



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**



**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΑΔΙΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΟΛΥΤΡΟΠΩΝ  
ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΔΕΞΤΡΑΝΗΣ  
ΓΙΑ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ ΦΡΟΥΡΟΥ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ**



**ΠΑΠΑΣΑΒΒΑ ΑΦΡΟΔΙΤΗ  
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ, MSc**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2021**



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**



**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΑΔΙΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΟΛΥΤΡΟΠΩΝ**

**ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΔΕΞΤΡΑΝΗΣ**

**ΓΙΑ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ ΦΡΟΥΡΟΥ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ**



**ΠΑΠΑΣΑΒΒΑ ΑΦΡΟΔΙΤΗ**

**ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ, MSc**

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2<sup>ος</sup> κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΡΑΔΙΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΟΛΥΤΡΟΠΩΝ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΩΝ  
ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΔΕΞΤΡΑΝΗΣ ΓΙΑ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΤΟΥ ΦΡΟΥΡΟΥ ΛΕΜΦΑΔΕΝΑ**

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**A. Τσοτίνης**

Καθηγητής

Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

**A' ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ**

**I. Πιρμεττής**

Ερευνητής A'

ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

**B' ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ**

**M. Παπαδόπουλος**

Ερευνητής A'

ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**A. Τσοτίνης**

Καθηγητής

Τμήμα Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ

**I. Πιρμεττής**

Ερευνητής Α΄

ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”

**M. Παπαδόπουλος**

Ερευνητής Α΄

ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”

**M. Πελεκάνου**

Ερευνήτρια Α΄

ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”

**N. Πουλή**

Καθηγήτρια

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

**Π. Μαράκος**

Καθηγητής

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

**N. Λουγιάκης**

Επικ. Καθηγητής

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

## **I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν νέα σύμπλοκα του  $^{99m}\text{Tc}$  και του  $^{68}\text{Ga}$ , με παράγωγα μαννοζυλιωμένων δεξτρανών διαφορετικού μοριακού βάρους, 10-500 kDa, για πιθανή χρήση τους στον εντοπισμό του φρουρού λεμφαδένα.

Στο πλαίσιο αυτό, συντέθηκε, αρχικά, με βάση τη βιβλιογραφία ο 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδης, η μαννόζη, που θα λειτουργήσει ως υπόστρωμα για τη πρόσδεση στον υποδοχέα μαννόζης CD206 στα μακροφάγα τον λεμφαδένων.

Στη συνέχεια, συντέθηκαν οι υποκαταστάτες  $\text{D}_{10}\text{CM}-\text{D}_{500}\text{CM}$ , **19-24**, σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο, με την προσθήκη του αλλυλοβρωμιδίου σε δεξτράνη, διαφορετικού μοριακού βάρους κάθε φορά, προέκυψαν οι ενδιάμεσες άλλυλ-δεξτράνες  $\text{D}_{10}\text{A}-\text{D}_{500}\text{A}$ , **7-12**. Στις αλλυλοδεξτράνες προστέθηκε κυστεΐνη, οπότε προέκυψαν τα παράγωγα  $\text{D}_{10}\text{C}-\text{D}_{500}\text{C}$ , **13-18**. Και τέλος, στα παράγωγα  $\text{D}_{10}\text{C}-\text{D}_{500}\text{C}$  προστέθηκε φρεσκοπαρασκευασμένο διάλυμα 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδης για να προκύψουν τα μαννοζυλιωμένα παράγωγα  $\text{D}_{10}\text{CM}-\text{D}_{500}\text{CM}$ , **19-24**. Στο επιλεγμένο παράγωγο  $\text{D}_{20}\text{CM}$ , **20**, προστέθηκε το χηλικό σύστημα NODAGA για να προκύψει ο υποκαταστάτης  $\text{NODAGA}-\text{D}_{20}\text{CM}$ , **25**, και, μετέπειτα, η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), φθοριόχρωμα, το οποίο εκπέμπει πράσινο χρώμα για οπτική απεικόνιση, για να προκύψει το παράγωγο  $\text{NODAGA}-\text{D}_{20}\text{CM}-\text{FITC}$ , **26**. Όλοι οι παραπάνω υποκαταστάτες χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία NMR.

Οι υποκαταστάτες **19-24** επισημάνθηκαν με τον οργανομεταλλικό πυρήνα  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ , οπότε προέκυψαν τα σύμπλοκα  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{D}_{10-500}\text{CM})]$ , **19'-24'**, στα οποία οι υποκαταστάτες  $\text{D}_{10}\text{CM}-\text{D}_{500}\text{CM}$ , **19-24**, λειτούργησαν ως SNO τριδραστικοί υποκαταστάτες. Οι υποκαταστάτες **25** και **26** επισημάνθηκαν με το  $^{68}\text{GaCl}_3$  και προέκυψαν τα σύμπλοκα  $^{68}\text{Ga}-\text{NODAGA}-\text{D}_{20}\text{CM}$ , **25'**, και  $^{68}\text{Ga}-\text{NODAGA}-\text{D}_{20}\text{CM}-\text{FITC}$ , **26'**. Η συναρμογή του  $^{68}\text{Ga}$  γίνεται μέσω των τριών ατόμων αζώτου και των τριών καρβοξυλίων του χηλικού συστήματος NODAGA.

Σε επίπεδο ιχνηθέτη, όλα τα σύμπλοκα παρασκευάστηκαν σε υψηλή απόδοση. Τα σύμπλοκα του  $^{99m}\text{Tc}$ , **19'-24'**, είναι σταθερά με την πάροδο του χρόνου στο διάλυμα της επισήμανσης και παρουσία ισχυρών ανταγωνιστών (ιστιδίνη, κυστεΐνη) μέχρι τις 24 h και 6 h, αντίστοιχα. Τα σύμπλοκα του  $^{68}\text{Ga}$ , **25'** και **26'**, είναι σταθερά, με την πάροδο του χρόνου, στο διάλυμα της επισήμανσης σε θερμοκρασία δωματίου έως και τις 4 h.

Μελέτες βιοκατανομής με τα σύμπλοκα του  $^{99m}\text{Tc}$ , **19'-24'**, στα 15, 60 και 180 λεπτά μετά την ένεση έδειξαν ταχεία κάθαρση από το σημείο της ένεσης στα 15 λεπτά, με μία πιο αργή κάθαρση μέχρι τα 60 λεπτά, η οποία και παρέμεινε στη συνέχεια σταθερή. Η πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα ήταν υψηλή για όλα τα σύμπλοκα στα 15 λεπτά (2-3%). Στα 60 και 180 λεπτά μετά την ένεση, η πρόσληψη αυξήθηκε περαιτέρω ή παρέμεινε σταθερή (5-15%). Τις υψηλότερες τιμές παρουσίασε το σύμπλοκο  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **22'**, το οποίο στα 180 λεπτά είχε και τη

μεγαλύτερη αναλογία  $1^{ou}/2^{ou}$  λεμφαδένα. Η πρόσληψη των συμπλόκων από τον δεύτερο λεμφαδένα ήταν χαμηλή καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης (0.49-1.84% στα 15 λεπτά, 1.81-2.37% στα 180 λεπτά). Ταυτόχρονα, μελετήθηκε και η βιοκατανομή του μη μαννοζυλιωμένου *fac*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{C})(\text{CO})_3]$ , **16'**, για την επιβεβαίωση πρόσληψης του συμπλόκου **22'**, λόγω αλληλεπίδρασης της μαννόζης με τον υποδοχέα μαννόζης CD206 στα μακροφάγα των λεμφαδένων. Τα αποτελέσματα των βιοκατανομών επιβεβαιώθηκαν και από μελέτες απεικόνισης με SPECT/CT κάμερα πειραματόζων.

Για τα σύμπλοκα του  $^{68}\text{Ga}$ , **25'** και **26'**, παρατηρήθηκε σε *in vivo* πειράματα στα 15, 30 και 60 λεπτά μια εξαρχής ταχεία απομάκρυνση από το σημείο της ένεσης, η οποία αυξήθηκε περαιτέρω με την πάροδο του χρόνου. Τα δεδομένα για το φρουρό λεμφαδένα έδειξαν αξιοσημείωτη και σταθερή πρόσληψη σε όλους του χρόνους. Τα κοινά χαρακτηριστικά των 2 βιοκατανομών υποδεικνύουν ότι η σύνδεση του FITC στο σύμπλοκο **26'**, δεν αλλάζει ιδιαιτέρως τη βιοκατανομή του μορίου.

Από τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν, το σύμπλοκο *fac*- $[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **22'**, έδειξε τα καλύτερα βιολογικά χαρακτηριστικά, καθιστώντας το, έτσι, υποψήφιο για περαιτέρω αξιολόγηση σε μεγαλύτερα ζώα ή σε κλινικές μελέτες για τη χρήση του ως νέο ραδιοφάρμακο για την ανίχνευση του φρουρού λεμφαδένα.

**Λέξεις-κλειδιά:** φρουρός λεμφαδένας, δεξτράνη, μαννόζη, κυστεΐνη, τεχνήτιο-99m, γάλλιο-68, απεικόνιση

## II. ABSTRACT



The current project aims at the design, synthesis, and biological evaluation of a series of mannosylated dextran derivatives labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{68}\text{Ga}$ , bearing dextrans of different molecular weight, 10-500 kDa, for potential use in sentinel lymph node detection.

In this context, 2-imino-2-methoxy-ethyl-1-thio- $\beta$ -D-mannopyranoside, a mannose derivative, was initially synthesized according to the literature procedure, to act as a substrate for binding to the mannose receptor CD206 in the macrophages of the lymph nodes.

DCM derivatives, **19-24**, were then synthesized in three steps. In the first step, by adding allyl bromide to a dextran of different molecular weight each time, the intermediate allyl dextrans  $\text{D}_{10}\text{A}$ - $\text{D}_{500}\text{A}$ , **7-12**, were obtained. Cysteine was added to the allyl-dextrans to give the  $\text{D}_{10}\text{C}$ - $\text{D}_{500}\text{C}$  derivatives, **13-18**. Finally, freshly prepared 2-imino-2-methoxy-ethyl-1-thio- $\beta$ -D-mannopyranoside solution was added to the  $\text{D}_{10}\text{CM}$ - $\text{D}_{500}\text{CM}$  derivatives, affording the mannosylated DCM derivatives, **19-24**. NODAGA chelating system was added to  $\text{D}_{20}\text{CM}$ , **20**, to give NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ , **25**, followed by fluorescein isothiocyanate (FITC), a fluorochrome for potential use in optical imaging, to give NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ -FITC, **26**. All derivatives were characterized by NMR spectroscopy.

Derivatives **19-24** were labeled with the  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  core, to give complexes  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{DCM})]$ , **19'-24'**, where DCM derivatives, **19-24**, act as efficient SNO tridentate ligands. Derivatives **25** and **26** were labeled with  $^{68}\text{GaCl}_3$ , to yield complexes  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ , **25'**, and  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ -FITC, **26'**, where  $^{68}\text{Ga}$  is coordinated by the three nitrogen atoms and the three carboxylic groups of the NODAGA chelating system.

At tracer level, all complexes were prepared in high yield.  $^{99m}\text{Tc}$  complexes, **19'-24'**, were stable overtime, in the labeling solution, and during histidine/cysteine challenge experiments up to 24 h and 6 h, accordingly.  $^{68}\text{Ga}$  complexes, **25'** and **26'**, showed also high stability in the labeling solution at room temperature up to 4 h.

Biodistribution studies with  $^{99m}\text{Tc}$  complexes, **19'-24'**, at 15, 60 and 180 min after injection showed rapid injection site clearance at 15 min, with a slower clearance up to 60 min, which then remained quite stable. Sentinel lymph node uptake was high for all complexes at 15 min (2-3%). At 60 and 180 min after injection, uptake was further increased or remained stable (5-15%). The highest values were presented for complex  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **22'**, which at 180 min showed the highest 1<sup>st</sup>/2<sup>nd</sup> lymph node ratio. The uptake in the second lymph node was low throughout the studies (0.49-1.84% at 15 min, 1.81-2.37% at 180 min). For comparison purposes, the biodistribution of the non-mannosylated  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{C})(\text{CO})_3]$ , **16'**, was studied to confirm the uptake of complex **22'**, due to the interaction of mannose with the mannose receptor CD206 in the macrophages of the lymph nodes. Biodistribution results, for complexes **22'** and **16'**, were also confirmed by imaging studies with SPECT/CT camera.

<sup>68</sup>Ga complexes, **25'** and **26'**, were studied *in vivo* at 15, 30 and 60 min. An initially rapid injection site clearance was observed, which increased further overtime. The data for the sentinel lymph node showed remarkable and stable uptake at all time points. The common characteristics of both biodistribution studies indicate that binding FITC to complex **26'** does not significantly alter the biodistribution of the molecule.

Complex *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(D<sub>75</sub>CM)(CO)<sub>3</sub>], **22'**, showed the best biological characteristics, making it a candidate for further evaluation in larger animals and clinical trials as a new radiopharmaceutical for sentinel lymph node detection.

*Keywords:* **sentinel lymph node; dextran; mannose; cysteine; technetium-99m; gallium-68; imaging**

### III. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική εργασία εκπονήθηκε κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2016-2021 στο Εργαστήριο Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) “Δημόκριτος”, υπό την επίβλεψη του Δρ. Ιωάννη Πιρμεττή, Ερευνητή Α΄ στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”, με τη συνεργασία του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ανδρέα Τσοτίνη.

Ευχαριστώ το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για την παροχή υποτροφίας για την εκπλήρωση του διδακτορικού, καθώς και το Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος” για τη διάθεση των αναγκών μέσων για τη διεξαγωγή της έρευνας αυτής.

Ευχαριστώ τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής και συγκεκριμένα τον επιβλέποντα καθηγητή Α. Τσοτίνη και τους ερευνητές Α΄ Δρ. Ιωάννη Πιρμεττή και Δρ. Μηνά Παπαδόπουλο, για την αμέριστη υποστήριξη και τις πολύτιμες υποδείξεις τους. Ευχαριστώ τον καθηγητή Π. Μαράκο, την καθηγήτρια Ν. Πουλή, τον επίκουρο καθηγητή Ν. Λουγιάκη και την ερευνήτρια Α΄ Δρ. Μ. Πελεκάνου, ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις τους.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους Δρ. Μηνά Παπαδόπουλο και Δρ. Ι. Πιρμεττή για την πολύπλευρη ουσιαστική υποστήριξη, εμπιστοσύνη και καθοδήγησή τους από το προπτυχιακό επίπεδο μέχρι και σήμερα. Ευχαριστώ θερμά την, Δρ. Μ. Πελεκάνου, από το Ινστιτούτο Βιοεπιστημών & Εφαρμογών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”, για τις υποδείξεις της στην απόδοση των φασμάτων NMR, και Δρ. Π. Μπουζιώτη, από το Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”, για την αμέριστη καθοδήγηση και υποστήριξη κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με ραδιενεργό <sup>68</sup>Ga. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον συνεργαζόμενο ερευνητή Δρ. Γ. Λούντο, από το Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. “Δημόκριτος”, καθώς και συνιδρυτή και διευθύνοντα σύμβουλο της εταιρίας BioEmission Technology Solutions, για τον σχεδιασμό και την εκτέλεση των απεικονίσεων με SPECT/CT κάμερα πειραματόζων.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Αντώνη Σεγκάνη, Χρήστο Κυρίτση και Ιωάννα Ρούπα, στις υποψήφιες διδάκτορες Μυρτώ Ισχυροπούλου και Κωνσταντίνα Μακρυπίδη, καθώς και στον μεταπτυχιακό φοιτητή Χαράλαμπο Φλαμπουράρη, για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή τους σε όλο το διάστημα της διδακτορικής μου εργασίας. Απέκτησα την περίοδο αυτή ανεκτίμητους φίλους και συνεργάτες.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2021

Αφιερωμένο  
Στην οικογένειά μου

## IV. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
II.	ABSTRACT .....	7
III.	ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	10
IV.	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	12
V.	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	15
A.	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	16
B.	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	17
C.	ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	18
VI.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	19
1.	Σκοπός της εργασίας .....	20
2.	Ραδιοφαρμακευτική χημεία .....	21
3.	Διαγνωστικά ραδιοφάρμακα .....	23
3.1.1.	SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography .....	25
3.1.2.	PET: Positron Emission Tomography .....	26
4.	Τα στοιχεία τεχνητίο και γάλλιο .....	28
4.1.	Το τεχνητίο .....	28
4.1.1.	Το μετασταθερό <sup>99m</sup> Tc .....	28
4.1.2.	Μέθοδος παραγωγής του <sup>99m</sup> Tc .....	29
4.1.3.	Η χημεία των ενώσεων του τεχνητίου .....	31
4.1.4.	Οξειδωτική βαθμίδα I .....	32
4.1.5.	Τριδραστικό σύστημα ατόμων δοτών- S-αλκυλιωμένη L-κυστεΐνη (SNO) .....	34
4.1.6.	Τα ραδιοφάρμακα του <sup>99m</sup> Tc .....	36
4.2.	Το γάλλιο .....	39
4.2.1.	Το <sup>68</sup> Ga .....	39
4.2.2.	Μέθοδος παραγωγής του <sup>68</sup> Ga .....	40
4.2.3.	Η χημεία των ενώσεων του γαλλίου .....	42
4.2.4.	NODAGA (1, 4, 7-τριαζακυκλολονάνιο-1-γλουταρικό οξύ-4, 7-οξικό οξύ) .....	45
4.2.5.	Τα ραδιοφάρμακα του <sup>68</sup> Ga .....	45
4.3.	Προσκεύασμα ραδιοφαρμάκου (kit) .....	47
5.	Εντοπισμός του φρουρού λεμφαδένα (SLND: Sentinel Lymph Node Detection) .....	48
5.1.	Το λεμφικό σύστημα .....	48
5.2.	Η λειτουργία των λεμφαδένων .....	49
5.3.	Η λεμφαγγειογραφία (Lymphoscintigraphy) .....	51

5.4.	Ο φρουρός λεμφαδένας (Sentinel Lymph Node) .....	53
5.5.	Παράγοντες απεικόνισης του φρουρού λεμφαδένα .....	55
5.5.1.	Μπλε χρωστικές (Blue Dyes) και το πράσινο της ινδοκυανίνης (ICG).....	55
5.5.2.	Ραδιοανιχνευτές.....	56
5.5.2.1.	Βιολογικά αδρανείς παράγοντες .....	56
5.5.2.2.	Παράγοντες που αλληλοεπιδρούν με υποδοχέα .....	60
5.5.2.2.1.	<sup>99m</sup> Tc-tilmanocept .....	62
5.5.2.2.2.	Άλλα παράγωγα <sup>99m</sup> Tc-dextran για απεικόνιση του φρουρού λεμφαδένα.....	63
VII.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ.....	65
6.	Υλικά και μέθοδοι .....	66
6.1.	Αντιδραστήρια και Πρώτες ύλες .....	66
6.2.	Όργανα και Μέθοδοι.....	67
7.	Σύνθεση υποκαταστατών .....	69
7.1.	Σύνθεση του 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδης .....	69
7.1.1.	Σύνθεση του 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλ-α/β-D-μαννοπυρανόζη, 2.....	69
7.1.2.	Σύνθεση του 2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανόζυλο βρωμίδιο, 3 .....	69
7.1.3.	Σύνθεση της υδροβρωμικής 2-S-(2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-μαννοπυρανοζυλο)-2-θειοψευδοουρίας, 4 .....	70
7.1.4.	Σύνθεση του κυανομεθυλο-2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλ-1-θειο- β-D-μαννοπυρανοσίδη, 5..	70
7.1.5.	Σύνθεση του 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, 6.....	70
7.2.	Σύνθεση παραγώγων δεξτράνης.....	71
7.2.1.	Σύνθεση άλλυλο δεξτράνης D <sub>10</sub> A-D <sub>500</sub> A, 7-12 .....	71
7.2.2.	Σύνθεση αμινοτελικών δεξτρανών D <sub>10</sub> C-D <sub>500</sub> C, 13-18 .....	72
7.2.3.	Σύνθεση μαννοζυλιωμένων δεξτρανών D <sub>10</sub> CM-D <sub>500</sub> CM, 19-24.....	72
7.3.	Σύνθεση NODAGA-D <sub>20</sub> CM, 25 .....	73
7.4.	Σύνθεση NODAGA-D <sub>20</sub> CM-FITC, 26 .....	73
8.	Παρασκευή προσκευάσματος (kit) .....	75
9.	Επισήμανση με <sup>99m</sup> Tc.....	76
9.1.	Σύνθεση του πρόδρομου συμπλόκου <i>fac</i> -[ <sup>99m</sup> Tc(H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> .....	76
9.2.	Επισήμανση παραγώγων δεξτράνης με <sup>99m</sup> Tc, 16', 19'-24' .....	76
9.3.	Πειράματα σταθερότητας συμπλόκων <sup>99m</sup> Tc.....	76
9.3.1.	Σταθερότητα των συμπλόκων σε θερμοκρασία δωματίου .....	77
9.3.2.	Σταθερότητα των συμπλόκων παρουσία ιστιδίνης και κυστεΐνης.....	77
10.1.	Επισήμανση παραγώγων δεξτράνης με <sup>68</sup> Ga, 25' και 26' .....	78
10.2.	Πειράματα σταθερότητας συμπλόκων <sup>68</sup> Ga .....	78
10.2.1.	Σταθερότητα των συμπλόκων του <sup>68</sup> Ga σε θερμοκρασία δωματίου .....	78

11.	Βιολογική κατανομή των συμπλόκων <sup>99m</sup> Tc .....	79
11.1.	Βιολογική κατανομή σε πειραματόζωα (Swiss Albino) έπειτα από υποδόρια ένεση στο πέλμα 79	
11.1.1.	Εκτέλεση του πειράματος.....	79
11.2.	Απεικόνιση πειραματόζωων με SPECT κάμερα έπειτα από υποδόρια ένεση στο πέλμα	80
11.2.1.	Εκτέλεση του πειράματος.....	81
12.	Βιολογική κατανομή των συμπλόκων <sup>68</sup> Ga.....	82
12.1.	Βιολογική κατανομή σε πειραματόζωα (Swiss Albino mice) μετά από υποδόρια ένεση στο πέλμα.....	82
12.1.1.	Εκτέλεση του πειράματος.....	82
VIII.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	84
13.	Σύνθεση και ταυτοποίηση υποκαταστατών .....	85
13.1.	Σύνθεση και ταυτοποίηση του 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, 6	85
13.2.	Σύνθεση και ταυτοποίηση παραγώγων δεξτράνης, 7-24 .....	87
13.3.	Σύνθεση και ταυτοποίηση του NODAGA-D <sub>20</sub> CM, 25 .....	92
13.4.	Σύνθεση και ταυτοποίηση του NODAGA- D <sub>20</sub> CM -FITC, 26 .....	93
14.	Σύνθεση, ταυτοποίηση και αξιολόγηση συμπλόκων του <sup>99m</sup> Tc .....	94
14.1.	Σύνθεση και ταυτοποίηση των συμπλόκων του <sup>99m</sup> Tc, 16' και 19'-24' .....	94
14.2.	Πειράματα σταθερότητας των συμπλόκων με <sup>99m</sup> Tc.....	96
14.3.	Βιολογική αξιολόγηση των συμπλόκων <sup>99m</sup> Tc .....	98
15.	Σύνθεση, ταυτοποίηση και αξιολόγηση συμπλόκων του <sup>68</sup> Ga .....	106
15.1.	Σύνθεση και ταυτοποίηση του συμπλόκου του <sup>68</sup> Ga, 25' και 26' .....	106
15.2.	Πειράματα σταθερότητας συμπλόκων <sup>68</sup> Ga .....	107
15.3.	Βιολογική κατανομή των συμπλόκων <sup>68</sup> Ga.....	107
IX.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	110
X.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	112
X.	ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ .....	124

## **V. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ**



## A. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΑΡΙΘΜΗΣΗ	ΤΙΤΛΟΣ	ΣΕΛΙΔΑ
4.1	Οξειδωτικές βαθμίδες του τεχνητίου στα αντίστοιχα σύμπλοκα	32
4.2	Δομές χηλικών συστημάτων $^{68}\text{Ga}$	44
13.1	Μαννόζες, κυστεΐνες και μοριακό βάρος των παραγώγων δεξτράνης $\text{D}_{10}\text{CM}-\text{D}_{500}\text{CM}$ , 19-24.	89
14.1	Χρόνοι έκλυσης των συμπλόκων του $^{99\text{m}}\text{Tc}$	94
14.2	Σταθερότητα των συμπλόκων του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ στο διάλυμα της επισήμανσης	97
14.3	Σταθερότητα των συμπλόκων του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ παρουσία ανταγωνιστών	97
14.4	Βιολογική κατανομή των συμπλόκων $\text{fac}-[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{D}_{10-500}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , 19'-24', σε πειραματόζωα 15 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα	99
14.5	Βιολογική κατανομή των συμπλόκων $\text{fac}-[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{D}_{10-500}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , 19'-24', σε πειραματόζωα 60 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα	99
14.6	Βιολογική κατανομή των συμπλόκων $\text{fac}-[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{D}_{10-500}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , 19'-24', σε πειραματόζωα 180 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα	100
14.7	Συγκριτική βιολογική κατανομή του συμπλόκου $\text{fac}-[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{C})(\text{CO})_3]$ , 16', και $\text{fac}-[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , 23', σε πειραματόζωα σε α) 15, β) 60 και γ) 180 min p.i. μετά από ένεση στο πέλμα	102
15.1	Σταθερότητα των συμπλόκων του $^{68}\text{Ga}$ 25' και 26'	107
15.2	Βιολογική κατανομή του συμπλόκου $^{68}\text{Ga}-\text{NODAGA}-\text{D}_{20}\text{CM}$ , 25', σε πειραματόζωα σε α) 15, β) 30 και γ) 60 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα	108
15.3	Βιολογική κατανομή του συμπλόκου $^{68}\text{Ga}-\text{NODAGA}-\text{D}_{20}\text{CM}-\text{FITC}$ , 26', σε πειραματόζωα σε α) 15, β) 30 και γ) 60 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα	108

## B. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΑΡΙΘΜΗΣΗ	ΤΙΤΛΟΣ	ΣΕΛΙΔΑ
3.1	Εικόνες SPECT ανθρώπινου σκελετού που ελήφθησαν με το ραδιοφάρμακο $^{99m}\text{Tc}$ -MDP	25
3.2	Εικόνες PET/CT και PET/MRI ασθενούς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα	26
4.1	Το φυσικό τεχνητίο	28
4.2	Γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	30
4.3	Εικόνα παρκινσονικού εγκεφάλου με χρήση $^{99m}\text{Tc}$ -TRODAT-1	38
5.1	Το λεμφικό σύστημα	49
5.2	Απεικόνιση του φρουρού λεμφαδένα σε σχέση με τη θέση του πρωτοεμφανιζόμενου καρκίνου	54
13.1	Φάσμα $^1\text{H}$ NMR των παραγώγων $\text{D}_{75}\text{A}$ , 10, $\text{D}_{75}\text{C}$ , 16, και $\text{D}_{75}\text{CM}$ , 22, σε $\text{D}_2\text{O}$ στους $25^\circ\text{C}$	90
13.2	Φάσμα $^1\text{H}$ NMR των παραγώγων $\text{D}_{10}\text{CM}$ - $\text{D}_{500}\text{CM}$ , 19-24, σε $\text{D}_2\text{O}$ στους $25^\circ\text{C}$	91
14.1	2D και 3D απεικόνιση μετά από ένεση στο πέλμα σε μύ με το σύμπλοκο του $\text{Tc}$ -99m με μαννοζυλιωμένη δεξτράνη, $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{D}_{75}\text{CM}$ , ως παράγοντας στόχευσης λεμφαδένων σε υγιή Swiss Albino μυ. Ένας επισημασμένος με $\text{Tc}$ -99m παράγοντας στόχευσης λεμφαδένων, μετά από ένεση στο πέλμα, με απεικόνιση 2D και 3D αντίστοιχα. (Α) Δυναμική απεικόνιση αμέσως μετά τη χορήγηση για 30 λεπτά με $\gamma\text{-eye}^{\text{TM}}$ (Β) Τομογραφική απεικόνιση 1 ώρα μετά την ένεση για 30 λεπτά, (Γ) Τομογραφική απεικόνιση 3 ώρες μετά την χορήγηση για 30 λεπτά (Δ) Τομογραφική απεικόνιση 24 ώρες μετά την χορήγηση για 50 λεπτά με $\chi\text{-CUBE}^{\text{TM}}$ / $\gamma\text{-CUBE}^{\text{TM}}$ , αντίστοιχα. Η χρωματική μπάρα έδειξε το επίπεδο συσσώρευσης (δηλαδή, το λευκό είναι το υψηλότερο και το μωβ το χαμηλότερο). 1 <sup>ος</sup> Λεμφαδένας (1 <sup>ος</sup> ΛΑ), 2 <sup>ος</sup> Λεμφαδένας (2 <sup>ος</sup> ΛΑ), Κύστη (Κ), Σημείο ένεσης (ΣΕ).	104
14.2	2D και 3D απεικόνιση μετά από ένεση στο πέλμα σε μύ με το σύμπλοκο του $\text{Tc}$ -99m με μη μαννοζυλιωμένη δεξτράνη, $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{D}_{75}\text{C}$ . Ένας επισημασμένος με $\text{Tc}$ -99m παράγοντας, μετά από ένεση στο πέλμα, με απεικόνιση 2D και 3D αντίστοιχα. (Α) Δυναμική απεικόνιση αμέσως μετά τη χορήγηση για 30 λεπτά με $\gamma\text{-eye}^{\text{TM}}$ (Β) Τομογραφική απεικόνιση 1 ώρα μετά την ένεση για 30 λεπτά, (Γ) Τομογραφική απεικόνιση 3 ώρες μετά την χορήγηση για 30 λεπτά (Δ) Τομογραφική απεικόνιση 24 ώρες μετά την χορήγηση για 50 λεπτά με $\chi\text{-CUBE}^{\text{TM}}$ / $\gamma\text{-CUBE}^{\text{TM}}$ , αντίστοιχα. Η χρωματική μπάρα έδειξε το επίπεδο συσσώρευσης (δηλαδή, το λευκό είναι το υψηλότερο και το μωβ το χαμηλότερο). 1 <sup>ος</sup> Λεμφαδένας (1 <sup>ος</sup> ΛΑ), 2 <sup>ος</sup> Λεμφαδένας (2 <sup>ος</sup> ΛΑ), Κύστη (Κ), Σημείο ένεσης (ΣΕ).	105

### C. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΑΡΙΘΜΗΣΗ	ΤΙΤΛΟΣ	ΣΕΛΙΔΑ
3.1	Δομή του $^{18}\text{F}$ -FDG	27
4.1	Δομή του κατιονικού συμπλόκου $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$	33
4.2	Θέσεις σύμπλεξης τριδραστικών υποκαταστατών σε σύμπλοκα του τύπου $\text{fac-}[\text{M}(\text{XYZ})(\text{CO})_3]$ , όπου M:Tc	33
4.3	Δομή (i) του PADA και (ii) του συμπλόκου $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PADA	34
4.4	Κρυσταλλική δομή του $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{NSO})]$	35
4.5	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D,L-HMPAO	37
4.6	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -L,L-ECD	37
4.7	$^{99\text{m}}\text{TcO}$ -MAG <sub>3</sub>	38
4.8	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi	38
4.9	Η πρόοδος στις γεννήτριες $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ : από την εκχύλιση στην ανταλλαγή ιόντων	40
4.10	Συναρμογή του NODAGA με το $^{68}\text{Ga}$	45
4.11	Δομή του $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-TOC	46
5.1	Προτεινόμενη δομή του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tilmanocept	63
13.1	Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης της 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδης: i) pyridine, acetic anhydride, rt για 4 h, ii) Phosphorus tribromide, H <sub>2</sub> O, παγόλουτρο για 15 min και μετά rt για 4 h, iii) thiourea, dry acetone, reflux για 30 min, iv) chloroacetonitrile, water:acetone 1:1, rt για 30 min, v) sodium methanoxide solution, 20 h	86
13.2	Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης των D <sub>10</sub> CM-D <sub>500</sub> CM, 19-24: i) H <sub>2</sub> O, NaOH, NaBH <sub>4</sub> , 3-βρωμο-1-προπένιο, 50°C για 3 h ii) νερό, κυστεΐνη, υπερθειικό αμμώνιο 50°C 4 h, iii) 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, ρυθμιστικό διάλυμα βορικού, rt για 20 h.	87
13.3	Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης του NODAGA- D <sub>20</sub> CM: i) ρυθμιστικό διάλυμα βορικού, NODAGA-NHS ester, DMSO, rt για 18 h	92
13.4	Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης του NODAGA-D <sub>20</sub> CM-FITC: i) ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού, FITC, DMSO, rt για 18h	93
14.1	Χρωματογραφική ανάλυση των (α) $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ , (β) $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , και (γ) $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , <b>22'</b> , με RP-HPLC	95
14.2	Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης των συμπλόκων $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D <sub>75</sub> C, 16', και $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D <sub>10</sub> CM – $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D <sub>500</sub> CM, 19'-24'. i) $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (0.5 - 1.0 mL, 37 - 740 MBq), pH 7, 15 min, 100°C	96
15.1	Χρωματογραφική ανάλυση του $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-D <sub>20</sub> CM, 25' με RP-HPLC	106

## **VI. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων ραδιοφαρμάκων που φέρουν πολύτροπες μαννοζυλιωμένες δεξτράνες διαφορετικού μοριακού βάρους, επισημασμένες με  $^{99m}\text{Tc}$  ή/και  $^{68}\text{Ga}$ , για απεικόνιση του φρουρού λεμφαδένα με υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονικής εκπομπής (SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography) ή/και τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET: Positron Emission Tomography).

Αρχικά, θα παρασκευαστούν με κλασική οργανική σύνθεση οι κατάλληλοι υποκαταστάτες, οι οποίοι θα χαρακτηριστούν με  $^1\text{H}$  NMR. Για τα σύμπλοκα του  $^{99m}\text{Tc}$ , θα συντεθούν οι τριδραστικοί υποκαταστάτες DCM (Dextran-S-Cysteine-Mannose), όπου DCM είναι παράγωγο μαννοζυλιωμένης δεξτράνης διαφορετικού μοριακού βάρους κάθε φορά, το οποίο κυμαίνεται από 10-500 kDa, και φέρει το τριδραστικό σύστημα ατόμων δοτών SNO (παράγωγο S-κυστεΐνης), για συναρμογή με τον πυρήνα  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ . Σε επίπεδο ιχνηθέτη  $^{99m}\text{Tc}$ , για την σύνθεση των συμπλόκων θα χρησιμοποιηθεί η πρόδρομη ένωση  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ .

Για τα σύμπλοκα του  $^{68}\text{Ga}$ , θα συντεθούν επιλεγμένοι υποκαταστάτες NODAGA-DCM και NODAGA-DCM-FITC, όπου NODAGA-DCM είναι παράγωγα μαννοζυλιωμένων δεξτρανών τα οποία φέρουν το χηλικό 1,4,7-τριαζακυκλολονάνιο, 1-γλουταρικό οξύ-4,7-οξικό οξύ (NODAGA), το οποίο σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το γάλλιο και ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), φθοριόχρωμα το οποίο εκπέμπει πράσινο χρώμα για οπτική απεικόνιση. Για τη παρασκευή των συμπλόκων του  $^{68}\text{Ga}$  θα χρησιμοποιηθεί το  $^{68}\text{GaCl}_3$ .

Θα πραγματοποιηθούν μελέτες *in vitro* σταθερότητας των ραδιενεργών συμπλόκων  $^{99m}\text{Tc}$  και  $^{68}\text{Ga}$ , καθώς και *in vivo* αξιολόγησή τους. Η *in vivo* αξιολόγηση θα περιλαμβάνει αρχικά, μελέτες βιοκατανομής σε υγιή ποντίκια, μετά από υποδόρια ένεση στο πέλμα των ποντικών, αφαίρεση των λεμφαδένων και λοιπών οργάνων/ιστών και μέτρηση της ραδιενέργειάς τους. Παράλληλα, πειράματα απεικόνισης μέσω SPECT/CT θα επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων βιοκατανομής και τον εντοπισμό του φρουρού λεμφαδένα.

Τέλος, θα πραγματοποιηθεί τυποποίηση του/των καλύτερων προϊόντων σε προσκεύασμα ραδιοφαρμάκου (kit) για ενδεχόμενη εφαρμογή τους στη κλινική πράξη.

## 2. Ραδιοφαρμακευτική χημεία

Η χρήση των ραδιοφαρμάκων στην Πυρηνική Ιατρική για τη διαγνωστική απεικόνιση ή/και τη θεραπεία έχει αναγνωριστεί εδώ και πολλές δεκαετίες, καθιστώντας την Ραδιοφαρμακευτική Επιστήμη ένα διεπιστημονικό τομέα μέγιστης σημασίας από το επίπεδο της βασικής έρευνας στην Ιατρική, τη Βιολογία και τη Φυσική έως και την κλινική πρακτική.

Τα ραδιοφάρμακα είναι φάρμακα επισημασμένα με κατάλληλα ραδιονουκλίδια, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν αφενός για διάγνωση ασθενειών και μελέτη των σχετιζόμενων βιολογικών στόχων, όπως υποδοχείς, ένζυμα, συστήματα μεταφοράς και αφετέρου για θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Οι χημικές και φυσικές ιδιότητες των ραδιοφαρμάκων επηρεάζουν τον εντοπισμό τους στο σώμα, ενώ οι ιδιότητες της ραδιενεργού διάσπασης καθορίζουν την ανιχνευτική μέθοδο και τη διαγνωστική ή/και θεραπευτική εφαρμογή. Η ακτινοβολία των διαγνωστικών ραδιοφαρμάκων χρησιμοποιείται για την απεικόνιση της κατανομής τους στους ανθρώπινους ιστούς και η ακτινοβολία των θεραπευτικών ραδιονουκλιδίων, για να μεταφέρει μια υψηλή θεραπευτική δόση ραδιενέργειας στο όργανο-στόχο.

Η αρχή έγινε τη δεκαετία του 1950, όταν τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα ραδιονουκλίδια για διάγνωση και θεραπεία ήταν τα  $^{32}\text{P}$ ,  $^{24}\text{Na}$  και  $^{131}\text{I}$ . Έκτοτε, το πεδίο αυτό επεκτάθηκε για να συμπεριλάβει μια μεγάλη σειρά ραδιοφαρμάκων που βασίζονται σε διάφορα ραδιονουκλίδια. Σχεδόν κάθε όργανο του σώματος και πολλά είδη όγκων μπορούν σήμερα να εκτιμηθούν με πυρηνική απεικόνιση (nuclear imaging), ενώ, επιπρόσθετα, πολλά ραδιονουκλίδια χορηγούνται ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Σήμερα, η χρήση ραδιονουκλιδίων για διαγνωστική απεικόνιση, είναι πολύ σημαντική. Στην απεικόνιση με χρήση ραδιοφαρμάκων διακρίνουμε δύο βασικές κατηγορίες μεθόδων, την υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονικής εκπομπής (SPECT-Single Photon Emission Tomography) και την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET-Positron Emission Tomography).

Όσον αφορά την χρήση των θεραπευτικών ραδιοφαρμάκων, ποικίλα προϊόντα χορηγούνται για την θεραπεία καρκίνων ή φλεγμονωδών νόσων κλπ. Για την καταστροφή των πασχόντων ιστών, χρησιμοποιούνται σήμερα ιόντα, μόρια και σωματίδια, τα οποία επισημαίνονται με κατάλληλα ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν, κυρίως, ακτινοβολία  $\alpha^+$  και  $\beta^-$ . Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας αυξάνεται με την τοπική χορήγηση του ραδιοφαρμάκου, περιορίζοντας έτσι τοπικά τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα της ραδιενέργειας στους φυσιολογικούς ιστούς.<sup>1</sup>

Παρακάτω γίνεται περιγραφή των διαγνωστικών ραδιοφαρμάκων, καθώς η παρούσα διατριβή αναφέρεται σε νέα διαγνωστικά ραδιοφάρμακα.

### 3. Διαγνωστικά ραδιοφάρμακα

Τα ραδιοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς σκοπούς περιέχουν στο μόριό τους ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ακτινοβολία  $\gamma$  ή ποζιτρόνια ( $\beta^+$ ), όπως  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ , κ.ά. Η δόση ακτινοβολίας που χορηγείται για διάγνωση πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, αλλά αρκετή, ώστε να καθίσταται δυνατή η εξέταση και η απεικόνιση των παθολογικών εστιών, εκπέμποντας σήμα ραδιενέργειας ανιχνεύσιμο από ειδικές εξωτερικές απεικονιστικές διατάξεις.

Η επιλογή ενός ραδιοφαρμάκου ως διαγνωστικού είναι συνδυασμός παραγόντων:

1. Των φυσικών χαρακτηριστικών του ραδιονουκλιδίου, το οποίο περιέχεται στο μόριο του ραδιοφαρμάκου, από τις οποίες εξαρτάται η ανίχνευσή του.
2. Των βιοχημικών ιδιοτήτων και του μεταβολισμού του ραδιοφαρμάκου.
3. Του ραδιοβιολογικού αποτελέσματος, δηλαδή της δόσης ακτινοβολίας την οποία θα δεχθεί ο οργανισμός (απορροφούμενη δόση ακτινοβολίας). Η δόση αυτή εξαρτάται από την φύση και την ένταση της ακτινοβολίας του ραδιονουκλιδίου από τον χρόνο ημιζωής και την ύπαρξη κρίσιμου οργάνου-στόχου.

Ένα ραδιονουκλίδιο, για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη διαγνωστικών ραδιοφαρμάκων, πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Εύκολη μέθοδο παραγωγής, χαμηλό κόστος και υψηλή ειδική ραδιενέργεια.
2. Λειτουργικό χρόνο ημιζωής, δηλαδή όχι πολύ μικρό - ώστε να καθίσταται δυνατή η σύνθεση του ραδιοφαρμάκου και η ολοκλήρωση της εξέτασης για την οποία προορίζεται, αλλά ούτε πολύ μεγάλο, ώστε να μην ακτινοβολείται άσκοπα ο ασθενής.
3. Να εκπέμπει μόνο ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία  $\gamma$  ή  $\beta^+$  ποζιτρονίων, χωρίς ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας  $\alpha$  ή  $\beta^-$ .
4. Η ακτινοβολία  $\gamma$  την οποία εκπέμπει το ραδιονουκλίδιο, να είναι μονοενεργειακή, με μέση τιμή ενέργειας 150 KeV και όχι κάτω των 80 KeV, ώστε να είναι ανιχνεύσιμη από τις συνήθεις ανιχνευτικές διατάξεις ( $\gamma$ -camera). Τα ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ποζιτρόνια ανιχνεύονται με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων.
5. Να παρέχει την δυνατότητα ευχερούς και προσιτής μεθόδου σύνθεσης των ραδιοφαρμακευτικών ενώσεων.

Δοθέντων όλων των παραπάνω παραγόντων, τα ραδιονουκλίδια που περιέχονται πιο συχνά στη δομή των διαγνωστικών ραδιοφαρμάκων είναι το τεχνήτιο-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), το γάλλιο-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), το ιώδιο-123 ( $^{123}\text{I}$ ), το ίνδιο-111 ( $^{111}\text{In}$ ), το φθόριο-18 ( $^{18}\text{F}$ ) και το θάλλιο-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ). Το ραδιονουκλίδιο



επιλογής με την μεγαλύτερη εφαρμογή στην Πυρηνική Ιατρική σήμερα, είναι το μετασταθερό τεχνητό  $^{99m}\text{Tc}$  για απεικόνιση με SPECT. Ανάλογη ευρεία διάδοση για απεικόνιση με PET φαίνεται πως έχουν σήμερα τα ραδιοφάρμακα του  $^{68}\text{Ga}$ .

Για να συνθέσουμε νέα εξειδικευμένα ραδιοφάρμακα, αρχικώς επιλέγουμε το κατάλληλο ραδιονουκλίδιο και ανάλογα με το όργανο στόχο ή το βιολογικό σύστημα που θα μελετηθεί, σχεδιάζουμε την χημική δομή των επισημασμένων ενώσεων που πρόκειται να δοκιμαστούν, έτσι ώστε να έχουν τις κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες (μέγεθος, λιποφιλικότητα, διαλυτότητα) ή να φέρουν κατάλληλες φαρμακοφόρες ομάδες ή βιολογικώς δραστικά μόρια, ώστε να έχουν εξειδικευμένη δράση.

Από το σύνολο των καθιερωμένων διαγνωστικών ραδιοφαρμάκων, τα περισσότερα είναι σύμπλοκα ραδιενεργών μετάλλων. Στην περίπτωση αυτή, ο χηλικός υποκαταστάτης που έχει επιλεγεί να συναρμοστεί με το μέταλλο, πρέπει να φέρει κατάλληλες χημικές ομάδες, ώστε να εξασφαλίζεται η σταθερότητα του συμπλόκου *in vivo* και η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το υπό μελέτη βιολογικό υπόστρωμα.

Ο πυρηνικός ιατρικός εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση παράγει μια εικόνα που αντιπροσωπεύει τη κατανομή του ραδιοφαρμάκου στο σώμα. Σε αντίθεση με άλλες «απεικονιστικές» ειδικότητες, όπως η ακτινοδιαγνωστική, οι τεχνικές της Πυρηνικής Ιατρικής αποτελούν μεθόδους λειτουργικής απεικόνισης των οργάνων και όχι μορφολογικής απεικόνισης. Έτσι, παρέχουν πληροφορίες που η απόκτησή τους θα απαιτούσε χειρουργικές επεμβάσεις ή άλλες πολύπλοκες διαγνωστικές μελέτες. Οι τεχνικές της Πυρηνικής Ιατρικής απεικονίζουν συχνά κάποιες βλάβες σε πολύ αρχικά στάδια της νόσου, ακόμα και σε ασυμπτωματικά, στάδια, επιτρέποντας την πρώιμη διάγνωση και βελτιώνοντας την πρόγνωση της νόσου.<sup>2</sup>

### **3.1. Ανιχνευτικές διατάξεις**

Αρχικά, ο Hal Anger έφερε την επανάσταση στη επιστήμη της Πυρηνικής Ιατρικής, με την κατασκευή της πρώτης γ-κάμερας στη δεκαετία του 1950. Ο ίδιος επινόησε το μετρητή δειγμάτων (γ-counter) που σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα στις εργαστηριακές εξετάσεις βιολογικών δειγμάτων με μικρές ποσότητες ραδιενεργού υλικού (radioimmunoassay kits-RIA).

Σήμερα, στην απεικόνιση με χρήση ραδιοϊσοτόπων διακρίνουμε τρεις βασικές κατηγορίες μεθόδων:

1. προβολική απεικόνιση εκπεμπόμενων ακτίνων γ (γ κάμερα)
2. υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονιακής εκπομπής (SPECT-single photon emission tomography)

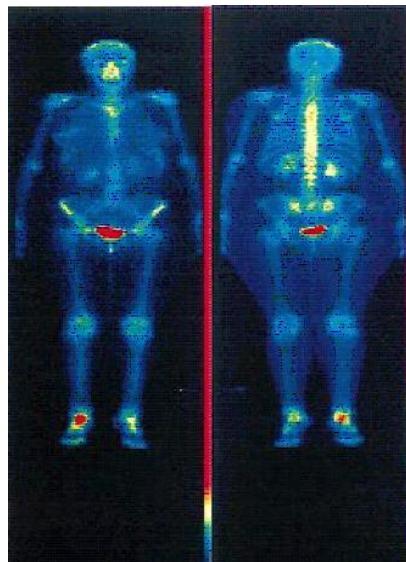
### 3. τομογραφία ποζιτρονίων (PET-Positron Emission Tomography).<sup>3</sup>

#### 3.1.1. SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

Στη μέθοδο προβολικής απεικόνισης με χρήση ραδιοϊσοτόπων ( $\gamma$  κάμερα) χρησιμοποιείται ραδιοϊσότοπο που εκπέμπει ακτίνες  $\gamma$ . Η μέθοδος βασίζεται σε μια  $\gamma$ -κάμερα, ένα σύστημα σπινθηριστή-φωτοπολλαπλασιαστή, για την λήψη προβολικής απεικόνισης της κατανομής των ραδιοϊσοτόπων.

Η υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονιακής εκπομπής (SPECT) βασίζεται στην ίδια βασική αρχή με την προβολική απεικόνιση. Ωστόσο, εδώ έχουμε λήψη πολλαπλών προβολών από διαφορετικές γωνίες. Με βάση αυτές, γίνεται με τη βοήθεια υπολογιστικού συστήματος η ανακατασκευή της τομογραφικής εικόνας. Η διακριτική ικανότητα είναι (σχετικά με άλλες απεικονιστικές μεθόδους) περιορισμένη (~10 mm), εξαιτίας του πεπερασμένου μεγέθους των φωτοπολλαπλασιαστών, της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και της μαθηματικής ανακατασκευής.

Το σημαντικότερο ραδιονουκλίδιο που χρησιμοποιείται σήμερα στη Πυρηνική Ιατρική για διαγνωστικούς σκοπούς μέσω απεικόνισης με SPECT είναι το  $^{99m}\text{Tc}$ . Ραδιοφάρμακα του  $^{99m}\text{Tc}$  χρησιμοποιούνται καθημερινά στην κλινική πρακτική για την διάγνωση παθήσεων του εγκεφάλου, μυοκαρδίου, πνευμόνων, θυρεοειδούς, ήπατος, νεφρών, οστών κτλ. (Εικόνα 3.1).<sup>4,5</sup>

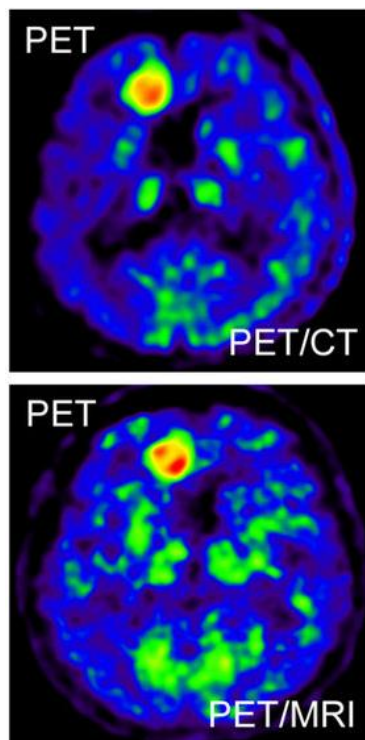


**Εικόνα 3.1.** Εικόνες SPECT ανθρώπινου σκελετού που ελήφθησαν με το ραδιοφάρμακο  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP

### 3.1.2. PET: Positron Emission Tomography

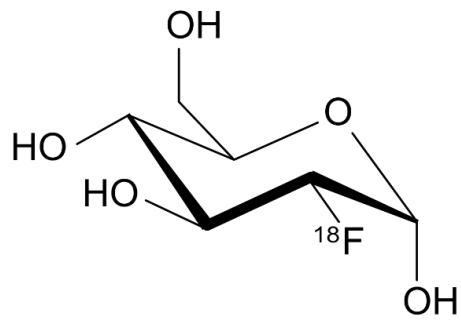
Το ραδιοϊσότοπο που χρησιμοποιείται στην τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET-Positron Emission Tomography) υπόκειται σε διάσπαση  $\beta^+$ , δηλαδή εκπέμπει ποζιτρόνια. Τα εκπεμπόμενα ποζιτρόνια αφού διανύσουν μια απόσταση, ενώνονται με ηλεκτρόνια και αλληλοεξουδετερώνονται (εξαϋλώνονται) εκπέμποντας δύο φωτόνια ενέργειας 511 keV σε αντίθετες κατευθύνσεις, δηλαδή δύο αντιδιαμετρικές  $\gamma$  ακτίνες οι οποίες ανιχνεύονται από το κατάλληλο σύστημα. Η PET είναι μια λειτουργική τεχνική απεικόνισης στην Πυρηνική Ιατρική, που ανιχνεύει αυτές τις αντιδιαμετρικές  $\gamma$  ακτίνες που παράγονται από ένα Ιχνηθέτη-Ραδιοϊσότοπο που εκπέμπει ποζιτρόνια, ο οποίος εισάγεται εντός του σώματος μέσω ενός βιολογικά δραστικού μορίου. Τρισδιάστατες εικόνες των λειτουργικών διαδικασιών στο σώμα κατασκευάζονται στη συνέχεια σε ένα ισχυρό υπολογιστή, με την υποστήριξη καταλλήλου λογισμικού.

Οι εικόνες που λαμβάνονται από το PET είναι προβολές ή και ανασυνθέσεις διαφόρων στρωμάτων ιστών και οργάνων, χαρακτηρίζονται από χαμηλή διακριτική ικανότητα (~5 mm), αλλά περιέχουν σημαντικές λειτουργικές πληροφορίες, δηλαδή, προσεγγίζουν την παθοφυσιολογία του ιστού ή του οργάνου. Ο συνδυασμός τους με τις πληροφορίες ενός CT ή/και ενός MRI, δημιουργούν μια σύνθετη σειρά υβριδικών εικόνων, με πληθώρα παθοφυσιολογικών και ανατομικών λεπτομερειών (Εικόνα 3.2).<sup>6</sup>



**Εικόνα 3.2.** Εικόνες PET/CT και PET/MRI ασθενούς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

Το βιολογικώς δραστικό μόριο που συνήθως επιλέγεται για απεικόνιση με PET είναι η 2-φθορο-2-δεσοξυγλυκόζη (FDG), ανάλογο της γλυκόζης, το οποίο επισημαίνεται με  $^{18}\text{F}$  (Σχήμα 3.1).<sup>7</sup>



**Σχήμα 3.1.** Δομή του  $^{18}\text{F}$ -FDG

## 4. Τα στοιχεία τεχνητίο και γάλλιο

### 4.1. Το τεχνητίο

Το τεχνητίο ( $Z=43$ ) (Εικόνα 4.1) μαζί με το μαγγάνιο και το ρήνιο απαρτίζουν την 7η ομάδα (VIIβ) του περιοδικού πίνακα. Ανήκει στη 5η περίοδο και στη δεύτερη σειρά των στοιχείων μετάπτωσης.<sup>8</sup> Έχει επτά ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα και η ηλεκτρονιακή του δομή είναι  $[Kr]4d^55s^2$ .<sup>8,9</sup> Η θέση του στον περιοδικό πίνακα είχε προβλεφθεί από το Mendeleev, ανάμεσα στο μολυβδαίνιο και το ρουθίνιο, αλλά παρέμενε κενή έως το 1937 όταν και έγινε η επίσημη ανακάλυψη του στοιχείου από τους C. Perrier και E. Segre.<sup>9,10</sup> Το 1947 οι ίδιοι πρότειναν την ονομασία τεχνητίο (technetium, με σύμβολο Tc) για το καινούριο αυτό στοιχείο, από την ελληνική λέξη «τεχνητός», επειδή ήταν το πρώτο στοιχείο που παρασκευάστηκε τεχνητά.<sup>10,11</sup>



**Εικόνα 4.1.** Το φυσικό τεχνητίο

Τα πρώτα μετασταθερά ραδιονουκλίδια ήταν τα  $^{95m}\text{Tc}$  και  $^{97m}\text{Tc}$ . Έκτοτε, παρασκευάστηκε μεγάλος αριθμός ισοτόπων του τεχνητίου.<sup>12</sup> Τα ραδιονουκλίδια με την μεγαλύτερη ημιπερίοδο ζωής είναι τα  $^{97}\text{Tc}$ ,  $^{98}\text{Tc}$  και  $^{99}\text{Tc}$ , τα οποία έχουν παραχθεί ήδη από το 1955 μετά από βομβαρδισμό του μολυβδαίνιου με πρωτόνια ενέργειας 22 MeV.<sup>13</sup> Σήμερα, το  $^{99}\text{Tc}$  προκύπτει ως υποπροϊόν της σχάσης ουρανίου στους πυρηνικούς αντιδραστήρες. Τα σημαντικότερα ραδιονουκλίδια του τεχνητίου είναι το μετασταθερό  $^{99m}\text{Tc}$ , λόγω της εκτεταμένης χρήσης του στη διάγνωση, και το ψευδοσταθερό  $^{99}\text{Tc}$ , το οποίο κατέστησε δυνατή τη μελέτη της χημείας του τεχνητίου.

#### 4.1.1. Το μετασταθερό $^{99m}\text{Tc}$

Η εκτεταμένη χρήση του μετασταθερού  $^{99m}\text{Tc}$  στην Πυρηνική Ιατρική ως διαγνωστικού παράγοντα οφείλεται στις πολύ καλές φυσικές του ιδιότητες, οι οποίες και συνοψίζονται παρακάτω:

- Η ακτινοβολία  $\gamma$ , ενέργειας 140 KeV που εκπέμπεται από το  $^{99m}\text{Tc}$ , διαπερνά ανεμπόδιστα τους ιστούς του σώματος και ανιχνεύεται από τις υπάρχουσες ανιχνευτικές διατάξεις ικανοποιητικά.

- Οι υψηλοί αριθμοί κρούσεων που προέρχονται από τη χορηγούμενη δόση ακτινοβολίας παρέχουν τη δυνατότητα εκτέλεσης μετρήσεων με μεγάλη ακρίβεια.

- Ο χρόνος υποδιπλασιασμού του  $^{99m}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6.02$  ώρες) θεωρείται ικανοποιητικός, τόσο για τις διάφορες χημικές συνθέσεις των ραδιοφαρμάκων που γίνονται με τη χρήση τυποποιημένων προσκευασμάτων τεχνητίου- $^{99m}\text{Tc}$  (kits), όσο και για την εφαρμογή σε πλήθος ιατρικών διαγνώσεων.

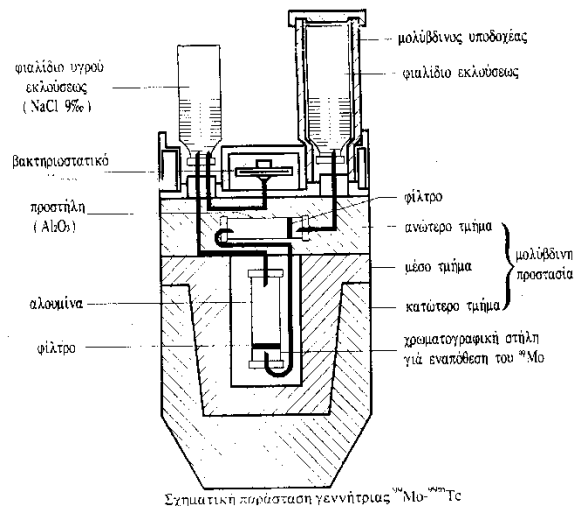
- Ο σχετικά βραχύς χρόνος υποδιπλασιασμού του  $^{99m}\text{Tc}$ , σε συνδυασμό με την έλλειψη ακτινοβολίας  $\beta^-$ , έχει ως αποτέλεσμα τη μικρή επιβάρυνση του ασθενούς με ακτινοβολία.<sup>14</sup>

- Το συγκριτικά μικρό κόστος παρασκευής, καθώς και η ικανότητα διάθεσής του σε μεγάλες αποστάσεις από τον τόπο παραγωγής με τις γεννήτριες  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ , το καθιστούν πολύ σημαντικό και ευέλικτο εργαλείο για την Πυρηνική Ιατρική.<sup>15,16</sup>

#### 4.1.2. Μέθοδος παραγωγής του $^{99m}\text{Tc}$

Οι γεννήτριες ραδιονουκλιδίων είναι διατάξεις που επιτρέπουν τον γρήγορο διαχωρισμό θυγατρικών ραδιονουκλιδίων από τα αντίστοιχα μητρικά με βάση διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Σε μία τέτοια διάταξη, το μητρικό ραδιονουκλίδιο έχει ημιπερίοδο ζωής μεγαλύτερη απ' ό,τι το θυγατρικό. Με αυτό τον τρόπο, είναι εφικτή η παραλαβή του θυγατρικού ραδιονουκλιδίου σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα (συνήθως κάθε 24 h) με μία απλή διαδικασία όπως η έκλουση μίας χρωματογραφικής στήλης και η περαιτέρω χρήση του στην κλινική πράξη.<sup>17</sup>

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παραγωγή του  $^{99m}\text{Tc}$  γίνεται με την γεννήτρια  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (Εικόνα 4.2). Η πρώτη γεννήτρια  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1950 από τους W. Tucker και M. Greene στο Brookhaven National Laboratory (BNL) των ΗΠΑ.<sup>18-20</sup> Μερικά χρόνια αργότερα, οι P. Harper και K. Lathrop χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά σε μελέτες στον άνθρωπο, το  $^{99m}\text{Tc}$  με τη μορφή των  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  και ουσιαστικά ήταν αυτοί που παρήγγειλαν την πρώτη γεννήτρια  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  από το BNL. Από το 1966 λόγω της ραγδαία αυξανόμενης ζήτησης ξεκίνησε η βιομηχανική παραγωγή γεννητριών  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ .



**Εικόνα 4.2. Γεννήτρια  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$**

Το  $^{99}\text{Mo}$  ( $t_{1/2}=66\text{h}$ ) αποτελεί το μητρικό ραδιονουκλίδιο του  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  μέσω  $\beta^-$  διάσπασης. Το  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6.02$  ώρες) διασπάται με εκπομπή  $\gamma$  ακτινοβολίας (140 KeV) προς το ψευδοσταθερό  $^{99}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 2.1 \cdot 10^5$  έτη). Αυτό στη συνέχεια υφίσταται μεταστοιχείωση προς το σταθερό ρουθίνιο ( $^{99}\text{Ru}$ ) με εκπομπή  $\beta^-$ . Το  $^{99}\text{Mo}$  παράγεται σε πυρηνικό αντιδραστήρα είτε με βομβαρδισμό φυσικού μολυβδαινίου ή εμπλουτισμένου  $^{98}\text{Mo}$  με “θερμά” νετρόνια ( $^{98}\text{Mo}(n, \gamma)^{99}\text{Mo}$ ) είτε από την σχάση φυσικού ουρανίου ή εμπλουτισμένου  $^{235}\text{U}$ . Οι σύγχρονες γεννήτριες παραγωγής  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  χρησιμοποιούν  $^{99}\text{Mo}$  το οποίο απομονώνεται από εμπλουτισμένο  $^{235}\text{U}$  πυρηνικού αντιδραστήρα με ειδική κατεργασία.

Στη γεννήτρια  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ , ο διαχωρισμός του θυγατρικού  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  από το μητρικό  $^{99}\text{Mo}$  γίνεται με χρωματογραφία στήλης. Πιο συγκεκριμένα, στην κορυφή μίας στήλης αλουμίνας ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) επιστοιβαδύεται  $^{99}\text{Mo}$  με την μορφή  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ . Καθώς το μητρικό  $^{99}\text{Mo}$  μεταπίπτει αυθόρμητα στο θυγατρικό  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , τα ιόντα  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$  μετατρέπονται σε  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ . Τα τελευταία είναι μονοανιονικά και επομένως έχουν μειωμένη ικανότητα συγκράτησης στην αλουμίνα σε σχέση με τα  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$  με αποτέλεσμα την εύκολη συλλογή τους μετά από έκλυση της στήλης με φυσιολογικό ορό. Μετά το τέλος κάθε έκλυσης, το  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  αρχίζει και πάλι να παράγεται από το μητρικό  $^{99}\text{Mo}$  μέσα στην στήλη ενώ την ίδια στιγμή διασπάται προς  $^{99}\text{Tc}$  εκπέμποντας  $\gamma$  ακτινοβολία. Η κατάσταση αυτή είναι γνωστή ως «μεταβατική ισορροπία» (“transient equilibrium”).<sup>21, 22</sup>

Η ειδική ραδιενέργεια του  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  είναι της τάξεως του  $10^6$  Ci/g. Η ειδική ραδιενέργεια ενός ραδιονουκλιδίου ορίζεται ως το πηλίκο της ραδιενέργειας προς τη μάζα του. Η συγκέντρωση  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  σε διάλυμα που προέρχεται από διάλυμα γεννήτριας είναι πολύ χαμηλή (της τάξης των nM), ενώ η ποσότητα του είναι της τάξης των νανογραμμαρίων. Για παράδειγμα, διάλυμα συγκέντρωσης 10 mCi/mL περιέχει  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  σε συγκέντρωση  $2 \times 10^{-8}$  M. Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη τη χρήση των

κλασικών αναλυτικών μεθόδων, όπως στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπία NMR, IR, UV-vis και κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες Χ για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$ .<sup>23-25</sup> Οι αναλυτικές μέθοδοι που συνήθως χρησιμοποιούνται σε επίπεδο  $^{99m}\text{Tc}$  είναι η χρωματογραφία και η ηλεκτροφόρηση. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται είναι μη ειδικές (ραδιοχημική καθαρότητα, απόδοση επισήμανσης) και δεν παρέχουν καμία πληροφορία για τη δομή των συμπλόκων. Οι γνώσεις τόσο για τη δομή, όσο και για την οξειδωτική βαθμίδα του τεχνητίου στις ενώσεις του, ακόμα και των αγνώστου δομής εγκεκριμένων ραδιοφαρμακευτικών σκευασμάτων που ήδη χρησιμοποιούνται, προέκυψαν με τη χρήση είτε του ψευδοσταθερού ισότοπου  $^{99}\text{Tc}$ , είτε του  $^{185/187}\text{Re}$ .<sup>26</sup>

#### 4.1.3. Η χημεία των ενώσεων του τεχνητίου

Στις ενώσεις του, το τεχνητίο, βρίσκεται στις οξειδωτικές βαθμίδες από (-I) έως (VII).<sup>27,28</sup> Στις βαθμίδες αυτές το μέταλλο παρουσιάζει αριθμούς συναρμογής από 4 έως 9. Ιδιαίτερα σταθερές οξειδωτικές βαθμίδες είναι η (VII) και η (IV). Γενικά ισχύει ότι ενώσεις στις οποίες το τεχνητίο βρίσκεται σε χαμηλές οξειδωτικές βαθμίδες (μικρότερες του IV) μπορούν να οξειδωθούν. Στις απλές ενώσεις όπως αλογονίδια, οξείδια ή σουλφίδια, το τεχνητίο βρίσκεται συνήθως στις οξειδωτικές βαθμίδες (VII) ή (IV), οι οποίες είναι και οι σταθερότερες. Σε όλες τις υπόλοιπες βαθμίδες απαιτείται ισχυρή σύμπλεξη με κατάλληλους περιφερειακούς υποκαταστάτες για τη σταθεροποίησή του. Στον Πίνακα 4.1 συνοψίζονται οι ισχυρές οξειδωτικές βαθμίδες του τεχνητίου και οι ανάλογοι πυρήνες των συμπλόκων.<sup>8,29,30</sup>

Όπως φαίνεται στον Πίνακα, το τεχνητίο στις υψηλότερες οξειδωτικές βαθμίδες (VII), (VI), (V) συνιστά τον πυρήνα του συμπλόκου, πάντοτε συνδεδεμένο με άτομα που είναι δότες ηλεκτρονίων, όπως άτομα οξυγόνου, αζώτου ή θείου, ενώ και οι περιφερειακοί υποκαταστάτες που σχηματίζουν σύμπλοκα με αυτούς τους πυρήνες είναι επίσης καλοί δότες ηλεκτρονίων. Τα άτομα αυτά βοηθούν στην εξουδετέρωση της έλλειψης ηλεκτρονιακής πυκνότητας του μετάλλου. Αντίθετα στις χαμηλότερες οξειδωτικές βαθμίδες όπου η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο μέταλλο είναι αυξημένη, είναι απαραίτητοι περιφερειακοί υποκαταστάτες που μπορούν να συμπεριφερθούν και σαν δέκτες ηλεκτρονιακού φορτίου μέσω του φαινομένου της π-οπισθοσύνδεσης, όπως οι φωσφίνες, τα ισοκυανίδια και τα καρβονύλια.<sup>30</sup>

Ως περιφερειακοί υποκαταστάτες του τεχνητίου έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο ανόργανα μονοδραστικά ιόντα, όσο και πολυδραστικές οργανικές ενώσεις οι οποίες διαθέτουν άτομα δότες σε κατάλληλη διάταξη.<sup>31</sup>



Παρακάτω περιγράφεται η χημεία των συμπλόκων του τεχνητίου στην οξειδωτική βαθμίδα I καθώς η παρούσα εργασία αναφέρεται σε σύμπλοκά της.

**Πίνακας 4.1.** Οξειδωτικές βαθμίδες του τεχνητίου στα αντίστοιχα σύμπλοκα

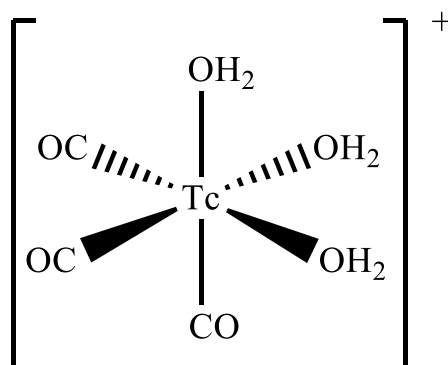
Οξειδωτική βαθμίδα	Πυρήνας των συμπλόκων
(VII)	$TcO_4^-$
(VI)	$TcN^{3+}$
(V)	$TcO^{3+}$ , $trans-TcO_2^+$ , $Tc_2O_3^{4+}$ , $TcN^{2+}$ , $TcS^{3+}$
(IV)	$Tc^{4+}$ , $TcO(OH)^+$ , $Tc(OH)_2^{2+}$
(III)	$Tc^{3+}$
(II)	$Tc^{2+}$
(I)	$Tc^+$ , $fac-[Tc(CO)_3]^+$
(0)	$Tc$ , $Tc_2$
(-I)	$Tc^-$

#### 4.1.4. Οξειδωτική βαθμίδα I

Το  $^{99m}Tc$  στην οξειδωτική βαθμίδα (I) ( $d^6$ ), σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με υποκαταστάτες οι οποίοι φέρουν ομάδες ικανές να σταθεροποιούν το μέταλλο με το φαινόμενο π-οπισθοσύνδεσης, όπως είναι οι φωσφίνες και τα ισοκυανίδια, καθώς και τα καρβονύλια.<sup>32-34</sup> Οι υποκαταστάτες που εμφανίζουν το φαινόμενο π-οπισθοσύνδεσης είναι περιορισμένοι και τα σύμπλοκα του  $^{99m}Tc(I)$  που είχαν μελετηθεί ήταν θετικά φορτισμένα μόρια.<sup>8,35</sup> Τα σύμπλοκα του Tc είναι κινητικά και θερμοδυναμικά σταθερά, όταν ο αριθμός συναρμογής του είναι έξι.

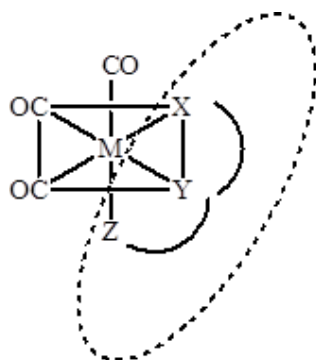
Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων πρόδρομων ενώσεων με εφαρμογή στη Ραδιοφαρμακευτική. Ο Prof. R. Alberto και οι συνεργάτες του, συνέθεσαν το σύμπλοκο με γενικό τύπο  $[NEt_4]_2[ReBr_3(CO)_3]$ , το οποίο περιέχει τον πυρήνα  $fac-[Re(CO)_3]^+$ . Ο όρος *facial* (*fac*) δηλώνει ότι τα τρία καρβονύλια βρίσκονται ανά δύο στο ίδιο επίπεδο. Επίσης, επιτεύχθηκε η σύνθεση, σε ένα στάδιο και υπό ατμοσφαιρική πίεση, του υδρόφιλου συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$  (Σχήμα 4.1) με μεγάλη απόδοση και υψηλή ραδιοχημική καθαρότητα, στο οποίο ο πυρήνας του μετάλλου έχει σταθεροποιηθεί στην επιθυμητή οξειδωτική βαθμίδα (I) από τρία καρβονύλια και τρεις ευκίνητους υποκαταστάτες ( $H_2O$ ). Τα τρία μόρια των καρβονυλίων συμπλέκονται με το μέταλλο και σταθεροποιούν τον πυρήνα του μετάλλου με π-οπισθοσύνδεση. Παρουσιάζουν ισχυρό *trans effect* και καθιστούν τα τρία μόρια που βρίσκονται σε θέσεις *trans* ως

προς αυτά, ευκίνητα. Τα μόρια του νερού υφίστανται έτσι εύκολα, αντιδράσεις αντικατάστασης από πληθώρα περιφερειακών υποκαταστατών.<sup>36,37</sup>



**Σχήμα 4.1.** Δομή του κατιονικού συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$

Οι περιφερειακοί υποκαταστάτες μπορεί να είναι μονοδραστικοί, διδραστικοί ή τριδραστικοί. Τριδραστικοί είναι οι υποκαταστάτες εκείνοι που έχουν ως δότες ηλεκτρονίων τρία άτομα με αποτέλεσμα να αντικαθιστούν και τα τρία μόρια νερού (Σχήμα 4.2), ενώ διδραστικοί είναι οι υποκαταστάτες εκείνοι που έχουν ως δότες ηλεκτρονίων δύο άτομα, με αποτέλεσμα να παραμένει στο σύμπλοκο ένα μόριο νερού ή το μόριο αυτό νερού να αντικαθίσταται από έναν άλλο μονοδραστικό υποκαταστάτη. Αντίστοιχα, μονοδραστικοί είναι οι υποκαταστάτες οι οποίοι έχουν ως δότη ηλεκτρονίων ένα άτομο. Χρησιμοποιώντας συνδυασμούς υποκαταστατών, μπορούν να προκύψουν μεικτά σύμπλοκα.



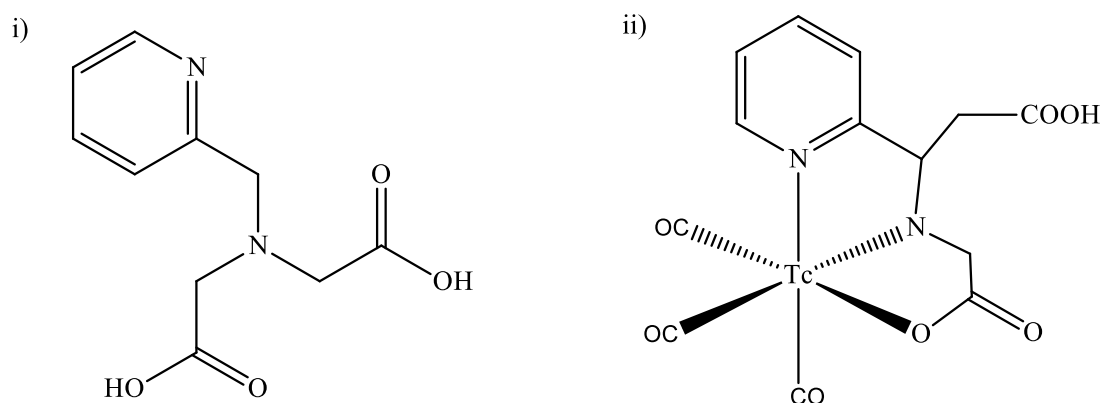
**Σχήμα 4.2.** Θέσεις σύμπλεξης τριδραστικών υποκαταστατών σε σύμπλοκα του τύπου  $fac-[M(XYZ)(CO)_3]$ , όπου  $M:Tc$

Η σύνθεση του συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$  πραγματοποιείται με απευθείας αναγωγή των  $^{99m}TcO_4^-$  με νατριοβοροϋδρίδιο ( $NaBH_4$ ) σε υδατικό διάλυμα, παρουσία μονοξειδίου του άνθρακα (CO), το οποίο φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγωγή. Η απόδοση

σχηματισμού του συμπλόκου είναι >95%. Επίσης χρησιμοποιείται σε kit το  $K_2[H_3BCO_2]$ , το οποίο απελευθερώνει μονοξειδίο του άνθρακα μέσω υδρόλυσης και ανάγει το Tc(VII) σε Tc(I).<sup>38</sup>

Ο Alberto και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν την αντίδραση του πρόδρομου συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$  με τον περιφερειακό υποκαταστάτη πικολιναμινο-N,N-διοξικό οξύ (PADA), η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ουδέτερου συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(PADA)(CO)_3]$  σε εξαιρετικά ικανοποιητική απόδοση. Δομικές μελέτες του συμπλόκου  $fac-[^{99}Tc(PADA)(CO)_3]$  έδειξαν ότι το PADA δρα ως τριδραστικός υποκαταστάτης, έχοντας ένα ελεύθερο καρβοξύλιο έξω από τη σφαίρα συναρμογής (Σχήμα 4.3). Το ελεύθερο αυτό καρβοξύλιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόσδεση βιομορίων στον υποκαταστάτη, γεγονός που χαρακτηρίζει τον υποκαταστάτη ως διλειτουργικό (bifunctional). Διλειτουργικοί (BCA: Bifunctional Chelating Agents) ονομάζονται οι υποκαταστάτες που από την μια μεριά σταθεροποιούν το μεταλλικό πυρήνα, ενώ παράλληλα δίνουν τη δυνατότητα πρόσδεσης ενός φαρμακοφόρου.<sup>39</sup>

Παρακάτω περιγράφεται ο τριδραστικός υποκαταστάτης S-αλκυλιωμένη L-κυστεΐνη (άτομα-δότες SNO), καθώς είναι το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.



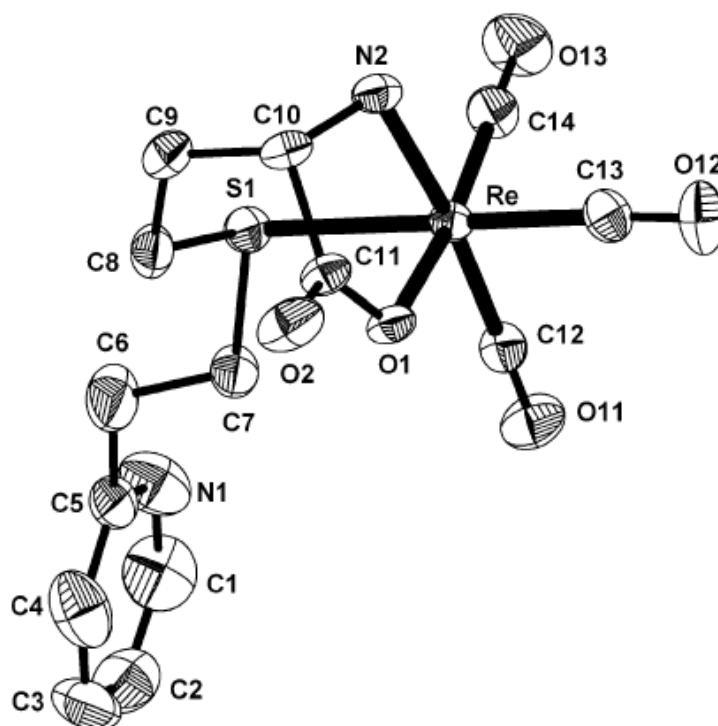
Σχήμα 4.3. Δομή (i) του PADA και (ii) του συμπλόκου  $^{99m}Tc$ -PADA

#### 4.1.5. Τριδραστικό σύστημα ατόμων δοτών- S-αλκυλιωμένη L-κυστεΐνη (SNO)

Μεταξύ των χηλικών παραγόντων που συναρμόζονται αποτελεσματικά με τον πυρήνα  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$ , οι τριδραστικοί υποκαταστάτες υπερτερούν, καθώς η επισήμανση τους είναι εφικτή σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως απαιτείται για τους παράγοντες που στοχεύουν έναν υποδοχέα, και επιπρόσθετα, λαμβάνονται σύμπλοκα υψηλής βιολογικής σταθερότητας. Σε προηγούμενες μελέτες, το picolylamine-diacetic acid (N-(carboxymethyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)glycine)<sup>40</sup> και η L-ιστιδίνη αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ενδιαφέροντες υποκαταστάτες. Το πρώτο μπορεί άμεσα να συζευχθεί με βιομόρια, αλλά τα προκύπτοντα σύμπλοκα είναι σχετικά λιπόφιλα. Η L-ιστιδίνη, από

την άλλη πλευρά, παρέχει ένα πιο υδρόφιλο σύμπλοκο, αλλά η επιλεκτική της λειτουργικότητα απαιτεί μια συνθετική διαδικασία πολλαπλών σταδίων.

Παρά τη διαθεσιμότητα της τριδραστικής L-ιστιδίνης, παραμένει πρόκληση η εισαγωγή χηλικών παραγόντων μικρότερου μεγέθους, με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και με μια ευέλικτη συνθετική διαδικασία. Η L-μεθειονίνη είναι ένας αρκετά καλός χηλικός παράγοντας και σχηματίζει έναν επταμελή, έναν εξαμελή και έναν πενταμελή χηλικό δακτύλιο κατά τη συναρμογή με  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ . Ωστόσο, η προσθήκη φαρμακοφόρου στο άζωτο (N-Cα) της μεθειονίνης θα απέδιδε τέσσερα διαστερεοϊσομερή μετά την συναρμογή με  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ . Η αντικατάσταση της μεθειονίνης από μια S-αλκυλιωμένη κυστεΐνη μειώνει αυτόν τον αριθμό σε δύο. Επιπλέον, η συναρμογή παρέχει εδώ δύο πενταμελείς και έναν εξαμελή δακτύλιο, συνεπώς, ένα θερμοδυναμικά πιο σταθερό σύμπλοκο. Κατά συνέπεια, επιλέγουμε στην παρούσα μελέτη τη διλειτουργική S-αλκυλιωμένη L-κυστεΐνη. Η S-αλκυλιωμένη L-κυστεΐνη αντιπροσωπεύει ένα μικρό τριδραστικό SNO υποκαταστάτη ανάλογης με την ιστιδίνη συναρμογής με το  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$ . Συνδέεται αποτελεσματικά με τον τρικαρβόνυλο πυρήνα μέσω του SNO συστήματος ατόμων-δοτών, που παρέχει σταθερά και ουδέτερα σύμπλοκα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.4.<sup>41,42</sup>



**Σχήμα 4.4.** Κρυσταλλική δομή του  $[Re(CO)_3(NSO)]$

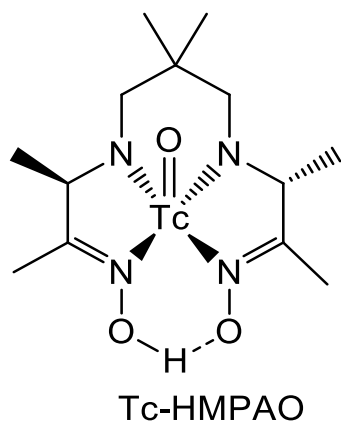
#### 4.1.6. Τα ραδιοφάρμακα του $^{99m}\text{Tc}$

Το μετασταθερό τεχνητίο-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) έμεινε ουσιαστικά αχρησιμοποίητο για μια εικοσαετία μετά την ανακάλυψή του το 1937, και μόνον αργότερα, όταν άρχισε να παρασκευάζεται και σε πυρηνικό αντιδραστήρα, αποδείχθηκε ένα από τα σπουδαιότερα ραδιονουκλίδια για την Πυρηνική Ιατρική, γιατί επιτρέπει την σύνθεση εξαιρετικά σημαντικών διαγνωστικών ραδιοφαρμάκων.

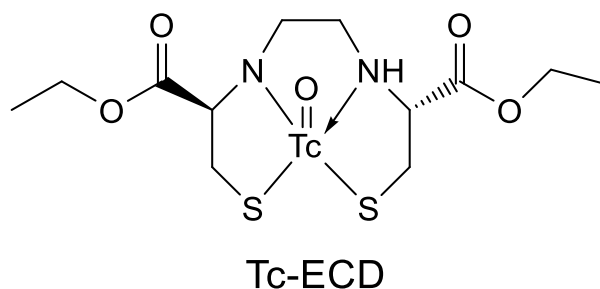
Κατά την δεκαετία του 1960, αρχίζει η χρήση ραδιοφαρμάκων του  $^{99m}\text{Tc}$ . Το 1964, γίνεται για πρώτη φορά, σπινθηρογράφηση του εγκεφάλου με  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ . Ακολουθεί στη συνέχεια, ταχύτατη ανάπτυξη σειράς ραδιοφαρμάκων του τεχνητίου-99m, από τα οποία τα περισσότερα διαμορφώνονται σε τυποποιημένες συσκευασίες, φαρμακευτική μορφή που διασφαλίζει την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της χορηγούμενης ενέσιμης δόσης, με την οποία χρησιμοποιούνται ως σήμερα. Ειδικότερα το 1971, χαρακτηρίζεται από την σημαντική ανακάλυψη συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$  με φωσφονικές ενώσεις, τα οποία δίνουν εξαιρετικά αποτελέσματα στη διάγνωση παθήσεων των οστών ( $^{99m}\text{Tc-MDP}$ ).<sup>43</sup>

Από το 1972 ως το 1978, η μελέτη συσχέτισης της δομής με τη βιολογική δράση συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$  με πυριδοξάλη, αμινοξέα καθώς και με παράγωγα της λιδοκαΐνης, κατέληξαν σε πολύτιμα ραδιοφάρμακα του τεχνητίου για το ηπατοχολικό σύστημα.<sup>44</sup> Η βασική έρευνα γύρω από το ραδιονουκλίδιο αυτό και τα ραδιοφάρμακά του προχωρεί με γοργό ρυθμό, με αποτέλεσμα η Ραδιοφαρμακευτική Χημεία του τεχνητίου να αρχίσει να ξεχωρίζει ως ιδιαίτερος κλάδος της Ραδιοφαρμακευτικής. Στον τομέα αυτό, η δεκαετία του 1980 χαρακτηρίζεται από την ανακάλυψη νέων συμπλόκων του τεχνητίου, για την μελέτη του εγκεφάλου, του μυοκαρδίου και των νεφρών, τα οποία αποτελούν πολύτιμο βοήθημα στην εξέλιξη της Πυρηνικής Ιατρικής.

Το [ $^{99m}\text{Tc-D,L-HMPAO}$ ] (Σχήμα 4.5) εγκρίθηκε κυρίως ως παράγοντας απεικόνισης της τοπικής αιματικής ροής του εγκεφάλου για την αξιολόγηση του εγκεφαλικού επεισοδίου, αλλά θεωρήθηκε επίσης χρήσιμο στην εκτίμηση άλλων εγκεφαλικών ασθενειών όπως τα αιματώματα ή η νόσος Αλτσχάμερ. Χρησιμοποιείται επίσης για την *in vitro* επισημάνση λευκών αιμοσφαιρίων. Από χημική άποψη, ο υποκαταστάτης [HMPAO] κατά τη συναρμογή με τον όξο- πυρήνα του τεχνητίου  $\text{TcO}^{3+}$  χάνει δύο πρωτόνια αμίνης και ένα πρωτόνιο οξίμης σχηματίζοντας ουδέτερο σύμπλοκο. Οι μελέτες βιοκατανομής δείχνουν ότι το [ $^{99m}\text{TcO-D,L-HMPAO}$ ] μετά την είσοδο του παραμένει στον εγκέφαλο λόγω της ιδιότητάς του να διασπάται ταχύτατα σε υδρόφιλο σύμπλοκο, το οποίο δεν μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η διάσπαση αυτή επιταχύνεται από την παρουσία γλουταθειόνης. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η διάσπαση είναι πολύ πιο αργή στο σύμπλοκο με τη meso μορφή [ $^{99m}\text{Tc-meso-HMPAO}$ ].<sup>45-48</sup>



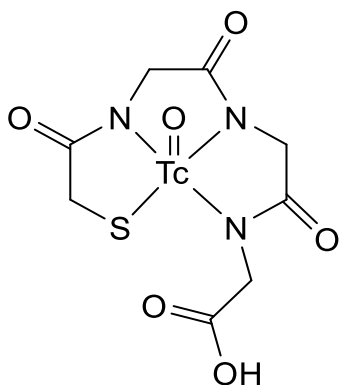
**Σχήμα 4.5.**  $^{99m}\text{Tc-D,L-HMPAO}$



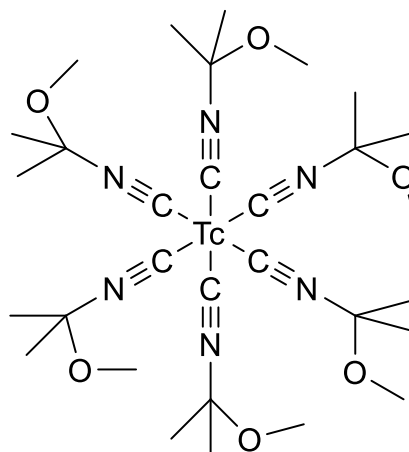
**Σχήμα 4.6.**  $^{99m}\text{Tc-L,L-ECD}$

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας για την απεικόνιση της τοπικής αιματικής ροής του εγκεφάλου είναι το [ $^{99m}\text{TcO-L,L-ECD}$ ], ένα ουδέτερο λιπόφιλο σύμπλοκο του Tc(V) (Σχήμα 4.6). Το ραδιοφάρμακο διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με ελεύθερη διάχυση και παγιδεύεται στον εγκέφαλο μετά από μία ενζυματική υδρόλυση του εστέρα, η οποία είναι στερεοειδική δεδομένου ότι μόνο το σύμπλοκο με το L, L εναντιομερές παγιδεύεται.<sup>49-51</sup>

Το [ $^{99m}\text{TcO-MAG}_3$ ] είναι ένα ραδιοφάρμακο που χρησιμοποιείται ως παράγοντας νεφρικής απεικόνισης (Σχήμα 4.7). Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση, παρακολουθείται η μετάβασή του μέσω του νεφρικού συστήματος για τη μελέτη της λειτουργίας των νεφρών. Αποβάλλεται ταχέως κυρίως με ενεργή σωληναριακή έκκριση και σε αντίθεση με άλλους ιχνηθέτες, δεν έχει προβλήματα με ισομερή, αφού δεν έχει χειρόμορφα κέντρα. Το [ $^{99m}\text{TcO-MAG}_3$ ] είναι ένα ανιονικό σύμπλοκο, καθώς κατά τη συναρμογή του  $\text{MAG}_3$  με τον όξο-πυρήνα του Tc(V), η θειόλη και τα τρία δευτεροταγή αμίδια αποπρωτονιώνονται. Το σύμπλοκο έχει δομή τετραγωνικής πυραμίδας με την όξο-ομάδα στην κορυφή της πυραμίδας και το άτομο Tc(V) πάνω από το επίπεδο που σχηματίζεται από το θείο και τα τρία άζωτα των αμιδίων. Το καρβοξύλιο δεν συντονίζεται με το μέταλλο και η ελεύθερη ομάδα καρβοξυλικού οξέος φαίνεται να είναι απαραίτητη για την νεφρική απέκκριση.<sup>52</sup>



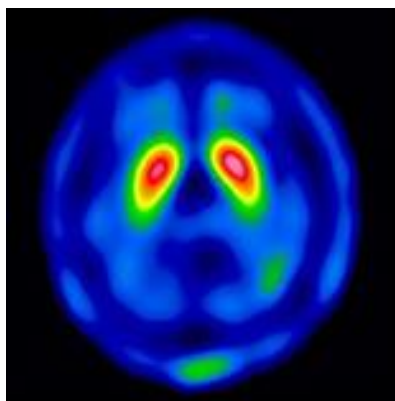
**Σχήμα 4.7.**  $^{99m}\text{TcO-MAG}_3$



**Σχήμα 4.8.**  $^{99m}\text{Tc-Sestamibi}$

Το  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi (Σχήμα 4.8) είναι ένα οκταεδρικό, κατιονικό σύμπλοκο του τεχνητίου (I), το οποίο αναπτύχθηκε ως παράγοντας απεικόνισης της αιμάτωσης του μυοκαρδίου για την αξιολόγηση της ακεραιότητάς του σε ασθενείς με υποψία εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η πρόσληψη του κατιονικού αυτού συμπλόκου, αν και αυτό σχεδιάστηκε αρχικά ως υπόστρωμα για την αντλία Na/K, αποδείχθηκε αργότερα ότι δεν σχετίζεται με αυτήν. Σήμερα, χρησιμοποιείται επίσης για την απεικόνιση όγκων που υπερεκφράζουν την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (Ρ-gr).<sup>53</sup>

Κατά τη δεκαετία του 2000, αναπτύχθηκαν τα ραδιοφάρμακα τρίτης γενεάς. Στόχος της κατηγορίας αυτής είναι τα ραδιοφάρμακα να λαμβάνουν μέρος σε βιοχημικούς μηχανισμούς ή σε εξειδικευμένες ενζυμικές αντιδράσεις.<sup>54-57</sup> Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο του  $^{99m}\text{Tc}$  με ένα περιφερειακό υποκαταστάτη της ομάδας των διαμινοδιθειολών, ο οποίος συνδέεται με δακτύλιο τροπανίου (TRODAT-1) και χρησιμοποιείται με επιτυχία για την *in vivo* εκτίμηση της απώλειας ντοπαμινεργικών νευρώνων κατά τη νόσο του Parkinson και άλλων νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Εικόνα 4.3).<sup>55,56</sup>



**Εικόνα 4.3.** Εικόνα παρκινσονικού εγκεφάλου με χρήση  $^{99m}\text{Tc-TRODAT-1}$

## 4.2. Το γάλλιο

Το γάλλιο ( $Z=31$ ) ανήκει στην ομάδα 13 (ομάδα του βορίου) του περιοδικού πίνακα, στην περίοδο 4 και στον τομέα p και η ηλεκτρονιακή του δομή είναι  $[\text{Ar}]^4s^23d^{10}4p^1$ .

Ιστορικά, ο Mendeleev το 1871, προέβλεψε ένα άγνωστο στοιχείο, το eka-αλουμίνιο, στον περιοδικό του πίνακα και πίστευε ότι θα ήταν ακριβώς κάτω από το αλουμίνιο με ατομική μάζα 68.<sup>58</sup> Τέσσερα χρόνια αργότερα, το 1875 ανακαλύφθηκε από τον Γάλλο χημικό Πολ-Εμίλ (Φρανσουά) Λεκόκ ντε Μπουαμποντράν το στοιχείο γάλλιο με φασματοσκοπική μελέτη και πήρε το όνομά του από την Gallia, παλιά λατινική ονομασία της Γαλλίας.<sup>59</sup> Στην ελληνική γλώσσα η ονομασία "Γάλλιον" όπως αποδόθηκε το "Γκάλιουμ", ή "Γκάλιαμ", αναφέρεται από το 1885 από τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου Αθηνών Αναστάσιο Δαμβέργη. Το γάλλιο δεν υπάρχει σε ελεύθερη μορφή στη φύση. Το μεγαλύτερο μέρος του μετάλλου παράγεται σήμερα ως παραπροϊόν κατά την επεξεργασία της αλουμίνας που προέρχεται από τον βωξίτη.

Το φυσικό γάλλιο ( $^{31}\text{Ga}$ ) αποτελείται από ένα μίγμα δύο σταθερών ισοτόπων: γάλλιο-69 ( $^{69}\text{Ga}$ ) και γάλλιο-71 ( $^{71}\text{Ga}$ ). Τα πιο σημαντικά ραδιοϊσότοπα είναι το γάλλιο-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ) και το γάλλιο-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ). Το  $^{67}\text{Ga}$  εκπέμπει ακτινοβολία  $\gamma$ , έχει χρόνο ημιζωής 78.26 ώρες και χρησιμοποιείται στην Πυρηνική Ιατρική για απεικόνιση με τομογραφία SPECT. Το βραχύβιο  $^{68}\text{Ga}$  έχει χρόνο ημιζωής 67.71 λεπτά, είναι ισότοπο που εκπέμπει ποζιτρόνια, παράγεται από το γερμάνιο-68 ( $^{68}\text{Ge}$ ) σε γεννήτρια ( $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ), για χρήση σε απεικόνιση με PET κάμερα και η έρευνα γύρω από αυτό είναι συνεχώς εξελισσόμενη τα τελευταία χρόνια.

### 4.2.1. Το $^{68}\text{Ga}$

Ο ρόλος του  $^{68}\text{Ga}$  στην ανάπτυξη, παγκοσμίως, της κλινικής έρευνας και της απεικόνισης με PET, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικός τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά του  $^{68}\text{Ga}$  που συνέβαλαν σε αυτή την πρόοδο, είναι τα εξής:

- Διασπάται κατά 89% με εκπομπή ποζιτρονίων και κατά 11% μέσω σύλληψης ηλεκτρονίου, με  $E_{\max}=1.92$  MeV.
- Ο χρόνος υποδιπλασιασμού του  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 67.71$  λεπτά) είναι συμβατός με τη φαρμακοκινητική των περισσότερων ραδιοφαρμακευτικών προϊόντων χαμηλού μοριακού βάρους, όπως θραύσματα αντισωμάτων, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και άλλα.
- Το συγκριτικά μικρό κόστος παρασκευής, καθώς και η ικανότητα διάθεσής του με τις γεννήτριες  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , το καθιστούν πολύ σημαντικό και ευέλικτο εργαλείο στην Πυρηνική Ιατρική.



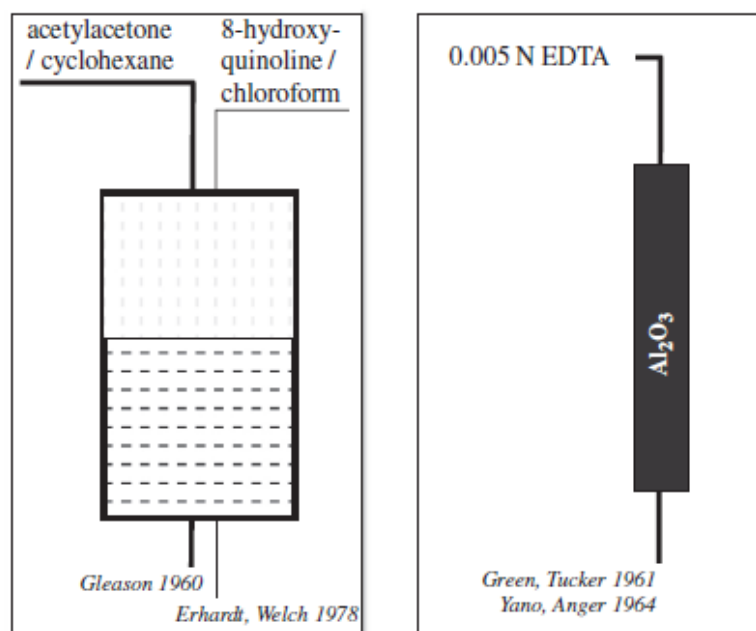
Το μητρικό ισότοπο  $^{68}\text{Ge}$  έχει πολύ μεγάλο χρόνο ημιζωής 271 ημερών που επιτρέπει την απρόσκοπτη παρασκευή και αποστολή του, ενώ οι χημικές ιδιότητες των Ge και Ga είναι αρκετά διαφορετικές, ώστε να επιτρέπουν διάφορες μεθόδους αποτελεσματικού διαχωρισμού.

- Η χρήση της γεννήτριας επιτρέπει την ανάπτυξη μιας σειράς ψυχρών, λυοφιλοποιημένων προσκευασμάτων (kits) που μπορούν να ανασυσταθούν και να επισημανθούν οποιαδήποτε στιγμή.<sup>60,61</sup>

#### 4.2.2. Μέθοδος παραγωγής του $^{68}\text{Ga}$

Το  $^{68}\text{Ga}$  παράγεται μέσω της γεννήτριας  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ . Το σχετικά μακρόβιο  $^{68}\text{Ge}$  ( $t_{1/2}= 270.95$  d) παράγει το βραχύβιο  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2}=67.71$  λεπτά), το οποίο στη συνέχεια μεταπίπτει στο σταθερό  $^{68}\text{Zn}$ .

Η πρώτη μέθοδος διαχωρισμού του Ga, δημιουργήθηκε από την Gleason το 1960 και βασίστηκε σε μια διαδικασία εκχύλισης. Η τεχνική αυτή παρουσίασε πληθώρα μειονεκτημάτων, μολονότι χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή συμπλόκων  $^{68}\text{Ga}$  σε αρκετές μελέτες.<sup>62</sup> Η χημεία εκχύλισης που εισήγαγε η Gleason αντικαταστάθηκε μετέπειτα από ένα σύστημα ανταλλαγής ιόντων (Greene and Tucker 1961<sup>63</sup>, Yano and Anger 1964<sup>64</sup>). Παρόλα αυτά, το 1978 περιγράφηκε μια βελτιωμένη έκδοση της μεθόδου εκχύλισης (Erhardt and Welch 1978<sup>65</sup>)(Σχήμα 4.9).



**Σχήμα 4.9.** Η πρόοδος στις γεννήτριες  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ : από την εκχύλιση στην ανταλλαγή ιόντων

Αυτές οι γεννήτριες προσέφεραν εξαιρετικά ραδιοχημικά χαρακτηριστικά. Χρησιμοποιώντας στήλη αλουμίνας και EDTA ως μέσον έκλουσης (10 mL, 0.005 M EDTA), το  $^{68}\text{Ga}$  εκλούστηκε με απόδοση 95% χωρίς να χρειάζεται εισαγωγή σταθερού  $\text{Ga(III)}$  ως φορέα. Κατά κάποιο τρόπο, αυτή η γεννήτρια ραδιονουκλιδίων ήταν βασικά μια μονάδα σύνθεσης ενός σχετικού ραδιοφαρμάκου, του  $^{68}\text{Ga-EDTA}$ . Όμως, στη μεγάλη επιτυχία του  $^{68}\text{Ga-EDTA}$  υπήρχε ένας προφανής περιορισμός των εφαρμογών, καθώς πρακτικά περιοριζόταν αποκλειστικά στη σύνθεση του  $^{68}\text{Ga-EDTA}$ . Η μεταφορά του  $^{68}\text{Ga}$  έξω από το συγκεκριμένο θερμοδυναμικά πολύ σταθερό ( $\log K = 21.7$ ) είδος έκλουσης δεν ήταν απλή.<sup>66,67</sup>

Πολλοί ερευνητές συμμετείχαν στην ανάπτυξη γεννητριών  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  με διάφορα στερεά υποστρώματα. Η πρόοδος στην ανάπτυξη των γεννητριών  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , όμως, ήταν αργή μετά τα τέλη της δεκαετίας του '70, λόγω (1) ανεπαρκούς σχεδιασμού των γεννητριών και (2) ταχείας ανάπτυξης νέων κατηγοριών ραδιοφαρμακευτικών προϊόντων απεικόνισης με σήμανση  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  και  $^{18}\text{F}$ .

Ταυτόχρονα, τη δεκαετία του 1970 και 1980 περιγράφηκε η χρήση ανόργανης στατικής φάσης καθώς και οργανικών ρητινών, που προσροφούν επιλεκτικά το  $^{68}\text{Ge}$  και αποδίδουν  $^{68}\text{Ga}$  με χαμηλής ή υψηλής συγκέντρωσης διάλυμα  $\text{HCl}$  (0.1-1.0 N). Στην πραγματικότητα, η πρόκληση ήταν να σχεδιαστούν συστήματα ραδιοχημικού διαχωρισμού που θα παρέχουν  $^{68}\text{Ga}$  με τη μορφή ιόντων  $^{68}\text{Ga}$ . Χάρη στο πρωτοποριακό επίτευγμα των ραδιοχημικών στο Obninsk της Ρωσίας, μια νέα γεννήτρια έγινε εμπορικά διαθέσιμη κατά τα πρώτα χρόνια του 21<sup>ου</sup> αιώνα. Η γεννήτρια εκλούεται με υδροχλωρικό οξύ και παρέχεται «κατιονικό»  $^{68}\text{Ga}$  αντί των «αδρανών» συμπλόκων  $^{68}\text{Ga}$ , ανοίγοντας νέα μονοπάτια στη χρήση του.<sup>61</sup>

Για τις τρέχουσες εμπορικά διαθέσιμες γεννήτριες, χρησιμοποιούνται δύο στρατηγικές. Στη πρώτη τεχνική, χρησιμοποιούνται οργανικές ρητίνες που σχηματίζουν πολύ σταθερά σύμπλοκα με το  $\text{Ge (IV)}$ , επιτρέποντας την έκλουση  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  ως  $^{68}\text{GaCl}_3$  με το  $\text{HCl}$  ως διάλυμα έκλουσης. Η δεύτερη στρατηγική χρησιμοποιεί στατική φάση ανόργανων οξειδίων, όπως  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{Sb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{ZrO}_2$ , και  $\text{TiO}_2$ , με διάλυμα έκλουσης  $\text{HCl}$  ή  $\text{EDTA}$ . Οι αποδόσεις έκλουσης  $^{68}\text{Ga}$  κυμαίνονται από 70% έως 80% για νέες γεννήτριες, με σταδιακή μείωση όσο περνάει ο χρόνος.

Οι εμπορικά διαθέσιμες «ιοντικές» γεννήτριες χρησιμοποιούν  $\text{HCl}$  σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για έκλουση  $^{68}\text{Ga}$  σε κατάλληλη μορφή για την επισήμανση. Ανεξάρτητα από το ποια γεννήτρια χρησιμοποιείται, πρέπει να ληφθεί υπόψη ο μεγάλος όγκος εκλούσματος, η κινητική, η αργή συμπλοκοποίηση και η παρουσία άλλων μετάλλων σαν υποπροϊόντα έκλουσης όπως  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$  και  $\text{Fe}^{3+}$  που μπορεί να δυσκολέψουν στην συνέχεια την επισήμανση με  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , καθώς ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τον ίδιο χηλικό υποκαταστάτη. Επομένως, μέθοδοι καθαρισμού μετά την έκλουση έχουν μελετηθεί λεπτομερώς. Επί του παρόντος, τα περισσότερα

προβλήματα έχουν επιλυθεί και επιπλέον οι γεννήτριες μπορούν να συνδεθούν με μηχανές σύνθεσης προς αυτοματοποίηση των διαδικασιών.<sup>61</sup>

#### 4.2.3. Η χημεία των ενώσεων του γαλλίου

Το γάλλιο βρίσκεται συνήθως στην οξειδωτική βαθμίδα +3 σε υδατικά διαλύματα, τα οποία λόγω του υψηλού θετικού φορτίου και της μικρής ιοντικής ακτίνας του, είναι αρκετά όξινα. Το τρισθενές  $\text{Ga}^{3+}$  είναι το σημαντικότερο για την υδατική χημεία του γαλλίου και σε διαλύματα βρίσκεται με τη μορφή οκταεδρικού ενυδατωμένου συμπλόκου με έξι μόρια νερού,  $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ , ως "σκληρό οξύ" κατά Pearson.<sup>68,69</sup> Συνδέεται εύκολα και ισχυρά με ισχυρές βάσεις κατά Lewis, ιδιαιτέρως με  $\text{OH}^-$ . Το  $\text{Ga}^{3+}$  αποτελεί μεταλλικό κέντρο με ισχυρή τάση για δημιουργία χηλικών ενώσεων με υποκαταστάτες που διαθέτουν δότες, άτομα οξυγόνου και αζώτου.

Η χημεία των ενώσεων του  $^{68}\text{Ga}$  είναι ένα διεπιστημονικό πεδίο. Περιλαμβάνει (1) την παραγωγή του  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , (2) τον σχεδιασμό υποκαταστατών με κατάλληλο θερμοδυναμικό και κινητικό προφίλ για τη δημιουργία  $\text{Ga}(\text{III})$  συμπλόκων, (3) την ανάπτυξη διλειτουργικών παραγώγων τους, (4) την ανάλογη σύνδεσή τους με το φαρμακοφόρο επιλογής, και τέλος, (5) τη χημεία επισήμανσης του  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ .

Τα ραδιοφάρμακα του  $^{68}\text{Ga}$  που χρησιμοποιούνται για απεικόνιση, αποτελούνται από ένα χηλικό παράγοντα που συναρμόζεται με το  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  συνδεδεμένο με βιομόρια που στοχεύουν σε ασθένειες. Ο ιδανικός χηλικός σε αυτή τη περίπτωση πρέπει να συναρμόζεται γρήγορα, ποσοτικά και σταθερά με το  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , σε θερμοκρασία δωματίου, κοντά σε ουδέτερο pH και με χαμηλή συγκέντρωση του χηλικού, επιτρέποντας εύκολη επισήμανση και υψηλή ειδική ραδιενέργεια.<sup>70</sup> Οι χηλικοί υποκαταστάτες που χρησιμοποιούνται είναι μακροκυκλικοί και μη μακροκυκλικοί και η δομή τους φαίνεται στον Πίνακα 4.2.

Από τους μη μακροκυκλικούς, το διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικό οξύ (DTPA) είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος χηλικός στη ραδιοχημεία με εφαρμογή σε πολλά ραδιοϊσότοπα όπως  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67/68}\text{Ga}$ ,  $^{44/47}\text{Sc}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{111}\text{In}$  σε ήπιες συνθήκες. Μελέτες με μεγάλο αριθμό διλειτουργικών παραγώγων του DTPA έχουν δείξει πως τα σύμπλοκά του με το  $^{68}\text{Ga}$  εμφανίζουν μικρή *in vivo* σταθερότητα, καθιστώντας τη χρήση τους λιγότερο συχνή τα τελευταία χρόνια.<sup>71</sup> Μεταξύ άλλων υποκαταστατών, η δεσφериοξαμίνη (DFO), ένας μη μακροκυκλικός χηλικός υποκαταστάτης γνωστός για τη χρήση του με το  $\text{Fe}(\text{III})$ , σχηματίζει πολύ σταθερά σύμπλοκα με το  $\text{Ga}(\text{III})$ .<sup>72</sup> Το 1,2-[[6-καρβοξυ-πυριδιν-2-υλ]-μεθυλαμινο]αιθάνιο ( $\text{H}_2\text{Dedpa}$ ), βασισμένο σε ένα σκελετό αιθυλενοδιαμίνης με 2 δακτυλίους πυριδίνης και μια καρβοξυλική ομάδα στον πυριδινικό

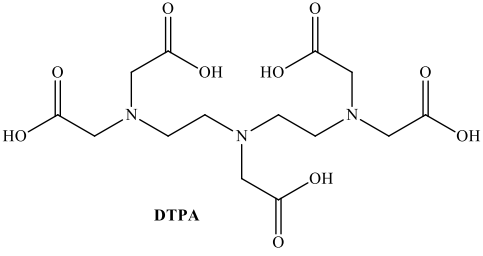
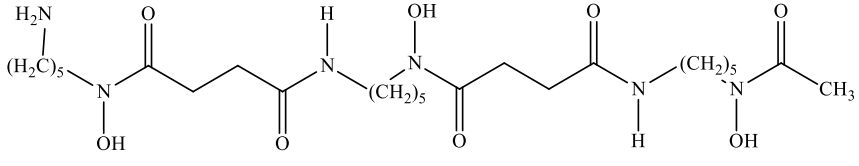
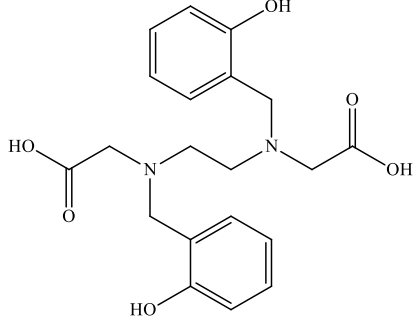
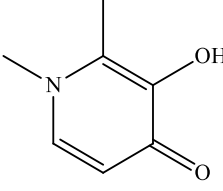
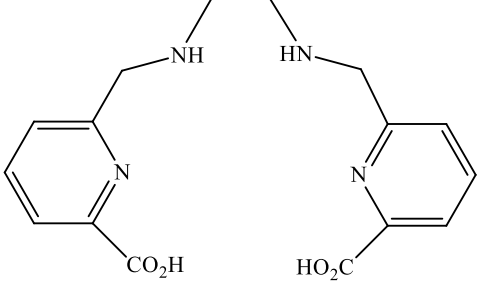
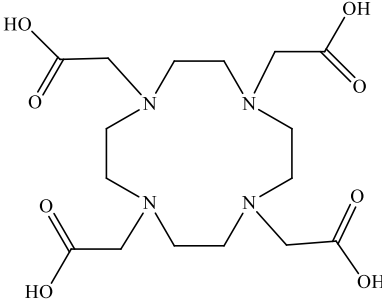
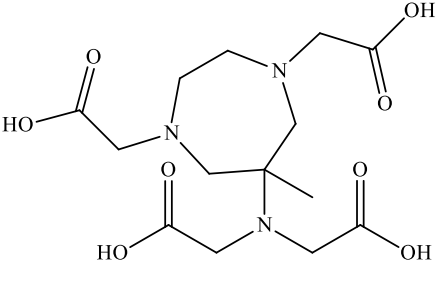
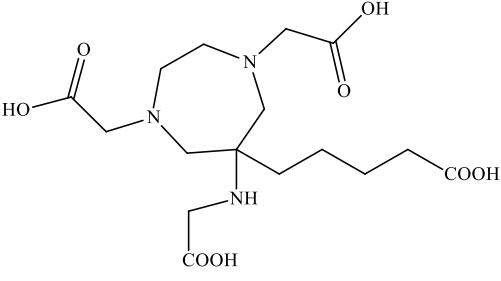
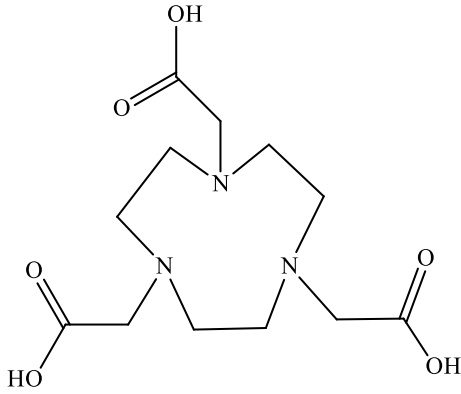
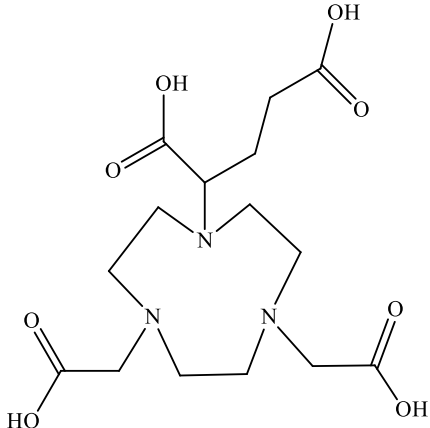
δακτύλιο, ικανοποιεί της χημικές απαιτήσεις συναρμογής με το Ga(III), όμως, τα *in vivo* πειράματα σταθερότητας των συμπλόκων με Ga(III) δεν παρουσιάζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.<sup>73-75</sup>

Ο χηλικός υποκαταστάτης N,N-δισ-(2-υδροξυβενζυλ)-αιθυλενοδιαμινο-N,N-διοξικό οξύ (HBED) βασίζεται στη δομή του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) με δύο επιπλέον φαινολικές πλευρές συναρμογής με το Ga<sup>3+</sup>, είναι γνωστός για τη γρήγορη και αποτελεσματική επισήμανση του σε θερμοκρασία δωματίου και την υψηλή *in vivo* σταθερότητα.<sup>76-78</sup> Τέλος, η 3-υδροξυ-πυριδιν-4-όνη (HPO) ή αλλιώς δεφεριπρόνη, είναι ένας διδραστικός χηλικός παράγοντας ο οποίος δεσμεύει το σίδηρο για χρήση στην αντιμετώπιση της υπερφόρτωσης σιδήρου. Αυτός ο τύπος υποκαταστάτη είναι αποτελεσματικός σε ουδέτερο pH και συναρμόζεται γρήγορα με το <sup>68</sup>Ga σε θερμοκρασία δωματίου, δίνοντας σταθερά σύμπλοκα στις ήπιες αυτές συνθήκες.<sup>79</sup>

Όσον αφορά τους μακροκυκλικούς χηλικούς υποκαταστάτες, το 1,4,7,10-τετρα-αζα-κυκλοδωδεκανο-N,N',N'',N''',τετραοξικό οξύ (DOTA) είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος χηλικός στην απεικόνιση με PET. Το [<sup>68</sup>Ga]-DOTA-TOC, είναι το μόνο εγκεκριμένο ραδιοφάρμακο του <sup>68</sup>Ga και είναι αδειοδοτημένο ως ορφανό φάρμακο. Ο υποκαταστάτης αυτός επισημαίνεται γρήγορα και αποτελεσματικά με το <sup>68</sup>Ga σε θερμοκρασία περίπου 95°C για 5 λεπτά, έχει μια μεγάλη ποικιλία παραγώγων για σύνδεση με το στόχο, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διλειτουργικός υποκαταστάτης χωρίς περαιτέρω τροποποιήσεις.<sup>80-82</sup> Ο χηλικός 6-αμινο-6-μεθυλοϋπερύδρο-1,4-διαζεπινο-τετραοξικό οξύ (AAZTA) αναπτύχθηκε το 2004, ως παράγοντας αντίθεσης για απεικόνιση με MRI για το γαδολίνιο, όμως, σύντομα ανακαλύφθηκε ότι σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το <sup>68</sup>Ga. Διλειτουργικά παράγωγά του έχουν εφαρμογή σε μελέτες απεικόνισης με PET μικρών ζώων. Ο υποκαταστάτης (6-πεντανοϊκό οξύ)-6-(αμινο)-μεθυλ-1,4-διαζεπινο-τριοξικό οξύ (DATA), παράγωγο του AAZTA, επισημαίνεται σε ήπιες συνθήκες σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα.<sup>83</sup>

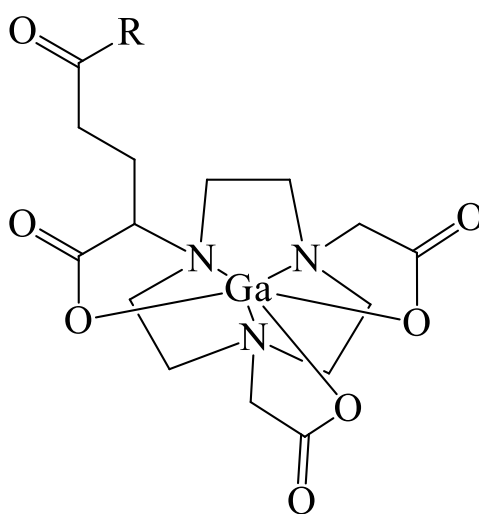
Ο υποκαταστάτης 2,2',2''-(1,4,7-τριαζακυκλονονανιο-1,4,7-τριυλ)τριοξικό οξύ (NOTA) είναι σήμερα ο «χρυσός κανόνας» για συναρμογή με το <sup>68</sup>Ga. Λόγω της δομής του, το γάλλιο ταιριάζει καλύτερα, σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα σε ήπιες συνθήκες (θερμοκρασία δωματίου) μέσα σε 15-20 λεπτά. Ο ευκολότερος τρόπος σύνδεσης του με το φαρμακοφόρο είναι η χρήση ενός ελεύθερου καρβοξυλικού οξέος, το οποίο συνδέεται με μια αμίνη με ένα παράγοντα σύζευξης, όπως HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate, Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium) και HATU (2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) ή με ενεργούς εστέρες.<sup>84</sup> Παράγωγο του χηλικού υποκαταστάτη NOTA είναι ο υποκαταστάτης 1,4,7-τριαζακυκλολονανιο-1-γλουταρικό οξύ-4,7-οξικό οξύ (NODAGA), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία.<sup>85</sup>

**Πίνακας 4.2. Δομές χηλικών συστημάτων <sup>68</sup>Ga**

 <p><b>DTPA</b></p>	 <p><b>DFO</b></p>	
 <p><b>HBED</b></p>	 <p><b>HPO</b></p>	 <p><b>DEDPA</b></p>
 <p><b>DOTA</b></p>	 <p><b>AAZTA</b></p>	 <p><b>DATA</b></p>
 <p><b>NOTA</b></p>	 <p><b>NODAGA</b></p>	

#### 4.2.4. NODAGA (1, 4, 7-τριαζακυκλολονάνιο-1-γλουταρικό οξύ-4, 7-οξικό οξύ)

Ο χηλικός παράγοντας NODAGA συντέθηκε για πρώτη φορά το 2002 και αποτελεί σήμερα έναν από τους πιο σημαντικούς χηλικούς διλειτουργικούς υποκαταστάτες για το  $^{68}\text{Ga}$ . Χρησιμοποιώντας το γλουταρικό οξύ ως σημείο σύζευξης αντί του οξικού οξέος, ο υποκαταστάτης παρουσιάζει δυο βασικά πλεονεκτήματα: η δομή του δεν καταστρέφεται όπως στη περίπτωση του άμεσα συζευγμένου NOTA και υπάρχει κάποιος χώρος μεταξύ του στόχου και του χηλικού. Η συναρμογή του λαμβάνει χώρα μέσω των 3 αζώτων (N) και των 3 καρβοξυλικών οξέων (COOH), ενώ η σύζευξη γίνεται με χρήση NHS- εστέρων, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.10.<sup>85-87</sup>



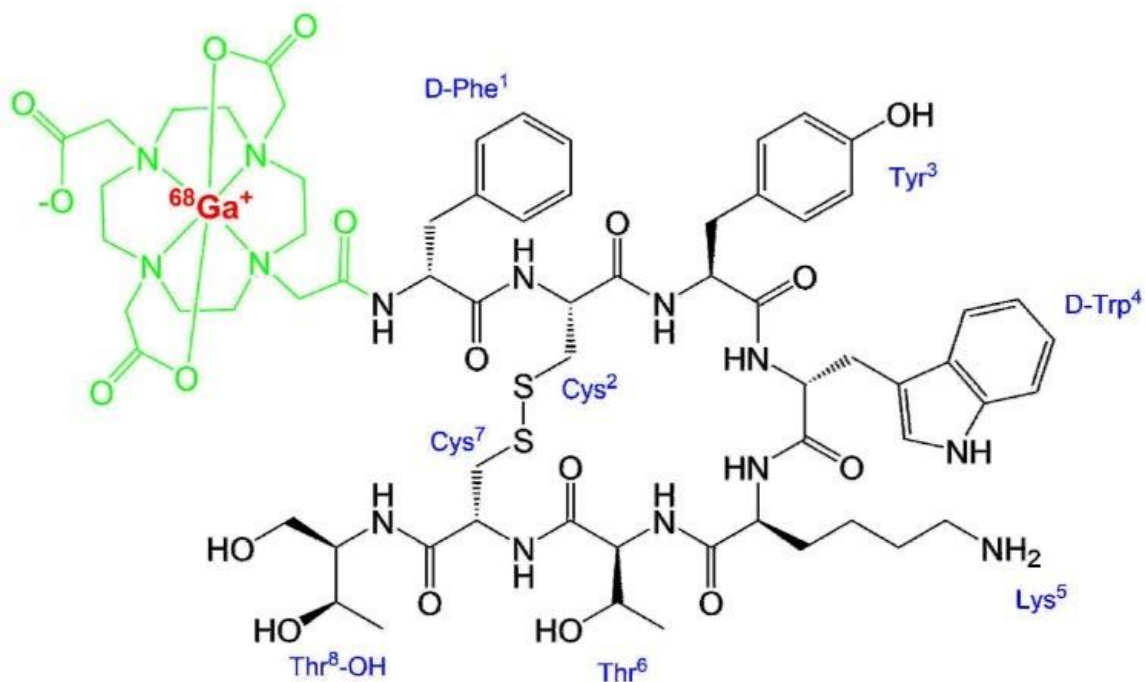
Σχήμα 4.10. Συναρμογή του NODAGA με το  $^{68}\text{Ga}$

#### 4.2.5. Τα ραδιοφάρμακα του $^{68}\text{Ga}$

Το  $^{68}\text{Ga}$  είναι ένα από τα πρώτα ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ποζιτρόνια, έχει εφαρμοστεί στην κλινική πράξη για απεικόνιση PET και η χρήση του χρονολογείται από τις αρχές της δεκαετίας του 1960 (Anger and Gottschalk, 1963). Λόγω της ταυτόχρονης προόδου στη τεχνολογία PET και στη ραδιοσυνθετική πρόσβαση επισημασμένων παραγόντων με  $^{68}\text{Ga}$  χρησιμοποιώντας τυπικές μεθόδους, άρχισε να εφαρμόζεται κλινικά αρχικά στις διεργασίες του κεντρικού νευρικού συστήματος (Anger and Gottschalk, 1963; Schaer et al., 1966).<sup>88,89</sup> Στα τέλη της δεκαετίας του 1970, ωστόσο, η απεικόνιση PET που βασίζεται στο  $^{68}\text{Ga}$  υποβαθμίστηκε από νέους παράγοντες απεικόνισης με SPECT και από τη χρήση του  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ως ραδιονουκλίδιο πρώτης επιλογής.

Στη συνέχεια, η ανάπτυξη των γεννητριών  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  που επέτρεψε την εύκολη έκλυση του κατιονικού  $^{68}\text{Ga}$  με αραιό οξύ, καθώς και ο αποτελεσματικός καθαρισμός του εκλούσματος, συνέβαλαν στην παραγωγή του  $[^{68}\text{Ga}]\text{-DOTA-TOC}$ , του πιο ευρέως χρησιμοποιούμενου

ραδιοφαρμάκου του  $^{68}\text{Ga}$  για απεικόνιση PET. Στις ΗΠΑ, το [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TOC εγκρίθηκε από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) το 2019 ως το πρώτο ραδιοφάρμακο του  $^{68}\text{Ga}$  που ενδείκνυται για την απεικόνιση της υπερέκφρασης των υποδοχέων σωματοστατίνης με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) σε ενήλικες ασθενείς με επιβεβαιωμένους ή εικαζόμενους καλώς διαφοροποιημένους γαστρο-εντερο-παγκρεατικούς ενδοκρινείς όγκους (GEP-NET), για τον εντοπισμό πρωτογενών όγκων και των μεταστάσεών τους.<sup>82</sup> Στην Ευρώπη, το [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TOC είχε ήδη εγκριθεί το 2016 ως ορφανό φάρμακο. Συνδυάζει το ραδιονουκλίδιο  $^{68}\text{Ga}$  με το ανάλογο σωματοστατίνης DOTA-TOC για συγκεκριμένη απεικόνιση των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν τους υποδοχείς SSTRs (Σχήμα 4.11).



**Σχήμα 4.11.** Δομή του [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTA-TOC

Έρευνες πραγματοποιούνται επίσης, για διάγνωση διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος του προστάτη, το ισουλίνωμα και οι οστικές μεταστάσεις. Επίσης, έχουν γίνει προσπάθειες για ραδιοφάρμακα για μη ογκολογικές εφαρμογές, όπως π.χ.  $^{68}\text{Ga}$ -citrate (το αντίστοιχο PET ραδιοφάρμακο του  $^{67}\text{Ga}$ -citrate) για τη διαφορική απεικόνιση φλεγμονής και λοίμωξης. Το  $^{67}\text{Ga}$ -citrate είναι εδώ και δεκαετίες γνωστό ραδιοφάρμακο διαφορικής απεικόνισης λοίμωξης/φλεγμονής. Μετά την ανάπτυξη γεννητριών για παραγωγή  $^{68}\text{Ga}$ , έγιναν προσπάθειες ανάπτυξης του παράγοντα  $^{68}\text{Ga}$ -citrate χωρίς πετυχημένα αποτελέσματα, καθώς οι περισσότερες από τις εικόνες που λαμβάνονταν με το  $^{67}\text{Ga}$ -citrate, λαμβάνονταν πέρα από το φυσικό χρόνο

ημιζωής του  $^{68}\text{Ga}$ . Ωστόσο, μετά την εφαρμογή του σε κλινικές δοκιμές σε διάφορα κέντρα, τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν πιθανό ρόλο για το  $^{68}\text{Ga}$ -citrate στη διάγνωση λοιμώξεων στα οστά.<sup>90</sup>

Η μεγαλύτερη ευαισθησία και άρα η καλύτερη ποιότητα εικόνας, ο μικρός χρόνος εξέτασης, η χαμηλή ακτινοβολήση και η δυνατότητα να μπορούν εύκολα με διαφορετικό ισότοπο π.χ.  $^{90}\text{Y}$  ή  $^{177}\text{Lu}$ , να χρησιμοποιηθούν για θεραπεία (theranostics, θεραπευοδιαγνωστική) καθιστούν τα ραδιοφάρμακα του  $^{68}\text{Ga}$  σε σχέση με τα αντίστοιχα του  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ή άλλων ραδιονουκλιδίων, πολύ ελπιδοφόρα για χρήση στη κλινική πράξη.

#### **4.3. Προσκεύασμα ραδιοφαρμάκου (kit)**

Η έρευνα για την παρασκευή προσκευασμάτων ραδιοφαρμάκου (kit) ξεκίνησε μετά την εισαγωγή στη κλινική πρακτική ραδιονουκλιδίων με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής που παράγονται από τις γεννήτριες, και, συγκεκριμένα, το τεχνητίο-99m. Τα ραδιοφάρμακα του τεχνητίου-99m, γενικά, παρασκευάζονται από kit σε εγκεκριμένες εγκαταστάσεις παραγωγής. Ένα kit περιέχει το πρόσδεμα στο οποίο πρόκειται να προστεθεί το  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , επαρκή ποσότητα αναγωγικού παράγοντα, ρυθμιστικό για ρύθμιση του pH ώστε να ταιριάζει με τις συνθήκες επισήμανσης, σταθεροποιητικούς παράγοντες και έκδοχα. Τα kit παρασκευάζονται σε λυοφιλοποιημένη μορφή και έχουν μακρά διάρκεια ζωής, που κυμαίνεται από αρκετούς μήνες έως χρόνια. Επίσης, μπορούν να μεταφερθούν σε θερμοκρασία δωματίου.

Γενικά, προσσκεύασμα ραδιοφαρμάκου είναι ένα φιαλίδιο που περιέχει όλα τα μη ραδιενεργά συστατικά ενός ραδιοφαρμακευτικού παρασκευάσματος, συνήθως με τη μορφή αποστειρωμένου, λυοφιλοποιημένου προϊόντος στο οποίο μπορεί να προστεθεί το κατάλληλο ραδιονουκλίδιο πριν από την ιατρική χρήση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το kit είναι φιαλίδιο πολλαπλών δόσεων και η παραγωγή του ραδιοφαρμακευτικού παρασκευάσματος μπορεί να απαιτεί πρόσθετα στάδια όπως βρασμός, θέρμανση, διήθηση. Τα ραδιοφαρμακευτικά παρασκευάσματα που προέρχονται από kit προορίζονται κανονικά για χρήση εντός ωρών από την παρασκευή τους.

Το ιδανικό προσσκεύασμα είναι αυτό από το οποίο προκύπτει το ραδιοφάρμακο με μια απλή διαδικασία (κατά προτίμηση ενός σταδίου), έχει μακρά διάρκεια ζωής και η επισήμανση του πραγματοποιείται σε υψηλή απόδοση. Κατά τη δημιουργία του, πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη η ρύθμιση του pH, ο όγκος, η συγκέντρωση, η *in vivo* και *in vitro* σταθερότητα καθώς και η αποστείρωση του τελικού προϊόντος.<sup>91</sup>



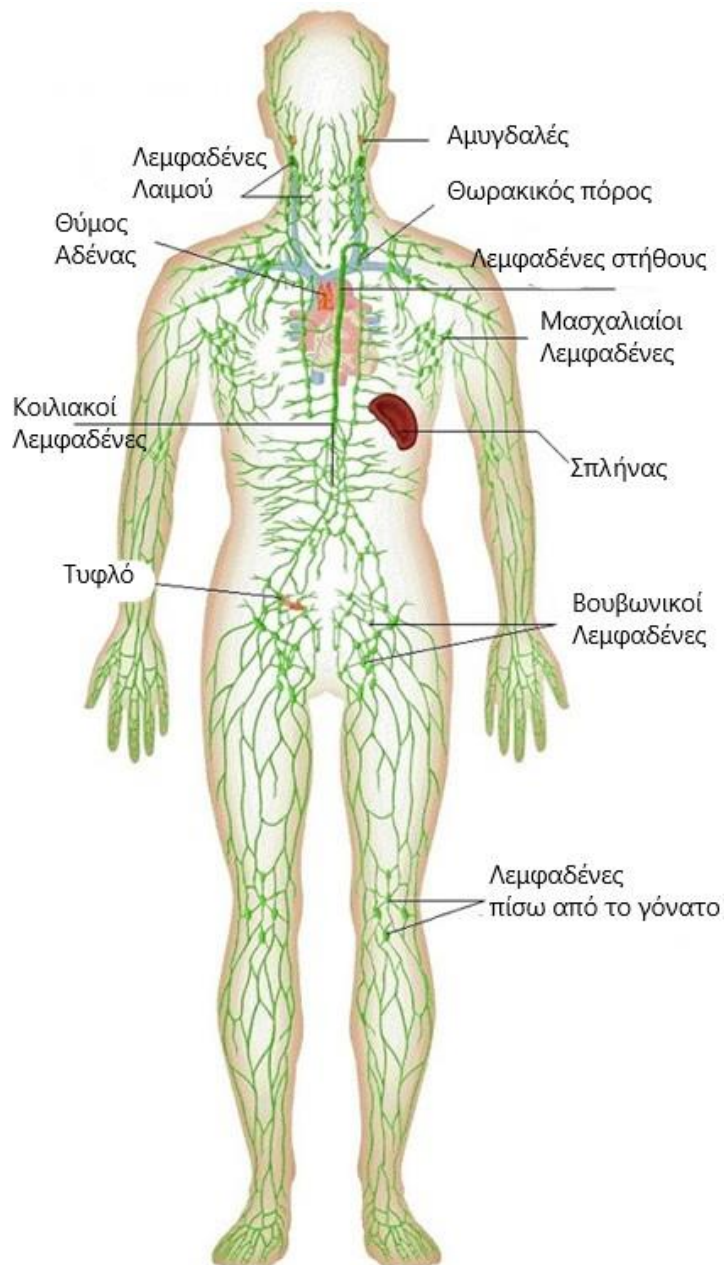
## **5. Εντοπισμός του φρουρού λεμφαδένα (SLND: Sentinel Lymph Node Detection)**

Θέμα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για την Ογκολογία και την Πυρηνική Ιατρική είναι ο εντοπισμός του φρουρού λεμφαδένα, του πρώτου λεμφαδένα που θα λάβει λέμφο καθώς και μεταστατικά κύτταρα από την πρωτογενή θέση του όγκου. Η μεταστατική πορεία ορισμένων μορφών καρκίνου συνήθως διέρχεται πρώτα από τους κοντινούς λεμφαδένες και η πιθανότητα εύρεσης μεταστάσεων σε απομακρυσμένους λεμφαδένες είναι πολύ μικρή όταν ο φρουρός λεμφαδένας δεν έχει στοιχεία μετάστασης. Συνεπώς, η βιοψία του σταδιακά αντικαθιστά την εκτεταμένη αφαίρεση των λεμφαδένων σε ασθενείς με καρκίνο, προσφέροντας ακριβέστερη διάγνωση και μειώνοντας την άσκοπη αφαίρεση των υγιών λεμφαδένων.

### **5.1. Το λεμφικό σύστημα**

Το λεμφικό σύστημα είναι μέρος του κυκλοφορικού συστήματος. Είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ισορροπίας στο διάμεσο υγρό, για την πρόσληψη του διατροφικού λίπους και για την άμυνα του σώματος κατά την εισβολή παραγόντων που προκαλούν ασθένειες. Το λεμφικό δίκτυο ξεκινά καθώς λεμφικά τριχοειδή ενώνονται για να σχηματίσουν λεμφικά αγγεία, τα οποία με τη σειρά τους συγκλίνουν για να σχηματίσουν αρτηρίες που τελικά καταλήγουν στη ροή του αίματος μέσω του δεξιού λεμφικού πόρου. Οι λεμφαδένες βρίσκονται κατά μήκος του λεμφικού δικτύου, ιδιαίτερα εκεί όπου τα λεμφικά αγγεία συγχωνεύονται σχηματίζοντας αρτηρίες (Εικόνα 5.1).

Στη σύγχρονη ιατρική, το λεμφικό σύστημα αποτελεί βασικό σημείο έρευνας της ογκολογίας, καθώς λειτουργεί με δύο αντίθετους τρόπους στον καρκίνο: αφενός ως άμυνα κατά των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων και, αφετέρου, ως μια οδός για μετάσταση και μια θέση ανάπτυξης όγκων όταν αποτυγχάνει ο αμυντικός μηχανισμός. Ο σημαντικός αντίκτυπος της λεμφικής διάδοσης στη σταδιοποίηση, τη θεραπεία και την έκβαση των καρκίνων έχει δώσει ώθηση σε έρευνες που στοχεύουν στην απόκτηση περισσότερης γνώσης σχετικά με το λεμφικό σύστημα.<sup>92</sup>



**Εικόνα 5.1.** Το λεμφικό σύστημα

## 5.2. Η λειτουργία των λεμφαδένων

Οι λεμφαδένες μπορεί να ποικίλουν σε μέγεθος και σχήμα, ενώ αποτελούνται από πολλαπλούς λεμφοειδείς λοβούς. Οι μικρότεροι λεμφαδένες μπορεί να περιέχουν πολύ λίγους λοβούς, ενώ οι μεγαλύτεροι μπορεί να περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό τέτοιων δομών. Περιέχουν μεγάλο αριθμό Β και Τ λεμφοκυττάρων και μακροφάγων και έχουν δύο βασικές λειτουργίες: Αποτρέπουν την εξάπλωση μικροοργανισμών και τοξινών που εισέρχονται στο διάμεσο υγρό, φιλτράροντας τα δυνητικά επιβλαβή σωματίδια από τη λέμφο πριν επιστρέψουν στην κυκλοφορία

του αίματος. Επιπλέον, καταστρέφουν βακτήρια, τοξίνες και σωματιδιακή ύλη μέσω της φαγοκυτταρικής δράσης των μακροφάγων.

Στη λειτουργία του φιλτραρίσματος σωματιδίων, οι λεμφαδένες φαίνεται να παρέχουν δύο βασικούς τύπους: ο πρώτος είναι μια απλή μηχανική διέλευση μέσω του πλέγματος των δικτυοκυττάρων και ο δεύτερος περιλαμβάνει μια βιολογική αντίδραση με τα φαγοκυτταρικά στοιχεία. Οι υποδοχείς στα φαγοκύτταρα και τα δικτυοκύτταρα είναι σε θέση να αναγνωρίσουν ξένα σωματίδια, είτε από τη φύση της επιφάνειας των σωματιδίων είτε από προσροφημένες στην επιφάνεια τους οψωνίνες, διαλυτά μόρια που παράγονται ως τμήματα των αμυντικών μηχανισμών του σώματος και προάγουν τη φαγοκυττάρωση των βακτηρίων. Η αφαίρεση των σωματιδίων από τη λέμφο βασίζεται σε μια ενεργή, κορεσμένη διαδικασία φαγοκυττάρωσης.

Στον λεμφαδένα, η φαγοκυττάρωση είναι η κύρια διαδικασία των μακροφάγων, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή φαγοκυτταρική ικανότητα και αποτελεσματικότητα στην εγκόλπωση σωματιδίων. Αυτή η ιδιότητα μπορεί πιθανώς να αποδοθεί στην παρουσία μιας σειράς αποκλειστικών φαγοκυτταρικών υποδοχέων που αυξάνουν το εύρος των σωματιδίων και τον φαγοκυτταρικό ρυθμό. Πρέπει να επισημανθεί ότι ο ρόλος των μακροφάγων δεν είναι μόνο η καταστροφή βακτηρίων, ιών, ανόργανων ξένων σωματιδίων και κυτταρικών υπολειμμάτων. Μερικά από αυτά διευκολύνουν, επίσης, τη διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας, ενεργώντας ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Η φαγοκυττάρωση συμβαίνει μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού. Παρά την πολυπλοκότητα που σχετίζεται με διάφορους φαγοκυτταρικούς μηχανισμούς, συνοπτικά πραγματοποιείται αλληλεπίδραση ειδικών υποδοχέων στην επιφάνεια του φαγοκυττάρου με μερικούς συνδέτες στην επιφάνεια των σωματιδίων. Στη συνέχεια, σχηματίζεται μια μεμβράνη γύρω από την ξένη ύλη και η ξένη ύλη αφομοιώνεται. Τέλος, τα μη εύπεπτα υπολείμματα αποβάλλονται από το κύτταρο με εξωκυττάρωση.

Η εγκόλπωση μικροοργανισμών που εισβάλλουν, ξένων σωματιδίων και αποπτωτικών σωματιδίων ξεκινά με τη δέσμευση εξειδικευμένων υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων, οι οποίοι μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ πολλών βακτηριακών συστατικών όπως βακτηριακοί υδατάνθρακες (υποδοχέας μαννόζης, υποδοχέας γλυκάνης) και βακτηριακά λιπίδια (υποδοχείς λιποπολυσακχαριτών), καθώς και άλλες δομές όπως οι υποδοχείς σαρωτή (scavenger receptors), που είναι ικανοί να δεσμεύσουν ποικίλα ενδογενή και ξένα μόρια. Επιπροσθέτως, τα μακροφάγα έχουν μόρια στην επιφάνεια τους γνωστά ως υποδοχείς Fc, τα οποία είναι ικανά να συνδέουν την ανοσοσφαιρίνη G μέσω της περιοχής Fc της σε παθογόνα.<sup>93</sup>

Ο υποδοχέας μαννόζης στα μακροφάγα αναγνωρίζει τη μαννόζη και τη φουκόζη στις επιφάνειες των παθογόνων και μεσολαβεί στη φαγοκυττάρωση των οργανισμών. Οι υποδοχείς

μαννόζης συνδέουν γλυκάνες πλούσιες σε μαννόζη. Αυτές οι γλυκάνες είναι βραχείες αλυσίδες υδατανθράκων με το σάκχαρο μαννόζη ή φρουκτόζη ως τελικό σάκχαρο και βρίσκονται συχνά ως δομικά συστατικά στις μικροβιακές γλυκοπρωτεΐνες και στα γλυκολιπίδια, αλλά βρίσκονται σπάνια στις γλυκοπρωτεΐνες του ανθρώπου. Αντίθετα, οι ανθρώπινες γλυκοπρωτεΐνες και τα γλυκολιπίδια έχουν ως τελικά σάκχαρα N-ακετυλογλυκοζαμίνη και ομάδες σιαλικού οξέος. Οι λεκτίνες τύπου-C που βρίσκονται στην επιφάνεια των φαγοκυττάρων είναι υποδοχείς μαννόζης. Λεκτίνες τύπου C είναι πρωτεϊνικές ακολουθίες που συνδέουν υδατάνθρακες (σάκχαρα) και για τη σύνδεση αυτή απαιτούν ασβέστιο (calcium, "C"), εξ ου και το γράμμα C στην ονομασία τους.<sup>94</sup>

Τα τελευταία χρόνια, ειδικά συστήματα φαρμάκων που στοχεύουν τα μακροφάγα έχουν κερδίσει μεγάλη προσοχή, επειδή τα μακροφάγα δρουν ως ένα φυσικό καταφύγιο για πολλούς παθολόγους μικροοργανισμούς. Ως εκ τούτου, αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν διερευνήσει το σύστημα πρόσληψης γλυκοπρωτεϊνών σε υδατάνθρακες των μακροφάγων για συγκεκριμένη στόχευση αυτών από συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Μεταξύ διαφορετικών φορέων, τα λιποσώματα έχουν διερευνηθεί εκτενώς ως συστήματα μεταφοράς για στοχευμένες με φαγοκύτταρα θεραπείες λόγω των πλεονεκτημάτων τους, που περιλαμβάνουν χαμηλή ανοσογονικότητα, βιοσυμβατότητα, εκλεκτικότητα κυττάρων και προστασία του μεταφερόμενου φαρμάκου.

### **5.3. Η λεμφαγγειογραφία (Lymphoscintigraphy)**

Η έγκαιρη ανίχνευση της μεταστατικής εμπλοκής των λεμφαδένων είναι μια από τις μεγαλύτερες δυσκολίες που αντιμετωπίζει η ιατρική σήμερα. Το λεμφικό σύστημα περιλαμβάνει ένα πολύπλοκο δίκτυο αγγείων και αδένων κατανομμένων σε όλο το ανθρώπινο σώμα, ενώ εμφανίζει μια αξιοσημείωτη ποικιλομορφία παρόμοια με άλλες ανατομικές δομές, όπως το αρτηριακό ή φλεβικό σύστημα. Ωστόσο, σε αντίθεση με την κυκλοφορία του αίματος, η λεμφική ροή είναι μονής κατεύθυνσης.

Η μελέτη του λεμφικού συστήματος ξεκίνησε από τον 3ο π.Χ. αιώνα, όταν ο Ιπποκράτης περιέγραψε τα λεμφαγγεία ως αγγεία που μεταφέρουν «λευκό αίμα». Το 1627, ο Aselli περιέγραψε «λευκά αγγεία» στο έντερο του σκύλου, τα οποία ονόμασε «γαλακτοφόρους φλέβες».<sup>95</sup> Στις αρχικές τεχνικές περιγραφής και απεικόνισης του λεμφικού συστήματος χρησιμοποιήθηκε η έγχυση υδραργύρου ή κυανού της Πρωσίας στα λεμφαγγεία (Gooperatne, 1974)<sup>96</sup> και το 1918, πρώτος ο Baum εκπόνησε τοπογραφική μελέτη των λεμφαδένων και των λεμφαγγείων στο σκύλο, δημιουργώντας ένα κλασικό σύγγραμμα ανατομικής του λεμφικού συστήματος.<sup>97</sup>

Η λεμφαγγειογραφία, δηλαδή η χαρτογράφηση των αγγείων και των λεμφαδένων, είναι μία από τις παλαιότερες μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιείται ραδιενεργός ιχνηθέτης. Ήδη από το 1953, οι Sherman και Ter-Pogossian περιέγραψαν την πρόσληψη ραδιενεργού χρυσού (Au-198), μετά από τοπική χορήγησή του. Αυτή η διαδικασία απεικόνισης της Πυρηνικής Ιατρικής παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργική κατάσταση του λεμφικού συστήματος (λεμφικά αγγεία και λεμφαδένες) και αρχικά, εισήχθη στην κλινική πράξη για τον εντοπισμό των αιτιών του περιφερικού οιδήματος ή για τον χαρακτηρισμό ασθενών με λεμφικές εκκρίσεις.<sup>98</sup>

Η λεμφαγγειογραφία μπορεί να αποκαλύψει ανωμαλίες στη πρόσληψη της λέμφου από τους λεμφαδένες, καθώς και να προβλέψει την ανταπόκριση στη θεραπεία. Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή της στην ογκολογία έχει εξελιχθεί τα τελευταία 50 χρόνια με την αναγνώριση της σχέσης μεταξύ των μεταστάσεων στους λεμφαδένες και την πρόγνωση διάφορων τύπων κακοήθων όγκων. Έτσι, μια πιθανή μετάσταση στους λεμφαδένες ως δευτερεύουσα σε έναν κακοήθη όγκο δεν είναι μόνο ένας προγνωστικός δείκτης, επειδή σηματοδοτεί την επέκταση της νόσου, αλλά θα μπορούσε επίσης να λειτουργήσει ως δεξαμενή καρκινικών κυττάρων, τα οποία, με τη σειρά τους, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγή σπλαχνικών μεταστάσεων.

Η λεμφαγγειογραφία δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού ορισμένων αλλοιώσεων στους λεμφαδένες, των οποίων ο προσδιορισμός επιτρέπει την εισαγωγή πιο επιθετικών προγραμμάτων θεραπείας, οδηγώντας σε καλύτερη επιβίωση του ασθενούς. Μπορεί να επαναληφθεί κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης του ασθενούς για αναζήτηση πρώιμης απόδειξης υποτροπής, με τις πιο πρόσφατες και ευρέως διαδεδομένες εφαρμογές της να αποτελούν τη βάση για ραδιοκατευθυνόμενη βιοψία του φρουρού λεμφαδένα (SLN) σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους.

Πολλοί όγκοι εξαπλώνουν τις μεταστάσεις τους σε περιφερειακούς λεμφαδένες, συμπεριλαμβανομένων του μελανώματος, του καρκίνου του μαστού, του στοματικού, γαστρεντερικού, γυναικολογικού και ουρογεννητικού καρκίνου. Η εμπλοκή αυτή είναι, σήμερα, ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας σε πολλούς κακοήθεις όγκους. Η σταδιοποίηση εξαρτάται από αυτήν την εμπλοκή και συνήθως συνεπάγεται σημαντικές αποφάσεις που σχετίζονται με την επικουρική θεραπεία. Διάφορες διαγνωστικές μέθοδοι απεικόνισης (αξονική τομογραφία, μαγνητική τομογραφία, υπερηχογράφημα κ.λπ.) έχουν εφαρμοστεί για να διαγνωστεί η εμπλοκή των λεμφαδένων, αλλά δεν ήταν αρκετά ακριβείς ώστε να αποφευχθούν οι επεμβατικές τεχνικές.<sup>99,100</sup>

Για παράδειγμα, η λεμφαδενεκτομή έχει γίνει ένα κλασικό διαγνωστικό εργαλείο στη σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού. Οι περιφερειακοί λεμφαδένες συλλέγονται και μελετώνται προς αναζήτηση μεταστάσεων. Μέχρι τη δεκαετία του 1990, η προφυλακτική λεμφαδενεκτομή χρησιμοποιήθηκε για τον καρκίνο του μαστού και το μελάνωμα. Αυτή η

προσέγγιση θέτει μεγάλο αριθμό ασθενών σε κίνδυνο επιπλοκών που σχετίζονται με αυτήν τη χειρουργική επέμβαση, συμπεριλαμβανομένου του λεμφοιδήματος και της λοίμωξης. Λόγω της σχετιζόμενης νοσηρότητας και ορισμένων σημαντικών περιορισμών, έχουν αναπτυχθεί πιο συντηρητικές μέθοδοι με σκοπό την αποφυγή της λεμφαδενεκτομής.<sup>101</sup>

#### **5.4. Ο φρουρός λεμφαδένας (Sentinel Lymph Node)**

Ο φρουρός λεμφαδένας αποτελεί τον πρώτο λεμφαδενικό σταθμό κατά τη διάρκεια της λεμφογενούς μεταστατικής διαδικασίας (Εικόνα 5.2). Δηλαδή, τα καρκινικά κύτταρα που εισέρχονται στη λεμφική κυκλοφορία από την ανατομική θέση του πρωτοεμφανιζόμενου καρκίνου ανευρίσκονται με ακρίβεια στον πρώτο σταθμό, τον φρουρό λεμφαδένα.

Η «προσέγγιση» του φρουρού λεμφαδένα επινοήθηκε το 1977 (R. Cabanas), όταν χρησιμοποιήθηκε η λεμφαγγειογραφία για να εξεταστούν ασθενείς με καρκίνο του πέους.<sup>102</sup> Για πολλά χρόνια, χρησιμοποιούνταν σε ασθενείς με μελάνωμα για να καθοδηγήσει τους χειρουργούς στον πιο πιθανό λεμφαδένα με μετάσταση, ειδικά όταν ο πρωτογενής όγκος βρισκόταν σε περιοχές με πολύ μεταβλητή λεμφική παροχέτευση .

Το 1992, έγινε αναφορά στη τρέχουσα έννοια της χαρτογράφησης SLN και της βιοψίας σε μια σειρά ασθενών με μελάνωμα. Περιγράφηκε μια ελάχιστα επεμβατική τεχνική που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της ακρίβειας στη διάγνωση των καρκίνων, μειώνοντας ταυτόχρονα τη νοσηρότητα.<sup>103</sup> Η βιοψία του φρουρού λεμφαδένα είναι σε θέση να παρέχει ακριβείς προγνωστικές πληροφορίες, να αποδείξει την αναγκαιότητα εκτέλεσης λεμφαδενεκτομής και να επιλέξει τους ασθενείς που χρειάζονται επικουρική θεραπεία.

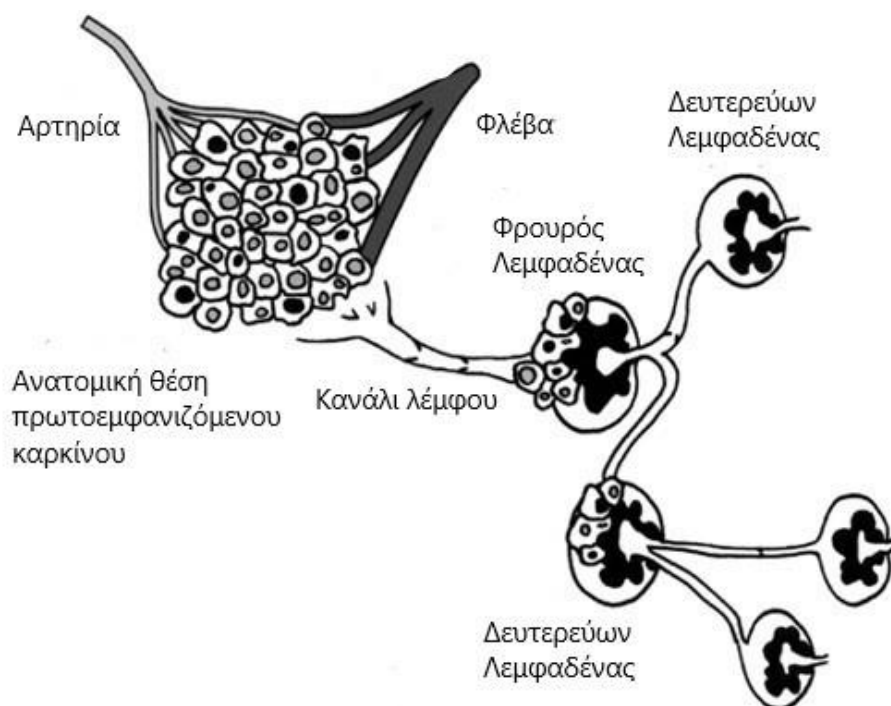
Η έννοια της βιοψίας SLN στη χειρουργική των όγκων σχετίζεται με τη θεωρία του Halsted, ότι κάθε συμπαγής όγκος αποστραγγίζεται με ομαλό τρόπο μέσω του λεμφικού συστήματος, από τον κατώτερο έως τον ανώτερο λεμφικό σταθμό.<sup>104</sup> Επομένως, ο φρουρός λεμφαδένας θα είναι ο πρώτος σταθμός που εμπλέκεται με πιθανή μετάσταση, ενώ ένα αρνητικό αποτέλεσμα αντιπροσωπεύει ότι είναι απίθανο να εμπλακούν άλλοι λεμφαδένες που βρίσκονται στην ίδια λεμφική οδό. Εάν, επιπρόσθετα, δεν παρατηρηθούν καρκινικά κύτταρα στο φρουρό λεμφαδένα, θα μπορούσε να αποφευχθεί η νοσηρότητα που σχετίζεται με την εκτομή τους. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε σε κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ή μελάνωμα, καθώς και σε ασθενείς με καρκίνο του πέους, του αιδοίου ή του στόματος.<sup>105,106</sup>

Ως εκ τούτου, η σαφής γνώση της φυσιολογίας του λεμφικού συστήματος βοηθάει στον εντοπισμό παραγόντων που επηρεάζουν το μηχανισμό διάχυσης και πρόσληψης των ραδιενεργών

ιχνηθετών στους λεμφαδένες και στον σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών και επιλεκτικών φαρμάκων εντοπισμού του φρουρού λεμφαδένα.

Η χαρτογράφηση του μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση ενός ραδιοιχνηθέτη ή/και μιας χρωστικής ουσίας. Αν χορηγηθεί ένας κατάλληλος ραδιοιχνηθέτης, όπως ένα νανοκολλοειδές του  $^{99m}\text{Tc}$  ή μια χρωστική ουσία, κοντά στο σημείο του όγκου, θα ταξιδέψει μέσω του λεμφικού συστήματος και θα παγιδευτεί στο φρουρό λεμφαδένα, επιτρέποντας τον εντοπισμό του χρησιμοποιώντας έναν κατάλληλο ραδιο-ανιχνευτή ή οπτική απεικόνιση. Το μέγεθος και το φορτίο του ραδιενεργού ιχνηθέτη θα επηρεάσουν την έκταση της ραδιενέργειας που παραμένει στο σημείο της ένεσης, το ρυθμό διάχυσης στα λεμφικά αγγεία και την πρόσληψη στον φρουρό λεμφαδένα.

Ο ιδανικός παράγοντας απεικόνισης του φρουρού λεμφαδένα πρέπει να παρουσιάζει ταχεία κάθαρση από το σημείο της ένεσης, ώστε να μην παρεμβαίνει στην ανίχνευση λεμφαδένων κοντά στο σημείο της ένεσης, καθώς και ταχεία συσσώρευση στο φρουρό λεμφαδένα με παρατεταμένη κατακράτηση του. Η υψηλή πρόσληψη στο πρώτο λεμφαδένα που δέχεται τη λεμφαγγειακή παροχέτευση σε συνδυασμό με χαμηλή διαρροή σε δευτερεύοντες λεμφαδένες και ένα ασφαλές διαγνωστικό πρωτόκολλο, επιτρέπουν μεγαλύτερη ευελιξία στην κλινική πράξη.<sup>107</sup>



**Εικόνα 5.2.** Απεικόνιση του φρουρού λεμφαδένα σε σχέση με τη θέση του πρωτοεμφανιζόμενου καρκίνου

## 5.5. Παράγοντες απεικόνισης του φρουρού λεμφαδένα

Οι συνηθέστερες μέθοδοι εύρεσης του φρουρού λεμφαδένα είναι οι εξής:

α. Η έγχυση ραδιοκολλοειδών του  $^{99m}\text{Tc}$ , την ίδια ημέρα ή το απόγευμα της προηγούμενης πριν από τη χειρουργική επέμβαση.

β. Η έγχυση χρωστικής ουσίας, την ώρα της επέμβασης.

γ. Ο συνδυασμός των παραπάνω.

Με χρήση σκέτου ραδιοιχνηθέτη, μελέτες έχουν δείξει πως πραγματοποιείται επιτυχημένη αναγνώριση σε πάνω από 97% των περιπτώσεων, ενώ με χρήση μόνο χρωστικής ουσίας τα ποσοστά επιτυχίας είναι χαμηλότερα (75-80%). Η χρήση και των δύο τεχνικών μπορεί να αυξήσει περαιτέρω το ποσοστό στο 99%, επιτυγχάνοντας τον εντοπισμό μεταστατικών λεμφαδένων μαζικά.

### 5.5.1. Μπλε χρωστικές (Blue Dyes) και το πράσινο της ινδοκυανίνης (ICG)

Στις μπλε χρωστικές ουσίες περιλαμβάνονται το μπλε του μεθυλενίου, το μπλε της ισοσουλφάνης (ISB) και το patent blue. Το μπλε του μεθυλενίου παρασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1876 και έχει περιγραφεί ως το πρώτο πλήρως συνθετικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στην Ιατρική (Friedlaender 1888). Το ISB είναι μια υγροσκοπική σκόνη που διαλύεται σε αποστειρωμένο νερό για τη λήψη διαλύματος 1%. Το patent blue είναι μια σκούρα μπλε συνθετική χρωστική που χρησιμοποιείται για το χρωματισμό των τροφίμων. Χαρακτηρίζεται από ένα πολύ βαθύ χρώμα ακόμη και σε χαμηλή συγκέντρωση, το οποίο εξασθενεί γρήγορα όταν εκτίθεται στο φως.

Ύστερα από χορήγησή τους, αυτές οι χρωστικές δεσμεύονται στις πρωτεΐνες του ορού, συλλέγονται από τα λεμφικά αγγεία και μεταφέρονται στους λεμφαδένες, τους οποίους βάφουν μπλε σε περίπου 5-10 λεπτά. Αυτή η μέθοδος είναι πολύ απλή καθώς βασίζεται σε μια οπτική αναγνώριση των λεμφαδένων, που δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Αφού πραγματοποιηθεί η χρώση του φρουρού λεμφαδένα, οι χρωστικές ταξιδεύουν γρήγορα κατά μήκος του λεμφικού συστήματος και σε δευτερεύοντες λεμφαδένες. Είναι σημαντικό η αναγνώριση του λεμφαδένα φρουρού να γίνει στην αρχή της διαδικασίας, πριν η χρωστική βάψει και τους επόμενους λεμφαδένες. Η ακρίβεια από αυτές τις τρεις διαφορετικές χρωστικές για τον εντοπισμό του φρουρού λεμφαδένα σε καρκίνο του μαστού, έχει αποδειχθεί ισοδύναμη.

Γενικά, σε πρώιμες εφαρμογές απεικόνισης με χρήση μόνο χρωστικής ουσίας χρησιμοποιήθηκε το μπλε της ισοσουλφάνης, μια ασφαλής χρωστική με χαμηλά ποσοστά εμφάνισης αναφυλαξίας στους ασθενείς. Η ισοσουλφάνη είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μπλε χρωστική για ενδοεγχειρητική λεμφική χαρτογράφηση στις ΗΠΑ. Εγχύεται ενδοεγχειρητικά, με



δυνατότητα οπτικοποίησης των λεμφικών οδών μέσα σε λίγα λεπτά. Άλλες μπλε χρωστικές που έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως το μπλε του μεθυλενίου και το patent blue, είχαν παρόμοια ποσοστά επιτυχίας σε μια μικρή σειρά μελετών, με την έγχυση της μπλε χρωστικής να ενέχει, όμως, και σε αυτές τις περιπτώσεις τους πιθανούς κινδύνους χρώσης του δέρματος, νέκρωσης του δέρματος, αλλεργικών αντιδράσεων, μέχρι και καρδιακών προβλημάτων.<sup>108-113</sup>

Το πράσινο της ινδοκυανίνης έχει μία σύνθετη μοριακή δομή, που οδηγεί σε αμφιφιλικές ιδιότητες, δηλαδή, τόσο σε υδρόφιλες όσο και σε λιπόφιλες ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες εξηγούν ότι μια συγκεκριμένη αλληλεπίδραση με φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών επηρεάζει το φάσμα εκπομπής και την απόδοση φθορισμού της ICG σε 700-900 nm. Η χρήση του εστιάζει στον εντοπισμό του λεμφαδένα φρουρού στον πρώιμο καρκίνο του ενδομητρίου και του τραχήλου της μήτρας, αλλά και περαιτέρω σε γυναικολογικούς καρκίνους. Κατά την χρήση αυτής της μεθόδου γίνεται προεγχειρητικά έγχυση διαλύματος ICG στον τράχηλο της μήτρας. Κατά την διάρκεια της επέμβασης ο χειρουργός εναλλάσσει διαμέσου μιας ειδικής κάμερας από το φυσιολογικό στο εγγύς υπέρυθρο φως. Το πράσινο της ινδοκυανίνης έχει δώσει καλύτερα αποτελέσματα απεικόνισης από τις μπλε χρωστικές.<sup>114-116</sup>

### **5.5.2. Ραδιοανιχνευτές**

Η τεχνική χρώσης των λεμφαδένων εξελίχθηκε, συνδυάστηκε και πραγματικά βελτιώθηκε με τη χρήση κολλοειδών του <sup>99m</sup>Tc για λεμφική χαρτογράφηση και με την εισαγωγή ενός ενδοεγχειρητικού γάμμα-ανιχνευτή για τον εντοπισμό της πηγής ραδιενέργειας, δηλαδή του φρουρού λεμφαδένα που έχει παγιδεύσει το ραδιοκολλοειδές.

Είναι προφανές ότι πρέπει να ξεχωρίσουμε με σαφήνεια μεταξύ της μεθοδολογίας για την χαρτογράφηση του συνόλου των λεμφαδένων μιας λεμφικής οδού (λεμφαγγειογραφία) και των κατάλληλων τεχνικών εντοπισμού του φρουρού λεμφαδένα. Για το πρώτο σκοπό, ραδιοανιχνευτές με μικρό μέγεθος σωματιδίων, μικρότερο από 10 nm, είναι προτιμότεροι, ενώ για την ανίχνευση του φρουρού λεμφαδένα χρειάζονται κολλοειδή μεγαλύτερου μεγέθους σωματιδίων, μεταξύ 50 και 200 nm.

#### **5.5.2.1. Βιολογικά αδρανείς παράγοντες**

Σε παλαιότερες μεθόδους λεμφαγγειογραφίας χρησιμοποιήθηκαν κολλοειδή του χρυσού, μεγέθους 9-15 nm, (<sup>198</sup>Au: χρόνος ημιζωής 2.697 ημέρες, εκπομπή ακτινοβολίας β<sup>-</sup>).<sup>117</sup> Αν και ελήφθησαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα των

κολλοειδών μικρού μεγέθους, η απορροφούμενη δόση στο σημείο της ένεσης κρίθηκε ως πολύ υψηλή για να επιτρέψει την ασφαλή χρήση αυτού του ραδιοκολλοειδούς.

Λύση στα παραπάνω προβλήματα έδωσαν τα κολλοειδή επισημασμένα με  $^{99m}\text{Tc}$ . Τα ραδιοκολλοειδή μπορούν να αποτελούνται από μια ανόργανη ουσία ( $^{99m}\text{Tc}$ -antimony sulfide,  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid,  $^{99m}\text{Tc}$ -calcium rhytate) ή μπορεί να προέρχονται από βιολογικές ουσίες (νανο- ή μικρο-κολλοειδές της αλβουμίνης του ανθρώπινου ορού). Σημαντικό ρόλο στη συνολική διαδικασία πρόσληψής τους παίζουν το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, η υδροφοβικότητα και το μοριακό βάρος.

Όσον αφορά το μέγεθος, μεγάλα σωματίδια (>200nm) παρουσιάζουν υψηλή κατακράτηση στον πρώτο λεμφαδένα, αλλά έχουν πολύ αργή κάθαρση από το σημείο έγχυσης και έτσι επισκιάζεται ο φρουρός λεμφαδένας. Αντίθετα, πολύ μικρά σωματίδια (<5nm) καθαρίζουν πιο γρήγορα από το σημείο έγχυσης αλλά διαφεύγουν και στους επόμενους λεμφαδένες, δυσχεραίνοντας έτσι τον εντοπισμό του πρώτου. Επιπλέον, το μέγεθος των σωματιδίων ρυθμίζει, επίσης, την ενδοκύττωση από τα μακροφάγα, καθώς επίσης και το χρονοδιάγραμμα της προεγχειρητικής σπινθηρογραφίας και της ενδοεγχειρητικής ανίχνευσης των SLN. Ο φρουρός λεμφαδένας γενικά οπτικοποιείται εντός 1-2 ωρών και ο ασθενής θα πρέπει να βρίσκεται στο χειρουργείο εντός 2-30 ωρών από την ένεση του κολλοειδούς.<sup>118-120</sup>

Πρόσφατα, το σχήμα των σωματιδίων έχει αναγνωριστεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα των μακροφάγων να εσωτερικεύουν σωματίδια. Τα θεωρητικά μοντέλα που βασίζονται στην κυτταρική εσωτερίκευση έχουν ήδη υπογραμμίσει το πλεονέκτημα της χρήσης μη σφαιρικών σωματιδίων για τη χορήγηση φαρμάκων. Επομένως, το μέγεθος των σωματιδίων θα επηρεάσει την ολοκλήρωση της φαγοκυττάρωσης και το σχήμα των σωματιδίων παραμένει σημαντικό στην εγκόλπωση ενός σωματιδίου από τα μακροφάγα.<sup>121-123</sup>

Αν και το φορτίο έχει ερευνηθεί λιγότερο, υπάρχουν ενδείξεις ότι τροποποιήσεις του επιφανειακού φορτίου των σωματιδίων μπορούν να επηρεάσουν τη μεταφορά στο διάμεσο υγρό και την πρόσληψη από τα μακροφάγα των λεμφαδένων. Ενώ όσον αφορά την υδροφοβικότητα, οι οψωνίνες προτιμούν να συσχετίζονται με υδρόφοβες παρά υδρόφιλες επιφάνειες.<sup>124</sup> Η υδροφοβικότητα, επιπρόσθετα, ασκεί αρνητική επίδραση στην παροχέτευση των σωματιδίων από το σημείο ένεσης, και ως εκ τούτου πρέπει να βρεθεί μια κατάλληλη επικάλυψη που επιτρέπει τη βελτιστοποίηση μεταξύ του βαθμού παροχέτευσης και της διαδικασίας πρόσληψης από τα μακροφάγα.<sup>125</sup>

Καθώς το μ.β. των σωματιδίων αυξάνεται, υπάρχει μια μειωμένη ικανότητα για το μόριο να διεισδύει στα τριχοειδή του αίματος, με επακόλουθη αύξηση της προτίμησης για είσοδο στα λεμφικά αγγεία. Έχει αποδειχθεί ότι για υδατοδιαλυτές ενώσεις με μ.β. από 246 g/mol έως 19.000

g/mol, υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του μ.β. της ένωσης που χορηγείται υποδορίως και του κλάσματος της δόσης που απορροφάται από τη λεμφική παροχέτευση.<sup>126</sup>

Στις ΗΠΑ, το επισημασμένο με  $^{99m}\text{Tc}$ -θειούχο κolloειδές ( $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid), ένα ραδιοφάρμακο που εγκρίθηκε αρχικά για το σπινθηρογράφημα του ήπατος και του σπλήνα, είναι το ραδιοκolloειδές που χρησιμοποιείται συνήθως για εντοπισμό του φρουρού λεμφαδένα. Το  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid περιλαμβάνει σωματίδια με ευρύ φάσμα μεγεθών (15–5.000 nm, ανάλογα με τη μέθοδο προετοιμασίας), με μέσο μέγεθος που κυμαίνεται από 305 έως 340 nm. Το διηθημένο  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid λαμβάνεται συνήθως χρησιμοποιώντας φίλτρο 0,22 μm. Το αποτέλεσμα είναι ένα εναιώρημα με κolloειδή σωματίδια που είναι κυρίως μεταξύ 100 nm και 220 nm.

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρκετές ενέσεις μικρών όγκων (0,1 mL) διηθημένου  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid εντός των μαλακών ιστών στη θέση του όγκου ή γειτονικά προς αυτήν. Γενικά, δεν συνιστάται η ένεση του ραδιοκolloειδούς απευθείας στον όγκο, επειδή μπορεί να καθυστερήσει σημαντικά ή ακόμη και να αποτρέψει τη μετανάστευση στα λεμφικά κανάλια. Για δερματικές αλλοιώσεις όπως το μελάνωμα, χρησιμοποιούνται ενδοδερμικές ενέσεις. Για άλλους όγκους, πραγματοποιούνται υποδόριες ενέσεις ή ενέσεις στο διάμεσο υγρό.<sup>118,127,128</sup>

Διάφορα παρασκευάσματα επισημασμένων με  $^{99m}\text{Tc}$  νανοκolloειδών της αλβουμίνης ( $^{99m}\text{Tc}$ -nanocolloidal albumin) είναι, σήμερα, ο πλέον ευρέως χορηγούμενος παράγοντας στο μεγαλύτερο μέρος της Ευρώπης, με μέγεθος σωματιδίων που κυμαίνεται από 5 έως 100 nm. Η χρήση τους ενδείκνυται στη λεμφαγγειογραφία για την απόδειξη της ακεραιότητας του λεμφικού συστήματος και τη διαφοροποίηση της φλεβικής από τη λεμφική απόφραξη, καθώς και στην προεγχειρητική απεικόνιση και ενδοεγχειρητική ανίχνευση του φρουρού λεμφαδένα στο μελάνωμα, στο καρκίνο του μαστού, του πέους, της στοματικής κοιλότητας και του αιδοίου. Αυτά τα προϊόντα οδηγούν σε υψηλή πρόσληψη στη λέμφο, αλλά η υψηλή τους συσσώρευση και σε περιφερικούς λεμφαδένες περιορίζει τη χρήση τους σε εικόνες που λαμβάνονται μετά από πολλές ώρες.<sup>129</sup>

Σε συγκριτικές μελέτες του  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid με το  $^{99m}\text{Tc}$ -nanocolloidal albumin το  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid απορροφάται γρήγορα και αποτελεσματικά στο σημείο της ένεσης, διατηρείται σημαντικά στο φρουρό λεμφαδένα και ρέει αργά στους επόμενους σταθμούς και στη συστηματική κυκλοφορία. Αντίθετα, το  $^{99m}\text{Tc}$ -nanocolloidal albumin τείνει να συσσωρεύεται λιγότερο αποτελεσματικά στο φρουρό λεμφαδένα και διασκορπίζεται ταχύτερα στους επόμενους λεμφαδένες και στη συστηματική κυκλοφορία. Ως εκ τούτου, το  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid είναι ένα καλύτερο ραδιοκolloειδές για την ενδοεγχειρητική ανίχνευση του φρουρού λεμφαδένα.<sup>130</sup>

Το κolloειδές  $^{99m}\text{Tc}$ -antimony trisulfide, είναι εγκεκριμένο ραδιοφάρμακο στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία ως λεμφοσπινθηρογραφικός παράγοντας στη κλινική πρακτική. Τα κolloειδή σωματίδιά του κυμαίνονται από 3 έως 30 nm, έχοντας ένα βέλτιστο μέγεθος για απεικόνιση

λεμφικών καναλιών στη λεμφαγγειογραφία. Σε μια μεγάλη συγκριτική μελέτη που πραγματοποιήθηκε (Paganelli et al.) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, όπου χρησιμοποιήθηκαν το  $^{99m}\text{Tc}$ -antimony trisulfide (μέγεθος σωματιδίων <50 nm) και  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA με μέγεθος σωματιδίων <80 nm και 200-1000 nm, τα μεγαλύτερα κολλοειδή ήταν αυτά που εντόπισαν με μεγαλύτερη ακρίβεια ένα ή δύο φρουρούς λεμφαδένες ακόμα και 14-16 ώρες μετά την ένεση, ενώ η προτιμώμενη οδός χορήγησης ήταν η υποδερμική.<sup>120</sup>

Το  $^{99m}\text{Tc}$ -calcium rhytate χρησιμοποιείται για την ανίχνευση SLN σε πολλά ινστιτούτα στην Ιαπωνία, και τα κολλοειδή του είναι διαμέτρου 200-1000 nm, μεγαλύτερα από οποιαδήποτε κολλοειδή αλβουμίνης ή θείου. Η ανάλυση μιας μελέτης που περιλάμβανε 533 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, όπου οι μισοί ασθενείς εξετάστηκαν με  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA και οι υπόλοιποι με  $^{99m}\text{Tc}$ -calcium rhytate, έδειξε ότι το ποσοστό εντοπισμού του SLN ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα με το  $^{99m}\text{Tc}$ -calcium rhytate. Η πιο σημαντική αναφορά ήταν πως η ραδιενέργεια στο φρουρό λεμφαδένα ανά περίπτωση ήταν πάνω από πέντε φορές υψηλότερη στο  $^{99m}\text{Tc}$ -calcium rhytate, δείχνοντας μια σαφώς καλύτερη διαγνωστική απόδοση.<sup>131</sup>

Όπως έχει αποδειχθεί για τις υδατοδιαλυτές ενώσεις με μοριακό βάρος μεταξύ 246 g/mol έως 19000 g/mol, υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του μ.β. μιας ένωσης που χορηγείται υποδορίως και του κλάσματος της δόσης που απορροφάται από τη λεμφική αποστράγγιση. Αυτό ήταν το σκεπτικό για τη χρήση μη σωματιδιακών παραγόντων μεγάλου μοριακού βάρους, όπως η  $^{99m}\text{Tc}$ -δεξτράνη (MW=110000 g/mol) και το  $^{99m}\text{Tc}$ -υδροξυαιθυλ-άμυλο (MW = 450000 g/mol).<sup>132,133</sup>

Η καταλληλότητα της  $^{99m}\text{Tc}$ -δεξτράνης ως παράγοντα απεικόνισης λεμφαδένων αξιολογήθηκε σε κουνέλια και σκύλους σε σύγκριση με το  $^{99m}\text{Tc}$ -antimony trisulfide. Και στα δύο είδη πειραματόζωων, παρά τον ταχύ ρυθμό πρόσληψης, η ολική πρόσληψη της  $^{99m}\text{Tc}$ -δεξτράνης στους λεμφαδένες ήταν σημαντικά χαμηλότερη έναντι της πρόσληψης του  $^{99m}\text{Tc}$ -antimony trisulfide.<sup>134</sup> Παρόλο που τα ευρήματα δεν ήταν ιδιαιτέρως ενθαρρυντικά, η επισημασμένη με τεχνητίο δεξτράνη χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τον εντοπισμό SLN σε μικρές ομάδες ασθενών με καρκίνο του μαστού.<sup>135-137</sup> Πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα αναφέρθηκαν επίσης, με το  $^{99m}\text{Tc}$ -υδροξυαιθυλ-άμυλο σε μια μικρή ομάδα υγιών εθελοντών και σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού.<sup>133</sup>

Η διαδικασία επισήμανσης των δύο ενώσεων είναι σημαντική για περαιτέρω συμπεράσματα. Οι δύο ενώσεις αποτελούνται από μεγάλο αριθμό μονάδων γλυκόζης και, καθώς υπάρχουν μόνον ασθενείς ηλικίες ομάδες υδροξυλίου στα μόρια, το κολλοειδές του  $^{99m}\text{Tc}$  μπορεί να σχηματιστεί κατά τη διάρκεια του σταδίου επισήμανσης, μολύνοντας έτσι το τελικό χορηγούμενο παρασκεύασμα. Επίσης, επειδή η διαδικασία επισήμανσης της δεξτράνης πραγματοποιείται με παρουσία υψηλών ποσοτήτων χλωριούχου κασσίτερου, ο ταυτόχρονος σχηματισμός κολλοειδούς

του κασσίτερου δεν μπορεί να αποκλειστεί πλήρως. Για την εξάλειψη αυτών των περιορισμών, συντέθηκε και δοκιμάστηκε σε ζώα, μια τροποποιημένη δεξτράνη, που ενσωματώνει την κυστεαμίνη ως χηλικό παράγοντα για το  $^{99m}\text{Tc}$ .

Το  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA (HSA: Human Serum Albumin, Ανθρώπινη Αλβουμίνη Ορού) έχει επίσης προταθεί ως ραδιενεργός μη σωματιδιακός παράγοντας για τον εντοπισμό SLN. Έχουν διεξαχθεί συγκριτικές μελέτες με άλλους παράγοντες ( $^{99m}\text{Tc}$ -sulphur colloid,  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin colloid και  $^{99m}\text{Tc}$ -calcium rhytate) σε ζώα και σε ανθρώπους. Σε ποντίκια, το  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA τείνει να συσσωρεύεται στον SLN λιγότερο αποτελεσματικά από το επισημασμένο με  $^{99m}\text{Tc}$  θειούχο κολλοειδές, ενώ περνά ταχύτερα στους επόμενους λεμφαδένες και στη συστηματική κυκλοφορία.<sup>130</sup>

Η διαγνωστική επίδοση του  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA συγκρίθηκε με αυτή του  $^{99m}\text{Tc}$ -albumin colloid και του φιλτραρισμένου  $^{99m}\text{Tc}$ -sulphur colloid, σε ασθενείς με μελάνωμα σταδίου I και II. Το  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA έδειξε ταχύτερους ρυθμούς κάθαρσης από τη θέση της ένεσης και καλύτερη εικόνα των λεμφικών καναλιών, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες διατηρήθηκαν περισσότερο στους λεμφαδένες και απεικόνισαν περισσότερους λεμφαδένες σε εικόνες που ελήφθησαν μετά από ώρα, σε σχέση με τις πρώτες εικόνες αμέσως μετά τη χορήγηση.<sup>138</sup>

#### 5.5.2.2. Παράγοντες που αλληλοεπιδρούν με υποδοχέα

Εντυπωσιακή πρόοδος έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια με το σχεδιασμό νέων απεικονιστικών παραγόντων, των οποίων η πρόσληψη από τους λεμφαδένες οφείλεται σε μηχανισμό αλληλεπίδρασης υποδοχέα-υποκαταστάτη: μελετήθηκαν μαννοζυλιωμένα παράγωγα αλβουμίνης, πολυλυσίνης και δεξτρανών, επισημασμένα κυρίως με  $^{99m}\text{Tc}$ . Από αυτά, τα παράγωγα μαννοζυλιωμένων δεξτρανών επισημασμένα κυρίως με  $^{99m}\text{Tc}$ , αλλά και με άλλα ραδιονουκλίδια, έχουν δείξει πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα.<sup>139-141</sup>

Οι δεξτράνες είναι πολυμερή γλυκόζης ή γλυκάνες, οι οποίες σχηματίζονται από μονάδες α-D-γλυκοκυρανόζης, με σύνδεση 1-6. Τα μόρια αυτά είναι λιγότερο ή περισσότερο διακλαδισμένα, έχουν υψηλό μοριακό βάρος και συντίθενται από ένα εξωκυττάριο ένζυμο, το οποίο υπάρχει σε διάφορα βακτήρια του γένους *Leuconostoc*, *Lactobacillus* και *Streptococcus*. Η δεξτράνη είναι μη τοξική, ανοσολογικά ουδέτερη, και απεκκρίνεται πλήρως. Παρέχει μια ιδανική δομή για πρόσδεση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού λειτουργικών ομάδων. Μια τέτοια λειτουργική ομάδα είναι η μαννόζη. Η μαννόζη παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τις πρωτεΐνες του υποδοχέα μαννόζης, γνωστές ως CD206, οι οποίες βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην επιφάνεια των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων.<sup>142,143</sup>

Ο υποδοχέας μαννόζης (CD206) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως στα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και επιλεγμένα λεμφικά ή ενδοθηλιακά κύτταρα. Ανιχνεύεται σε πολλά όργανα συμπεριλαμβανομένων του σπλήνα, του ήπατος και των λεμφαδένων. Ανήκει στην οικογένεια των λεκτίνων τύπου C και οι εξωκυτταρικές περιοχές του περιλαμβάνουν έναν μέρος N-τερματικής ινονεκτίνης II (FNII), ένα μέρος πλούσιο σε κυστεΐνη (CR) και οκτώ σημεία αναγνώρισης υδατανθράκων (CRD). Η περιοχή CRD δεσμεύει τη μαννόζη, φουκόζη και N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη με υψηλή συγγένεια. Ο υποδοχέας λειτουργεί ως ομοιοστατικός υποδοχέας με τη δέσμευση και την απομάκρυνση ανεπιθύμητων πλούσιων σε μαννόζη N-συνδεδεμένων γλυκοπρωτεϊνών καθώς και ορμονών της υπόφυσης από την κυκλοφορία. Επιπλέον, χρησιμεύει ως πρότυπος υποδοχέας αναγνώρισης στη φυσική ανοσία, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη άμυνα κατά του ξενιστή μέσω της φαγοκυττάρωσης.

Ο υποδοχέας της πλασματικής μεμβράνης ανακυκλώνεται γρήγορα από προσχηματισμένες ενδοκυτταρικές ομάδες στα μακροφάγα. Η άφθονη έκφρασή του σε συγκεκριμένα υποσύνολα κυττάρων και η ικανότητα ανακύκλωσής του καθιστούν τον συγκεκριμένο υποδοχέα βιώσιμο και ελκυστικό για τη στοχευμένη δέσμευσή του και την απελευθέρωση θεραπευτικών ενώσεων και παραγόντων απεικόνισης που περιέχουν υδατάνθρακες, για μια ποικιλία ασθενειών.

Τα μακροφάγα διεισδύουν σε θέσεις φλεγμονής, όπως αυτές που σχετίζονται με λοιμώξεις, όγκους, αθηροσκληρωτική πλάκα κτλ. Παρά τη συνεχιζόμενη ανάπτυξη τεχνολογιών μοριακής απεικόνισης, η αποτελεσματική στόχευση παραγόντων απεικόνισης σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα για διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία διαφόρων ασθενειών παραμένει μια πιθανή προσέγγιση με ευρύτερες εφαρμογές. Για παράδειγμα, η μαννοζυλίωση παραγόντων απεικόνισης μπορεί να βελτιστοποιήσει την πρόσληψη από τον υποδοχέα στα μακροφάγα σε ιστούς-στόχους που εμπλέκονται σε μια συγκεκριμένη ασθένεια. Δεδομένης της δυνατότητας ανακύκλωσης, η στοχευμένη αναγνώριση του υποδοχέα αναμένεται να απαιτεί μικρότερες δόσεις των παραγόντων για βέλτιστα κλινικά αποτελέσματα, μειώνοντας, έτσι, και την τοξικότητα των χορηγούμενων ουσιών.

Στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού ιστού, τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (TAMs-Targeting tumor-associated macrophages) προάγουν την ανάπτυξη του καθώς και την αγγειογένεση, εισβολή και μετάσταση. Αυτά είναι τύπου M2 μακροφάγα και εκφράζουν υψηλά επίπεδα του υποδοχέα. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μακροφάγα αυτά υπάρχουν σε υψηλά επίπεδα σε πολλούς ανθρώπινους όγκους συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, του στήθους, του δέρματος και του προστάτη.<sup>144-146</sup>

### 5.5.2.2.1. <sup>99m</sup>Tc-tilmanocept

Σε αυτό το σκεπτικό, ο David R. Vera και η ομάδα του ανέφεραν για πρώτη φορά το 2001, τη σύνθεση ενός ραδιοφαρμακευτικού προϊόντος που ήταν σχεδιασμένο να συνδέεται με τον υποδοχέα μαννόζης εντός των λεμφοειδών ιστών για απεικόνιση του φρουρού λεμφαδένα. Αυτός ο παράγοντας ονομάζεται <sup>99m</sup>Tc-tilmanocept (Lymphoseek; Navidea Biopharmaceuticals) (Σχήμα 5.1).<sup>141</sup>

Το Lymphoseek είναι ένα ραδιοφάρμακο, με άδεια κυκλοφορίας στην Αμερική και την Ευρώπη από το 2014, που στοχεύει τους υποδοχείς και το οποίο έχει σχεδιαστεί κατά τρόπο που να διέρχεται με ταχύτητα μέσω των λεμφαγγείων. Στοχεύει κύριους, και βασικούς για την πρόγνωση λεμφαδένες παροχέτευσης (τους φρουρούς λεμφαδένες), όπου συσσωρεύεται και κατακρατείται. Η ουσία tilmanocept δεσμεύεται ειδικά από τις πρωτεΐνες των υποδοχέων της μαννόζης (CD206), οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων. Τα μακροφάγα κύτταρα εντοπίζονται στους λεμφαδένες σε υψηλές συγκεντρώσεις.

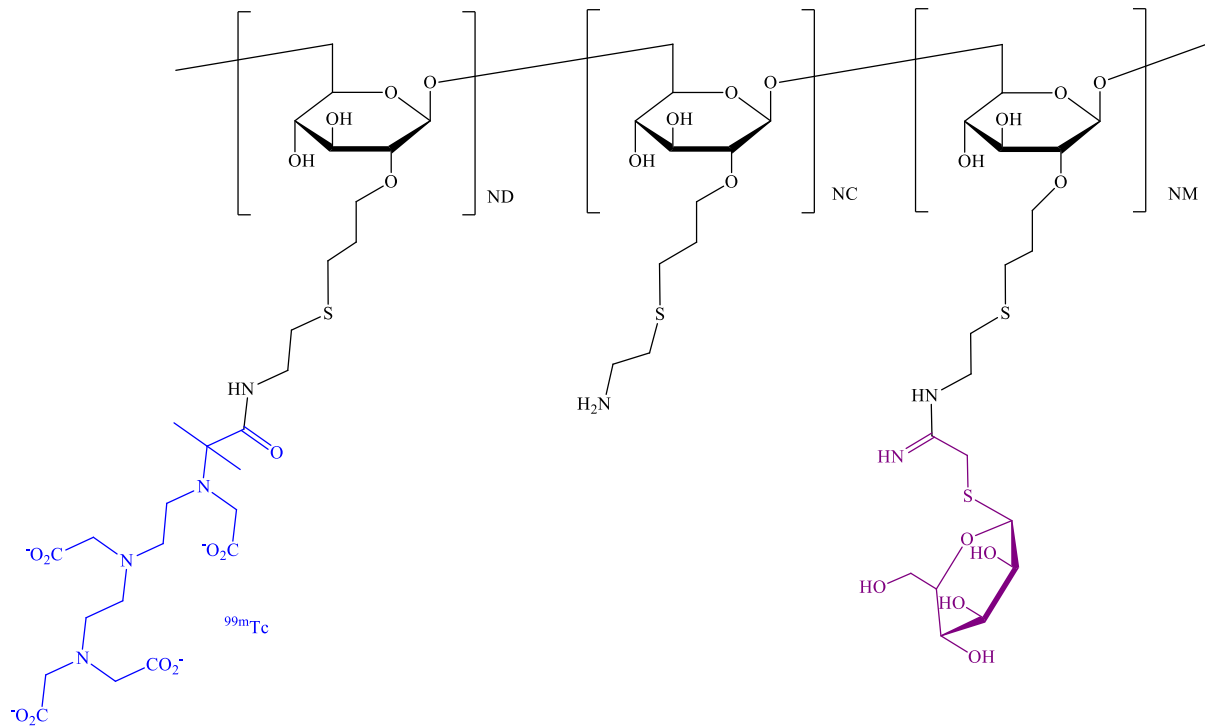
Η ουσία tilmanocept είναι ένα μακρομόριο που συνίσταται σε πολλαπλές μονάδες διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικού οξέος (DTPA) και μαννόζης, εκάστη εκ των οποίων συνδέεται σε σκελετό δεξτράνης 10 kDa. Η μαννόζη λειτουργεί ως υπόστρωμα για τον υποδοχέα, το δε DTPA χρησιμεύει ως χηλικός παράγοντας για τη σήμανση με το τεχνητό <sup>99m</sup>Tc. Η μέση διάμετρος της tilmanocept είναι 7 nm και χάρη στο μικρό μέγεθος των μορίων της διέρχεται ευκολότερα στα λεμφικά κανάλια με αποτέλεσμα την ταχεία και ομοιόμορφη κάθαρση του σημείου της ένεσης.

Μετά από τη διαδικασία ανασύστασης και σήμανσης, το Lymphoseek προορίζεται για έγχυση εγγύς του όγκου και για προεγχειρητική απεικόνιση μέσω ανίχνευσης της ακτινοβολίας γάμμα σε συνδυασμό με στατική κάμερα ακτινοβολίας γάμμα (σπινθηρογράφημα), υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονιακής εκπομπής (SPECT), ή SPECT/αξονική τομογραφία (SPECT/CT), και/ή για διεγχειρητική απεικόνιση σε συνδυασμό με αισθητήρα ανίχνευσης ακτινοβολίας γάμμα για τον εντοπισμό των φρουρών λεμφαδένων στη λεμφική οδό που παροχετεύει τον όγκο.<sup>147,148</sup>

Σε *in vitro* μελέτες, το <sup>99m</sup>Tc-tilmanocept κατέδειξε ειδική πρόσδεση στους ανθρώπινους υποδοχείς της CD206. Σε κλινικές μελέτες φάσης 1, το 0,5 έως 1,8% περίπου της δόσης συσσωρεύεται στους λεμφαδένες παροχέτευσης μέσω ειδικής πρόσδεσης μετά από διάστημα 30 λεπτών. Η πρόσδεση του <sup>99m</sup>Tc-tilmanocept δεν εξαρτάται από τον τύπο ή τη σοβαρότητα του καρκίνου.<sup>149</sup>

Το <sup>99m</sup>Tc-tilmanocept έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών ραδιοκολλοειδών, όπως ταχεία κάθαρση από τη θέση της ένεσης, υψηλή πρόσδεση στον φρουρό λεμφαδένα και χαμηλή συσσώρευση σε περιφερικούς λεμφαδένες, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε

αποτελεσματική χρήση του. Το ραδιοφάρμακο εμφανίζει βελτιωμένα χαρακτηριστικά αλλά εξακολουθεί να έχει υψηλό ποσοστό ραδιενέργειας στο σημείο έγχυσης, αλλά και ανεπιθύμητη πρόσληψη στους επόμενους λεμφαδένες. Επίσης, το  $^{99m}\text{Tc}$ -tilmanocept φέρει το χηλικό σύστημα DTPA, το οποίο δε θεωρείται το ιδανικό για τη σταθεροποίηση του μεταλλικού πυρήνα του  $^{99m}\text{Tc}$ , ενώ ταυτόχρονα, η χημική δομή του συμπλόκου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.



**Σχήμα 5.1.** Προτεινόμενη δομή του  $^{99m}\text{Tc}$ -Tilmanocept

#### 5.5.2.2.2. Άλλα παράγωγα $^{99m}\text{Tc}$ -dextran για απεικόνιση του φρουρού λεμφαδένα

Με στόχο την ανάπτυξη νέων ραδιοφαρμάκων του  $^{99m}\text{Tc}$  για τον εντοπισμό του SLN με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων παραγώγων μαννοζυλιωμένης δεξτράνης με πυραζολυλ-διαμίνη και κυστεΐνη ως χηλικά συστήματα συναρμογής με τον οργανομεταλλικό πυρήνα  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ . Η σύνθεση του παραγώγου με πυραζολυλ-διαμίνη ως χηλικό σύστημα, ξεκινάει με τη σύνθεση της αλλυλ-δεξτράνης (Dex-Allyl: DA). Σε δεύτερο στάδιο, προστίθεται κυστεαμίνη στη DA προς σχηματισμό αμίνης ακολουθούμενο από την προσθήκη του ενεργοποιημένου χηλικού παράγοντα  $pz(\text{Boc})\text{COOsucc}$  στις ελεύθερες αμίνες. Η τελική μαννοζυλίωση των ελεύθερων αμινοομάδων δίνει το παράγωγο DAPM (Dextran Amine Pyrazolyl diamine Mannose).<sup>150</sup>



Στην περίπτωση του παραγώγου δεξτράνης που περιέχει την κυστεΐνη (Dex-Cysteine: DC) ως χηλικό σύστημα, υπάρχουν μόνο δύο κύρια συνθετικά στάδια ξεκινώντας από το παράγωγο αλλυλ-δεξτράνης. Η άμεση ενσωμάτωση του αμινοξέος στη δεξτράνη μειώνει τα στάδια σύνθεσης και δεν υπάρχει λόγος ενεργοποίησης και σύνδεσης πρόσθετου διλειτουργικού χηλικού παράγοντα. Η τελική μαννοζυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων δίνει σε αυτή τη περίπτωση το παράγωγο DCM (Dextran-S-Cysteine-Mannose). Το DCM είναι δεξτράνη μεταβλητού μοριακού βάρους, η οποία έχει τροποποιηθεί και φέρει μαννόζες για πρόσδεση με τον υποδοχέα και ελεύθερες ομάδες κυστεΐνης για συναρμογή με τον πυρήνα  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$  μέσω του θειοαιθέρα, της αμινοομάδας και του καρβοξυλίου, σχηματίζοντας σταθερά και ουδέτερα σύμπλοκα.<sup>151-154</sup>

Το Εργαστήριό μας το 2012, παρουσίασε τη σύνθεση και χαρακτηρισμό του προϊόντος  $^{99m}Tc(CO)_3(DCM20)$ . Το DCM20 είναι δεξτράνη 10 kDa η οποία έχει τροποποιηθεί και φέρει 24 μαννόζες για πρόσδεση με τον υποδοχέα και 6 ομάδες κυστεΐνης για συναρμογή με το  $^{99m}Tc(CO)_3^+$ . Η βιολογική του αξιολόγηση έδειξε εξίσου καλά αποτελέσματα με το  $^{99m}Tc$ -tilmanocept.<sup>151</sup>

Επεκτείνοντας αυτή την ερευνητική προσπάθεια, παρουσιάζουμε στην παρούσα διδακτορική διατριβή την σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση μιας σειράς παραγώγων DCM που χρησιμοποιούν δεξτράνες διαφορετικού μοριακού βάρους, 10–500 kDa, για παρασκευή ενός ραδιοφαρμάκου με βελτιωμένα βιολογικά χαρακτηριστικά για την *in vivo* απεικόνιση και εντοπισμό του φρουρού λεμφαδένα με ένα μη επεμβατικό τρόπο.

## **VII. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ**

## 6. Υλικά και μέθοδοι

### 6.1. Αντιδραστήρια και Πρώτες ύλες

Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν χημικώς καθαρά αντιδραστήρια και διαλύτες, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η προμήθεια τους έγινε από τις εταιρίες Fluka, Aldrich, Sigma, Riedel-de-Haën, Ferak, Jannsen, Acros και Merck.

Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε για την έκλουση των προϊόντων κατά τη χρωματογραφία HPLC ήταν της εταιρείας Sigma-Aldrich κατάλληλη για HPLC. Τα αέρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας μονοξείδιο του άνθρακα, ήλιο και άζωτο, από την εταιρεία Air Liquide Hellas.

Χρησιμοποιήθηκαν δεξτράνες διαφορετικού μοριακού βάρους (D10: MW 11,800 Da, D20: MW 18,100 Da, D40: MW 40,000 Da, D75: MW 75,000 Da, D150: MW 150,000 Da, και D500: MW 500,000 Da), η προμήθεια των οποίων έγινε από την εταιρεία Serva Electrophoresis GmbH.

Το  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  προέρχεται από τις γεννήτριες  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  της εταιρείας General Electric Healthcare Drytec στο Εργαστήριο Παραγωγής Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοφαρμάκων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Η ραδιενέργεια των διαλυμάτων μετρήθηκε με μετρητή (Isotope Calibrator) CRC-12 της εταιρείας Capintec. Η μέτρηση των κρούσεων των ραδιενεργών δειγμάτων, καθώς και των βιολογικών δειγμάτων έγινε σε αναλυτή τύπου φρέατος, με κρύσταλλο NaI (μετρητή ακτινοβολίας-γ πολλαπλών δειγμάτων), τύπου MINAXI 5000 Auto gamma counter της εταιρείας Packard.

Το  $^{68}\text{GaCl}_3$  προέρχεται από έκλουση γεννήτριας  $^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$ . Η ραδιενέργεια των διαλυμάτων μετρήθηκε με μετρητή (Isotope Calibrator) CRC-12 της εταιρείας Capintec. Η μέτρηση των κρούσεων των ραδιενεργών δειγμάτων, καθώς και των βιολογικών δειγμάτων έγινε σε αναλυτή τύπου φρέατος, με κρύσταλλο NaI (μετρητή ακτινοβολίας-γ πολλαπλών δειγμάτων), τύπου MINAXI 5000 Auto gamma counter της εταιρείας Packard.

Τα πειραματόζωα, που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τις μελέτες βιοκατανομής, όσο και για την απεικόνιση του συμπλόκου  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , είναι λευκά θηλυκά ποντίκια τύπου Swiss Albino, ηλικίας τριών περίπου μηνών και μέσου βάρους 18-30 g. Η προμήθεια τους και ο εσταβλισμός τους έγινε στο εκτροφείο πειραματόζωων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» σύμφωνα με τις προδιαγραφές της ορθής εργαστηριακής πρακτικής για χρήση πειραματόζωων. Τα πειραματόζωα προστατεύονται από το Προεδρικό Διάταγμα 56/2013 που εναρμονίζει την εθνική μας νομοθεσία με την κοινοτική οδηγία 2010/63 και τον νόμο 2015/2001, ο οποίος ενσωματώνει στο εθνικό δίκαιο την Σύμβαση του Συμβουλίου της Ευρώπης για τα σπονδυλωτά ζώα που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς και

άλλους επιστημονικούς σκοπούς. Ως αναισθητικό χρησιμοποιείται ισοφλουράνιο που διοχετεύεται ως αέριο.

## 6.2. Όργανα και Μέθοδοι

Για τον χαρακτηρισμό με Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιήθηκε 500 MHz Bruker DRX Avance spectrometer με μία μονάδα BVT 3000 ελέγχου θερμοκρασίας. Τα δείγματα υπό μορφή διαλύματος σε κατάλληλο δευτεριωμένο διαλύτη (D<sub>2</sub>O) μεταφέρονται σε γυάλινο σωλήνα NMR (διάμετρος 5 mm) με ομοιογενή τοιχώματα και τοποθετείται σε ένα μεταλλικό κάθετο σωλήνα μεταξύ των πόλων του μαγνήτη. Έγινε χρήση φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H-NMR.

Ο έλεγχος ποιότητας πραγματοποιήθηκε με HPLC. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από: i. αντλία τύπου 600 της εταιρείας Waters, ii. σύστημα εισαγωγής δείγματος στη χρωματογραφική στήλη με υποδοχέα (loop) των 500 μL, iii. αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης τύπου Macherey-Nagel Nucleosil RP-C18 column (10 μm, 250 × 4 mm), iv. ανιχνευτή UV-Vis, τύπου 2487 της εταιρείας Waters (στα 254 nm), v. ανιχνευτή γ ακτινοβολίας, GABI – Raytest και vi. ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος ελέγχει τη λειτουργία της αντλίας, του ανιχνευτή, συλλέγει και επεξεργάζεται τα δεδομένα. Μετά τη δίοδο από τη χρωματογραφική στήλη, οι ενώσεις που διαχωρίζονται διέρχονται από τις δύο ανιχνευτικές διατάξεις, οι οποίες είναι συνδεδεμένες σε σειρά.

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με σύστημα διαλυτών έκλουσης την κινητή φάση A: μεθανόλη / 0.01% τριφθοροξικό οξύ (TFA) και την κινητή φάση B: H<sub>2</sub>O / 0.01% TFA. Οι διαλύτες έκλουσης είχαν υποστεί ειδική επεξεργασία που περιλάμβανε διήθηση υπό κενό μέσω ειδικών φίλτρων (0.22 μm, Millipore) και απαέρωση με διαβίβαση ηλίου υψηλής καθαρότητας. Για την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα του χρωματογράφου χρησιμοποιείται μικρομετρική σύριγγα των 100 μL. Η ροή των διαλυμάτων έκλουσης στη χρωματογραφική στήλη ρυθμίζεται σε 1.0 mL/min. Χρησιμοποιήθηκε το εξής μίγμα διαλυτών κλιμακωτά μεταβαλλόμενης σύστασης (gradient I). Το gradient I στο χρόνο t = 0 - 1 min έχει σύσταση 0% A (100% B) και ακολούθως μεταβάλλεται γραμμικά για 9 min έως 70% A (30% B). Η σύσταση αυτή διατηρείται για 10 min και στη συνέχεια η στήλη εκλούεται με 95 % A (5% B) για άλλα 10 min. Μετά το τέλος της χρωματογραφικής ανάλυσης εφαρμόζονται οι αρχικές συνθήκες.

Πραγματοποιήθηκε απεικόνιση δυναμικής μελέτης, πραγματικού χρόνου σε σύστημα επίπεδης σπινθηρογραφίας που προορίζεται για πάγκο εργασίας, οπτικού πεδίου μεγέθους μύος

( $\gamma$ -eye™ της BIOEMTECH, Αθήνα, Ελλάδα). Το σύστημα υποστηρίζει σύντηξη με ψηφιακή φωτογραφία μύος. Για την περαιτέρω ενίσχυση της ανατομικής χαρτογράφησης του μύος με τις αντίστοιχες μεταβολικές πληροφορίες, χρησιμοποιείται νευρωνικό δίκτυο που μεταφράζει τη φωτογραφική εικόνα σε μια τεχνητή σάρωση ακτίνων Χ για ανατομική συνευθυγράμμιση. Ο ανιχνευτής βασίζεται σε χωρικά ευαίσθητους σωλήνες φωτοπολλαπλασιαστών (PSPMTs), συζευγμένο με σπινθηριστή CsI με ενεργοποιητή Na χωρισμένο σε εικονοστοιχεία και κατευθυντήρα μολύβδου μέσης ενέργειας, παράλληλων εξαγωνικών οπών, υποστηρίζοντας ένα ευρύ φάσμα ισotόπων SPECT. Το οπτικό πεδίο του συστήματος είναι  $5 \times 10 \text{ cm}^2$ , με χωρική διακριτική ικανότητα  $\sim 2 \text{ mm}$ .

Η τομογραφική απεικόνιση SPECT/CT πραγματοποιήθηκε με το  $\gamma$ -CUBE™ και το x-CUBE™ (Molecubes, Βέλγιο). Το σύστημα  $\gamma$ -CUBE™ (Molecubes, Βέλγιο) παρέχει εικόνες SPECT με χωρική διακριτική ικανότητα 0,6 mm για απεικόνιση μύος και συνοδεύεται από το x-CUBE™ (Molecubes, Βέλγιο) μπορεί να παρέχει εικόνες CT με χωρική διακριτική ικανότητα 50  $\mu\text{m}$ , που λειτουργεί μεταξύ 35-80 kVp, 10 -500  $\mu\text{A}$  ρεύμα σωλήνα.

Για τη ζωντανή δυναμική απεικόνιση που εκτελείται με το  $\gamma$ -eye™, η μετέπειτα επεξεργασία και ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε μέσω του ενσωματωμένου λογισμικού ανάλυσης, visual|eyes, (BIOEMTECH, Αθήνα, Ελλάδα).

Για τις τομογραφικές εικόνες που αποκτήθηκαν με τα συστήματα τομογραφικής απεικόνισης, πραγματοποιήθηκε μετέπειτα επεξεργασία μέσω λογισμικού ανάλυσης, VivoQuant v1.23 (Invicro LLC, Boston).

Η υπερδιήθηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή υπερδιήθησης, Μοντέλο 8400, Millipore Corp, Bedford, MA, USA και Μοντέλο 8050, Millipore Corp, Bedford, MA, USA εφοδιασμένα με μεμβράνη υπερδιήθησης MW cut off 3000 και MW cut off 1000, αντίστοιχα.

## 7. Σύνθεση υποκαταστατών

### 7.1. Σύνθεση του 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδης

Η σύνθεση και ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση την βιβλιογραφία.<sup>155,156</sup>

#### 7.1.1. Σύνθεση του 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλ-α/β-D-μαννοπυρανόζη, 2

Σε σφαιρική φιάλη φέρονται D-μαννόζη, **1** (20 g, 111.2 mmol), 92 mL πυριδίνης και 104 mL οξικού ανυδρίτη τα οποία αναδεύονται για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στο διάλυμα, προστίθενται 250 mL παγωμένου νερού και στη συνέχεια πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL). Ακολούθως, η οργανική φάση συλλέγεται και πλένεται κατά σειρά με HCl 1M (3 x 150 mL), H<sub>2</sub>O (150 mL), κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> (150 mL) και H<sub>2</sub>O (150 mL). Στην οργανική φάση προστίθεται αφυδατικό MgSO<sub>4</sub>, διηθούμε και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Λαμβάνεται κίτρινο σιρόπι 40.48 g, απόδοση 93%.

#### 7.1.2. Σύνθεση του 2,3,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανόζυλο βρωμίδιο, 3

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται ακετυλιωμένος D-μαννοπυρανοσίδης, **2** (15 g, 38.4 mmol) από το πρώτο στάδιο με 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, η φιάλη πωματίζεται και ψύχεται σε παγόλουτρο. Προστίθεται PBr<sub>3</sub> (6.5 mL, 65.3 mmol) και H<sub>2</sub>O (4.12 mL, 228.9 mmol) σιγά-σιγά. Μετά από 15 min, το διάλυμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 4 h. Προστίθεται CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) και γίνονται πλύσεις με H<sub>2</sub>O (2 x 150 mL), κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> (200 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (2 x 150 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Λαμβάνεται απαλό πορτοκαλί σιρόπι 10.00 g, απόδοση 63%.

### 7.1.3. Σύνθεση της υδροβρωμικής 2-S-(2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-β-μαννοπυρανοζυλο)-2-θειοψευδοουρίας, 4

Μείγμα του 2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανόζυλο βρωμίδιου, **3** (10.00 g, 24.3 mmol), θειουρίας (2.80 g, 36.8 mmol), και ακετόνης (20 ml) βράζεται για 30 min και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το λάδι που προκύπτει διαλύεται σε χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>), διηθείται για να απομακρυνθεί μικρή ποσότητα στερεού και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού και λαμβάνεται το **4**, ως λάδι που στερεοποιείται υπό υψηλό κενό. Λαμβάνεται κολλώδες στερεό σκούρου κίτρινου χρώματος 10.00 g, 84% απόδοση.

### 7.1.4. Σύνθεση του κυανομεθυλο-2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλ-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, 5

Υδροβρωμική 2-S-(2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-β-μαννοπυρανοζυλο)-2-θειοψευδοουρία, **4** (9.74 g, 20 mmol) και χλωροακετονιτρίλιο (5 mL, 79 mmol) αναδεύονται με μείγμα νερού και ακετόνης (40 ml) σε αναλογία 1 : 1 (v/v) μέχρι πλήρους διάλυσης. Στη συνέχεια, προστίθεται ανθρακικό κάλιο (3.2 g, 23.2 mmol) και μεταδιθειώδες νάτριο (4.0 g, 40.4 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα της αντίδρασης προστίθεται σε παγωμένο νερό (160 ml) και αναδεύεται για 2 h. Το στερεό που λαμβάνεται διηθείται και πλένεται με παγωμένο νερό.

Λαμβάνεται στερεό 5.00 g, 62% απόδοση. Στοιχειακή ανάλυση για C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S (FW: 403.4): C, 47.64; H, 5.25; N, 3.47. Ευρέθη: C, 47.34; H, 5.20; N, 3.21. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ 5.46 (s, mannose 1H), 5.39 – 5.32 (m, mannose 2H), 5.20 (dd, *J* = 9.8, 3.2 Hz, mannose 1H), 4.36 (t, mannose 1H), 4.25 (dd, *J* = 79.1, 11.5 Hz, 2H, mannose CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>), 3.39 (dd, *J* = 80.3, 17.1 Hz, 2H, -SCH<sub>2</sub>CN), 2.19 (s, 3H, mannose CH<sub>3</sub>O-), 2.11 (s, 3H, mannose CH<sub>3</sub>O-), 2.06 (s, 3H, mannose CH<sub>3</sub>O-), 2.00 (s, 3H, mannose CH<sub>3</sub>O-).

### 7.1.5. Σύνθεση του 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, 6

Σε μεθανολικό διάλυμα του κυανομεθυλο-2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, **5** (1.41 g, 3.49×10<sup>-3</sup> mol, σε 33 mL μεθανόλης) προστίθεται 2 mL διαλύματος μεθανολικού νατρίου (21.6 mg, 3.99×10<sup>-4</sup> mol). Το διάλυμα αναδεύεται περιοδικά για 24 h και ο

διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Λαμβάνεται χρυσό σιρόπι **6**, το οποίο χρησιμοποιείται αμέσως για το επόμενο στάδιο 7.2.3.

## **7.2. Σύνθεση παραγώγων δεξτράνης**

Η σύνθεση πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Για τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκαν δεξτράνες διαφορετικού μοριακού βάρους (D10: MW 11,800 Da, D20: MW 18,100 Da, D40: MW 40,000 Da, D75: MW 75,000 Da, D150: MW 150,000 Da, και D500: MW 500,000 Da).

### **7.2.1. Σύνθεση άλλυλο δεξτράνης D<sub>10</sub>A-D<sub>500</sub>A, 7-12**

Σε σφαιρική φιάλη διαλύονται 15 g δεξτράνης μοριακού βάρους 10-500 kDa σε 75 mL H<sub>2</sub>O μαζί με 4 g ( $1 \times 10^{-1}$  mol) NaOH και 0.1 g ( $2.6 \times 10^{-4}$  mol) τετραϋδροβορικό νάτριο. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό ανάδευση στους 50°C, όπου και προστίθεται 25.4 g 3-βρωμο-1-προπένιο (0.21 mol). Το pH διατηρείται στο 11 με περιοδική προσθήκη 2.5 N NaOH. Μετά από 4 h το pH ρυθμίζεται στο 7 με προσθήκη οξικού οξέος. Το διάλυμα προστίθεται σε αιθανόλη όπου και σχηματίζεται αδιάλυτο παχύρευστο ίζημα. Περαιτέρω πλύση με αιθανόλη οδηγεί στο σχηματισμό λευκού στερεού. Στη συνέχεια το στερεό συλλέγεται και επαναδιαλυτοποιείται σε νερό και διηθείται με φίλτρο 5 μm. Το διήθημα μεταφέρεται για υπερδιήθηση (Model 8400, Millipore Corp, Bedford MA, με μεμβράνη: YM03, MW cutoff 3000, Millipore Corp). Πραγματοποιείται πλύση με επαναλαμβανόμενη προσθήκη νερού (10 x 250 mL) και στη συνέχεια πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση.

Οι αποδόσεις κυμαίνονται από 76% έως 82%. Όλα τα προϊόντα δίνουν τις ίδιες κορυφές NMR σε D<sub>2</sub>O. <sup>1</sup>H NMR για D<sub>10</sub>A-D<sub>500</sub>A, **7-12**, (D<sub>2</sub>O, ppm), 5.99 (m, -OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.38, 5.31 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.17 (subst. dextran anomeric H-1), 4.99 (dextran anomeric H-1), 4.22 (OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 4.00, 3.77 (dextran H-6), 3.99 - 3.53 (subst. dextran H-3-H-6), 3.92 (dextran H-5), 3.74 (dex-tran H-3), 3.60 (dextran H-2), 3.54 (dextran H-4), 3.42 (subst. dextran H-2).



### 7.2.2. Σύνθεση αμινοτελικών δεξτρανών D<sub>10</sub>C-D<sub>500</sub>C, 13-18

Σε σφαιρική φιάλη διαλύονται 2 g δεξτράνης D<sub>10</sub>A-D<sub>500</sub>A, **7-12**, από το 7.2.1 σε 10 mL νερού και προστίθενται 1.43 g ( $8.14 \times 10^{-3}$  mol) L-κυστεΐνης και 0.12 g ( $5.25 \times 10^{-4}$  mol) υπερθειϊκό αμμώνιο ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Το διάλυμα αναδεύεται και θερμαίνεται στους 50°C για 4 h σε ατμόσφαιρα όπου διαβιβάζεται άζωτο (N<sub>2</sub>) και στη συνέχεια το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 4 με προσθήκη 0.1 N NaOH και το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Στη συνέχεια, ο όγκος ρυθμίζεται στα 50 mL με ρυθμιστικό διάλυμα 0.02 M οξικού νατρίου pH 4. Έπειτα από διήθηση με φίλτρο 5 μm, το διάλυμα μεταφέρεται για υπερδιήθηση (Model 8050, Millipore Corp, Bedford MA, με μεμβράνη: MW cutoff 1000, Millipore Corp). Πραγματοποιείται πλύση με επαναλαμβανόμενη προσθήκη δύο όγκων (50 mL) με 0.02 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 4, πέντε όγκων (50 mL) με 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού και 5 όγκων (50 mL) με νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση.

Οι αποδόσεις κυμαίνονται από 70% έως 75%. Όλα τα προϊόντα δίνουν τις ίδιες κορυφές NMR σε D<sub>2</sub>O. <sup>1</sup>H NMR για D<sub>10</sub>C-D<sub>500</sub>C, **13-18**, (D<sub>2</sub>O, ppm), 5.18 (subst. dextran anomeric H-1), 4.99 (dextran anomeric H-1), 4.00, 3.78 (dextran H-6), 3.92 - 3.56 (subst. dextran H-3 – H-6), 3.92 (dextran H-5), 3.84, 3.78 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.94 (cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.73 (dextran H-3), 3.59 (dextran H-2), 3.54 (dextran H-4), 3.42 (subst. dextran H-2), 3.14, 3.06 (cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 2.72 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.92 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

### 7.2.3. Σύνθεση μαννοζυλιωμένων δεξτρανών D<sub>10</sub>CM-D<sub>500</sub>CM, 19-24

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει πρόσφατα παρασκευασμένο 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, **6**, (1.41 g,  $3.49 \times 10^{-3}$  mol, σε 33 mL μεθανόλης), προστίθεται διάλυμα D<sub>10</sub>C-D<sub>500</sub>C, **12-18**, (0.2 g) σε 7.5 mL 0.2 M ρυθμιστικό διάλυμα βορικού pH 9, και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει με περιοδικές αναδεύσεις για 20 h. Έπειτα από διήθηση με φίλτρο 5 μm, το διάλυμα μεταφέρεται για υπερδιήθηση (Model 8050, Millipore Corp, Bedford MA, με μεμβράνη: MW cutoff 1000, Millipore Corp). Πραγματοποιείται πλύση με επαναλαμβανόμενη προσθήκη πέντε όγκων (50 mL) με 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού και 5 όγκων (50 mL) με νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση.

Οι αποδόσεις κυμαίνονται από 80% έως 85%. Όλα τα προϊόντα δίνουν τις ίδιες κορυφές NMR σε D<sub>2</sub>O. <sup>1</sup>H NMR για D<sub>10</sub>CM-D<sub>500</sub>CM, **19-24**, (D<sub>2</sub>O, ppm), 5.45, 5.41, 5.34 (mannose anomeric H-1),

5.18 (subst. dextran anomeric H-1), 4.99 (dextran anomeric H-1), 4.40, 4.33 (subst. cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 4.10 (mannose H-2), 4.00, 3.77 (dextran H-6), 3.94 - 3.72 (mannose H-3–H-6), 3.91 (dextran H-5), 4.00-3.53 (subst. dextran H-3 – H-6), 3.87, 3.80 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.93 (free cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.74 (dextran H-3), 3.58 (dextran H-2), 3.52 (dextran H-4), 3.49, 3.42 (NH=CCH<sub>2</sub>S), 3.41 (subst. dextran H-2), 3.20, 3.07 (subst. cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.14, 3.06 (free cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 2.72 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.91 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

### 7.3. Σύνθεση NODAGA-D<sub>20</sub>CM, 25

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει διάλυμα D<sub>20</sub>CM, **20**, (200 mg) 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα βορικού (1 mL), προστίθεται 30 mg εστέρα NODAGA-NHS διαλυμένα σε 0.5 mL DMSO το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 18 h. Έπειτα από διήθηση με φίλτρο 5 μm, το διάλυμα μεταφέρεται για υπερδιήθηση (Model 8050, Millipore Corp, Bedford MA, με μεμβράνη: MW cutoff 1000, Millipore Corp). Πραγματοποιείται πλύση με επαναλαμβανόμενη προσθήκη πέντε όγκων (50 mL) με 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού και 5 όγκων (50 mL) με νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση.

**NODAGA-D<sub>20</sub>CM (25):** Απόδοση 175 mg, 79%. MW=31811 g/mol. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, ppm): 5.45, 5.41, 5.34 (mannose anomeric H-1), 5.18 (subst. dextran anomeric H-1), 4.99 (dextran anomeric H-1), 4.40, 4.33 (subst. cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 4.10 (mannose H-2), 4.00, 3.77 (dextran H-6), 3.94 - 3.72 (mannose H-3–H-6), 3.91 (dextran H-5), 4.00-3.53 (subst. dextran H-3 – H-6), 3.87, 3.80 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.93 (free cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.74 (dextran H-3), 3.69-3.33 (NCH<sub>2</sub>CO, NCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO, NODAGA), 3.58 (dextran H-2), 3.52 (dextran H-4), 3.49, 3.42 (NH=CCH<sub>2</sub>S), 3.41 (subst. dextran H-2), 3.20, 3.07 (subst. cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.14, 3.06 (free cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 2.73 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, NODAGA), 2.72 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.91 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

### 7.4. Σύνθεση NODAGA-D<sub>20</sub>CM-FITC, 26

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει διάλυμα NODAGA-D<sub>20</sub>CM, **25**, (100 mg) 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού (1 mL), προστίθεται 10 mg FITC διαλυμένα σε 0.5 mL DMSO το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 18 h. Έπειτα από διήθηση σε φίλτρο 5 μm, το διάλυμα μεταφέρεται για υπερδιήθηση (Model 8050, Millipore Corp, Bedford MA, με μεμβράνη: MW cutoff 1000, Millipore Corp). Πραγματοποιείται πλύση με επαναλαμβανόμενη

προσθήκη πέντε όγκων (50 mL) με 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού και 5 όγκων (50 mL) με νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση.

**NODAGA-D<sub>20</sub>CM-FITC (26):** Απόδοση 100 mg, 88%. MW=34139 g/mol. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, ppm): 7.92-6.49 (FITC), 5.45, 5.41, 5.34 (mannose anomeric H-1), 5.18 (subst. dextran anomeric H-1), 4.99 (dextran anomeric H-1), 4.40, 4.33 (subst. cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 4.10 (mannose H-2), 4.00, 3.77 (dextran H-6), 3.94 - 3.72 (mannose H-3–H-6), 3.91 (dextran H-5), 4.00-3.53 (subst. dextran H-3 – H-6), 3.87, 3.80 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.93 (free cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.74 (dextran H-3), 3.69-3.33 (NCH<sub>2</sub>CO, NCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO, NODAGA), 3.58 (dextran H-2), 3.52 (dextran H-4), 3.49, 3.42 (NH=CCH<sub>2</sub>S), 3.41 (subst. dextran H-2), 3.20, 3.07 (subst. cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.14, 3.06 (free cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 2.73 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, NODAGA), 2.72 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.91 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

## 8. Παρασκευή προσκευάσματος (kit)

Ποσότητα 10 mg από κάθε υποκαταστάτη D<sub>75</sub>C, **16**, D<sub>10</sub>CM-D<sub>500</sub>CM, **19-24**, NODAGA-D<sub>20</sub>CM, **25** και NODAGA-D<sub>20</sub>CM-FITC, **26**, διαλυτοποιείται σε 100 mL νερό. Έπειτα από διήθηση με 0.22 μm φίλτρο, μεταφέρεται ποσότητα 1 mL σε φιαλίδια πενικιλίνης και στη συνέχεια πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση. Τα φιαλίδια σφραγίστηκαν με ελαστικό πώμα υπό κενό.

Η λυοφιλοποίηση (freeze drying, lyophilization) προτιμήθηκε ως μέθοδος ξήρανσης καθώς όλη η κατεργασία πραγματοποιείται σε πολύ ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης και επιπλέον παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα: (1) λαμβάνονται προϊόντα υψηλής ποιότητας, τα οποία θα ήταν αδύνατο να παραχθούν με άλλη μέθοδο, (2) ελαχιστοποιούνται τα προϊόντα διάσπασης του, (3) η ανασύσταση του τελικού προϊόντος μετά την προσθήκη του κατάλληλου διαλύτη είναι εύκολη και γρήγορη.

## 9. Επισήμανση με $^{99m}\text{Tc}$

### 9.1. Σύνθεση του πρόδρομου συμπλόκου $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Σε φιαλίδιο πενικιλίνης των 10 mL φέρονται 4 mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 20 mg τρυγικό κάλιο-νάτριο και 5.5 mg  $\text{NaBH}_4$ . Το φιαλίδιο σφραγίζεται και στη συνέχεια διαβιβάζεται μονοξειδίο του άνθρακα για 5 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 1 mL διαλύματος  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  (5-30 mCi) λαμβάνοντας κάθε δυνατή προφύλαξη να μην εισέλθει ατμοσφαιρικός αέρας στο φιαλίδιο και στη συνέχεια ακολουθεί θέρμανση του φιαλιδίου στους  $95^\circ\text{C}$  για 30 λεπτά. Το φιαλίδιο στη συνέχεια αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ρυθμίζεται το pH του διαλύματος σε 7 με προσθήκη διαλύματος  $\text{HCl}$  1N. Ο σχηματισμός του πρόδρομου συμπλόκου  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  επιβεβαιώνεται με αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με το gradient I. Στην ανάλυση εμφανίζεται μια κορυφή (απόδοση > 99 %) με χρόνο έκλουσης (Retention time)  $t_R = 5.1$  min ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$   $t_R = 2.6$  min).

### 9.2. Επισήμανση παραγώγων δεξτράνης με $^{99m}\text{Tc}$ , 16', 19'-24'

Διάλυμα (0.5-1 mL) πρόδρομου συμπλόκου  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  προστίθεται σε φιαλίδιο πενικιλίνης που περιέχει 100 μg παράγωγο δεξτράνης  $\text{D}_{75}\text{C}$ , **16**,  $\text{D}_{10}\text{CM-D}_{500}\text{CM}$ , **19-24**. Το διάλυμα επωάζεται στους  $100^\circ\text{C}$  για 15 min. Το διάλυμα της αντίδρασης ελέγχεται με HPLC (>95%).  $t_R = 12\text{-}13$  min

### 9.3. Πειράματα σταθερότητας συμπλόκων $^{99m}\text{Tc}$

Τα σύμπλοκα του  $^{99m}\text{Tc}$  που συντέθηκαν, μελετηθήκαν ως προς τη σταθερότητά τους στις πιο κάτω συνθήκες:

### **9.3.1. Σταθερότητα των συμπλόκων σε θερμοκρασία δωματίου**

Το διάλυμα της επισήμανσης φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου έως 24 ώρες. Στα χρονικά διαστήματα 1, 3, 6 και 24 ωρών μετά την σύνθεσή τους, λαμβάνεται δείγμα και πραγματοποιείται ανάλυση με RP-HPLC.

### **9.3.2. Σταθερότητα των συμπλόκων παρουσία ιστιδίνης και κυστεΐνης**

Η σταθερότητα των συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$  μελετήθηκε παρουσία περίσσειας ανταγωνιστών, όπως είναι η κυστεΐνη και η ιστιδίνη (Cys/His challenge). Παρασκευάζονται δύο διαλύματα: i. ένα διάλυμα κυστεΐνης  $10^{-3}$  M σε φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl και ii. ένα διάλυμα ιστιδίνης  $10^{-3}$  M σε φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl. Σε 900  $\mu\text{L}$  καθενός από τα παραπάνω διαλύματα προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα της επισήμανσης. Τα νέα διαλύματα επωάζονται σε θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$  και ελέγχονται για την σταθερότητά του ραδιοεπισημασμένου συμπλόκου στα ανάλογα χρονικά διαστήματα (1h, 3h, 6h).

## **10. Επισήμανση με $^{68}\text{Ga}$**

### **10.1. Επισήμανση παραγώγων δεξτράνης με $^{68}\text{Ga}$ , 25' και 26'**

Σε υδατικό διάλυμα (1 mg/100  $\mu\text{L}$ ) NODAGA-D<sub>20</sub>CM, **25**, και NODAGA-D<sub>20</sub>CM-FITC, **26**, προστίθενται 300  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου, 0.1 M, pH=5.6, και 150  $\mu\text{L}$   $^{68}\text{GaCl}_3$  (περίπου 50–150 MBq σε 0.1 M HCl). Το διάλυμα επωάζεται στους 70°C για 30 min και στη συνέχεια ελέγχεται με HPLC.

### **10.2. Πειράματα σταθερότητας συμπλόκων $^{68}\text{Ga}$**

Τα σύμπλοκα του  $^{68}\text{Ga}$  που συντέθηκαν, μελετήθηκαν ως προς τη σταθερότητά τους στις πιο κάτω συνθήκες:

#### **10.2.1. Σταθερότητα των συμπλόκων του $^{68}\text{Ga}$ σε θερμοκρασία δωματίου**

Το διάλυμα της επισήμανσης φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου έως 4 ώρες. Στα χρονικά διαστήματα 1, 2 και 4 ωρών μετά την σύνθεσή τους, λαμβάνονται δείγματα τα οποία αναλύονται με RP-HPLC.

## 11. Βιολογική κατανομή των συμπλόκων $^{99m}\text{Tc}$

Τα πειραματόζωα, που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τις μελέτες βιοκατανομής, όσο και για την απεικόνιση του συμπλόκου  $^{99m}\text{Tc}$ , είναι λευκά θηλυκά ποντίκια τύπου Swiss Albino, ηλικίας τριών περίπου μηνών και μέσου βάρους 18-30 g. Η προμήθεια τους και ο εσταβλισμός τους έγινε στο εκτροφείο πειραματόζωων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» σύμφωνα με τις προδιαγραφές της ορθής εργαστηριακής πρακτικής για χρήση πειραματόζωων.

### 11.1. Βιολογική κατανομή σε πειραματόζωα (Swiss Albino) έπειτα από υποδόρια ένεση στο πέλμα

Μελετήθηκαν τα σύμπλοκα  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{10}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **19'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{20}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **20'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{40}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **21'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **22'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{150}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **23'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{500}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **24'** και  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{C})(\text{CO})_3]$ , **16'** και σε διάφορα χρονικά διαστήματα από 15, 60, έως και 180 min, μετά από υποδόρια ένεση στο πέλμα. Για κάθε χρόνο χρησιμοποιήθηκαν 3 πειραματόζωα.

Διάλυμα αντίδρασης του εκάστοτε συμπλόκου (περίπου 7~10 mCi/mL) αραιώνεται με φυσιολογικό ορό, ώστε η τελική ραδιενεργός συγκέντρωση να είναι περίπου 100 μCi/mL, επαρκής ραδιενέργεια για την ολοκλήρωση του πειράματος.

Όγκος 200 μL του προς χορήγηση διαλύματος του συμπλόκου μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται φυσιολογικός ορός μέχρι την χαραγή. Μέρος του διαλύματος αυτού διανέμεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες ανά 1.0 mL ώστε, τελικά, η ραδιενέργεια τους να αντιστοιχεί στο 10% της χορηγούμενης στο πειραματόζωο δόσης ακτινοβολίας.

#### 11.1.1. Εκτέλεση του πειράματος

Η χορήγηση του διαλύματος του, προς μελέτη, συμπλόκου του  $^{99m}\text{Tc}$  γίνεται με υποδόρια ένεση στο πέλμα κάθε πειραματόζωου (20 μL, 2 μCi) και ακολουθούν μαλάξεις στο σημείο ένεσης για 5 λεπτά. Ταυτόχρονα, σημειώνεται ο χρόνος της ένεσης για κάθε ζώο. Κατόπιν, το πειραματόζωο τοποθετείται σε ειδικό θάλαμο που επιτρέπει τη συλλογή των απεκκρινόμενων



ούρων και παραμένει εκεί μέχρι τη στιγμή της θυσίας του. Ακριβώς 10 min πριν την πάροδο του καθορισμένου χρονικού διαστήματος για κάθε ζώο, πραγματοποιείται υποδόρια ένεση στο ίδιο πέλμα με διάλυμα χρωστικής methylene blue (20 µL) και ακολουθούν μαλάξεις στο σημείο ένεσης για 5 λεπτά. Στη συνέχεια το πειραματόζωο αναισθητοποιείται σε θάλαμο κορεσμένο με ατμούς αιθέρα και με τη συμπλήρωση του καθορισμένου χρόνου, θυσιάζεται με καρδιακτομή. Λαμβάνονται δείγματα του αίματος του, τα οποία τοποθετούνται σε προζυγισμένους σωλήνες, ζυγίζεται και καταγράφεται το βάρος του ζώου. Στη συνέχεια, συγκεντρώνονται τα προς μελέτη όργανα και δείγματα ιστών, τα οποία είναι: 1<sup>ος</sup> λεμφαδένας, 2<sup>ος</sup> λεμφαδένας (ως προς το πέλμα της ένεσης), το πέλμα που πραγματοποιήθηκε η ένεση, το ήπαρ, η καρδιά, το στομάχι, τα νεφρά, ο σπλήνας, οι πνεύμονες, τα έντερα καθώς και δείγματα από τους μύες. Τα δείγματα τοποθετούνται σε προζυγισμένα χαρτιά ζυγίσεως, ζυγίζεται και καταγράφεται το βάρος τους. Τέλος, τοποθετούνται σε αριθμημένους ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα μεγαλύτερα όργανα (ήπαρ και έντερα) μοιράζονται σε περισσότερους σωλήνες (2 και 3 αντίστοιχα), ώστε να αποφευχθούν σφάλματα μετρήσεων οφειλόμενα στη γεωμετρία των δειγμάτων. Τα ούρα του ζώου (απεκκρινόμενα και κύστη), το πέλμα καθώς και οι λεμφαδένες του, τοποθετούνται σε αριθμημένους ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς ζύγιση. Στη συνέχεια, τα δείγματα ανά ζώο μαζί με δοκιμαστικούς σωλήνες από το διάλυμα αναφοράς (10% της χορηγούμενης δόσης) τοποθετούνται σε μετρητή ακτινοβολίας γ πολλαπλών δειγμάτων με ανιχνευτή σπινθηρισμών, όπου μετράτε και καταγράφεται ο αριθμός των κρούσεων του κάθε δείγματος.

Από τις κρούσεις του διαλύματος αναφοράς ανά πειραματόζωο (10% της χορηγούμενης δόσης ακτινοβολίας) υπολογίζεται η συγκέντρωση της ραδιενέργειας ανά όργανο και ανά γραμμάριο βάρους για κάθε πειραματόζωο.

### **11.2. Απεικόνιση πειραματόζωων με SPECT κάμερα έπειτα από υποδόρια ένεση στο πέλμα**

Πραγματοποιήθηκε στατική και δυναμική απεικόνιση μετά από υποδόρια ένεση στο πέλμα, των συμπλόκων  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}C)(CO)_3]$ , **16'** και  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**. Διάλυμα αντίδρασης του εκάστοτε συμπλόκου του  $^{99m}Tc$ , με επαρκή ραδιενέργεια για την ολοκλήρωση του πειράματος (12-13 mCi/mL), χορηγείται με ένεση στο πέλμα του πειραματόζωου (20 µL, 250 µCi).

### 11.2.1. Εκτέλεση του πειράματος

Για την επίπεδη απεικόνιση, οι μύες διατηρούνται υπό αναισθησία με την χρήση ισοφλουράνιου και σε σταθερή θερμοκρασία 37°C. Πραγματοποιήθηκαν, σύντομες στατικές σαρώσεις σε διαφορετικά χρονικά σημεία, ώστε να παρέχονται διαμήκεις πληροφορίες της κατανομής για το ίδιο ζώο, μετά από σύντομους χρόνους αναισθησίας, δηλαδή 10 λεπτά ή λιγότερο.

Η απεικόνιση μυός στο σύστημα σπινθηρογραφίας πραγματοποιήθηκε διατηρώντας τα ζώα αναισθητοποιημένα υπό ισοφλουράνιο σε σταθερή θερμοκρασία 37°C. Δυναμικές σαρώσεις αποκτήθηκαν ως στιγμιότυπα δίλεπτων καταγραφών σήματος συνολικής διάρκειας 30 λεπτών, με βάση την ενεργότητα της χορήγησης και τις προδιαγραφές του συστήματος.

Η απεικόνιση μυός σε τομογραφικά συστήματα, πραγματοποιήθηκε διατηρώντας τους μύες υπό αναισθησία ισοφλουράνιου με σταθερή θερμοκρασία 37°C. Οι σαρώσεις SPECT αποκτήθηκαν με συνολική διάρκεια 30 - 50 λεπτών, με βάση την ενεργότητα της χορήγησης και τις προδιαγραφές του συστήματος.

Κάθε σάρωση SPECT ακολουθήθηκε από αξονική τομογραφία για την πραγματοποίηση συνευθυγράμμισης. Τα δεδομένα που προέκυψαν από το Molecubes SPECT σύστημα ανακατασκευάστηκαν μέσω ενός αλγορίθμου MLEM, με μέγεθος εικονοστοιχείου τριών διαστάσεων 250  $\mu\text{m}$  και 500 επαναλήψεις. Τα δεδομένα CT ανακατασκευάστηκαν μέσω ενός αλγορίθμου ISRA, με μέγεθος εικονοστοιχείου τριών διαστάσεων 100  $\mu\text{m}$ .

Για τα ισότοπα SPECT, αναλύθηκαν μελέτες με σύμπλοκα του Tc-99m. Σε όλες τις περιπτώσεις μελέτης, πραγματοποιήθηκαν υποδόριες ενέσεις πέλματος με παράγοντες στόχευσης λεμφαδένων, με όγκους ενώσεων 20  $\mu\text{L}$ . Τα ποντίκια διατηρήθηκαν αναισθητοποιημένα κατά τη χορήγηση και κατά την απεικόνιση υπό αναισθησία ισοφλουράνιου (επαγωγικά με ρυθμό ροής ισοφλουράνιου 3-5% και συντήρηση με ρυθμό ροής 1-3%). Τα ζώα απεικονίστηκαν ζωντανά και οι μελέτες ξεκίνησαν με 2D απεικόνιση και ακολούθησαν οι τρισδιάστατες σαρώσεις.

## 12. Βιολογική κατανομή των συμπλόκων $^{68}\text{Ga}$

Τα πειραματόζωα, που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τις μελέτες βιοκατανομής, όσο και για την απεικόνιση του συμπλόκου  $^{68}\text{Ga}$ , είναι λευκά θηλυκά ποντίκια τύπου Swiss Albino, ηλικίας τριών περίπου μηνών και μέσου βάρους 18-30 g. Η προμήθεια τους και ο εσταβλισμός τους έγινε στο εκτροφείο πειραματόζωων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» σύμφωνα με τις προδιαγραφές της ορθής εργαστηριακής πρακτικής για χρήση πειραματόζωων.

### 12.1. Βιολογική κατανομή σε πειραματόζωα (Swiss Albino mice) μετά από υποδόρια ένεση στο πέλμα

Μελετήθηκαν τα σύμπλοκα  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ , **25'** και  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ -FITC, **26'**, στα χρονικά διαστήματα 15, 30 και 60 min, μετά από υποδόρια ένεση στο πέλμα. Για κάθε χρόνο χρησιμοποιήθηκαν 3 πειραματόζωα.

Διάλυμα αντίδρασης του συμπλόκου (περίπου 100 MBq/mL) αραιώνεται με φυσιολογικό ορό, ώστε η τελική ραδιενεργός συγκέντρωση να είναι περίπου 4 MBq/mL, επαρκής ραδιενέργεια για την ολοκλήρωση του πειράματος.

Όγκος 200  $\mu\text{L}$  του προς χορήγηση διαλύματος του συμπλόκου μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστίθεται φυσιολογικός ορός μέχρι την χαραγή. Μέρος του διαλύματος αυτού διανέμεται σε ειδικούς πλαστικούς σωλήνες ανά 1.0 mL ώστε, τελικά, η ραδιενέργεια τους να αντιστοιχεί στο 10% της χορηγούμενης στο πειραματόζωο δόσης ακτινοβολίας.

#### 12.1.1. Εκτέλεση του πειράματος

Η χορήγηση του διαλύματος του, προς μελέτη, συμπλόκου του  $^{68}\text{Ga}$  γίνεται με υποδόρια ένεση στο πέλμα κάθε πειραματόζωου (20  $\mu\text{L}$ , 200 kBq) και ακολουθούν μαλάξεις στο σημείο ένεσης για 5 λεπτά. Ταυτόχρονα σημειώνεται ο χρόνος της ένεσης για κάθε ζώο. Κατόπιν, το πειραματόζωο τοποθετείται σε ειδικό θάλαμο που επιτρέπει τη συλλογή των απεκκρινόμενων ούρων και παραμένει εκεί μέχρι τη στιγμή της θυσίας του. Ακριβώς 10 min πριν την πάροδο του καθορισμένου χρονικού διαστήματος για κάθε ζώο, πραγματοποιείται υποδόρια ένεση στο ίδιο πέλμα (μόνο για τα πειράματα όπου η χορήγηση πραγματοποιείται από το πέλμα), διάλυμα

χρωστικής methylene blue (20  $\mu$ L) και ακολουθούν μαλάξεις στο σημείο ένεσης για 5 λεπτά. Στη συνέχεια το πειραματόζωο αναισθητοποιείται σε θάλαμο κορεσμένο με ατμούς αιθέρα και με τη συμπλήρωση του καθορισμένου χρόνου, θυσιάζεται με καρδιοεκτομή. Λαμβάνονται δείγματα του αίματος του, τα οποία τοποθετούνται σε προ ζυγισμένους σωλήνες, ζυγίζεται και καταγράφεται το βάρος του ζώου. Στη συνέχεια, συγκεντρώνονται τα προς μελέτη όργανα και δείγματα ιστών, τα οποία είναι: 1<sup>ος</sup> λεμφαδένας ως προς το πέλμα που πραγματοποιήθηκε η ένεση, το ήπαρ, η καρδιά, το στομάχι, τα νεφρά, ο σπλήνας, οι πνεύμονες, τα έντερα καθώς και δείγματα από τους μύες. Τα δείγματα τοποθετούνται σε προζυγισμένα χαρτιά ζυγίσεως, ζυγίζεται και καταγράφεται το βάρος τους. Τέλος, τοποθετούνται σε αριθμημένους ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα μεγαλύτερα όργανα (ήπαρ και έντερα) μοιράζονται σε περισσότερους σωλήνες (2 και 3 αντίστοιχα), ώστε να αποφευχθούν σφάλματα μετρήσεων οφειλόμενα στη γεωμετρία των δειγμάτων. Τα ούρα του ζώου (απεκκρινόμενα και κύστη), το πέλμα καθώς και οι λεμφαδένες του, τοποθετούνται σε αριθμημένους ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς ζύγιση. Στη συνέχεια, τα δείγματα ανά ζώο μαζί με δοκιμαστικούς σωλήνες από το διάλυμα αναφοράς (10% της χορηγούμενης δόσης) τοποθετούνται σε μετρητή ακτινοβολίας  $\gamma$  πολλαπλών δειγμάτων με ανιχνευτή σπινθηρισμών, όπου μετράτε και καταγράφεται ο αριθμός των κρούσεων του κάθε δείγματος.

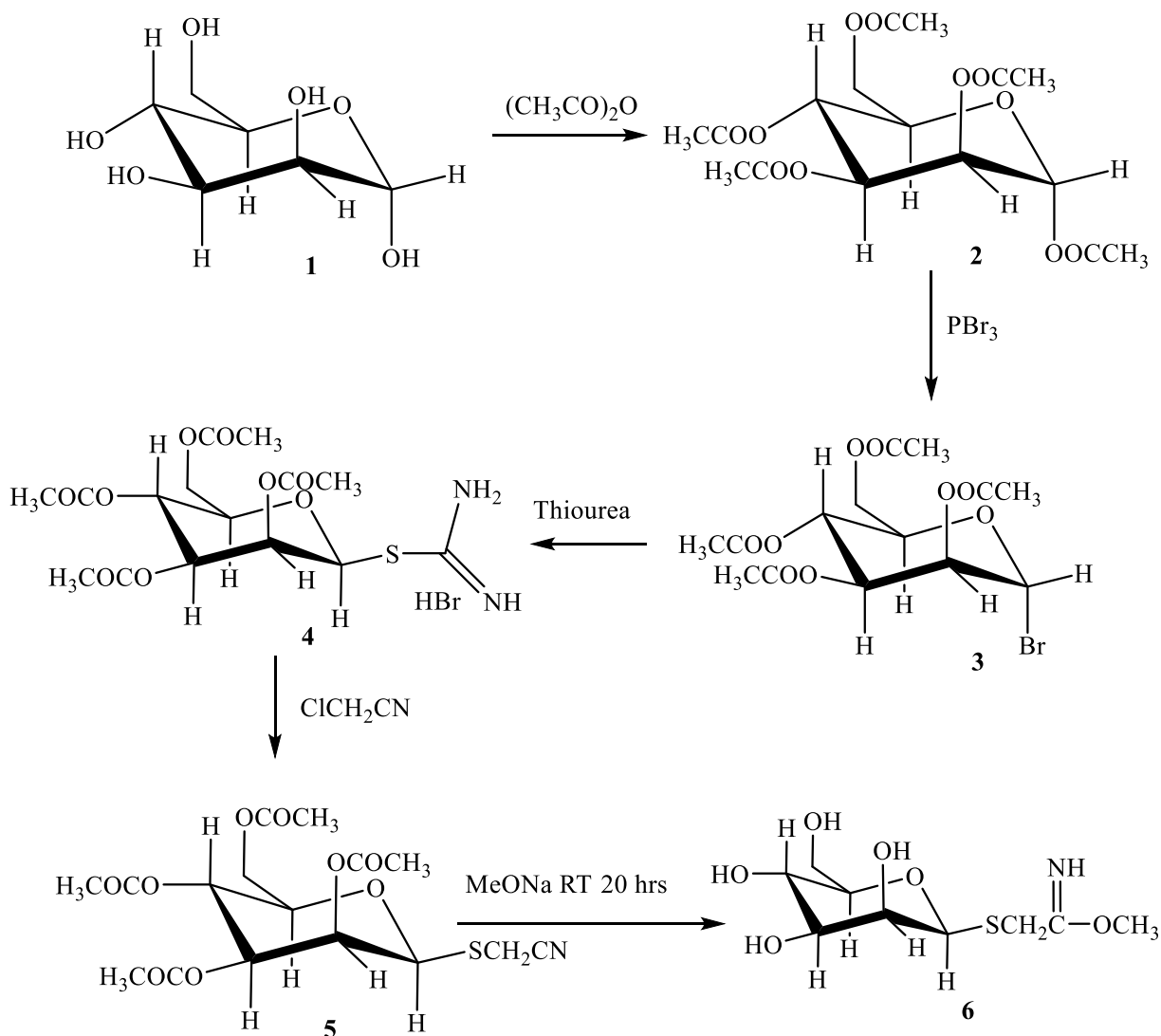
Από τις κρούσεις του διαλύματος αναφοράς ανά πειραματόζωο (10% της χορηγούμενης δόσης ακτινοβολίας) υπολογίζεται η συγκέντρωση της ραδιενέργειας ανά όργανο και ανά γραμμάριο βάρους για κάθε πειραματόζωο.

## **VIII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **13. Σύνθεση και ταυτοποίηση υποκαταστατών**

#### **13.1. Σύνθεση και ταυτοποίηση του 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδης, 6**

Η σύνθεση και η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση την βιβλιογραφία σε πέντε στάδια και περιγράφεται συνοπτικά στο Σχήμα 13.1.<sup>155,156</sup>



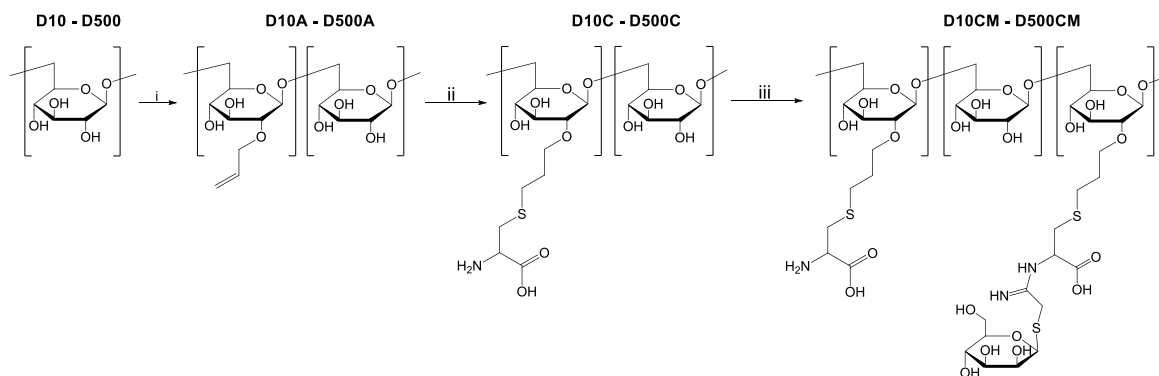
**Σχήμα 13.1.** Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης της 2-αμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδης: i) pyridine, acetic anhydride, rt για 4 h, ii) Phosphorus tribromide,  $\text{H}_2\text{O}$ , παγόλουτρο για 15 min και μετά rt για 4 h, iii) thiourea, dry acetone, reflux για 30 min, iv) chloroacetonitrile, water:acetone 1:1, rt για 30 min, v) sodium methanoxide solution, 20 h

Αυτή η συνθετική μεθοδολογία ξεκίνησε με τη D-μαννόζη, **1**, η οποία πρώτα προστατεύεται για την παραγωγή της ακετυλιωμένης ένωσης **2**. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τριβρωμιούχο φώσφορο λαμβάνεται το υποκατεστημένο γλυκοζυλοβρωμίδιο **3**, όπου το Br εγκαθίσταται εύκολα στο ανωμερικό κέντρο. Με προσθήκη θειουρίας σε ακετόνη λαμβάνεται το προϊόν **4**, στο οποίο προστίθεται χλωροακετονιτρίλιο σε μείγμα νερού:ακετόνης μαζί με ανθρακικό κάλιο και διθειώδες νάτριο και έτσι λαμβάνεται το κυανομέθυλ-παραγώγο **5**. Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR των ενώσεων **2-5** ήταν σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές αναφορές. Επίσης, κατά την στοιχειακή ανάλυση του προϊόντος **5**, οι πειραματικές μετρήσεις για C, H και N ήταν σύμφωνες με τις υπολογισθείσες τιμές.

Το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης πραγματοποιήθηκε πριν τη σύνθεση του παραγώγου δεξτράνης με μαννόζη και αφορά την προσθήκη μεθόξυ-νατρίου στο προϊόν **5**, όπου λαμβάνεται το προϊόν **6**, 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδης. Η ένωση αυτή ουσιαστικά αποτελεί τη φαρμακοφόρο ομάδα που χρησιμοποιήσαμε.

### 13.2. Σύνθεση και ταυτοποίηση παραγώγων δεξτράνης, 7-24

Οι μαννοζυλιωμένες δεξτράνες D<sub>10</sub>CM-D<sub>500</sub>CM, **19-24**, παρασκευάστηκαν σε 3 στάδια, όπως φαίνεται συνοπτικά και στο Σχήμα 13.2. Σε όλα τα στάδια τα προϊόντα καθαρίστηκαν με υπερδιήθηση και ταυτοποιήθηκαν με <sup>1</sup>H NMR.



**Σχήμα 13.2.** Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης των D<sub>10</sub>CM-D<sub>500</sub>CM, 19-24: i) H<sub>2</sub>O, NaOH, NaBH<sub>4</sub>, 3-βρωμο-1-προπένιο, 50°C για 3 h ii) νερό, κυστεΐνη, υπερθειικό αμμώνιο 50°C 4 h, iii) 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, ρυθμιστικό διάλυμα βορικού, rt για 20 h.

Στο πρώτο βήμα, η αντίδραση της δεξτράνης, διαφορετικού μοριακού βάρους κάθε φορά, με το αλλυλοβρωμίδιο σε περίσσεια απέδωσε τις ενδιάμεσες αλλυλ-δεξτράνες D<sub>10</sub>A-D<sub>500</sub>A, **7-12**. Η ενσωμάτωση της αλλυλ-ομάδας είναι εμφανής στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR του παραγώγου D<sub>75</sub>A, **10**, με την παρουσία τριών πολλαπλών στα 5.99, 5.31 και 4.22 ppm (Εικόνα 13.1). Η υποκατάσταση με αλλύλιο αναμένεται κυρίως να λάβει χώρα στο OH του C-2 των μονάδων γλυκόζης της δεξτράνης, και, πράγματι, χαρακτηριστικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>H που σχετίζονται με την υποκατάσταση σε αυτό το σημείο φαίνονται στα φάσματα NMR. Συγκεκριμένα, το H-2 πρωτόνιο μετατοπίζεται προς τα πάνω κατά 0,18 ppm σε σύγκριση με την μετατόπισή του στη μη υποκατεστημένη δεξτράνη. Η αντίθετη τάση καταγράφεται για τη παρακείμενη ανωμερική θέση με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1 να μετατοπίζεται προς τα κάτω κατά 0,18 ppm. Στα φάσματα <sup>1</sup>H NMR καθενός από αυτά, η



ολοκλήρωση όλων των άλλυλ κορυφών προς την ολοκλήρωση των ανωμερικών πρωτονίων υποδεικνύει ότι το 21-35% των μονάδων γλυκόζης υποκαθίστανται με άλλυλ-ομάδες.

Με προσθήκη L-κυστεΐνης στις άλλυλ-δεξτράνες **7-12** λαμβάνονται τα προϊόντα D<sub>10</sub>C-D<sub>500</sub>C, **13-18**. Η αντίδραση προχώρησε ποσοτικά όπως φαίνεται από την εξαφάνιση των κορυφών των άλλυλ-ομάδων και την εμφάνιση χαρακτηριστικών κορυφών που ανήκουν στην αλυσίδα προπυλενοαιθέρα στα 2.72 και 1.92 ppm, στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR του παραγώγου D<sub>75</sub>C, **16** (Εικόνα 13.1). Τα βCH<sub>2</sub> πρωτόνια του εισαγόμενου τμήματος κυστεΐνης στα 3.14 και 3.06 ppm βρίσκονται στο φάσμα <sup>1</sup>H και συσχετίζονται με κορυφή στα 3.94 ppm κρυμμένη κάτω από τις κορυφές γλυκόζης που αποδίδονται στο πρωτόνιο αCH της κυστεΐνης.

Στο επόμενο βήμα, αντίδραση των D<sub>10</sub>C-D<sub>500</sub>C, **13-18**, με φρεσκοπαρασκευασμένο διάλυμα 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη έδωσε τις μαννοζυλιωμένες δεξτράνες D<sub>10</sub>CM-D<sub>500</sub>CM, **19-24**, στις οποίες οι ομάδες μαννόζης εισάγονται σε υψηλή απόδοση μέσω σχηματισμού μιας αμιδινο-σύνδεσης με τις αμινομάδες των κυστεΐνων. Στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR του παραγώγου D<sub>75</sub>CM, **22**, χαρακτηριστικές κορυφές που ανήκουν στα ανωμερικά H-1 και H-2 πρωτόνια της μαννόζης (Εικόνα 13.1) παρέχουν άμεση απόδειξη για την παρουσία μαννόζης στο δείγμα με τα υπόλοιπα πρωτόνια να επικαλύπτονται με τα πρωτόνια των μορίων γλυκόζης της δεξτράνης. Κατά την μαννοζυλίωση, το αCH της ομάδας κυστεΐνης μετατοπίστηκε προς τα κάτω κατά 0.47 ppm σε σχέση με τη θέση του στα D<sub>10</sub>C-D<sub>500</sub>C, **13-18**, και γίνεται ορατό στο φάσμα <sup>1</sup>H, ενώ τα πρωτόνια βCH<sub>2</sub> μετατοπίζονται επίσης προς τα κάτω περίπου 0,1 ppm. Με βάση την ένταση των σχετικών με την μαννόζη κορυφών σε σχέση με τις άλλες κορυφές στο φάσμα <sup>1</sup>H, η έκταση της μαννοζυλίωσης των κυστεΐνων είναι ποσοστιαία 53-82%.

Κατά αυτόν τον τρόπο, τα μαννοζυλιωμένα παράγωγα D<sub>10</sub>CM-D<sub>500</sub>CM, **19-24**, αποτελούνται από ένας σκελετό δεξτράνης, διαφορετικού μοριακού βάρους κάθε φορά, μερικές μονάδες μαννόζης ως φαρμακοφόρο ομάδα για αναγνώριση από τους υποδοχείς μαννόζης στα μακροφάγα των λεμφαδένων και ένα χηλικό σύστημα για συναρμογή με το <sup>99m</sup>Tc. Η παρούσα μελέτη αναφέρεται στην ανάπτυξη νέων μαννοζυλιωμένων παραγώγων δεξτράνης, τα οποία μπορούν να επισημανθούν <sup>99m</sup>Tc. Η αμινομάδα των S-παραγωγοποιημένων κυστεΐνων προσφέρεται για τη σύζευξη με τη μαννόζη ενώ οι υπόλοιπες ελεύθερες μη μαννοζυλιωμένες κυστεΐνες χρησιμεύουν ως χηλικοί SNO παράγοντες για τον πυρήνα [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, που θα χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια. Η σύνθεση τους προχώρησε ομαλά, με περίπου 80% απόδοση σε κάθε βήμα. Τα προϊόντα καθαρίστηκαν με υπερδιήθηση, η οποία αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική στην απομάκρυνση κυστεΐνης και ενεργοποιημένων αντιδραστηρίων μαννόζης.

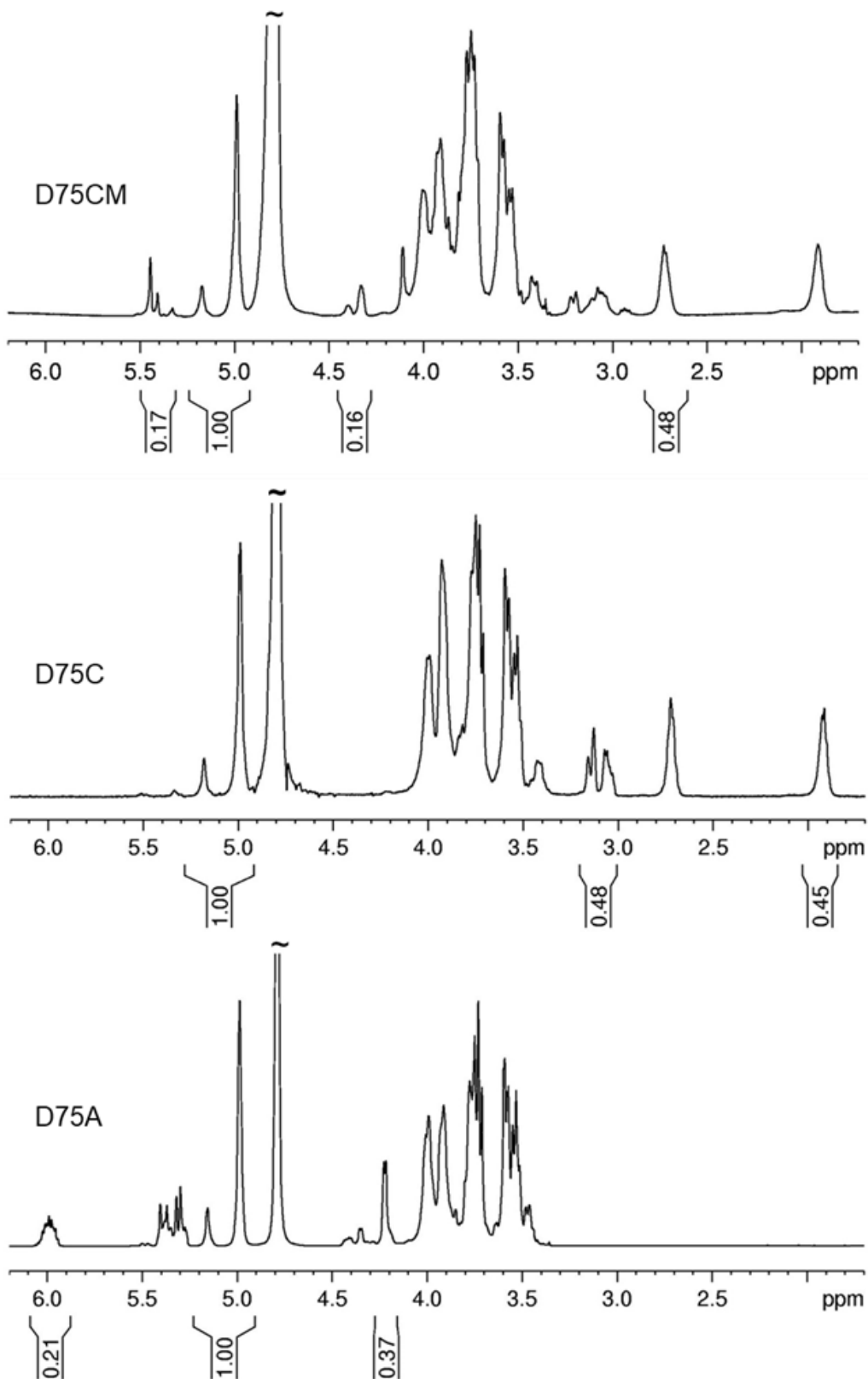
Με βάση τις κορυφές των <sup>1</sup>H NMR των παραγώγων **19-24** (Εικόνα 13.1 και 13.2), υπολογίστηκε για τα νέα παράγωγα ο αριθμός από μαννόζες, ως φαρμακοφόρο ομάδα για σύνδεση

με τους υποδοχείς μαννόζης, οι ελεύθερες κυστεΐνες που παρέχουν για επισήμανση με τον πυρήνα  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  και το μοριακό τους βάρος, όπως φαίνεται στον Πίνακα 13.1.

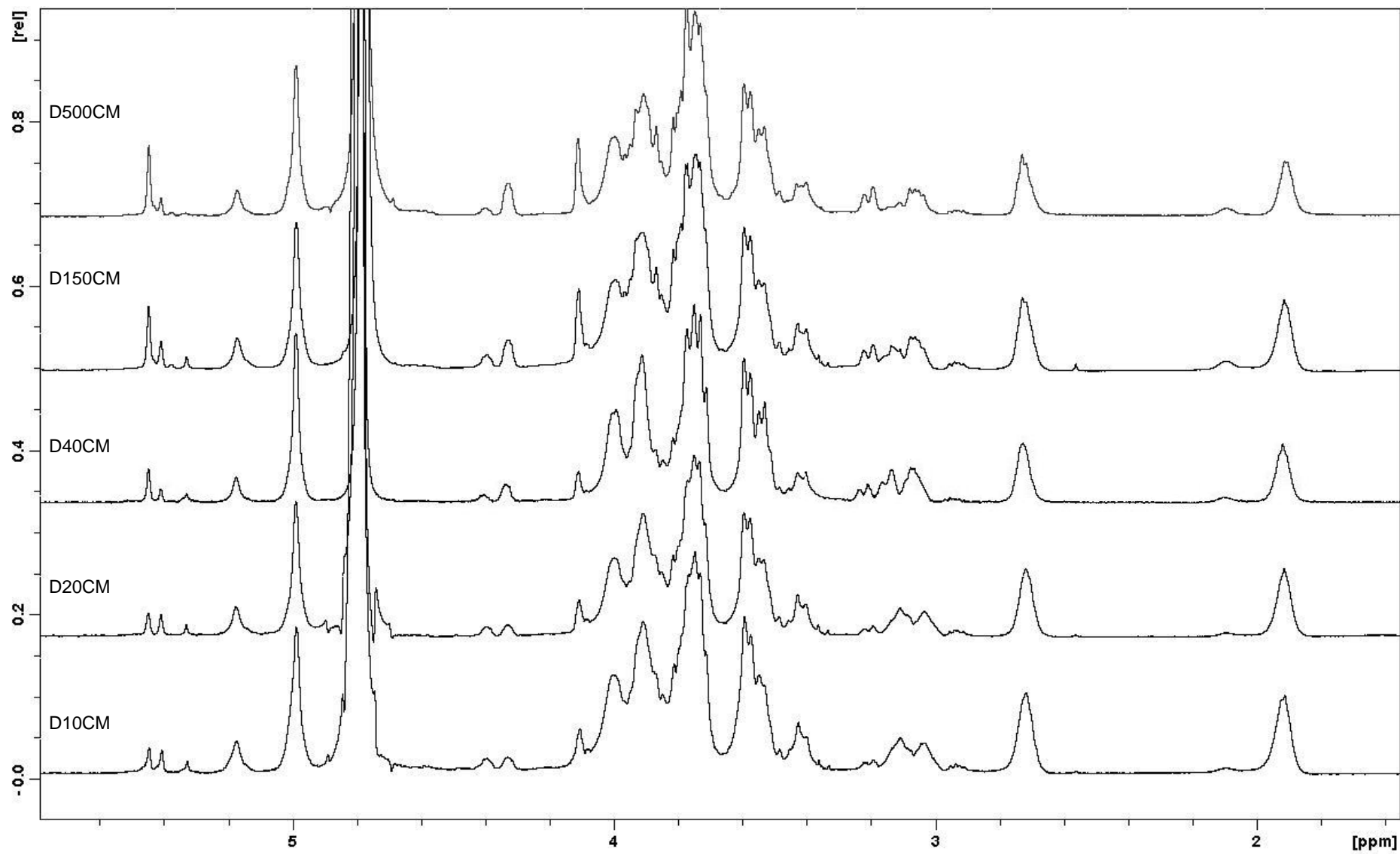
**Πίνακας 13.1.** Μαννόζες, κυστεΐνες και μοριακό βάρος των παραγώγων δεξτράνης  $D_{10}\text{CM}-D_{500}\text{CM}$ ,

19-24

DCM παράγωγο	Κυστεΐνες	Μαννόζες	MW
$D_{10}\text{CM}$	7	19	21297
$D_{20}\text{CM}$	17	23	31097
$D_{40}\text{CM}$	29	33	59459
$D_{75}\text{CM}$	23	74	111238
$D_{150}\text{CM}$	95	160	236320
$D_{500}\text{CM}$	142	645	805567

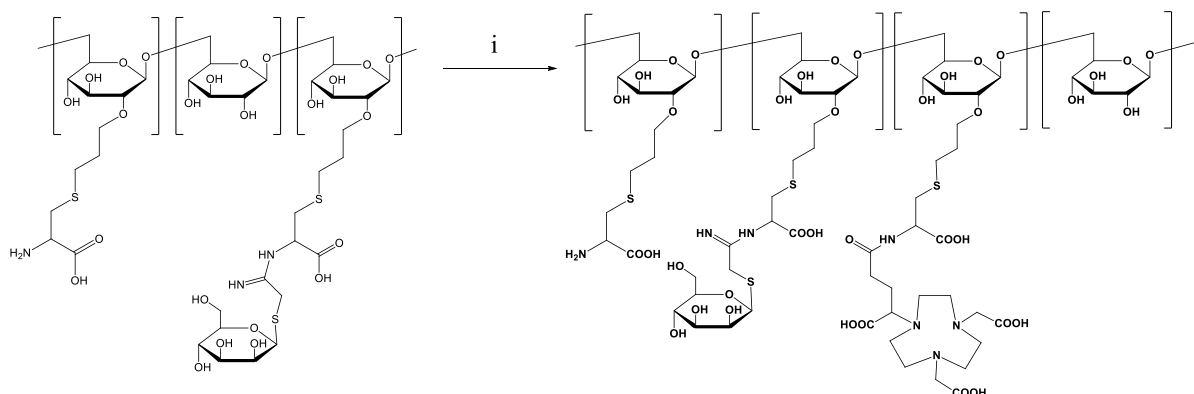


**Εικόνα 13.1.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR των παραγώγων  $D_{75}A$ , 10,  $D_{75}C$ , 16, και  $D_{75}CM$ , 22, σε  $\text{D}_2\text{O}$  στους  $25^\circ\text{C}$



Εικόνα 13.2. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR των παραγώγων  $D_{10}\text{CM}$ -  $D_{500}\text{CM}$ , 19-24, σε  $D_2O$  στους  $25^\circ\text{C}$

### 13.3. Σύνθεση και ταυτοποίηση του NODAGA-D<sub>20</sub>CM, 25

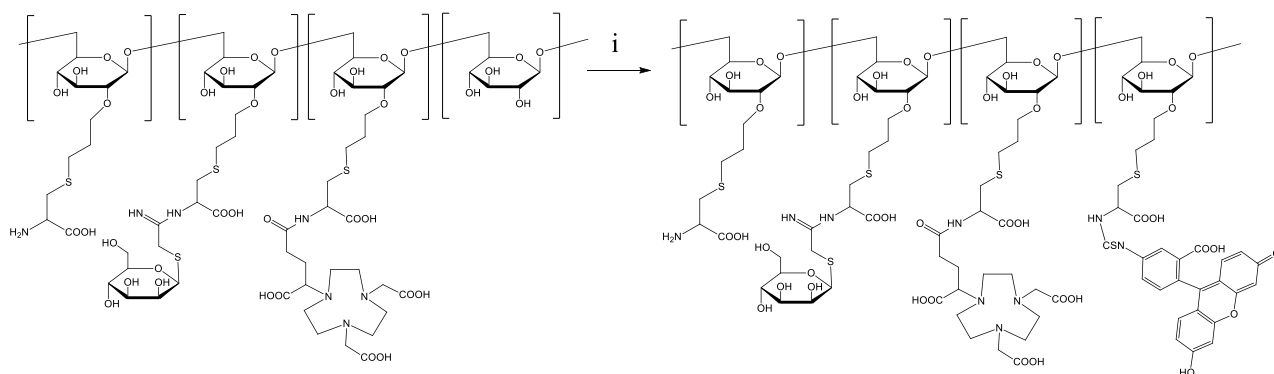


**Σχήμα 13.3.** Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης του NODAGA- D<sub>20</sub>CM: i) ρυθμιστικό διάλυμα βορικού, NODAGA-NHS ester, DMSO, rt για 18 h

Το NODAGA-D<sub>20</sub>CM, 25, συντέθηκε σύμφωνα με το Σχήμα 13.3. Σύμφωνα με τα προηγούμενα στάδια, η αντίδραση της δεξτράνης D<sub>20</sub> με το αλλυλ-βρωμίδιο έδωσε το ενδιάμεσο αλλυλ-παράγωγο D<sub>20</sub>A, 8, και στην συνέχεια με προσθήκη L-κυστεΐνης προέκυψε το παράγωγο D<sub>20</sub>C, 14. Η προσθήκη κυστεϊνών παρέχει την απαραίτητη αμινομάδα για τη σύζευξη τόσο της μαννόζης όσο και του χηλικού συστήματος NODAGA, ενώ οι υπόλοιπες ελεύθερες κυστεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διπλή επισήμανση με <sup>99m</sup>Tc. Εφόσον, το D<sub>20</sub>C, 14, μαννοζυλιωθεί, μετά την *in situ* υδρόλυση, ενεργοποίηση και σύζευξη με τον 2-ιμινο-2-μεθοξυ-αιθυλο-1-θειο-β-D-μαννοπυρανοσίδη, προκύπτει το παράγωγο D<sub>20</sub>CM, 20. Τέλος, η αντίδραση του ενεργοποιημένου εστέρα, NODAGA-NHS, με το D<sub>20</sub>CM αποδίδει το τελικό προϊόν, NODAGA-D<sub>20</sub>CM, 25, μέσω σύζευξης της ελεύθερης αμινομάδας της κυστεΐνης και του καρβοξυλικού οξέος του NODAGA.

Ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση του NODAGA- D<sub>20</sub>CM πραγματοποιήθηκε με <sup>1</sup>H NMR. Από το φάσμα <sup>1</sup>H NMR προκύπτει πως στο NODAGA- D<sub>20</sub>CM πέραν του σκελετού της δεξτράνης υπάρχουν 23 μαννόζες, 2 NODAGA και 15 μόρια κυστεΐνης.

### 13.4. Σύνθεση και ταυτοποίηση του NODAGA- D<sub>20</sub>CM -FITC, **26**



**Σχήμα 13.4.** Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης του NODAGA-D<sub>20</sub>CM-FITC: *i)* ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού, FITC, DMSO, rt για 18h

Η νέα ένωση NODAGA-D<sub>20</sub>CM-FITC, **26**, συντέθηκε με αντίδραση του φθοριοχρώματος FITC με το μαννοζυλιωμένο παράγωγο NODAGA-D<sub>20</sub>CM, **25**, μέσω σύζευξης με την αμινομάδα της κυστεΐνης (Σχήμα 13.4).

Ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση του πραγματοποιήθηκε με <sup>1</sup>H NMR. Με βάση τις κορυφές στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR, προκύπτει ότι το NODAGA-D<sub>20</sub>CM-FITC αποτελείται από 23 μαννόζες, 2 NODAGA, 6 FITC και 9 μόρια κυστεΐνης.

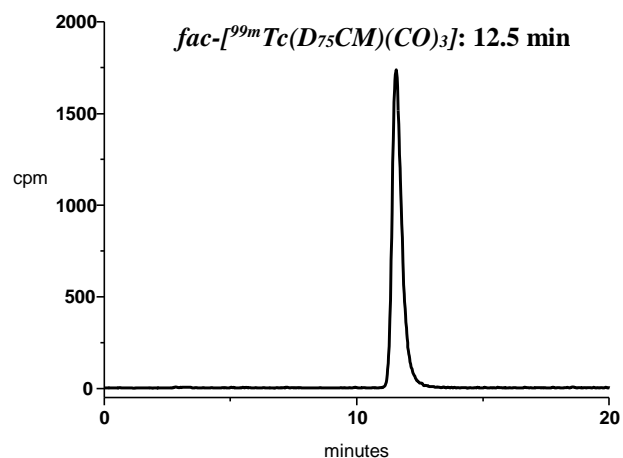
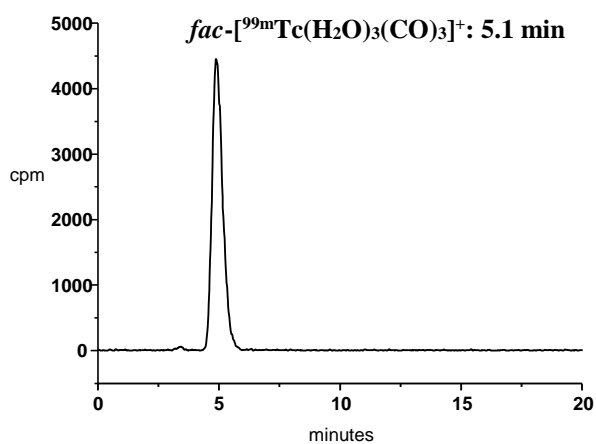
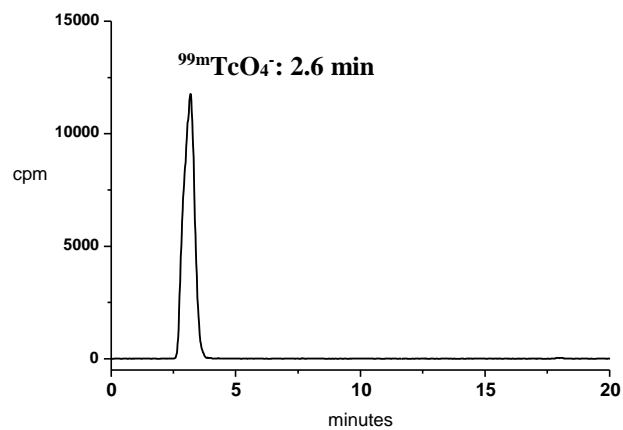
#### 14. Σύνθεση, ταυτοποίηση και αξιολόγηση συμπλόκων του <sup>99m</sup>Tc

##### 14.1. Σύνθεση και ταυτοποίηση των συμπλόκων του <sup>99m</sup>Tc, 16' και 19'-24'

Η σύνθεση των  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}C)(CO)_3]$ , **16'**,  $fac-[^{99m}Tc(D_{10}CM)(CO)_3]$ , **19'**,  $fac-[^{99m}Tc(D_{20}CM)(CO)_3]$ , **20'**,  $fac-[^{99m}Tc(D_{40}CM)(CO)_3]$ , **21'**,  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**,  $fac-[^{99m}Tc(D_{150}CM)(CO)_3]$ , **23'** και  $fac-[^{99m}Tc(D_{500}CM)(CO)_3]$ , **24'** πραγματοποιείται με προσθήκη του πρόδρομου συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$  σε προσκείμενο (κιτ) που περιέχει 100 μg από κάθε έναν από τους τριδραστικούς υποκαταστάτες δεξτράνης D<sub>75</sub>C, **16**, D<sub>100</sub>CM- D<sub>500</sub>CM, **19-24** (Σχήμα 14.2). Το διάλυμα επωάζεται στους 100°C για 15 min και στη συνέχεια ελέγχεται με HPLC. Κατά τη χρωματογραφική ανάλυση με HPLC του μίγματος της αντίδρασης εμφανίστηκε μια κορυφή για κάθε σύμπλοκο σε χρόνο και απόδοση που φαίνεται στο πίνακα 14.1. Ενδεικτική χρωματογραφική ανάλυση με HPLC του συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, σε σχέση με τα <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> που λαμβάνονται από τη γεννήτρια και το πυρήνα  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$  φαίνεται στο σχήμα 14.1.

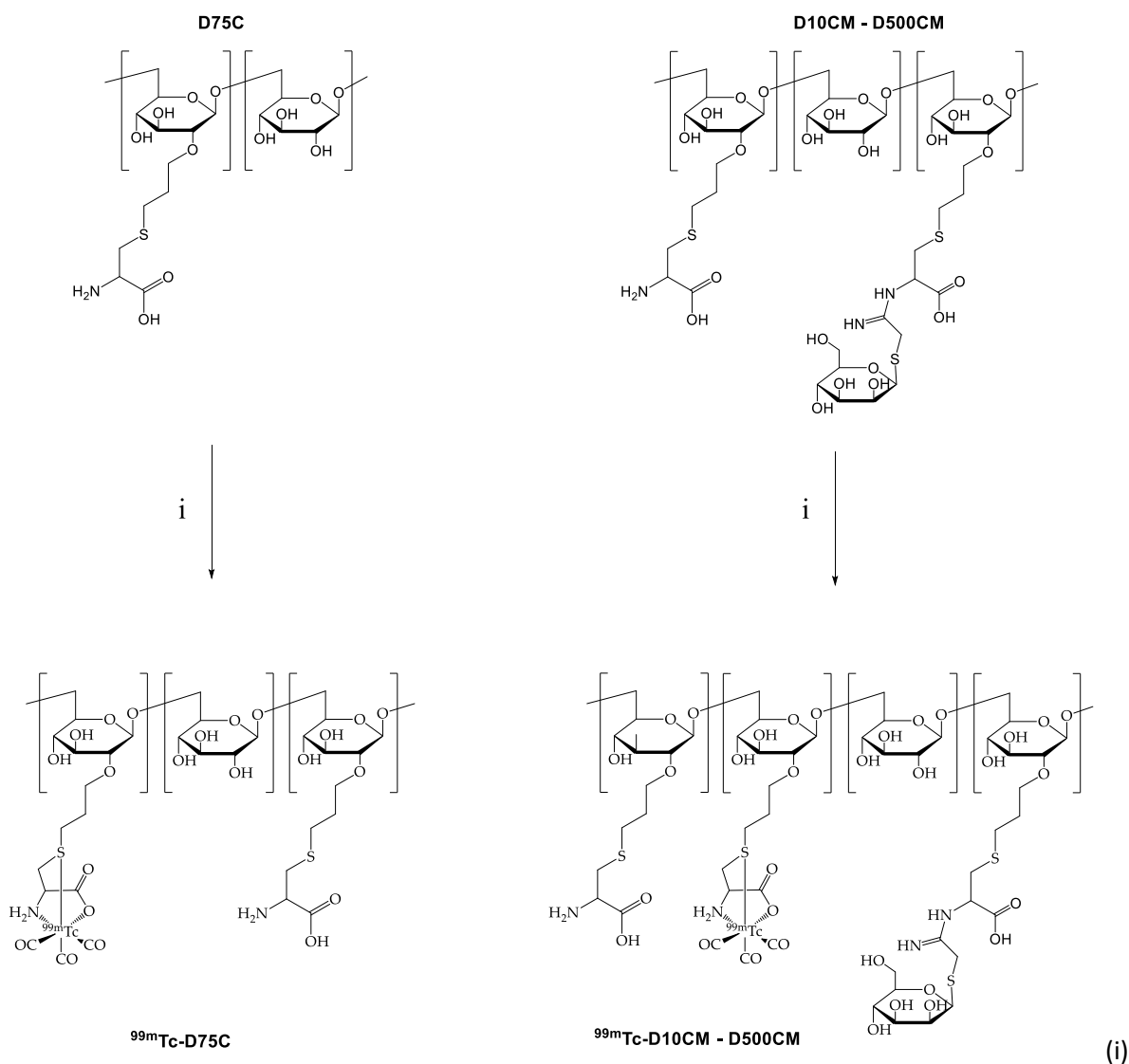
**Πίνακας 14.1.** Χρόνοι έκλουσης των συμπλόκων του <sup>99m</sup>Tc

Σύμπλοκο		t <sub>R</sub> (min)	Απόδοση
$fac-[^{99m}Tc(D_{75}C)(CO)_3]$	<b>16'</b>	12.0	>98%
$fac-[^{99m}Tc(D_{10}CM)(CO)_3]$	<b>19'</b>	12.3	>98%
$fac-[^{99m}Tc(D_{20}CM)(CO)_3]$	<b>20'</b>	12.4	>98%
$fac-[^{99m}Tc(D_{40}CM)(CO)_3]$	<b>21'</b>	12.5	>98%
$fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$	<b>22'</b>	12.5	>98%
$fac-[^{99m}Tc(D_{150}CM)(CO)_3]$	<b>23'</b>	12.9	>98%
$fac-[^{99m}Tc(D_{500}CM)(CO)_3]$	<b>24'</b>	13.0	>98%



**Σχήμα 14.1.** Χρωματογραφική ανάλυση των (α)  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , (β)  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , και (γ)  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **22'**, με RP-HPLC





**Σχήμα 14.2.** Σχηματική απεικόνιση σύνθεσης των συμπλόκων <sup>99m</sup>Tc-D<sub>75</sub>C, 16', και <sup>99m</sup>Tc-D<sub>10</sub>CM – <sup>99m</sup>Tc-D<sub>500</sub>CM, 19'-24'. i) fac-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0.5 - 1.0 mL, 37 - 740 MBq), pH 7, 15 min, 100°C

#### 14.2. Πειράματα σταθερότητας των συμπλόκων με <sup>99m</sup>Tc

Για τα σύμπλοκα **16'** και **19'-24'** μελετήθηκε η σταθερότητά τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Το διάλυμα της επισήμανσης αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες και αναλύεται με HPLC. Τα αποτελέσματα (Πίνακας 14.2) δείχνουν ότι τα σύμπλοκα παραμένουν σταθερά στο μείγμα της αντίδρασης.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η σταθερότητα των συμπλόκων **16'** και **19'-24'** παρουσία περίσσειας κυστεΐνης ή ιστιδίνης (10<sup>-3</sup> M) στους 37°C στις 1, 3 και στις 6 ώρες. Παρουσία των

ισχυρών ανταγωνιστών (Cys/His Challenge) τα σύμπλοκα παρέμειναν σταθερά τόσο στη 1 όσο και στις 3 και 6 ώρες σε υψηλά ποσοστά (Πίνακας 14.3).

**Πίνακας 14.2.** Σταθερότητα των συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$  στο διάλυμα της επισήμανσης

Σύμπλοκο	Διάλυμα Επισήμανσης			
	1 h	3 h	6 h	24 h
16'	>98%	>98%	>98%	>98%
19'	>98%	>98%	>98%	>98%
20'	>98%	>98%	>98%	>98%
21'	>98%	>98%	>98%	>98%
22'	>98%	>98%	>98%	>98%
23'	>98%	>98%	>98%	>98%
24'	>98%	>98%	>98%	>98%

**Πίνακας 14.3.** Σταθερότητα των συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$  παρουσία ανταγωνιστών

Σύμπλοκο	Cys/His Challenge		
	1 h	3 h	6 h
16'	>98%	>95%	>95%
19'	>98%	>95%	>95%
20'	>98%	>95%	>95%
21'	>98%	>95%	>95%
22'	>98%	>95%	>95%
23'	>98%	>95%	>95%
24'	>98%	>95%	>95%

### 14.3. Βιολογική αξιολόγηση των συμπλόκων $^{99m}\text{Tc}$

Αρχικά μελετήθηκαν τα σύμπλοκα  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{10}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **19'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{20}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **20'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{40}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **21'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **22'**,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{150}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **23'** και  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{500}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **24'**. Η *in vivo* μελέτη της φαρμακοκινητικής των συμπλόκων **19'-24'** έγινε σε λευκά θηλυκά ποντίκια τύπου Swiss Albino μέσου βάρους περίπου 30 g, τα οποία έλαβαν δόση 20  $\mu\text{L}$  (2  $\mu\text{Ci}$ , 0.05  $\mu\text{g}$  DCM).

Η χορήγηση του διαλύματος των, προς μελέτη, συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$  έγινε με υποδόρια ένεση στο πέλμα κάθε πειραματόζωου και ακολούθησαν μαλάξεις στο σημείο ένεσης για 5 λεπτά. Ακριβώς 10 min πριν την πάροδο του καθορισμένου χρονικού διαστήματος για κάθε ζώο, πραγματοποιήθηκε υποδόρια ένεση στο ίδιο πέλμα με διάλυμα χρωστικής μπλε του μεθυλενίου (methylene blue) ώστε να χρωματιστούν οι λεμφαδένες και να είναι ορατοί με γυμνό μάτι κατά τη βιοκατανομή.

Η μελέτη έγινε σε τρεις χρόνους, στα 15, 60 και 180 min μετά τη χορήγηση του διαλύματος των συμπλόκων. Με τον τρόπο αυτό, μελετήθηκε η κατανομή των συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$  στα όργανα των πειραματόζωων και υπολογίστηκε η % δόση ανά όργανο και ανά γραμμάριο βάρους. Στους πίνακες 14.4, 14.5 και 14.6 παρουσιάζονται αποτελέσματα της βιοκατανομής των συμπλόκων του  $^{99m}\text{Tc}$ , **19'-24'**, στα 15, 60 και 180 λεπτά, αντίστοιχα, εκφραζόμενα ως % δόση ανά όργανο (ID/organ) για τον 1<sup>ο</sup> λεμφαδένα, 2<sup>ο</sup> λεμφαδένα και το πέλμα που πραγματοποιήθηκε η ένεση και ανά γραμμάριο βάρους οργάνου (ID/g) για το ήπαρ, καρδιά, στομάχι, νεφρά, σπλήνα, πνεύμονες, έντερα καθώς και δείγματα από τους μύες.

**Πίνακας 14.4.** Βιολογική κατανομή των συμπλόκων  $fac-[^{99m}Tc(D_{10-500}CM)(CO)_3]$ , 19'-24', σε πειραματόζωα 15 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα

ΟΡΓΑΝΟ	$^{99m}Tc-D_{10}CM$	$^{99m}Tc-D_{20}CM$	$^{99m}Tc-D_{40}CM$	$^{99m}Tc-D_{75}CM$	$^{99m}Tc-D_{150}CM$	$^{99m}Tc-D_{500}CM$
ΑΙΜΑ	0.76 ± 0.18	0.52 ± 0.12	1.60 ± 0.82	1.93 ± 0.91	2.06 ± 0.14	1.53 ± 0.44
ΗΠΑΡ	2.77 ± 0.42	1.08 ± 0.40	2.65 ± 1.29	3.62 ± 0.87	3.72 ± 0.75	1.37 ± 0.27
ΚΑΡΔΙΑ	0.87 ± 0.24	0.18 ± 0.02	0.72 ± 0.21	0.44 ± 0.12	0.57 ± 0.07	0.29 ± 0.09
ΝΕΦΡΟΙ	3.12 ± 0.38	1.59 ± 0.11	2.20 ± 0.87	2.22 ± 0.47	3.06 ± 0.86	1.52 ± 0.51
ΣΤΟΜΑΧΙ	0.15 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.46 ± 0.28	0.33 ± 0.17	0.24 ± 0.09	0.77 ± 0.30
ΕΝΤΕΡΑ	0.22 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.33 ± 0.11	0.36 ± 0.12	0.34 ± 0.08	0.21 ± 0.11
ΣΠΛΗΝΑΣ	0.52 ± 0.01	0.31 ± 0.08	0.81 ± 0.48	0.73 ± 0.22	0.38 ± 0.18	0.50 ± 0.23
ΜΥΣ	0.11 ± 0.00	0.06 ± 0.02	0.29 ± 0.18	0.17 ± 0.11	0.18 ± 0.04	0.11 ± 0.03
ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	0.32 ± 0.08	0.19 ± 0.12	1.33 ± 0.59	0.96 ± 0.50	1.11 ± 0.40	0.62 ± 0.21
ΟΥΡΑ*	1.94 ± 0.30	0.95 ± 0.37	0.76 ± 0.27	2.06 ± 0.74	2.03 ± 0.52	1.64 ± 0.18
1 <sup>ος</sup> ΛΕΜΦ.*	4.71 ± 0.13	3.04 ± 0.36	1.61 ± 0.39	4.20 ± 0.84	4.16 ± 0.75	3.53 ± 0.44
2 <sup>ος</sup> ΛΕΜΦ.*	1.84 ± 0.05	1.77 ± 0.39	0.49 ± 0.07	0.99 ± 0.75	0.97 ± 0.30	1.22 ± 0.10
ΣΗΜ.ΕΝΕΣΗΣ*	68.24 ± 0.70	74.68 ± 0.72	63.11 ± 2.94	66.84 ± 1.96	63.28 ± 1.51	72.47 ± 2.72

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/g \* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/organ

**Πίνακας 14.5.** Βιολογική κατανομή των συμπλόκων  $fac-[^{99m}Tc(D_{10-500}CM)(CO)_3]$ , 19'-24', σε πειραματόζωα 60 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα

ΟΡΓΑΝΟ	$^{99m}Tc-D_{10}CM$	$^{99m}Tc-D_{20}CM$	$^{99m}Tc-D_{40}CM$	$^{99m}Tc-D_{75}CM$	$^{99m}Tc-D_{150}CM$	$^{99m}Tc-D_{500}CM$
ΑΙΜΑ	0.31 ± 0.02	0.10 ± 0.03	1.62 ± 0.23	0.40 ± 0.19	0.92 ± 0.03	0.75 ± 0.15
ΗΠΑΡ	3.86 ± 0.55	1.38 ± 0.13	1.70 ± 0.71	3.70 ± 1.44	3.76 ± 0.22	2.72 ± 0.25
ΚΑΡΔΙΑ	0.27 ± 0.03	0.14 ± 0.06	0.56 ± 0.10	0.34 ± 0.11	0.28 ± 0.04	0.18 ± 0.02
ΝΕΦΡΟΙ	1.84 ± 1.15	0.40 ± 0.03	1.02 ± 0.51	0.90 ± 0.09	1.97 ± 0.47	0.92 ± 0.15
ΣΤΟΜΑΧΙ	0.32 ± 0.11	0.05 ± 0.04	0.85 ± 0.33	0.29 ± 0.04	0.14 ± 0.08	0.86 ± 0.54
ΕΝΤΕΡΑ	0.31 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.62 ± 0.08	0.33 ± 0.08	0.73 ± 0.31	0.28 ± 0.03
ΣΠΛΗΝΑΣ	0.95 ± 0.29	0.44 ± 0.14	1.92 ± 0.40	1.43 ± 1.33	1.82 ± 0.39	0.78 ± 0.12
ΜΥΣ	0.10 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.06 ± 0.01
ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	0.24 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.91 ± 0.05	0.31 ± 0.06	0.39 ± 0.12	0.29 ± 0.03
ΟΥΡΑ*	0.79 ± 0.70	1.73 ± 1.22	0.85 ± 1.21	1.69 ± 2.39	1.48 ± 0.42	2.31 ± 1.55
1 <sup>ος</sup> ΛΕΜΦ.*	7.49 ± 0.88	8.36 ± 0.73	7.40 ± 0.89	15.00 ± 1.50	11.73 ± 0.64	5.80 ± 0.58
2 <sup>ος</sup> ΛΕΜΦ.*	2.28 ± 0.19	2.37 ± 0.30	2.00 ± 0.31	1.81 ± 0.77	2.17 ± 0.29	1.93 ± 0.49
ΣΗΜ.ΕΝΕΣΗΣ*	64.03 ± 1.56	71.41 ± 0.92	51.59 ± 4.25	53.20 ± 2.96	56.34 ± 3.69	68.15 ± 3.88

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/g \* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/organ

**Πίνακας 14.6.** Βιολογική κατανομή των συμπλόκων  $fac-[^{99m}Tc(D_{10-500}CM)(CO)_3]$ , 19'-24', σε πειραματόζωα 180 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα

ΟΡΓΑΝΟ	$^{99m}Tc-D_{10}CM$	$^{99m}Tc-D_{20}CM$	$^{99m}Tc-D_{40}CM$	$^{99m}Tc-D_{75}CM$	$^{99m}Tc-D_{150}CM$	$^{99m}Tc-D_{500}CM$
ΑΙΜΑ	0.23 ± 0.01	0.08 ± 0.02	1.17 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.29 ± 0.12	0.20 ± 0.02
ΗΠΑΡ	2.75 ± 0.59	1.79 ± 0.35	3.85 ± 2.03	2.22 ± 0.16	4.14 ± 1.94	3.30 ± 0.34
ΚΑΡΔΙΑ	0.19 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.35 ± 0.03	0.27 ± 0.06	0.10 ± 0.01
ΝΕΦΡΟΙ	1.17 ± 0.66	0.51 ± 0.21	0.76 ± 0.92	0.76 ± 0.13	1.74 ± 0.39	0.52 ± 0.09
ΣΤΟΜΑΧΙ	0.31 ± 0.10	0.25 ± 0.17	1.10 ± 0.44	1.08 ± 0.66	0.48 ± 0.37	1.02 ± 0.29
ΕΝΤΕΡΑ	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.18	1.68 ± 0.13	0.81 ± 0.60	0.63 ± 0.13	0.32 ± 0.04
ΣΠΛΗΝΑΣ	0.39 ± 0.08	0.39 ± 0.10	1.13 ± 0.51	1.19 ± 0.33	1.82 ± 0.97	1.68 ± 0.94
ΜΥΣ	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.75 ± 0.41	0.34 ± 0.11	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.01
ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	0.18 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.30 ± 0.27	0.38 ± 0.06	0.26 ± 0.05	0.13 ± 0.01
ΟΥΡΑ*	4.37 ± 2.19	1.32 ± 1.83	1.80 ± 1.27	4.45 ± 3.23	5.58 ± 1.72	5.15 ± 0.60
1 <sup>ος</sup> ΛΕΜΦ.*	7.73 ± 0.75	6.44 ± 1.01	8.79 ± 0.25	13.53 ± 0.45	12.54 ± 1.93	7.53 ± 1.41
2 <sup>ος</sup> ΛΕΜΦ.*	2.29 ± 0.52	1.65 ± 0.69	2.28 ± 0.24	1.49 ± 0.20	2.11 ± 0.23	2.30 ± 0.59
ΣΗΜ.ΕΝΕΣΗΣ*	62.60 ± 1.23	70.78 ± 0.97	46.84 ± 4.57	51.04 ± 1.20	55.20 ± 4.12	62.52 ± 3.19

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/g \* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/organ

Για τα επισημασμένα με  $^{99m}Tc$  μαννοζυλιωμένα παράγωγα δεξτράνης αυτής της εργασίας, όσον αφορά την κάθαρση της ραδιενέργειας από το σημείο της ένεσης, μέχρι τα 15 λεπτά, 25-37% της ενιόμενης δόσης (ID) απομακρύνθηκε από το πέλμα. Το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, ξεπέρασε το 40% ID. Οι τιμές δεν ήταν πολύ διαφορετικές μεταξύ των έξι παραγόντων, όμως, η απομάκρυνση από το σημείο της ένεσης ήταν μεγαλύτερη για το σύμπλοκο **21'** (46.84% ID) και μικρότερη για το **20'** (70.78% ID), μέχρι τα 180 λεπτά. Γενικά, μετά τα 60 λεπτά, η πρόσληψη στο σημείο της ένεσης παρέμεινε σχετικά σταθερή σε ένα εύρος από 46 μέχρι 70%.

Τα δεδομένα βιοκατανομών στα 15 λεπτά μετά την ένεση (Πίνακας 14.4) έδειξαν παρόμοια πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα για όλα τα σύμπλοκα, παρότι το σύμπλοκο **21'** είχε λίγο χαμηλότερη, 1.61% ID, και τα σύμπλοκα **19'** και **22'** υψηλότερη, με τιμές 4.71% ID και 4.20% ID, αντίστοιχα.

Στα 60 λεπτά μετά την ένεση (Πίνακας 14.5), το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, έδειξε ιδιαίτερως υψηλή πρόσληψη (15.00% ID) στο φρουρό λεμφαδένα, ενώ η πρόσληψη στον δεύτερο, ως προς το σημείο της ένεσης, λεμφαδένα παρέμεινε χαμηλή (1.81% ID). Ταυτόχρονα, και το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{150}CM)(CO)_3]$ , **23'**, έδειξε υψηλή πρόσληψη στον φρουρό λεμφαδένα (11.73% ID), μαζί με μια υψηλή αναλογία  $1^{ou}/2^{ou}$  λεμφαδένα (5.40). Γενικά, η πρόσληψη στο φρουρό

λεμφαδένα αυξήθηκε για όλα τα σύμπλοκα στα 60 λεπτά μετά την ένεση, σε ένα εύρος από 5.80 μέχρι 15% ID.

Στα 180 λεπτά μετά την ένεση (Πίνακας 14.6), η παρατηρούμενη πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα για τα σύμπλοκα **19'** (7.73% ID), **20'** (6.44% ID), **21'** (8.79% ID) και **24'** (7.53% ID) ήταν σε υψηλά επίπεδα, ενώ, μεταξύ αυτών των παραγόντων, το σύμπλοκο **20'** είχε τη μεγαλύτερη αναλογία  $1^{ου}/2^{ου}$  λεμφαδένα (3.90). Τα σύμπλοκα  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, 13.53% ID, και  $fac-[^{99m}Tc(D_{150}CM)(CO)_3]$ , **23'**, 12.54% ID, έδειξαν και τα δύο εξαιρετικά υψηλή πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα.

Τα σύμπλοκα παρουσίασαν γρήγορη απομάκρυνση από το αίμα με μια πιο ήπια μείωση μετά τα 60 λεπτά, όπου μόνο ίχνη ραδιενέργειας ανιχνεύθηκαν για τα σύμπλοκα **19'**, **20'**, **22'**, **23'** και **24'**. Το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{40}CM)(CO)_3]$ , **21'**, διατήρησε 1.17% ID πρόσληψη στο αίμα στα 180 λεπτά μετά την ένεση. Η ραδιενέργεια στο στομάχι και τον σπλήνα σε όλα τα χρονικά διαστήματα ήταν ελάχιστη και οι υψηλότερες τιμές στο στομάχι (1.10% ID) και τον σπλήνα (1.92% ID) παρατηρήθηκαν στα σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{40}CM)(CO)_3]$ , **21'**, στα 180 και 60 λεπτά, αντίστοιχα.

Όλα τα σύμπλοκα είχαν αυξανόμενη πρόσληψη στο ήπαρ και, ιδιαίτερα, το σύμπλοκο **23'** είχε τις υψηλότερες τιμές, 3.72% ID στα 15 λεπτά μετά την ένεση, 3.76% ID στα 60 λεπτά μετά την ένεση και 4.14% ID στα 180 λεπτά μετά την ένεση. Η πρόσληψη στο ήπαρ αυξήθηκε ή παρέμεινε σταθερή για όλα τα σύμπλοκα από τα 15 μέχρι και τα 180 λεπτά. Ταυτόχρονα, μικρή πρόσληψη στα έντερα παρατηρήθηκε στα 15 λεπτά μετά την ένεση για όλους τους παράγοντες, παρότι σε μετέπειτα χρόνους η πρόσληψη αυτή αυξήθηκε και το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{40}CM)(CO)_3]$ , **21'**, είχε την μεγαλύτερη τιμή στα 180 λεπτά μετά την ένεση, 1.68% ID.

Ακολουθώντας την οδό απέκκρισης των παραγόντων, ούρα συλλέχθηκαν από τα πειραματόζωα μέχρι και 180 λεπτά μετά την ένεση. Τα σύμπλοκα είχαν χαμηλή πρόσληψη στα ούρα στα 15 λεπτά, χωρίς ιδιαίτερες αλλαγές με την πάροδο του χρόνου. Τα σύμπλοκα **23'** (1.48% ID) και **24'** (2.31% ID) έδειξαν μια αξιοσημείωτη πρόσληψη στα 60 λεπτά μετά την ένεση, η οποία αυξήθηκε περαιτέρω στα 180 λεπτά, 5.58% ID και 5.15% ID, αντίστοιχα.

Για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων και σε συνδυασμό με τα καλά αποτελέσματα για το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, μελετήθηκε, επίσης, η βιοκατανομή του συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}C)(CO)_3]$ , **16'**, το οποίο φέρει το μη μαννοζυλιωμένο παράγωγο  $D_{75}C$ , **16**. Το σύμπλοκο **16'** (Πίνακας 14.7), έδειξε ταχεία κάθαρση από το σημείο της ένεσης με 24.05% ID στα 180 λεπτά μετά την ένεση, όμως, παρατηρήθηκε ελάχιστη πρόσληψη στον φρουρό λεμφαδένα (1.04-2.43% ID) και υψηλές τιμές ραδιενέργειας στο αίμα ( $6.16 - 10.13 \% \text{ ID/g}$ ) και τα ούρα ( $22.46 \pm 3.55\% \text{ ID}$ ), στα 180 λεπτά μετά την ένεση.

**Πίνακας 14.7.** Συγκριτική βιολογική κατανομή του συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}C)(CO)_3]$ , 16', και  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , 23', σε πειραματόζωα σε α) 15, β) 60 και γ) 180 min p.i. μετά από ένεση στο πέλμα

ΟΡΓΑΝΟ	$^{99m}Tc-D_{75}C$			$^{99m}Tc-D_{75}CM$		
	15 min	60 min	180 min	15 min	60 min	180 min
ΑΙΜΑ	6.16 ± 1.23	10.10 ± 2.19	10.13 ± 1.36	1.93 ± 0.91	0.40 ± 0.19	0.18 ± 0.04
ΗΠΑΡ	2.11 ± 0.23	3.22 ± 0.39	3.22 ± 0.61	3.62 ± 0.87	3.70 ± 1.44	2.22 ± 0.16
ΚΑΡΔΙΑ	0.99 ± 0.24	1.65 ± 0.56	1.88 ± 0.46	0.44 ± 0.12	0.34 ± 0.11	0.35 ± 0.03
ΝΕΦΡΟΙ	5.28 ± 1.00	5.61 ± 1.16	4.92 ± 0.86	2.22 ± 0.47	0.90 ± 0.09	0.76 ± 0.13
ΣΤΟΜΑΧΙ	0.46 ± 0.10	1.32 ± 0.92	1.38 ± 0.35	0.33 ± 0.17	0.29 ± 0.04	1.08 ± 0.66
ΕΝΤΕΡΑ	0.40 ± 0.08	0.54 ± 0.11	1.00 ± 0.13	0.36 ± 0.12	0.33 ± 0.08	0.81 ± 0.60
ΣΠΛΗΝΑΣ	0.58 ± 0.07	1.08 ± 0.29	1.99 ± 0.47	0.73 ± 0.22	1.43 ± 1.33	1.19 ± 0.33
ΜΥΣ	0.19 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.34 ± 0.07	0.17 ± 0.11	0.15 ± 0.03	0.34 ± 0.11
ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	1.44 ± 0.07	2.32 ± 0.65	2.43 ± 0.07	0.96 ± 0.50	0.31 ± 0.06	0.38 ± 0.06
ΟΥΡΑ*	2.47 ± 1.32	6.54 ± 4.84	22.46 ± 3.55	2.06 ± 0.74	1.69 ± 2.39	4.45 ± 3.23
1ος ΛΕΜΦ.*	1.04 ± 0.37	1.94 ± 0.80	2.43 ± 0.64	4.20 ± 0.84	15.00 ± 1.50	13.53 ± 0.45
2ος ΛΕΜΦ.*	0.53 ± 0.38	0.80 ± 0.34	1.72 ± 1.13	0.99 ± 0.75	1.81 ± 0.77	1.49 ± 0.20
ΣΗΜ.ΕΝΕΣΗΣ*	60.91 ± 1.52	42.63 ± 3.27	24.05 ± 1.61	66.84 ± 1.96	53.20 ± 2.96	51.04 ± 1.20

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/g \* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/organ

*In vivo* πειράματα σε ποντίκια με τα σύμπλοκα **19'-24'** έδειξαν ότι σε όλα τα σύμπλοκα, το 25-37% της ενιόμενης ραδιενέργειας απομακρύνθηκε γρήγορα από το σημείο της ένεσης στα 15 λεπτά. Πιο αργή κάθαρση παρατηρήθηκε μέχρι τα 60 λεπτά, η οποία και παρέμεινε σχετικά σταθερή μέχρι και τα 180 λεπτά.

Στα 15 λεπτά μετά την ένεση, η πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα σε σχέση με το δεύτερο λεμφαδένα για το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, είχε μια ιδιαίτερως υψηλή αναλογία (4.24), δικαιολογώντας επίμονη αρχική πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα με χαμηλή διαρροή σε δευτερεύοντες λεμφαδένες. Στα 60 λεπτά μετά την ένεση στο πέλμα, η πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα αυξήθηκε για όλα τα σύμπλοκα, με το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, και  $fac-[^{99m}Tc(D_{150}CM)(CO)_3]$ , **23'**, να είχαν τις μεγαλύτερες τιμές. Την ίδια στιγμή, το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, είχε την υψηλότερη αναλογία 1<sup>ου</sup>/2<sup>ου</sup> λεμφαδένα (8.28), δείχνοντας τον αποτελεσματικό εντοπισμό του φρουρού λεμφαδένα με ελάχιστη πρόσληψη από τους επόμενους

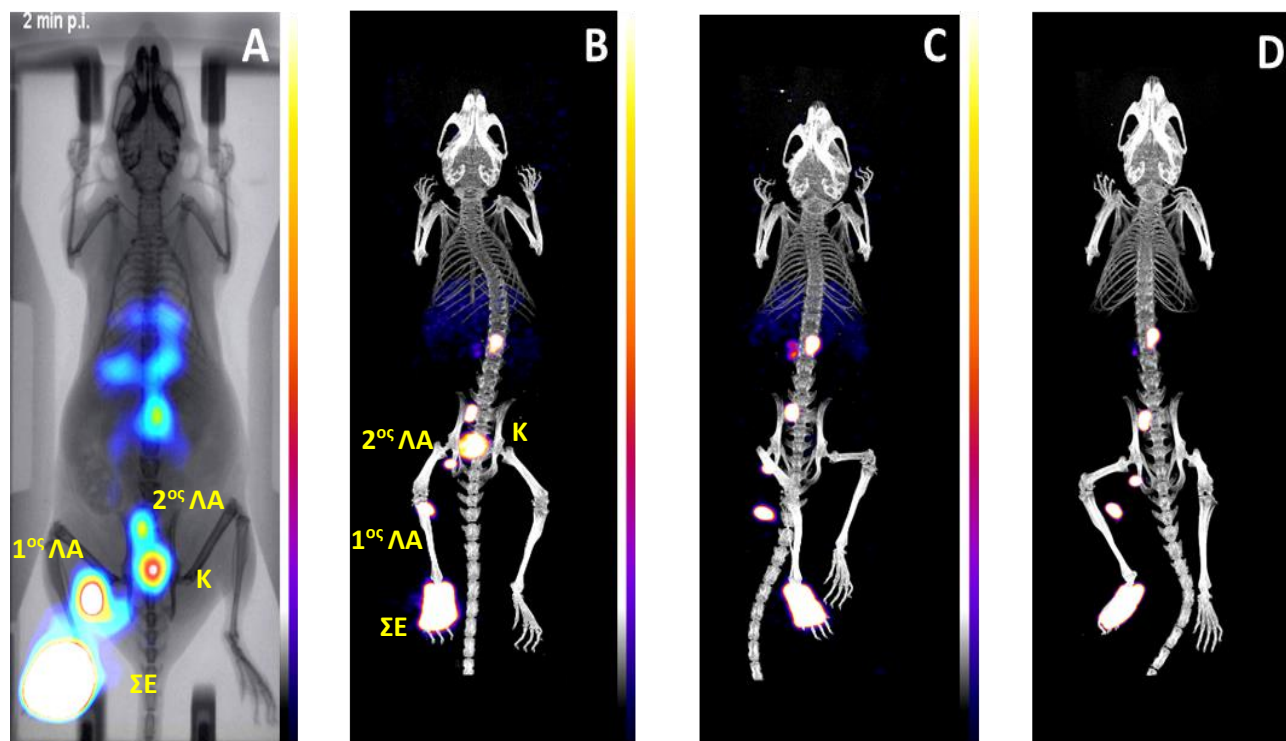
λεμφαδένες. Μέχρι τα 180 λεπτά, οι τιμές για όλα τα σύμπλοκα αυξήθηκαν περαιτέρω ή παρέμειναν σταθερές. Τα  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, και  $fac-[^{99m}Tc(D_{150}CM)(CO)_3]$ , **23'**, ξανά, έδειξαν τις υψηλότερες τιμές. Η αναλογία 1<sup>ου</sup>/2<sup>ου</sup> λεμφαδένα ήταν 9,08 και 5,94, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας μια επιλεκτική δραστηριότητα για την ανίχνευση του φρουρού λεμφαδένα. Η αλληλεπίδραση των μαννοζυλιωμένων παραγώγων δεξτράνης με τους υποδοχείς μαννόζης υποστηρίχθηκε περαιτέρω με την χαμηλή πρόσληψη του μη μαννοζυλιωμένου παραγώγου  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}C)(CO)_3]$ , **16'**.

Σε όλα τα σύμπλοκα παρατηρήθηκε γρήγορη αιματική κάθαρση, γεγονός το οποίο προσφέρει ένα ευνοϊκό υπόστρωμα για την απεικόνιση των επιθυμητών ιστών. Η απουσία ραδιενέργειας στο στομάχι και τον σπλήνα στα 180 λεπτά μετά την ένεση για όλα τα σύμπλοκα καταδεικνύει πως είναι σταθερά και δεν οξειδώνονται προς υπερτεχνητικά ( $^{99m}TcO_4^-$ ) και κολλοειδή του τεχνητίου ( $^{99m}TcO_2$ ). Η αυξανόμενη πρόσληψη στο ήπαρ ενδεχομένως οφείλεται στην έκφραση του υποδοχέα μαννόζης (CD206) στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Τα σύμπλοκα προσλαμβάνονται στο ήπαρ μέσω ενός μηχανισμού μεσολαβούμενου από υποδοχέα κατά τη μετάβαση από το λεμφικό σύστημα στη συστηματική κυκλοφορία.

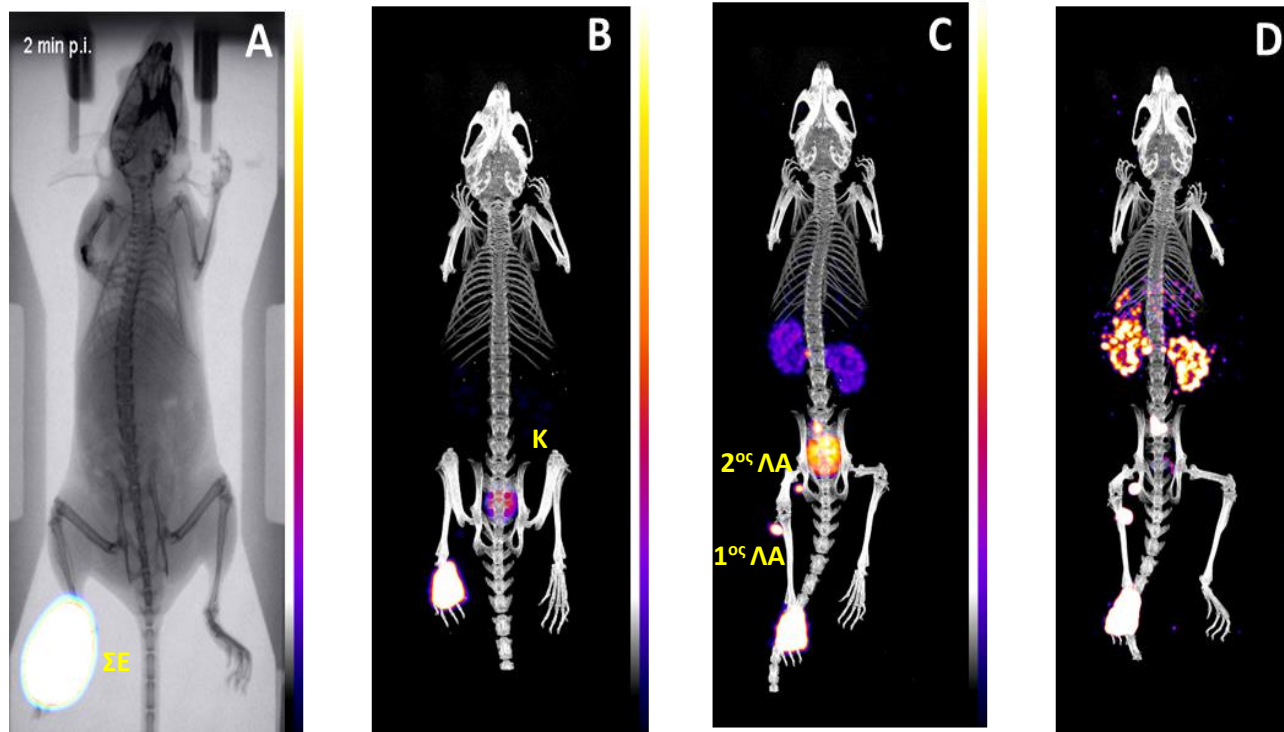
Τα αποτελέσματα των βιοκατανομών διαδέχθηκαν μελέτες απεικόνισης με SPECT/CT κάμερα πειραματόζωων. Πραγματοποιήθηκε στατική και δυναμική απεικόνιση μετά από υποδόρια ένεση στο πέλμα, του συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'** (Εικόνα 14.1), που έδειξε τα καλύτερα βιολογικά αποτελέσματα στις μελέτες βιοκατανομής και του συμπλόκου  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}C)(CO)_3]$ , **16'** (Εικόνα 14.2), που φέρει το μη μαννοζυλιωμένο παράγωγο  $D_{75}C$ , **16**.

Διάλυμα αντίδρασης του εκάστοτε συμπλόκου του  $^{99m}Tc$  (20  $\mu$ L, 250  $\mu$ Ci) χορηγείται με ένεση στο πέλμα του πειραματόζωου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14.1, το σύμπλοκο  $fac-[^{99m}Tc(D_{75}CM)(CO)_3]$ , **22'**, σε δυναμική απεικόνιση μισής ώρας, έχει ξεκάθαρη πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα, η οποία και παραμένει στις στατικές εικόνες των 1, 3 και 24 ωρών. Αντίθετα το μη μαννοζυλιωμένο παράγωγο, δείχνει μια τελείως διαφορετική εικόνα. Δεν προσλαμβάνεται καθόλου στο φρουρό λεμφαδένα και κατά την απομάκρυνση του από το σημείο της ένεσης απεκκρίνεται ολοκληρωτικά στα ούρα με ελάχιστη καθήλωση στο ήπαρ.





**Εικόνα 14.1:** 2D και 3D απεικόνιση μετά από ένεση στο πέλμα σε μύ με το σύμπλοκο του Tc-99m με μαννοζυλιωμένη δεξτράνη,  $^{99m}\text{Tc-D}_{75}\text{CM}$ , ως παράγοντας στόχευσης λεμφαδένων σε υγιή Swiss Albino μυ. Ένας επισημασμένος με Tc-99m παράγοντας στόχευσης λεμφαδένων, μετά από ένεση στο πέλμα, με απεικόνιση 2D και 3D αντίστοιχα. (Α) Δυναμική απεικόνιση αμέσως μετά τη χορήγηση για 30 λεπτά με  $\gamma\text{-eye}^{\text{TM}}$  (Β) Τομογραφική απεικόνιση 1 ώρα μετά την ένεση για 30 λεπτά, (Γ) Τομογραφική απεικόνιση 3 ώρες μετά την χορήγηση για 30 λεπτά (Δ) Τομογραφική απεικόνιση 24 ώρες μετά την χορήγηση για 50 λεπτά με  $x\text{-CUBE}^{\text{TM}}$  /  $\gamma\text{-CUBE}^{\text{TM}}$ , αντίστοιχα. Η χρωματική μπάρα έδειξε το επίπεδο συσσώρευσης (δηλαδή, το λευκό είναι το υψηλότερο και το μωβ το χαμηλότερο). 1<sup>ος</sup> Λεμφαδένας (1<sup>ος</sup> ΛΑ), 2<sup>ος</sup> Λεμφαδένας (2<sup>ος</sup> ΛΑ), Κύστη (Κ), Σημείο ένεσης (ΣΕ).

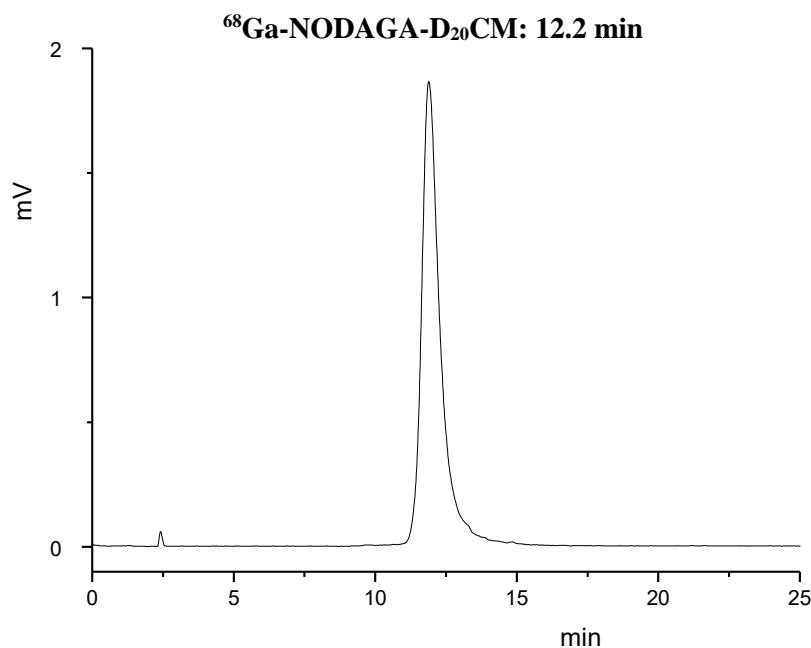


**Εικόνα 14.2:** 2D και 3D απεικόνιση μετά από ένεση στο πέλμα σε μύ με το σύμπλοκο του Tc-99m με μη μαννοζυλιωμένη δεξτράνη,  $^{99m}\text{Tc-D}_{75}\text{C}$ . Ένας επισημασμένος με Tc-99m παράγοντας, μετά από ένεση στο πέλμα, με απεικόνιση 2D και 3D αντίστοιχα. (Α) Δυναμική απεικόνιση αμέσως μετά τη χορήγηση για 30 λεπτά με  $\gamma\text{-eye}^{\text{TM}}$  (Β) Τομογραφική απεικόνιση 1 ώρα μετά την ένεση για 30 λεπτά, (Γ) Τομογραφική απεικόνιση 3 ώρες μετά την χορήγηση για 30 λεπτά (Δ) Τομογραφική απεικόνιση 24 ώρες μετά την χορήγηση για 50 λεπτά με  $\alpha\text{-CUBE}^{\text{TM}}$  /  $\gamma\text{-CUBE}^{\text{TM}}$ , αντίστοιχα. Η χρωματική μπάρα έδειξε το επίπεδο συσσώρευσης (δηλαδή, το λευκό είναι το υψηλότερο και το μωβ το χαμηλότερο). 1<sup>ος</sup> Λεμφαδένας (1<sup>ος</sup> ΛΑ), 2<sup>ος</sup> Λεμφαδένας (2<sup>ος</sup> ΛΑ), Κύστη (Κ), Σημείο ένεσης (ΣΕ).

## 15. Σύνθεση, ταυτοποίηση και αξιολόγηση συμπλόκων του $^{68}\text{Ga}$

### 15.1. Σύνθεση και ταυτοποίηση του συμπλόκου του $^{68}\text{Ga}$ , **25'** και **26'**

Η σύνθεση των  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ , **25'**, και  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$  -FITC, **26'**, πραγματοποιείται με προσθήκη  $^{68}\text{GaCl}_3$  σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου στον υποκαταστάτη NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ , **25**, και NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$  -FITC, **26**. Το διάλυμα επωάζεται στους  $70^\circ\text{C}$  για 30 min και στη συνέχεια ελέγχεται με HPLC. Κατά τη χρωματογραφική ανάλυση με HPLC του μίγματος της αντίδρασης εμφανίστηκε μια νέα κορυφή σε χρόνο  $t_R$  12.2 και 12.6 και απόδοση μεγαλύτερη από 95% και στις δύο περιπτώσεις. Ενδεικτική χρωματογραφική ανάλυση με HPLC του συμπλόκου **25'** φαίνεται στο σχήμα 15.1.



**Σχήμα 15.1.** Χρωματογραφική ανάλυση του  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- $\text{D}_{20}\text{CM}$ , 25' με RP-HPLC

## 15.2. Πειράματα σταθερότητας συμπλόκων $^{68}\text{Ga}$

Προκειμένου να αποδειχθεί η σταθερότητα του τελικού προϊόντος ελέγχθηκαν παράμετροι όπως η ραδιοχημική καθαρότητα. Τα φιαλίδια φυλάχθηκαν μέσα σε θωρακισμένη εστία μόλυβδου σε θερμοκρασία μεταξύ 20-27°C. Τα σύμπλοκα **25'** και **26'** βρέθηκαν σταθερά πάνω από 98% σε θερμοκρασία δωματίου ως τις 4 ώρες, όπως φαίνεται στο πίνακα 15.1.

**Πίνακας 15.1.** Σταθερότητα των συμπλόκων του  $^{68}\text{Ga}$  25' και 26'

	Συνθήκες	1 h	2 h	4 h
<b>25'</b>	Θερμοκρασία δωματίου 20-27°C	≥98%	≥98%	≥98%
<b>26'</b>	Θερμοκρασία δωματίου 20-27°C	≥98%	≥98%	≥98%

## 15.3. Βιολογική κατανομή των συμπλόκων $^{68}\text{Ga}$

Μελετήθηκαν τα σύμπλοκα  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-D<sub>20</sub>CM, **25'** και  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- D<sub>20</sub>CM -FITC, **26'**. Η *in vivo* μελέτη της φαρμακοκινητικής των συμπλόκων έγινε σε λευκά θηλυκά ποντίκια τύπου Swiss Albino μέσου βάρους περίπου 30 g, τα οποία έλαβαν δόση 20 μL (2 μCi, 40 μg NODAGA-D<sub>20</sub>CM και NODAGA- D<sub>20</sub>CM -FITC).

Η χορήγηση του διαλύματος των, προς μελέτη, συμπλόκων του  $^{68}\text{Ga}$  έγινε με υποδόρια ένεση στο πέλμα κάθε πειραματόζωου και ακολούθησαν μαλάξεις στο σημείο ένεσης για 5 λεπτά. Ακριβώς 10 min πριν την πάροδο του καθορισμένου χρονικού διαστήματος για κάθε ζώο, πραγματοποιήθηκε υποδόρια ένεση στο ίδιο πέλμα με διάλυμα χρωστικής μπλε του μεθυλενίου (methylene blue) ώστε να χρωματιστούν οι λεμφαδένες και να είναι ορατοί με γυμνό μάτι κατά τη βιοκατανομή.

Η μελέτη έγινε σε τρεις χρόνους, στα 15, 30 και 60 min μετά τη χορήγηση του διαλύματος των συμπλόκων. Με τον τρόπο αυτό, μελετήθηκε η κατανομή των συμπλόκων του  $^{68}\text{Ga}$  στα όργανα των πειραματόζωων και υπολογίστηκε η % δόση ανά όργανο και ανά γραμμάριο βάρους. Στους πίνακες 15.2 και 15.3 παρουσιάζονται αποτελέσματα της βιοκατανομής των συμπλόκων του  $^{68}\text{Ga}$ , **25'** και **26'**, στα 15, 30 και 60 λεπτά, αντίστοιχα, εκφραζόμενα ως % δόση ανά όργανο (ID/organ) για τον 1<sup>ο</sup> λεμφαδένα και το πέλμα που πραγματοποιήθηκε η ένεση και ανά γραμμάριο βάρους οργάνου (ID/g) για το ήπαρ, καρδιά, στομάχι, νεφρά, σπλήνα, πνεύμονες, έντερα καθώς και δείγματα από τους μύες.

**Πίνακας 15.2.** Βιολογική κατανομή του συμπλόκου  $^{68}\text{Ga-NODAGA-D}_{20}\text{CM}$ , 25', σε πειραματόζωα σε  
α) 15, β) 30 και γ) 60 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα

ΟΡΓΑΝΟ	25'		
	15 min	30 min	60 min
ΑΙΜΑ	1.47 ± 0.82	1.30 ± 0.14	1.11 ± 0.30
ΗΠΑΡ	5.87 ± 1.41	9.24 ± 0.19	10.91 ± 1.30
ΚΑΡΔΙΑ	0.43 ± 0.11	0.30 ± 0.09	0.51 ± 0.06
ΝΕΦΡΟΙ	2.09 ± 0.44	2.92 ± 0.45	2.49 ± 0.89
ΣΤΟΜΑΧΙ	0.74 ± 0.66	0.35 ± 0.08	0.67 ± 0.45
ΕΝΤΕΡΑ	0.92 ± 1.00	0.40 ± 0.10	0.43 ± 0.17
ΣΠΛΗΝΑΣ	1.56 ± 0.53	3.55 ± 0.80	3.43 ± 0.21
ΜΥΣ	0.10 ± 0.04	0.10 ± 0.07	0.13 ± 0.10
ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	0.35 ± 0.11	0.41 ± 0.06	0.36 ± 0.06
ΟΥΡΑ*	5.39 ± 2.36	14.88 ± 2.07	12.47 ± 2.94
1 <sup>ος</sup> ΛΕΜΦ.*	1.59 ± 0.47	1.82 ± 0.25	1.93 ± 0.30
ΣΗΜ.ΕΝΕΣΗΣ*	46.90 ± 7.71	42.11 ± 4.50	37.07 ± 5.89

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/g \* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/organ

**Πίνακας 15.3.** Βιολογική κατανομή του συμπλόκου  $^{68}\text{Ga-NODAGA-D}_{20}\text{CM-FITC}$ , 26', σε  
πειραματόζωα σε α) 15, β) 30 και γ) 60 min p.i μετά από ένεση στο πέλμα

ΟΡΓΑΝΟ	26'		
	15 min	30 min	60 min
ΑΙΜΑ	2.17 ± 0.19	1.47 ± 0.12	1.68 ± 0.17
ΗΠΑΡ	1.80 ± 0.70	1.73 ± 0.26	1.92 ± 0.43
ΚΑΡΔΙΑ	0.56 ± 0.22	0.34 ± 0.09	0.36 ± 0.08
ΝΕΦΡΟΙ	2.35 ± 0.48	1.69 ± 0.16	1.41 ± 0.29
ΣΤΟΜΑΧΙ	3.92 ± 1.87	5.47 ± 0.52	10.69 ± 1.78
ΕΝΤΕΡΑ	0.30 ± 0.09	0.39 ± 0.03	0.93 ± 0.20
ΣΠΛΗΝΑΣ	0.47 ± 0.18	0.34 ± 0.04	0.47 ± 0.20
ΜΥΣ	0.23 ± 0.06	0.22 ± 0.10	0.18 ± 0.11
ΠΝΕΥΜΟΝΕΣ	0.98 ± 0.20	0.58 ± 0.16	0.64 ± 0.10
ΟΥΡΑ*	3.57 ± 1.34	7.33 ± 0.06	8.92 ± 1.34
1 <sup>ος</sup> ΛΕΜΦ.*	2.63 ± 0.58	2.61 ± 0.36	2.02 ± 0.93
ΣΗΜ.ΕΝΕΣΗΣ*	60.46 ± 7.66	52.15 ± 4.24	40.61 ± 7.11

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/g \* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ID/organ

Για το επισημασμένο με  $^{68}\text{Ga}$  μαννοζυλιωμένο παράγωγο δεξτράνης **25'** αυτής της εργασίας, όσον αφορά την κάθαρση της ραδιενέργειας από το σημείο της ένεσης μέχρι τα 15 λεπτά, το σύμπλοκο ξεπέρασε το 50% ID και η απομάκρυνση από το σημείο της ένεσης ήταν υψηλή μέχρι τα 60 λεπτά με ποσοστό άνω του 60% ID.

Τα δεδομένα βιοκατανομών στα 15 λεπτά μετά την ένεση έδειξαν αξιοσημείωτη πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα (1.59% ID), με σταθερά μικρή αύξηση της πρόσληψης στα 30 και 60 λεπτά μετά την ένεση, με τιμές 1.82% ID και 1.93% ID, αντίστοιχα.

Οι τιμές % ID έδειξαν μια εξαρχής γρήγορη απομάκρυνση του από το αίμα. Παρατηρήθηκε υψηλή πρόσληψη στο ήπαρ στα 15 λεπτά μετά την ένεση (5.87% ID), η οποία αυξήθηκε περαιτέρω μέχρι τα 60 λεπτά (10.91% ID). Ταυτόχρονα, μικρή πρόσληψη στα έντερα παρατηρήθηκε στα 15 λεπτά μετά την ένεση (0.92% ID) και η πρόσληψη αυτή μειώθηκε περαιτέρω στα 30 λεπτά μετά την ένεση (0.40% ID), οπότε και μετέπειτα παρέμεινε σταθερή.

Ακολουθώντας την οδό απέκκρισης, ούρα συλλέχθηκαν από τα πειραματόζωα μέχρι και 60 λεπτά μετά την ένεση. Το σύμπλοκο είχε χαμηλή πρόσληψη στα ούρα στα 15 λεπτά (5.39% ID) με αξιοσημείωτη αύξηση στα 30 λεπτά (14.88% ID) αλλά χωρίς ιδιαίτερες αλλαγές με την πάροδο του χρόνου ως τα 60 λεπτά.

Στα παραπάνω προστέθηκε και το FITC, μια κοινή φθορίζουσα ουσία ως μοντέλο για πιθανή χρήση του παράγοντα ως εργαλείου απεικόνισης μέσω οπτικής απεικόνισης (optical imaging). Το FITC (Fluorescence isothiocyanate) προστέθηκε στο μαννοζυλιωμένο παράγωγο δεξτράνης NODAGA-D<sub>20</sub>CM και με επισήμανση με  $^{68}\text{Ga}$  λήφθηκε το σύμπλοκο  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-D<sub>20</sub>CM-FITC, **26'**. Η μελέτη βιοκατανομής του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διερευνηθεί κατά πόσο η ύπαρξη του FITC επηρεάζει τη φαρμακοκινητική του συμπλόκου. Η βιολογική αξιολόγηση έδειξε υψηλή συσσώρευση στο φρουρό λεμφαδένα και ταχεία κάθαρση από το σημείο της ένεσης στο πέλμα, κάνοντας σαφή τον εντοπισμό του φρουρού λεμφαδένα.

Συνοπτικά, για το επισημασμένο με  $^{68}\text{Ga}$  μαννοζυλιωμένο παράγωγο δεξτράνης **25** αυτής της εργασίας, το 50-60% της ενιόμενης ραδιενέργειας απομακρύνθηκε γρήγορα από το σημείο της ένεσης από τα 15 λεπτά ως και τα 60 λεπτά. Η πρόσληψη του συμπλόκου στο φρουρό λεμφαδένα ήταν σταθερή, αλλά ικανοποιητική καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Παρατηρήθηκε γρήγορη αιματική κάθαρση, γεγονός το οποίο προσφέρει ένα ευνοϊκό υπόστρωμα για την απεικόνιση των επιθυμητών ιστών. Η υψηλή πρόσληψη στο ήπαρ ενδεχομένως οφείλεται στην έκφραση του υποδοχέα μαννόζης (CD206) στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Η μελέτη βιοκατανομής του συμπλόκου **26'** υπέδειξε ότι η σύνδεση του FITC δεν αλλάζει τη βιοκατανομή του μορίου.

## **ΙΧ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Ο εντοπισμός του φρουρού λεμφαδένα (SLND) αποτελεί σήμερα θέμα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για τη διαχείριση ασθενών με όγκους. Η εισαγωγή μορίων μαννόζης σε δεξτράνες, επισημασμένες με  $^{99m}\text{Tc}$ , έχει δείξει, μέχρι στιγμής, ότι ο φρουρός λεμφαδένας θα μπορούσε να παγιδεύσει αυτούς τους παράγοντες, λόγω της αναγνώρισής τους από τους υποδοχείς μαννόζης των μακροφάγων στους λεμφαδένες.

Η παρούσα διατριβή είχε, ως σκοπό, το σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη βιολογική αξιολόγηση μίας σειράς παραγώγων της μαννοζυλιωμένης δεξτράνης επισημασμένων με  $^{99m}\text{Tc}$  και  $^{68}\text{Ga}$ . Οι ενώσεις σχεδιάστηκαν για να φέρουν μια δεξτράνη, με μοριακό βάρος 10-500 kDa, ως βασικό κορμό, κυστεΐνες, ως SNO χηλικά συστήματα για την επισήμανση με τον μεταλλικό πυρήνα του τεχνητίου,  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ , και μονάδες μαννόζης για σύνδεση με τους υποδοχείς μαννόζης στα μακροφάγα. Επιλεγμένα παράγωγα σχεδιάστηκαν ώστε να φέρουν επιπλέον το χηλικό σύστημα NODAGA, για επισήμανση με  $^{68}\text{GaCl}_3$ , και FITC, ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη, ως φθορίζουσα ουσία-μοντέλο, για πιθανή χρήση στην οπτική απεικόνιση.

Όλα τα παράγωγα συντέθηκαν επιτυχώς, χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία NMR και επισημάνθηκαν με  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  ή  $^{68}\text{GaCl}_3$ . Η επισήμανση με υψηλές αποδόσεις και η υψηλή ραδιοχημική καθαρότητα επιτεύχθηκε για όλα τα παράγωγα. Τα σύμπλοκα ήταν σταθερά με την πάροδο του χρόνου. Τα αποτελέσματα της βιολογικής κατανομής έδειξαν *in vivo* ότι όλα τα σύμπλοκα έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά.

Το αυξανόμενο μοριακό βάρος των αρχικών δεξτράνων, από 10-500 kDa, φαίνεται να μην επηρέασε ιδιαίτερα την κάθαρση από το σημείο της ένεσης. Η πρόσληψη από το φρουρό λεμφαδένα παρουσιάζει παρόμοια εικόνα για όλα τα σύμπλοκα, στα 15 λεπτά μετά την ένεση, με μία αυξητική τάση, έως τα 60 λεπτά, οπότε και μετά παραμένουν σχετικά σταθερά. Στα 60 και 180 λεπτά, η πρόσληψη αυξήθηκε, αυξανόμενου του μοριακού βάρους της αρχικής δεξτράνης, μέχρι και το σύμπλοκο  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{150}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **23'**, οπότε και μετά και ακολούθως πτωτική πορεία.

Από τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν, το σύμπλοκο  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **22'**, έδειξε τα καλύτερα χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα είχε ταχεία κάθαρση από το σημείο της ένεσης, την υψηλότερη πρόσληψη στο φρουρό λεμφαδένα και την υψηλότερη εκλεκτικότητα. Οι απεικονίσεις με κάμερα SPECT/CT πειραματόζων επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα των βιοκατανομών. Τα αποτελέσματα αυτά καθιστούν το σύμπλοκο  $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{D}_{75}\text{CM})(\text{CO})_3]$ , **22'**, υποψήφιο για περαιτέρω αξιολόγηση σε μεγαλύτερα ζώα ή σε κλινικές μελέτες για τη χρήση του, ως νέο ραδιοφάρμακο για την ανίχνευση του φρουρού λεμφαδένα.



## **Χ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Kopka, K. Pharmaceuticals—Special Issue on Radiopharmaceutical Chemistry between Imaging and Endoradiotherapy. *Pharmaceuticals* **7**, 839–849 (2014).
2. Williams, E. D. Radionuclides in diagnosis. *Phys. Educ.* **24**, 306 (1989).
3. Selby, J. B. *Practical Nuclear Medicine. Clinical Nuclear Medicine* **24**, (1999).
4. Khalil, M. M., Tremoleda, J. L., Bayomy, T. B. & Gsell, W. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int. J. Mol. Imaging* **2011**, 1–15 (2011).
5. O'Connor, M. K. & Kemp, B. J. Single-Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography: Basic Instrumentation and Innovations. *Semin. Nucl. Med.* **36**, 258–266 (2006).
6. Cintolo, J. A., Tchou, J. & Pryma, D. A. Diagnostic and prognostic application of positron emission tomography in breast imaging: emerging uses and the role of PET in monitoring treatment response. *Breast Cancer Res. Treat.* **138**, 331–346 (2013).
7. Gambhir, S. S. *et al.* A tabulated summary of the FDG PET literature. *J. Nucl. Med.* **42**, 1S-93S (2001).
8. Alberto, R. Technetium. in *Comprehensive Coordination Chemistry II* **5**, 127–270 (Elsevier, 2003).
9. Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. (2005).
10. DIRAC, P. A. M. The Cosmological Constants. *Nature* **139**, 323–323 (1937).
11. Perrier, C. & Segrè, E. Technetium: The Element of Atomic Number 43. *Nature* **159**, 24–24 (1947).
12. Berthou, V., Galy, J., Magill, J. & Lützenkirchen, K. Nuclides.net: a computational environment for nuclear data and applications in radioprotection and radioecology. *J. Environ. Radioact.* **99**, 581–586 (2008).
13. Hashimoto, K. & Yoshihara, K. Rhenium Complexes Labeled with <sup>186/188</sup>Re for Nuclear Medicine. *Technetium and Rhenium* **176**, 275–292 (1996).
14. Smith, E. M. Internal Dose Calculation for <sup>99m</sup>Tc. *J. Nucl. Med.* **6**, 231–251 (1965).
15. Katcoff, S. Decay of Tc-97 Ground State. *Phys. Rev.* **111**, 575–578 (1958).
16. Castronovo, F. P. Technetium-99m: basic nuclear physics and chemical properties. *Am. J. Hosp. Pharm.* **32**, 480–8 (1975).
17. Pashentsev, V. N. Current State and Prospects of Production of Radionuclide Generators for Medical Diagnosis. *Biomed. Eng. (NY)*. **49**, 340–343 (2016).
18. Abrahams, S. C., Ginsberg, A. P. & Knox, K. Transition Metal-Hydrogen Compounds. II. The Crystal and Molecular Structure of Potassium Rhenium Hydride, K<sub>2</sub>ReH<sub>9</sub>. *Inorg. Chem.* **3**, 558–567 (1964).

19. Liu, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1347–1370 (2008).
20. Harper, P. V.; Beck, R.; Charleston, D.; Lathrop, K. A. Optimization of a scanning method using  $^{99m}\text{Tc}$ . *Nucleonics* **22**, 50 (1964).
21. Rayudu, G. V. S. Production of radionuclides for medicine. *Semin. Nucl. Med.* **20**, 100–110 (1990).
22. Hušák, V. & Vlček, J. Some remarks on  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  generator kinetics. *Eur. J. Nucl. Med.* **7**, 331–332 (1982).
23. J. Baldas, F. C. Technetium (VII) nitridoperoxo complexes. *Inorganica Chim. Acta* **76**, 1–3 (1990).
24. Baldas, J., Boas, J. F., Bonnyman, J. & Williams, G. A. Studies of technetium complexes. Part 6. The preparation, characterisation, and electron spin resonance spectra of salts of tetrachloro- and tetrabromo-nitridotechnetate(VI): crystal structure of tetraphenylarsonium tetrachloronitridotechnetate(VI). *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 2395 (1984). doi:10.1039/dt9840002395
25. Saha, G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy. Fundamentals of Nuclear Pharmacy* (Springer New York, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-5860-0
26. Χιωτέλλης Ε. *Ραδιοφαρμακευτική Χημεία*. (2004).
27. Mazzocchin, G. A., Seeber, R., Mazzi, U. & Roncari, E. Voltammetric behaviour of technetium-99 complexes with  $\pi$ -acceptor ligands in aprotic medium. I. oxidation of  $\text{TcCl}_3(\text{PMe}_2\text{Ph})_3$ . *Inorganica Chim. Acta* **29**, 1–4 (1978).
28. Trop, H. S. *et al.* Electrochemical studies on halide and pseudo-halide complexes of technetium and rhenium. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **41**, 271–272 (1979).
29. Deutsch, E., Libson, K., Jurisson, S. & Lindoy, L. F. Technetium Chemistry and Technetium Radiopharmaceuticals. in *Prog. Inorg. Chem.* **30**, 75–139 (2007).
30. Deutsch, E. *et al.* Cationic Tc-99m complexes as potential myocardial imaging agents. *J. Nucl. Med.* **22**, 897–907 (1981).
31. Trop, H. S. *et al.* Synthesis and physical properties of hexakis(isothiocyanato)technetate(III) and -(IV) complexes. Structure of the  $[\text{Tc}(\text{NCS})_6]^{3-}$  ion. *Inorg. Chem.* **19**, 1105–1110 (1980).
32. Abrams, M. J., Davison, A., Faggiani, R., Jones, A. G. & Lock, C. J. L. Chemistry and structure of hexakis(thiourea-S)technetium(III) trichloride tetrahydrate,  $[\text{Tc}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_6]\text{Cl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . *Inorg. Chem.* **23**, 3284–3288 (1984).
33. Wester, D. W., White, D. H., Miller, F. W. & Dean, R. T. Synthesis and characterization of a technetium phosphite complex: hexakis(trimethyl phosphite)technetium(I)

- tetraphenylborate. *Inorg. Chem.* **23**, 1501–1502 (1984).
34. Vanderheyden, J. L. *et al.* Synthesis and characterization of cationic technetium complexes of 1,2-bis(dimethylphosphino)ethane (DMPE). Structure determinations of trans-[TcV(DMPE)<sub>2</sub>(OH)(O)](F<sub>3</sub>CSO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, trans-[TcIII(DMPE)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]F<sub>3</sub>CSO<sub>3</sub>, and [TcI(DMPE)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> using x-ray diffraction, EXAFS, an. *Inorg. Chem.* **23**, 3184–3191 (1984).
  35. Mazzi, U. The coordination chemistry of technetium in its intermediate oxidation states. *Polyhedron* **8**, 1683–1688 (1989).
  36. Alberto, R. *et al.* Synthesis and reactivity of [NEt<sub>4</sub>]<sub>2</sub>[ReBr<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]. Formation and structural characterization of the clusters [NEt<sub>4</sub>][Re<sub>3</sub>(μ<sub>3</sub>-OH)(μ-OH)<sub>3</sub>(CO)<sub>9</sub>] and [NEt<sub>4</sub>][Re<sub>2</sub>(μ-OH)<sub>3</sub>(CO)<sub>6</sub>] by alkaline titration. *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* 2815–2820 (1994). doi:10.1039/DT9940002815
  37. Alberto, R. *et al.* First Application of *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> in Bioorganometallic Chemistry: Design, Structure, and in Vitro Affinity of a 5-HT 1A Receptor Ligand Labeled with 99m Tc. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6076–6077 (1999).
  38. Schibli, R. & Schubiger, A. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **29**, 1529–1542 (2002).
  39. Alberto, R., Schibli, R., Waibel, R., Abram, U. & Schubiger, A. P. Basic aqueous chemistry of [M(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coord. Chem. Rev.* **190–192**, 901–919 (1999).
  40. Alberto, R. *et al.* A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of [<sup>99m</sup>Tc(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> from [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7987–7988 (1998).
  41. D. R. van Staveren, P. D Benny, Waibel, R., Kurz, P., Pak, J.-K. & Alberto, R. S-Functionalized Cysteine: Powerful Ligands for the Labelling of Bioactive Molecules with Triaquatricarbonyltechnetium-99m(<sup>1+</sup>) [<sup>99m</sup>Tc(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. *Helv. Chim. Acta* **88**, 447–460 (2005).
  42. Karagiorgou, O. *et al.* (S)-(2-(2'-Pyridyl)ethyl)cysteamine and (S)-(2-(2'-Pyridyl)ethyl)- d, l - homocysteine as Ligands for the “ *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ” (M = Re, <sup>99m</sup> Tc) Core. *Inorg. Chem.* **44**, 4118–4120 (2005).
  43. Subramanian, G. & McAfee, J. G. A New Complex of <sup>99m</sup>Tc for Skeletal Imaging. *Radiology* **99**, 192–196 (1971).
  44. Ronai, P. M. *et al.* Technetium-99m-pyridoxylidene-glutamate: a new hepatobiliary radiopharmaceutical. II. Clinical aspects. *J. Nucl. Med.* **16**, 728–37 (1975).
  45. Gemmell, H. G. *et al.* Differential Diagnosis in Dementia Using the Cerebral Blood Flow Agent

- <sup>99m</sup>Tc HM-PAO. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **11**, 398–402 (1987).
46. REID, R. H., GULENCHYN, K. Y., BALLINGER, J. R. & VENTUREYRA, E. C. G. Cerebral Perfusion Imaging with Technetium-99m HMPAO Following Cerebral Trauma. *Clin. Nucl. Med.* **15**, 383–388 (1990).
  47. Laurin, N. R. *et al.* Cerebral perfusion imaging with technetium-99m HMPAO in brain death and severe central nervous system injury. *J. Nucl. Med.* **30**, 1627–35 (1989).
  48. Jinming, Z., Jiahe, T., Qiongfang, L., Xiaohai, J. & Shengcai, W. Kinetic analysis of <sup>99m</sup>Tc-d, 1-HMPAO decomposition and the method of stabilization. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Artic.* **206**, 85–89 (1996).
  49. Holman, B. L. *et al.* Biodistribution, dosimetry, and clinical evaluation of technetium-99m ethyl cysteinate dimer in normal subjects and in patients with chronic cerebral infarction. *J. Nucl. Med.* **30**, 1018–24 (1989).
  50. Walovitch, R. C. *et al.* Characterization of technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging, Part 1: Pharmacology of technetium-99m ECD in nonhuman primates. *J. Nucl. Med.* **30**, 1892–901 (1989).
  51. Léveillé, J. *et al.* Characterization of technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging, Part 2: Biodistribution and brain imaging in humans. *J. Nucl. Med.* **30**, 1902–10 (1989).
  52. Fritzberg, A. R., Kasina, S., Eshima, D. & Johnson, D. L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG<sub>3</sub> as a hippuran replacement. *J. Nucl. Med.* **27**, 111–6 (1986).
  53. Taillefer, R. *et al.* Myocardial perfusion imaging with <sup>99m</sup>Tc-methoxy-isobutyl-isonitrile (MIBI): Comparison of short and long time intervals between rest and stress injections. *Eur. J. Nucl. Med.* **13**, (1988).
  54. Eckelman, W. C. Radiolabeling with technetium-99m to study high-capacity and low-capacity biochemical systems. *Eur. J. Nucl. Med.* **22**, 249–263 (1995).
  55. Verbruggen, A. M. Radiopharmaceuticals: state of the art. *Eur. J. Nucl. Med.* **17**, 346–364 (1990).
  56. Meegalla, S. K. *et al.* Specificity of Diastereomers of [<sup>99m</sup>Tc]TRODAT-1 as Dopamine Transporter Imaging Agents. *J. Med. Chem.* **41**, 428–436 (1998).
  57. Kung, H. F. *et al.* Imaging of dopamine transporters in humans with technetium-99m TRODAT 1. *Eur. J. Nucl. Med.* **23**, 1527–1530 (1996).
  58. D. Mendeleev. The natural system of elements and its application to the indication of the properties of undiscovered elements. *J. Russ. Chem. Soc.* **3**, 25–56 (1871).
  59. Ramsay, W. *et al.* Obituary notices: Paul Émile (dit François) Lecoq de Boisbaudran, 1838–1912; Edward Divers, 1837–1912; Humphrey Owen Jones, F.R.S., 1878–1912; John William

- Mallet, 1832–1912; Henry de Mosenthal, 1850–1912; Benjamin Edward Reina Newlands, 1842–1912; John P. *J. Chem. Soc., Trans.* **103**, 742–774 (1913).
60. Rosch, F. *Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides. Recent Results in Cancer Research* **194**, (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
  61. Rösch, F.  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Generators and  $^{68}\text{Ga}$  Radiopharmaceutical Chemistry on Their Way into a New Century. *J. Postgrad. Med. Educ. Res.* **47**, 18–25 (2013).
  62. Gleason, G. I. A positron cow. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **8**, 90–94 (1960).
  63. Greene, M. W. & Tucker, W. D. An improved gallium-68 cow. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **12**, 62–63 (1961).
  64. Yano, Y. & Anger, H. O. A gallium-68 positron cow for medical use. *J. Nucl. Med.* **5**, 484–7 (1964).
  65. Ehrhardt, G. J. & Welch, M. J. A new germanium-63/gallium-68 generator. *J. Nucl. Med.* **19**, 925–9 (1978).
  66. GOTTSCHALK, A. & ANGER, H. O. The sensitivity of the positron scintillation camera for detecting simulated brain tumors with gallium-68 EDTA. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* **92**, 174–6 (1964).
  67. Gottschalk, A. Hal Anger, nuclear medicine's quiet genius. *J. Nucl. Med.* **45**, 13N, 26N (2004).
  68. PEARSON, W. B. A Nickel-Gallium Superlattice ( $\text{Ni}_3\text{Ga}$ ). *Nature* **173**, 364–364 (1954).
  69. Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3533–3539 (1963).
  70. Velikyan, I.  $^{68}\text{Ga}$ -Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. *Molecules* **20**, 12913–12943 (2015).
  71. Moerlein, S. M., Daugherty, A., Sobel, B. E. & Welch, M. J. Metabolic imaging with gallium-68- and indium-111-labeled low-density lipoprotein. *J. Nucl. Med.* **32**, 300–7 (1991).
  72. Tsiou, M. I. *et al.* Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. *RSC Adv.* **7**, 49586–49599 (2017).
  73. Boros, E. *et al.* Acyclic Chelate with Ideal Properties for  $^{68}\text{Ga}$  PET Imaging Agent Elaboration. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15726–15733 (2010).
  74. Boros, E. *et al.* RGD conjugates of the  $\text{H}_2\text{dedpa}$  scaffold: synthesis, labeling and imaging with  $^{68}\text{Ga}$ . *Nucl. Med. Biol.* **39**, 785–794 (2012).
  75. Ramogida, C. F. *et al.*  $\text{H}_2$  CHX dedpa and  $\text{H}_4$  CHX octapa—Chiral Acyclic Chelating Ligands for  $^{67/68}\text{Ga}$  and  $^{111}\text{In}$  Radiopharmaceuticals. *Inorg. Chem.* **54**, 2017–2031 (2015).
  76. Fendler, W. P. *et al.*  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA PET/CT Detects the Location and Extent of Primary Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **57**, 1720–1725 (2016).
  77. Afshar-Oromieh, A. *et al.* Comparison of PET imaging with a  $^{68}\text{Ga}$ -labelled PSMA ligand and

- <sup>18</sup>F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **41**, 11–20 (2014).
78. Eder, M. *et al.* <sup>68</sup>Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. *Bioconjug. Chem.* **23**, 688–697 (2012).
  79. Berry, D. J. *et al.* Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. *Chem. Commun.* **47**, 7068 (2011).
  80. Zhernosekov, K. P. *et al.* Processing of Generator-Produced <sup>68</sup>Ga for Medical Application. *J. Nucl. Med.* **48**, 1741–1748 (2007).
  81. Khan, M. U. *et al.* Clinical indications for Gallium-68 positron emission tomography imaging. *Eur. J. Surg. Oncol.* **35**, 561–567 (2009).
  82. Hennrich, U. & Benešová, M. [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved <sup>68</sup>Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging. *Pharmaceuticals* **13**, 38 (2020).
  83. Baranyai, Z. *et al.* Equilibrium, Kinetic and Structural Studies of AAZTA Complexes with Ga<sup>3+</sup>, In<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 147–162 (2013).
  84. Tsoukalas, C. *et al.* Labeling of a NOTA mannosylated dextran with <sup>68</sup>Ga. *Nucl. Med. Biol.* **41**, 801 (2014).
  85. Isal, S. *et al.* PET imaging of <sup>68</sup>Ga-NODAGA-RGD, as compared with <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose, in experimental rodent models of engrafted glioblastoma. *EJNMMI Res.* **8**, 51 (2018).
  86. Hajdu, I. *et al.* Radiochemical synthesis and preclinical evaluation of <sup>68</sup>Ga-labeled NODAGA-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (<sup>68</sup>Ga-NODAGA-HPBCD). *Eur. J. Pharm. Sci.* **128**, 202–208 (2019).
  87. Eisenwiener, K.-P. *et al.* NODAGATOC, a New Chelator-Coupled Somatostatin Analogue Labeled with [<sup>67/68</sup>Ga] and [<sup>111</sup>In] for SPECT, PET, and Targeted Therapeutic Applications of Somatostatin Receptor (hsst2) Expressing Tumors. *Bioconjug. Chem.* **13**, 530–541 (2002).
  88. ANGER, H. O. & GOTTSCHALK, A. Localization of Brain Tumors With the Positron Scintillation Camera. *J. Nucl. Med.* **4**, 326–30 (1963).
  89. Schaer, L. R. Gallium Edetate <sup>68</sup>Ga Experiences in Brain-Lesion Detection With the Positron Camera. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **198**, 811 (1966).
  90. Velikyan, I. Prospective of <sup>68</sup>Ga Radionuclide Contribution to the Development of Imaging Agents for Infection and Inflammation. *Contrast Media Mol. Imaging* **2018**, 1–24 (2018).
  91. International Atomic Energy Agency. *Technetium-99m radiopharmaceuticals: manufacture of kits. Technical reports series* **466**, (2008).
  92. Swartz, M. The physiology of the lymphatic system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **50**, 3–20 (2001).
  93. Willard-Mack, C. L. Normal Structure, Function, and Histology of Lymph Nodes. *Toxicol.*

- Pathol.* **34**, 409–424 (2006).
94. East, L. The mannose receptor family. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1572**, 364–386 (2002).
  95. Aselli, G. *De lactibus sive lacteis venis quarto vasorum mesaraicorum genere novo invento dissertatio*. Milan: Giovanni Battista Bidelli. (1627).
  96. Gooneratne, B. W. M. Simian lymphography. *Cells Tissues Organs* **87**, 1–11 (1974).
  97. Baum. *Das Lymphgefäßsystem des Hunde*. (1918).
  98. Sherman, A. I. & Ter-Pogossian, M. Lymph-node concentration of radioactive colloidal gold following interstitial injection. *Cancer* **6**, 1238–1240 (1953).
  99. Vidal-Sicart, S. & Valdés Olmos, R. Using lymphoscintigraphy as a prognostic tool in patients with cancer. *Res. Reports Nucl. Med.* **1** (2016). doi:10.2147/RRNM.S64945
  100. Moncayo, V. M., Aarsvold, J. N. & Alazraki, N. P. Lymphoscintigraphy and sentinel nodes. *J. Nucl. Med.* **56**, 901–907 (2015).
  101. Morton, D. L. & Chan, A. D. The concept of sentinel node localization: How it started. *Seminars in Nuclear Medicine* **30**, 4–10 (2000).
  102. Cabanas, R. M. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* **39**, 456–466 (1977).
  103. Morton, D. L. Technical Details of Intraoperative Lymphatic Mapping for Early Stage Melanoma. *Arch. Surg.* **127**, 392 (1992).
  104. HALSTED, W. S. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann. Surg.* **20**, 497–555 (1894).
  105. Civantos, F. J. *et al.* Sentinel Lymph Node Biopsy Accurately Stages the Regional Lymph Nodes for T1-T2 Oral Squamous Cell Carcinomas: Results of a Prospective Multi-Institutional Trial. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1395–1400 (2010).
  106. Valdés Olmos, R. A., Klop, W. M. C. & Brouwer, O. R. Preoperative and Intraoperative Lymphatic Mapping for Radioguided Sentinel Node Biopsy in Head and Neck Cancers. in *Atlas of Lymphoscintigraphy and Sentinel Node Mapping* (eds. Mariani, G., Manca, G., Orsini, F., Vidal-Sicart, S. & Valdés Olmos, R. A.) 199–223 (Springer Milan, 2013). doi:10.1007/978-88-470-2766-4\_11
  107. International atomic energy agency. Radiopharmaceuticals for Sentinel Lymph Node Detection: Status and Trends Iaea Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series Publications. *IAEA Radioisot. Radiopharm. Ser.* **6**, (2015).
  108. Newman, E. A. & Newman, L. A. Lymphatic Mapping Techniques and Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer. *Surg. Clin. North Am.* **87**, 353–364 (2007).



109. Estourgie, S. H. *et al.* Eight false negative sentinel node procedures in breast cancer: what went wrong? *Eur. J. Surg. Oncol.* **29**, 336–340 (2003).
110. Leijte, J. A. P., van der Ploeg, I. M. C., Valdes Olmos, R. A., Nieweg, O. E. & Horenblas, S. Visualization of Tumor Blockage and Rerouting of Lymphatic Drainage in Penile Cancer Patients by Use of SPECT/CT. *J. Nucl. Med.* **50**, 364–367 (2009).
111. Clement, O. & Luciani, A. Imaging the lymphatic system: possibilities and clinical applications. *Eur. Radiol.* **14**, (2004).
112. Albo, D. *et al.* Anaphylactic reactions to isosulfan blue dye during sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Am. J. Surg.* **182**, 393–398 (2001).
113. Laurie, S. A., Khan, D. A., Gruchalla, R. S. & Peters, G. Anaphylaxis to isosulfan blue. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **88**, 64–66 (2002).
114. Keereweer, S. *et al.* Optical Image-guided Surgery—Where Do We Stand? *Mol. Imaging Biol.* **13**, 199–207 (2011).
115. Polom, K. *et al.* Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology. *Cancer* **117**, 4812–4822 (2011).
116. Thompson, J. F., Scolyer, R. A. & Kefford, R. F. Cutaneous melanoma. *Lancet* **365**, 687–701 (2005).
117. Hultborn, K. A., Larsson, L.-G. & Ragnhult, I. The Lymph Drainage from the Breast to the Axillary and Parasternal Lymph Nodes, Studied with the Aid of Colloidal Au198. *Acta radiol.* **43**, 52–64 (1955).
118. Tsopelas, C. Particle size analysis of <sup>99m</sup>Tc-labeled and unlabeled antimony trisulfide and rhenium sulfide colloids intended for lymphoscintigraphic application. *J. Nucl. Med.* **42**, 460–466 (2001).
119. Mitragotri, S. & Lahann, J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat. Mater.* **8**, 15–23 (2009).
120. Paganelli, G. *et al.* Optimized sentinel node scintigraphy in breast cancer. *Q. J. Nucl. Med.* **42**, 49–53 (1998).
121. Champion, J. A., Katare, Y. K. & Mitragotri, S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J. Control. Release* **121**, 3–9 (2007).
122. Mitragotri, S. In drug delivery, shape does matter. *Pharm. Res.* **26**, 232–234 (2009).
123. Lu, Z., Qiao, Y., Zheng, X. T., Chan-Park, M. B. & Li, C. M. Effect of particle shape on phagocytosis of CdTe quantum dot-cystine composites. *Medchemcomm* **1**, 84–86 (2010).
124. Patel, H. M. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **9**, 39–90 (1992).

125. Moghimi, S. M. *et al.* Surface engineered nanospheres with enhanced drainage into lymphatics and uptake by macrophages of the regional lymph nodes. *FEBS Lett.* **344**, 25–30 (1994).
126. Supersaxo A., H. W. S. H. Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration. *Pharm. Res.* **7**, 167–169 (1990).
127. Larson, S. M. & Nelp, W. B. Radiopharmacology of a simplified technetium-99m-colloid preparation for photoscanning. *J. Nucl. Med.* **7**, 817–826 (1966).
128. Gommans, G. M. M. *et al.* <sup>99m</sup>Tc Nanocoll: A radiopharmaceutical for sentinel node localisation in breast cancer-In vitro and in vivo results. *Appl. Radiat. Isot.* **67**, 1550–1558 (2009).
129. Bedrosian, I. *et al.* <sup>99m</sup>Tc-Human serum albumin: An effective radiotracer for identifying sentinel lymph nodes in melanoma. *J. Nucl. Med.* **40**, 1143–1148 (1999).
130. Nathanson, S. D., Anaya, P., Karvelis, K. C., Eck, L. & Havstad, S. Sentinel lymph node uptake of two different technetium-labeled radiocolloids. *Ann. Surg. Oncol.* **4**, 104–110 (1997).
131. Takeji, H. *et al.* <sup>99m</sup>Tc-phytate is better than <sup>99m</sup>Tc-human serum albumin as a radioactive tracer for sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Surg. Today* **36**, 219–224 (2006).
132. Sadek, S., Dayem, H. A., Owunwanne, A. & Yacoub, T. <sup>99m</sup>Tc hydroxyethyl starch: a potential radiopharmaceutical for lymphoscintigraphy. *Nucl. Med. Commun.* **8**, 395–405 (1987).
133. Sadek, S., Owunwanne, A., Abdel-Dayem, H. M. & Yacoub, T. Preparation and evaluation of Tc-99m hydroxyethyl starch as a potential radiopharmaceutical for lymphoscintigraphy: comparison with Tc-99m human serum albumin, Tc-99m dextran, and Tc-99m sulfur microcolloid. *Lymphology* **22**, 157–66 (1989).
134. Juma, N., Andrey, T. & Ege, G. N. Comparison as a Lymphoscintigraphic Agent between <sup>99m</sup>Tc m Dextran and <sup>99m</sup>Tc m Antimony Sulphide Colloid. *Br. J. Radiol.* **58**, 325–330 (1985).
135. KARAYALCIN, B., ARAS, G., ERBAY, G. & ERCAN, M. T. Parasternal lymphoscintigraphy using <sup>99m</sup>Tc-m-dextran. *Nucl. Med. Commun.* **9**, 657–662 (1988).
136. Offodile, R. *et al.* Minimally invasive breast carcinoma staging using lymphatic mapping with radiolabeled dextran. *Cancer* **82**, 1704–1708 (1998).
137. Barros, A., Cardoso, M., Sheng, P., Costa, P. & Pelizon, C. Radioguided localisation of non-palpable breast lesions and simultaneous sentinel lymph node mapping. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **29**, 1561–1565 (2002).
138. Glass, E. C., Essner, R. & Morton, D. L. Kinetics of three lymphoscintigraphic agents in patients with cutaneous melanoma. *J. Nucl. Med.* **39**, 1185–90 (1998).
139. Takagi, K. *et al.* <sup>99m</sup>Tc-labeled mannosyl-neoglycoalbumin for sentinel lymph node

- identification. *Nucl. Med. Biol.* **31**, 893–900 (2004).
140. Vera, D. R., Wisner, E. R. & Stadalnik, R. C. Sentinel node imaging via a nonparticulate receptor-binding radiotracer. *J. Nucl. Med.* **38**, 530–5 (1997).
141. Vera, D. R., Wallace, A. M., Hoh, C. K. & Mattrey, R. F. A synthetic macromolecule for sentinel node detection:  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-mannosyl-dextran. *J. Nucl. Med.* **42**, 951–959 (2001).
142. Sun, G. & Mao, J. J. Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair. *Nanomedicine* **7**, 1771–1784 (2012).
143. Maia, J., Evangelista, M. B., Gil, H. & Ferreira, L. Dextran-based materials for biomedical applications. in **661**, 31–53 (2014).
144. Stahl, P. D. & Ezekowitz, R. A. B. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 50–55 (1998).
145. Stahl, P. D., Rodman, J. S., Miller, M. J. & Schlesinger, P. H. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 1399–1403 (1978).
146. Taylor, P. R. *et al.* Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 901–944 (2005).
147. Wallace, A. M., Hoh, C. K., Vera, D. R., Darrah, D. D. & Schulteis, G. Lymphoseek: A Molecular Radiopharmaceutical for Sentinel Node Detection. *Ann. Surg. Oncol.* **10**, 531–538 (2003).
148. Wallace, A. M. *et al.* Lymphoseek: A molecular imaging agent for melanoma sentinel lymph node mapping. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 913–921 (2007).
149. Surasi, D. S., O'Malley, J. & Bhambhani, P.  $^{99m}\text{Tc}$ -tilmanocept: A novel molecular agent for lymphatic mapping and sentinel lymph node localization. *J. Nucl. Med. Technol.* **43**, 87–91 (2015).
150. Subramanian, S. *et al.* Comparative biological evaluation of two [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^-$  dextran pyrazolyl mannose conjugates developed for use in sentinel lymph node detection. *Q. J. Nucl. Med. Mol. imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. [and] Int. Assoc. Radiopharmacol. (IAR), [and] Sect. Soc. Radiopharm.* **58**, 216–223 (2014).
151. Pirmettis, I. *et al.* New  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  Mannosylated Dextran Bearing S-Derivatized Cysteine Chelator for Sentinel Lymph Node Detection. *Mol. Pharm.* **9**, 1681–1692 (2012).
152. Giglio, J. *et al.* Design and development of  $^{99m}\text{Tc}$ - $^4+1'$ -labeled dextran-mannose derivatives as potential radiopharmaceuticals for sentinel lymph node detection. *Cancer Biother. Radiopharm.* **28**, 541–551 (2013).
153. Yamaguchi, A. *et al.* Injection site radioactivity of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled mannosylated dextran for sentinel lymph node mapping. *Mol. Pharm.* **12**, 514–519 (2015).

154. Subramanian, S. *et al.* Studies toward the biological efficacy of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled dextran-cysteine-mannose ( $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]\text{DCM20}$ ) for sentinel lymph node detection. *Cancer Biother. Radiopharm.* **27**, 365–370 (2012).
155. Timmons, S. C. & Jakeman, D. L. Stereoselective Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides via Direct Displacement of Acylated Glycosyl Bromides. *Org. Lett.* **9**, 1227–1230 (2007).
156. Lee, Y. C. U., Stowell, C. P. & Krantz, M. J. 2-Imino-2-Methoxyethyl 1-Thioglycosides: New Reagents for Attaching Sugars to Proteins. *Biochemistry* **15**, 3956–3963 (1976).

## **Χ. ΣΧΕΤΙΚΗ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ**

## Article

# Comparative Study of a Series of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ Mannosylated Dextran Derivatives for Sentinel Lymph Node Detection

Afroditi Papasavva <sup>1</sup>, Antonio Shegani <sup>1</sup> , Christos Kiritsis <sup>1</sup>, Ioanna Roupa <sup>1</sup>, Myrto Ischyropoulou <sup>1</sup>, Konstantina Makrypidi <sup>1</sup>, Irineos Pilatis <sup>2</sup>, George Loudos <sup>2</sup>, Maria Pelecanou <sup>3</sup> , Minas Papadopoulos <sup>1</sup> and Ioannis Pirmettis <sup>1,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Institute of Nuclear and Radiological Sciences and Technology, Energy & Safety, NCSR “Demokritos”, 15310 Athens, Greece; papasavvaphro@gmail.com (A.P.); antonio.shegani@kcl.ac.uk (A.S.); kiritsis.chr@gmail.com (C.K.); iroupa@rrp.demokritos.gr (I.R.); myrto7@gmail.com (M.I.); kmakripidi@rrp.demokritos.gr (K.M.); mspap@rrp.demokritos.gr (M.P.)
- <sup>2</sup> BIOEMTECH Laboratories, Lefkippos Attica Technology Park—NCSR “Demokritos”, 15310 Athens, Greece; ipilatis@bioemtech.com (I.P.); george@bioemtech.com (G.L.)
- <sup>3</sup> Institute of Biosciences & Applications, NCSR “Demokritos”, 15310 Athens, Greece; pelmar@bio.demokritos.gr
- \* Correspondence: ipirme@rrp.demokritos.gr; Tel.: +30-210-650-3921



**Citation:** Papasavva, A.; Shegani, A.; Kiritsis, C.; Roupa, I.; Ischyropoulou, M.; Makrypidi, K.; Pilatis, I.; Loudos, G.; Pelecanou, M.; Papadopoulos, M.; et al. Comparative Study of a Series of  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  Mannosylated Dextran Derivatives for Sentinel Lymph Node Detection. *Molecules* **2021**, *26*, 4797. <https://doi.org/10.3390/molecules26164797>

Academic Editors: Helen Osborn, Diego Muñoz-Torrero, Robert J. Doerksen and Silvia Socorro

Received: 13 July 2021

Accepted: 4 August 2021

Published: 7 August 2021

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Sentinel lymph node detection (SLND) is rapidly entering common practice in the management of patients with tumors. The introduction of mannose molecules to  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled dextrans, so far, showed that the sentinel node could trap these agents due to their recognition by the mannose receptors of lymph node macrophages. The current study aimed to synthesize, characterize, and biologically evaluate a series of mannosylated dextran derivatives labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  for potential use in SLND. The compounds were designed to have a dextran with a molecular weight of 10–500 kDa as a backbone, S-derivatized cysteines, efficient SNO chelators, and mannose moieties for binding to mannose receptors. They were successfully synthesized, thoroughly characterized using NMR techniques, and labeled with the *fac*-[ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ]<sup>+</sup> synthon. Labeling with high yields and radiochemical purities was achieved with all derivatives. In vivo biodistribution and imaging studies demonstrated high uptake in the first lymph node and low uptakes in the following node and confirmed the ability to visualize the SLN. Among the compounds studied,  $^{99m}\text{Tc}$ -D75CM demonstrated the most attractive biological features, and in combination with the high radiochemical yield and stability of the compound, its further evaluation as a new radiopharmaceutical for sentinel lymph node detection was justified.

**Keywords:** sentinel lymph node; dextran; mannose; cysteine; technetium-99m; SPECT imaging

## 1. Introduction

Over the last decade, research on developing new radiopharmaceuticals has focused on the selective binding of a radiolabeled biomolecule to a receptor. Specifically, the biomolecule acts as a vector that transports the radionuclide to the tissue overexpressing the receptor to enable imaging and diagnosis with a SPECT or PET camera or with radiotherapy [1]. Among the SPECT isotopes currently in use, technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) remains the radionuclide of choice, having excellent physicochemical properties, easy access through generators, and low cost compared with radionuclides, the production of which requires a cyclotron ( $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ) [2].

The development of diagnostic radiopharmaceuticals for the precise localization of the sentinel lymph node (SLN), the hypothetical first lymph node to receive lymph and metastatic cells from the primary site of the tumor, is actively explored, aiming at identifying affected tissues that require surgical removal. The metastatic pathway of some cancers usually follows a course that begins from the nearby lymph nodes. Therefore,

if the first draining lymph node, the SLN, is negative in tumor metastasis, the presence of cancerous cells in all other lymph nodes is highly improbable. Thus, sentinel lymph node biopsy (SLNB) gradually replaces extensive lymph node removal in patients with cancer, offering more accurate diagnosis and reducing unnecessary lymph node dissection (lymphadenectomy) [3–7].

Sentinel lymph node detection (SLND) in nuclear medicine is performed by injecting small, radiolabeled particles in the tumor area. The particles migrate from the injection site into the lymphatic system mainly by passive diffusion and are cleared from the lymph as a foreign matter through active saturable phagocytosis. Particle size influences the rate of colloid drainage from the injection site to the dermal lymphatic capillaries as well as phagocytosis by lymph node macrophages. Particles larger than 100 nm are trapped in the interstitial space, resulting in masking of the SLNs, whereas smaller particles clear faster from the injection site but may leak to the bloodstream (<5 nm) and distant lymph nodes. A number of  $^{99m}\text{Tc}$  colloidal radiopharmaceuticals are clinically used (filtered  $^{99m}\text{Tc}$ -sulfur colloid,  $^{99m}\text{Tc}$ -antimony, and various  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled albumin preparations); however, they are associated with certain drawbacks, such as high injection site retention, migration to subsequent higher echelon lymph nodes, as well as adverse effects associated with the employment of materials of biological origin, such as gelatine or human albumin [8,9].

An alternative direction for developing radiopharmaceuticals for SLND targets the mannose receptors on the surface of the macrophage cells present in the lymph node [10–14]. A series of mannosylated dextrans have been explored in that direction, taking advantage of the nanoparticle nature of dextrans and their suitability for biological applications, properties such as being water soluble, biodegradable, non-toxic, and available in various molecular weights [15–20]. This direction resulted in the development of  $^{99m}\text{Tc}$ -tilmanocept, the first authorized radiopharmaceutical in Europe and USA to selectively localize the SLN by binding to the mannose receptor (CD206). The radiotracer is a synthetic macromolecule composed of a 10 kDa dextran backbone, several DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) units serving as attachment sites for  $^{99m}\text{Tc}$  chelation, and mannose for receptor binding. However, DTPA is not considered an ideal chelator for  $^{99m}\text{Tc}$ , and the structure of its  $^{99m}\text{Tc}$ -complexes is not well defined. In addition, the selectivity of  $^{99m}\text{Tc}$ -tilmanocept for the SLN is not optimal, as its transport in secondary nodes is notable, while a high percentage of the agent remains at the injection site. Thus, it is of particular interest to prepare well-characterized complexes showing fast injection site clearance; fast, high, and persistent uptake by the SLN; and low leakage to higher echelon nodes, together with a favorable safety profile [15,18–22].

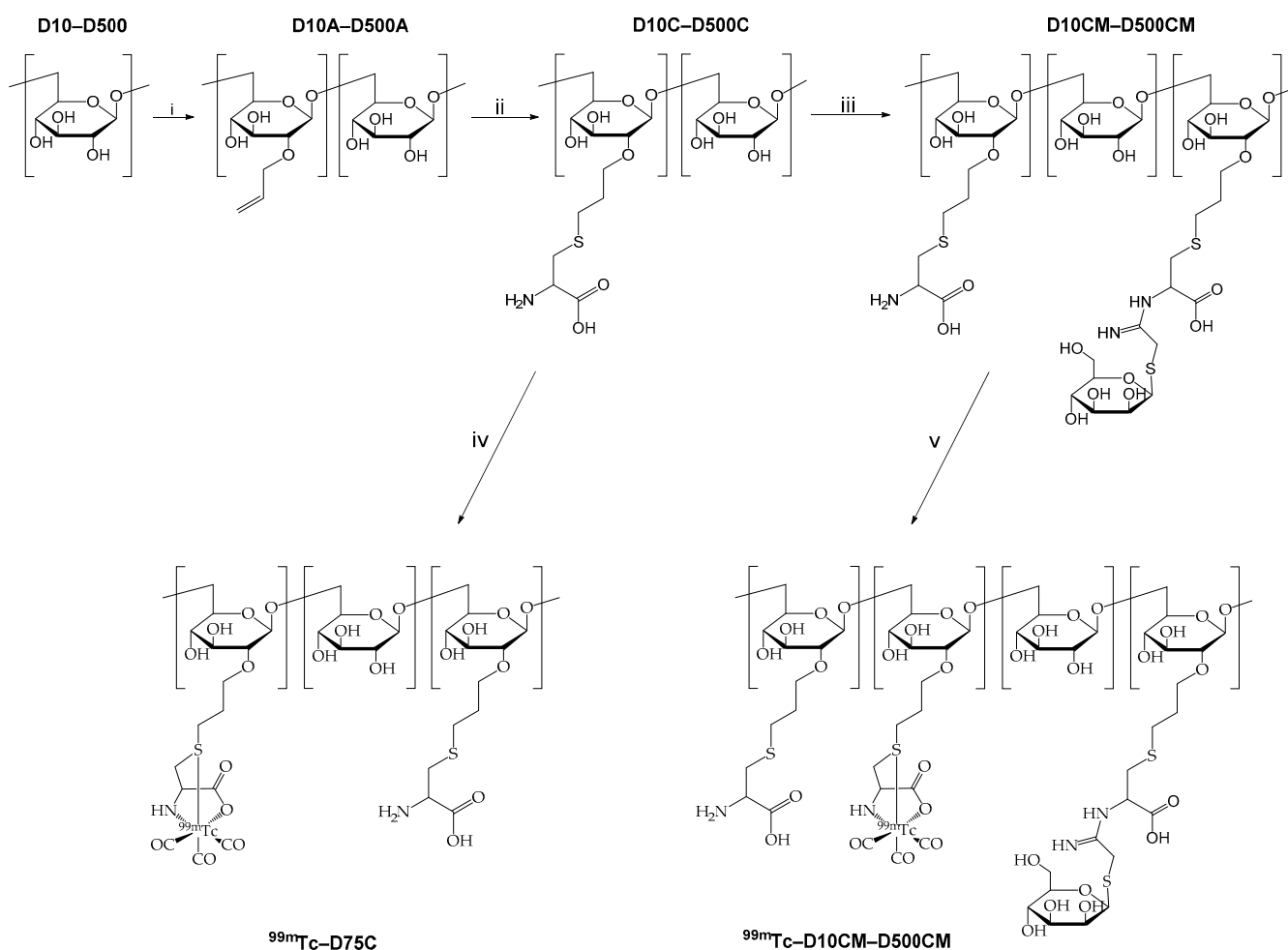
Intending to develop SLND imaging agents with improved characteristics, our laboratory has previously reported the development of a novel  $^{99m}\text{Tc}$ -radiolabeled mannosylated dextran derivative,  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DCM20}$ , with a 10 kDa dextran backbone bearing S-derivatized cysteines as efficient SNO chelators for the *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  core and with mannose moieties for binding to mannose receptors of the lymph node. The  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DCM20}$  derivative proved to be stable and of high radiochemical purity and specific activity, while its biological evaluation showed fast injection site clearance and high and persistent uptake in the SLN [23,24]. Expanding this promising project, we present herein the synthesis and biological evaluation of a series of DCM derivatives employing dextrans of different MW spanning 10–500 kDa in an attempt to develop a  $^{99m}\text{Tc}$ -DCM product with improved biological characteristics as an SLN imaging agent.

## 2. Results

### 2.1. Synthesis and Characterization of the Mannosylated Dextran Derivatives

The new dextran derivatives D10CM–D500CM were synthesized and characterized by NMR following the procedures described in detail for DCM20 [23]. Specifically, the reaction of allyl bromide with dextrans D10–D500 (MW 10–500 kDa) yielded the intermediate allyl dextrans D10A–D500A, Scheme 1. Comparing the intensity of allyl peaks in the NMR spectra with those of the anomeric protons of dextran indicated that 21–35% of

the dextran glucose units were allylated. Addition of cysteine to allyl dextran resulted in the quantitative formation of the dextran–cysteine derivatives (D10C–D500C). Subsequently, D10C–D500C reacted with the bifunctional reagent 2-imino-2-methoxyethyl-1-thio- $\beta$ -D-mannopyranoside to yield the mannosylated dextran derivatives (D10CM–D500CM). Comparison of the intensity of the anomeric protons of mannose to that of the anomeric protons of dextran showed that 53–82% of the cysteines were mannosylated. The number of cysteines and mannose units present in each DCM derivative based on NMR data are presented in Table 1. The  $^1\text{H}$  NMR spectra of D75A, D75C, and D75CM are given in Supplementary Materials (Figure S1) as representative of the spectra obtained with the different MW dextrans, together with a stack plot of the  $^1\text{H}$ NMR spectra of the rest of the mannosylated dextrans (Figure S2).



(i)  $\text{BrC}_3\text{H}_5$ ,  $\text{NaOH}$  (2.5 M),  $\text{H}_2\text{O}$ ; (ii) L-cysteine,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ ; (iii) 2-imino-2-methoxyethyl-1-thio- $\beta$ -D-mannoside, borate buffer (0.02 M, pH 9); (iv) D75C,  $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  (0.5 - 1.0 mL, 37 - 740 MBq), pH 7, 15 min, 100 °C; (v)  $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  (0.5 - 1.0 mL, 37 - 740 MBq), pH 7, 15 min, 100 °C;

**Scheme 1.** Synthesis of D10CM–D500CM and preparation of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -complexes  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D75C and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D10CM– $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D500CM.



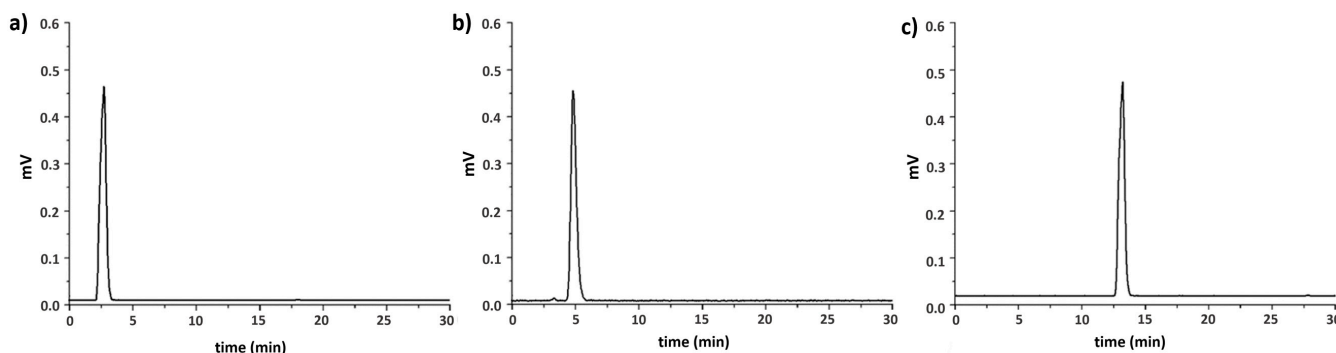
**Table 1.** Group density and molecular weight of D10CM–D500CM dextran derivatives.

DCM Derivative	Cysteine Moieties	Mannose Moieties	MW <sub>calculated</sub>
D10CM	7	19	21,297
D20CM	17	23	31,097
D40CM	29	33	59,459
D75CM	23	74	111,238
D150CM	95	160	236,320
D500CM	142	645	805,567

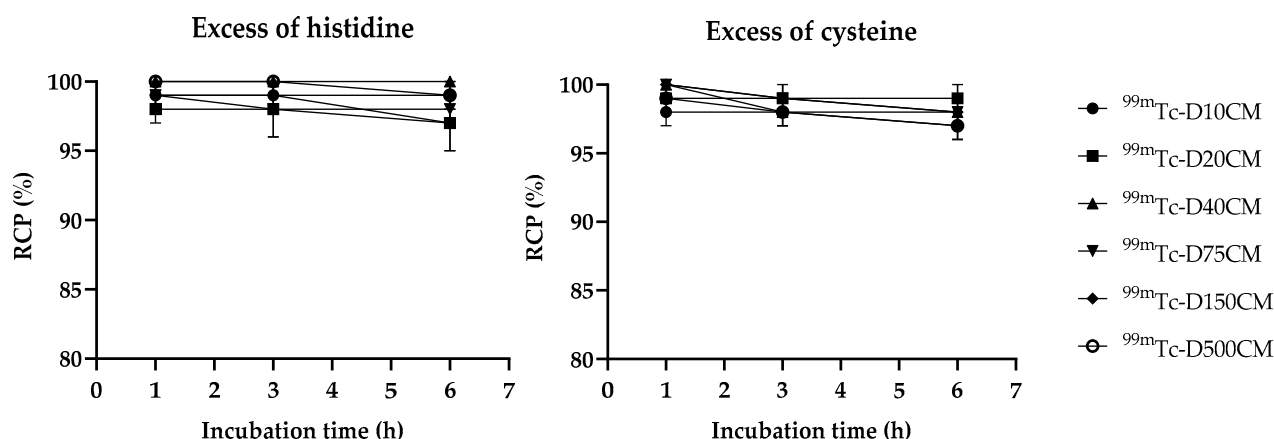
## 2.2. Radiolabeling

Radiolabeling was effected through the employment of the  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  tricarbonyl core. In-house production of the  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  precursor was performed by direct addition of  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  in a closed vial in the presence of CO gas and  $\text{NaBH}_4$  as a reducing agent and by heating for 30 min at 95 °C, followed by adjustment of the pH to 7. The quality control of the radiolabeling by HPLC showed more than 97% formation of the precursor.

The mannosylated compounds, as well as the non-mannosylated D75C derivative, were labeled with  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  precursor at low ligand concentration ( $1.2 \times 10^{-7}$  to  $4.4 \times 10^{-6}$  M) and heating for 15 min at 100 °C. In each case, HPLC analysis of the radiolabeling reaction mixture showed the presence of a single peak for each complex ( $^{99m}\text{Tc}$ -D10CM,  $^{99m}\text{Tc}$ -D500CM), eluting at 12 to 13 min, which was distanced from the  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  precursor eluting out at 5.1 min and the  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  eluting at 2.6 min (Figure 1).

**Figure 1.** RP-HPLC chromatograms ( $\gamma$ -detection) of (a)  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , (b)  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , and (c)  $^{99m}\text{Tc}$ -D40CM.

Stability studies showed that the  $^{99m}\text{Tc}$ -complexes remained stable in their reaction mixture for up to 24 h. Incubation of  $^{99m}\text{Tc}$ -complexes at 37 °C with a significant excess of the amino acids cysteine or histidine that display high affinity for the  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  synthon showed that more than 95% of the complexes remained intact (Figure 2).



**Figure 2.** In vitro stability of  $^{99m}\text{Tc}$ -D10CM– $^{99m}\text{Tc}$ -D500CM in the presence of excess histidine and cysteine ( $10^{-2}$  M) at  $37^\circ\text{C}$  for 1, 3, and 6 h.

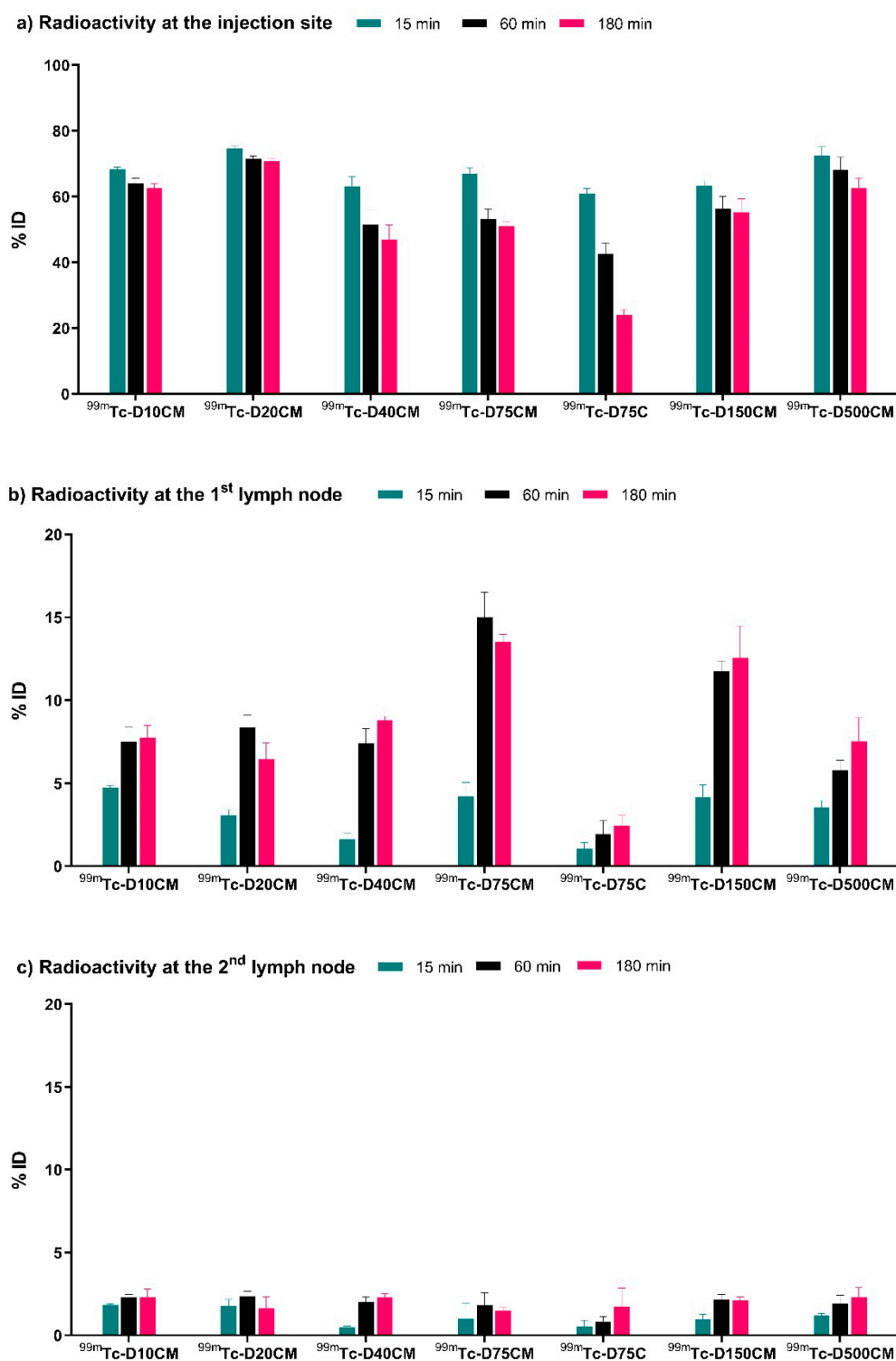
### 2.3. Biological Evaluation

The in vivo biodistribution of all six  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled mannosylated dextran derivatives— $^{99m}\text{Tc}$ -D10CM,  $^{99m}\text{Tc}$ -D20CM,  $^{99m}\text{Tc}$ -D40CM,  $^{99m}\text{Tc}$ -D75CM,  $^{99m}\text{Tc}$ -D150CM, and  $^{99m}\text{Tc}$ -D500CM—was studied in healthy male Swiss Albino mice. In addition, for comparison purposes, the non-mannosylated  $^{99m}\text{Tc}$ -D75C was also tested. Each mouse received a dose of  $20\ \mu\text{L}$  ( $0.074\ \text{MBq}$ ,  $0.05\ \mu\text{g}$  DCM), and the biodistribution pattern of the six  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled dextrans was studied at 15, 60, and 180 min after a subcutaneous injection via the rear footpad. The results of in vivo biodistribution studies of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled mannosylated dextrans ( $^{99m}\text{Tc}$ -D10CM– $^{99m}\text{Tc}$ -D500CM) are shown in Figure 3, Table 2, and Table S1.

At 15 min post injection, 25% to 37% of the injected dose (ID) cleared from the injection site (footpad). At the same time, a significant percentage of the injected activity (1.61% to 4.71% ID) localized in the popliteal lymph node, the sentinel lymph node in this study. The highest popliteal lymph node uptake was measured for the  $^{99m}\text{Tc}$ -D10CM and  $^{99m}\text{Tc}$ -D75CM derivatives,  $4.71 \pm 0.13\%$  and  $4.20 \pm 0.84\%$  ID, respectively, while the lowest was measured for the  $^{99m}\text{Tc}$ -D40CM derivative ( $1.61 \pm 0.39\%$  ID).

Slower injection site clearance was observed from 15 to 60 min post injection. In general, after 60 min, injection site uptake remained quite stable in a range from 46% to 70% ID. On the contrary, a significant increase in the popliteal lymph node uptake at 60 min p.i. was observed, ranging between 5.80% and 15.00% ID, that remained almost constant up to 180 min p.i. ( $6.44$  to  $13.53\%$  ID). The highest values,  $15.0 \pm 1.5\%$  and  $13.53 \pm 0.45\%$  ID, were measured for compound  $^{99m}\text{Tc}$ -D75CM at 60 and 180 min p.i., respectively (Table 2).

The uptake of complexes in the second lymph node was in the range 0.49–1.84% ID at 15 min p.i., slowly increasing to 1.81–2.37% ID at 60 min p.i. and then remaining practically stable up to 180 min p.i. ( $1.49$ – $2.30\%$  ID). The ratio between the first and second lymph nodes was high at all time points and above 3 for most complexes. The highest ratios (8.3 and 9.0) were found for complex  $^{99m}\text{Tc}$ -D75CM at 60 and 180 min p.i., respectively.



**Figure 3.** Biodistribution of radioactivity in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> lymph nodes and at the injection site after subcutaneous injection of  $^{99m}\text{Tc}$ -complexes to the rear footpad of healthy Swiss Albino mice at (a) 15, (b) 60, and (c) 180 min.

**Table 2.** Biodistribution of radioactivity after subcutaneous injection to the rear footpad of  $^{99m}\text{Tc-D75C}$  and  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$  in mice at (a) 15, (b) 60, and (c) 180 min.

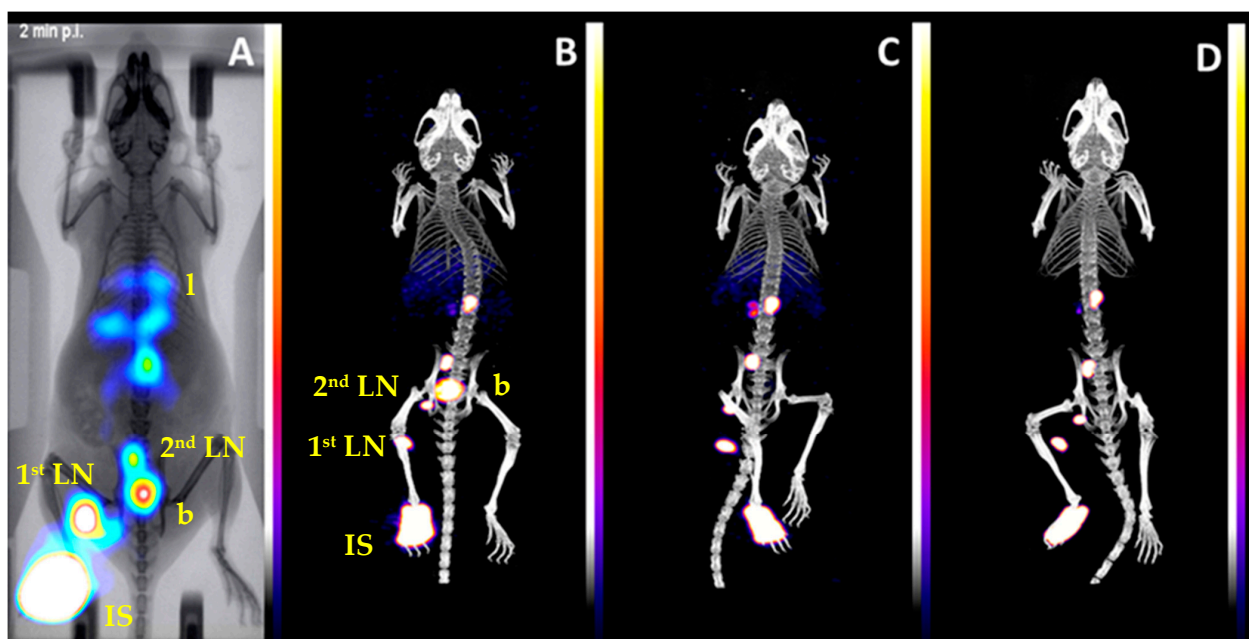
Organ	$^{99m}\text{Tc-D75C}$			$^{99m}\text{Tc-D75CM}$		
	15 min	60 min	180 min	15 min	60 min	180 min
Blood	6.16 ± 1.23	10.10 ± 2.19	10.13 ± 1.36	1.93 ± 0.91	0.40 ± 0.19	0.18 ± 0.04
Liver	2.11 ± 0.23	3.22 ± 0.39	3.22 ± 0.61	3.62 ± 0.87	3.70 ± 1.44	2.22 ± 0.16
Heart	0.99 ± 0.24	1.65 ± 0.56	1.88 ± 0.46	0.44 ± 0.12	0.34 ± 0.11	0.35 ± 0.03
Kidneys	5.28 ± 1.00	5.61 ± 1.16	4.92 ± 0.86	2.22 ± 0.47	0.90 ± 0.09	0.76 ± 0.13
Stomach	0.46 ± 0.10	1.32 ± 0.92	1.38 ± 0.35	0.33 ± 0.17	0.29 ± 0.04	1.08 ± 0.66
Intestines	0.40 ± 0.08	0.54 ± 0.11	1.00 ± 0.13	0.36 ± 0.12	0.33 ± 0.08	0.81 ± 0.60
Spleen	0.58 ± 0.07	1.08 ± 0.29	1.99 ± 0.47	0.73 ± 0.22	1.43 ± 1.33	1.19 ± 0.33
Muscle	0.19 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.34 ± 0.07	0.17 ± 0.11	0.15 ± 0.03	0.34 ± 0.11
Lungs	1.44 ± 0.07	2.32 ± 0.65	2.43 ± 0.07	0.96 ± 0.50	0.31 ± 0.06	0.38 ± 0.06
Urine *	2.47 ± 1.32	6.54 ± 4.84	22.46 ± 3.55	2.06 ± 0.74	1.69 ± 2.39	4.45 ± 3.23
1st node *	1.04 ± 0.37	1.94 ± 0.80	2.43 ± 0.64	4.20 ± 0.84	15.00 ± 1.50	13.53 ± 0.45
2nd node *	0.53 ± 0.38	0.80 ± 0.34	1.72 ± 1.13	0.99 ± 0.75	1.81 ± 0.77	1.49 ± 0.20
Injection site *	60.91 ± 1.52	42.63 ± 3.27	24.05 ± 1.61	66.84 ± 1.96	53.20 ± 2.96	51.04 ± 1.20

The results are expressed as % ID/g. Mean values are reported ± SD;  $n = 3$ . \* Mean % ID values are reported ± SD;  $n = 3$ .

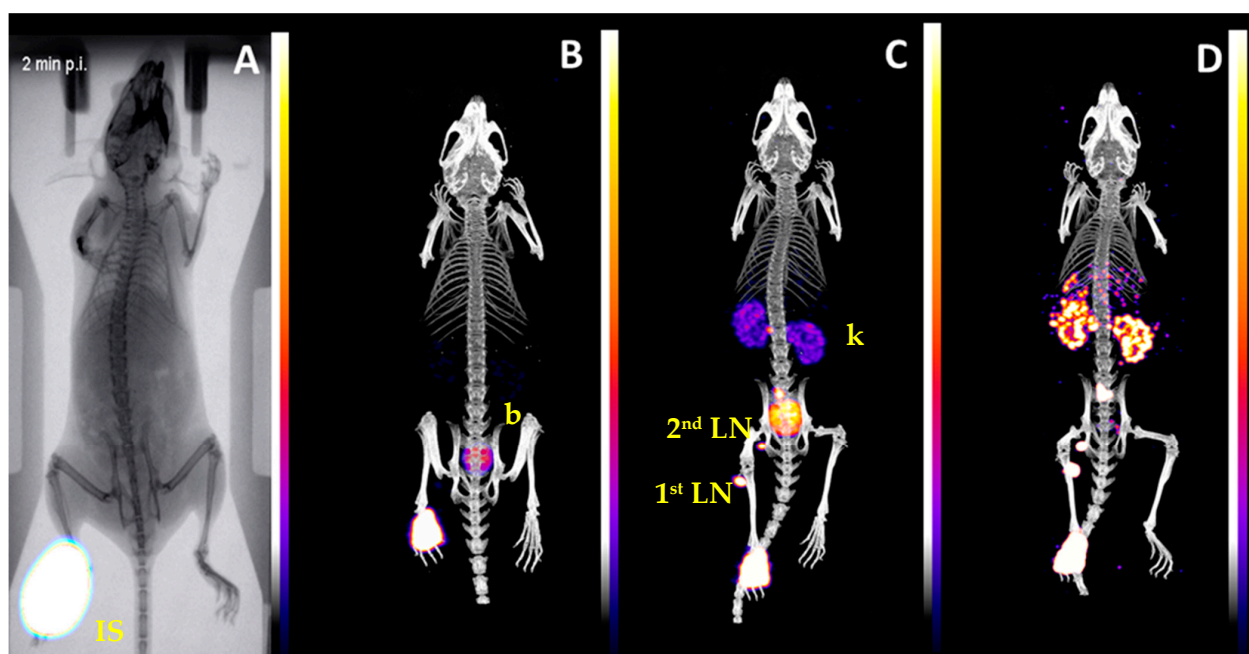
The percentage of the radioactivity in the blood at 15 min p.i. was low (0.52–2.06% ID/g) and dropped further at 180 min p.i. (0.08–1.17% ID/g). A low concentration of radioactivity was measured in most of the organs. Specifically, the radiation in the stomach and spleen at all time points was minimal, indicating the *in vivo* stability of the complexes with respect to reoxidation to  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  and  $^{99m}\text{TcO}_2$ . A significant amount of radioactivity was measured only in the liver, ranging from 1.08% to 3.72% ID/g at 15 min p.i. to 1.79% to 4.14% ID/g at 180 min p.i. The uptake in intestines was below 1.0% ID/g for all complexes at all times studied except for complex  $^{99m}\text{Tc-D40CM}$  (1.68% ID/g at 180 min p.i.), indicating minimal hepatobiliary excretion. Urinary excretion was also low, as indicated by the small percentage of radioactivity in urine (1.32–5.58% ID at 180 min p.i.).

The biodistribution of the non-mannosylated compound  $^{99m}\text{Tc-D75C}$  was also studied. The results, presented in Table 2, show superior injection site clearance with only 24.1% ID remaining in the injection site at 180 min p.i. However, only marginal uptake was observed in the popliteal lymph node (1.04–2.43% ID) and in the second lymph node (0.53–1.72% ID). In addition, high radioactivity levels were measured in the blood at all times studied (6.16–10.13% ID/g), accompanied by significant urinary excretion (22.46 ± 3.55% ID) at 180 min p.i.

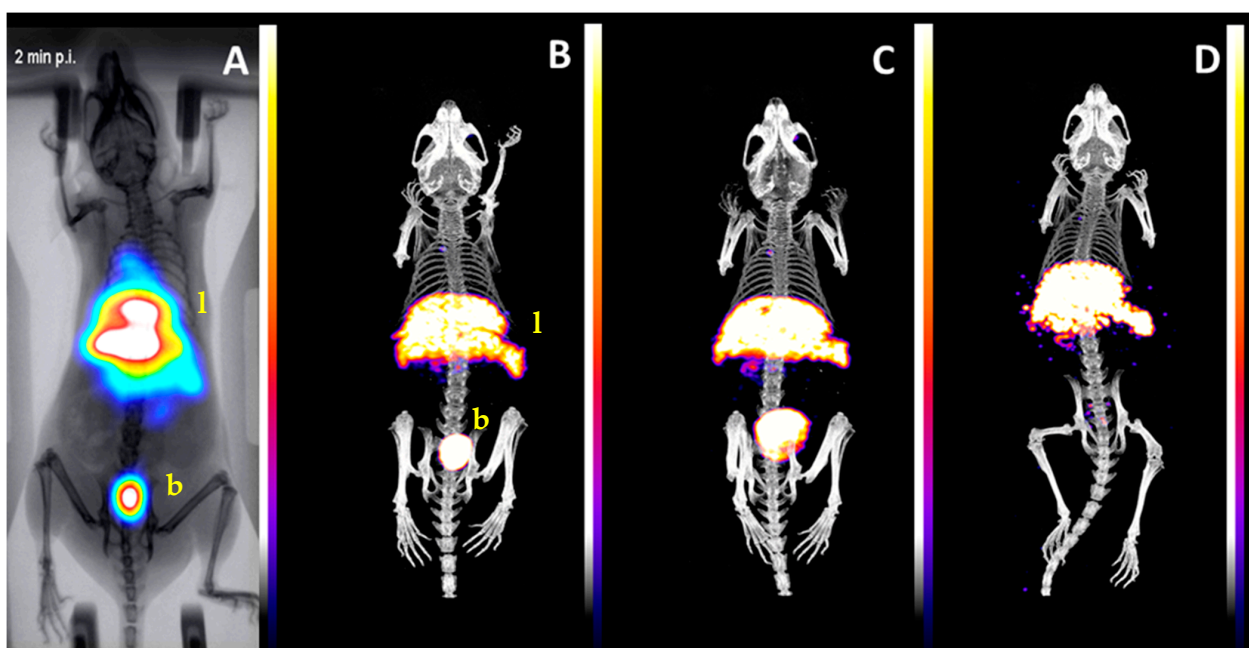
The *in vivo* imaging study of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled mannosylated dextran derivative  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$ , which showed the best overall biodistribution profile, as well as of the non-mannosylated  $^{99m}\text{Tc-D75C}$  analogue, was performed by injecting the compounds in the rear footpad. The images (Figures 4 and 5) are in agreement with the biodistribution data. Minutes after injecting  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$ , the lymph nodes were clearly delineated, and the localization persisted up to 24 h after injection. The uptake in a second and a third lymph node may be due to the saturation of the mannose receptors in the small popliteal lymph node of the mouse (1–2 mg) by the excess (2 µg,  $1.8 \times 10^{-11}$  moles) of non-radiolabeled D75CM injected in the imaging studies. On the contrary, after injecting the non-mannosylated compound  $^{99m}\text{Tc-D75C}$ , only marginal lymph node uptake was observed, followed by extensive urinary excretion. After intravenous injection of the mannosylated compound  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$  (Figure 6), a significant percentage of radioactivity was rapidly excreted in urine, but a high and persistent localization in the liver was observed. This finding is consistent with reports in the literature, referring to the mannose receptor (CD206) as being predominantly expressed by liver endothelial cells [25].



**Figure 4.** 2D and 3D imaging after footpad injection of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled mannosylated dextran mannose receptors targeting agent  $^{99m}\text{Tc}$ -D75CM in healthy Swiss Albino mouse. (A) Dynamic imaging for 30 min just after injection with  $\gamma$ -eye<sup>TM</sup>. (B) Tomographic imaging for 30 min at 1 h p.i., (C) tomographic imaging for 30 min at 3 h p.i., and (D) tomographic imaging for 50 min at 24 h p.i. with x-CUBE<sup>TM</sup>/y-CUBE<sup>TM</sup>, respectively. The color bar indicates the accumulation level (i.e., white being the highest and purple the lowest). 1st lymph node (1st LN); 2nd lymph node (2nd LN); Bladder (b); Liver (l); Injection site (IS).



**Figure 5.** 2D and 3D imaging after footpad injection of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled non-mannosylated dextran agent  $^{99m}\text{Tc}$ -D75C in healthy Swiss Albino mouse. (A) Dynamic imaging for 30 min just after injection with  $\gamma$ -eye<sup>TM</sup>. (B) Tomographic imaging for 30 min at 1 h p.i., (C) tomographic imaging for 30 min at 3 h p.i., and (D) tomographic imaging for 50 min at 24 h p.i. with x-CUBE<sup>TM</sup>/y-CUBE<sup>TM</sup>, respectively. The color bar indicates the accumulation level (i.e., white being the highest and purple the lowest). 1st lymph node (1st LN); 2nd lymph node (2nd LN); Bladder (b); Kidney (k); Injection site (IS).



**Figure 6.** 2D and 3D imaging after intravenous injection of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled mannosylated dextran mannose receptors targeting agent  $^{99m}\text{Tc}$ -D75CM in healthy Swiss Albino mouse. (A) Dynamic imaging for 30 min just after injection with  $\gamma$ -eye<sup>TM</sup>. (B) Tomographic imaging for 30 min at 1 h p.i., (C) tomographic imaging for 30 min at 3 h p.i., and (D) tomographic imaging for 50 min at 24 h p.i. with x-CUBE<sup>TM</sup>/ $\gamma$ -CUBE<sup>TM</sup>, respectively. The color bar indicates the accumulation level (i.e., white being the highest and purple the lowest). Bladder (b); Liver (l).

### 3. Discussion

Sentinel lymph node detection (SLND) is rapidly entering common practice in the management of patients with tumors. SLND in nuclear medicine is performed by injecting small radiolabeled particles in the area where a tumor is located.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled dextrans carrying mannoses are known to be trapped in the SLN due to their recognition by the mannose receptors of lymph node macrophages. These nanocompounds consist of a 10 kDa dextran backbone, several mannose units for recognition by the mannose receptors, and a chelating agent such as DTPA in Lymphoseek,  $\text{MAG}_3$ , or pyrazolyl-diamine for coordinating  $^{99m}\text{Tc}$  [23,24].

In previous studies [23,24], we presented the development of a novel mannosylated dextran derivative DCM20 that can be labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  using the  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  precursor. The compound has a 10 kDa dextran as a backbone, 6 S-derivatized cysteines as efficient SNO chelators, and 24 mannose moieties for binding to mannose receptors. The biological evaluation of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -DCM20 showed specific uptake in the mouse RAW 264.7 mannose receptor-bearing macrophage cells, rapid and high accumulation in the popliteal lymph node that remained almost stable up to 6 h, and fast clearance from the injection site.

In this work, we describe the synthesis, labeling with  $^{99m}\text{Tc}$ , and biological evaluation of a series of analogous mannosylated dextran derivatives ( $^{99m}\text{Tc}$ -D10CM– $^{99m}\text{Tc}$ -D500CM) having a dextran backbone with a molecular weight of 10–500 kDa. It should be noted that the derivative  $^{99m}\text{Tc}$ -D10CM is essentially the same as the previously studied [23,24] compound  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -DCM20 and is included for comparison purposes. The synthesis and characterization of the compounds D10CM–D500CM was straightforward, and no significant differences either in the percentage of allylation or in the percentage of mannosylation were noted between derivatives. Labeling with high yield and radiochemical purity was achieved with all derivatives. The stability studies of the generated  $^{99m}\text{Tc}$ -complexes showed that more than 95% of the original complexes were present after 6 h incubation with

excess cysteine or histidine at 37 °C, demonstrating the strong ligation of the  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  core to the SNO cysteine ligand and the suitability of the radiotracers for biological and imaging applications.

In vivo biodistribution studies in mice demonstrated fast injection site clearance, high uptake in the first lymph node, and relatively low uptake in the following node for all mannosylated compounds. Regarding the injection site clearance, no significant improvement was observed in comparison with the previously reported compound  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DCM20}$ . However, the uptake of  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$  in the popliteal lymph node (13–15% ID) was almost 2 times higher (Figure 3, Table S1). The specific uptake of  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$  in the lymph node was supported by the low uptake of the non-mannosylated analogue  $^{99m}\text{Tc-D75C}$ .

In vivo imaging studies in mice with  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$  were in agreement with the biodistribution data (Figure 4). Radioactivity cleared from the injection site and localized in the popliteal in a high percentage, allowing for precise localization and imaging. The uptake in a second and a third lymph node observed in imaging and biodistribution studies may be due to the saturation of the mannose receptors in the small popliteal lymph node of the mouse (1–2 mg) by the excess ( $4.5 \times 10^{-13}$  moles) of non-radiolabeled D75CM. The latter was more noticeable in imaging studies than biodistribution because higher excess of non-radiolabeled D75CM was injected ( $1.8 \times 10^{-11}$  moles). Previous studies with the  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DCM20}$  in rats have shown that the leak to the second lymph node is eliminated by reducing the injected non-radiolabeled compound [24]. Thus, in larger animals or humans, the visualization of the SLN only is expected because the size of the lymph node and the number of mannose receptors will be higher. The marginal uptake in the lymph nodes after injecting the non-mannosylated compound  $^{99m}\text{Tc-D75C}$  (Figure 5) in the footpad and the accumulation of radioactivity in the liver after intravenous injection of  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$  in mice (Figure 6) strongly support the interaction of  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$  with mannose receptors.

Overall, the attractive biological features of  $^{99m}\text{Tc-D75CM}$ , in combination with the high radiochemical yield and stability of the compound, justify its further evaluation as a new radiopharmaceutical for sentinel lymph node detection.

#### 4. Materials and Methods

All laboratory chemicals were reagent grade; they were purchased from Aldrich, Acros, or Fluka and were used without further purification. Solvents for high-performance liquid chromatography (HPLC) were HPLC-grade and degassed by a helium flux before and during use. Dextrans (D10: MW 11,800 Da, D20: MW 18,100 Da, D40: MW 40,000 Da, D75: MW 75,000 Da, D150: MW 150,000 Da, and D500: MW 500,000 Da) were purchased from Serva Electrophoresis GmbH. The helium, nitrogen, and CO gases were purchased from Air Liquide (Greece) in cylinders. The cyanomethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-mannopyranoside was prepared according to the literature [26,27].

The ultrafiltration was performed into an ultrafiltration cell (Model 8400, Millipore Corp, Bedford, MA, USA) fitted with an ultrafiltration membrane (YM03, MW cut off 3000).

The NMR spectra were recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  at 25 °C on a Bruker 500 MHz Avance DRX (Bruker, Billerica, MA, USA) using sodium trimethylsilylpropanesulfonate (DSS) as an internal standard. Assignment of the spectra was based on a series of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  experiments described in detail in the literature [23].

HPLC analysis was performed on a Waters 600 chromatography system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a Waters 2487 Dual  $\lambda$  absorbance detector (Waters, Milford, MA, USA) and a Gabi gamma detector (Raytest, Germany). Separations were achieved on a Macherey-Nagel Nucleosil RP-C18 column (10  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4 mm) eluted with a binary gradient system at a 1 mL/min flow rate. Mobile phase A was water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), while mobile phase B was methanol containing 0.1% TFA. The elution gradient was 0–1 min 95% A (5% B), followed by a linear gradient to 30% A (70% B) in 9 min; this composition was held for another 10 min.

Caution! Technetium-99m is radioactive, and all manipulations utilizing radioactive material were performed by authorized personnel, followed appropriate radiation safety procedures, and were conducted in supervised laboratories licensed for such work.  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  was obtained in physiological saline as a commercial  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generator eluate (Ultra-Technekow™ V4 Generator, Curium Pharma, Petten, The Netherlands). The radioactive precursor *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  was prepared using a homemade kit containing 5.5 mg of  $\text{NaBH}_4$ , 4 mg of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , and 20 mg of Na-K tartrate, purged with CO gas before the addition of  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ , as described in the literature [28].

#### 4.1. Synthesis of Allyl-Dextran Compounds (D10A–D500A)

General method: Dextran (15.0 g), 4.0 g ( $1 \times 10^{-1}$  mol) of NaOH, and 0.1 g ( $2.6 \times 10^{-4}$  mol) of  $\text{NaBH}_4$  were dissolved in 75 mL of distilled water. The solution was warmed to 50 °C, and allyl bromide (25.4 g, 0.21 mol) was added. The pH was maintained at 11 by the addition of 2.5 N NaOH. After 4 h, the solution was neutralized (pH 7.0) with glacial acetic acid, and the allyl-dextran was purified by precipitation with ethanol. Further purification was performed by ultrafiltration. The white solid was dissolved in 50 mL water and filtered through a 5 µm filter. The filtrate was transferred into an ultrafiltration cell, and the volume was fixed to 250 mL with water and then concentrated to 15 mL by applying  $\text{N}_2$  gas pressure directly to the ultrafiltration cell. The retentate was diluted with 250 mL water, reconcentrated to 10 mL, and finally lyophilized. Yields ranged between 76% and 82%. All products give the same NMR peaks in  $\text{D}_2\text{O}$ .  $^1\text{H}$  NMR for D10A–D500A ( $\text{D}_2\text{O}$ , ppm), 5.99 (m,  $-\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.38, 5.31 ( $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.17 (subst. dextran anomeric H-1), 4.99 (dextran anomeric H-1), 4.22 ( $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 4.00, 377 (dextran H-6), 3.99–3.53 (subst. dextran H-3–H-6), 3.92 (dextran H-5), 3.74 (dextran H-3), 3.60 (dextran H-2), 3.54 (dextran H-4), 3.74 (subst. dextran H-2).

#### 4.2. Synthesis of Dextran-S-Cysteine Compounds (D10C–D500C)

General method: To a solution of 2.0 g of allyl dextran in 10 mL of water, 1.43 g ( $8.14 \times 10^{-3}$  mol) L-cysteine hydrochloride monohydrate and 0.12 g ( $5.25 \times 10^{-4}$  mol) of ammonium persulfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) were added, and the resulting solution was stirred for 4 h at 50 °C under nitrogen. The pH was adjusted to 4.0 using 0.1 N NaOH, and the solution was left under stirring at room temperature for 24 h. The volume was fixed to 50 mL with 0.02 M NaOAc buffer pH 4.0, and after filtration through a 5 µm filter, the filtrate was transferred into an ultrafiltration cell. The volume was fixed to 250 mL with 0.02 M NaOAc buffer pH 4.0 and then concentrated to 10 mL by applying  $\text{N}_2$  gas pressure directly to the ultrafiltration cell. Subsequently, the retentate was diluted with 250 mL 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  buffer, concentrated to 10 mL, as above; the retentate was diluted with 250 mL of water, reconcentrated to 10 mL, and lyophilized. Yields ranged between 70% and 75%. All products give the same NMR peaks in  $\text{D}_2\text{O}$ .  $^1\text{H}$  NMR for D10C–D500C ( $\text{D}_2\text{O}$ , ppm) 5.18 (subst. dextran anomeric H-1), 4.99 (dextran anomeric H-1), 4.00, 3.78 (dextran H-6), 3.92–3.56 (subst. dextran H-3–H-6), 3.92 (dextran H-5), 3.84, 3.78 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ), 3.94 (cysteine  $\text{SCH}_2\text{CH}$ ), 3.73 (dextran H-3), 3.59 (dextran H-2), 3.54 (dextran H-4), 3.42 (subst. dextran H-2), 3.14, 3.06 (cysteine  $\text{SCH}_2\text{CH}$ ), 2.72 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.92 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ).

#### 4.3. Synthesis of Mannosylated Dextran-S-Cysteine Compounds (D10CM–D500CM)

General method: To a methanolic suspension of cyanomethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-mannopyranoside (1.41 g,  $3.49 \times 10^{-3}$  mol, in 33 mL methanol), 2 mL of sodium methanoxide solution (21.6 mg,  $3.99 \times 10^{-4}$  mol) was added, and the mixture was agitated periodically. After 24 h, 15 mL of the solution was transferred to a dried recovery flask, and methanol was removed by rotary evaporation, affording 2-imino-2-methoxyethyl-1-thio-β-D-mannopyranoside as golden syrup. Immediately, a solution of DC (0.2 g) in 7.5 mL of 0.02 M sodium borate buffer pH 9.0 was added to the flask and left to react for 20 h under periodic stirring. After filtration through a 5 µm filter, the filtrate was transferred into an ultrafiltration cell. The volume was fixed to 50 mL with 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  buffer and



then concentrated to 5 mL by applying N<sub>2</sub> gas pressure directly to the ultrafiltration cell. Subsequently, the retentate was diluted with 50 mL deionized water, concentrated to 5 mL as above (twice), and lyophilized. Yields ranged between 80% and 85%. All products give the same NMR peaks in D<sub>2</sub>O, differing in relative intensities between derivatives. <sup>1</sup>H NMR for D10CM–D500CM (D<sub>2</sub>O, ppm) 5.45, 5.41, 5.34 (mannose anomeric H-1), 5.18 (subst. dextran anomeric H-1), 4.99 (dextran anomeric H-1), 4.40, 4.33 (subst. cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 4.10 (mannose H-2), 4.00, 3.77 (dextran H-6), 3.94–3.72 (mannose H-3–H-6) to check in TOCSY, 3.91 (dextran H-5), 4.00–3.53 (subst. dextran H-3–H-6), 3.87, 3.80 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.93 (free cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.74 (dextran H-3), 3.58 (dextran H-2), 3.52 (dextran H-4), 3.49, 3.42 (NH=CCH<sub>2</sub>S), 3.41 (subst. dextran H-2), 3.20, 3.07, 2.94 (subst. cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 3.14, 3.06 (free cysteine SCH<sub>2</sub>CH), 2.72 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.91 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

#### 4.4. Synthesis of <sup>99m</sup>Tc Complexes

The precursor *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> was prepared using the homemade kit, and its radiochemical purity was checked by RP-HPLC. A solution of *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (0.5–1.0 mL, 37–740 MBq), pH 7–8, was added to a capped vial, containing 100 µg of each of the dextran compounds D10CM–D500CM or D75C. The mixture was incubated at 100 °C for 15 min and then analyzed by HPLC. For the stability and animal studies, all complexes were used without further purification.

#### 4.5. In Vitro Stability Studies of <sup>99m</sup>Tc Complexes

Aliquots of 400 µL (37 MBq) of <sup>99m</sup>Tc complexes were added to 100 µL of histidine or cysteine (5 × 10<sup>-2</sup> M) solution in PBS, pH 7.4, respectively. The samples were incubated for 1, 3, and 6 h, and aliquots were analyzed by HPLC.

#### 4.6. Animal Distribution Studies

All the biodistribution studies were carried out in compliance with the Presidential Decree 56/2013 (published in the Official Government Gazette of Greece 106 A/30-4-2013) that has transposed the EU Directive 2010/63 on the protection of animals used for scientific purposes.

Groups of healthy Swiss Albino mice (male, 25 ± 3 g) under slight ether anesthesia were injected subcutaneously in the rear footpad with <sup>99m</sup>Tc-labeled dextran derivatives. The preparation mixture of the <sup>99m</sup>Tc-labeled compounds was diluted with saline before injection to adjust concentration. A volume of 0.02 mL (0.074 MBq, 0.05 µg DCM) was administered in three groups of three mice each to the rear footpad, while 5 min prior to sacrifice, 0.02 mL of patent blue V was also injected to facilitate lymph node visualization. After each injection, the pad was massaged for 0.5 min. At preset time intervals post-injection (15, 60, and 180 min), mice were sacrificed by cardiectomy. Lymph nodes (popliteal and inguinal) were extracted first. Other organs and samples of blood and muscle were also collected, weighed, and assayed for radioactivity. Total urine volume was collected during the experiment and added to that removed from the bladder after sacrifice. Bladder and excreted urine were not weighed. The stomach and intestines were not emptied of food contents prior to radioactivity measurements. The percentage of injected dose per organ (% ID/organ) was calculated by comparing sample radioactivity with standard solutions containing 10% of the injected dose. The calculation for blood and muscle was based on measured activity, sample weight, and body composition data (considering that blood and muscle comprise 7% and 43% of body weight). The percentage of injected dose per gram (% ID/g) was calculated by dividing the % ID/organ by the organ or tissue's weight.

#### 4.7. Imaging Studies

##### 4.7.1. Imaging Systems

Real-time, fast, dynamic screening studies were performed on a dedicated benchtop, mouse-sized, planar scintigraphy system (γ-eye<sup>TM</sup> by BIOEMTECH, Athens, Greece). The system supports fusion with a digital mouse photograph. In addition, to further

enhance anatomical mouse mapping to the corresponding functional information, a deep neural network was used to translate the photographic image to an artificially produced X-ray scan for anatomical co-registration [29]. The detector is based on position-sensitive photomultiplier tubes (PSPMTs), coupled to a CsI(Na) pixelated scintillator and a medium-energy lead collimator with parallel hexagonal holes, supporting a wide range of SPECT isotopes. The system's field of view is  $5 \times 10 \text{ cm}^2$ , with a spatial resolution of  $\sim 2 \text{ mm}$ .

For the planar imaging, healthy Swiss Albino mice were kept under isoflurane anesthesia and constant temperature of  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Short static scans were possible at different time points to provide longitudinal information on the distribution on the same animal after short anesthesia times, e.g., 10 min or less [30].

Tomographic SPECT/CT imaging was performed with  $\gamma$ -CUBE<sup>TM</sup> and  $x$ -CUBE<sup>TM</sup> (Molecubes, Belgium). The  $\gamma$ -CUBE<sup>TM</sup> (Molecubes, Belgium) system provides SPECT images with a spatial resolution of 0.6 mm for mouse imaging, and the accompanying  $x$ -CUBE<sup>TM</sup> (Molecubes, Belgium) can provide CT images with  $50 \text{ }\mu\text{m}$  resolution, operating between 35 and 80 kVp, 10 and 500  $\mu\text{A}$  tube current.

Mouse imaging on the scintigraphy system was performed by keeping the mice anesthetized under isoflurane and constant temperature of  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dynamic scans were acquired with a 2 min frame with a total of 30 min duration, based on the injected activity and system specifications.

Mouse imaging on tomographic systems was performed by keeping the mice anesthetized under isoflurane and constant temperature of  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . SPECT scans were acquired with a 30–50 min duration, based on the injected activity and system specifications.

A CT scan followed each SPECT scan for co-registration purposes. The SPECT data for the Molecubes system were reconstructed through an MLEM algorithm, with 250  $\mu\text{m}$  voxel size and 500 iterations. CT data were reconstructed through an ISRA algorithm, with 100  $\mu\text{m}$  voxel size.

#### 4.7.2. Animal Imaging Studies

For SPECT isotopes, studies with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -complexes were analyzed. In one study, intravenous bolus injections of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D75CM (20  $\mu\text{L}$ ,  $\sim 10 \text{ MBq}$ ,  $\sim 2 \text{ }\mu\text{g}$  D75CM) were performed. In all the other studies, subcutaneous injection in the footpad of lymph node targeting agent  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D75CM or the non-mannosylated compound  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D75C (20  $\mu\text{L}$ ,  $\sim 10 \text{ MBq}$ , 2  $\mu\text{g}$  D75C or D75CM) was performed. Mice were kept anesthetized during administration and imaging with isoflurane anesthesia (induction with 3–5% isoflurane flow rate and maintenance with 1–3% flow rate). The animals were imaged alive, and the studies started with 2D imaging, and the 3D scans followed right after.

For the live dynamic imaging performed with  $\gamma$ -eye<sup>TM</sup>, post-processing and quantification were performed through embedded analysis software, visual | eyes (BIOEMTECH, Athens, Greece).

For the tomographic images acquired with the tomographic imaging systems, post-processing was performed through third-party analysis software, VivoQuant v1.23 (Invivo LLC, Boston, MA, USA).

## 5. Conclusions

With the aim of developing the ideal radiopharmaceutical for SLND, we worked on the synthesis, labeling, and biological evaluation of a series of mannosylated dextran derivatives. Synthesis of all derivatives was successfully achieved by a multistep procedure. Labeling with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  using the *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  synthon resulted in each case in a single product with high radiochemical purity, and the labeled products were stable.

Biodistribution studies show that all compounds have similar or better characteristics to our previously reported compound  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DCM20}$ . In addition, compound  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D75CM is superior to  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DCM20}$ , as the lymph node uptake is almost 2 times higher, making it a candidate for further evaluation in larger animals and clinical trials as a new radiopharmaceutical for sentinel lymph node detection.

**Supplementary Materials:** The following are available online, Figure S1:  $^1\text{H}$  NMR spectra (range  $\delta_{\text{H}}$  6.2–1.7) of the allyl derivative D75A, the S-derivatized cysteinyl dextran D75C, and the mannosylated dextran D75CM in D<sub>2</sub>O at 25 °C, Figure S2:  $^1\text{H}$  NMR spectra (range  $\delta_{\text{H}}$  5.78–1.56 ppm) of the D10CM, D20CM, D40CM, D150CM, and D500CM derivatives in D<sub>2</sub>O at 25 °C, Table S1: Biodistribution of radioactivity after subcutaneous injection to the rear footpad of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -D10CM–D500CM in mice at (a) 15, (b) 60, and (c) 180 min.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.P. (Minas Papadopoulos) and I.P. (Ioannis Pirmettis); formal analysis, A.S. and I.P. (Ioannis Pirmettis); funding acquisition, G.L., M.P. (Maria Pelecanou), M.P. (Minas Papadopoulos), and I.P. (Ioannis Pirmettis); investigation, A.P., C.K., I.R., K.M., and M.P. (Maria Pelecanou); methodology, A.P. and A.S.; project administration, I.P. (Ioannis Pirmettis); resources, I.P. (Ioannis Pirmettis); software, A.S., G.L. and I.P. (Irineos Pilatis); supervision, M.P. (Minas Papadopoulos) and I.P. (Ioannis Pirmettis); validation, I.P. (Ioannis Pirmettis), M.I., and K.M.; writing—original draft, A.P.; writing—review and editing, A.S., C.K., I.R., M.P. (Minas Papadopoulos), and I.P. (Ioannis Pirmettis). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Department of Agriculture and Veterinary Service of the Prefecture of Athens (Protocol Number: 1606/11-04-2018).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data are available within the article or Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** This research was co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund-ESF) through the Operational Programme “Human Resources Development, Education and Lifelong Learning” in the context of the project “Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research” (MIS-5000432), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY). We thank BIOEMTECH Laboratories ([www.bioemtech.com](http://www.bioemtech.com)—Athens (accessed on 4 August 2021), Greece) for hosting all imaging studies.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Sample Availability:** Samples of the compounds are not available from the authors.

## References

1. Eckelman, W.C.; Reba, R.C.; Gibson, R.E.; Rzeszutarski, W.J.; Vieras, F.; Mazaitis, J.K.; Francis, B. Receptor-Binding Radiotracers: A Class of Potential Radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **1979**, *20*, 350.
2. Castronovo, F.P., Jr. Technetium-99m: Basic nuclear physics and chemical properties. *Am. J. Hosp. Pharm.* **1975**, *32*, 480–488. [[CrossRef](#)]
3. Keshtgar, M.; Zaknun, J.J.; Sabih, D.; Lago, G.; Cox, C.E.; Leong, S.P.L.; Mariani, G. Implementing Sentinel Lymph Node Biopsy Programs in Developing Countries: Challenges and Opportunities. *World J. Surg.* **2011**, *35*, 1159–1168. [[CrossRef](#)]
4. Morton, D.L.; Chan, A.D. The concept of sentinel node localization: How it started. *Semin. Nucl. Med.* **2000**, *30*, 4–10. [[CrossRef](#)]
5. Morais, M.; Campello, M.P.C.; Xavier, C.; Heemskerk, J.; Correia, J.D.G.; Lahoutte, T.; Caveliers, V.; Hernot, S.; Santos, I. Radiolabeled Mannosylated Dextran Derivatives Bearing an NIR-Fluorophore for Sentinel Lymph Node Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1963–1970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Shayan, R.; Achen, M.G.; Stacker, S.A. Lymphatic vessels in cancer metastasis: Bridging the gaps. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 1729–1738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Veronesi, U.; Galimberti, V.; Zurrada, S.; Pigatto, F.; Veronesi, P.; Robertson, C.; Paganelli, G.; Sciascia, V.; Viale, G. Sentinel lymph node biopsy as an indicator for axillary dissection in early breast cancer. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 454–458. [[CrossRef](#)]
8. Wilhelm, A.J.; Mijnhout, G.S.; Franssen, E.J. Radiopharmaceuticals in sentinel lymph-node detection—An overview. *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, S36–S42. [[CrossRef](#)]
9. Fritzberg, A.R.; Kasina, S.; Eshima, D.; Johnson, D.L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m  $\text{MAG}_3$  as a hippuran replacement. *J. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 111–116.
10. Ocampo-García, B.E.; Ramírez, F.d.M.; Ferro-Flores, G.; De León-Rodríguez, L.M.; Santos-Cuevas, C.L.; Morales-Avila, E.; de Murphy, C.A.; Pedraza-López, M.; Medina, L.A.; Camacho-López, M.A.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled gold nanoparticles capped with HYNIC-peptide/mannose for sentinel lymph node detection. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 1–11. [[CrossRef](#)]

11. Estudiante-Mariquez, O.J.; Rodríguez-Galván, A.; Ramírez-Hernández, D.; Contreras-Torres, F.F.; Medina, L.A. Technetium-Radiolabeled Mannose-Functionalized Gold Nanoparticles as Nanoprobes for Sentinel Lymph Node Detection. *Molecules* **2020**, *25*, 1982. [[CrossRef](#)]
12. Vera, D.R.; Wisner, E.R.; Stadalnik, R.C. Sentinel node imaging via a nonparticulate receptor-binding radiotracer. *J. Nucl. Med.* **1997**, *38*, 530–535. [[PubMed](#)]
13. Jeong, J.M.; Hong, M.K.; Kim, Y.J.; Lee, J.; Kang, J.H.; Lee, D.S.; Chung, J.K.; Lee, M.C. Development of  $^{99m}\text{Tc}$ -neomannosyl human serum albumin ( $^{99m}\text{Tc}$ -MSA) as a novel receptor binding agent for sentinel lymph node imaging. *Nucl. Med. Commun.* **2004**, *25*, 1211–1217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Takagi, K.; Uehara, T.; Kaneko, E.; Nakayama, M.; Koizumi, M.; Endo, K.; Arano, Y.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled mannosyl-neoglycoalbumin for sentinel lymph node identification. *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31*, 893–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vera, D.R.; Wallace, A.M.; Hoh, C.K.; Mattrey, R.F. A synthetic macromolecule for sentinel node detection:  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-mannosyl-dextran. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 951–959.
16. Hoh, C.K.; Wallace, A.M.; Vera, D.R. Preclinical studies of [ $^{99m}\text{Tc}$ ] DTPA-mannosyl-dextran. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 457–464. [[CrossRef](#)]
17. Unkart, J.T.; Wallace, A.M. Use of  $^{99m}\text{Tc}$ -Tilmanocept as a Single Agent for Sentinel Lymph Node Identification in Breast Cancer: A Retrospective Pilot Study. *J. Nucl. Med. Technol.* **2017**, *45*, 181. [[CrossRef](#)]
18. Wallace, A.M.; Hoh, C.K.; Darrah, D.D.; Schulteis, G.; Vera, D.R. Sentinel lymph node mapping of breast cancer via intradermal administration of Lymphoseek. *Nucl. Med. Biol.* **2007**, *34*, 849–853. [[CrossRef](#)]
19. Vera, D.R.; Wallace, A.M.; Hoh, C.K. [ $^{99m}\text{Tc}$ ] MAG<sub>3</sub>-mannosyl-dextran: A receptor-binding radiopharmaceutical for sentinel node detection. *Nucl. Med. Biol.* **2001**, *28*, 493–498. [[CrossRef](#)]
20. Morais, M.; Subramanian, S.; Pandey, U.; Samuel, G.; Venkatesh, M.; Martins, M.; Pereira, S.; Correia, J.D.G.; Santos, I. Mannosylated Dextran Derivatives Labeled with *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M =  $^{99m}\text{Tc}$ , Re) for Specific Targeting of Sentinel Lymph Node. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 609–620. [[CrossRef](#)]
21. Wallace, A.M.; Hoh, C.K.; Ellner, S.J.; Darrah, D.D.; Schulteis, G.; Vera, D.R. Lymphoseek: A molecular imaging agent for melanoma sentinel lymph node mapping. *Ann. Surg. Oncol.* **2007**, *14*, 913–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Giglio, J.; Fernández, S.; Pietzsch, H.-J.; Dematteis, S.; Moreno, M.; Pacheco, J.P.; Cerecetto, H.; Rey, A. Synthesis, in vitro and in vivo characterization of novel  $^{99m}\text{Tc}$ -4+1'-labeled 5-nitroimidazole derivatives as potential agents for imaging hypoxia. *Nucl. Med. Biol.* **2012**, *39*, 679–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pirmettis, I.; Arano, Y.; Tsoakos, T.; Okada, K.; Yamaguchi, A.; Uehara, T.; Morais, M.; Correia, J.D.G.; Santos, I.; Martins, M.; et al. New  $^{99m}\text{Tc}$ (CO)<sub>3</sub> Mannosylated Dextran Bearing S-Derivatized Cysteine Chelator for Sentinel Lymph Node Detection. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1681–1692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Subramanian, S.; Pandey, U.; Papadopoulos, M.; Pirmettis, I.; Venkatesh, M.; Samuel, G. Studies toward the biological efficacy of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled dextran-cysteine-mannose ([ $^{99m}\text{Tc}$ (CO)<sub>3</sub>] DCM20) for sentinel lymph node detection. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2012**, *27*, 365–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Azad, A.K.; Rajaram, M.V.; Schlesinger, L.S. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J. Cytol. Mol. Biol.* **2014**, *1*, 1000003. [[CrossRef](#)]
26. Timmons, S.C.; Jakeman, D.L. Stereoselective Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides via Direct Displacement of Acylated Glycosyl Bromides. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1227–1230. [[CrossRef](#)]
27. Lee, Y.C.; Stowell, C.P.; Krantz, M.J. 2-Imino-2-methoxyethyl 1-thioglycosides: New reagents for attaching sugars to proteins. *Biochemistry* **1976**, *15*, 3956–3963. [[CrossRef](#)]
28. Alberto, R.; Schibli, R.; Egli, A.; Schubiger, A.P.; Abram, U.; Kaden, T.A. A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of [ $^{99m}\text{Tc}$ (OH)<sub>2</sub>]<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub><sup>+</sup> from [ $^{99m}\text{TcO}_4$ ]<sup>-</sup> in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7987–7988. [[CrossRef](#)]
29. Fysikopoulos, E.; Rouchota, E.M.; Eleftheriadis, V.; Gatsiou, C.A.; Pilatis, I.; Sarpaki, S.; Loudos, G.; Kostopoulos, S.; Glotsos, D. Photograph to X-ray image translation for ana-tomical mouse mapping in preclinical nuclear molecular imaging. In Proceedings of the 2nd International Conference on Medical Image and Computer-Aided Diagnosis, Birmingham, UK, 25–26 March 2021.
30. Georgiou, M.; Loudos, G.; Fysikopoulos, E.; Lamprou, E.; Mikropoulos, K.; Shegani, A.; Georgoulas, P. λ-Eye: A high-sensitivity  $\gamma$  imaging probe for axillary sentinel lymph node mapping. *Nucl. Med. Commun.* **2016**, *37*, 1001–1009. [[CrossRef](#)]

## Supporting Information

### Comparative study of a series of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ Mannosylated Dextran Derivatives for Sentinel Lymph Node Detection

Afroditi Papasavva <sup>1</sup>, Antonio Shegani <sup>1</sup>, Christos Kiritsis <sup>1</sup>, Ioanna Roupa <sup>1</sup>, Myrto Ischyropoulou <sup>1</sup>, Konstantina Makrypidi <sup>1</sup>, Irineos Pilatis <sup>2</sup>, George Loudos <sup>2</sup>, Maria Pelecanou <sup>3</sup>, Minas Papadopoulos <sup>1</sup> and Ioannis Pirmettis <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Nuclear and Radiological Sciences and Technology, Energy & Safety, NCSR "Demokritos", 15310 Athens, Greece;

<sup>2</sup>BIOEMTECH Laboratories, Lefkippos Attica Technology Park - NCSR "Demokritos", 15310 Athens, Greece;

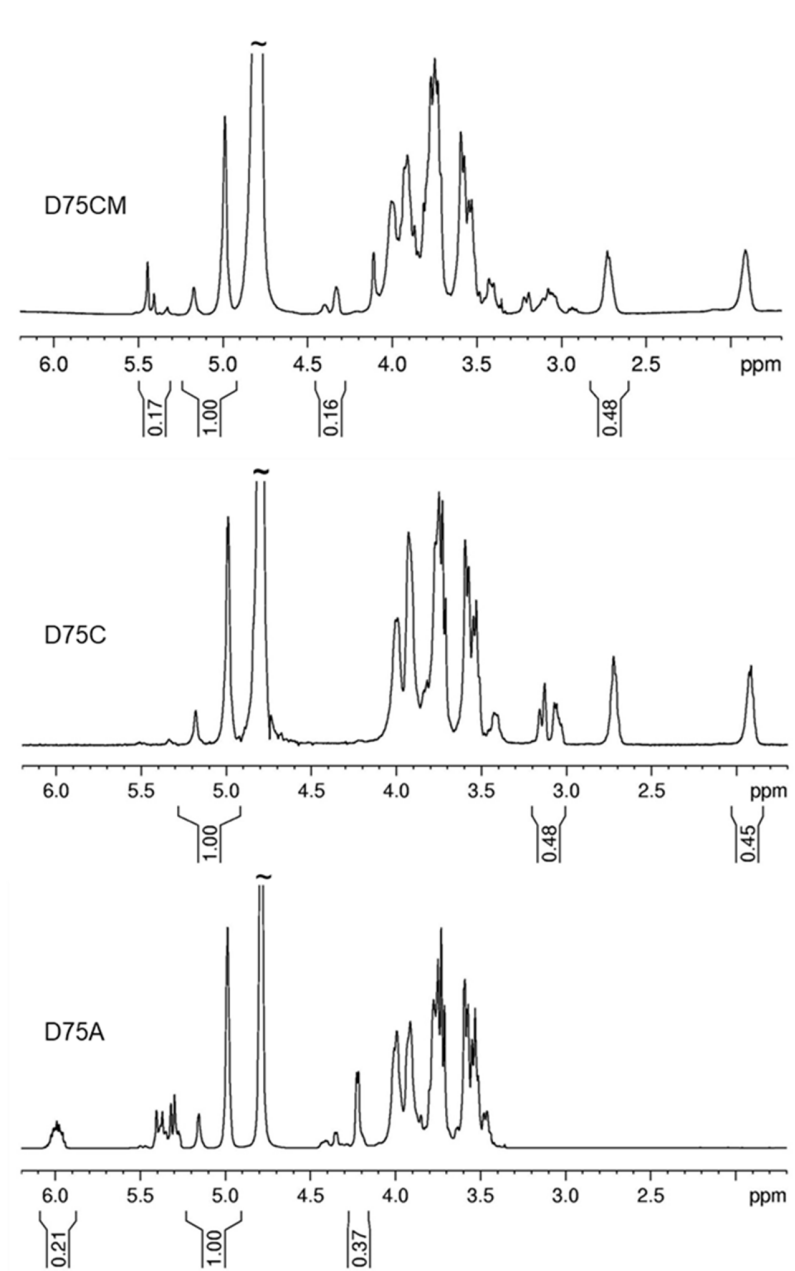
<sup>3</sup>Institute of Biosciences & Applications, NCSR "Demokritos", 15310 Athens, Greece;

\*Correspondence: [ipirme@rrp.demokritos.gr](mailto:ipirme@rrp.demokritos.gr); Tel.: +30 210 650 3921

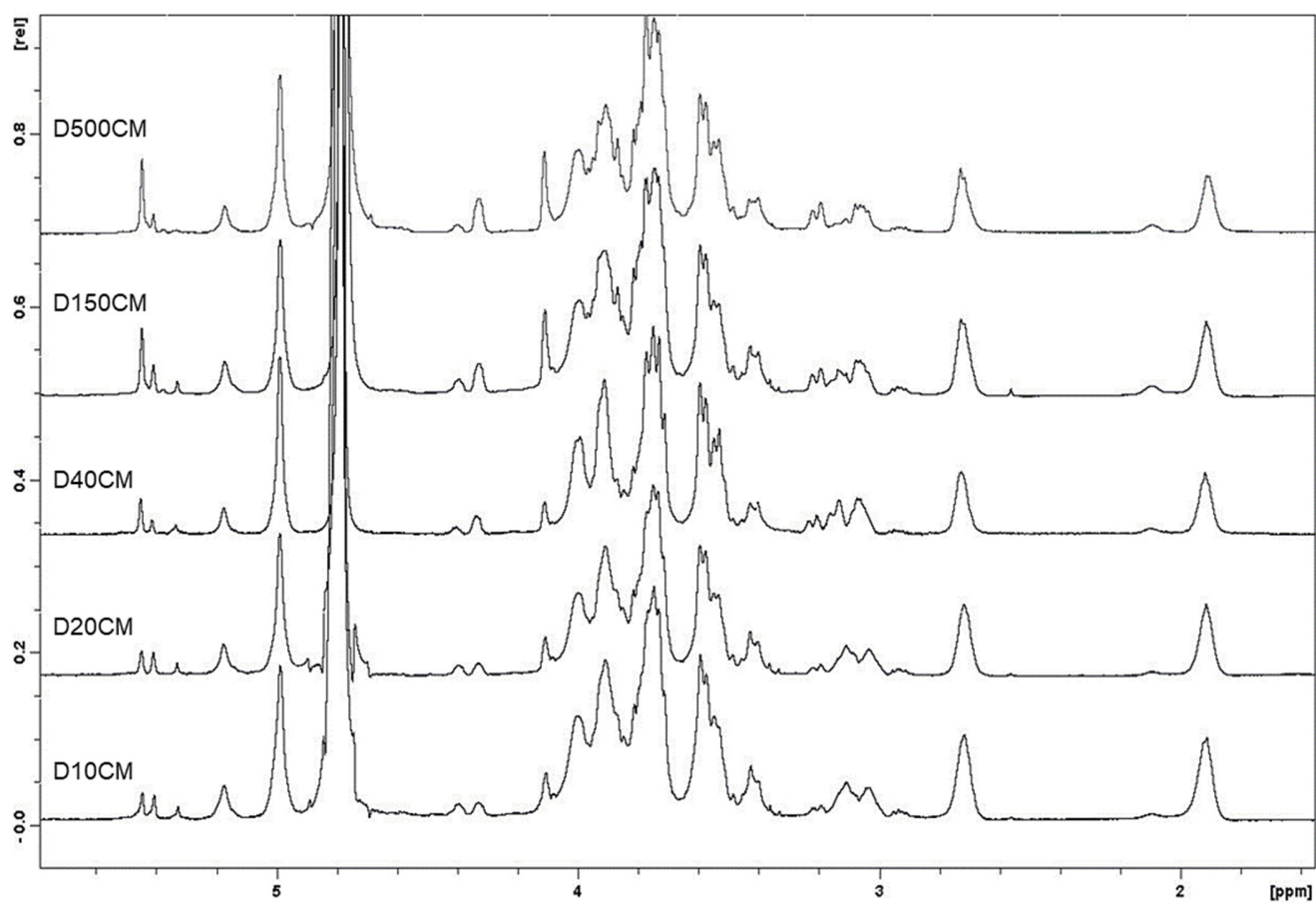
**Corresponding Author.** Dr. Ioannis Pirmettis, Ph.D., INRASTES, NCSR "Demokritos," Ag. Paraskevi Attikis, GR-15310 Athens, Greece; Phone: +30 210 650 3921; E-mail: [ipirme@rrp.demokritos.gr](mailto:ipirme@rrp.demokritos.gr).

## Contents

<b>Figure S1.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra (range $\delta_{\text{H}}$ 6.2–1.7) of the allyl derivative D75A, the S-derivatized cysteinyl dextran D75C and the mannosylated dextran D75CM in $\text{D}_2\text{O}$ at 25 °C. ....	3
<b>Figure S2.</b> $^1\text{H}$ NMR spectra (range 5.78 -1.56 ppm) of the D10CM, D20CM, D40CM, D150CM and D500CM derivatives in $\text{D}_2\text{O}$ at 25 °C. ....	4
<b>Table S1.</b> Biodistribution of radioactivity after subcutaneous injection to the rear footpad of $^{99\text{m}}\text{Tc-D10CM - D500CM}$ in mice at (a) 15, (b) 60, and (c) 180 min. ....	5



**Figure S1.** <sup>1</sup>H NMR spectra (range  $\delta_H$  6.2–1.7) of the allyl derivative D75A, the S-derivatized cysteinyl dextran D75C and the mannosylated dextran D75CM in D<sub>2</sub>O at 25 °C.



**Figure S2.** <sup>1</sup>H NMR spectra (range 5.78 -1.56 ppm) of the D10CM, D20CM, D40CM, D150CM and D500CM derivatives in D<sub>2</sub>O at 25 °C.



**Table S1.** Biodistribution of radioactivity after subcutaneous injection to the rear footpad of <sup>99m</sup>Tc-D10CM - D500CM in mice at (a) 15, (b) 60 and (c) 180 min.

a) 15 min p.i.	<sup>99m</sup> Tc-D10CM	<sup>99m</sup> Tc-D20CM	<sup>99m</sup> Tc-D40CM	<sup>99m</sup> Tc-D75CM	<sup>99m</sup> Tc-D150CM	<sup>99m</sup> Tc-D500CM
Blood	0.76 ± 0.18	0.52 ± 0.12	1.60 ± 0.82	1.93 ± 0.91	2.06 ± 0.14	1.53 ± 0.44
Liver	2.77 ± 0.42	1.08 ± 0.40	2.65 ± 1.29	3.62 ± 0.87	3.72 ± 0.75	1.37 ± 0.27
Heart	0.87 ± 0.24	0.18 ± 0.02	0.72 ± 0.21	0.44 ± 0.12	0.57 ± 0.07	0.29 ± 0.09
Kidneys	3.12 ± 0.38	1.59 ± 0.11	2.20 ± 0.87	2.22 ± 0.47	3.06 ± 0.86	1.52 ± 0.51
Stomach	0.15 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.46 ± 0.28	0.33 ± 0.17	0.24 ± 0.09	0.77 ± 0.30
Intestines	0.22 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.33 ± 0.11	0.36 ± 0.12	0.34 ± 0.08	0.21 ± 0.11
Spleen	0.52 ± 0.01	0.31 ± 0.08	0.81 ± 0.48	0.73 ± 0.22	0.38 ± 0.18	0.50 ± 0.23
Muscle	0.11 ± 0.00	0.06 ± 0.02	0.29 ± 0.18	0.17 ± 0.11	0.18 ± 0.04	0.11 ± 0.03
Lungs	0.32 ± 0.08	0.19 ± 0.12	1.33 ± 0.59	0.96 ± 0.50	1.11 ± 0.40	0.62 ± 0.21
Urine*	1.94 ± 0.30	0.95 ± 0.37	0.76 ± 0.27	2.06 ± 0.74	2.03 ± 0.52	1.64 ± 0.18
1 <sup>st</sup> node*	4.71 ± 0.13	3.04 ± 0.36	1.61 ± 0.39	4.20 ± 0.84	4.16 ± 0.75	3.53 ± 0.44
2 <sup>nd</sup> node*	1.84 ± 0.05	1.77 ± 0.39	0.49 ± 0.07	0.99 ± 0.75	0.97 ± 0.30	1.22 ± 0.10
Injection site*	68.24 ± 0.70	74.68 ± 0.72	63.11 ± 2.94	66.84 ± 1.96	63.28 ± 1.51	72.47 ± 2.72

b) 60 min p.i.	<sup>99m</sup> Tc-D10CM	<sup>99m</sup> Tc-D20CM	<sup>99m</sup> Tc-D40CM	<sup>99m</sup> Tc-D75CM	<sup>99m</sup> Tc-D150CM	<sup>99m</sup> Tc-D500CM
Blood	0.31 ± 0.02	0.10 ± 0.03	1.62 ± 0.23	0.40 ± 0.19	0.92 ± 0.03	0.75 ± 0.15
Liver	3.86 ± 0.55	1.38 ± 0.13	1.70 ± 0.71	3.70 ± 1.44	3.76 ± 0.22	2.72 ± 0.25
Heart	0.27 ± 0.03	0.14 ± 0.06	0.56 ± 0.10	0.34 ± 0.11	0.28 ± 0.04	0.18 ± 0.02
Kidneys	1.84 ± 1.15	0.40 ± 0.03	1.02 ± 0.51	0.90 ± 0.09	1.97 ± 0.47	0.92 ± 0.15
Stomach	0.32 ± 0.11	0.05 ± 0.04	0.85 ± 0.33	0.29 ± 0.04	0.14 ± 0.08	0.86 ± 0.54
Intestines	0.31 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.62 ± 0.08	0.33 ± 0.08	0.73 ± 0.31	0.28 ± 0.03
Spleen	0.95 ± 0.29	0.44 ± 0.14	1.92 ± 0.40	1.43 ± 1.33	1.82 ± 0.39	0.78 ± 0.12
Muscle	0.10 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.06 ± 0.01
Lungs	0.24 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.91 ± 0.05	0.31 ± 0.06	0.39 ± 0.12	0.29 ± 0.03
Urine*	0.79 ± 0.70	1.73 ± 1.22	0.85 ± 1.21	1.69 ± 2.39	1.48 ± 0.42	2.31 ± 1.55
1 <sup>st</sup> node*	7.49 ± 0.88	8.36 ± 0.73	7.40 ± 0.89	15.00 ± 1.50	11.73 ± 0.64	5.80 ± 0.58
2 <sup>nd</sup> node*	2.28 ± 0.19	2.37 ± 0.30	2.00 ± 0.31	1.81 ± 0.77	2.17 ± 0.29	1.93 ± 0.49
Injection site*	64.03 ± 1.56	71.41 ± 0.92	51.59 ± 4.25	53.20 ± 2.96	56.34 ± 3.69	68.15 ± 3.88

c) 180 min p.i.	<sup>99m</sup> Tc-D10CM	<sup>99m</sup> Tc-D20CM	<sup>99m</sup> Tc-D40CM	<sup>99m</sup> Tc-D75CM	<sup>99m</sup> Tc-D150CM	<sup>99m</sup> Tc-D500CM
Blood	0.23 ± 0.01	0.08 ± 0.02	1.17 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.29 ± 0.12	0.20 ± 0.02
Liver	2.75 ± 0.59	1.79 ± 0.35	3.85 ± 2.03	2.22 ± 0.16	4.14 ± 1.94	3.30 ± 0.34
Heart	0.19 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.35 ± 0.03	0.27 ± 0.06	0.10 ± 0.01
Kidneys	1.17 ± 0.66	0.51 ± 0.21	0.76 ± 0.92	0.76 ± 0.13	1.74 ± 0.39	0.52 ± 0.09
Stomach	0.31 ± 0.10	0.25 ± 0.17	1.10 ± 0.44	1.08 ± 0.66	0.48 ± 0.37	1.02 ± 0.29
Intestines	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.18	1.68 ± 0.13	0.81 ± 0.60	0.63 ± 0.13	0.32 ± 0.04
Spleen	0.39 ± 0.08	0.39 ± 0.10	1.13 ± 0.51	1.19 ± 0.33	1.82 ± 0.97	1.68 ± 0.94
Muscle	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.75 ± 0.41	0.34 ± 0.11	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Lungs	0.18 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.30 ± 0.27	0.38 ± 0.06	0.26 ± 0.05	0.13 ± 0.01
Urine*	4.37 ± 2.19	1.32 ± 1.83	1.80 ± 1.27	4.45 ± 3.23	5.58 ± 1.72	5.15 ± 0.60
1 <sup>st</sup> node*	7.73 ± 0.75	6.44 ± 1.01	8.79 ± 0.25	13.53 ± 0.45	12.54 ± 1.93	7.53 ± 1.41
2 <sup>nd</sup> node*	2.29 ± 0.52	1.65 ± 0.69	2.28 ± 0.24	1.49 ± 0.20	2.11 ± 0.23	2.30 ± 0.59
Injection site*	62.60 ± 1.23	70.78 ± 0.97	46.84 ± 4.57	51.04 ± 1.20	55.20 ± 4.12	62.52 ± 3.19

The results are expressed as % ID/g. Mean values are reported ± SD; n = 3. \*Mean % ID values are reported ± SD; n = 3.