendelkezik, a generátor-élettartam is hosszú, amely sok előnnyel jár (Sudbrock és mtsai., 2014). A $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátor első leírása 1960-ban Gleason által történt („positron cow”)(Gleason, 1960), amely prototípus még folyadék-folyadék extrakció által és hozzáadott stabil Ga III-oldattal választotta el a

leányelemet az anyaelemtől Ezt követő generáció az Al_2O_3 alapú szilárd-fázisú kromatográfiás generátorok voltak (Green & Welch, 1989), amelyek EDTA-val történő elúciót alkalmaztak a ^{68}Ga előállítására, hozzáadott hordozó nélkül. Az előállított ^{68}Ga -EDTA-val agyi leképezés kísérleteket valósítottak meg a korai időkben (Gottschalk & Anger, 1964), azonban később pont ez a módszer szabott gátat a radiofarmakológiai fejlesztések terén, mivel az EDTA- komplex kémiaiilag inert anyagként viselkedik ezért a radionuklid nehézkesen kinyerhető.

A modern $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generátor Obninsk-ból, Oroszországból származik. A generátorból gallium-68 nyerhető ki az anyaelem a germanium-68 magreakciójával($p,2n$), nagy tisztaságú Ga_2O_3 felhasználásával. A leányelem, a ^{68}Ga 89%-ban pozitron kibocsátással, 11%-ban elektronbefogással bomlik. Felezési ideje 67,7 perc, közben max. pozitron energiája 1899 keV, és bomlása során stabil ^{68}Zn keletkezik. A gallium-68 orvosi alkalmazásához feltétlenül szükséges a germanium-68-tól történő maximális megtisztítása, mert az biológiailag toxikus a hosszú felezési ideje miatt. A jelenlegi generátorok olyan TiO_2 - vagy SnO_2 , vagy szerves gyanta alapú ólom-borítású, hordozható kromatográfiás oszlopok, melyekről 70-80%-os hozammal eluálható a ^{68}Ga -izotóp kationos formában a kezdeti időkben (Rösch, 2013).



5.ábra Hordozható Gallium- 68 generátor (Ecklert&Ziegler-Németország)

Ezek a modern generátorok akár egy évig is képesek hasznos aktivitást szolgáltatni, és akár naponta többször is eluálható róluk gallium 68- izotóp.

Habár a ^{68}Ga -jelölések elméletileg egy egylépéses fémion – kelátoregység közötti komplexképzésből állnak, mégis hátráltató tényezőt jelent az, hogy a ^{68}Ga -aktivitás generátor-eluátumon keresztül érhető el, a jelölési protokollok kidolgozása szempontjából, (Baum & Rösch, 2013) az alábbiak miatt:

1. Hosszútávon megnő az eluátum ^{68}Ge -szennyezés (áttörés) mértéke
2. Az eluátumban potenciális kompetitorok jelennek meg a komplexképzés során szennyező fémionok formájában (Pl: Zn, Fe), tehát sem kémiai, sem radionuklidosan nem tiszta.
3. a ^{68}Ga -aktivitás erősen savas közegben eluálható, ez protonálhat olyan funkciócsoportokat, melyek a kelátképzést akadályozhatják, valamint a nagy elúciós térfogat akár nagyságrendekkel növelheti a prekursor igényt.

2.6.4. A Bizmut

A bizmut a periódusos rendszer 83 -as rendszámú kémiai eleme, vegyjele Bi. Kemény, rideg, fémes elem, nagy szemcsékben kristályosodik. Sokáig a legnagyobb rendszámú stabil elemnek tekintették, de 2003-ban felfedezték, hogy gyengén alfa sugárzó. Valentinus Basilus fedezte fel 1405-ben.

A Bi egy olyan elem, amelyet a könnyű fém főcsoporthoz képest csak korlátozott figyelemben részesült a múltban. Azonban a Bi-vegyületeket jelenleg széles spektrumban alkalmazzák a nem mérgező pigmentektől és katalizátoroktól a biokompatibilis adalékanyagokon át, fogászati anyagokban és gyógymódokban a humán- és állatgyógyászatban (Briand & Burford, 1999; Mehring, 2007), A jó kelátképző tulajdonsága a ^{213}Bi -t alkalmassá teszi a radiofarmakonokban történő felhasználáshoz. A Bi atomnak a 83 elektronja, különböző energiaszintek között van elosztva. A legmagasabb és legkülső energiaszinteket elfoglaló elektronok felelősek kémiai reakcióképességéért. (Mehring, 2007). Bi [Xe] 4f145d106s26p3 elektronkonfigurációval rendelkezik, és hajlamos háromértékű bizmut (Bi^{3+}) 6s2 vegyérték konfigurációra. A 6s2 elektronpár ezen tendenciájára, azaz, hogy formálisan oxidálatlan maradjon a Bi-vegyületekben (azaz a 6s elektronok magszerű természete), gyakran használták az „inert párhatás” (Lowry, 1928) vagy „nem hibridizációs hatás” kifejezést (Pyykkö, 1988). A bizmutnak két fő oxidációs állapota van (III és V), amelyek közül a Bi(III) a gyakoribb és stabilabb oxidációs állapot. Azonban a Bi(II) és Bi(IV) ritka előfordulásáról is beszámoltak (Ershov és mtsai., 1986). A vizes Bi-kémiát túlnyomórészt a Bi(III) uralja, és a d'mező fémekkel ellentétben komplex és klaszteres szerkezeteket képez széles pH-skálán (Näslund és mtsai., 2000). Alacsony pH-n (pl.

$pK_{a1} = 1,5$), a Bi(III) könnyen hidrolízisen megy keresztül, így Bi(III)-hidroxid keletkezik (Sun és mtsai., 1997). Híg vizes oldatokban a mononukleáris komplexek dominálnak jelentősen, széles pH tartományában (Pearson, 1969), és ezek a Bi mononukleáris komplexek nagyrészt követik az OH^- lépésenkénti hozzáadását úgy, hogy a $Bi(OH)_x(3x)$ (ahol $x \leq 4$) komplexek egymás után képződnek a pH növekedésével. A Bi(III) a Pearson-féle elmélet szerint kemény-lágy sav-bázis (HSAB) határvonalbeli fémion (Pearson, 1969). Ennek ellenére jelentős affinitással bír a nitrogén- és oxigéndonor atomokhoz (Ferraz és mtsai., 2012; M.-X. Li és mtsai., 2012; Sadler és mtsai., 1999); mindamellettt egyes kutatók a Bi(III)-ról, mint erős Lewis-savról számoltak be. (Tooth és mtsai., 2013) Ez a tulajdonsága lehetővé teszi az aminos-csoportokkal való komplexképződést még alacsony pH mellett is (Hancock és mtsai., 1993). A N- és O-donor atomokkal való komplexképzési kinetika gyakran gyors, és az egyensúlyi állapot már néhány perc alatt kialakul (Hancock és mtsai., 1993).

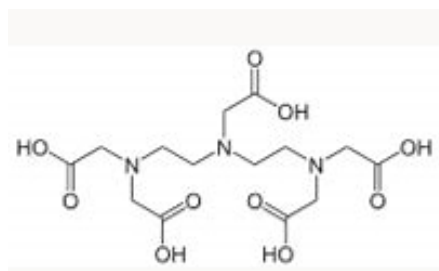
2.7. Kelátorok

Ha radioaktív fémeket használnak célzott radionuklid terápiához, akkor a kelátképzőnek egy extra reaktív funkciós csoportra van szüksége. Ez a rész, amelyet bifunkcionális kelátképzőnek (BF) is neveznek, garantálja a kovalens kötést a vektormolekulával, és stabil komplexet képez a radiofémekkel. Fontos, hogy a radiofém-kelátképző komplexnek nagy termodinamikai stabilitással kell rendelkeznie és kinetikusan inertnek kell lennie, hogy elkerüljük az *in vivo* disszociációt, amely tipikusan a transzkeláció révén következik be a szérumfehérjék és enzimek esetében.

Az alapján, hogy milyen egy kelátor szerkezete, két típusba sorolhatjuk: nyílt láncú -aciklusos vagy gyűrűs szerkezetű -makrociklusos. A két csoport hasonló termodinamikai stabilitású, ám a makrociklusos kelátorok kinetikailag inertebbek. (Byegård és mtsai., 2006; Stimmel és mtsai., 2002). A makrociklus a kelátor azon központi szerkezeti egysége, amelyben a fémion elhelyezkedik. Az aciklusos kelátorok esetén, mivel nem gyűrűs szerkezetűek, a kelát kialakításához kisebb energiát igényelnek. A fémionok komplexálása során a makrociklusok funkciós csoportjai, valamint a gyűrűméret szelekciós hatása. (Price & Orvig, 2014) A radiógyógyszerek farmakokinetikai viselkedésére nagy hatással bír a radiofém és kelátot tartalmazó molekula tulajdonságai és szerkezete. Ilyen például a gyakran tapasztalt rendkívüli hidrofobicitás, mely determinálja a vesén keresztüli eliminációt. Kis molekulatömegű hordozók esetén a kelátorok megváltoztatása drasztikus változást idézhet elő a szervezetszrásban. (Nayak és mtsai., 2011) Fontos szempont a kelátor kiválasztásánál a komplex kinetikai stabilitása, hiszen az élő szervezetben a radiofémnek a hordozóhoz kötve kell maradnia.

2.7.1. A DTPA (dietilén- triamin-pentaecetsav) kelátor

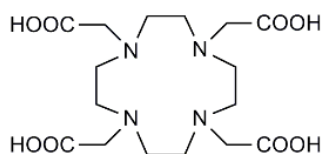
Aciklikus kelátorként előnyös tulajdonsága, hogy szobahőmérsékleten gyors komplexképzésre képes, tehát a rendkívül rövid felezési idejű radiofémek komplexálására alkalmas. (S. Liu & Edwards, 2001) A DTPA (dietilén- triamin-pentaecetsav) alkalmazhatóságát régebben gyakran vizsgálták az irodalomban, mint ^{68}Ga kelátor. Azonban mivel alacsony stabilitásúnak bizonyult ($\log \beta_1 = 24,3$), valamint biológiai szempontból a komplex disszociációja kedvezőtlen volt, napjainkban elveszítette jelentőségét a gallium alapú radiokémiában (Kojima & Jay, 1987).



6.ábra: dietilén- triamin-pentaecetsav

2.7.2. A DOTA (1,4,7,10,-tetraazaciklododekán-N, N', N'', N'''-tetraecetsav) kelátorok

A DOTA számos radiofém esetében használt, legszélesebb körben alkalmazott makrociklusos kelátor. Főleg ^{68}Ga radiojelöléseknél elterjedt a használata, olyan korábbi fejlesztésű radiofarmakonok esetén, melyeket rutin betegvizsgálatokban alkalmaznak, ilyen például a szomatosztatin receptort expresszáló neuroendokrin tumorok diagnosztikájára. (Yang és mtsai., 2014) A DOTA radiofémekkel történő komplex kialakításában a makrociklus nitrogén atomjai, valamint karboxil csoportjának oxigén atomjai vesznek részt. A komplex nagy gyűrűméretű, torzult oktaéderes szerkezetű, emiatt alacsony termodinamikai stabilitású ($\log \beta_1 = 21,3- 26,1$) (Kubíček és mtsai., 2010). A DOTA felhasználása során a legfontosabb akadály lehet a magas hőmérséklet, amelyen hatékonyan jelölhető radiofémekkel (95°C). Emiatt hőre érzékeny hordozóknál alkalmazhatósága korlátozott.

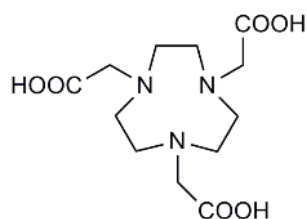


7.ábra: 1,4,7,10,-tetraazaciklododekán-N, N', N'', N'''-tetraecetsav

A ^{213}Bi jelenlegi „arany standard” bifunkciós kelátképzője az amino-karboxilát makrociklus DOTA. A ^{213}Bi -DOTA biokonjugátumok stabilak *in vitro* és *in vivo* legalább két órán keresztül (Chan és mtsai., 2017). A Bi^{3+} négyzetes antiprizma geometriát alkalmaz DOTA-val, így magas lesz a termodinamikai stabilitása.

2.7.3. A NOTA (1,4,7- triazaciklononán- N, N', N'' -triacetsav) kelátorok

A DOTA kelátor gyűrű méretének lecsökkentésével készült új makrociklusos kelátorcsalád, melynek központi eleme a triazaciklononán. (Hicks, 2012) Ezen kelátorok azért bizonyultak hatékonynak a gallium jelölés szempontjából, mert a kisebb gyűrűméret miatt a kötések felületi feszültsége csökkent, ezáltal a komplexek termodinamikai stabilitása megnőtt ($\log \beta_1 = 29,0-31,0$) (Clarke & Martell, 1991). A triazaciklononán gyűrű alapjául szolgál számos vegyületnek, melyek az oldalláncok kémiai szerkezetében mutatnak különbözőséget. Ilyen kelátor például a NODAGA (1,4,7- triazaciklononán, 1-glutársav-4,7- diacetsav) (Velikyan és mtsai., 2008).



8. ábra: 1,4,7- triazaciklononán- N, N', N'' -triacetsav

2.8. Hasnyálmirigy karcinóma

A hasnyálmirigy rák, vagy más néven pankreász karcinóma a hasnyálmirigy rosszindulatú daganatos megbetegedése. Az elváltozás rendkívül rossz prognózisú, a betegek 5 éves túlélése 5% alatti. A rákos halálozást okozó daganatok közül Magyarországon ez a daganattípus az 5. helyen áll. Az elváltozások az esetek 67%-ban a hasnyálmirigy fejéből alakulnak ki, és a diagnózis időpontjában 2 cm-esek, míg a sebészi beavatkozás időpontjában 2,5-3,5 cm nagyságot is elérhetnek. Jellemzően sárgaságot vagy patkóbél elzáródást okozhatnak. A hasnyálmirigy farkában vagy testében kialakuló daganatok, mivel kevesebb tünetet okoznak, így felfedezésük időpontjában akár 6-7cm méretűek is lehetnek, és sebészileg nem reszekálhatóak. (Yamada's Atlas of Gastroenterology | Wiley Online Books, é. n.) A legtöbb esetben a daganat felfedezésekor a betegség már előrehaladott állapotban van, és az egy éves túlélési esélyek nagyon alacsonyak. A hasnyálmirigyrákot néma gyilkosnak nevezik, mert a kezdeti megbetegedés tünetszegény, és a későbbi panaszok sem specifikusak. A diagnózis már áttétes állapotban születik meg. (Pancreatic Cancer—Patient Version - NCI, é. n.)

Legjelentősebb tünetei: övszerű felhasi fájdalom, sárgaság, jelentős fogyás, étvágytalanság. (Pancreatic Cancer—Patient Version - NCI, é. n.)

A legnagyobb kockázati tényezőt a dohányzás, az elhízás, valamint a II. típusú cukorbetegség jelentik, túlzott kalóriabevitellel együtt. A különböző toxinoknak (azbeszt, növényvédőszer) csak kis jelentőséget tulajdonítanak. (Midha és mtsai., 2016; Petersen, 2016) A vörös és feldolgozott húsok rendszeres fogyasztása, valamint a gyümölcs és zöldségekben szegény étrend bizonyítottan növeli a hasnyálmirigyrák kialakulásának a kockázatát. 60 év felett, és férfiakban gyakoribb az előfordulása.

Szövettanilag a leggyakoribb hasnyálmirigyrák az adenokarcinóma, amely az esetek döntő többségében duktális adenokarcinóma, amely – nevéből értetődően – a hasnyálmirigy külső elválasztású mirigyeinek csatornáiból, azaz a ductusokból indul ki (Kopper László, Schaff Zsuzsa, 2004).

A pankreász karcinóma előfordulása a világ különböző részein eltérő. Az Egyesült Államokban az afro-amerikaiak körében előfordulási gyakorisága magasabb, mint a kaukázusiaké, vagy az ázsiai amerikaiaké. A csendes-óceáni szigeteken a legalacsonyabb az előfordulás gyakorisága (Midha és mtsai., 2016). Kínában a rákos megbetegedések száma növekszik, és a növekedés üteme az utóbbi években párhuzamosan növekszik a világ többi részével. A társadalmi különbségek, a városi életmód szerepet játszik a morbiditásban, mert megbetegedések száma és a halálozás a városi területeken magasabb, mint a vidéken. (B.-Q. Li és mtsai., 2017) 2018-

ra a világon a hasnyálmirigy tumoros megbetegedések előfordulási aránya Európában a legmagasabb (7,7/10 millió) és Észak-Amerikában (7,6/10 millió), Óceánia (6,4/10 millió). Az előfordulási arány Afrikában a legalacsonyabb. (2,2/ 10 millió).(Rawla és mtsai., 2019).

Azon cukorbeteg emberek körében, akik A, AB vagy B vércsoportúak nagyobb a kockázata a hasnyálmirigy karcinóma kialakulásának, mint az 0-s vércsoportúaknál. (X. Li és mtsai., 2018; Midha és mtsai., 2016) Van néhány evidencia arra vonatkozóan, hogy az A típusú vércsoport és a cukorbetegség együtt jelentik a legnagyobb kockázatot.(Ciccone és mtsai., 2010; X. Li és mtsai., 2018)

Az elmúlt évek tanulmányai kimutatták, hogy a családban előforduló pankréász tumor nagymértékben növeli a betegség kockázatát. (Hruban és mtsai., 2010; Wood & Hruban, 2012) Főleg genetikai és szerzett génmutációk okozzák, a PC-k több mint 80%-a szórványos mutációknak köszönhető, és kis számú esetet specifikus genetikai mutációk okoznak. A családi PC kockázata exponenciálisan nő az elsőfokú rokonoknál. (Becker és mtsai., 2014; Yeo, 2015) A modern epidemiológiai vizsgálatok jelentős növekedést igazoltak a PC kialakulásának kockázata, és a cukorbetegség összefüggésében. (Gardner és mtsai., 2014) 1. típusú cukorbetegségben szenvedő betegeknek a PC kockázata 5-10-szeresére nő, ha betegséget több mint 10 éve diagnosztizáltak. Cukorbetegnek, akiknél több mint 20 éve diagnosztizáltak a betegséget, tovább emelkedik, nagyobb a PC kockázata. (Bosetti és mtsai., 2014) Nemrég egy 2002-es tanulmány megállapította, 7,5 millió ember követése során, hogy összehasonlítva a cukorbetegségben nem szenvedő betegekkel, az újonnan diagnosztizált cukorbetegekben csaknem hétszeresére nő a PC kockázata. Ezeknél a PC-s betegeknek a vércukorszint és a glikált hemoglobin (HbA1c) szintje szignifikánsan emelkedett egy hónappal a betegség diagnózisa előtt, ezért a HbA1c várhatóan a potenciális biomarker a PC előrejelzésére.(Huang és mtsai., 2020).

Egy 2187 PC-s beteg bevonásával végzett kohorsz vizsgálat megállapította, hogy a betegség kockázata szignifikánsan magasabb volt azoknál, akik több alkoholt ittak, mint 30 g/nap. (Genkinger és mtsai., 2009). Egy metaanalízis megállapította, hogy az alacsony és a mértékletes alkoholfogyasztás nem járt PC-kockázattal, és dózis-hatás összefüggés volt az alkoholfogyasztás között és a tumor kialakulása között. A kockázat a sokat ivó populációkban emelkedett. (Y.-T. Wang és mtsai., 2016).

Az obezitás is szerepet játszik a betegség kialakulásában, mivel a gyorsan szaporodó rákos sejtek számára a lipoxidáció nélkülözhetetlen a sejtek túléléséhez a nem tumoroshoz képest, a

szöveti zsír életképesebbé teheti a rákos sejteket. (Grachan és mtsai., 2021) Epidemiológiai bizonyítékok arra utalnak, hogy az elhízás fontos kockázati tényező a PC kialakulásában.

2.8.1. A hasnyálmirigy tumor diagnosztikája

A kórszövettani elemzés és/vagy a citológia „aranystandardja” a PC diagnózisához a következő: (1) Endoszkópos ultrahang (EUS) vagy komputertomográfia (CT) által irányított biopszia; (2) ascites citológia; vagy (3) exploratív biopszia laparoscopia alatt, vagy nyílt műtéti diagnózis. A tumor stádium beosztását képalkotó eljárásokkal végzik, úgy, mint komputertomográfia/pozitronemissziós tomográfia. A hasnyálmirigy-elváltozások gyanújának diagnosztizálásában, a PC reszekálhatósága, vaszkuláris invázió felmérése és a metasztázisok felmérésére a multidetektoros komputertomográfia (MDCT) ma már rutinvizsgálatnak számít. Az MDCT nemcsak a kis elágazású ereket és a peripancreast képes megjeleníteni, hanem olyan vaszkuláris anatómiai eltéréseket is, amelyek által jobban megérthetjük az elváltozások részleteit. A különböző szövetek morfológiai és sűrűségváltozásai, elősegítik a PC stádiumának tükrözését. Segítenek meghozni a döntést, azzal kapcsolatban, hogy szükséges-e sebészeti reszekció. Ugyanazon időben, a környező szervek vérellátottságának mértéke alapján határozhatók meg a metasztázis jellemzői (Ahn és mtsai., 2009).

A PC-stádiumai a japán hasnyálmirigy-társaság kritériumai alapján:

I. stádium, a tumor átmérője kisebb vagy egyenlő, mint 2 cm, nincs vaszkuláris invázió és metasztázis;

II. stádium, a daganat átmérője 2 cm-nél nagyobb és 4 cm-nél kisebb, burkolt rákos sejtinfiltráció, nincs érinvázió, metasztázis;

III. stádium, daganat átmérője nagyobb, mint 4 cm, a közeli nyirokrendszer érintettsége mellett metasztázis;

IV. stádiumban a tumor átmérője nagyobb, mint 4 cm, távoli nyirokcsomó metasztázisra utaló jelekkel.

A pozitronemissziós tomográfia (PET) képes molekuláris feltárást végezni olyan információk, alapján, mint a finomszöveti funkció és a test anyagcseréje. A PET-CT korán diagnosztizálja a daganatokat és más betegségeket. A daganatsejtek aktív anyagcseréjének köszönhetően a radiofarmakonok felvétele 2-10-szerese a normál sejteknek, ami egy nyilvánvaló „fényfolt” a képen. Ezért a daganat rejtett mikroszkopikus elváltozások alapján (5 mm-nél nagyobb), rendkívül korai fázisban felismerhető. (Ghaneh és mtsai., 2018)

A hagyományos hasnyálmirigy tumor kezelés magában foglalja a műtétet, a kemoterápiát, radioterápiát és palliatív ellátást. Az elmúlt években a kutatások a célzott terápia, immunterápia

és mikrobiális terápia és ezek kombinációjára irányulnak. Hasonlóképpen, a PC stádiuma határozza meg a kezelést, ezért rendkívül fontos a korai pontos diagnózis felállítása.

2.8.2.Prosztaglandin E2

A PGE2 és receptorai jellemzően túlexpresszálnak az alábbi humán eredetű rosszindulatú tumorokban, mint pl. hasnyálmirigy rák (Tong, és mtsai., 2018) vesedaganat (Verratti, és mtsai., 2019), osteosarcoma (Zhou, és mtsai., 2019), vastagbél daganat (Park, és mtsai., 2018), hepatocelluláris carcinoma (Koga, és mtsai., 1999), hematológia tumorok (Zmigrodzka, és mtsai., 2018) emlő rák (Li, és mtsai., 2015), és glioblastoma (Jiang, Qiu, Li, & Shi, 2017). Ezért a PGE2 molekulát intenzíven vizsgálják a rákellenes kutatásokban (O'Callaghan & Houston, 2015) (Tong, és mtsai., 2018) (Reader, Holt, & Fulton, 2011), valamint egyes tumorok előrejelző biomarkerévé válhat. Ezen eredmények alapján a PGE2 az *in vivo* molekuláris képalkotás és a nukleáris medicina területén új célponttá vált a tumorok vizsgálatában.

Egy 2017-es publikáció szerint a PGE2 nagy affinitással kötődik a RAMEB-hez, ami nagy fontosságú lehet a PGE2 által indukált gyulladásos hyperalgézia kezelésében. (Sauer, és mtsai., 2017). A PGE2 receptorok és a ciklooxygenáz-2 (COX-2) /prosztaglandin E2 (PGE2) útvonal kulcs szerepet játszanak nemcsak a gyulladásos folyamatokban, hanem a karcinogenezisben is. A prosztaglandin E2 (PGE2) a ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim terméke, túlzott expressziója szerepet játszik nemcsak a rák progressziójában, hanem a terápiás rezisztencia kialakulásában is. A COX-2/PGE2 útvonal deregulációja részt vesz a tumor előidőzésében, fennmaradásában és az áttétes léziók kialakulásában is. Több publikációban megjelent, hogy a tumor mikro környezetében a COX-2 és PGE2 overexpressziója rossz kimenetellel jár, és nagymértékben csökkenti a beteg túlélési esélyeit. (Greenhough, és mtsai., 2009)(Zmigrodzka és mtsai., 2018) A G-proteinhez kapcsolt plazmamembrán receptoron keresztül a PGE2 a következőféleképpen fejtheti ki hatását: például a prosztanoid receptor az EP1-4- en keresztül hat a tumor kialakulására és túlélésére. Az EP1 és EP2 receptorok, amelyek magas PGE2 szinten aktiválódnak, részt vesznek a daganat proliferációjában, gátolják az apoptózist, segítik a tumorban az ér újra képződést, valamint támogatják a tumorsejtek alkalmazkodását a hypoxiához. (O'Callaghan & Houston, 2015) (Liu, Qu, & Yan, 2015). Tehát támogatják a daganat sejtek túlélését és a távoli áttétek kialakulását.

3. Célkitűzés

A doktori tanulmányaim során folytatott kutatásaink célja, olyan radioaktívan jelzett ciklodextrin származékok - mint új radiofarmakonok- előállítása, 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 alapos vizsgálatához az alábbi projektek megvalósításával kívántunk hozzájárulni:

Az első projekt során célunk volt radiojelölt ciklodextrin származék [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB előállítása, karakterizálása, *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* farmakokinetikai és biodisztribúciós vizsgálata, prosztata 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 előállítása és vizsgálata, mely alkalmas lehet a PGE2 receptort túlexpresszáló 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.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok és eszközök

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

A 6-monodeoxi-6-monoamino-random metilezett béta-ciklodextrin hidroklorid (NH₂-RAMEB) (CycloLab Ltd. Kat.Szám: CY-2056; Budapest, Magyarország); p-NCS-benzil-NODA-GA(NODAGA)(CheMatech katalógusszám: C103 Dijon,Franciaország); p-NCS-Bz-DOTA-GA (DOTAGA) (CheMatech katalógusszám: C115 Dijon, Franciaország);dimetil-szulfoxid (DMSO)(Sigma-Aldrich Kft. Budapest, Magyarország); N,N-diizopropil-etil-amin (DIPEA)(Sigma-Aldrich Kft. Budapest, Magyarország ,a 2-amino-2-(hidroxi-metil)-1,3-propándiol -TRIS-bázis (Sigma-Aldrich Kft. Budapest, Magyarország); ACS minőségű víz(Sigma-Aldrich Kft. Budapest, Magyarország);nátrium-acetát (VWR International Kft. Debrecen, Magyarország) Ultra-tiszta (u.p.) HCl (Merck Kft. Budapest, Magyarország) aszkorbinsav(Sigma-Aldrich Kft.Budapest, Magyarország); Dimetilsulfoxide D6(VWR International Kft. Debrecen, Magyarország); Acetonitril, trifluorecetsav (Sigma-Aldrich Kft. Budapest, Magyarország) DCM – diklórmétán (Sigma-Aldrich Kft. Budapest, Magyarország)

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

KNAUER RP-HPLC (KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Németország); Supelco Discovery® Bio Wide Pore C-18 oszlop ((Lx I.D.:250 mm × 4,6 mm; részecskeméret: 10 µm) Supelco Discovery ® Bio Wide Pore C18 oszlop ((L × I.D.: 150 mm × 10 mm, részecskeméret: 10 µm) Merck KGaA Darmstadt, Németország); Light C18 Sep-Pak Cartridge (Waters MA USA) Oasis HLB Catridge (Waters MA USA); TK 200 gyantát tartalmazó oszlop (TRISKEM INTERNATIONAL Bruz – FRANCE) ¹H-NMR (Bruker WP 360 SY, Billerica, Massachusetts, Egyesült Államok); MS (maXis II UHR ESI-TOF MS, Bruker Corp. Billerica, Massachusetts, USA). ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-generátor (50 mCi, Gallia-Pharm, Eckert and Ziegler Németország Berlin); Kalibrált gammaszámláló (Perkin-Elmer Packard Cobra, Waltham, MA, USA UV detektor: Waters 486, Tunable absorbance detector (Waters Corporation, Milford,

Massachusetts USA); pH-mérő: Consort C831, Multi- parameter analyser (Spektrum 3D Kft., Debrecen Magyarország); pH-szenzor (Mettler- Toledo Kft., Budapest, Magyarország) Keverőgép: Thermolyne, SYBRON (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts USA) Liofilizátor (S-Biotech Kft. Budapest Magyarország); Centrifuga: Rotina 35R (Dialab Kft., Budapest Magyarország) Mágneses keverő (VELP Scientifica, Usmate Olaszország) GE PETtrace ciklotron (Debreceni Egyetem Klinikai Központ Nukleáris Medicina) Pipetták (BIOHIT HealthCare, Finnország Helsinki); Eppendorf (Eppendorf AG Hamburg, Németország); Centrifugacső (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország); Szilikával impregnált kromatográfiás papír (Agilent Santa Clara, Kalifornia USA); H-Gly-HMPB-ChemMatrix® gyanta (Sigma-Aldrich Kft. Budapest, Magyarország)

A biológiai mérések és vizsgálatok során az alábbi anyagokat, eszközöket és műszereket alkalmaztuk (zárójelben a gyártót/ forgalmazót tüntettem fel, továbbá a cégek székhelyét)

Egérkamra (Mediso Ltd., Budapest Magyarország) miniPET (DE ÁOK OKI Nukleáris Medicina Tanszék és az MTA-ATOMKI munkatársainak saját fejlesztésű eszköze, Debrecen Magyarország); Sejtenyésztő inkubátor: ESCO CelCulture® (Dialab Kft. Budapest Magyarország); hím CB17 SCID immunhiányos egerek (Innovo Kft. Magyarország Budapest); IVC rendszer- egyedileg szellőztetett ketrecrendszer (Techniplast Buggugiata, Olaszország); Fél szintetikus táplálék (Charles River Hungary Kft., Gödöllő, Magyarország); Kisállat altatógép (Tec 3 Isoflurane Vaporizer for animal, Vetland Medical Sales & Services LLC, Louisville, Kentucky, USA); T75 tenyésztőflaska (Sarstedt, Németország); antimikotikum és antibiotikum oldat (Sigma Aldrich, St. Louis, USA); nyúl monoklonális anti-prosztata E receptor EP2 / PTGER2 antitest (Abcam, USA; kat. szám: ab167171); humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek BxPC-3 (ATCC, CRL-168) PancTu-1 (a Hamburgi Egyetem ajándéka) ; a BrainCad képelemző szoftver; Leica DM2500 kutatómikroszkóp (Leica Microsystems Inc.10 Parkway North Deerfield, IL 60015)

4.2. Monoamino-RAMEB konjugálási reakciója NODAGA kelátorral

A NODAGA kelátort az NH₂-RAMEB aminocsoportján keresztül konjugáltuk - az alábbiak szerint: NH₂-RAMEB-et (20 mg, 16,6 µM) feloldottunk vízben (4 ml), majd az oldatot 4 °C-ra hűtöttük és 15 percig kevertettük. A NODAGA-t (9,9 mg, 16,6 µM) DMSO-ban (250 µl) 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 (1 ml) újra feloldottuk és preparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk, a 4.3. fejezetben leírtak szerint. A szintézis hozama 74% volt. A NODAGA-RAMEB tisztaságának meghatározására analitikai RP-HPLC -t használtunk, Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszloppal (250 mm × 4,6 mm; részecskeméret: 10 µm). A 4.3. fejezetben leírtak szerint. A kapott termék pontos molekulatömegét nagyfelbontású tömegspektrometriával (MS), a szerkezetét ¹H-NMR-rel igazoltuk. A mintákat a következőképpen készítettük elő: a tisztítás után a teljes mennyiséget beoldottuk D6 DMSO-ban (750 µl), majd leadtuk a DE Természettudományi és Technológiai kar Kémiai Intézet Szerves Kémiai Tanszékére ¹H-NMR vizsgálatra. A vizsgálat után az azonosított termékből (NODAGA-RAMEB) ultratiszta vízzel törzsoldatot (1 mM) készítettünk. A törzsoldatból 100 µl mintát adtunk le a DE-TTK Alkalmazott Kémiai Tanszékére MS vizsgálatra, ahol a méréseket elvégezték és segítettek az eredmények kiértékelésében, megértésében.

4.3. 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

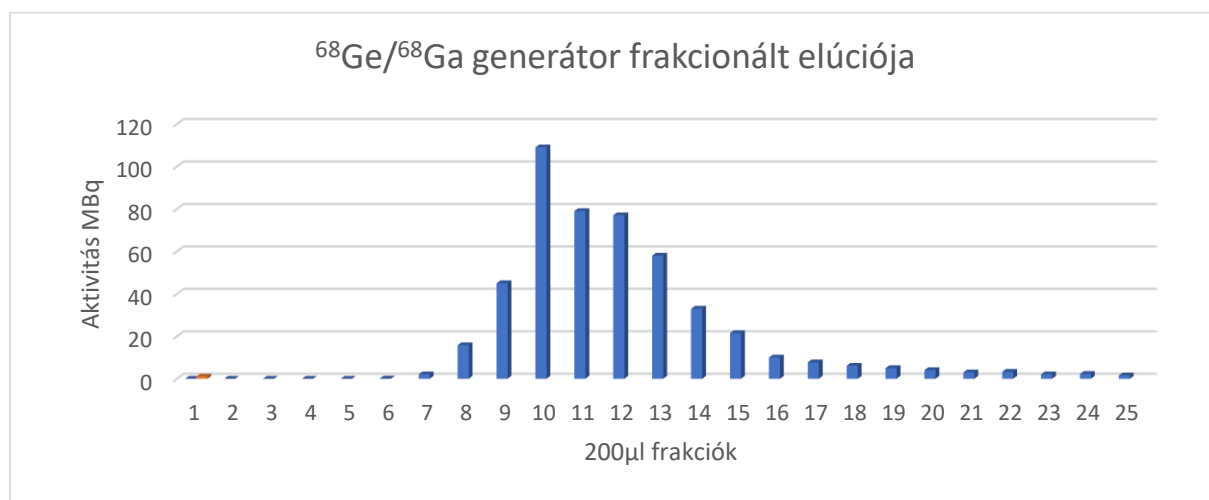
A radioaktív izotóppal jelölt vegyületeink minőségellenőrzéséhez szintén KNAUER RP-HPLC rendszert használtunk, kiegészítve az UV detektor elé kapcsolt radiodetektorral, a továbbiakban együttesen alkalmazva őket. A detektálás 254 nm-en történt, analitikai Supelco Discovery® Bio Wide Pore C18 oszlopon, 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.

4.4. Monoamino-RAMEB konjugálási reakciója DOTAGA kelátorral

A DOTAGA kelátort szintén az NH_2 -RAMEB aminocsoportján keresztül konjugáltuk a következőképpen: 10 mg ($8\ \mu\text{M}$) NH_2 -RAMEB-et feloldottunk vízben (1,5 ml), majd az oldatot $4\ ^\circ\text{C}$ -ra hűtöttük és 15 percig kevertettük. 5,5 mg ($8\ \mu\text{M}$) DOTAGA-t adtunk a lehűtött NH_2 -RAMEB oldathoz, 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 4.3 fejezetben leírtak szerint. 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.

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

A ^{68}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 azonban 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, majd a kapott aktivitás értékeket ábrázoltuk. (9. ábra).



9. ábra: $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor frakcionált elúciója

A méréseink alapján a 9. és 14. frakciók közötti térfogatban (1,2 ml) található a legaktívabb része az eluátumnak, így a későbbi jelölések során ezt a térfogategységet használtuk. A jelöléseink előtt a generátor elúcióját a következő képen végeztük: Első frakció: 1,6 ml, alacsony aktivitású frakció, nem használtuk jelölésre. Második frakció: 1,2 ml a legaktívabb frakció, ezt használtuk a jelölések során. Harmadik frakció: 2,2 ml alacsony aktivitású frakció, szintén nem használtuk jelölésre.

4.6. $^{205/206}\text{Bi}$ izotópok előállítása 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 lebomljanak, ezután a besugárzott céltárgyat ultratiszta HNO_3 -val (2 ml, 7 M) 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 (5 ml, 0,7 M) a maradék Pb szennyezés eltávolítása érdekében, ezt követően a $^{205/206}\text{Bi}$ izotópokat HNO_3 -val (2 ml, 7 M) eluáltuk. A tiszta eluátumot mely $\sim 30 \text{ MBq}$ aktivitású $^{205/206}\text{Bi}$ izotópot tartalmazott, szárazra pároltuk majd újra feloldottuk u.p. HCl -ban (300 μl , 0,1 M)

4.7. 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 (1 M, 160 μl) puffereltünk, 4,3–4,5 pH értékre, majd hozzáadtuk a NODAGA-RAMEB vizes oldatát (1 mM, 10 μl). 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, melyet előtte a gyártói ajánlás alapján a következőképpen aktiváltunk: vizes mosás (6 ml), etanolos mosás 96%-os etanollal (4 ml), végül vizes mosás (8 ml). A jelölt farmakon megkötése után az oszlopot vízzel (2 ml) 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 radiokémiai tisztaság meghatározásához radiodetektorral kombinált RP-HPLC rendszert használtunk, a 4.3.fejezetben leírtak szerint. A jelölt terméket

steril izotóniás sóoldattal hígítottuk, ezzel csökkentve az etanol-tartalmat 10% alá, majd 0,22 µm Millipore fecskendőszűrővel sterilre szűrtük az állatokon való felhasználás előtt.

4.8. DOTAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal

A 4.5. fejezetben leírt módon nyert 1 ml ^{68}Ga eluátumot nátrium-acetáttal puffereltünk (1 M, 160 µl), hogy biztosítsuk a megfelelő pH értéket (pH 4,3-4,5). Ezt követően hozzáadtuk a DOTAGA-RAMEB vizes oldatát (5 µl, 3 mM). A reakciót 95 °C-on 10 percig inkubáltuk. Majd az oldatot egy Light C18 Sep-Pak oszlopra vittük fel, amelyet a ...fejezetben leírtak szerint aktiváltunk. A megkötés után az oszlopot 2 ml vízzel mostuk. A ^{68}Ga jelölt termékünket (^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB) szintén 96%-os EtOH/izotóniás NaCl oldat 1:2 arányú elegyével eluáltuk le. A radiokémiai tisztaság meghatározásához radiodetektorral kombinált RP-HPLC rendszert használtunk, a 4.3. fejezetben leírtak szerint. A jelölt terméket sóoldattal hígítottuk, ezzel csökkentve az etanol-tartalmat 10% alá, majd sterilre szűrtük az állatokon való felhasználás előtt.

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

A 4.6. fejezetben előállított $^{205/206}\text{Bi}$ 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 adtunk hozzá 20%-os aszkorbinsavat (25 µl), és hozzáadtuk a DOTAGA-RAMEB-et (10 µL, 3 mM). A reakcióelegyet 95 °C-on, 10 percig inkubáltuk, majd hagytuk szobahőmérsékletre hűlni. Ezt követően az oldatot egy Oasis HLB gyantát tartalmazó szeparációs oszlopra vittük föl, melyet előtte a gyártói ajánlás alapján a következőképpen aktiváltunk: vizes mosás (6 ml), etanolos mosás 96%-os etanollal (4 ml), végül vizes mosás (8 ml). A farmakon megkötődése után az oszlopot vízzel mostuk (2ml), hogy a puffert, illetve a nem komplexált szabad $^{205/206}\text{Bi}$ ionokat eltávolítsuk. A $^{205/206}\text{Bi}$ radioizotóppal jelzett terméket ($^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB 96%-os EtOH/izotóniás NaCl oldat) (1:2 (v/v%)) elegyével (200 µl) eluáltuk. A radiokémiai tisztaság meghatározásához radiodetektorral kombinált RP-HPLC rendszert használtunk, a 4.3. fejezetben leírtak szerint. A jelölt terméket sóoldattal hígítottuk, ezzel csökkentve az etanol-tartalmat 10% alá, majd sterilre szűrtük az állatokon való felhasználáshoz.

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

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB (10 µL, 5,5 ± 0,2 MBq); [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB (10 µL, 5 ± 0,5 MBq) és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB (10 µL, 4 ± 0,6 MBq) származékok oktanol/PBS megoszlási hányadosát is vizsgáltuk, amely a vegyületek adott pH értéken való vízzoldékonyságára utalnak. Ezen érték alapján a kifejlesztett radioizotóp jelölt vegyületek szervezeten belüli viselkedéséről, farmakokinetikai tulajdonságairól vonhatunk le következtetéseket. A LogP értékének meghatározását mindhárom ciklodextrin származékunk esetében ugyanúgy végeztük el, mint az itt említett esetben: a radiojelölt ciklodextrin származékot (10 µl) összekevertük 1-oktanol (500 µl) és PBS (490 µl, pH 7,4) keverékével egy centrifugacsőben. Az elegyet 20 percig kevertettük egy Vortex segítségével, majd a rétegek teljes szétválásáig 5 percig centrifugáltuk 20000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on. 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.

4.11. A [⁶⁸Ga]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, melyet az alábbi reakció szerint végeztünk: A H-Gly-HMPB-ChemMatrix® gyantát (750 mg, 0,3- 0,65 mmol/g) beáztattunk 5 ml DCM-ba és kondicionáltuk 10 percig. Ezt követően a prosztaglandin E2-t (PGE2) (38,8 mg 0,11 mmol), és a PyBOP-ot (62,5 mg 0,12 mmol) hozzáadtuk, majd DIPEA-val (21 µL 0,12 mmol) 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. Majd az így nyert gyantát teljesen megszáritottuk, majd visszamérve 775mg 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 frittrel ellátott 1 ml-es polipropilén csőbe helyeztünk. A mintákhoz először 700-700 µl PBS-t adtunk, összeráztuk, majd 3 perc elteltével

40 μL 35 ± 5 MBq aktivitású [^{68}Ga]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, majd a gyanták, illetve a felülúszók aktivitását megmértük.

4.12. Az *in vitro* metabolikus stabilitás meghatározása

Az *in vitro* stabilitás vizsgálat célja, hogy a radioizotóppal jelölt vegyületeket teszteljük vérszérumban, ezáltal megbecsülve azt, hogy a szervezetben mennyi ideig marad intakt állapotban. Az általunk használt radioizotópok, a ^{68}Ga és a $^{205/206}\text{Bi}$ szabad ion formájában radiotoxicitási problémákat okozhat az egyéb, általunk nem célzott szövetekben, vagy szervekben, illetve a képalkotás megfelelő minőségben történő értelmezéséhez a metabolitok kiszámíthatatlan dúsulási profilja miatt is fontos ismernünk a stabilitásukat.

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. 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 jéghideg abs. EtOH-al (50 μL) 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.

4.13. Az *in vivo* metabolikus stabilitás meghatározás

Az *in vivo* metabolikus stabilitás meghatározásának célja, hogy teszteljük, hogyan viselkedik a radioizotóppal jelölt vegyületünk az élő szervezetben, hiszen vérkoncentrációját számos felszívódási, hatóanyag átalakulási és lebontási az az metabolikus folyamat befolyásolja. Ezért az egészséges SCID egerek ($n = 4$) farokvénáján keresztül $7,5 \pm 0,4$ MBq aktivitású [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB-et injektáltunk, majd az injekció beadása után 60 perccel vizeletmintákat gyűjtöttünk. A kapott mintát 50 μL jéghideg abs. etanollal összekevertük és 10 000 fordulat/perc sebességgel 5 percig centrifugáltuk. A felülúszót összegyűjtöttük, és analitikai radio- RP-HPLC módszerrel elemeztük.

4.14. Alkalmazott tumor modellek

Az állatkísérleteink során 12 hetes hím CB17 SCID immunhiányos egereket használtunk. A kísérleteket megelőzően az állatokat steril körülmények között, IVC ketrecrendszerben

tartottuk, ahol állandó hőmérsékletet (26 ± 3 °C) és levegő páratartalmat ($52 \pm 10\%$) biztosítottunk, 12 órás mesterséges megvilágítási ciklusokkal. Mindegyik kísérleti állatot steril szemi-szintetikus táppal etettük, és steril ivóvízzel itattuk ad libitum. A kísérletek során az állatokat a Magyarország és az Európai Unió állatvédelmi törvényeinek és rendeleteinek megfelelően tartottuk, minden erre vonatkozó szakasz pontos és szigorú betartásával. A kísérleteink minden esetben a „3R” betartásával történtek, nevezetesen: *replacement*- az állati modellek amikor csak lehet egyéb mintapéldánnyal, például számítógépes programokkal pótlása (*abszolút pótlás*), vagy a gerinces állatok ahol lehet gerinctelenekkel helyettesítése, mert a tudomány mai állása szerint a fájdalom érzékelésük alacsonyabb (relatív pótlás); *reduction*- a lehető legkevesebb állat felhasználása az eljárás során, hogy a kutatási kérdés megválaszolásához mégis elegendő információt kapjunk; *refinement*- a tudományos munka során felhasznált állatoknál felmerülő fájdalom, szorongás valamint szenvedés minimalizálása, valamint jólétük biztosítása a születéstől a halálukig. A tumor modellek indukálásakor BxPC-3 vagy PancTu-1 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejteket injektáltunk az egér bal váll régiójába a bőr alá 0,9%-os NaCl oldatban (5×10^6 sejt; 100 μ l NaCl-ban). A daganatok növekedését tolmérővel követtük, és a (legnagyobb átmérő * a legkisebb átmérő²)/2 képlettel meghatároztuk az aktuális térfogatukat. *Ex vivo* és *in vivo* biodisztribúciós vizsgálatokat 12 ± 1 nappal a tumorsejtek injektálása után végeztünk, ekkor a tumor térfogata 95 ± 8 mm³ volt.

4.15. MiniPET képalkotás

A radioaktívan jelzett vegyületek élő szervezetben történő szerveszlásának, viselkedésének és eliminációjának megfigyelése céljából képalkotó vizsgálatokat végeztünk. A kisállat PET vizsgálatokat a DE-ÁOK Orvosi Képalkotó Intézet Nukleáris Medicina Tanszékén rendelkezésünkre álló MiniPET-II dedikált kisállat PET-szkenner készüléken hajtottuk végre. A miniPET készülék 12 detektora egyenként 35×35 darab lutécium yttrium- sziliátoxid (LYSO) kristályt tartalmaz. A PET kamera belső körgyűrűjének átmérője 211 mm, axiális látótere 48 mm, felbontása 1,4 mm. A kamera ágya szoftverek segítségével mozgatható. (Lajtos és mtsai. 2013).

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 BxPC-3 (n = 3) és PancTu-1 (n = 3) daganatokat hordozó egerekbe, valamint az egészséges kontroll (n = 3) egerekbe. Külön kísérletben hasonlóan jártunk el a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületünk esetén is, inhalációs anesztézia mellett $6,4 \pm 0,3$ MBq aktivitású [⁶⁸Ga]Ga-

DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületet injektáltunk a laterális farokvénába ($n = 3$). 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 ezért *in vivo* vizsgálat során miniPET felvételeket készítettünk PGE2 alkalmazása mellett nevezetesen a PGE2 pozitív BxPC-3 tumort hordozó SCID egereket intravénásán injektáltunk, 100 μ l 4% etanol tartalmú sóoldattal hígított $7,25 \pm 0,21$ MBq aktivitású [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyület és 1 mg PGE2 keverékével. A radiotracer *in vivo* biodistribúciójának meghatározása végett. korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan PET- szkennel használatával statikus és dinamikus felvételeket készítettünk (0 - 90perc) inhalációs anesztézia alkalmazása mellett.

4.16. MiniPET adatok elemzése és értékelése

A PET felvételek elemzése szempontjából a tumorok kvantitatív radiogyógyszer jelölt vegyület felvételét a standardizált felvételi értékkel (SUV-standardized uptake value,) illetve daganat / izom aránnyal (T / M SUV átlag) jellemezhetjük. Ha a radiofarmakon egyenletesen oszlana 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 dózissal (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 radiofarmakont képes felvenni, mint az izom.

4.17. Ex vivo biodistribúciós vizsgálatok

A BxPC-3 vagy PancTu-1 tumorokat hordozó SCID-egereket ($n = 3$) és a kontroll egereket ($n = 3$) az ex-vivo szervi eloszlás vizsgálatához intravénásán injektáltuk [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyülettel ($7,31 \pm 0,32$ MBq), majd az injekció beadását követő 30. 60. illetve 90. percben 5% izofuránnal eutanizáltuk őket. A kiválasztott szervekből 3 szövetmintát vettünk, megmértük a súlyukat analitikai mérlegen, valamint a radioaktivitásukat kalibrált gammaszámlálóval. A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felvételt %ID/g szövetben fejeztük ki.

Majd külön kísérletekben az *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatokhoz szintén kontroll és tumort hordozó (BxPC-3) SCID egereket használtunk. Intravénás injekcióban [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületet ($6,2 \pm 0,2$ MBq) vagy [$^{205/206}\text{Bi}$]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 [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB- radioizotóp jelzett vegyületeink felvételét százalékos injektált dózis per gramm szövet értékben fejeztük ki (%ID/g).

4.18. Immunhisztokémia

A BxPC-3 és PancTu1 daganatokat hordozó egerek boncolását követően a tumormintákat formaldehidben fixáltuk és paraffinba ágyztuk, majd paraffinmentesítést, rehidrációt és antigén-visszanyerést (pH 6,0) végeztünk. Ezt követően nyúl monoklonális antiproszttaglandin 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 hematoxin festést végeztünk, és egy Leica DM2500 kutatómikroszkóppal készítettük mikroszkópos felvételeket.

4.19. Statisztikai elemzés

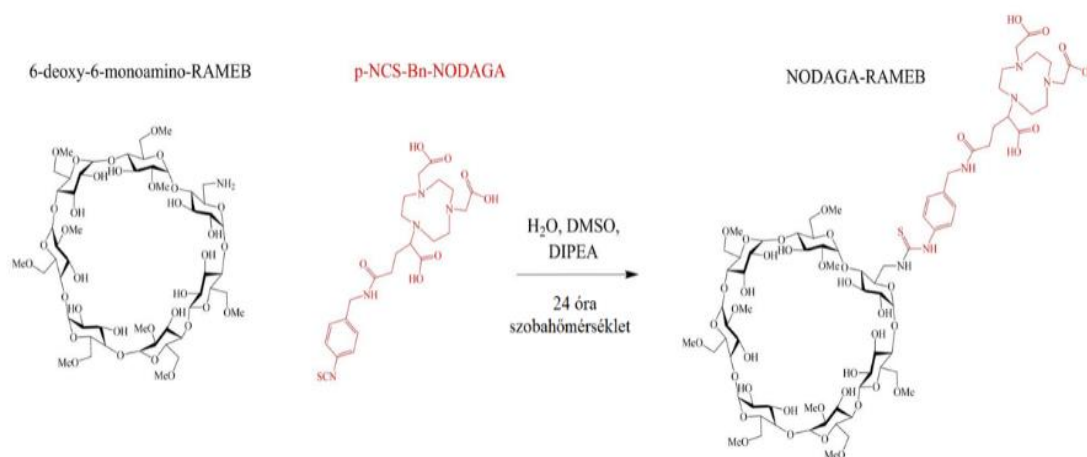
Student-féle t próbával (kétmintás) és Mann-Whitney U-teszttel szignifikanciát számoltuk, és a szignifikancia szintjét $p \leq 0,05$ -re állítottuk, eltérő esetben ezt jelezzük. Az adatok ábrázolását legalább három független kísérlet átlaga $\pm$ SD szerint végeztük.

5. Eredmények

5.1. Kémia

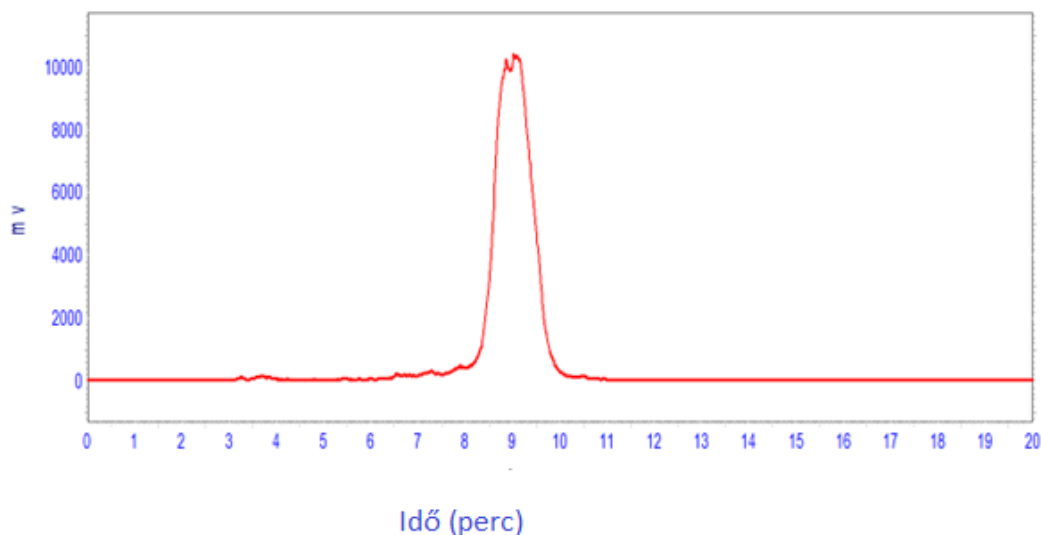
5.1.1. NODAGA-RAMEB előállítása

NODAGA kelátort kapcsoltunk a random metilezett β -ciklodextrinhez (NH₂-RAMEB), mely által alkalmassá vált a ⁶⁸Ga-izotóppal történő jelölésre (10. ábra). A kapcsolási reakciót követően a terméket liofilizáltuk, vízben újra feloldottuk (1ml) és preparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk a 4.3. fejezetben leírtak szerint (11 ábra). A szintézis hozama 74% volt, a tisztított prekursor kémiai tisztasága 99% volt.



10. ábra: Monoamino RAMEB konjugálási reakciója NODAGA kelátorral

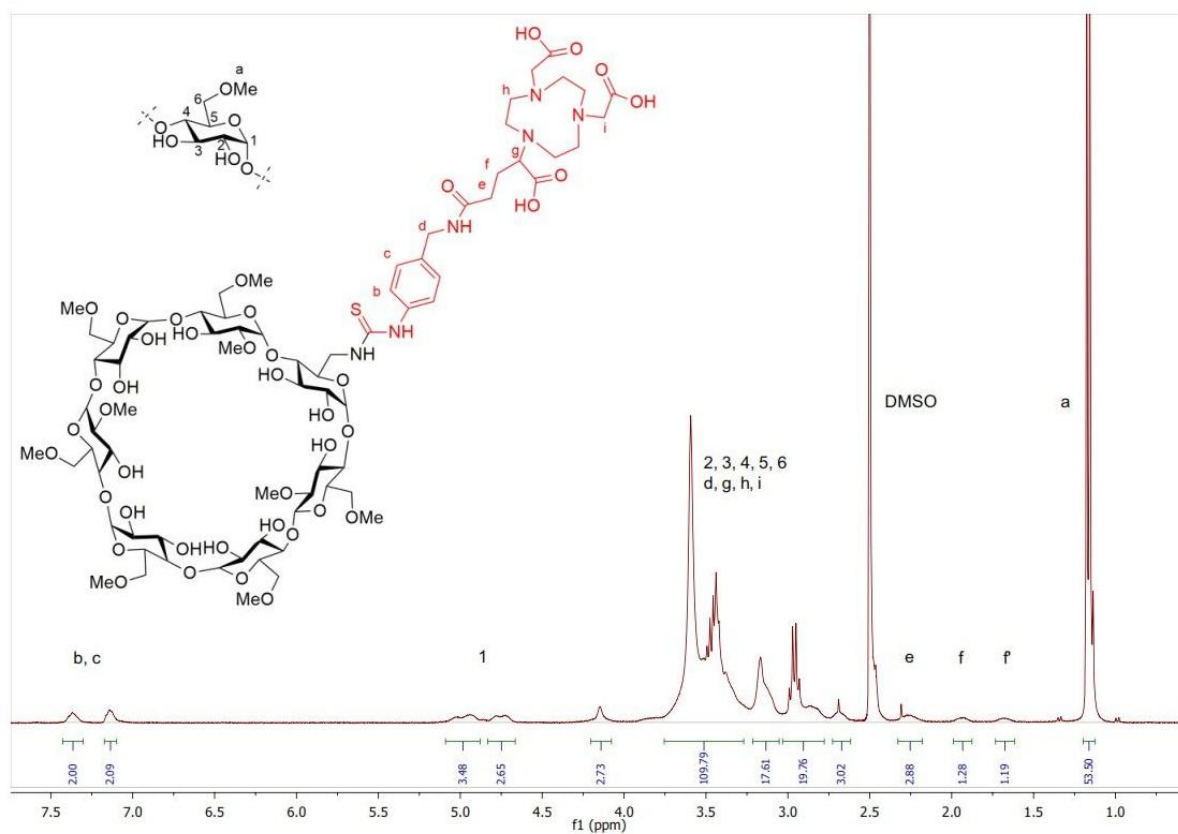
Az alkalmazott analitikai RP-HPLC módszer esetében a termék retenciós ideje 9,8 perc volt. A kromatogramon a termék jelén kívül más jel nem észlelhető, mely bizonyítja, hogy a termék tisztasága közel 100% (11. ábra)



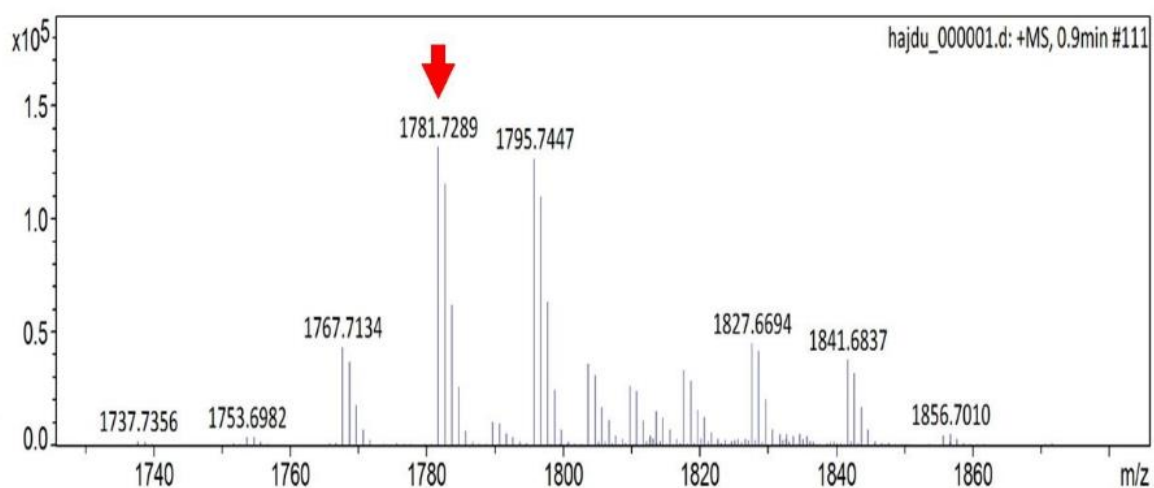
11. ábra: A tisztított NODAGA-RAMEB RP-HPLC kromatogramja

Tisztítás után a termék szerkezetét ^1H -NMR-rel ellenőriztük (12. ábra), és UHR-ESI-TOF tömegspektrométerrel igazoltuk. Az ^1H -NMR mérést (DMSO)- d_6 -ban végeztük. A kémiai eltolódásokat δ ppm-ben ábrázoltuk. A kapott csúcsokat a megfelelő protonokhoz rendeltük (13. ábra).

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 $[\text{M}]^{1+}$, a mért tömege 1781.7289 $[\text{M}]^{1+}$.



12. ábra: Az általunk szintetizált NODAGA-RAMEB ^1H -NMR spektruma. A spektrumot asszignáltuk. A ciklodextrinben lévő protonokat számokkal, a kelátorban lévő protonokat betűkkel jelöltük.



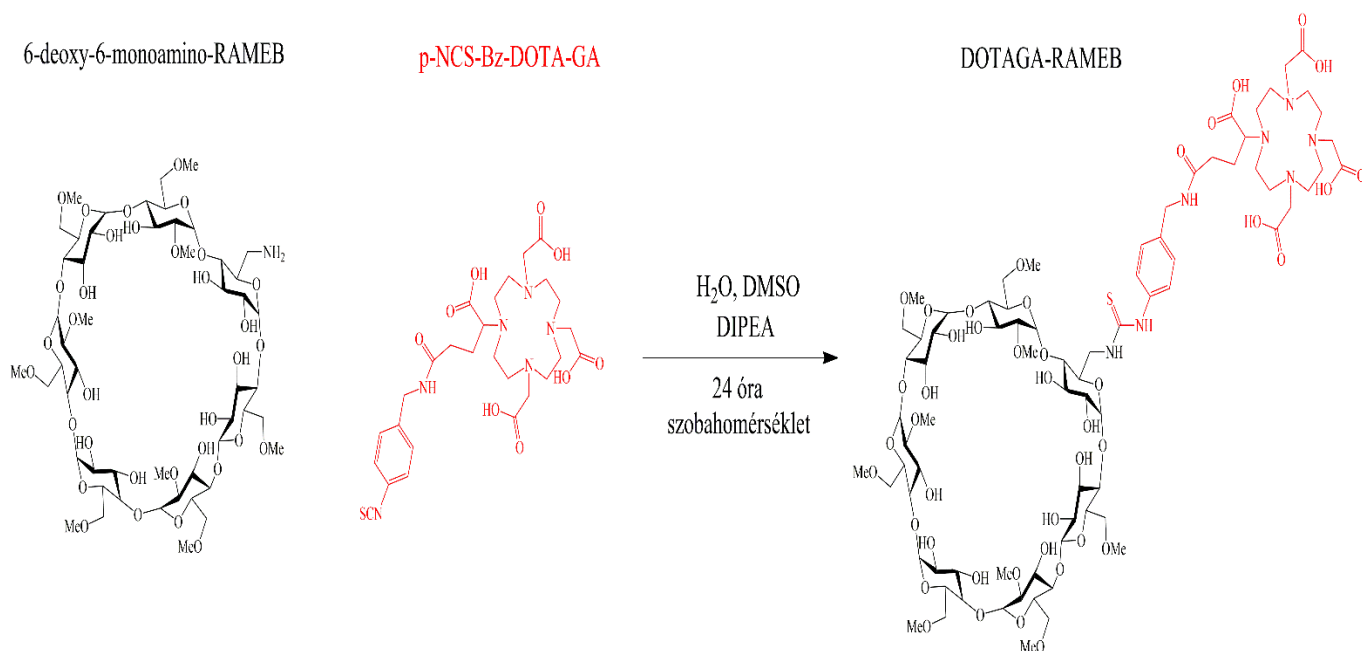
13. ábra: A NODAGA-RAMEB tömegspektruma

A nyíl a főtermékhez tartozó mért tömeg jelét mutatja.

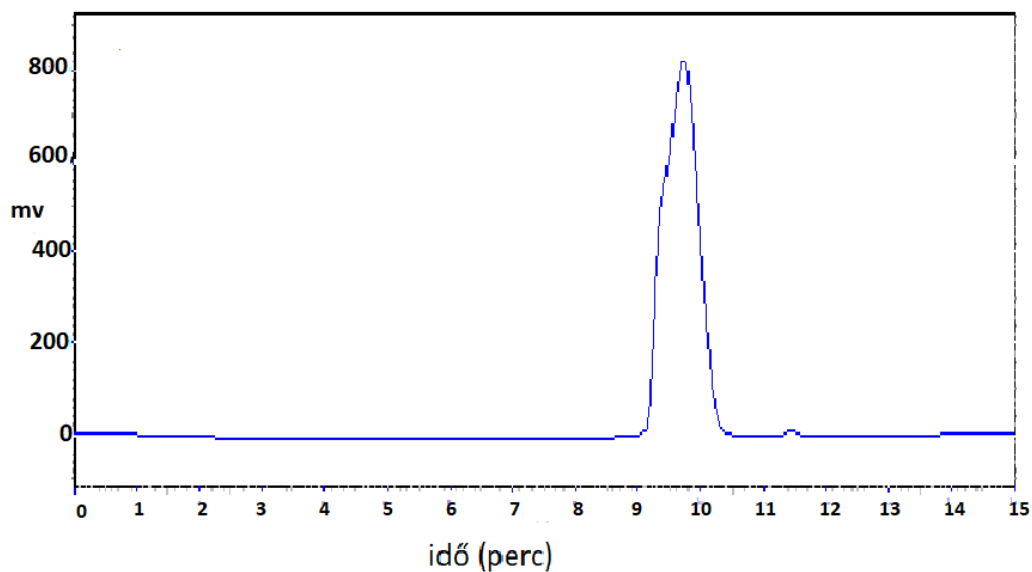
5.1.2. Monoamino -RAMEB konjugálási reakciója DOTAGA kelátorral

DOTAGA kelátort kapcsoltunk a random metilezett β -ciklodextrinhez (NH₂-RAMEB), mely által alkalmassá vált a ⁶⁸Ga és ^{205/206}Bi izotópokkal történő jelölésre (14. ábra). A kapcsolási reakciót követően a terméket liofilizáltuk, vízben újra feloldottuk (1 ml) és preparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk a 4.3. fejezetben leírtak szerint (15. ábra). A szintézis hozama 77% volt, 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 (16. ábra) 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⁺

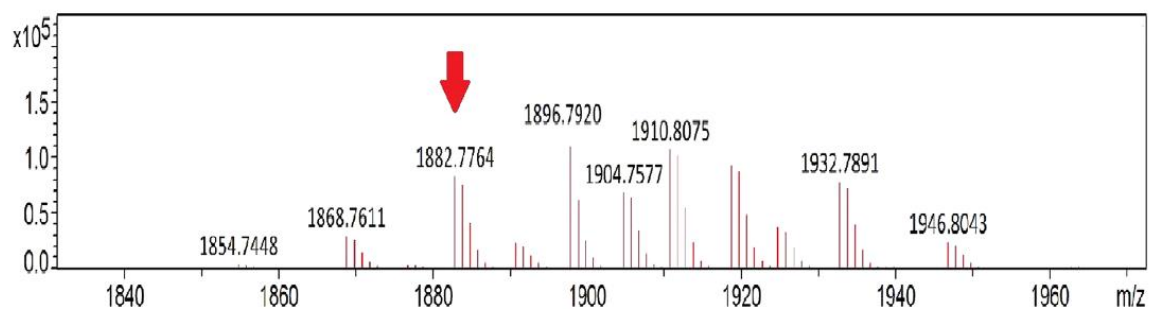


14. ábra: Monoamino RAMEB konjugálási reakciója DOTAGA kelátorral



15. ábra: A tisztított DOTAGA-RAMEB RP-HPLC kromatogramja

Az alkalmazott analitikai RP-HPLC módszer esetében a termék retenciós ideje 9,8 perc volt. A kromatogramon a termék jelén kívül más jel nem észlelhető, mely bizonyítja, hogy a termék tisztasága közel 100%.



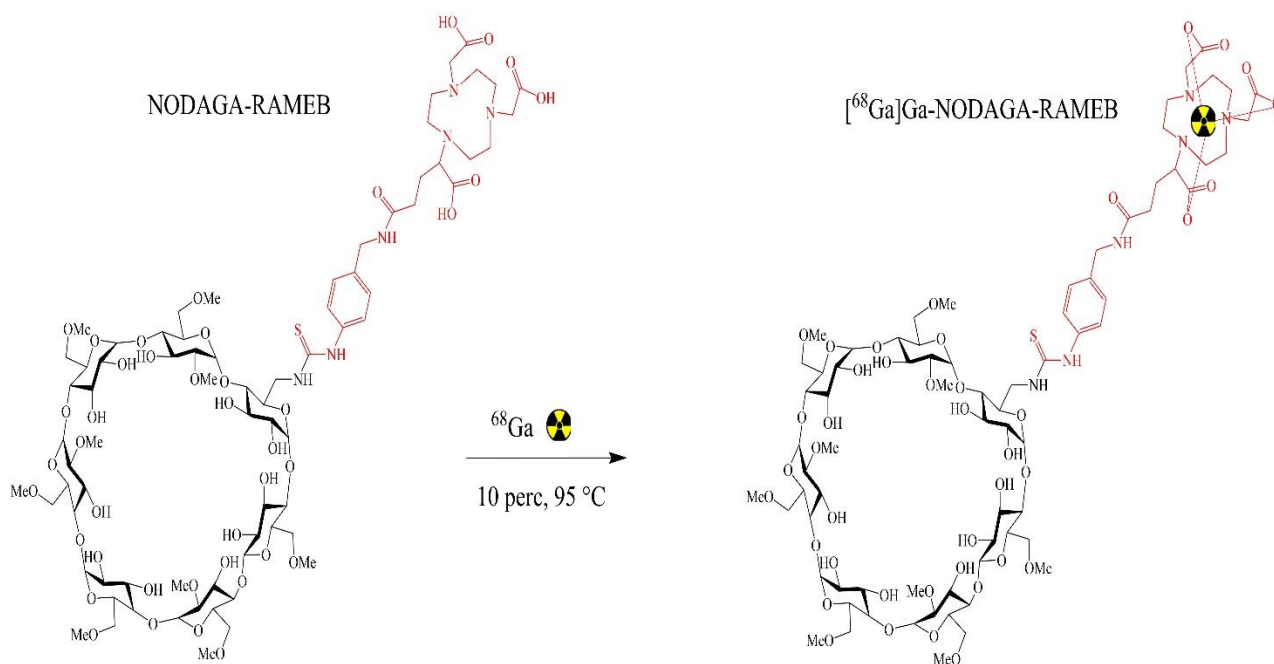
16. ábra: A DOTAGA-RAMEB tömegspektruma

A nyíl a főtermékhez tartozó mért tömeg jelét mutatja.

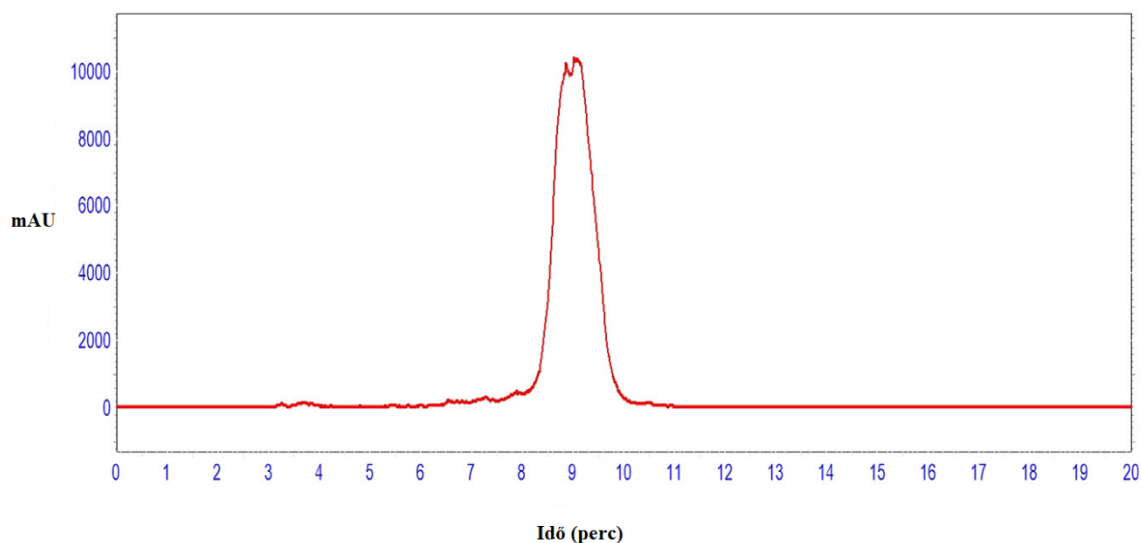
5.2. Radiokémia

5.2.1. NODAGA-RAMEB jelölése ^{68}Ga izotóppal

A $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátort a 2. fejezetben leírtak szerint frakcionáltan eluáltuk, majd a legmagasabb aktivitású frakcióval dolgoztunk tovább. A NODAGA-RAMEB-et ólomárnyékolt kézi munkahelyen manuálisan jelöltük ^{68}Ga -mal (17. ábra). A reakcióelegyet puffereltük, majd 10 percig 95 °C-on inkubáltuk. A ^{68}Ga -mal jelölt NODAGA-RAMEB [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB terméket szeparációs oszlopon tisztítottuk és sterilre szűrtük. Felhasználás előtt minden esetben minőségellenőrzést is végeztünk. A teljes reakcióidő körülbelül 20 perc volt. A termék moláris aktivitása $15,34 \pm 1,93\text{GBq} / \mu\text{mol}$, a radiokémiai tisztasága (RPC) 98% feletti volt. A radiokémiai tisztaság meghatározásához RP-HPLC rendszert használtunk, a 4.6. fejezetben leírtak szerint. Az alkalmazott analitikai vizsgálat során látható, hogy a termék csúcs mellett nem található egyéb csúcs, mely azt jelzi, hogy a termék nem tartalmaz sehol sem szabad ^{68}Ga ionokat, sem egyéb aktív szennyezőket. A termék retenciósideje 9,13 perc volt. (18. ábra)



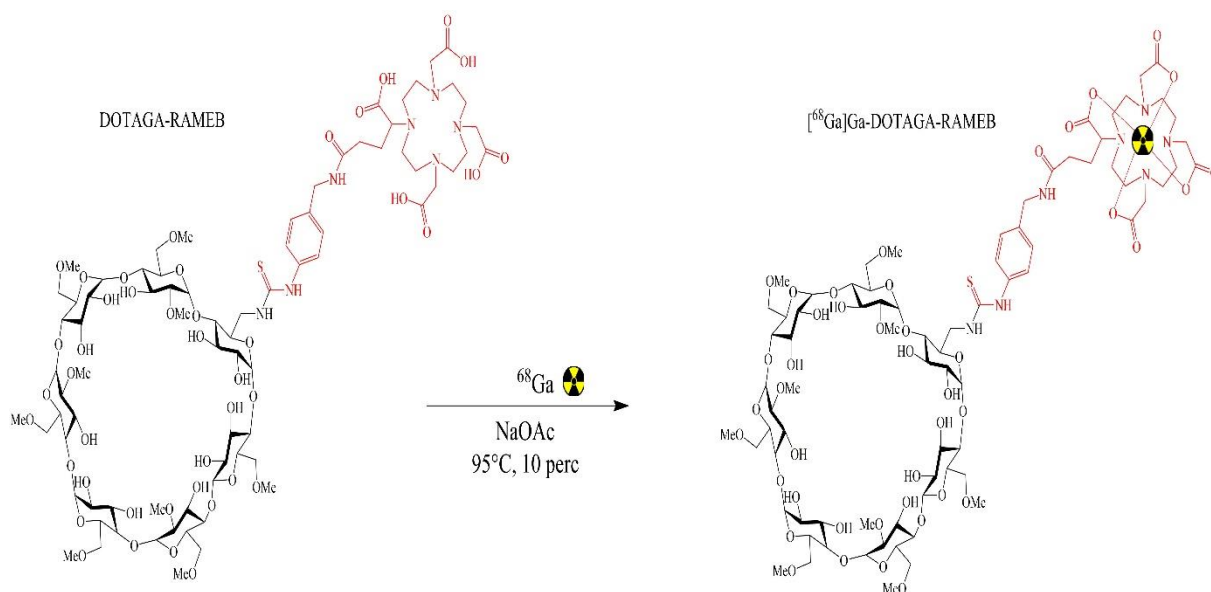
17. ábra: A NODAGA-RAMEB jelölése ^{68}Ga izotóppal



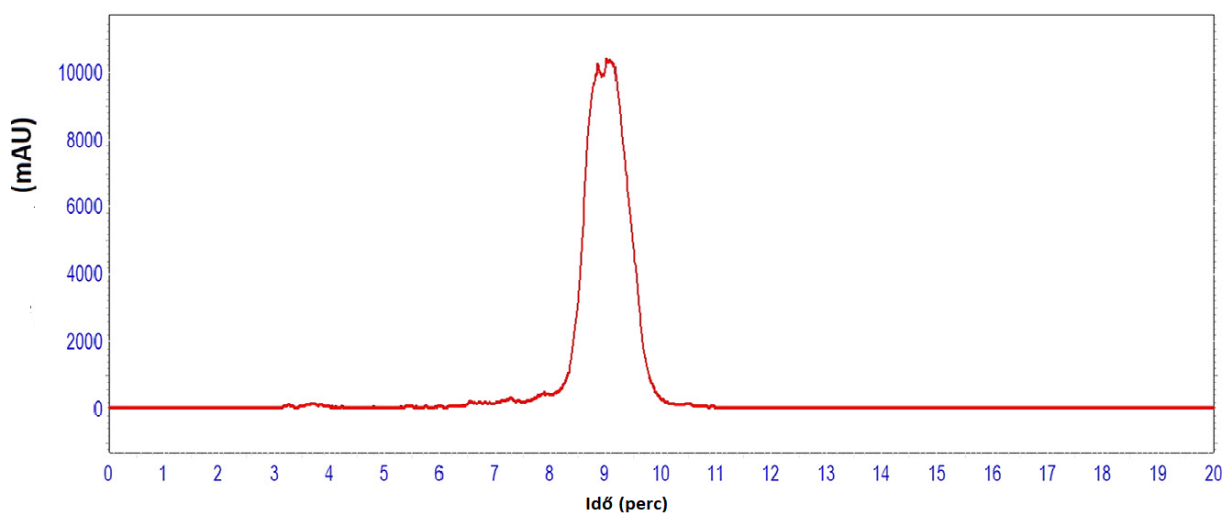
18. ábra: a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ RP-HPLC kromatogramja

5.2.2. A DOTAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal

A DOTAGA-RAMEB radiojelölését szintén ólomárnyékolt kézi munkahelyen végeztük. A 4.5. fejezetben leírt módon nyert 1 ml ^{68}Ga eluátumot nátrium acetáttal puffertük, majd hozzáadtuk a DOTAGA-RAMEB prekuzort. A reakció 10 perc alatt ment végbe, 95 °C-on. A jelölt terméket $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ 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 4.3. fejezetben leírtak szerint. A termék radiokémiai tisztasága (RPC) 98% feletti volt (19. ábra). A 20. ábrán látható, hogy 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.



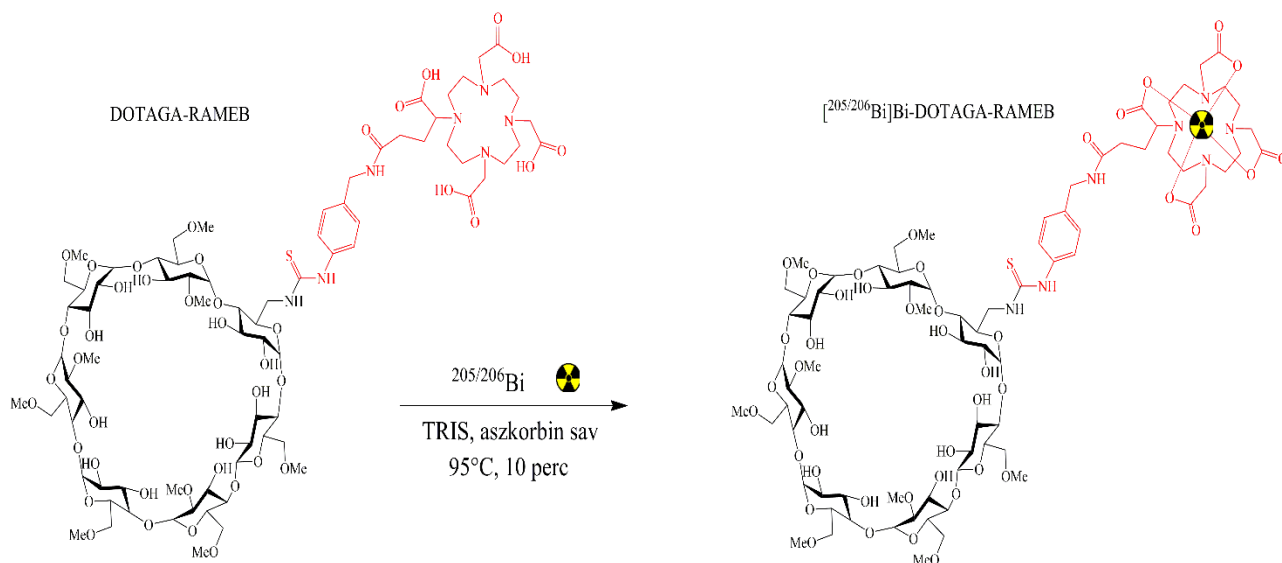
19. ábra: A DOTAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal



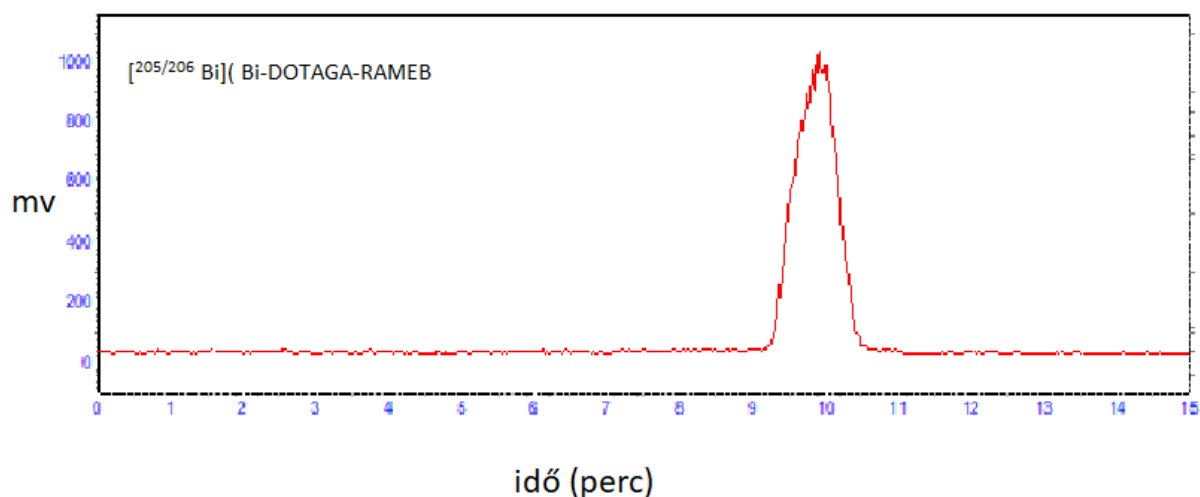
20. ábra: $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ RP-HPLC kromatogramja

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

A DOTAGA-RAMEB radiojelölését manuálisan végeztük a 4.6. fejezetben leírtak szerint előállított $^{205/206}\text{Bi}$ izotópotat felhasználva, azaz a $^{205/206}\text{Bi}$ izotópotat 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 adtunk hozzá 20%-os aszkorbinsavat (25 μl), és hozzáadtuk 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 $^{205/206}\text{Bi}$ izotópotat, majd a $^{205/206}\text{Bi}$ -DOTAGA-RAMEB terméket a 4.6. fejezetben leírtak szerint eluáltuk. A jelölés reakciósémája a 21. ábrán látható. A radiokémiai tisztaság meghatározásához radio detektorral kombinált RP-HPLC rendszert használtunk, a 4.3. fejezetben leírtak szerint. A termék radiokémiai tisztasága (RPC) 98% feletti volt (22. ábra). A B ábrán látható, hogy 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.



21. ábra: DOTAGA-RAMEB jelölése $^{205/206}\text{Bi}$ izotóppal



22. ábra: $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTAGA-RAMEB}$ RP-HPLC kromatogramja

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

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

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

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

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

5.4. A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ 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 775mg konjugált gyantát kaptunk. A kapcsolási reakció 98%-os hozamot mutatott.

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

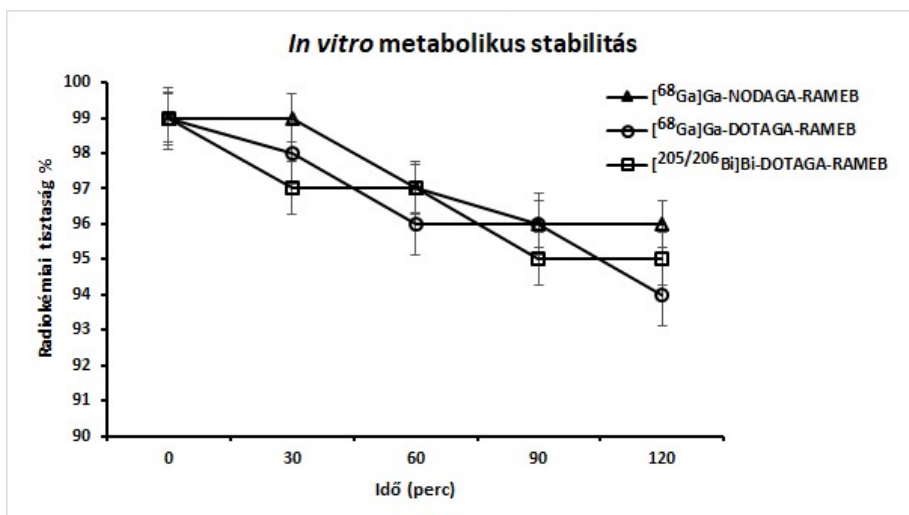
5.5. *In vitro* metabolikus stabilitás meghatározása

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ (10 μL , $5,5 \pm 0,2$ MBq); $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ (10 μL , $5 \pm 0,5$ MBq) és a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTAGA-RAMEB}$ (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 (23. ábra).

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ stabil maradt a mért időszakban, és a radiokémiai tisztasága 95% felettinek bizonyult.

A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTAGA-RAMEB}$ stabilak maradtak a mért időszakban és radiokémiai tisztaságuk 95% felettinek bizonyult.

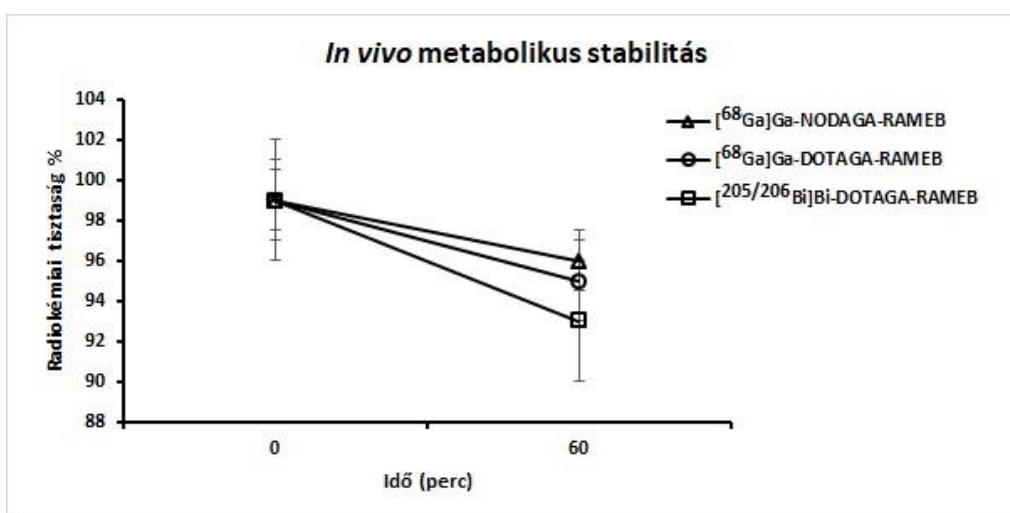
Tehát számíthatunk arra, hogy az *in vivo* vizsgálatokban a PET felvételeken a dúsulások a radiogyógyszertől származnak. Az általunk használt radioizotópok, a ^{68}Ga és a $^{205/206}\text{Bi}$ szabad ion formájában nem okoznak majd radiotoxicitási problémákat az egyéb, általunk nem célzott szövetekben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



23. ábra: *In vitro* metabolikus stabilitás [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB; [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB (10 μL, 4 ± 0,6 MBq) egér szérumban

5.6. *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 órás inkubációs idő után az egerek vizeletét gyűjtöttük. 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 (24. ábra)



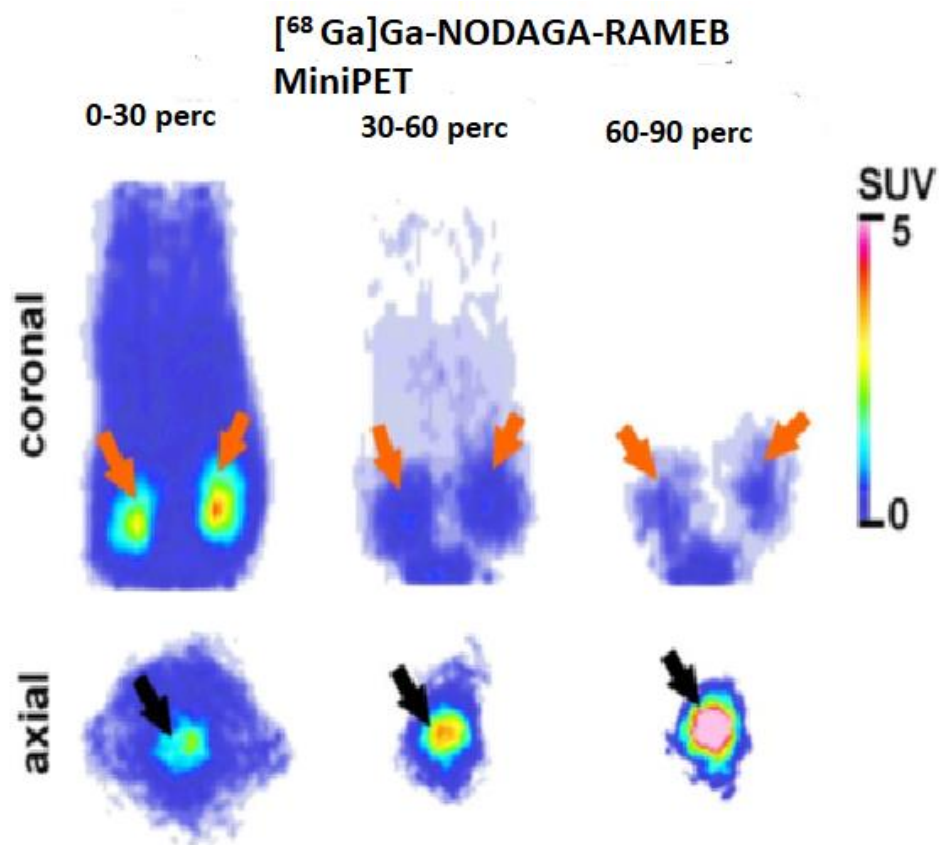
24. ábra: a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB, a [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [^{205/206}Bi]Bi-DOTAGA-RAMEB *in vivo* metabolikus stabilitása

5.7. MiniPET képalkotás

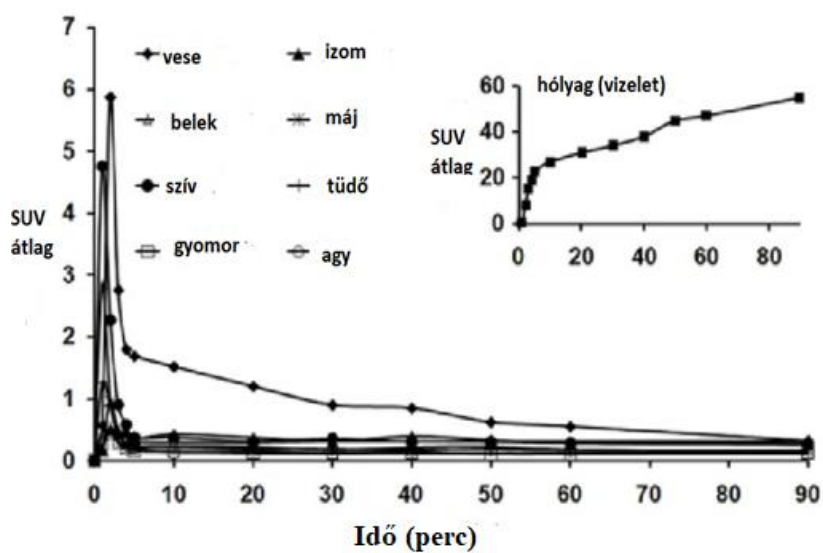
5.7.1. Szervi eloszlás vizsgálatok egészséges kontroll egereken

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

A radioaktívan jelzett vegyületek élő szervezetben történő szerveszételésének, viselkedésének és eliminációjának megfigyelése céljából képalkotó vizsgálatokat végeztünk. A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB biológiai eloszlásának meghatározásához egészséges kontroll CB17 SCID egerekkel dinamikus PET képalkotást és *ex vivo* vizsgálatokat végeztünk, a 4.17. fejezetben ismertetett módon. 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 dinamikus PET képeket és az átlag idő-aktivitás görbét (TAC) a 26. ábra mutatja. A PET képek bomlás korrigált elemzésével a vesék és a hólyag (vizeletrendszer) egyértelműen látható volt (25. ábra), 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 (26. ábra) 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.



25. ábra: A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB biológiai eloszlása egészséges kontroll CB17 SCID egerekben dinamikus PET képek Narancssárga nyilak: vese; fekete nyilak: húgyhólyag.

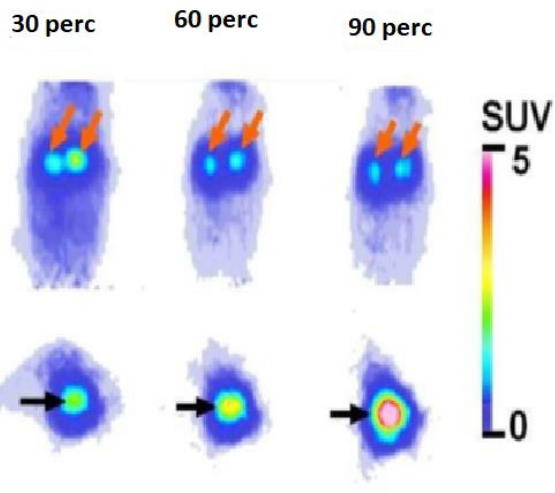


26. ábra: A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB szervi eloszlása SUV átlag- idő bomláskorrigált görbe

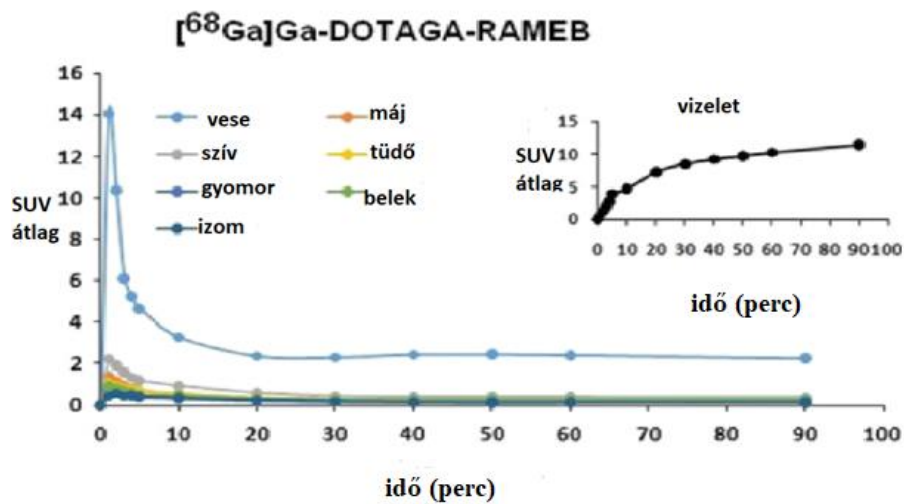
5.7.1.2. [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB szervi eloszlásának vizsgálata

[⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületünk esetén is, 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 PET-skenner segítségével inhalációs érzéstelenítés alatt. A dinamikus PET képeket és az átlag idő-aktivitás görbét (TAC) a 27. és 28. ábra mutatja. A PET képek bomlás korrigált elemzésével a vesék és a hólyag (vizeletrendszer) egyértelműen látható volt (27. ábra), 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 (28. ábra) 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. 5 perc múlva 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: $0,21 \pm 0,05$), a szívben (SUV-átlag: $0,38 \pm 0,08$). A hasi szervekben (SUV-átlag: $0,25 \pm 0,06$), a májban (SUV-átlag: $0,25 \pm 0,06$), a gyomorban (SUV-átlag: $0,14 \pm 0,03$) A vizelet radioaktivitása azonban jelentősen megnőtt 5 és 90 perccel az injekció beadása után (SUV-átlag: $3,93 \pm 1,85$ és $11,46 \pm 2,75$)

[⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB



27. ábra [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB biológiai eloszlása egészséges kontroll SCID egerekben. Reprezentatív bomláskorrigált dinamikus PET képek. Narancssárga nyilak: vese; fekete nyilak: húgyhólyag



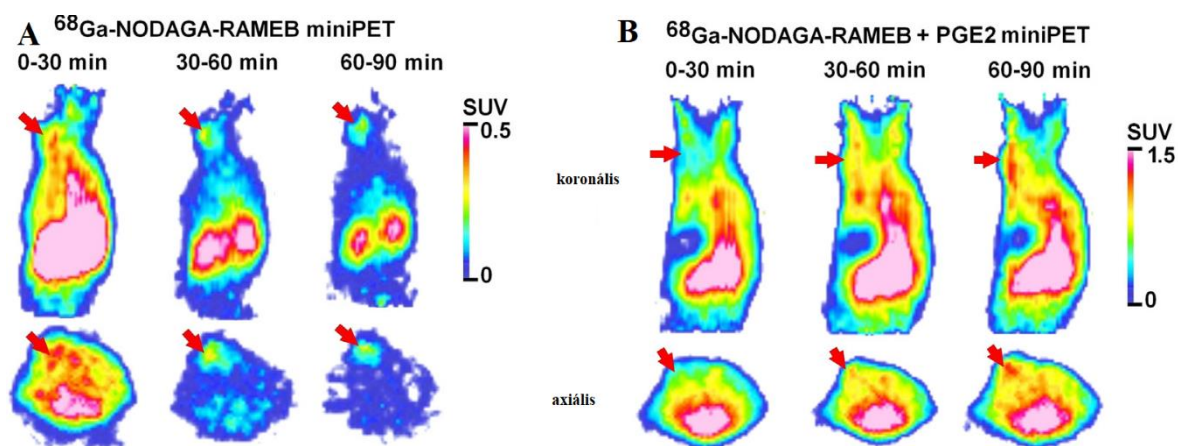
28. ábra: [⁶⁸Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB szervi eloszlása SUV-átlag- idő bomláskorrigált görbe

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

5.8.1. A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitása BxPC-3 tumort hordozó

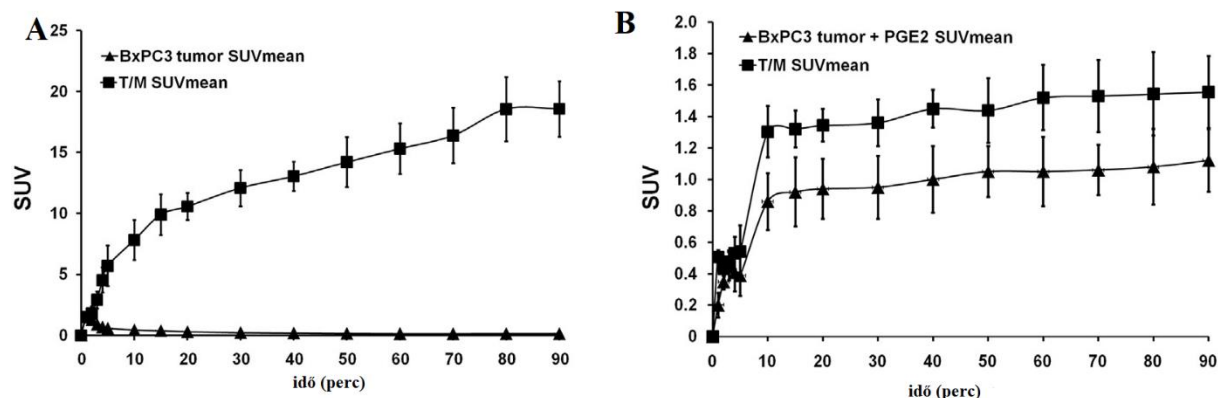
SCID egerekben PGE2 alkalmazása mellett

Annak érdekében, hogy feltárjuk a PGE2 szerepét a tumorhalmozás folyamatában ezért *in vivo* vizsgálat során miniPET felvételeket készítettünk PGE2 alkalmazása mellett nevezetesen a PGE2 pozitív BxPC-3 tumort hordozó SCID egereket intravénásán injektáltunk, 100 µl 4% etanol tartalmú sóoldattal hígított $7,25 \pm 0,21$ MBq aktivitású [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyület és 1 mg PGE2 keverékével. 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 29. ábrán szemléltettük. A PET-felvételek kvalitatív elemzésével megállapítottuk, hogy a szubkután növekvő BxPC-3 daganatok egyértelműen azonosíthatók voltak (29 A. ábra, piros nyilak) az injekció beadása után 30 perccel, azonban magas háttér radioaktivitást észleltünk. Ezenkívül az inkubációs idő növekedésével a háttéraktivitás 30 percről 90 percre csökkent, és a daganat hangsúlyosabbá vált. Ezt a megfigyelést megerősítette a kvantitatív SUV adatelemzés (30. ábra), ahol megállapítottuk, hogy a T/M SUV-átlag adatok 10 percről nőttek (T/M SUV átlag: $7,80 \pm 1,64$) 90 percre (T/M SUV átlag: $18,57 \pm 2,64$) az injekció beadása után. A BxPC-3 tumorok SUV értékei nagyon lassan csökkentek az injekció beadását követően 10 perccel. (SUV átlag: $0,45 \pm 0,06$). Annak ellenére, hogy a BxPC-3 daganatoknak viszonylag alacsony a radiotracer felvétele (SUV átlag: $0,14 \pm 0,04$) 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 29. B. ábra és 30. B. ábra azt mutatja, hogy 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: $0,95 \pm 0,20$) 30 percnél, és az injekció beadása után 90 perccel (SUV átlag: $1,12 \pm 0,21$). 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) (29 B. ábra). Ezt jelzi egy jelentősen ($p \leq 0,01$) körülbelül 10-szer alacsonyabb a tumor-izom arány (T/M SUV átlag: $1,36 \pm 0,15$) 30 percnél és (T/M SUV átlag: $1,56 \pm 0,23$) 90 percnél, mint amely a PGE2 molekula távollétében volt megfigyelhető.



29.A ábra: Reprezentatív időfüggő, bomlás korrigált koronális és axiális miniPET képek $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ injektálása után BxPC-3 daganatot hordozó egerekben

29.B ábra: Reprezentatív időfüggő, bomlás korrigált koronális és axiális miniPET képek $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ és PGE2 együttes injektálása után BxPC-3 daganatot hordozó egerekben

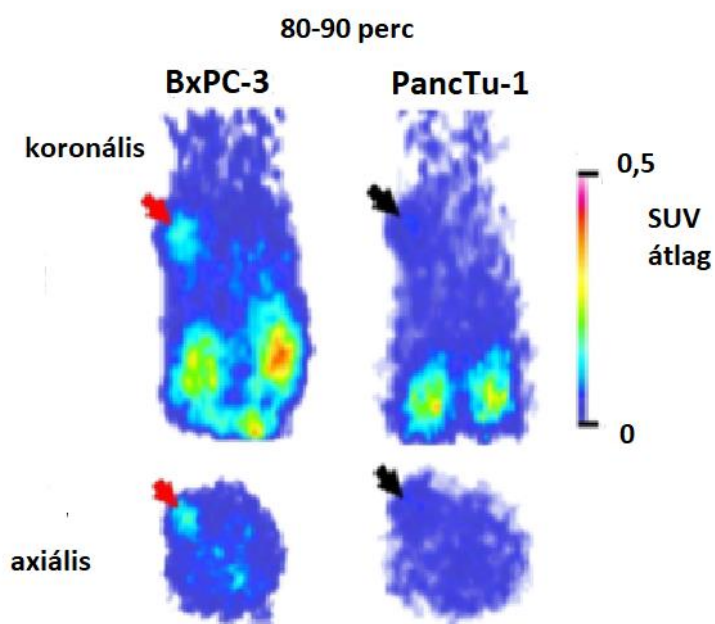


30.A ábra: Idő-aktivitási görbe (TAC) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ felhalmozódásról PGE2 pozitív BxPC-3 tumorokban.

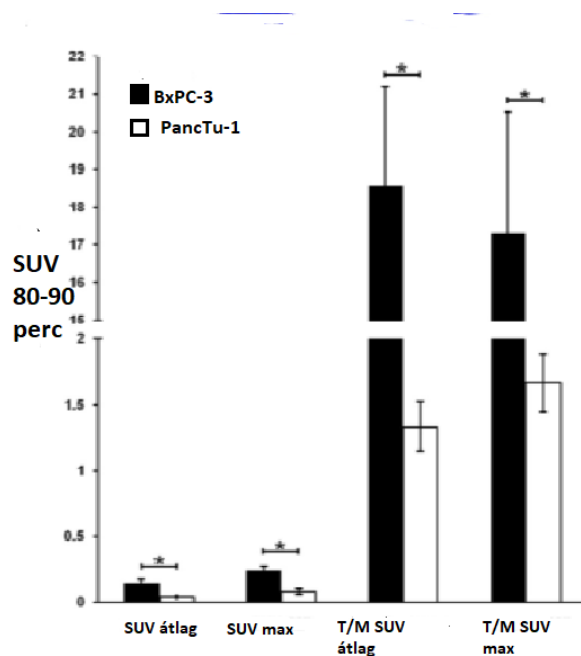
30.B ábra: Idő-aktivitási görbe (TAC) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ + 1 mg PGE2 felhalmozódásról PGE2 pozitív BxPC-3 tumorokban.

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

A [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitását az alacsony proszttaglandin E2 receptort expresszált PancTu-1 tumorokat használva igazoltuk. 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 BxPC-3 és PancTu-1 daganatokat hordozó egerekbe. A reprezentatív bomláskorrigált PET képek az 31. ábrán láthatók, 80-90. perccel az injekció beadása után. A miniPET-felvételek kvalitatív elemzésével azt találtuk, hogy a BxPC-3 daganatok egyértelműen láthatóak voltak (31. ábra, piros nyilak), azonban a PancTu-1 daganat- alacsonyabb proszttaglandin E2 receptor (EP2) expressziója miatt- nem tért el élesen a háttérben lévő szövetektől (31. ábra, fekete nyilak). 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 32. ábrán láthatóak. Az értékelés szerint a PET-képek közül 80-90 percnél szignifikánsan ($p \leq 0,01$) kisebb akkumuláció mutatkozott a PancTu-1 daganatokban a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB alkalmazása esetén (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: $1,66 \pm 0,22$) értékei a PancTu-1 daganatok esetén körülbelül 3-14- szer alacsonyabbak voltak, mint a BxPC-3 tumoroknál, ami megerősíti a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB magas PGE2-szelektivitását. (32. ábra).



31. ábra: A BxPC-3 és a PancTu-1 tumoros SCID egerek reprezentatív bomlás korrigált miniPET képei

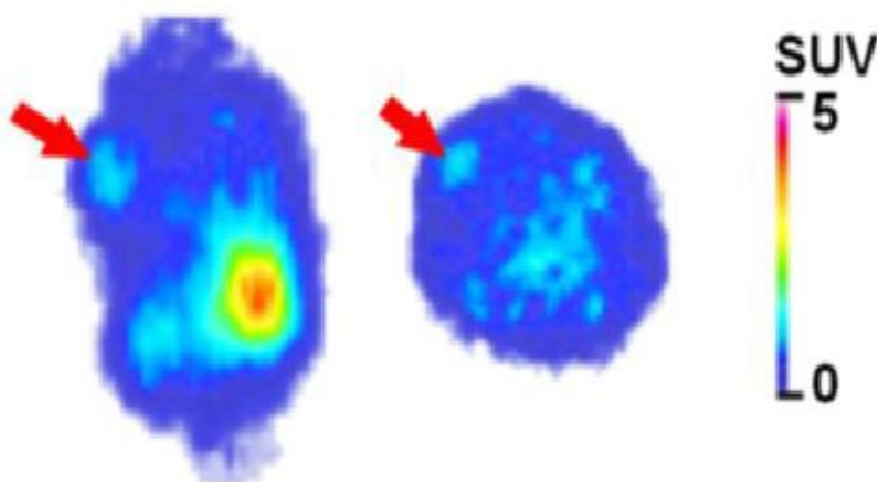


32. ábra: a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ felvétel kvantitatív SUV elemzése 80-90 perccel a radiotracer intravénás injekciója után

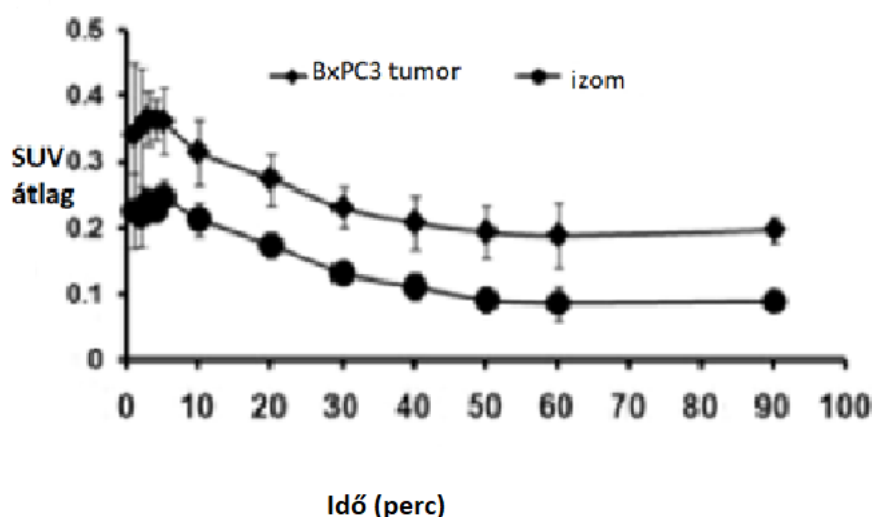
5.9. A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB biológiai eloszlásának *in vivo* értékelése

BxPC-3 daganatot hordozó egerekben

A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyület esetén is, inhalációs anesztézia mellett $6,4 \pm 0,3$ MBq aktivitású [^{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 miniPET-szkennel segítségével inhalációs érzéstelenítés alatt. A kvalitatív képelemzéssel azt találtuk, hogy a BxPC-3 daganatok egyértelműen azonosíthatóak a PET-felvételeken a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radiofarmakon felvétele által (33. ábra). 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 (34. ábra). Ezen adatok alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a daganat-háttér (izom) arány, a legmagasabb a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB beadása után 90 perccel, amikor a T/M arány $2,5 \pm 0,2$ volt (32. ábra).



33. ábra: A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB *in vivo* biológiai eloszlása BxPC-3 daganatot hordozó SCID egerekben. Reprezentatív bomláskorrigált statikus coronalis (balra) és transaxiális (jobbra) miniPET felvételek 90 perccel a radiotracer injekció beadása után.



34.ábra: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGARAMEB}$ idő-aktivitás görbéje BxPC-3 daganatban és izomban

5.10. Ex vivo biodisztribúciós vizsgálatok

5.10.1.A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ ex vivo biológiai eloszlási vizsgálatok egészséges kontroll egereken

Az ex vivo biológiai eloszlási vizsgálatokat a 4.17. fejezetben ismertetett módszer szerint végeztük. A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ injekció intravénás beadását követően 30, 60 és 90 perces inkubációs idők leteltével. A szervek és szövetek $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ felvételét kalibrált gamma-számlálóval mértük. A kvantitatív elemzés után az ex vivo eredmények és az in vivo SUV adatok jól korreláltak egymással, amely a 2. táblázatban látható ex vivo % ID/g értékekkel. A % ID/g adatokból kiderült, hogy a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ gyorsan kiürült a vesékből és koncentrációja megnövekedett a hólyagban, ahogyan az a LogP vizsgálat alapján vártuk, mert a ^{68}Ga -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 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ felhalmozódása más szervekben és szövetekben szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,01$) mutatott a 30 és 90 perces % ID/g értékek között (2. táblázat). Nagyon alacsony $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ 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.

2. táblázat: [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB (% ID/g) ex vivo szervi eloszlása egészséges kontroll egerekben 30, 60 és 90 perccel a radiotracer injektálása után. Szignifikancia szint 30 és 90 perces adatok között: $p \leq 0.01$ (*).

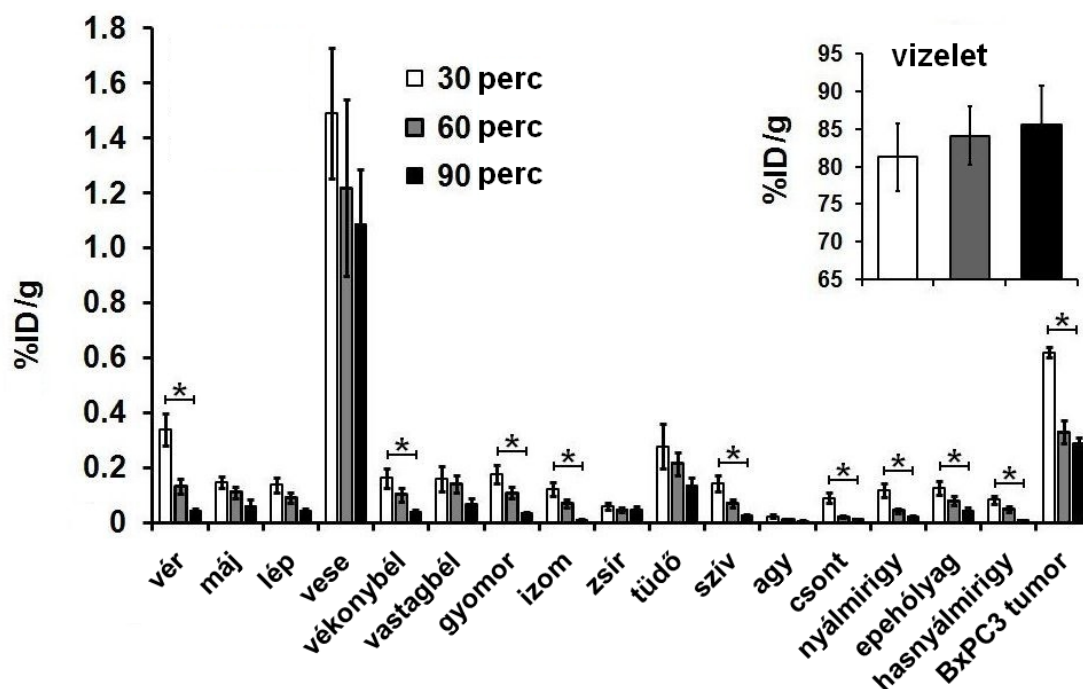
Szerv/szövet	30 perc (n= 5)	60 perc (n=5)	90 perc (n= 5)
Vér	0.34 ± 0.06	0.13 ± 0.03	$0.04 \pm 0.01^*$
Vizelet	81.26 ± 4.47	84.14 ± 3.85	85.65 ± 5.12
Máj	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.02
Lép	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Vese	1.49 ± 0.24	1.22 ± 0.32	1.09 ± 0.20
Vékonybél	0.16 ± 0.03	0.10 ± 0.03	$0.04 \pm 0.01^*$
Vastagbél	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.02
Gyomor	0.18 ± 0.03	0.11 ± 0.02	$0.03 \pm 0.01^*$
Izom	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.01	$0.01 \pm 0.01^*$
Zsír	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Tüdő	0.28 ± 0.08	0.21 ± 0.04	0.14 ± 0.03
Szív	0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.01	$0.03 \pm 0.01^*$
Agy	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Csont	0.09 ± 0.02	0.02 ± 0.01	$0.01 \pm 0.01^*$
Nyálmirigy	0.12 ± 0.02	0.04 ± 0.01	$0.02 \pm 0.01^*$
Epehólyag	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.02	$0.04 \pm 0.01^*$
Hasnyálmirigy	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.01	$0.01 \pm 0.01^*$

5.10.2. A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB ex vivo biológiai eloszlási vizsgálatok daganatot hordozó SCID egereken

A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB PGE2 szelektivitásának értékeléséhez ex vivo biológiai eloszlási vizsgálatokat végeztünk 30, 60 és 90 perccel a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyület ($7,31 \pm 0,32$ MBq), injektálását követően, BxPC-3 és PancTu-1 daganatot hordozó egereken. A 35. ábra azt mutatja, hogy a [^{68}Ga]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 (35. ábra és 3. táblázat). Kivételt képez ez alól a vese és a húgyhólyag. Azt is megállapítottuk,

hogy a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódása szignifikánsan ($p \leq 0,01$) csökkent az injekció beadása utáni 30 percről 90 percre a legtöbb vizsgált mellkasi és hasi szervben és BxPC-3 daganatokban (35 ábra).

Az *in vivo* PET adatokhoz hasonlóan BxPC-3 és PancTu-1 daganatok összevetése esetén is, szignifikánsan ($p \leq 0,01$) alacsonyabb [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB *ex vivo* akkumulációt figyeltünk meg a PancTu-1 daganatokban 90 perccel az injekció beadása után (3. táblázat). A % ID/g adatok körülbelül 5-ször alacsonyabb [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felvételt mutattak a PancTu-1 daganatokban, mint a BxPC-3 daganatokban 90 perccel az injekció beadása után. Ráadásul miután a [^{68}Ga]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. ($p \leq 0,01$) (x. táblázat).



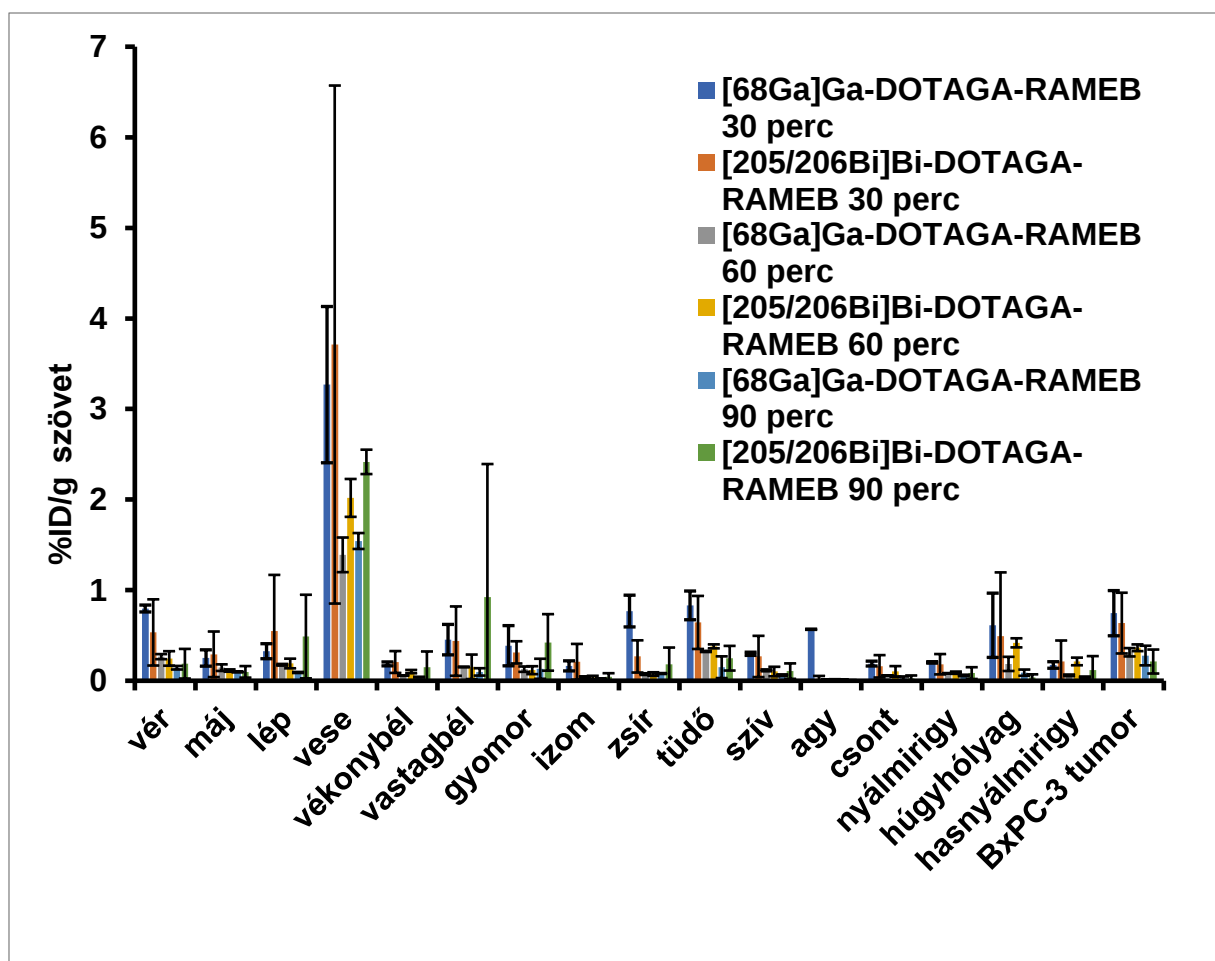
35. ábra: A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódásának *ex vivo* értékelése a PGE2 pozitív BxPC-3 tumort hordozó CB17 SCID egerekben

3. táblázat: A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felvételének *ex vivo* értékelése (% ID/g) BxPC-3- és PancTu-1 daganatokban

Tumor	[^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB		
	30 perc	60 perc	90 perc
BxPC-3 tumor (n=5)	0,62 ± 0,02	0,33 ± 0,04	0,29 ± 0,02*
BxPC-3 + 1 mg PGE2 (n=5)	-	-	6,71 ± 0,16
BxPC-3 T/M	20,03 ± 4,16	15,68 ± 4,04	17,18 ± 3,10*
BxPC-3 T/M + 1 mg PGE2	-	-	2,93 ± 0,46
PancTu-1 tumor (n=5)	-	-	0,06 ± 0,02*
PancTu-1 T/M	-	-	5,40 ± 1,17*

5.10.3. A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB *ex vivo* biológiai eloszlás elemzése BxPC-3 daganatot hordozó egerekben

Külön kísérletekben az *ex vivo* biológiai eloszlási vizsgálatokhoz szintén kontroll és tumort hordozó (BxPC-3) SCID egereket használtunk. Intravénás injekcióban [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB radioizotóp jelzett vegyületet ($6,2 \pm 0,2$ MBq) vagy külön kísérletben [$^{205/206}\text{Bi}$]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, amint az a 36. ábra és a 4. táblázat mutatja. 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 (36 ábra). 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.



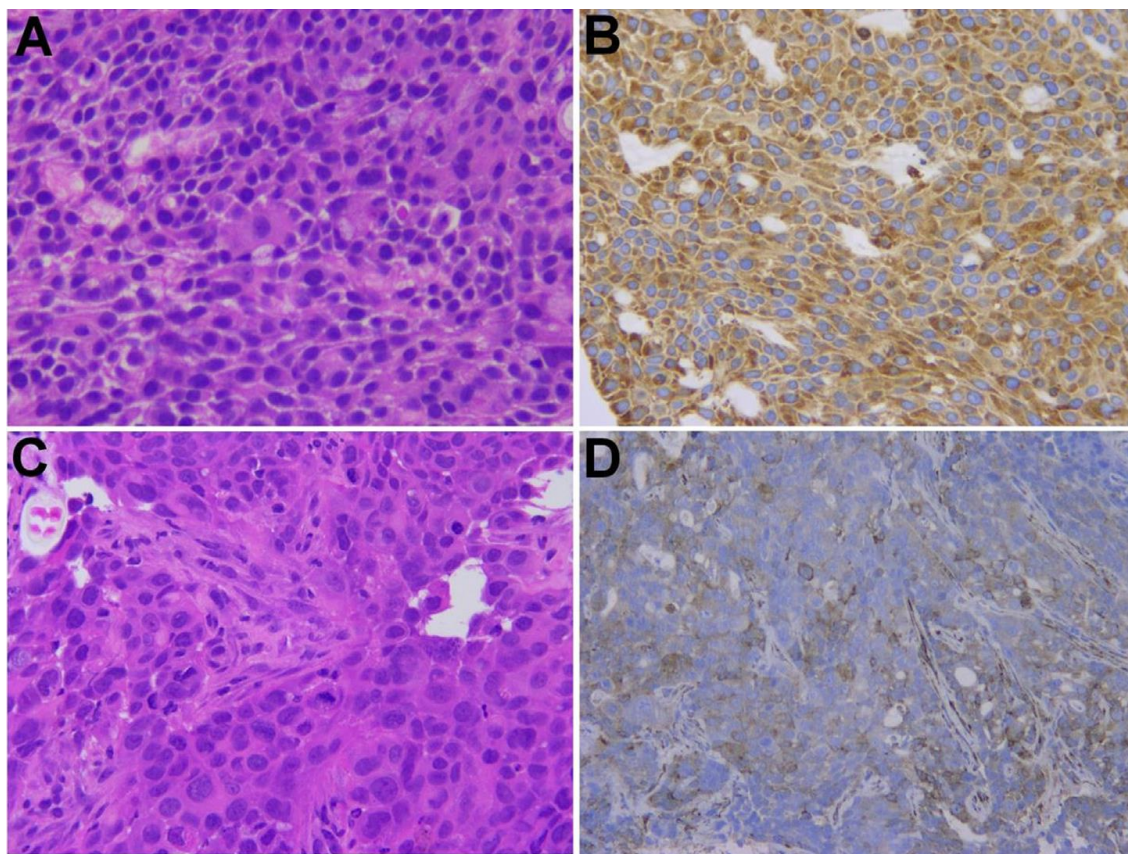
36. ábra: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTAGA-RAMEB}$ ex vivo biológiai megoszlása PGE2 pozitív BxPC-3 tumort hordozó CB17 SCID egerekben

4. táblázat: A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB radiotracerek ex vivo biológiai eloszlása 30, 60 és 90 perccel az injekció beadása után. % ID/g kifejezve átlag

	[^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB 30 perc	[^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB 60 perc	[^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB 90 perc	[$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB 30 perc	[$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB 60 perc	[$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB 90 perc
vér	0,80	0,27	0,14	0,53	0,25	0,19
máj	0,25	0,14	0,10	0,29	0,11	0,10
lép	0,33	0,18	0,09	0,55	0,19	0,49
vese	3,27	1,39	1,54	3,71	2,02	2,42
vékonybél	0,19	0,06	0,04	0,21	0,10	0,15
vastagbél	0,45	0,15	0,10	0,44	0,15	0,92
gyomor	0,39	0,13	0,13	0,31	0,12	0,42
izom	0,16	0,04	0,02	0,21	0,04	0,04
zsír	0,77	0,07	0,08	0,27	0,07	0,18
tüdő	0,83	0,32	0,15	0,64	0,38	0,25
szív	0,30	0,11	0,06	0,27	0,10	0,11
agy	0,57	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00
csont	0,19	0,06	0,03	0,16	0,10	0,02
nyálmirigy	0,20	0,08	0,06	0,18	0,09	0,08
húgyhólyag	0,61	0,19	0,09	0,49	0,42	0,04
hasnyálmirigy	0,17	0,06	0,04	0,21	0,21	0,12
BxPC-3 tumor	0,75	0,31	0,28	0,64	0,36	0,21

5.11. 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. A 37B. ábra erős EP2 receptor pozitivitást, és intenzív citoplazma/membrán expressziót mutat a xenograft hasnyálmirigy karcinóma sejtekben. Ezzel szemben alacsonyabb jelintenzitást figyelhattunk meg a PancTu-1 daganatoknál (37D. ábra). Ezek az eredmények jól korreláltak az *ex vivo* és *in vivo* vizsgálatok eredményeivel, tovább erősítve a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ erős kötődési affinitását a PGE2 molekulához. Külön kísérletekben vizsgáltuk a szubkután növekvő BxPC-3 PGE2 receptorának jelenlétét (37. ábra). Erős receptor pozitivitás 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 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ és a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTAGA-RAMEB}$ esetében is.



37. ábra BxPC-3 (A és B panel) és PancTu-1 (C és D panel) tumorok 11 nappal a tumorsejt-oltás után. A és C: reprezentatív hematoxilineozin festett daganatszövet; B és D: Anti-Prosztaglandin E receptor EP2/PTGER2 antitest immunhisztokémia (IHC), vizualizálva 3,3'-diaminobenzidin (DAB) (barna festés). Nagyítás: 40X.

Megjegyzések:

A kémiai, illetve radiokémiai reakciók és mérések teljes egészében a saját munkáim, kivételt képeznek a tömegspektrometriás és ^1H -NMR mérések, ezt az anyagok és módszerek részben jelöltem.

A biológiai méréseket kutatócsoportunk biológusai segítségével végeztem. Az eredmények kiértékelését is az ő iránymutatásukkal végeztem.

6. Megbeszélés

Az elmúlt években a prosztata E2 (PGE2) molekulával és receptoraival kapcsolatos kísérletek egyre nagyobb figyelmet kapnak a preklinikai onkológiai kutatásokban.

A PGE2-ről ismert, hogy a neoangiogenezis elősegítése révén fokozza a daganatsejtek proliferációját, valamint növeli azok immunitását a daganatellenes kezelésekre, és gátolja az apoptózist. (B. Liu és mtsai., 2015). Ismeretes azonban, hogy a PGE2 különböző daganatok biomarkere is lehet (hasnyálmirigy-, vese-, száj- és mellrák) (Tong és mtsai., 2018). Ezen okok miatt fontos szerepet játszhat a PGE2-pozitív daganatok *in vivo* diagnosztikájában pozitronemissziós tomográfiával és terápiás célpontként is alkalmazható a daganatok kezelésében.

Sauer és kutatócsoportja 2017-ben azt találta, hogy a random metilezett β -ciklodextrin (RAMEB) nagy affinitással rendelkezett a PGE2-vel történő komplex kialakítására (Sauer és mtsai., 2017). A ciklodextrineket a gyógyszerészet és az orvostudomány több területén is alkalmazzák, de nem használják a pozitronemissziós tomográfiával végzett daganatképzés területén. Kutatócsoportunk korábban beszámolt egy új ^{68}Ga -mal jelölt, és NODAGA kelátképzővel módosított ciklodextrin származék előállításáról. Ezen ^{68}Ga -NODAGA-HP β CD (2-hydroxypropyl- β -ciklodextrin) farmakokinetikai tulajdonságait és az *in vivo* eloszlást tesztelték (Hajdu és mtsai., 2019). A korábbi eredmények alapján, kutatómunkánk első szakaszában az NH_2 -RAMEB-t módosítottuk NODAGA kelátképzővel, és Gallium-68 radioizotóppal jelöltük egy PGE2 pozitív daganatok *in vivo* PET képzése 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 tisztaság (98,0% felett) és moláris aktivitása $15,34 \pm 1,93$ GBq/ μ mol volt. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor kutatócsoportunk a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD -t szintetizálta és jellemezte. a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD radiokémiai tisztasága is magasabb volt, mint 98%, és a fajlagos aktivitás körülbelül 17 GBq/ μ mol volt, ami megerősíti, hogy módszerünk optimális a ciklodextrin és származékai radioaktív jelölésére ^{68}Ga -NODAGA-val (Hajdu és mtsai., 2019)

A [^{68}Ga]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}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB farmakon szérumban 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}Ga]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}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB elsősorban a vesén keresztül ürült ki hidrophil tulajdonsága miatt. Ugyanezen tulajdonságokat igazolták korábban a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD esetén, amely szintén erősen hidrophil volt (logP: $-3,07 \pm 0,11$) (Hajdu és mtsai., 2019). A [^{68}Ga]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 is gyors eliminációt figyeltek meg embereken és patkányokon végzett vizsgálatok során jelöletlen és radioaktívan jelölt HP β CD-vel (Frijlink és mtsai., 1990; Gould & Scott, 2005; Hajdu és mtsai., 2019). Az *ex vivo* (ID%/g) és az *in vivo* (SUV-k) összehasonlítása során alacsonyabb [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódást figyeltünk meg a hasi és mellkasi szervekben és szövetekben, mint a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD esetén. (Hajdu és mtsai., 2019) A szervek felvételi aránya azonban egymáshoz viszonyítva

meggyezett. Továbbá a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB esetében a vártnál magasabb tüdőakkumulációt is megfigyeltünk az *ex vivo* mérések során. A lehetséges okokat már leírták (Hajdu és mtsai., 2019) a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD vizsgálatai során: ez alapján az erősen hidrofil 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}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB -PGE2 komplex egy közepesen megnagyobbodott molekula, kevésbé hidrofil, és ezek a tulajdonságok megakadályozzák a gyorsan keresztüli eliminációt így növelve a keringési időt a vérben. Egy másik ok lehet a PGE2 és a vérplazmafehérjék kölcsönhatása (Raz, 1972), amelyek szintén növelhetik a keringési időt.

A szakirodalomban megjelent, hogy a prosztaglandinok képesek komplexet alkotni a béta-ciklodextrinekkal (Inoue és mtsai., 2016). Azt szeretnénk volna megnézni, hogy ez a komplexképződés *in vivo* is megtörténik-e, és hogyan hat a radioaktívan jelölt [^{68}Ga]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 [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB tumorfelvételét illetően.

Munkánk következő szakaszában az *in vivo* PET képalkotással kívántuk igazolni a ^{68}Ga -mal jelölt NODAGA-RAMEB molekula PGE2-szelektivitását. Tumor indukcióhoz CB17 SCID egerekben BxPC-3 és PancTu-1 hasnyálmirigy karcinóma sejtvonalakat használtunk. Korábbi tanulmányok beszámoltak róla (Yip-Schneider és mtsai., 2000), hogy a PGE2 termelés fokozott a BxPC-3 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonal esetén, továbbá igazolták, hogy az EP1 és EP2 receptorok aktivitása lényegesen magasabb PGE2 szintet igényel (O'Callaghan & Houston, 2015). Más kutatócsoportok is erős PGE2 szekréciót és magas EP2 receptor expressziót találtak a BxPC-3 sejtvonalak esetén, amikor különböző humán hasnyálmirigy-ráksejtek *in vitro* vizsgálatait végezték (Takahashi és mtsai., 2014). 2015-ben Gonnermann-féle áramlási citometriával és Western Blot-tal a PancTu-1 sejtvonal PGE2

termelését is vizsgálták. Az elemzések szerint a COX-2 expresszió és a PGE2 termelés nagyon alacsony a PancTu-1 sejtvonal esetén, a különböző hasnyálmirigy ductalis adenokarcinóma sejtvonalakkal összehasonlítva (Gonnermann és mtsai., 2015). Kutatásunk során mi is 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 BxPC-3 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 összehasonlítható 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. A közelmúltban egy erős és szelektív prosztanoid EP4 receptor antagonist, CJ-042794 ¹⁸F radioaktívan jelölt molekulát vizsgáltak Zhang és munkatársai (Z. Zhang és mtsai., 2017). Eredményeik szerint a nyomjelző felhalmozódása LNCaP prosztatarák xenograftot hordozó egerekben szelektívnek mutatkozott, de blokkoló vizsgálatok esetén a magasabb felvétel állandó maradt. Ez az eredmény azt sugallhatja, hogy az EP4 receptor nem játszik döntő szerepet a [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-RAMEB fajlagos felhalmozódásában.

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 [^{68}Ga]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 [^{68}Ga]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 [^{68}Ga]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.: prosztata glandin termelés, hypoxia stb.), valamint az EP2 receptor sűrűség. Összességében a vizsgálatainkban alkalmazott módszerekkel, elért eredmények megerősítették a szoros kapcsolatot a PGE2 molekula és a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB között, mely eredmények megteremtették a PGE2-célzott *in vivo* PET diagnosztika alapjait (Trencsényi és mtsai., 2020). 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 ^{68}Ga -mal és $^{205/206}\text{Bi}$ -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 a az izotiocianát, nem igényelnek védőcsoport-eltávolítási reakciókat és időigényes kromatográfiás munkát. Az ily módon újonnan szintetizált DOTGA-RAMEB alkalmas radioaktív jelölésre mind ^{68}Ga -mal (A. Anderson & McAnulty, 2013; Filippi és mtsai., 2020) mind $^{205/206}\text{Bi}$ -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 ^{68}Ga jelölések esetén a generátort ultratiszta sósavval eluáltuk ($c = 0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 1$). Az erősen savas közeg ($\text{pH} < 2$) nem megfelelő a radioaktív jelöléshez, ezért az eluátumokat 1 M nátrium-acetáttal puffereltük, hogy a pH -t $4,3\text{--}4,5$ -re állítsuk be (Hacht, 2008; Tsionou és mtsai., 2017). Minden reakció előtt a ^{68}Ga -eluátumot puffereltük, és közvetlenül a DOTAGA-RAMEB-hez adtuk, amely hatékony, robusztus radioaktív jelölési reakciót eredményezett. A $^{205/206}\text{Bi}$ jelölés esetén a radioaktív jelölési reakciót $8,2\text{--}8,5 \text{ pH}$ -n kell végrehajtani. Ez a pH érték csökkenti a bizmut-hidroxid kiválását és hatékony jelölési reakciót eredményez (Egorova és mtsai., 2018; Manna és mtsai., 2020). 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 egérszérumban jelenlétében stabilak maradtak, hasonlóan korábbi vegyületeinkhez, ami fontos az intravénás beadás szempontjából. Az *in vivo* metabolikus stabilitást 60 perccel a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTAGA-RAMEB és a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ -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 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTAGA-RAMEB és a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ -DOTAGA-RAMEB az élő szervezetben stabilak a keringés és a kiválasztás során, ami elengedhetetlen a további *in vivo* kísérletekhez.

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

A preklinikai vizsgálatok során először a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTAGA-RAMEB biológiai eloszlását határoztuk meg egészséges kontroll CB17 SCID egerekben *in vivo* PET képalkotás alkalmazásával. A $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTAGA-RAMEB vizelettel történő kiválasztása volt látható a bomláskorrigált PET képeken. Az átlagos $\log P$ -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 idő-aktivitás görbék a nyomjelző gyors kiürülését mutatják. Eliminációs eredményeink összhangban vannak a korábbi, más típusú ciklodextrinekkel (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 (Hajdu és mtsai., 2019).

A preklinikai kutatás második szakaszában a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB tumor célzó képességét vizsgáltuk PGE2-pozitív tumort hordozó egerekben *in vivo* PET képalkotással. Más kutatócsoportok által leírt 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 [^{68}Ga]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 ^{68}Ga -val jelölt RAMEB esetén. Mivel a $^{205/206}\text{Bi}$ fizikai jellemzői miatt nem lehetett PET szkennelvel elvégezni a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB összehasonlító szerveeloszlás 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 [^{68}Ga]Ga-DOTAGARAMEB felhalmozódás mindvégig alacsony volt az egyes szervekben. Ezek az adatok összhangban vannak az *in vivo* PET vizsgálat eredményeivel és a korábbi [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB valamint a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-HP β CD kutatások eredményeivel (Hajdu és mtsai., 2019;

Trencsényi és mtsai., 2020). Ezzel szemben a [$^{205/206}\text{Bi}$]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.

7. 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 kísérletsorozatunkban olyan radiojelzett ciklodextrin származékot [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB állítottunk elő, mely alkalmasnak bizonyult a BxPC-3 hasnyálmirigy adenokarcinóma tumor kimutatására. A RAMEB-et NODAGA kelátorhoz kapcsolva sikeresen jelöltük ^{68}Ga izotóppal, ezután analitikai vizsgálatoknak vetettük alá. Robosztus, 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 [^{68}Ga]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 kapcsoltunk, melyet első kísérletünkben ^{68}Ga izotóppal, majd külön kísérletben $^{205/206}\text{Bi}$ izotóppal radioaktívan jelöltünk. Így két magas radiokémiai tisztaságú reprodukálható, robosztus radiofarmakont kaptunk, a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB-et és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB-et. Mindkét radiogyógyszert 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.

8. Summary

The application of cyclodextrin derivatives in the medical and pharmaceutical industries is very diverse. CD-s have excellent drug carrier properties moreover it is known that many derivatives are effective in the therapy of several diseases. During my doctoral studies, we aimed to synthesize radiolabeled randomly methylated beta-cyclodextrin and investigate its tumor-targeting properties. These derivatives can potentially serve as new radiopharmaceuticals in pancreatic tumor diagnostics and therapy.

In our first project, we produced a radiolabeled cyclodextrin derivative ($[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$), which proved to be suitable for the detection of BxPC-3 pancreatic adenocarcinoma tumors. The NODAGA-RAMEB was successfully labeled with the ^{68}Ga isotope, and then subjected to analytical tests. We obtained a robust, reproducible radiopharmaceutical with high radiochemical purity, which was extensively tested in preclinical *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* studies. Based on these tests, we found that the metabolic stability of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA-RAMEB}$ is excellent, it can accumulate specifically in the tumor, it is eliminated from the body through the urinary system, and it does not accumulate in other organs.

In our second project, we replaced the diagnostic isotope with a therapeutic isotope. We produced a cyclodextrin derivative that may be suitable for BxPC-3 pancreatic adenocarcinoma tumor therapy. DOTAGA-RAMEB was labeled with ^{68}Ga and $^{205/206}\text{Bi}$ radionuclides. We produced two reproducible, robust radiopharmaceuticals with high radiochemical purity: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ and $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTAGA-RAMEB}$. Both radiopharmaceuticals were subjected to extensive biological tests, during which we found that they accumulated specifically in pancreatic tumor cells. The $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTAGA-RAMEB}$ and $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi-DOTAGA-RAMEB}$ eliminated renally, and did not show specific accumulation in other organs.

Based on our results, radiolabeled cyclodextrins further expand the applications of cyclodextrins in pharmaceutical and medical industry.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Az előző fejezetekben hivatkozott közlemények jegyzéke

- Adeoye, O., & Cabral-Marques, H. (2017). Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: A mini review. *International Journal of Pharmaceutics*, 531(2), 521–531.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.050>
- Ahn, S. S., Kim, M.-J., Choi, J.-Y., Hong, H.-S., Chung, Y. E., & Lim, J. S. (2009). Indicative findings of pancreatic cancer in prediagnostic CT. *European Radiology*, 19(10), 2448–2455.
<https://doi.org/10.1007/s00330-009-1422-6>
- Aime, S. (1991). *Inclusion complexes between β -cyclodextrin and β -benzyloxy- α -propionic derivatives of paramagnetic DOTA- and DPTA-Gd(III) complexes—Aime—1991—Magnetic Resonance in Chemistry—Wiley Online Library.*
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrc.1260290910>
- Aime, S., Benetollo, F., Bombieri, G., Colla, S., Fasano, M., & Paoletti, S. (1997). Non-ionic Ln(III) chelates as MRI contrast agents: Synthesis, characterisation and ^1H NMR relaxometric investigations of bis(benzylamide)diethylenetriaminepentaacetic acid Lu(III) and Gd(III) complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 254(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(96\)05139-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(96)05139-0)
- Anderson, A., & McAnulty, T. (2013). *Somatostatin: Synthesis, Mechanisms-of-action and Physiological Effects*. Nova Science Publishers, Incorporated.
- Anderson, C. J., & Ferdani, R. (2009). Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: Advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 24(4), 379–393. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0674>
- Antoch, G., & Bockisch, A. (2009). Combined PET/MRI: A new dimension in whole-body oncology imaging? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 36(1), 113–120.
<https://doi.org/10.1007/s00259-008-0951-6>

- Areses, P., Agüeros, M. T., Quincoces, G., Collantes, M., Richter, J. Á., López-Sánchez, L. M., Sánchez-Martínez, M., Irache, J. M., & Peñuelas, I. (2011). Molecular Imaging Techniques to Study the Biodistribution of Orally Administered ^{99m}Tc-Labelled Naive and Ligand-Tagged Nanoparticles. *Molecular Imaging and Biology*, 13(6), 1215–1223.
<https://doi.org/10.1007/s11307-010-0456-0>
- Barge, A., Cravotto, G., Robaldo, B., Gianolio, E., & Aime, S. (2007). New CD derivatives as self-assembling contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI). *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1), 489–495. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9239-2>
- Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. A., & Davis, M. E. (2007). Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15549–15554. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707461104>
- Baum, R. P., & Rösch, F. (Szerk.). (2013). *Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides: A Pathway to Personalized Diagnosis and Treatment* (Köt. 194). Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-27994-2>
- Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H., & Lucas, A. L. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(32), 11182–11198. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11182>
- Becket, G., Schep, L. J., & Tan, M. Y. (1999). Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 179(1), 65–71. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(98\)00382-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(98)00382-2)
- Bellringer, M. E., Smith, T. G., Read, R., Gopinath, C., & Olivier, Ph. (1995). β -Cyclodextrin: 52-Week toxicity studies in the rat and dog. *Food and Chemical Toxicology*, 33(5), 367–376.
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)00149-I](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)00149-I)

- Bernhard, C., Moreau, M., Lhenry, D., Goze, C., Boschetti, F., Rousselin, Y., Brunotte, F., & Denat, F. (2012). DOTAGA–Anhydride: A Valuable Building Block for the Preparation of DOTA-Like Chelating Agents. *Chemistry – A European Journal*, 18(25), 7834–7841. <https://doi.org/10.1002/chem.201200132>
- Bosetti, C., Rosato, V., Li, D., Silverman, D., Petersen, G. M., Bracci, P. M., Neale, R. E., Muscat, J., Anderson, K., Gallinger, S., Olson, S. H., Miller, A. B., Bas Bueno-de-Mesquita, H., Scelo, G., Janout, V., Holcatova, I., Laggiou, P., Serraino, D., Lucenteforte, E., ... Ghadirian, P. (2014). Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: An analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Annals of Oncology*, 25(10), 2065–2072. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu276>
- Briand, G. G., & Burford, N. (1999). Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance. *Chemical Reviews*, 99(9), 2601–2658. <https://doi.org/10.1021/cr980425s>
- Buchbender, C., Heusner, T. A., Lauenstein, T. C., Bockisch, A., & Antoch, G. (2012a). Oncologic PET/MRI, Part 1: Tumors of the Brain, Head and Neck, Chest, Abdomen, and Pelvis. *Journal of Nuclear Medicine*, 53(6), 928–938. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.105338>
- Buchbender, C., Heusner, T. A., Lauenstein, T. C., Bockisch, A., & Antoch, G. (2012b). Oncologic PET/MRI, Part 2: Bone Tumors, Soft-Tissue Tumors, Melanoma, and Lymphoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 53(8), 1244–1252. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.109306>
- Byegård, J., Skarnemark, G., & Skålberg, M. (2006). The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 241(2), 281–290. <https://doi.org/10.1007/bf02347463>
- Camargo, F., Erickson, R. P., Garver, W. S., Hossain, G. S., Carbone, P. N., Heidenreich, R. A., & Blanchard, J. (2001). Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Life Sciences*, 70(2), 131–142. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01384-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01384-4)

- Carrera, C., Digilio, G., Baroni, S., Burgio, D., Consol, S., Fedeli, F., Longo, D., Mortillaro, A., & Aime, S. (2007). Synthesis and characterization of a Gd(III) based contrast agent responsive to thiol containing compounds. *Dalton Transactions*, 43, 4980–4987.
<https://doi.org/10.1039/B705088G>
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., & Khar, R. K. (2005). Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech*, 6(2), E329–E357. <https://doi.org/10.1208/pt060243>
- Chan, H. S., De Blois, E., Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., De Jong, M., Breeman, W., & Konijnenberg, M. (2017). In Vitro comparison of ²¹³Bi- and ¹⁷⁷Lu-radiation for peptide receptor radionuclide therapy. *PLOS ONE*, 12(7), e0181473.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181473>
- Cho, Z. H., Son, Y. D., Choi, E. J., Kim, H. K., Kim, J. H., Lee, S. Y., Ogawa, S., & Kim, Y. B. (2013). In-vivo human brain molecular imaging with a brain-dedicated PET/MRI system. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 26(1), 71–79.
<https://doi.org/10.1007/s10334-012-0329-4>
- Ciccone, M. M., Aquilino, A., Cortese, F., Scicchitano, P., Sassara, M., Mola, E., Rollo, R., Caldarola, P., Giorgino, F., Pomo, V., & Bux, F. (2010). Feasibility and effectiveness of a disease and care management model in the primary health care system for patients with heart failure and diabetes (Project Leonardo). *Vascular Health and Risk Management*, 6, 297–305.
<https://doi.org/10.2147/vhrm.s9252>
- Clarke, E. T., & Martell, A. E. (1991). Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles. *Inorganica Chimica Acta*, 190(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)80229-7](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)80229-7)
- deKemp, R. A., Renaud, J. M., Klein, R., & Beanlands, R. S. B. (2016). Radionuclide Tracers for Myocardial Perfusion Imaging and Blood Flow Quantification. *Cardiology Clinics*, 34(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2015.08.001>

- Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033–1046. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
- Dijkers, E. C., Oude Munnink, T. H., Kosterink, J. G., Brouwers, A. H., Jager, P. L., de Jong, J. R., van Dongen, G. A., Schröder, C. P., Lub-de Hooge, M. N., & de Vries, E. G. (2010). Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 87(5), 586–592. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.12>
- Dimou, E., Booij, J., Rodrigues, M., Prosch, H., Attems, J., Knoll, P., Zajicek, B., Dudczak, R., Mostbeck, G., Kuntner, C., Langer, O., Bruecke, T., & Mirzaei, S. (é. n.). Amyloid PET and MRI in Alzheimers Disease and Mild Cognitive Impairment. *Current Alzheimer Research*, 6(3), 312–319.
- Domnanich, K. A., Müller, C., Farkas, R., Schmid, R. M., Ponsard, B., Schibli, R., Türlér, A., & Van Der Meulen, N. P. (2017). ⁴⁴Sc for labeling of DOTA- and NODAGA-functionalized peptides: Preclinical in vitro and in vivo investigations. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s41181-016-0013-5>
- Eder, M., Schäfer, M., Bauder-Wüst, U., Hull, W.-E., Wängler, C., Mier, W., Haberkorn, U., & Eisenhut, M. (2012). ⁶⁸Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 23(4), 688–697. <https://doi.org/10.1021/bc200279b>
- Egorova, B. V., Matazova, E. V., Mitrofanov, A. A., Aleshin, G. Yu., Trigub, A. L., Zubenko, A. D., Fedorova, O. A., Fedorov, Yu. V., & Kalmykov, S. N. (2018). Novel pyridine-containing azacrownethers for the chelation of therapeutic bismuth radioisotopes: Complexation study, radiolabeling, serum stability and biodistribution. *Nuclear Medicine and Biology*, 60, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2018.01.005>

- Ershov, B. G., Akinshin, M. A., Gordeev, A. V., & Sukhov, N. L. (1986). A pulse radiolysis study of the chloride complexes of Bi(II) and Bi(IV). *Radiation Physics and Chemistry*, 27, 91–92.
[https://doi.org/10.1016/1359-0197\(86\)90139-6](https://doi.org/10.1016/1359-0197(86)90139-6)
- Ferraz, K. S. O., Silva, N. F., da Silva, J. G., de Miranda, L. F., Romeiro, C. F. D., Souza-Fagundes, E. M., Mendes, I. C., & Beraldo, H. (2012). Investigation on the pharmacological profile of 2,6-diacetylpyridine bis(benzoylhydrazone) derivatives and their antimony(III) and bismuth(III) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 98–106.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.03.040>
- Filippi, L., Pizzichini, P., Bagni, O., & Scopinaro, F. (2020). Somatostatin Receptor Analogs (68Ga-DOTATOC, 68Ga-DOTANOC, 68Ga-DOTATATE). In F. Calabria & O. Schillaci (Szerk.), *Radiopharmaceuticals: A Guide to PET/CT and PET/MRI* (o. 99–113). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27779-6_6
- Frijlink, H. W., Visser, J., Hefting, N. R., Oosting, R., Meijer, D. K., & Lerk, C. F. (1990). The pharmacokinetics of beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the rat. *Pharmaceutical Research*, 7(12), 1248–1252. <https://doi.org/10.1023/a:1015929720063>
- Gardner, T. B., Hessami, N., Smith, K. D., Ripple, G. H., Barth, R. J., Klibansky, D. A., Colacchio, T. A., Zaki, B., Tsapakos, M. J., Suriawinata, A. A., Putra, J., Tsongalis, G. J., Mody, K., Gordon, S. R., & Pipas, J. M. (2014). The effect of neoadjuvant chemoradiation on pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Pancreas*, 43(7), 1018–1021.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000162>
- Genkinger, J. M., Spiegelman, D., Anderson, K. E., Bergkvist, L., Bernstein, L., van den Brandt, P. A., English, D. R., Freudenheim, J. L., Fuchs, C. S., Giles, G. G., Giovannucci, E., Hankinson, S. E., Horn-Ross, P. L., Leitzmann, M., Männistö, S., Marshall, J. R., McCullough, M. L., Miller, A. B., Reding, D. J., ... Smith-Warner, S. A. (2009). Alcohol intake and pancreatic cancer risk: A pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American*

- Society of Preventive Oncology*, 18(3), 765–776. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0880>
- Ghaneh, P., Hanson, R., Titman, A., Lancaster, G., Plumpton, C., Lloyd-Williams, H., Yeo, S. T., Edwards, R. T., Johnson, C., Abu Hilal, M., Higginson, A. P., Armstrong, T., Smith, A., Scarsbrook, A., McKay, C., Carter, R., Sutcliffe, R. P., Bramhall, S., Kocher, H. M., ... Neoptolemos, J. P. (2018). PET-PANC: Multicentre prospective diagnostic accuracy and health economic analysis study of the impact of combined modality 18fluorine-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography with computed tomography scanning in the diagnosis and management of pancreatic cancer. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*, 22(7), 1–114. <https://doi.org/10.3310/hta22070>
- Gleason, G. I. (1960). A positron cow. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 8(2), 90–94. [https://doi.org/10.1016/0020-708X\(60\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0020-708X(60)90052-1)
- Gomes, P. M. O., Silva, A. M. S., & Silva, V. L. M. (2020). Pyrazoles as Key Scaffolds for the Development of Fluorine-18-Labeled Radiotracers for Positron Emission Tomography (PET). *Molecules*, 25(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules25071722>
- Gonnermann, D., Oberg, H.-H., Kellner, C., Peipp, M., Sebens, S., Kabelitz, D., & Wesch, D. (2015). Resistance of cyclooxygenase-2 expressing pancreatic ductal adenocarcinoma cells against $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity. *Oncoimmunology*, 4(3), e988460. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.988460>
- Gottschalk, A., & Anger, H. O. (1964). THE SENSITIVITY OF THE POSITRON SCINTILLATION CAMERA FOR DETECTING SIMULATED BRAIN TUMORS WITH GALLIUM 68-EDTA. *The American Journal of Roentgenology, Radium Therapy, and Nuclear Medicine*, 92, 174–176.
- Gould, S., & Scott, R. C. (2005). 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 43(10), 1451–1459. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.03.007>

- Gourni, E., Demmer, O., Schottelius, M., D'Alessandria, C., Schulz, S., Dijkgraaf, I., Schumacher, U., Schwaiger, M., Kessler, H., & Wester, H.-J. (2011). PET of CXCR4 expression by a (68)Ga-labeled highly specific targeted contrast agent. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 52(11), 1803–1810.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.111.098798>
- Grachan, J. J., Kery, M., Giaccia, A. J., Denko, N. C., & Papandreou, I. (2021). Lipid droplet storage promotes murine pancreatic tumor growth. *Oncology Reports*, 45(4), 21.
<https://doi.org/10.3892/or.2021.7972>
- Green, M. A., & Welch, M. J. (1989). Gallium radiopharmaceutical chemistry. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B, Nuclear Medicine and Biology*, 16(5), 435–448. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(89\)90053-6](https://doi.org/10.1016/0883-2897(89)90053-6)
- Grosse, P. Y., Bressolle, F., & Pinguet, F. (1998). Antiproliferative effect of methyl- β -cyclodextrin in vitro and in human tumour xenografted athymic nude mice. *British Journal of Cancer*, 78(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.648>
- Hacht, B. (2008). Gallium(III) Ion Hydrolysis under Physiological Conditions. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(2), 372–376. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2008.29.2.372>
- Hadagura. (é. n.). *A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes* | *Semantic Scholar*. Elérés 2023. május 28., forrás <https://www.semanticscholar.org/paper/A-review-on-thermal-analyses-of-cyclodextrins-and-H%C4%83d%C4%83rug%C4%83-Bandur/c19d0f97fc03f4dbfe83a31865ec76c31a276218>
- Hajdu, I., Angyal, J., Szikra, D., Kertész, I., Malanga, M., Fenyvesi, É., Szente, L., Vecsernyés, M., Bácskay, I., Váradi, J., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Rusznyák, Á., Trencsényi, G., & Fenyvesi, F. (2019). Radiochemical synthesis and preclinical evaluation of 68Ga-labeled NODAGA-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (68Ga-NODAGA-HPBCD). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 128, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.12.001>

- Hancock, R. D., Cukrowski, I., Baloyi, J., & Mashishi, J. (1993). The affinity of bismuth(III) for nitrogen-donor ligands. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 19, 2895–2899.
<https://doi.org/10.1039/DT9930002895>
- Hashidzume. (2019). *Cyclodextrin-Based Rotaxanes: From Rotaxanes to Polyrotaxanes and Further to Functional Materials—Hashidzume—2019—European Journal of Organic Chemistry—Wiley Online Library*. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ejoc.201900090>
- Hashidzume, A., Yamaguchi, H., & Harada, A. (2014). Cyclodextrin-based molecular machines. *Topics in Current Chemistry*, 354, 71–110. https://doi.org/10.1007/128_2014_547
- Henze, M., Dimitrakopoulou-Strauss, A., Milker-Zabel, S., Schuhmacher, J., Strauss, L. G., Doll, J., Mäcke, H. R., Eisenhut, M., Debus, J., & Haberkorn, U. (2005). Characterization of ⁶⁸Ga-DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotide kinetics in patients with meningiomas. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 46(5), 763–769.
- Hernandez, R., Sun, H., England, C. G., Valdovinos, H. F., Ehlerding, E. B., Barnhart, T. E., Yang, Y., & Cai, W. (2016). CD146-targeted immunoPET and NIRF Imaging of Hepatocellular Carcinoma with a Dual-Labeled Monoclonal Antibody. *Theranostics*, 6(11), 1918–1933.
<https://doi.org/10.7150/thno.15568>
- Hicks, R. J. (2012). Should positron emission tomography/computed tomography be the first rather than the last test performed in the assessment of cancer? *Cancer Imaging*, 12(2), 315–323.
<https://doi.org/10.1102/1470-7330.2012.9005>
- Hnatowich, D. J. (1977). A review of radiopharmaceutical development with short-lived generator-produced radionuclides other than ^{99m}Tc. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 28(1–2), 169–181. [https://doi.org/10.1016/0020-708x\(77\)90171-5](https://doi.org/10.1016/0020-708x(77)90171-5)
- Hruban, R. H., Canto, M. I., Goggins, M., Schulick, R., & Klein, A. P. (2010). Update on familial pancreatic cancer. *Advances in Surgery*, 44, 293–311.
<https://doi.org/10.1016/j.yasu.2010.05.011>

- Huang, B. Z., Pandol, S. J., Jeon, C. Y., Chari, S. T., Sugar, C. A., Chao, C. R., Zhang, Z.-F., Wu, B. U., & Setiawan, V. W. (2020). New-Onset Diabetes, Longitudinal Trends in Metabolic Markers, and Risk of Pancreatic Cancer in a Heterogeneous Population. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 18(8), 1812-1821.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.11.043>
- Inoue, Y., Iohara, D., Sekiya, N., Yamamoto, M., Ishida, H., Sakiyama, Y., Hirayama, F., Arima, H., & Uekama, K. (2016). Ternary inclusion complex formation and stabilization of limaprost, a prostaglandin E1 derivative, in the presence of α - and β -cyclodextrins in the solid state. *International Journal of Pharmaceutics*, 509(1–2), 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.018>
- Jahr, J. S., Miller, J. E., Hiruma, J., Emaus, K., You, M., & Meistelman, C. (2015). Sugammadex: A Scientific Review Including Safety and Efficacy, Update on Regulatory Issues, and Clinical Use in Europe. *American Journal of Therapeutics*, 22(4), 288–297. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000092>
- Jambhekar, S. S., & Breen, P. (2016). Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: Solubilization, binding constant, and complexation efficiency. *Drug Discovery Today*, 21(2), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.016>
- Jansook, P., Ogawa, N., & Loftsson, T. (2018). Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535(1), 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>
- Kamada, M., Hirayama, F., Udo, K., Yano, H., Arima, H., & Uekama, K. (2002). Cyclodextrin conjugate-based controlled release system: Repeated- and prolonged-releases of ketoprofen after oral administration in rats. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 82(2–3), 407–416. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00171-2](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00171-2)

- Kojima, S., & Jay, M. (1987). Comparisons of labeling efficiency, biological activity and biodistribution among ^{125}I -, ^{67}Ga -DTPA-and ^{67}Ga -DFO-lectins. *European Journal of Nuclear Medicine*, 13(7), 366–370. <https://doi.org/10.1007/BF00252997>
- Kondo, Y., Tokumaru, H., Ishitsuka, Y., Matsumoto, T., Taguchi, M., Motoyama, K., Higashi, T., Arima, H., Matsuo, M., Higaki, K., Ohno, K., & Irie, T. (2016). In vitro evaluation of 2-hydroxyalkylated β -cyclodextrins as potential therapeutic agents for Niemann-Pick Type C disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 118(3), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.04.014>
- Kopper László, Schaff Zsuzsa. (2004). *Patológia*. Budapest : Medicina.
- Kraeber-Bodéré, F., & Barbet, J. (2014). Challenges in nuclear medicine: Innovative theranostic tools for personalized medicine. *Frontiers in Medicine*, 1, 16. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00016>
- Kubíček, V., Havlíčková, J., Kotek, J., Tircsó, G., Hermann, P., Tóth, É., & Lukeš, I. (2010). Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA–Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies. *Inorganic Chemistry*, 49(23), 10960–10969. <https://doi.org/10.1021/ic101378s>
- Lai, W.-F. (2014). Cyclodextrins in non-viral gene delivery. *Biomaterials*, 35(1), 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.061>
- Lai, W.-F. (2019). Design of cyclodextrin-based systems for intervention execution. *Delivery of Therapeutics for Biogerontological Interventions*, 49–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816485-3.00005-2>
- Lai, W.-F., Rogach, A. L., & Wong, W.-T. (2017). Chemistry and engineering of cyclodextrins for molecular imaging. *Chemical Society Reviews*, 46(20), 6379–6419. <https://doi.org/10.1039/c7cs00040e>
- Laramie, M. D., Smith, M. K., Marmarchi, F., McNally, L. R., & Henary, M. (2018). Small Molecule Optoacoustic Contrast Agents: An Unexplored Avenue for Enhancing In Vivo Imaging. *Molecules*, 23(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/molecules23112766>

- Lattuada, L., Barge, A., Cravotto, G., Giovenzana, G. B., & Tei, L. (2011). The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 3019–3049. <https://doi.org/10.1039/C0CS00199F>
- Levy, S. G., Jacques, V., Zhou, K. L., Kalogeropoulos, S., Schumacher, K., Amedio, J. C., Scherer, J. E., Witowski, S. R., Lombardy, R., & Koppetsch, K. (2009). Development of a Multigram Asymmetric Synthesis of 2-(R)-2-(4,7,10-Tris tert-Butylcarboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl)-pentanedioic Acid, 1-tert-Butyl Ester, (R)-tert-Bu4-DOTAGA. *Organic Process Research & Development*, 13(3), 535–542. <https://doi.org/10.1021/op8002932>
- Li, B.-Q., Wang, L., Li, J., Zhou, L., Zhang, T.-P., Guo, J.-C., & Zhao, Y.-P. (2017). Surgeons' knowledge regarding the diagnosis and management of pancreatic cancer in China: A cross-sectional study. *BMC Health Services Research*, 17(1), 395. <https://doi.org/10.1186/s12913-017-2345-6>
- Li, M.-X., Zhang, L.-Z., Yang, M., Niu, J.-Y., & Zhou, J. (2012). Synthesis, crystal structures, in vitro biological evaluation of zinc(II) and bismuth(III) complexes of 2-acetylpyrazine N(4)-phenylthiosemicarbazone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(7), 2418–2423. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.02.024>
- Li, X., Xu, H., & Gao, P. (2018). ABO Blood Group and Diabetes Mellitus Influence the Risk for Pancreatic Cancer in a Population from China. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 9392–9398. <https://doi.org/10.12659/MSM.913769>
- Lin, W, L., X, Z., L, Q., N, Y., Y, P., & L, Z. (2017). Doxorubicin-Loaded Unimolecular Micelle-Stabilized Gold Nanoparticles as a Theranostic Nanoplatfrom for Tumor-Targeted Chemotherapy and Computed Tomography Imaging. *Biomacromolecules*, 18(12). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00810>
- Liu, B., Qu, L., & Yan, S. (2015). Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell International*, 15, 106. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0260-7>

- Liu, L., & Guo, Q.-X. (2002). The Driving Forces in the Inclusion Complexation of Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 42(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1023/A:1014520830813>
- Liu, Q., Chen, M., Sun, Y., Chen, G., Yang, T., Gao, Y., Zhang, X., & Li, F. (2011). Multifunctional rare-earth self-assembled nanosystem for tri-modal upconversion luminescence /fluorescence /positron emission tomography imaging. *Biomaterials*, 32(32), 8243–8253.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.053>
- Liu, S., & Edwards, D. S. (2001). Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals. *Bioconjugate Chemistry*, 12(1), 7–34.
<https://doi.org/10.1021/bc000070v>
- Loftsson, T., Hreinsdóttir, D., & Másson, M. (2005). Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 302(1), 18–28.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.042>
- Loftsson, T., Vogensen, S. B., Brewster, M. E., & Konráðsdóttir, F. (2007). Effects of Cyclodextrins on Drug Delivery Through Biological Membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(10), 2532–2546. <https://doi.org/10.1002/jps.20992>
- Londhe, V., & Nagarsenker, M. (1999). Comparison between Hydroxypropyl β -Cyclodextrin and Polyvinylpyrrolidone as Carriers for Carbamazepine Solid Dispersions. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61, 237–240.
- Lowry, T. M. (1928). The Electronic Theory of Valency. *Nature*, 121(3049), Article 3049.
<https://doi.org/10.1038/121527a0>
- Luna, A., Vilanova, J. C., Jr, L. C. H. da C., & Rossi, S. E. (2013). *Functional Imaging in Oncology: Biophysical Basis and Technical Approaches - Volume 1*. Springer Science & Business Media.
- Maecke, H. R., & André, J. P. (2007). ^{68}Ga -PET radiopharmacy: A generator-based alternative to ^{18}F -radiopharmacy. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*, 62, 215–242.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-49527-7_8

- Maeda, Y., Motoyama, K., Higashi, T., Horikoshi, Y., Takeo, T., Nakagata, N., Kurauchi, Y., Katsuki, H., Ishitsuka, Y., Kondo, Y., Irie, T., Furuya, H., Era, T., & Arima, H. (2015). Effects of cyclodextrins on GM1-gangliosides in fibroblasts from GM1-gangliosidosis patients. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(8), 1133–1142. <https://doi.org/10.1111/jphp.12405>
- Malhotra, M., Gooding, M., Evans, J. C., O'Driscoll, D., Darcy, R., & O'Driscoll, C. M. (2018). Cyclodextrin-siRNA conjugates as versatile gene silencing agents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.024>
- Mankoff, D. A. (2007). A definition of molecular imaging. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 48(6), 18N, 21N.
- Manna, P., Szücs, D., Csupász, T., Fekete, A., Szikra, D., Lin, Z., Gáspár, A., Bhattacharya, S., Zulaica, A., Tóth, I., & Kortz, U. (2020). Shape and Size Tuning of BiIII-Centered Polyoxopalladates: High Resolution 209Bi NMR and 205/206Bi Radiolabeling for Potential Pharmaceutical Applications. *Inorganic Chemistry*, 59(23), 16769–16782. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02857>
- Martinez-Möller, A., Eiber, M., Nekolla, S. G., Souvatzoglou, M., Drzezga, A., Ziegler, S., Rummeny, E. J., Schwaiger, M., & Beer, A. J. (2012). Workflow and Scan Protocol Considerations for Integrated Whole-Body PET/MRI in Oncology. *Journal of Nuclear Medicine*, 53(9), 1415–1426. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.109348>
- Mehring, M. (2007). From molecules to bismuth oxide-based materials: Potential homo- and heterometallic precursors and model compounds. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(7), 974–1006. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.005>
- Midha, S., Chawla, S., & Garg, P. K. (2016). Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Letters*, 381(1), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.022>
- Miyake, K., Arima, H., Hirayama, F., Yamamoto, M., Horikawa, T., Sumiyoshi, H., Noda, S., & Uekama, K. (2000). Improvement of solubility and oral bioavailability of rutin by complexation with 2-

- hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Pharmaceutical Development and Technology*, 5(3), 399–407. <https://doi.org/10.1081/pdt-100100556>
- Morin-Crini, N., Fourmentin, S., Fenyvesi, É., Lichtfouse, E., Torri, G., Fourmentin, M., & Crini, G. (2020). History of Cyclodextrins. In G. Crini, S. Fourmentin, & E. Lichtfouse (Szerk.), *The History of Cyclodextrins* (o. 1–93). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-49308-0_1
- Näslund, J., Persson, I., & Sandström, M. (2000). Solvation of the bismuth(III) ion by water, dimethyl sulfoxide, N,N'-dimethylpropyleneurea, and N,N-dimethylthioformamide. An EXAFS, large-angle X-ray scattering, and crystallographic structural study. *Inorganic Chemistry*, 39(18), 4012–4021. <https://doi.org/10.1021/ic000022m>
- Nayak, T. K., Garmestani, K., Baidoo, K. E., Milenic, D. E., & Brechbiel, M. W. (2011). PET imaging of tumor angiogenesis in mice with VEGF-A-targeted 86Y-CHX-A"-DTPA-bevacizumab. *International Journal of Cancer*, 128(4), 920–926. <https://doi.org/10.1002/ijc.25409>
- Nicolazzi, C., Venard, V., Le Faou, A., & Finance, C. (2002). In vitro antiviral efficacy of the ganciclovir complexed with β -cyclodextrin on human cytomegalovirus clinical strains. *Antiviral Research*, 54(2), 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(01\)00218-2](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(01)00218-2)
- O'Callaghan, G., & Houston, A. (2015). Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: Possible therapeutic targets? *British Journal of Pharmacology*, 172(22), 5239–5250. <https://doi.org/10.1111/bph.13331>
- Onodera, R., Motoyama, K., Okamatsu, A., Higashi, T., & Arima, H. (2013). Potential use of folate-appended methyl- β -cyclodextrin as an anticancer agent. *Scientific Reports*, 3, 1104. <https://doi.org/10.1038/srep01104>
- Onodera, R., Motoyama, K., Tanaka, N., Ohyama, A., Okamatsu, A., Higashi, T., Kariya, R., Okada, S., & Arima, H. (2014). Involvement of Autophagy in Antitumor Activity of Folate-appended Methyl- β -cyclodextrin. *Scientific Reports*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep04417>

- Ottinger, E. A., Kao, M. L., Carrillo-Carrasco, N., Yanjanin, N., Shankar, R. K., Janssen, M., Brewster, M., Scott, I., Xu, X., Cradock, J., Terse, P., Dehdashti, S. J., Marugan, J., Zheng, W., Portilla, L., Hubbs, A., Pavan, W. J., Heiss, J., Vite, C. H., ... McKew, J. C. (2014). Collaborative development of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for the treatment of Niemann-Pick type C1 disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(3), 330–339.
<https://doi.org/10.2174/1568026613666131127160118>
- Overoye-Chan, K., Koerner, S., Looby, R. J., Kolodziej, A. F., Zech, S. G., Deng, Q., Chasse, J. M., McMurry, T. J., & Caravan, P. (2008). EP-2104R: A Fibrin-Specific Gadolinium-Based MRI Contrast Agent for Detection of Thrombus. *Journal of the American Chemical Society*, 130(18), 6025–6039. <https://doi.org/10.1021/ja800834y>
- Pancreatic Cancer—Patient Version—NCI* (nciglobal,ncienterprise). (é. n.). [cgvCancerTypeHome].
Elérés 2023. május 28., forrás <https://www.cancer.gov/types/pancreatic>
- Pearson, R. G. (1969). Hard and Soft Acids and Bases. In A. F. Scott (Szerk.), *Survey of Progress in Chemistry* (Köt. 5, o. 1–52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395706-1.50007-8>
- Petersen, G. M. (2016). Abstract IA03: Genetic and non-genetic risk factors of pancreatic cancer. *Cancer Research*, 76(24_Supplement), IA03. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.PANCA16-IA03>
- Phelps, M. E. (2000). PET: The merging of biology and imaging into molecular imaging. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 41(4), 661–681.
- Pohle, K., Notni, J., Bussemer, J., Kessler, H., Schwaiger, M., & Beer, A. J. (2012). ⁶⁸Ga-NODAGA-RGD is a suitable substitute for (18)F-Galacto-RGD and can be produced with high specific activity in a cGMP/GRP compliant automated process. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(6), 777–784.
<https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.02.006>
- Price, E. W., & Orvig, C. (2014). Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chemical Society Reviews*, 43(1), 260–290. <https://doi.org/10.1039/c3cs60304k>

- Pyykkö, P. (1988). Relativistic Effects in Structural Chemistry. *Chemical Reviews - CHEM REV*, 88.
<https://doi.org/10.1021/cr00085a006>
- Qian, L., Guan, Y., & Xiao, H. (2008). Preparation and characterization of inclusion complexes of a cationic β -cyclodextrin polymer with butylparaben or triclosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 357(1), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.018>
- RADIOAKTÍV GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK. *Radiopharmaceutica—PDF Free Download*. (é. n.). Elérés 2023. május 28., forrás <https://docplayer.hu/14485684-Radioaktiv-gyogyszerkeszitmenyek-radiopharmaceutica.html>
- Rajewski, R. A., & Stella, V. J. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(11), 1142–1169.
<https://doi.org/10.1021/js960075u>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10–27.
<https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Raz, A. (1972). Interaction of prostaglandins with blood plasma proteins: I. Binding of prostaglandin E2 to human plasma proteins and its effect on the physiological activity of prostaglandin E2 in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 280(4), 602–613. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(72\)90140-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(72)90140-3)
- Rekharsky, M. V., & Inoue, Y. (1998). Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98(5), 1875–1918. <https://doi.org/10.1021/cr970015o>
- Rischpler, C., Nekolla, S. G., Dregely, I., & Schwaiger, M. (2013). Hybrid PET/MR Imaging of the Heart: Potential, Initial Experiences, and Future Prospects. *Journal of Nuclear Medicine*, 54(3), 402–415. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.105353>
- Rosenbaum, A. I., & Maxfield, F. R. (2011). Niemann-Pick type C disease: Molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *Journal of Neurochemistry*, 116(5), 789–795.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06976.x>

- Rösch, F. (2013). Past, present and future of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators. *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine*, 76, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.10.012>
- Sadler, P. J., Li, H., & Sun, H. (1999). Coordination chemistry of metals in medicine: Target sites for bismuth. *Coordination Chemistry Reviews*, 185–186, 689–709. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(99\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(99)00018-1)
- Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., & Loftsson, T. (2018). Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules*, 23(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/molecules23051161>
- Sauer, R.-S., Rittner, H. L., Roewer, N., Sohajda, T., Shityakov, S., Brack, A., & Broscheit, J.-A. (2017). A Novel Approach for the Control of Inflammatory Pain: Prostaglandin E2 Complexation by Randomly Methylated β -Cyclodextrins. *Anesthesia and Analgesia*, 124(2), 675–685. <https://doi.org/10.1213/ane.0000000000001674>
- Sk, Y., Y, S., V, G., & Ms, A. (2020). Molecular Imaging of Fluorinated Probes for Tau Protein and Amyloid- β Detection. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153413>
- Soga, M., Ishitsuka, Y., Hamasaki, M., Yoneda, K., Furuya, H., Matsuo, M., Ihn, H., Fusaki, N., Nakamura, K., Nakagata, N., Endo, F., Irie, T., & Era, T. (2015). HPGCD Outperforms HPBCD as a Potential Treatment for Niemann-Pick Disease Type C During Disease Modeling with iPS Cells. *Stem Cells*, 33(4), 1075–1088. <https://doi.org/10.1002/stem.1917>
- Stella, V. J., & He, Q. (2008). Cyclodextrins. *Toxicologic pathology*, 36(1), 30–42.
- Stimmel, J. B., Stockstill, M. E., & Frederick C. Kull, J. (2002, május 1). *Yttrium-90 Chelation Properties of Tetraazatetraacetic Acid Macrocycles, Diethylenetriaminepentaacetic Acid Analogs, and a Novel Terpyridine Acyclic Chelator* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bc00032a010>

- Sudbrock, F., Fischer, T., Zimmermanns, B., Guliyev, M., Dietlein, M., Drzezga, A., & Schomäcker, K. (2014). Characterization of SnO₂-based ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generators and ⁶⁸Ga-DOTATATE preparations: Radionuclide purity, radiochemical yield and long-term constancy. *EJNMMI Research*, 4(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13550-014-0036-4>
- Sun, H., Li, H., & Sadler, P. J. (1997). The Biological and Medicinal Chemistry of Bismuth. *Chemische Berichte*, 130(6), 669–681. <https://doi.org/10.1002/cber.19971300602>
- Suthiram, J., Ebenhan, T., Marjanovic-Painter, B., Sathekge, M. M., & Zeevaart, J. R. (2021). Towards Facile Radiolabeling and Preparation of Gallium-68-/Bismuth-213-DOTA-[Thi8, Met(O₂)₁₁]-Substance P for Future Clinical Application: First Experiences. *Pharmaceutics*, 13(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091326>
- Takahashi, T., Uehara, H., Ogawa, H., Umemoto, H., Bando, Y., & Izumi, K. (2014). Inhibition of EP2/EP4 signaling abrogates IGF-1R-mediated cancer cell growth: Involvement of protein kinase C- θ activation. *Oncotarget*, 6(7), 4829–4844.
- Takeo, T., Hoshii, T., Kondo, Y., Toyodome, H., Arima, H., Yamamura, K., Irie, T., & Nakagata, N. (2008). Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biology of Reproduction*, 78(3), 546–551. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065359>
- Tasic, L. M., Jovanovic, M. D., & Djuric, Z. R. (1992). The Influence of Beta-Cyclodextrin On the Solubility and Dissolution Rate of Paracetamol Solid Dispersions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44(1), 52–55.
- Ter-Pogossian, M. M., Phelps, M. E., Hoffman, E. J., & Mullani, N. A. (1975). A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT). *Radiology*, 114(1), 89–98. <https://doi.org/10.1148/114.1.89>
- Tong, D., Liu, Q., Wang, L.-A., Xie, Q., Pang, J., Huang, Y., Wang, L., Liu, G., Zhang, D., Lan, W., & Jiang, J. (2018). The roles of the COX2/PGE2/EP axis in therapeutic resistance. *Cancer Metastasis Reviews*, 37(2–3), 355–368. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9752-y>

- Tooth, B., Etschmann, B., Pokrovski, G., Testemale, D., Hazemann, J.-L., Grundler, P., & Brugger, J. (2013). Bismuth speciation in hydrothermal fluids: An X-ray absorption spectroscopy and solubility study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 101, 156–172.
<https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.10.020>
- Trencsényi, G., Kis, A., Szabó, J. P., Ráti, Á., Csige, K., Fenyvesi, É., Szenté, L., Malanga, M., Méhes, G., Emri, M., Kertész, I., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F., & Hajdu, I. (2020). In vivo preclinical evaluation of the new ⁶⁸Ga-labeled beta-cyclodextrin in prostaglandin E2 (PGE2) positive tumor model using positron emission tomography. *International Journal of Pharmaceutics*, 576, 118954. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118954>
- Tsionou, M. I., Knapp, C. E., Foley, C. A., Munteanu, C. R., Cakebread, A., Imberti, C., Eykyn, T. R., Young, J. D., Paterson, B. M., Blower, P. J., & Ma, M. T. (2017). Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. *RSC Advances*, 7(78), 49586–49599.
<https://doi.org/10.1039/C7RA09076E>
- Uekama, K., Fujinaga, T., Hirayama, F., Otagiri, M., Yamasaki, M., Seo, H., Hashimoto, T., & Tsuruoka, M. (1983). Improvement of the oral bioavailability of digitalis glycosides by cyclodextrin complexation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(11), 1338–1341.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600721125>
- Uekama, K., Hirayama, F., & Irie, T. (1998). Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemical Reviews*, 98(5), 2045–2076. <https://doi.org/10.1021/cr970025p>
- Vandoorne, H. (1993). INTERACTIONS BETWEEN CYCLODEXTRINS AND OPHTHALMIC DRUGS. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
<https://www.semanticscholar.org/paper/INTERACTIONS-BETWEEN-CYCLODEXTRINS-AND-OPHTHALMIC-Vandoorne/66c051130486cb846555e5bdbfcd62aedde04745>
- Velikyan, I., Maecke, H., & Langstrom, B. (2008, 0 19). *Convenient Preparation of ⁶⁸Ga-Based PET-Radiopharmaceuticals at Room Temperature* (world) [Brief-report]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bc700341x>

- Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R., & Anderson, C. J. (2010). Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chemical Reviews*, 110(5), 2858–2902. <https://doi.org/10.1021/cr900325h>
- Wang, X., Parvathaneni, V., Shukla, S. K., Kanabar, D. D., Muth, A., & Gupta, V. (2020). Cyclodextrin Complexation for Enhanced Stability and Non-invasive Pulmonary Delivery of Resveratrol—Applications in Non-small Cell Lung Cancer Treatment. *AAPS PharmSciTech*, 21(5), 183. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01724-x>
- Wang, Y., Thompson, J. M., Ashbaugh, A. G., Khodakivskyi, P., Budin, G., Sinisi, R., Heinmiller, A., van Oosten, M., van Dijk, J. M., van Dam, G. M., Francis, K. P., Bernthal, N. M., Dubikovskaya, E. A., & Miller, L. S. (2017). Preclinical Evaluation of Photoacoustic Imaging as a Novel Noninvasive Approach to Detect an Orthopaedic Implant Infection. *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 25, S7. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-16-00630>
- Wang, Y.-T., Gou, Y.-W., Jin, W.-W., Xiao, M., & Fang, H.-Y. (2016). Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: A dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer*, 16, 212. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2241-1>
- Wankar, J., Kotla, N. G., Gera, S., Rasala, S., Pandit, A., & Rochev, Y. A. (2020). Recent Advances in Host–Guest Self-Assembled Cyclodextrin Carriers: Implications for Responsive Drug Delivery and Biomedical Engineering. *Advanced Functional Materials*, 30(44), 1909049. <https://doi.org/10.1002/adfm.201909049>
- Weber, J., Beard, P. C., & Bohndiek, S. E. (2016). Contrast agents for molecular photoacoustic imaging. *Nature Methods*, 13(8), 639–650. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3929>
- Wernick, M. N., & Aarsvold, J. N. (2004). *Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT*. Elsevier.
- Wolf, A. P., & Fowler, J. S. (1987). Cyclotrons and Positron Emitting Radiopharmaceuticals. In R. Guzzardi (Szerk.), *Physics and Engineering of Medical Imaging* (p. 721–749). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3537-2_57

- Wood, L. D., & Hruban, R. H. (2012). Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18(6), 492–501.
<https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31827459b6>
- Yamada's Atlas of Gastroenterology | Wiley Online Books*. (é. n.). Elérés 2023. május 28., forrás
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119600527>
- Yang, J., Kan, Y., Ge, B. H., Yuan, L., Li, C., & Zhao, W. (2014). Diagnostic role of Gallium-68 DOTATOC and Gallium-68 DOTATATE PET in patients with neuroendocrine tumors: A meta-analysis. *Acta Radiologica (Stockholm, Sweden: 1987)*, 55(4), 389–398.
<https://doi.org/10.1177/0284185113496679>
- Yao, Y., Liu, X., Liu, T., Zhou, J., Zhu, J., Sun, G., & He, D. (2014). Preparation of inclusion complex of perfluorocarbon compound with β -cyclodextrin for ultrasound contrast agent. *RSC Advances*, 5(9), 6305–6310. <https://doi.org/10.1039/C4RA12205D>
- Ye, M., Qian, Y., Shen, Y., Hu, H., Sui, M., & Tang, J. (2012). Facile synthesis and in vivo evaluation of biodegradable dendritic MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry*, 22(29), 14369–14377. <https://doi.org/10.1039/C2JM32211K>
- Yeo, T. P. (2015). Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Seminars in Oncology*, 42(1), 8–18.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.002>
- Yip-Schneider, M. T., Barnard, D. S., Billings, S. D., Cheng, L., Heilman, D. K., Lin, A., Marshall, S. J., Crowell, P. L., Marshall, M. S., & Sweeney, C. J. (2000). Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 21(2), 139–146.
<https://doi.org/10.1093/carcin/21.2.139>
- Yokoo. (2015). *2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent | PLOS ONE*.
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0141946>
- Yu, Z., Wang, M., Pan, W., Wang, H., Li, N., & Tang, B. (2017). Tumor microenvironment-triggered fabrication of gold nanomachines for tumor-specific photoacoustic imaging and

photothermal therapy. *Chemical Science*, 8(7), 4896–4903.

<https://doi.org/10.1039/C7SC00700K>

Zhang, C., Wang, S.-B., Chen, Z.-X., Fan, J.-X., Zhong, Z.-L., & Zhang, X.-Z. (2019). A tungsten nitride-based degradable nanoplatform for dual-modal image-guided combinatorial chemophotothermal therapy of tumors. *Nanoscale*, 11(4), 2027–2036.

<https://doi.org/10.1039/C8NR09064E>

Zhang, Z., Lau, J., Kuo, H.-T., Zhang, C., Colpo, N., Bénard, F., & Lin, K.-S. (2017). Synthesis and evaluation of ¹⁸F-labeled CJ-042794 for imaging prostanoid EP4 receptor expression in cancer with positron emission tomography. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(10), 2094–2098. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.078>

Zhou, J., Lu, Z., Shan, G., Wang, S., & Liao, Y. (2014). Gadolinium complex and phosphorescent probe-modified NaDyF₄ nanorods for T1- and T2-weighted MRI/CT/phosphorescence multimodality imaging. *Biomaterials*, 35(1), 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.088>

Zmigrodzka, M., Rzepecka, A., Krzyzowska, M., Witkowska-Pilaszewicz, O., Cywinska, A., & Winnicka, A. (2018). The cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway and its role in the pathogenesis of human and dog hematological malignancies. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 69(5).

<https://doi.org/10.26402/jpp.2018.5.01>

9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke.



**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., Szenté, L., Malanga, M., Méhes, G., Emri, M., Kertész, I., Vecsernyés, 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





Registry number: DEENK/420/2023.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Katalin Csige

Doctoral School: Doctoral School of Pharmacy

List of publications related to the dissertation

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., Szenté, L., Malanga, M., Méhes, G., Emri, M., Kertész, I., Vecsernyés, 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



10. Tárgyszavak

Ciklodextrin, kelátor, pozitron emissziós tomográfia, hasnyálmirigy adenokarcióma, gallium, bizmut, radiojelölés, radiofarmakonok

11. Ábrák és táblázatok jegyzéke

1. ábra: Az α -ciklodextrin, a β -ciklodextrin és a γ -ciklodextrin kémiai szerkezete

2. ábra A PET működési sémája

3. ábra PET-CT gép

4. ábra: Kisállat PET-scanner

5. ábra Hordozható Gallium- 68 generátor (Ecklert&Ziegler-Németország)

6. ábra: dietilén- triamin-pentaecetsav

7. ábra: 1,4,7,10,-tetraazaciklododekán-N,N', N'',N'''-tetraecetsav

8. ábra: 1,4,7- triazaciklononán- N, N', N'' -triecetsav

9. ábra: $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor fakcionált elúciója

10. ábra: Monoamino RAMEB konjugálási reakciója NODAGA kelátorral

11. ábra: A tisztított NODAGA-RAMEB RP-HPLC kromatogramja

12. ábra: Az általunk szintetizált NODAGA-RAMEB ^1H -NMR spektruma. A spektrumot

13. ábra: A NODAGA-RAMEB tömegspektruma

14. ábra: Monoamino RAMEB konjugálási reakciója DODAGA kelátorral

15. ábra: A tisztított DOTAGA-RAMEB RP-HPLC kromatogramja

16. ábra: A DOTAGA-RAMEB tömegspektruma

17. ábra: A NODAGA-RAMEB jelölése ^{68}Ga izotóppal

18. ábra: a $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB RP-HPLC kromatogramja

19. ábra: A DOTAGA-RAMEB radiojelölése ^{68}Ga izotóppal

20. ábra: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTAGA-RAMEB RP-HPLC kromatogramja

21. ábra: DOTAGA-RAMEB jelölése $^{205/206}\text{Bi}$ izotóppal

22. ábra: $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ -DOTAGA-RAMEB RP-HPLC kromatogramja

23. ábra: In vitro metabolikus stabilitás $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NODAGA-RAMEB; $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTAGA-RAMEB és a $[^{205/206}\text{Bi}]\text{Bi}$ -DOTAGA-RAMEB ($10\ \mu\text{L}$, $4 \pm 0,6\ \text{MBq}$) egér szérumban

24. ábra: a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB, a [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB *in vivo* metabolikus stabilitása

25. ábra: A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB biológiai eloszlása egészséges kontroll CB17 SCID egerekben dinamikus PET képek Narancssárga nyilak: vese; fekete nyilak: húgyhólyag.

26. ábra: A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB szervi eloszlása SUV átlag- idő bomláskorrigált görbe

27. ábra [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB biológiai eloszlása egészséges kontroll SCID egerekben. Reprezentatív bomláskorrigált dinamikus PET képek. Narancssárga nyilak: vese; fekete nyilak: húgyhólyag

28. ábra: [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB szervi eloszlása SUV-átlag- idő bomláskorrigált görbe

29.A ábra: Reprezentatív időfüggő, bomlás korrigált koronális és axiális miniPET képek [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB injekciója után BxPC-3 daganatot hordozó egerekben

29.B ábra: Reprezentatív időfüggő, bomlás korrigált koronális és axiális miniPET képek [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB és PGE2 együttes injekciója után BxPC-3 daganatot hordozó egerekben

30.A. ábra: Idő-aktivitási görbe (TAC) [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódásról PGE2 pozitív BxPC-3 tumorokban.

30.B ábra: Idő-aktivitási görbe (TAC) ^{68}Ga -NODAGA-RAMEB + 1 mg PGE2 felhalmozódásról PGE2 pozitív BxPC-3 tumorokban.

31. ábra: A BxPC-3 és a PancTu-1 tumoros SCID egerek reprezentatív bomlás korrigált miniPET képei

32. ábra: a [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felvétel kvantitatív SUV elemzése 80-90 perccel a radiotracer intravénás injekciója után

33. ábra: A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA- RAMEB *in vivo* biológiai eloszlása BxPC-3 daganatot hordozó SCID egerekben. Reprezentatív bomláskorrigált statikus coronalis (balra) és transaxiális (jobbra) miniPET felvételek 90 perccel a radiotracer injekció beadása után.

34. ábra: [^{68}Ga]Ga-DOTAGARAMEB idő-aktivitás görbéje BxPC-3 daganatban és izomban

35. ábra: A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felhalmozódásának ex vivo értékelése a PGE2 pozitív BxPC-3 tumort hordozó CB17 SCID egerekben

36. ábra: [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB ex vivo biológiai megoszlása PGE2 pozitív BxPC-3 tumort hordozó CB17 SCID egerekben

37. ábra BxPC-3 (A és B panel) és PancTu-1 (C és D panel) tumorok 11 nappal a tumorsejt-oltás után. A és C: reprezentatív hematoxilineozin festett daganatszövet; B és D: Anti-Prosztaglandin E receptor EP2/PTGER2 antitest immunhisztokémia (IHC), vizualizálva 3,3-diaminobenzidin (DAB) (barna festés). Nagyítás: 40X.

1. táblázat Leggyakrabban alkalmazott radiofémek, tulajdonságaik, és alkalmazásuk

2. táblázat: [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB (% ID/g) ex vivo szervi eloszlása egészséges kontroll egerekben 30, 60 és 90 perccel a radiotracer injektálása után. Szignifikancia szint 30 és 90 perces adatok között: $p \leq 0.01$ (*).

3. táblázat: A [^{68}Ga]Ga-NODAGA-RAMEB felvételének ex vivo értékelése (% ID/g) BxPC-3- és PancTu-1 daganatokban

4. táblázat: A [^{68}Ga]Ga-DOTAGA-RAMEB és a [$^{205/206}\text{Bi}$]Bi-DOTAGA-RAMEB radiotracerek ex vivo biológiai eloszlása 30, 60 és 90 perccel az injekció beadása után. % ID/g kifejezve átlag $\pm$ SD

12. 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.

Hálásan köszönöm Dr. Bodnár Magdolna építő kritikáit, és lelki támogatását.

Szeretettel köszönöm a családom, a kislányom 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”

13. Függelék