



СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ "СВЕТИ КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ"

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ

Катедра Аналитична химия

Лаборатория по Следови анализ: ИСП техники и радиоаналитични методи

Гергана Венцеславова Симеонова

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЪЗМОЖНОСТИТЕ ЗА СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНО
„КЛИК“ РАДИОМАРКИРАНЕ С ^{18}F -ФЛУОРДЕЗОКСИ ГЛЮКОЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“

по научна специалност Радиохимия

София, 2024

Дисертационният труд се състои от 135 страници, съдържа 64 фигури, 15 таблици и са цитирани 143 литературни източници на латиница. Номерацията на фигурите в автореферата не съответства на тази от дисертацията.

Научен ръководител на дисертацията е доц. д-р Валентина Любомирова, а научен консултант – доц. д-р Боян Тодоров.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедрения съвет на катедра „Аналитична химия“ към Факултета по химия и фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, състоял се на дата 11.03.2024г.

Дисертантката е била задочен докторант към катедра „Аналитична химия“.

Членове на научното жури:

1. Проф. д-р Ивайла Панчева, дхн
2. Проф. д-р Анелия Клисарова, дмн
3. Проф. д-р Елисавета Иванова, дхн
4. Проф. д-р Албена Дечева
5. Доц. д-р Петя Ковачева

Резервен вътрешен член: проф. д-р Стефан Цаковски

Резервен външен член: доц. д-р Андриана Сурлева

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на дата от часа в зала на Факултета по химия и фармация към СУ „Св.Климент Охридски“.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Деканата на ФХФ към СУ, както и на интернет страницата на ФХФ.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	2 стр.
Въведение	3 стр.
Цел и задачи на дисертацията	4 стр.
Използвани апаратура, реактиви и материали	5 стр.
Производствен цикъл на [¹⁸ F]FDG	9 стр.
Стереоселктивно клик радиомаркиране с [¹⁸ F]FDG	10 стр.
Резултати и дискусия	19 стр.
Изводи и заключение	42 стр.
Приноси	43 стр.
Списък на собствени научни публикации	44 стр.
Списък на участията в научни форуми и конференции	44 стр.
Участие в научни проекти	45 стр.
Списък на включените фигури	45 стр.
Списък на включените таблици	46 стр.
Благодарности	47 стр.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

иТСО – използван транс-циклооктен: (Z)-O-(cyclooct-4-en-1-yl)hydroxylamine

ПЕТ-СТ – Позитрон емисионна томография

ВОС – tert-butylloxycarbonyl

DAD – детектор с диодна матрица

[¹⁸F]FDG – [¹⁸F]2-флуор-D-дезоксиглюкоза

HPLC – Високоэффективна течна хроматография

IEDDA – [4+2] циклоприсъединяване на Дийлс-Алдер между тетразин и транс-циклооктен

K₁ – анилин

K₂ – p-метоксианилин

K₃ – p-диаминобензен

K₄ – 3,5-диаминобензоена киселина

K222 – Криптофикс или (4,7,13,16,21,24-хексаокса-1,10-дiazобицикло-[8,8,8]-хексакозан

Pr1 – оксимен продукт между [¹⁸F]FDG и Tz1

Pr2 – хидразонен продукт между [¹⁸F]FDG и Tz2

Pr3 – оксимен продукт между [¹⁸F]FDG и R1

Pr4 – монозаместен оксимен продукт между [¹⁸F]FDG и R2

Pr5 – дизаместен оксимен продукт между [¹⁸F]FDG и R2

Pr6 – монозаместен оксимен продукт между [¹⁸F]FDG и R3

Pr7 - дизаместен оксимен продукт между [¹⁸F]FDG и R3

QC – качествен контрол

R₁ – aminooxy-acetic acid 4-(6-phenyl-[1,2,4,5]tetrazin-3-yl)-phenyl ester

R₂ – 4-(6-(4-(2-(aminooxy)acetoxy)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl-2-(aminooxy) acetate

R₃ – aminooxy-acetic acid 6-(2-aminooxy-acetoxy)-[1,2,4,5]tetrazin-3-yl ester

RAD – детектор за радиоактивност

RI – рефрактов индекс

Tz₁ – O-{10-[4-(6-Phenyl-[1,2,4,5]tetrazine-3-yl)-phenoxy]-decyl}-hydroxylamine

Tz₂ – {3-[4-(6-Phenyl-[1,2,4,5]tetrazin-3-yl)-phenoxy]-propyl}-hydrazine

ТСО – транс-циклооктен

TFA – трифлуороцетна киселина

TLC – тънкослойна хроматография

UV/VIS – ултравиолетова/видима светлина

ВЪВЕДЕНИЕ

Онкологичните заболявания са една от водещите причини за смърт в света. Въпреки значителните подобрения в настоящите възможности за лечение като хирургия, лъчетерапия, химиотерапия и имунотерапия се наблюдават и известни недостатъци при третирането на раковите заболявания. За това ранната и прецизна диагностика на злокачествените тумори играе водеща роля при избора на правилния подход за терапия и прогнозата за преживяемост на онкоболните. Тази задача се решава в значителна степен с помощта на нуклеарната медицина чрез изследвания *in vivo*, базирани на разпределението на съединения, маркирани с радионуклиди. Основната образна техника в нуклеарната медицина е позитрон емисионната томография (ПЕТ-СТ). Има за цел неинвазивно визуализиране, характеризиране и количествено определяне на биологичните процеси на клетъчно и молекулярно ниво *in vivo*. Принципът ѝ се състои в детектирането на позитронни емитери, в следствие на което се реконструират дву- и тримерни образи от разпространението на радиоактивността в тялото на пациента. Основен радионуклид за получаването на ПЕТ-радиофармацевтици е ^{18}F . Характеризира се с лесна достъпност, оптимални физични свойства и относително кратък период на полуразпад (109 мин.). За целите на радиофармацевтичния синтез предимно се получава в циклотрон чрез протонно бомбардиране на обогатена на ^{18}O вода по следната ядрена реакция $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.

Маркираната с ^{18}F [^{18}F]FDG е аналог на глюкозата и е най-често използваният ПЕТ радиофармацевтик поради високоефективния му радиосинтез и възможността за автоматизация. Намира приложение в онкологията, кардиологията и неврологията. ПЕТ-СТ с [^{18}F]FDG е чувствителен образен метод за откриване и характеризиране на злокачествени тумори, за оценка на ефекта от проведено лечение, за планиране на терапия и също така за определяне точното място за биопсия. Предимно се получава чрез нуклеофилно радиофлуориране, като реакцията протича по $\text{S}_{\text{N}}2$ механизъм, т.е. като бимолекулна стереоспецифична реакция, последвана от киселинна хидролиза. Въпреки че [^{18}F]FDG се използва като универсален не се вписва в съвременната концепция за високоспецифичен и селективен радиофармацевтик. Това налага необходимостта от модифициране на молекулата. [^{18}F]FDG е докладвана като подходяща простетична група, която може да се използва за индиректно маркиране на чувствителни макромолекули. Наличието на карбонилна група в структурата предполага участието на молекулата в реакции за формиране на оксимна или хидразонна връзка. По тази причина разработването и предлагането на методика за модифициране на един от най-често

използваните в нуклеарната медицина радиофармацевтици [^{18}F]FDG е основната идея, заложена в настоящия дисертационен труд.

Възможността за използване на специфични клик реакции за модифициране на ^{18}F -маркираните радиофармацевтици допълнително може да повиши тяхната специфичност и ефективност. Интересна клик реакция е циклоприсъединяването между тетразин и транс-циклооктен. Характеризира се с бърза кинетика и необратимост, протича във водна среда и в отсъствие на катализатор. Реакцията дава възможност за получаване на радиофармацевтици за предварително насочено изобразяване. Това е стратегия, при която радиомаркирането на желаната биомолекула се извършва *in vivo*. Първо се инжектират специфични за целта молекули или имуноконюгати, които се свързват с целевото място. След това се добавят радиомаркирани съединения, които селективно се конюгира с предварително обработените молекули на прицелното място. Този метод има няколко предимства, включително по-добър контраст на изображението, възможност за използване на краткоживущи ПЕТ радионуклиди и намаляване на дозите на облъчване на нецелевите тъкани.

Възможността за индиректно радиомаркиране с [^{18}F]FDG на бифункционални производни на тетразин и ТСО, които могат да се кликват по между си, е важна стъпка към развитието на персонализираната медицина, свързана с ранната и точна диагностика на раковите заболявания, и също така с прецизирането на терапията. Смята се, че методът за радиомаркиране, основан на биоортогоналната клик реакция на тетразин с транс-циклооктен (IEDDA), може да позволи бързо свързване при много ниски концентрации, което да доведе до оптималното получаване на нови ПЕТ радиофармацевтици с висока специфична активност и селективност.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Настоящата работа цели да се проследят възможностите за използване на [^{18}F]FDG като простетична група за стереоселективно „клик“ радиомаркиране на макромолекули. Реакцията трябва да е проста за реализиране, да включва минимален брой етапи, да е ефективна и бърза предвид относително краткия период на полуразпад на ^{18}F (109 мин). Важно е да позволява извършването ѝ в стандартни клинични условия при умерено висока температура (до 80°C). Разработването на методология за модифициране на [^{18}F]FDG, използвайки бифункционално производно на тетразин, ще осигури флуориращ агент, който може да се кликва към биоактивни ТСО структури.

След провеждане на синтеза е необходимо крайният продукт да се охарактеризира със съвременни методи за разделяне и анализ.

За изпълнението на заложената цел са поставени следните задачи:

1. Разработване на методика за оксимно модифициране на аминоксифункционализирани тетразини.
2. Разработване на методика за хидразоново модифициране на хидразин съдържащи тетразини.

ИЗПОЛЗВАНИ АПАРАТУРА, РЕАКТИВИ И МАТЕРИАЛИ

Представените в дисертацията експерименти, свързани с производството и качествения контрол на [^{18}F]FDG, маркирането на бифункционални производни на тетразин и TCO с [^{18}F]FDG чрез формиране на оксимна или хидразонна връзка се извършват на територията на Клиниката по Нуклеарна медицина към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Допълнителни анализи и охарактеризиране на някои от получените продукти с HPLC и IR-ATR, както и изследване кинетиката на IEDDA реакции чрез абсорбционен спектрофотометър се извършват във Факултета по химия и фармация към Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

I. Използвана апаратура

➤ Циклотронен комплекс

За производството на [^{18}F]FDG в клиниката по Нуклеарна медицина към УМБАЛ „Света Марина“ – Варна се използва биомедицински малък циклотрон на ABT Molecular Imaging, модел BG-75, комплектован с автоматизиран радиохимичен синтезен модул и автоматизирана QC-система. Автоматизираната QC система включва pH – микроелектрод, QC – помпа, стандартна HPLC – система с UV/VIS, RI и RAD детектори. Използваната HPLC – колона е Phenomenex, Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%), 4,6x250 mm, която се поддържа при 76°C в пещ.

➤ Активиметър (дозов калибратор)

За измерване активността на получения радиофармацевтик [^{18}F]FDG и определяне периода на полуразпад на радионуклида се използва дозов калибратор Dose Calibrator ISOMED 2010, SN 192148, удостоверяен съгласно наредбите на местните агенции за радиационен контрол.

➤ Мултиканален анализатор (гама спектрометър)

За определяне на радионуклидната чистота се използва мултиканален анализатор Digital Spectrum Analyzer DSA-1000 с германиев детектор (модел 7500).

➤ Апаратура за бактериални ендотоксини

За определяне наличието на бактериални ендотоксини се използва система Endosafe PTS Charles river (модел ES-VAL-PTS001-12, SN 5821), използваща лицензирани еднократни за употреба касетки, специфични за апарата.

➤ Радио-TLC

Установяването на успешно протичане на реакциите и получаване на радиомаркирани с [¹⁸F]FDG бифункционални съединения чрез формиране на оксимна и хидразонна връзка се извършва с радио-TLC апаратура TLC (Scan-Ram PET/SPECT radio TLC-scanner).

➤ HPLC-DAD система

За доказване на успешното протичане на реакциите и получаване на желаните продукти се прилага HPLC-анализ с помощта на HPLC-система Varian ProStar. Разделянето се извършва с хроматографска колона C18 (Microsorb-MV, 100-5, C18, 150 x 4,6 mm). Параметрите на хроматографския анализ са посочени в таблица 1.

Таблица 1. Параметри на HPLC анализ

Параметри на хроматографското разделяне	Подвижна фаза	H ₂ O (А) и CH ₃ CN (Б)
	Поток	1 mL.min ⁻¹
	Градиент	95% А:5% Б за 2 min → 0% А:100% Б за 20 min
	Продължителност	22 min
Параметри на детектора	Дължина на вълната	260 nm

➤ Радио – HPLC система

Като независим метод се използва радио-HPLC с помощта на радио-HPLC – система SCI8100 Plus, включваща: вакуумен дегазатор, бинарна помпа; UV/VIS детектор с възможност за двойна дължина на вълната; детектор за радиоактивност. Разделянето се провежда със същата хроматографска колона C18 (Microsorb-MV, 100-5, C18, 150 x 4,6 mm). Анализи са извършват при два различни градиентни метода, чиито параметри са представени в таблица 2.

Таблица 2. Параметри на радио-HPLC анализ

Показател	I метод	II метод
Подвижна фаза	0,1%TFA/H ₂ O (А) и 0,1%TFA / CH ₃ CN (Б)	0,1%TFA/H ₂ O (А) и 0,1%TFA CH ₃ CN (Б)
Поток	1 mL.min ⁻¹	1 mL.min ⁻¹
Градиент	95% А:5% Б за 2 min → 0% А:100% Б за 20 min	100% А: 0% Б за 4 min 40% А: 60% Б за 10 min 5% А: 95% Б за 6 min
Продължителност	22 min	20 min
Дължина на вълната	260 nm	280 nm

➤ Помощна апаратура

За приготвяне на разтвори с определена концентрация и рН се използват аналитична везна KERN ABS-N-ABJ-NM, модел 1,5 /08/2017 BG (1715) и рН-метър модел Bante 920UK. За подгръване на реакционните смеси се използва термостатирана водна баня, екранирана с оловна защита.

II. Използвани реактиви и материали

1. Реактиви и материали за производството на [¹⁸F]FDG

За производството на радионуклида ¹⁸F се използва обогатена на ¹⁸O вода (≥ 98%) ([¹⁸O]H₂O). За радиохимичния процес се използват еднократни синтезни карти и кит с реагенти, включващ ацетонитрил, K222, етанол 70%, 2M HCl, вода за инжекции и празен флакон за отпадък. И допълнително се използва флакон, съдържащ лиофилизиран манозен трифлат. Всички реактиви се получават от търговската мрежа и се използват без допълнително пречистване.

За провеждане на HPLC анализа от автоматизираната QC-система се използва вода за течна хроматография (Fisher). За определяне на бактериални ендотоксини се използват LAL вода (EMD Millipore Corporation) и еднократни специфични за апарата касетки (Charles River).

2. Реактиви и материали, необходими за хемоселективно маркиране с [¹⁸F]FDG

2.1. *Катализатори:* анилин (**K1**); p-метоксианилин (**K2**); p-диаминобензен (**K3**); 3,5-диаминобензоена киселина (**K4**)

2.2. *Буфери:* натриево ацетатен с рН=4; фосфатен PSB с рН=7,4; HEPES рН=5,5; калиев фталатен буфер с рН=4; анилин ацетатен буфер с различно рН (воден

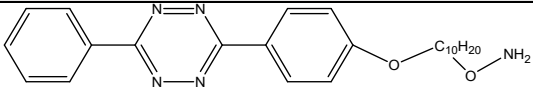
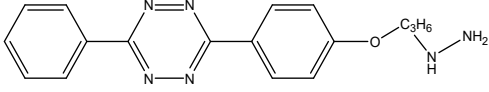
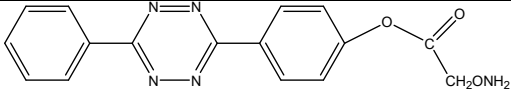
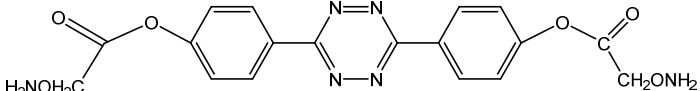
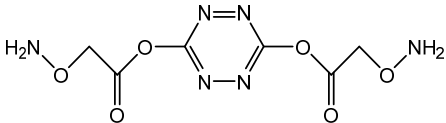
разтвор на катализатора – анилин или негово производно, подкиселен с оцетна киселина).

2.3. Бифункционални производни на тетразин:

- O-{10-[4-(6-Phenyl-[1,2,4,5]tetrazin-3-yl)-phenoxy]-decyl}-hydroxylamine (**Tz1**)
- {3-[4-(6-Phenyl-[1,2,4,5]tetrazin-3-yl)-phenoxy]-propyl}-hydrazine (**Tz2**)
- aminooxy-acetic acid 6-(2-aminooxy-acetoxy)-[1,2,4,5]tetrazin-3-yl ester (**R3**)
- aminooxy-acetic acid 4-(6-phenyl-[1,2,4,5]tetrazin-3-yl)-phenyl ester (**R1**)
- 4-(6-(4-(-2-(aminooxy)acetoxy)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl-2-(aminooxy) acetate (**R2**)

Избрани са подходящо функционализирани производни на тетразин, съдържащи свободна хидроксиламинава или хидразинова група, способни да образуват оксимна или хидразонова връзка. Освен това е подбран подходящ спейсър между тетразиновия пръстен и функционалната група. Чрез варирането на спейсъра може да се влияе върху липофилността и фармакокинетичните свойства на макромолекулата. Структурите на използваните бифункционални съединения са представят в таблица 3.

Таблица 3 – Структури на бифункционалните съединения

Бифункционално съединение	Структура
Tz1	
Tz2	
R1	
R2	
R3	

Използваните вещества се синтезират предварително във Факултета по химия и фармация към СУ „Св. Климент Охридски“, като част от изпълнението на проект с договор № КП-06-Н29/4 (Фонд Научни Изследвания към Министерство на Образованието и Науката). Продуктите се пречистват посредством колонна

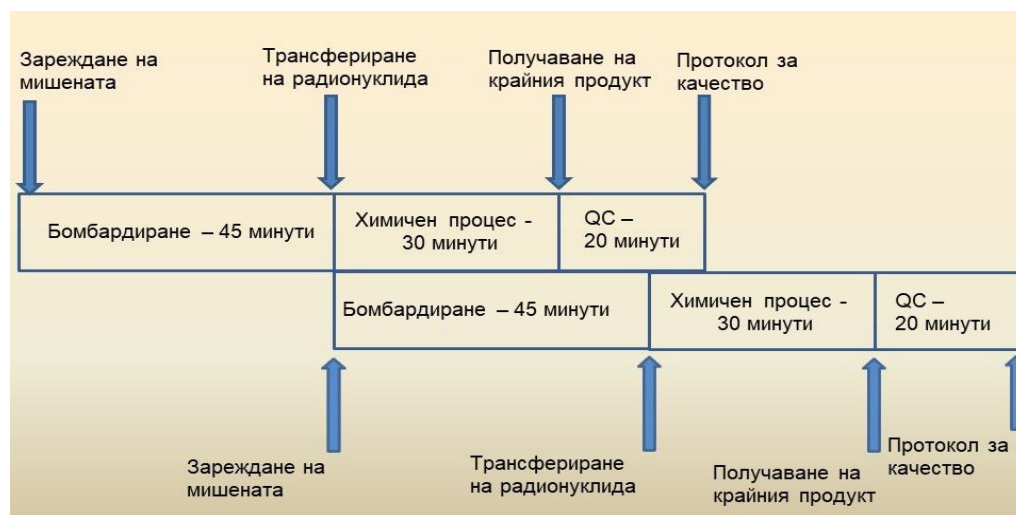
хроматография с полярни фази и се охарактеризират с $^1\text{H-NMR}$, след което се използват за целите на нашия експеримент.

2.5. *Разтворители и киселини:* HPLC вода, ацетонитрил, етилацетат, дихлорметан, метанол, етанол, оцетна киселина, труклуороцетна киселина.

2.6. *Помощни материали:* полиетиленови кюветки от 0,5 и 1,5 mL; стъклени флакони с гумена тапа от 10 mL; автоматични пипети от 5 μL , 100 μL и вариабилна от 200 до 1000 μL ; алуминиеви плаки с покритие от силициев диоксид за TLC; ваничка за TLC плаки; спринцовки от 2 mL и игли към тях; филтри 0,45 μm .

ПРОИЗВОДСТВЕН ЦИКЪЛ НА ^{18}F FDG

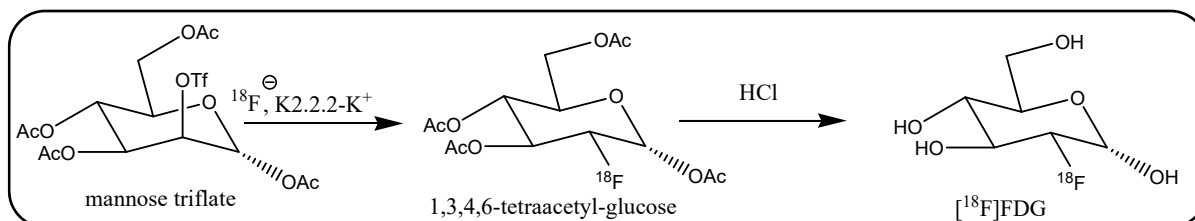
Клиниката по Нуклеарна медицина към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна разполага със собствен циклотрон, с помощта на който се осъществява производството на ^{18}F FDG за рутинни клинични цели. Производството е стандартизирано и напълно автоматизирано, характеризира се с добра възпроизводимост. Радиофармацевтикът се получава в спринцовка като готова за инжектиране доза. На фигура 1 се представя времевата схема на етапите от производствения цикъл. Продължителността на производствения процес е 95 ± 5 минути. Докато се извършва радиохимичният процес в синтезния модул, в циклотрона успоредно се произвежда радионуклидът за следващата доза. Поради застъпването на споменатите процеси, получаването на дозите след първата е през интервал от 50 минути.



Фигура 1 – Времеви етапи на производствения цикъл

В първия етап от производствения цикъл се осъществява производството на радионуклида ^{18}F чрез бомбардиране на обогатена на ^{18}O вода ($>95\%$) с протони с

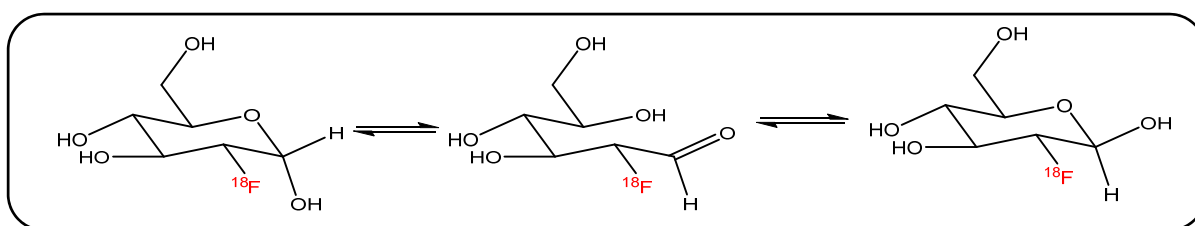
енергия 7,5 MeV при среден ток 4 μ A за 40-45 минути. След постъпване на радионуклида (под формата на анион във воден разтвор) в реактора на синтезната карта се извършва радиохимичният синтез на [^{18}F]FDG в продължение на 30-32 минути. За целта се прилага нуклеофилно радиофлуориране с прекурсор манозен трифлат, последвано от хидролиза с 2 M HCl, представено на фигура 2.



Фигура 2 – Синтез на [^{18}F]FDG

Полученият продукт се подлага на различни контроли за качество, които да гарантират чистота, сигурност и ефективност. След успешното извършване на контрола за качество полученият продукт се освобождава и прилага за клинични цели.

Неаплицирани на пациенти количества от [^{18}F]FDG се използват за целите на нашия експеримент за модифициране на бифункционални производни на тетразин. Използва се [^{18}F]FDG като простетична група се дължи на факта, че във воден разтвор се наблюдава равновесие между цикличните и ацикличната форма на молекулата, представено на фигура 3. Ацикличната форма се благоприятства при висока температура и ниско рН.



Фигура 3 – Равновесие на [^{18}F]-FDG във воден разтвор

СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНО КЛИК РАДИОМАРКИРАНЕ С [^{18}F]FDG

1. Реакционни условия на проведените експерименти

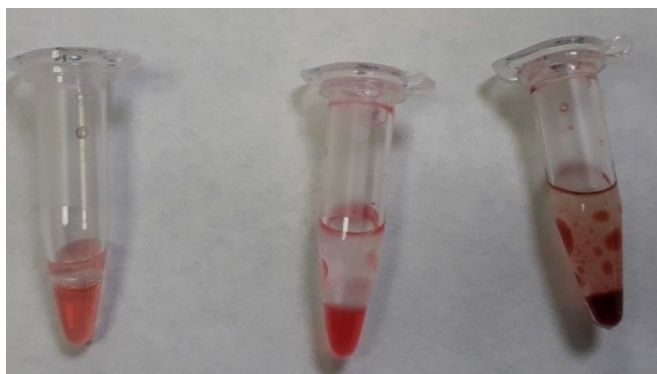
Реакциите за модифициране с [^{18}F]FDG на бифункционалните производни на тетразин се извършват изцяло в клинични условия на територията на Клиниката по нуклеарна медицина към УМБАЛ „Света Марина“ – Варна, а не в специализирана радиохимична лаборатория. От гледна точка на радиационната безопасност

експериментите се провеждат при ниска начална радиоактивност на [¹⁸F]FDG. Провеждат се над двеста синтеза. За да се намерят оптималните реакционни условия за конюгирането между бифункционалните тетразини и [¹⁸F]FDG, реакциите се провеждат при различни температури: стайна температура, 30, 40, 50, 70, 80 и 100°C, като нагряването се извършва в термостатирана водна баня. Проследяването на хода на реакциите се извършва с радио-TLC на проби след 1, 5, 10, 20 и 30 минути след смесване на реагентите. Варира се рН на средата в границите между 0,5 и 8,5. Провеждат се синтези в отсъствието и в присъствието на катализатор (анилин или негови производни). Варира се видът на използвания буфер (натриево-ацетатен, фосфатен, HEPES, анилин-ацетатен). Варират се количествата на използваните реагенти, концентрацията на катализатора, съотношението на тетразина спрямо [¹⁸F]FDG и начинът на смесване на реактивите. При някои синтези всички реактиви се смесват в началния момент, непосредствено преди нагряването. След това се установява, че поетапното смесване се оказва по-ефективно, като на първия етап се смесват буферният разтвор на катализатора с [¹⁸F]FDG, а на следващия етап се добавя тетразинът, предварително разтворен в ацетонитрил. В част от експериментите въглеводородният компонент се използва в десетократен излишък спрямо тетразина. За да се компенсира ниската радиоактивност на [¹⁸F]FDG (съответстваща на ниско молно количество), се добавя определено количество нерадиоактивна глюкоза като носител. Приложената радиоактивност е в границите между 20 и 70 µCi (0,74-2,59 MBq). В последствие се провеждат синтезите без добавяне на нерадиоактивна глюкоза, като в тази група експерименти се прилага значително по-висока активност – от порядъка на 150 – 750 µCi (5,55 – 27,75 MBq).

При първоначалните експерименти радио-TLC анализът се провежда с DCM (дихлорметан) като елуент, но се оказва неподходящ за разделяне на реакционните компоненти, тъй като и [¹⁸F]FDG, и полученият продукт се задържат на старта (в точката на накапване). След това се използва смес DCM/CH₃OH 1:1 и се получава малко по-добро разделяне. Впоследствие се прилага по-полярен разтворител – етилацетат.

До установяване на оптималните условия синтезите се провеждат предимно с един от предоставените тетразини, а именно с Tz1. Първите експерименти се провеждат в много малки количества (общият обем на реакционната смес е 0,27 – 0,30 mL) и с много ниски радиоактивности на [¹⁸F]FDG, като реагентите едновременно се смесват в началния момент. Поради малкия обем на реагентите първоначално като реакционен съд се използват полиетиленови кюветки с обем 0,5 mL (които обаче не са подходящи за

нагряване при по-висока температура). На фигура 4 се представят реакционни смеси на подбрани първоначални експерименти.



Фигура 4 – Реакционни смеси при начални експерименти

На по-късен етап от работата синтезите се провеждат в стъклени флакони от 10 mL, показани на фигура 5.



Фигура 5 – Реакционни флакони

Флаконите се нагряват със забита в гумената тапа вентилационна игла за изравняване на парното с атмосферното налягане. По този начин се предотвратява тяхното отваряне и евентуалното изпръскване от радиоактивната реакционна смес.

2. Описание на експерименталните процедури

2.1. Експерименти със случайни съотношения на реагентите

При първите експерименти реагентите (100 μL натриево-ацетатен буфер, 20 μL анилин, 100 μL [^{18}F]FDG и 50 μL разтвор на тетразин с концентрация 10 μM) се смесват едновременно и реакционният съд се инкубира при съответната температура за 15 минути. При други експерименти добавянето на тетразина се извършва на по-късен етап след предварителното нагряване на останалите компоненти от реакционната смес. Провеждат се и експерименти без катализатор, но в присъствие на HCl. Конкретните

условия на синтезите могат да се видят в таблица 4 (1-3 ред). Проведеният TLC анализ с DCM като елуент показва неуспешна реакция при тези условия.

2.2. Експерименти с добавка на нерадиоактивна глюкоза към реакционната смес – работи се в излишък на глюкозата спрямо тетразина

При тази група експерименти катализаторите K1 или K2 се разтварят в съответния буфер (натриево-ацетатен, NEPEs и PBS). От получените разтвори с концентрация 0,2-0,8 М се прехвърлят 500 μL в реакционния съд. Към тях се добавя съответното количество нерадиоактивна глюкоза като носител и 100 μL [^{18}F]FDG. Реакционната смес се нагрява при температура 70-80°C в продължение на 20 минути, след което се добавя разтворът на тетразина. Следва допълнително нагряване при същата температура за 15 минути. След проведен TLC анализ с DCM в някои от случаите се наблюдават цветни петна на старта, съответстващи на получени продукти, докато изходният тетразин и катализаторът се регистрират като цветни петна в близост до фронта. На този етап от работата само качествено се проследява дали реакцията протича или не, тъй като при елуирането с DCM и нереагиралата [^{18}F]FDG се задържа на старта. И при сканиране на плаките с радио-TLC скенер не може да се отчете каква част от регистрираната радиоактивност съответства на получения продукт. Успешни синтези се наблюдават в присъствието на K2 в натриево-ацетатен буфер и крайно рН на реакционната среда 5,4. Повече детайли за условията на синтезите могат да се получат от таблица 4 (4-7 ред).

2.3. Експерименти без добавяне на нерадиоактивна глюкоза към реакционната смес – работи се в голям излишък на тетразина

Необходимостта от получаване на маркиран продукт с по-висока специфична радиоактивност води до провеждане на следващите синтези без добавяне на нерадиоактивна глюкоза, тоест в голям излишък на тетразин спрямо [^{18}F]FDG, а не обратното. Това предполага пълно превръщане на [^{18}F]FDG, присъстваща в реакционната система при оптималните за реакцията условия. Основно проследяването на синтезния процес и производството на продукта се извършва чрез TLC, поради което е важно да може да се визуализират получените по-наситени цветни петна върху плаката, в които се регистрира радиоактивността, съответстваща на продуктите. Това е основната причина за разработването на процедурата в излишък на тетразин спрямо флуорирания реагент. За установяването на оптималните реакционни условия за

формирание на оксимна или хидразонна връзка между [^{18}F]FDG и бифункционален тетразин се изпробват различни методики, взети от литературата:

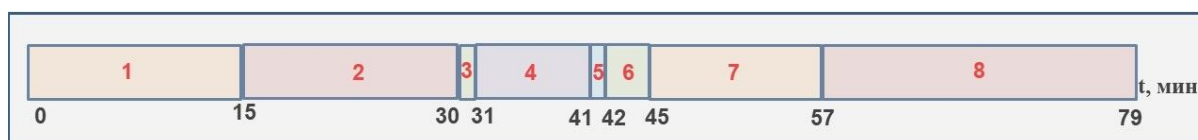
- Методика, предложена от Wuest и колектив (2009): Като реакционна среда се използва смес от метанол и вода в съотношение 1:1, от която 0,5 mL се прехвърлят в реакционния съд. Към нея едновременно се добавят 0,2 mL [^{18}F]FDG и 0,1 mL разтвор на съответния тетразин. Използва се Tz1. Реакционната смес се нагрява при 80°C в продължение на 30 минути.
- Изпробва се методика, взета от Wuest (2008), при която като реакционна среда се използва смес от физиологичен разтвор и етанол в съотношение 1:5. От тази смес се вземат 0,5 mL и към нея се добавят същите количества [^{18}F]FDG (0,2 mL) и разтвор на тетразин (0,1 mL). Всички реактиви се смесват едновременно в началния момент. Нагрява се при температура 95°C в продължение на 10 минути. При някои от синтезите нагряването е 20 минути при 100°C или 30 минути при 80°C.
- Методика, представена от Maschauer (2014), при която като реакционна среда се използва 0,4% (TFA) и 16% етанол във физиологичен разтвор. Отпипетирват се 0,5 mL от така приготвения разтвор с рН=1,5. Към него се добавят реагентите [^{18}F]FDG и R3. Реакционната смес се нагрява при 100°C в продължение на 20 минути.

Условията на представените методики са обобщени в таблица 4 (8-10 ред). Според резултатите от проведения радио-TLC анализ не се регистрират цветни петна с отчетена радиоактивност в тях. Прилагането на тези методики в случая не води до успешно маркиране на бифункционален тетразин чрез формирание на оксимна или хидразонна връзка. За това отново се прилага методиката, описана в точка 2.2., при която се регистрира наличие на маркиран продукт. В този случай обаче експериментите се провеждат без добавяне на нерадиоактивна глюкоза и с по-висока приложена радиоактивност на [^{18}F]FDG. Стремежът е да се оптимизират реакционните условия (температура, рН, концентрация и вид на катализатора), за да се получи маркиран продукт с висок RCU и добра радиохимична чистота (RCP). Методиката, по която се работи в следващите експерименти, е следната: към 0,5 mL разтвор на някой от катализаторите (K1, K2, K3, K4), подкиселен с оцетна киселина до дадено рН, се добавят 0,2 mL [^{18}F]FDG с активност в границите 0,15-0,80 mCi (5,55 – 29,6 MBq). Нагрява се при съответната температура 10-15 минути, след което се добавя 0,1 mL разтвор (в ацетонитрил) на някой от тетразините. Отново се загрява 15 минути. При този начин на

смесване на реактивите и при тези количества се променят видът на катализатора, видът на тетразина, рН на средата, както и реакционната температура.

Разтворът на буферирания катализатор е и среда за провеждане на реакцията, поради което се използва в огромен излишък спрямо останалите реакционни компоненти. Това е условие за успешното протичане на радиомаркирането с [^{18}F]FDG чрез формиране на оксимна или хидразонна връзка. При провеждане на синтезите по втората стратегия без добавяне на нерадиоактивна глюкоза концентрацията на изходния разтвор на тетразина е в границите между 15 и 25 μM . Работи се в излишък на тетразина спрямо [^{18}F]FDG от порядъка 10^3 - 10^4 пъти.

Установява се, че оптимални за синтезите условия са следните: присъствие на катализатор К2 или К3 в концентрация 0,3-0,5 М; рН 4-4,3; Т 70-80°C; поетапно смесване на реактивите и излишък на тетразина спрямо [^{18}F]FDG. Като елуент за TLC в тези експерименти се използва етилацетат. Радиомаркирането на бифункционалните съединения и тяхното потвърждаване включва следните етапи: активиране на [^{18}F]FDG и отваряне на глюкопиранозния пръстен (1); добавяне на разтвора на тетразина и неговото модифициране (2); в края на синтеза вземане на проба за TLC (3), последващо елуиране с етилацетат (4); сканиране на плаката, получаване на радио-TLC хроматограма (5) и обработка на резултата (6); при успешен синтез в някои случаи се провежда допълнително HPLC или радио-HPLC, включващо подготовка (7) и анализ на пробата (8). В случаите на провеждане на радио-HPLC непосредствено след проведен радио-TLC получената HPLC- хроматограма излиза към 80-та минута след смесване на буферирания разтвор на катализатора с [^{18}F]FDG. Относително краткият период на полуразпад на ^{18}F и използването на ниска радиоактивност са причина успешното протичане на реакцията за формиране на оксим или хидразон основно да се проследява чрез радио-TLC. Времеви етапи на радиомаркирането се представят на фигура 6. При тези реакционни условия и тази методика освен Tz1 се модифицират и останалите бифункционални тетразини (Tz2, R1, R2 и R3).



Фигура 6 – Времеви етапи на радиомаркирането и потвърждаването на продукта

При маркиране на R1 и R2 се използват защитени с ВОС група тетразини, при което е необходимо провеждането на една допълнителна стъпка за отстраняване на защитата. Премахването на ВОС защитата се реализира чрез карбаматна хидролиза в киселинни

условия. Изходният материал се разтваря във вода или органичен разтворител като толуен, дихлорметан или етилацетат. За подкиселяване на средата може да се използват HCl или TFA. В случая се приготвят следните разтвори 25% TFA/DCM и 25% TFA/етилацетат. Малко количество от защитените с BOC група тетразини се накисва в 0,60 mL 25% TFA/етилацетат. Разбърква се при стайна температура в продължение на 10-12 часа. Следва изпаряване на разтворителя, след което така получените тетразини се разтварят в ацетонитрил и се модифицират по установената процедура.

При маркиране на някой от симетричните тетразини (R2 и R3) е възможно да се получат два продукта (моно- и дизаместен). Възможността за двойно маркиране води до получаване на продукт с по-висока специфична активност. След извършване на колонно пречистване дизаместеният продукт се отделя от нереагиращия тетразин и монозаместения продукт.

Таблица 4. Обобщение на реакционните условия

No	Tz	T, °C	t, min	pH	A, mCi	Реакционна среда	Присъствие на катализатор	Начин на смесване	Излишък на глюкоза	Излишък на Tz	Елуент за TLC	Резултат	Протича реакция
1	Tz1	40	15	4,8	0,05-0,10	натриевоацетатен буфер	да – K1	Едновременно	Не	Да	DCM	цветни петна без активност	Не
2	Tz1	60 40	10 20	4,8	0,10	натриевоацетатен буфер	да – K1	Поетапно	Не	Да	DCM	цветни петна без активност	Не
3	Tz1	70	15 20	0,6	0,35	водна среда	Не	Поетапно	Не	Да	DCM	цветни петна без активност	Не
4	Tz1	80	20 15	4,8	0,20	натриевоацетатен буфер	да – K1	Поетапно	да (+глюкоза)	Не	DCM	цветни петна без активност	Не
5	Tz1	80	20 15	6,2	0,20	HEPES буфер	да – K2	Поетапно	да (+глюкоза)	Не	DCM	цветни петна без активност	Не
6	Tz1	75	10 15	5,4	0,25	натриевоацетатен буфер	да – K2	Поетапно	да (+глюкоза)	Не	DCM	цветни петна на старта с активност	Да
7	Tz1	75	10 15	7,7	0,25	PBS	да – K2	Поетапно	да (+глюкоза)	Не	DCM	цветни петна без активност	Не
8	Tz1	80	30		0,12	метанол/вода 1:1	Не	Едновременно	Не	Да	DCM	цветни петна без активност	Не

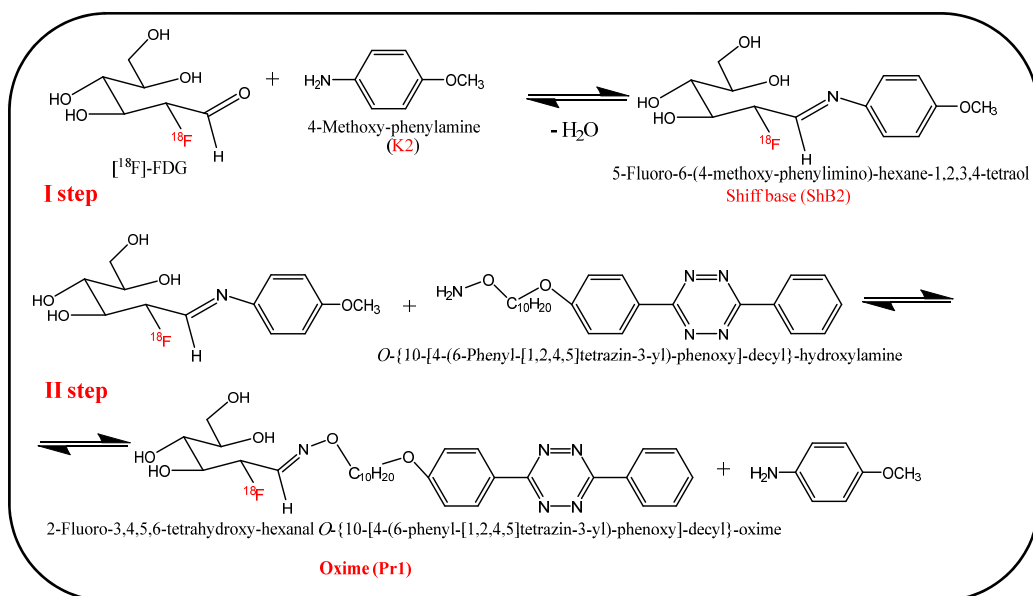
9	Tz1	95	20		0,10	физ. р-р/етанол 1:5	Не	Едновременно	Не	Да	етилацетат	цветни петна без активност	Не
10	R3	100	20	1,5	0,2	0,4% TFA и 16% етанол във физ.р-р	Не	Едновременно	Не	Да	DCM/метанол 1:1	цветни петна без активност	Не
11	Tz1	80	15 15	5,4	0,2	натриевоацетатен буфер	да – K2	Поетапно	Не	Да	DCM	цветни петна на старта с активност	Да
12	R3	75	25	4,3	0,2	р-р на кат., подкиселен с TFA	да – K2	Поетапно	Не	Да	DCM/метанол 1:1	отместени цветни петна с активност	Да
13	Варира се	75	15 15	4- 4,3	0,15- 0,80	р-р на кат., подкиселен с оцетна киселина	да – варира се	Поетапно	Не	Да	етилацетат	отместени цветни петна с активност	Да

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

I. Модифициране на бифункционални молекули с [^{18}F]FDG

1. Модифициране на Tz1

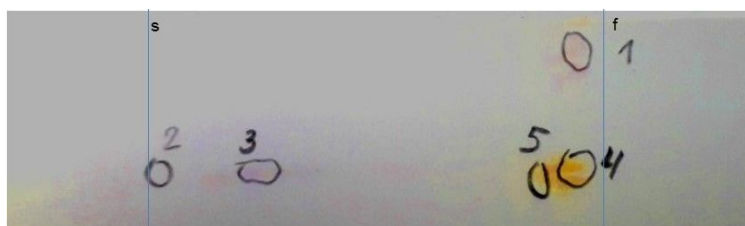
До установяването на оптималните реакционни условия експериментите се провеждат с Tz1. В началните етапи от работата синтезите се извършват в излишък на глюкоза, която се добавя заедно с [^{18}F]FDG към реакционната система. На по-късен етап се предпочита обратната стратегия, а именно да се използва голям излишък на тетразина спрямо [^{18}F]FDG в молно съотношение приблизително $10^4:1$. Получаването на радиомаркиран продукт се установява посредством радио-TLC и се потвърждава чрез HPLC анализ. За потвърждаване на структурата се прилага IR-ATR спектроскопия. Успешно модифициране на Tz1 се наблюдава при следните реакционни условия: pH между 4 и 4,5; температура между 40 и 80°C; в присъствие на катализатор (анилин или негово производно); поетапно смесване на реактивите; реакционно време между 20 и 30 минути. Tz1 се модифицира в присъствието на един от четирите използвани катализатори (K1, K2, K3, K4). На фигура 7 се представя реакцията за получаване на Pr1 в присъствие на K2, като на първия етап се получава ShB2. След добавяне на тетразин Tz1 получената Шифова база се превръща в оксимен продукт (Pr1). Аналогично реакцията протича и в присъствието на останалите катализатори (K1, K3 и K4).



Фигура 7 – Реакция за получаване на Pr1 в присъствие на K2

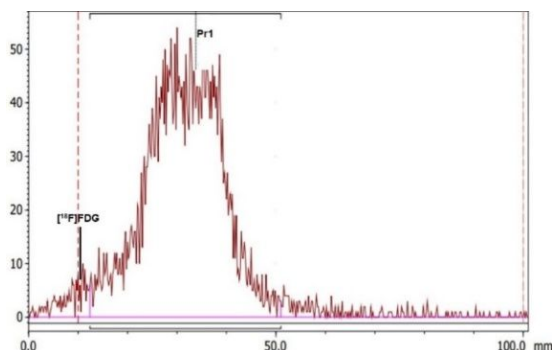
Успешното протичане на синтеза се установява посредством радио-TLC, която е бърз, прост и евтин метод за анализ, наличен в клиничната лаборатория. Паралелно на плаката се накапват проби от изходен тетразин Tz1 и реакционна смес при получаване

на Pr1. Очаква се появата на две розови петна в близост до фронта, съответстващи на изходен и на nereагирал Tz1 в случаите, в които се работи в голям излишък на тетразина спрямо [¹⁸F]FDG. Но тъй като и катализаторът също се движи към фронта на плаката (близки стойности на R_f с R_f на изходните тетразини) и се използва в значително по-висока концентрация спрямо останалите реакционни компоненти, е възможно наслагване на петната и видимо да се отчита само оранжево-кафевият цвят, дължащ се на катализатора. Елууването се извършва с CH₃CO₂C₂H₅. На фигура 8 се представя TLC хроматограма на реакционните компоненти след модифицирането на Tz1, като с s и f се означават съответно старта и фронта на елууване. Разпределението на петната е както следва: 1 – изходен тетразин, а 5 – се очаква появата на nereагирал тетразин от реакционната смес; 2 е немодифицираната [¹⁸F]FDG, на която съответства радиоактивен пик, започващ от началото на радиохроматограмата (фигури 9 и 10); 3 (бледо розово петно, в което се отчита радиоактивност) е полученият продукт, на който съответства нов отместен спрямо старта радиоактивен пик (фигура 9); 4 – използваният катализатор.



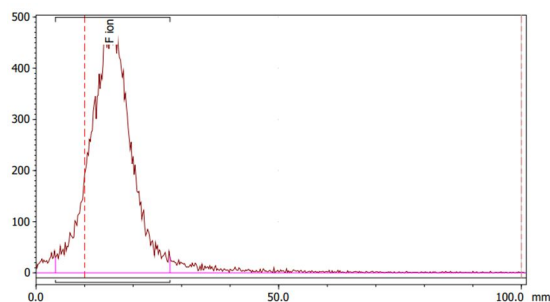
Фигура 8 – TLC анализ на модифицирането на Tz1

След елууването плаките се сканират посредством радио-TLC скенер и на базата на получената радио-TLC хроматограма се изчислява приблизителният RCY 90±5% и е определен R_f на модифицирания бифункционален тетразин Tz1 (R_f=0,28). На фигура 9 се представя радио-хроматограма на продукт, получен при оптимални условия на маркиране, при които наличната в системата [¹⁸F]FDG търпи почти пълно превръщане.



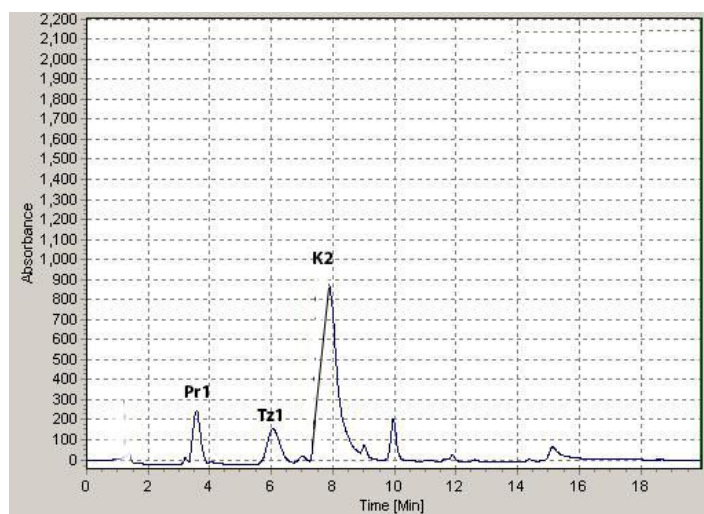
Фигура 9 – Радио-TLC хроматограма на модифициран Tz1: R_f=0,28; RCY=92,4%

За сравнение на фигура 10 се представя и радио-TLC хроматограма на изходната немодифицирана [¹⁸F]FDG с R_f = 0,06.



Фигура 10 – Радио-TLC хроматограма на изходна [^{18}F]FDG; $R_f=0,06$

Провежда се HPLC анализ за потвърждаване на получените резултати от TLC хроматограмите. Използва се стандартна HPLC система в градиентен режим (C18, елуент вода/ацетонитрил 95:5 → 0:100; 1 mL min^{-1} , 20 min). Хроматограмата, представена на фигура 11, се получава след синтез, проведен при голям излишък на глюкозата спрямо тетразина. Това позволява полученият маркиран продукт да се детектира като нов пик от DAD детектора. Пиковете на нереагиралия тетразин и катализатора в реакционната смес се установяват чрез предварителен анализ на еднокомпонентни разтвори на използваните реагенти.



Фигура 11 – HPLC хроматограма от модифициране на Tz1 със следните tr : Pr1 – 3,5 min ; Tz1 – 6,0 min ; K2 – 8,0 min.

Времената на задържане на реакционните компоненти са както следва: Tz1 – 6,0 минути; катализатор (K2) – 8,0 минути. Очаква се, че задържането на модифицирания тетразин (Pr1) върху колоната ще бъде по-слабо от изходния Tz1. Това се обяснява с факта, че заради допълнителните хидроксилни групи от глюкопиранозния остатък молекулата на Pr1 е по-полярна и по-лесно преминава в полярната подвижна фаза, при което се задържа по-малко време в колоната. В резултат на анализа се наблюдава пик, появяващ се с tr 3,5 минути. Общите последователности на компонентите в

реакционната смес са същите като при TLC, но в обратен ред поради обратната фаза на HPLC колоната. Това потвърждава резултатите, получени чрез радио-TLC.

В таблица 5 се обобщават данните от проведените успешни синтези за модифициране на Tz1 при различни реакционни условия, където A_0 е приложената радиоактивност на [^{18}F]FDG, t е реакционното време. В третата колона се представя RY, получен на базата на радио-TLC анализа. При оптимални реакционни условия полученият RY е между 85 и 94%.

Таблица 5 – Получени данни от модифицирането на Tz1

Ao, [mCi]	T, min	RCY (%), TLC	Ao, [mCi]	T, min	RCY (%), TLC
0,48	30	91,72	0,41	30	85,86
0,23	30	87,20	0,54	30	25,58
0,30	30	49,46	0,56	30	16,01
0,34	25	89,88	0,36	30	82,73
0,40	30	93,54	0,34	30	78,96
0,49	30	93,26	0,36	30	27,22
0,21	25	63,66	0,30	30	83,88
0,24	25	89,36	0,28	30	91,60
0,33	30	93,21	0,25	30	14,51
0,21	25	28,93	0,26	30	17,74
0,49	40	88,63	0,28	30	22,11
0,47	40	84,93	0,17	25	15,65
0,49	30	88,67	0,17	25	17,67
0,40	30	19,05	0,22	20	21,18
0,42	30	15,62	0,22	30	91,12
0,45	30	85,51	0,30	20	88,74
			0,15	25	89,16

В таблица 6 се представят средни, минимални и максимални стойности на RY.

Таблица 6 – Обобщени резултати при маркирането на Tz1.

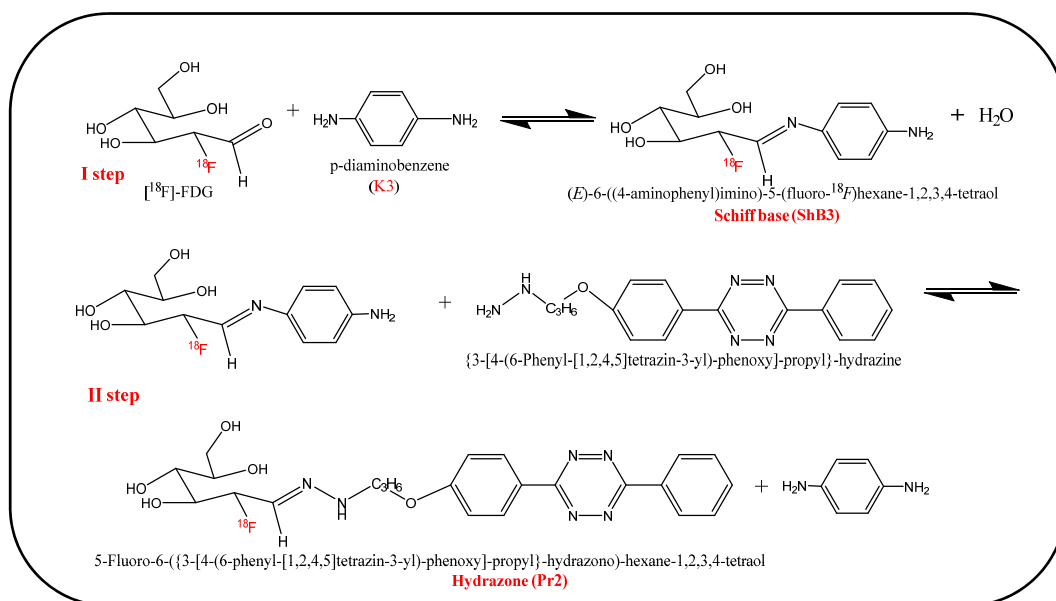
ср. Ao, [mCi]	0,37
ср. RY % TLC	61,6
max RY %	93,5
min RY %	14,5

На базата на получените резултати се доказва, че реакцията за модифициране на бифункционални тетразини чрез формиране на оксимен продукт с $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ е успешна и ефективна, протича при сравнително меки условия и е приложима за клиничната лаборатория. След установяване на оптималните реакционни условия по аналогичен начин се маркират и останалите използвани тетразини.

2. Модифициране на Tz2

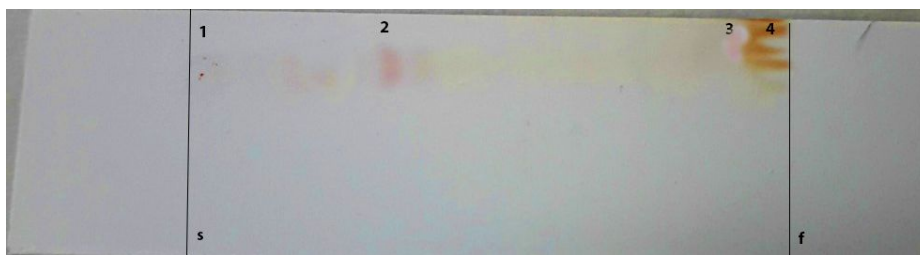
Радиомаркирането на Tz2 се провежда при установените оптимални условия, а именно температура 75°C , рН $4\pm 0,2$ и наличие на някой от четирите използвани катализатори (K1, K2, K3, K4). Аналогично синтезът се провежда на 2 етапа, като на първия етап се преминава през междинен продукт – съответната Шифова база (ShB1, ShB2, ShB3 или ShB4) в зависимост от използвания катализатор. След добавяне на тетразин Tz2 получената Шифова база се превръща в хидразонен продукт (Pr2).

На фигура 12 се представя реакцията за получаване на Pr2 в присъствие на K3, като на първия етап се получава ShB3. Аналогично реакцията протича и в присъствието на останалите катализатори (K1, K2 и K4).



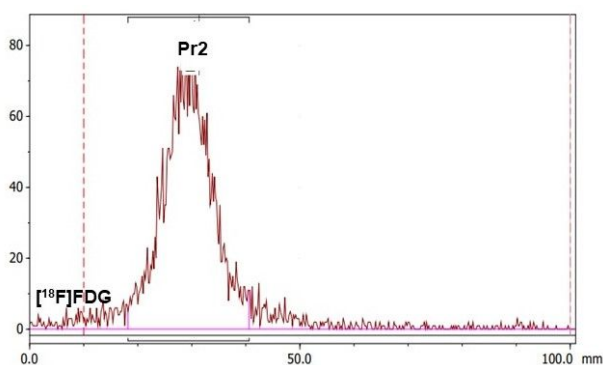
Фигура 12 – Реакция за получаване на Pr2 в присъствие на K3

Успешното протичане на синтеза се установява посредством радио-TLC с елуент $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$. На фигура 13 се представя TLC хроматограма на реакционните компоненти след модифицирането на Tz2, като със s и f се отбелязват съответно стартът и фронтът на елуирането. Разпределението на петната е както следва: 1 – $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, 2 – модифициран Tz2 (с отчетена активност в него), 3 – немодифициран Tz2, 4 – катализатор.



Фигура 13 - TLC анализ на модифициран Tz2

След сканиране на плаката с радио-TLC скенер се получава хроматограмата, показана на фигура 14. На базата на нея се определя Rf (0,22) на получения продукт Pr2 и приблизителния RCY 85% .



Фигура 14 – Радио-TLC хоматограма на модифициран Tz2: Rf=0,22; RCY=85,9%

За потвърждаване на получените резултати от TLC анализа, се провежда и радио-HPLC анализ с помощта на радио-HPLC система SCI8100. Като елуираща фаза се използва 0,1% TFA/H₂O (А) и 0,1% TFA/CH₃CN (Б) при условията на II градиентен метод, описани в таблица 2. На фигура 15 се представят HPLC хроматограми, получени от RAD детектора съответно на немодифицирана [¹⁸F]FDG (хроматограма А) и на реакционна смес (хроматограма Б).

С данните от RAD детектора се потвърждава успешно протеклата реакция. Изходната [¹⁸F]FDG се регистрира като пик с tr=1,08 минути, а при анализ на реакционна смес се появява нов радиоактивен пик при tr=2,47 минути, съответстващ на маркирания продукт Pr2. Регистрира се единствен радиоактивен пик (отместен във времето спрямо този на радиомаркера), тъй като се работи в много голям излишък на тетразина спрямо [¹⁸F]FDG, която при оптималните условия претърпява почти пълно превръщане в съответния радиомаркиран продукт. Освен това поради следните факти: първо, работи се с много ниска радиоактивност; второ, времето за подготовка и анализ на пробата с радио-HPLC е по-продължително в сравнение с TLC анализа и трето – относително краткият период на полуразпад на радионуклида, са причина да не се регистрира втори радиоактивен пик, дори в системата да има остатъчна нереагирала [¹⁸F]FDG. След

разпада на ^{18}F до ^{18}O в реакционната смес ще присъства нерадиоактивна глюкоза. Резултатите от радио-HPLC анализа потвърждават резултатите от TLC за успешното протичане на реакцията при модифициране на бифункционалния тетразин Tz2 с $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$.



Фигура 15 – Радио-HPLC анализ при маркиране на Tz2: А – RAD хроматограма на изходна $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ($t_r=1,08$ мин.); Б – RAD – хроматограма на маркиран продукт Pr2 ($t_r=2,47$ мин.)

В таблица 7 се обобщават данните от проведените успешни синтети за модифициране на Tz2 при различни реакционни условия. В таблица 8 се представят средни, минимални и максимални стойности на RCY.

Таблица 7 – Получени данни от модифицирането на Tz2

Ao, [mCi]	T, min	RCY (%), TLC	Ao, [mCi]	T, min	RCY (%), TLC
0,35	25	88,96	0,37	30	7,82
0,33	25	77,50	0,36	30	6,25
0,48	30	91,24	0,40	30	20,47
0,30	30	90,23	0,40	30	19,02
0,34	25	13,50	0,33	25	10,13
0,40	30	84,22	0,32	25	49,03
0,40	30	19,05	0,32	25	24,94
0,33	30	91,43	0,18	30	83,21
0,42	30	17,18	0,80	33	87,97
0,43	30	13,54	0,32	20	91,98

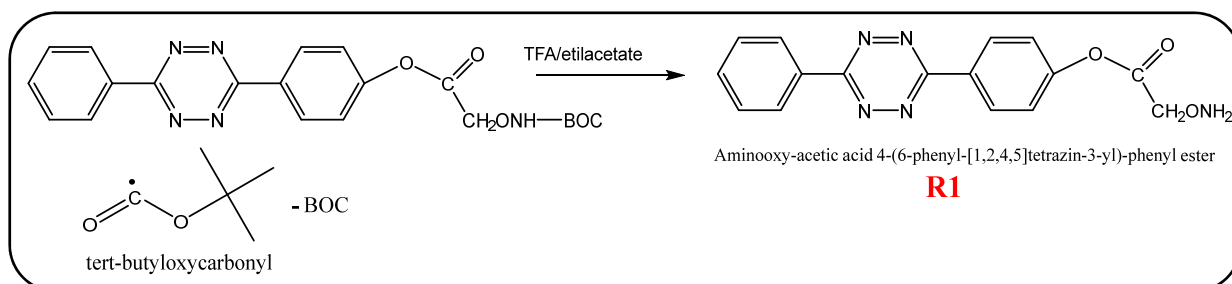
Таблица 8 – Обобщени резултати при маркирането на Tz2

ср. Ao, [mCi]	0,38
ср. RCY %, TLC	49,4
max RCY %	91,9
min RCY %	6,3

След като се установява кои от използваните катализатори са най-ефективни, маркирането на останалите 3 тетразина (R1, R2 и R3) се провежда именно само в тяхно присъствие (K2 и K3).

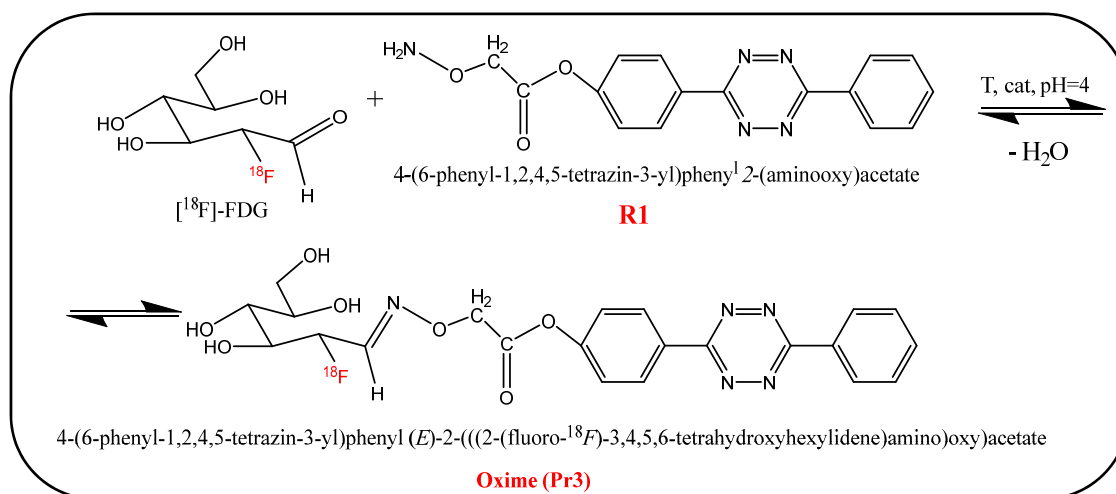
3. Модифициране на R1

Поради факта, че се използва защитен с BOC група бифункционален тетразин, преди маркирането му с [^{18}F]FDG е необходимо да се извърши допълнителна процедура за премахване на защитата, описана по-горе в текста. Реакционната схема на тази предварителна стъпка се представя на фигура 16. След това освободеният от BOC защита тетразин R1 се разтваря с CH_3CN и се прилага установената процедура за модифициране чрез формиране на оксимна връзка при температура $70\text{--}75^\circ\text{C}$, $\text{pH } 4\pm 0,1$, наличие на катализатор (K2 или K3), поетапно смесване на реактивите и продължителност на синтеза 20-25 минути. Експериментите за маркирането на R1 се провеждат само при установените вече оптимални условия.



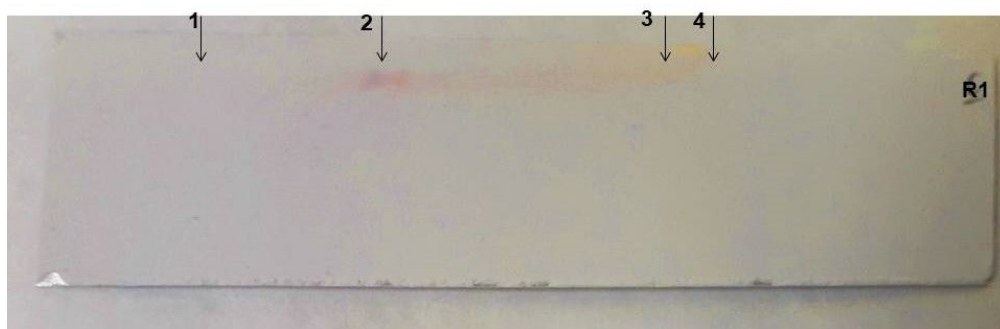
Фигура 16 – Получаване на тетразин R1

На фигура 17 се представя крайната реакция на получаване на оксимния продукт Pr3.



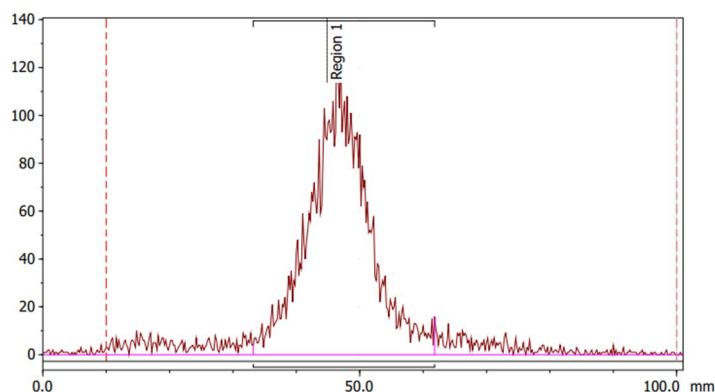
Фигура 17 – Обобщена реакция за получаване на Pr3

След проведен TLC анализ и елуиране на плаката с етилацетат се получава хроматограмата, представена на фигура 18. Разпределението на петната на реакционните компоненти след модифицирането на R1 е както следва: 1 е нереагирала [^{18}F]FDG, ако присъства в системата, 2 – маркиран оксимен продукт, 3 е изходен тетразин, а 4 е използваният катализатор.



Фигура 18 – TLC анализ на модифициран R1

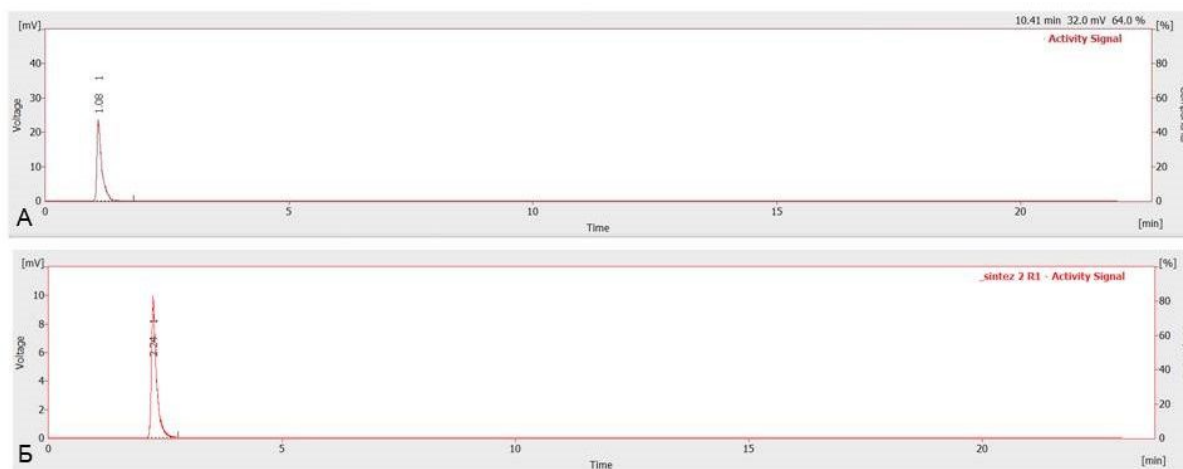
След сканиране на плаката се получава радио-TLC хоматограмата, показана на фигура 19. На базата на нея се определя R_f (0,40) на получения продукт Pr3 и приблизителен RCY $80\pm 5\%$.



Фигура 19 – Радио-TLC анализ на модифициран R1: $R_f=0,40$; RCY=85,4%

Полученият продукт се потвърждава с радио-HPLC при вече описаните градиентни условия. Тъй като при маркирането на R1 (след установяване на оптималните условия на реакцията) се работи в голям излишък на тетразина спрямо [^{18}F]FDG, концентрацията на получения радиомаркиран продукт в реакционната система е незначителна. За това в този случай получените продукти се потвърждават изцяло на базата на данните от RAD детектора, който е със значително по-голяма чувствителност. При анализ на реакционна смес от RAD детектора се регистрира нов радиоактивен пик с $t_r=2,24$ минути, съответстващ на получения маркиран продукт Pr3.

На фигура 20 се представят съответните хроматограми от RAD детектора на немодифицирана [¹⁸F]FDG и на получения продукт.

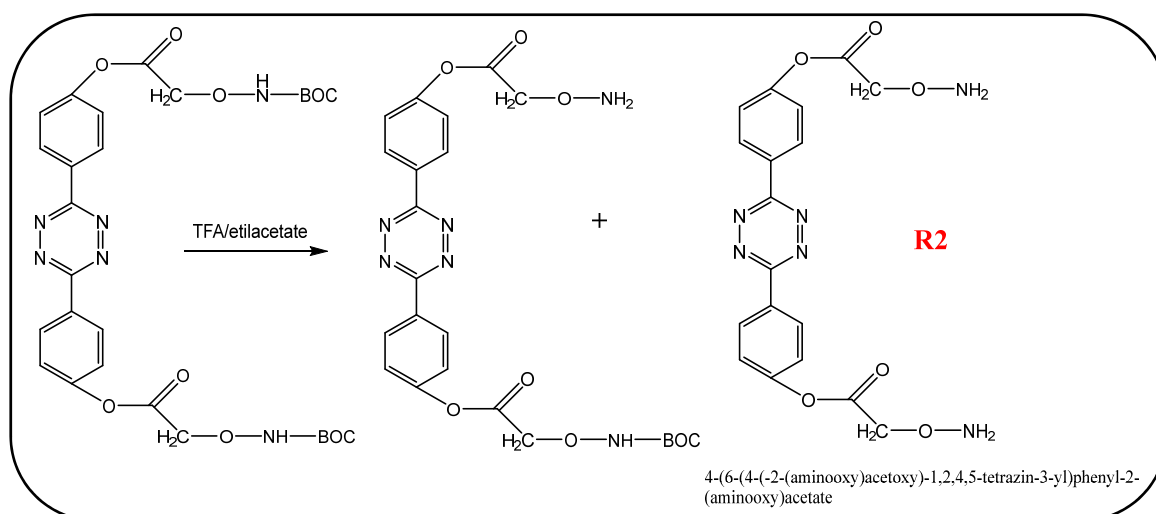


Фигура 20 – Радио-HPLC анализ при маркиране на R1: А – RAD – хроматограма на изходна [¹⁸F]FDG ($t_r=1,08$ мин.); Б – RAD – хроматограма на маркиран продукт Pr3 ($t_r=2,24$ мин.)

На базата на получените резултати от проведения радио-HPLC анализ се потвърждава успешното модифициране на R1 чрез формиране на оксимна връзка с [¹⁸F]FDG.

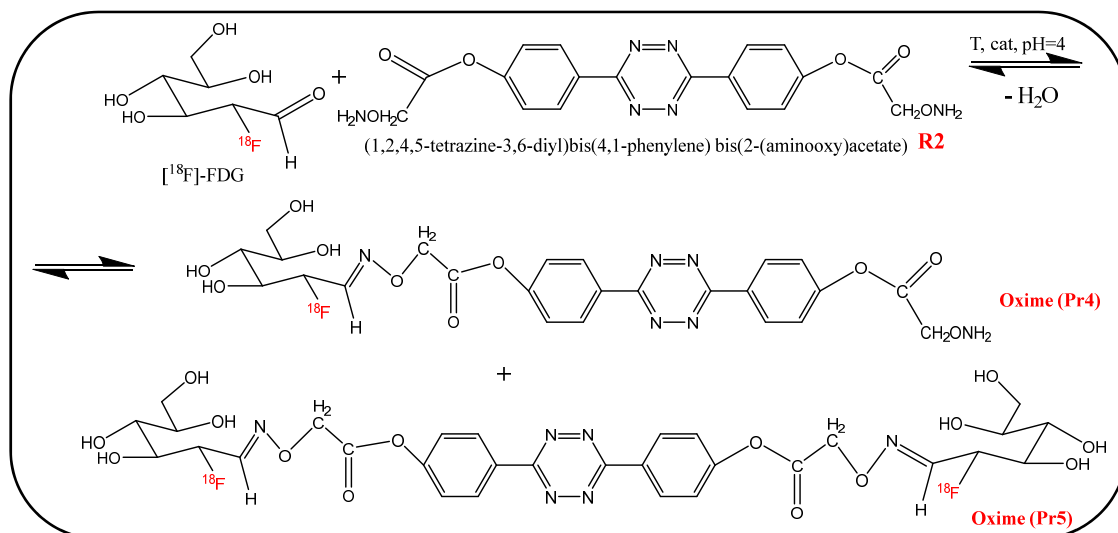
4. Модифициране на R2

Тъй като се използва защитен с BOC група тетразин, се извършва допълнителна стъпка за премахване на тази защита, описана по-горе в текста, с цел получаване на R2 (представено на фигура 21). Използването на симетрични бифункционални тетразини, каквито са R2 и R3, дава възможност за двойно маркиране, при което полученият продукт има по-висока специфична активност.



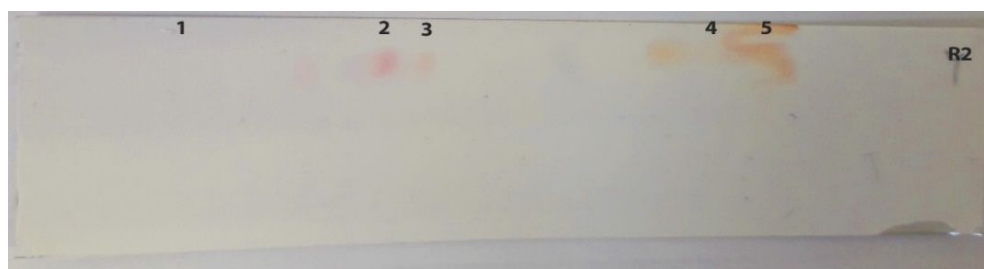
Фигура 21 – Получаване на тетразин R2

На фигура 22 се представя крайната реакция на модифициране на R2. Възможно е получаването на два продукта (монозаместен и дизаместен) в зависимост от количеството на $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ в реакционната смес. При прилагане на $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ с по-голяма радиоактивност, съответстваща на по-голямо молно количество, по-вероятно е получаването на дизаместения продукт **Pr5**.



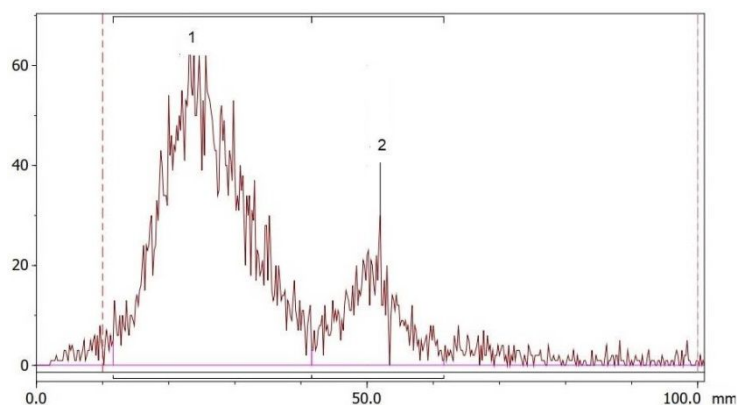
Фигура 22 – Обобщена реакция за получаване на Pr4 и Pr5

На фигура 23 се представя TLC хроматограма на реакционните компоненти след модифицирането на R2. Разпределението на петната е както следва: 1 е точката на накапване, в която се задържа нереагиралата $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, ако присъства в системата; 2 съответства на дизаместения продукт Pr5; 3 – монозаместен продукт Pr4; 4 – нереагирал тетразин R2; 5 – използван катализатор (в случая K2). В случаите, в които реално се получават двата очаквани продукта дизаместеният продукт ще има по-нисък Rf в сравнение с Rf на монозаместения продукт и се регистрира като първо розово петно след старта. Това се дължи на факта, че дизаместеният е носител на повече ОН групи, което прави молекулата по-полярна и тя по-силно ще се задържа върху повърхността на плаката.



Фигура 23 – TLC анализ на модифициран R2

След сканиране на плаката се получава радио-TLC хоматограмата, представена на фигура 24. На базата на нея се определят R_f на получените продукти и техният RCY, както следва: първият получен пик с $R_f=0,25$ съответства на дизаместения продукт Pr5 с RCY 81,1%, а вторият с $R_f=0,47$ – на монозаместения продукт Pr4 с RCY 18,9%.



Фигура 24 - Радио-TLC анализ на модифициран R2: $R_{f1}=0,25$, RCY=81,1%; $R_{f2}=0,47$, 18,9%

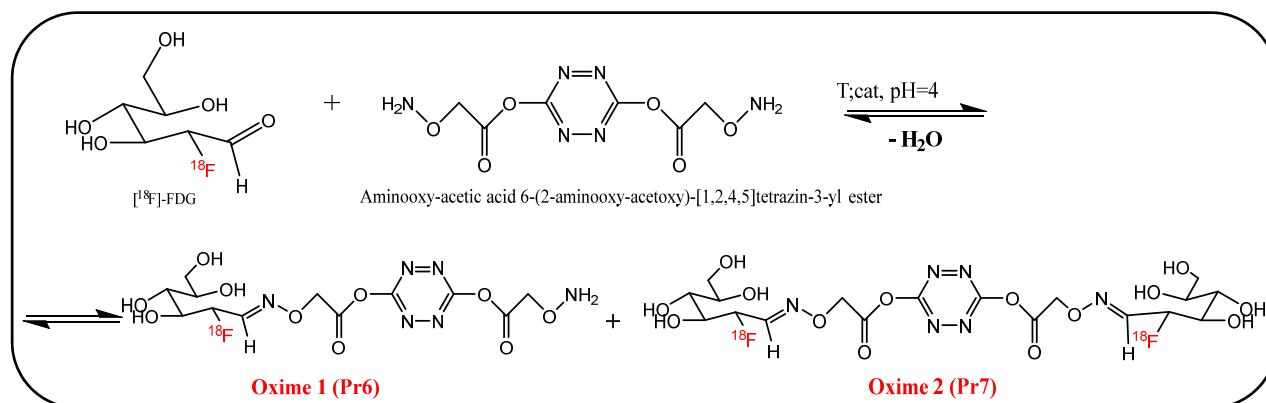
На по-късен етап се провежда радио-HPLC анализ за потвърждаване на успешно протеклата реакция. На фигура 25 се представят получените хроматограми от RAD детектора. Наблюдава се появата на радиоактивен пик (с $t_r=2,61$ минути), отместен във времето спрямо пика на изходната $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, съответстващ на един от очакваните маркирани продукти. Вторият очакван продукт се получава в по-ниска концентрация и поради разпада на ^{18}F до ^{18}O не се регистрира втори радиоактивен пик на продукт в радио-HPLC хроматограмата на реакционна смес.



Фигура 25 – Радио-HPLC анализ при маркиране на R2: А – RAD – хроматограма на изходна $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ($t_r=1,08$ мин.); Б – RAD – хроматограма на маркиран продукт Pr5 ($t_r=2,61$ мин.)

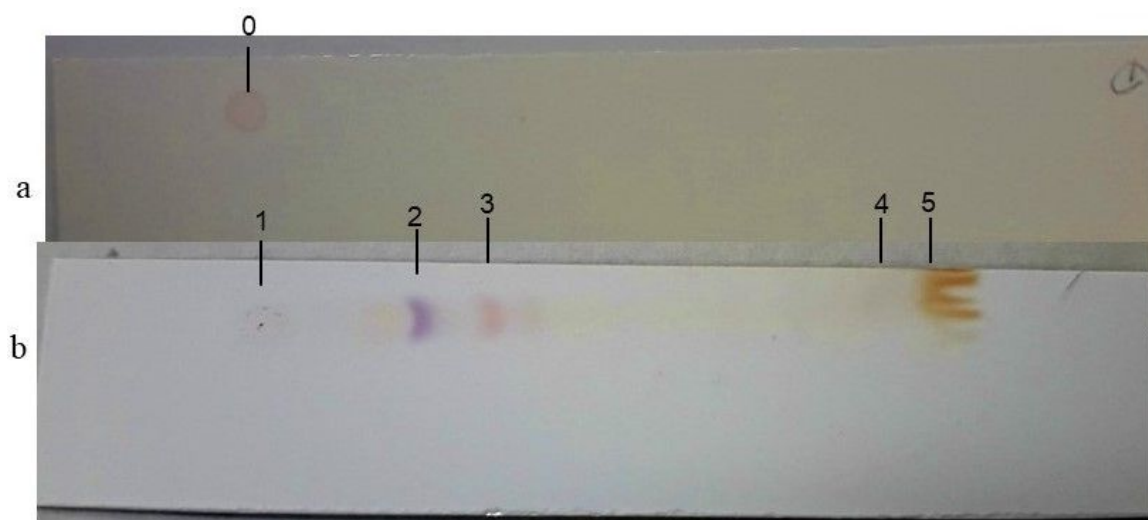
5. Модифициране на R3

R3 се модифицира при установените оптимални за реакцията условия. Тъй като е симетричен, е възможно получаването на два радиомаркирани продукта. На фигура 26 се представя крайната реакция на модифициране на R3, без посочване на междинните продукти, през които се преминава.



Фигура 26 – Обобщена реакция за получаване на Pr6 и Pr7

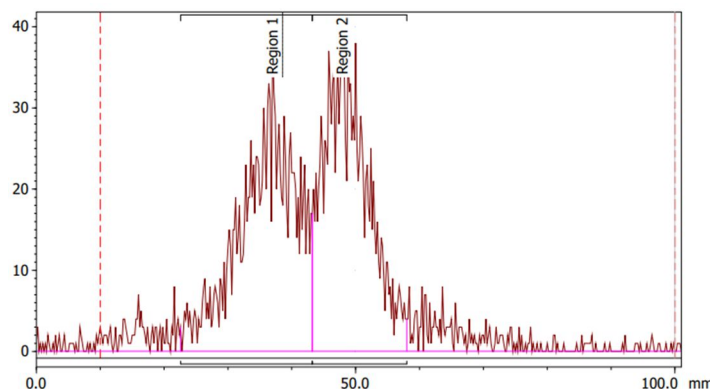
На фигура 27 се представя хроматограма с разпределение на реакционните компоненти след успешно проведено маркиране на R3. Хроматограмата **a** е преди елуиране и петното, означено с 0, съответства на изходната реакционна смес. Хроматограмата **b** е след елуиране с етилацетат и разпределението на компонентите е както следва: 1 съответства на нереагиралата [18F]FDG, 2 и 3 съответстват на получените оксимни продукти Pr6 и Pr7; 4 – нереагирал тетразин и 5 – катализатор.



Фигура 27 – TLC анализ на получаването на Pr6 и Pr7: а) хроматограма преди елуиране; б) хроматограма след елуиране с етилацетат

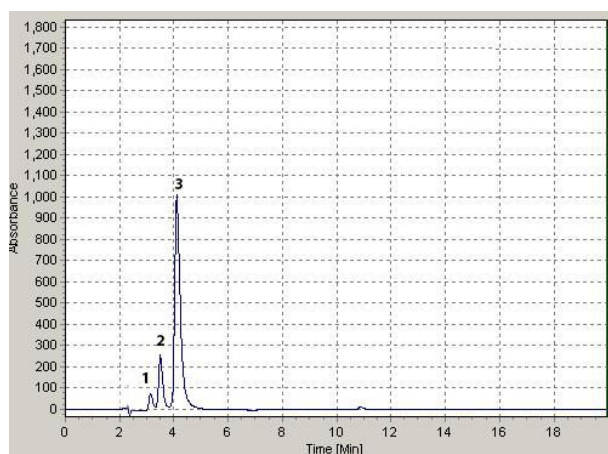
След сканиране на плаката посредством радио-TLC скенер се получава следната радио-хроматограма, показана на фигура 28. Получават се два радиоактивни пика с $R_f=0,30$ и

$R_f = 0,42$, съответстващи на двата очаквани оксимни продукта Pr6 и Pr7 с общ радиохимичен добив 87,6%.



Фигура 28 – Радио-TLC хроматограма на модифициран R3: $R_f=0,30$ съответства на Pr6 с $RCY=44,2\%$; $R_f=0,42$ съответства на Pr7 с $RCY=43,4\%$

На по-късен етап успешното протичане на реакцията се потвърждава с HPLC в градиентен режим (C18, елуент вода/ацетонитрил 95:5→0:100; 1 mLmin⁻¹, 20 min). Приложената HPLC-хроматограма (на фигура 29) е на реакционна смес, получена при синтез, при който се прилага първата стратегия за маркиране, т.е. работи се в голям излишък на глюкозата спрямо тетразина. Това позволява детектиране на получения маркиран продукт с DAD детектор. Анализът се провежда с помощта на HPLC – система (Varian ProStar). Получените пикове 1 и 3 са съответно на R3 и K3, установени чрез предварителен анализ на еднокомпонентни разтвори. Наблюдава се появата на нов пик (2), съответстващ на един от очакваните продукти. По-вероятно е получаването на дизаместения продукт.



Фигура 29 – HPLC анализ на модифициран R3. Разпределението на пиковете е както следва: – 1 – R3; 2 – маркиран продукт; 3 – K3

Времената на задържане на компонентите на реакционната смес са както следва: R3 – 3,1 мин; модифициран продукт – 3,5 мин.; K3 – 4,1 мин.

В таблица 9 се представят данните от успешни експерименти при маркирането на R3, а в таблица 10 се представят средни, минимални и максимални стойности на RCY.

Таблица 9 – Получени данни от модифицирането на R3

Ao, [mCi]	T, min	RCY (%), TLC	Ao, [mCi]	T, min	RCY (%), TLC
0,48	30	93,87	0,24	25	52,11
0,30	30	84,79	0,31	25	80,00
0,30	30	93,05	0,30	30	82,04
0,17	30	91,56	0,46	30	6,10
0,33	25	92,10	0,42	30	21,33
0,39	30	94,93	0,45	30	10,17
0,25	25	12,03	0,40	30	70,83
0,23	25	46,52	0,49	30	18,12
0,25	25	81,60	0,18	30	83,21
0,30	30	78,50	0,22	30	87,37
0,20	25	17,95	0,79	30	87,88

Таблица 10 – Обобщени резултати при маркирането на R3

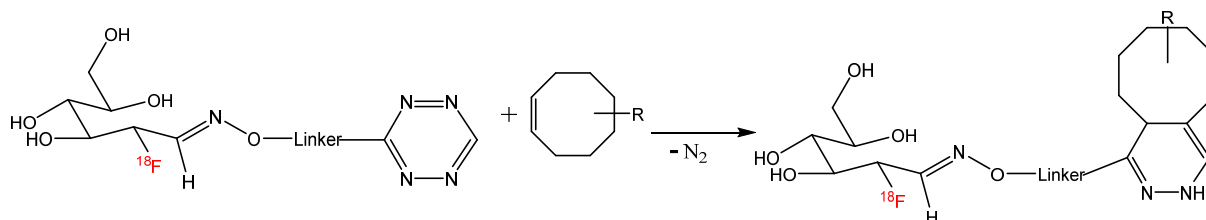
ср. Ao, [mCi]	0,34
ср. RCY %, TLC	63,00
max RCY %	94,93
min RCY %	6,10

На базата от получените резултати може да се изтъкне значимостта от разработената методика, с помощта на която успешно се модифицират бифункционални производни на тетразин с добър радиохимичен добив изцяло в клинични условия. Тази методика може да е полезна като бъдеща стратегия за модифициране на биоактивни и специфични за даден орган молекули чрез формиране на оксимна или хидразонна връзка с [¹⁸F]FDG.

6. IEDDA реакции между модифицираните с [¹⁸F]FDG тетразини и TCO

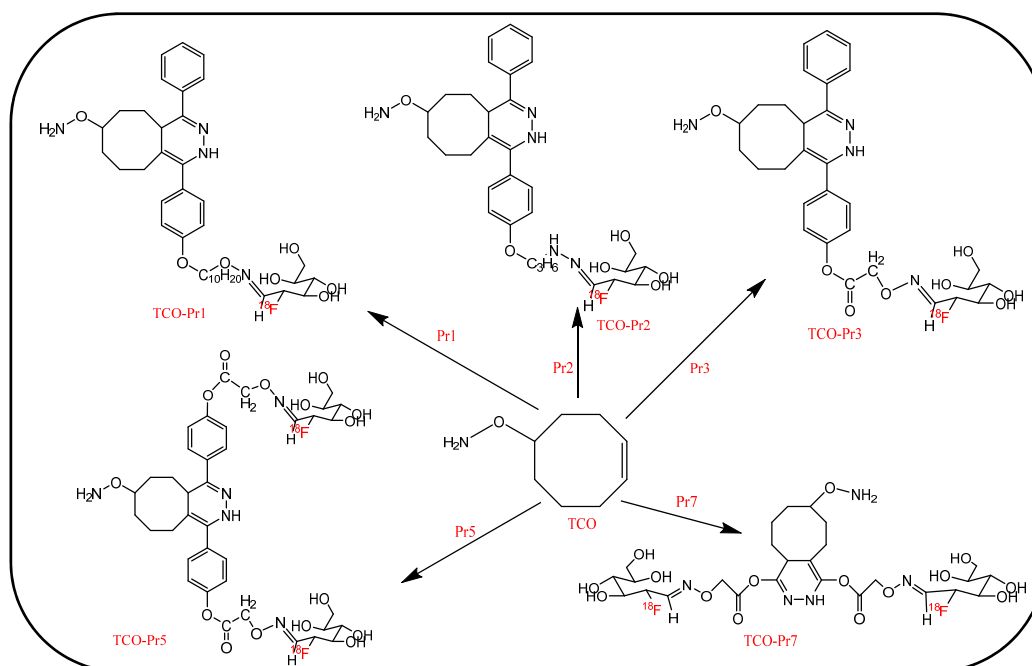
След разработването на методика за модифициране на бифункционални тетразини чрез формиране на оксимна или хидразонна връзка с [¹⁸F]FDG, получените маркирани

продукти могат да се използват за бъдещи клик IEDDA реакции с TCO. За целта е необходимо синтезите да се проведат в по-голямо количество, което да позволи изолиране и пречистване на маркирания тетразин преди реакция с TCO. На фигура 30 се представя обща реакционна схема между модифициран с [¹⁸F]FDG тетразин и бифункционален TCO.



Фигура 30 – Обща схема на IEDDA реакции между модифициран с [¹⁸F]FDG тетразин и транс-циклооктен

Възможните комбинации, които могат да се извършат между използвания транс-циклооктен и модифицираните тетразини се представят на фигура 31.



Фигура 31 – Реакционна схема на възможните комбинации на TCO и модифицираните тетразини

Както е известно от литературни данни, IEDDA реакциите между тетразин и TCO са лесни, бързи, практически необртливи и протичат с отделяне на молекула азот. Най-често протичат при еквивалентни количества на реагентите, при физиологични условия и стайна температура, без присъствие на катализатор.

Като част от изпълнението на проект с договор № КП-06-Н29/4 (Фонд Научни Изследвания към Министерство на Образованието и Науката) се изследват кинетичните параметри на „студени клик“ реакции с някои от най-подходящите от фармакологична

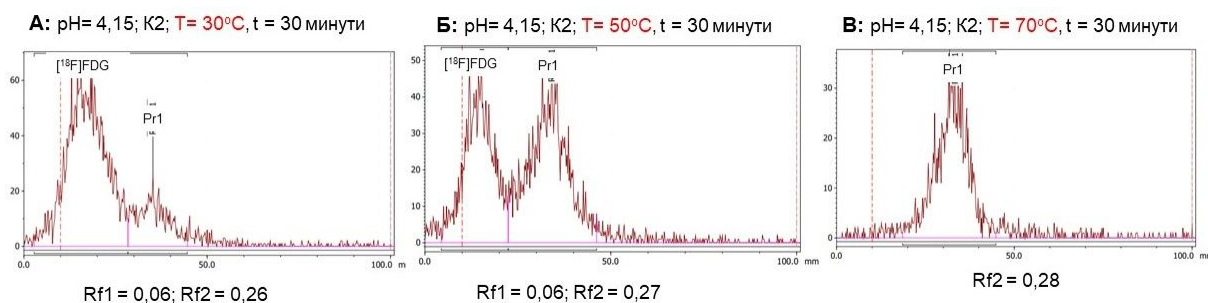
гледна точка производни на TCO и Tz. Експериментално се определят съответните скоростни константи. Изучаването кинетиката на студена (без радиоактивност) клик реакция е важен етап от разработването на процедура за радиомаркиране посредством IEDDA. От получените резултати става ясно за скоростта на реакцията и приложимостта на процедурата за целите на нуклеарната медицина. Кинетиката на реакциите се измерва с абсорбционен спектрофотометър със спрял поток чрез наблюдение на промяната на характерните за тетразина абсорбционни ивици при 534 nm или 270 nm като функция на времето. Измерванията се извършват в C₂H₅OH при стайна температура. Продължителностите на реакциите е от порядъка на няколко секунди и заснемането на абсорбционите спектри се прави с честота 1 kHz. Експериментално определените скоростни константи на бимолекулната "клик" реакция в етанол са от един и същи порядък в границите 150-300 M⁻¹.s⁻¹, което гарантира протичането на реакцията в рамките на секунди. Тази секундна скорост е напълно достатъчна за целите на стратегията за радиомаркиране с предварително насочване.

II. Получени резултати при вариране на експерименталните условия

Радио-TLC методът успешно потвърждава протичането на реакция между бифункционалния тетразин и [¹⁸F]FDG. Тази техника се използва, за да се проследи хода на реакцията и да се направи оценка на ефекта на различни фактори (температура, рН, вид на катализатора, реакционно време) върху получавания радиохимичен добив. На базата на получените резултати се определят оптималните реакционни условия, при които се получава максимален добив.

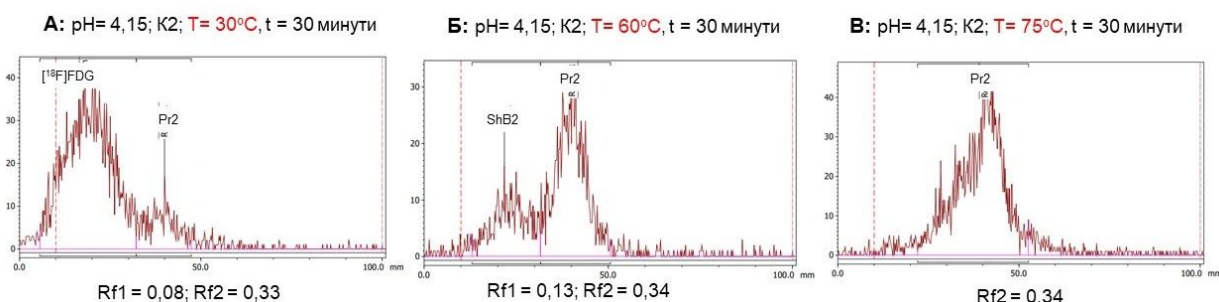
1. Влияние на температурата

Извършват се синтези по установената процедура с Tz1, Tz2 и R3 при следните реакционни условия: рН (4,15), поетапно смесване на реагентите, в присъствие на K₂, общо реакционно време 30 минути и вариране на температурата, за да се направи оценка на ефекта върху RCY. По-долу се представят хроматограми на синтези при различна температура и на базата на тях се определя приблизителният RCY. С Tz1 се провеждат синтези при 30, 50 и 70°C и получените радиохимични добиви са както следва: 17,9% ; 52,1% ; 87,2%. Най-добри резултати и почти пълно превръщане се получават при температура 70 °C (фигура 32).



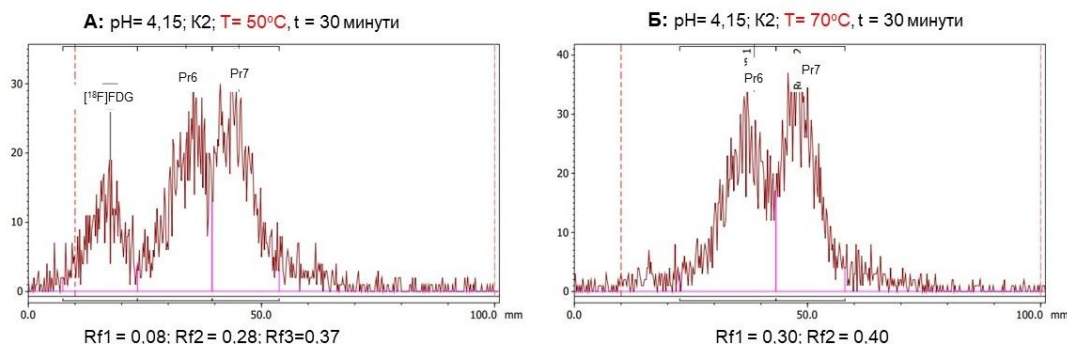
Фигура 32– Модифициране на Tz1 при вариране на температурата: А – $T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{RCY}=17,9\%$;
 Б – $T=50^{\circ}\text{C}$, $\text{RCY}=52,1\%$; В – $T=70^{\circ}\text{C}$, $\text{RCY}=87,2\%$

На фигура 33 се представят хроматограмите на синтези с Tz2 при температури 30, 60 и 75°C и съответните получени добиви са: 13,5% ; 63,6% ; 86,9%. При температура 60°C се наблюдава пик с $R_f = 0,13$, съответстващ на ShB2. В този случай не се регистрира пикът на свободната $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, а пикът на получената Шифова база с K2, която не търпи пълно превръщане в желания хидразонен продукт Pr2. За модифицирането на Tz2 оптимална температура се оказва 75°C .



Фигура 33 – Модифициране на Tz2 при вариране на температурата: А – $T=30^{\circ}\text{C}$, $\text{RCY}=13,5\%$;
 Б – $T=60^{\circ}\text{C}$, $\text{RCY}=63,6\%$; В – $T=75^{\circ}\text{C}$, $\text{RCY}=86,9\%$

На фигура 34 се представят хроматограмите на синтези с R3, извършени при температури 50 и 70°C и получените добиви общо за двата маркирани продукта са следните: 71% и 87,6%. При температура 70°C се наблюдава почти пълно превръщане.



Фигура 34 – Модифициране на R3 при вариране на температурата: А – $T=50^{\circ}\text{C}$, $\text{RCY}(\text{Pr6})=34,2\%$; $\text{RCY}(\text{Pr7})=36,8\%$; Б – $T=70^{\circ}\text{C}$, $\text{RCY}(\text{Pr6})=44,2\%$; $\text{RCY}(\text{Pr7})=43,4\%$

В таблица 11 се обобщават данните, получени при проследяване ефекта на температурата върху RCY на модифицираните тетразини Tz1, Tz2 и R3.

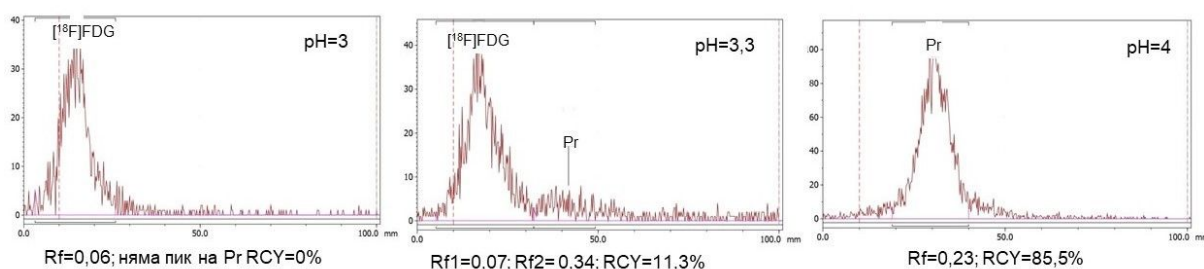
Таблица 11 - Зависимост на радиохимичния добив от температурата

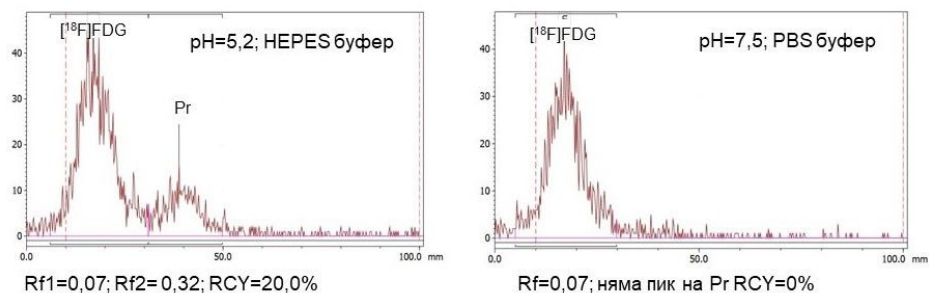
T, °C	22	30	50	60	70	75	тетразин
RCY, %	0	17,9	52,1	65,2	87,2	89,0	Tz1
	0	13,5	45,2	63,7	75,1	86,9	Tz2
	0	20,5	70,9	75,6	87,7	91,3	R3

На базата на данните може да се направи изводът, че оптимална температура за провеждане на реакции за формиране на оксим или хидразон с $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ е 70 -75 °C, при която се наблюдава почти пълно превръщане.

2. Влияние на рН на средата

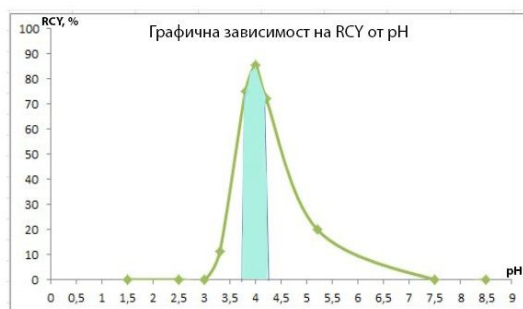
Провеждат се синтези по установената процедура с Tz1 при следните реакционни условия: температура 70-75°C (оптималната за реакцията), поетапно смесване на реагентите, в присъствие на K2, общо реакционно време 30 минути и вариране на рН в границите 1,5-8,5, за да се направи оценка на ефекта върху RCY. Направените експерименти при вариране на рН водят до следните резултати. При рН под 3 не се наблюдава втори пик, съответстващ на продукт, а само този – на $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. Реакциите на формиране на оксимна и хидразонна връзка са обратими и при рН под 3 се благоприятства хидролизата, при което равновесието се изтегля към изходните вещества. При рН над 7,5 отново не се наблюдава получаване на маркиран продукт поради затруднение за активиране на $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ и отваряне на глюкопиранозния пръстен. При рН 3,3 се наблюдава втори пик, дължащ се на получен продукт с $R_f=0,34$ и RCY 11,3%. При рН 5,2 се получава продукт ($R_f=0,32$) и по-добър RCY, в сравнение с този, получен при рН 3,3 – 20%. При рН 4 се наблюдава получаване на единствен пик, съответстващ на модифициран тетразин с $R_f=0,23$ с RCY над 85% и отсъствие на пика на радиомаркера, което предполага почти пълно превръщане на наличната в реакционната система $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. На фигура 35 се представят съответните радио-TLC хроматограми.





Фигура 35 – Модифициране на Tz1 при вариране на рН на средата: 1 – рН 3, RCU=0% ; 2 – рН 3,3; RCU=11,3%; 3 – рН 4, RCU=85,5%; 4 – рН 5,2; RCU=20%; 5 – рН 7,5; RCU=0%

В таблица 12 се обобщават резултатите, получени при проследяване ефекта на рН на средата върху RCU при модифициране на тетразин Tz1 за установената оптимална температура 75°C и в присъствие на K2. На фигура 36 графично се представя зависимостта на RCU от рН на средата.



Фигура 36 – Графична зависимост на RCU от рН на средата

Таблица 12 - Зависимост на радиохимичния добив от рН на средата

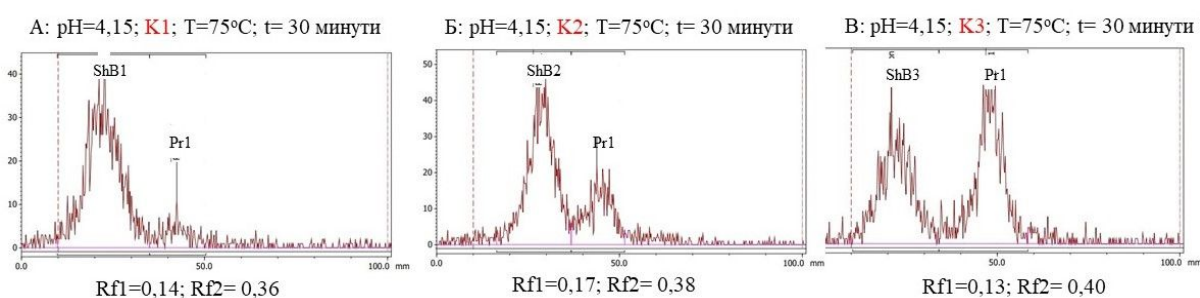
рН	1,5	2,5	3,0	3,3	3,8	4,0	4,2	5,2	7,5	8,5
RCU, %	няма сигнал	няма сигнал	няма сигнал	11,3	75,0	85,5	72,4	20,0	няма сигнал	няма сигнал

На базата на данните може да се направи изводът, че оптималното рН за провеждане на реакции за формиране на оксим или хидразон между бифункционални тетразини и $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ е в границите между 3,8 и 4,2, при което се наблюдава почти пълно превръщане и получаване на продукт с добър RCU.

3. Влияние на катализатора – неговия вид и концентрация

Извършват се синтези по установената процедура с Tz1 и Tz2 при следните реакционни условия: рН 4,15, температура 70-75°C, поэтапно смесване на реагентите, общо реакционно време 25-30 минути и вариране на катализатора и неговата концентрация, за да се направи оценка на ефекта върху RCU.

Провеждат се синтези с Tz1 при еднакви реакционни условия и вариране вида на катализатора при близка концентрация ($0,30 \pm 0,03$ M). За сравнение на фигура 37 се представят радио-TLC хроматограми при използване на K1, K2 и K3. В трите случая се наблюдава появата на два пика, като първият съответства на Шифовата база, а вторият – на получения краен продукт. Полученият продукт при употребата на различен катализатор е с RCY, както следва: 19,6 % с K1; 39 % с K2; 56,2 % с K3. При използване на анилин RCY е под 20 %, което е показател за не достатъчно ефективен катализатор при дадената концентрация, за това той се прилага само в малка част от експериментите.



Фигура 37 – Модифициране на Tz1 при вариране вида на катализатора: А – с K1, RCY=19,6% (Pr1); Б – с K2, RCY=39% (Pr1); В – с K3, RCY=56,2% (Pr1)

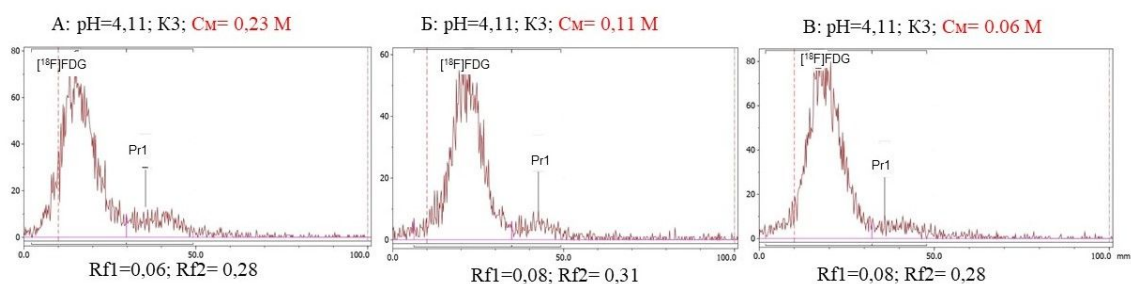
Предпочита се използването на K2 и K3 като катализатори при разработването на методика за модифициране на бифункционалните тетразини. K4 е ефективен катализатор, който сам по себе си е със слабо кисело $pH=3,9$ заради наличната карбоксилна група в структурата му, поради което не се налага допълнително подкиселяване с оцетна киселина. В негово присъствие се маркират Tz1 и Tz2. Но се предпочита да не се използва в маркирането на останалите тетразини поради факта, че разтворът му е със сиво-черен цвят, което влияе върху цвета на реакционната смес. Освен това при TLC анализ с елуент етилацетат получената Шифова база (ShB4) се задържа на старта, подобно на нереагиралата [^{18}F]FDG.

Пригответни са серия от разтвори на катализаторите с различна концентрация, като данните са представени в таблица 13.

Таблица 13 – Концентрации на работните разтвори на катализаторите

Катализатор	моларна концентрация				
	K2	0,47 M	0,23 M	0,12 M	0,06 M
K3	0,45 M	0,23 M	0,11 M	0,06 M	0,03 M
K4	0,41 M	0,20 M	0,10 M	0,05 M	0,02 M

Провеждат се синтези при рН на средата 4,1 и вариране концентрацията на катализаторите (К2 и К3), за да се оцени тяхната ефективност при формирането на оксимна връзка. На фигура 38 се представят радио-TLC хроматограми от модифициране на Tz1 в присъствие на К3 при различна концентрация. Полученият продукт е с RCU, както следва: 13,5 % при $C_M = 0,23$ M; 8,4 % при $C_M = 0,11$ M; 7,8 % при $C_M = 0,06$ M. Провеждат се експерименти за модифициране на същия тетразин, но в присъствие на К2. Получените данни за двата катализатора се обобщават в таблица 14. Наблюдава се тенденцията RCU значително да намалява при понижаване концентрацията на катализатора.



Фигура 38 – Модифициране на Tz1 при вариране концентрацията на К3: А – с $C_M = 0,23$ M, RCU=13,5% (Pr1); Б – с $C_M = 0,11$ M, RCU=8,4% (Pr1); В – с $C_M = 0,06$ M, RCU=7,8% (Pr1)

Установява се, че провеждане на синтези с концентрации на катализаторите по-ниски от 0,3 M не е много ефективно. Резултатите от радио-TLC в някои от случаите показват липса на продукт между $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ и бифункционалните тетразини. За предпочитане е да се работи с по-висока концентрация от порядъка 0,30-0,50 M.

Таблица 14 - Зависимост на радиохимичния добив от концентрацията на катализатора

C_M , M	0,23	0,11	0,05	0,03	катализатор
RCU, %	11,5	8,1	7,4	4,8	К2
	13,5	8,4	7,8	6,4	К3

4. Влияние на реакционното време върху радиохимичния добив

Извършват се синтези по установената процедура при оптималните условия: температура (70°C), рН (4,2) и използван катализатор р-метоксианилин с концентрация 0,50 M. Продължителността на първия активиращ етап е 10, а на втория – 20 минути. Непосредствено след добавяне на тетразина се взема проба за радио-TLC анализ. Този начален момент се означава като t_0 . След това се вземат проби на 5-та, 10-та, 15-та и 20-

та минута след смесването на всички реактиви. Данните се представят в таблица 15 и се построяват съответните криви (на фигура 39), показващи зависимостта на добива от реакционното време. Чрез тази процедура се проследява зависимостта на RCY от реакционното време при маркирането на Tz1 и Tz2.

Таблица 15 – Зависимост на RCY от продължителността на синтеза: А - модифициране на Tz1; Б – модифициране на Tz2

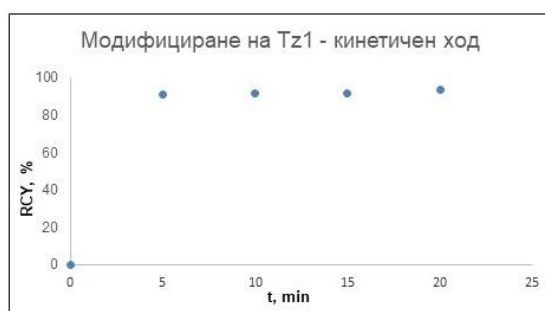
Tz1	t, min	RCY, %
	0	0
	5	90,8
	10	91,6
	15	91,7
	20	93,3

А

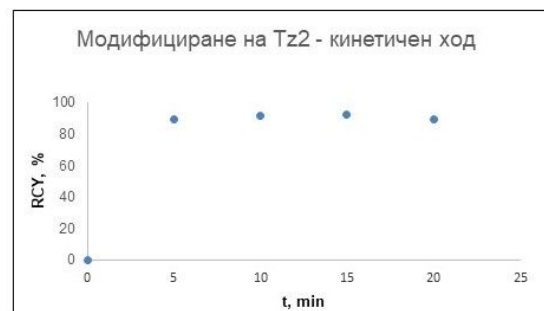
Tz2	t, min	RCY, %
	0	0
	5	89,1
	10	91,3
	15	92,0
	20	89,3

Б

Както се вижда от данните, 5 минути след добавяне на тетразина и последвало нагряване при оптималната температура се осъществява почти пълно превръщане на наличната в системата [¹⁸F]FDG. За получаване на по-добри резултати при втория етап от синтеза нагряването се провежда в продължение на 10 минути, вместо 15 или 20. Това благоприятства и по-малкия радиоактивен разпад и получаване на продукт с по-висока специфична активност.



А



Б

Фигура 39 – Графична зависимост на RCY от реакционното време при модифициране на бифункционални тетразини: А – модифициране на Tz1; Б – модифициране на Tz2

За съжаление радио-TLC методът дава само информация за това дали протича или не радиохимичната реакция и за съответния получен RCY, но не дава точна и ясна представа за получаването на конкретен продукт, в случай че в реакционната система присъстват повече от едно вещества, способни да реагират с молекулата на [¹⁸F]FDG. Аналогичен е и случаят със симетрично функционализираните изходни тетразини (налични две функционални аминоксигрупи), при маркирането на които се очаква получаването на два продукта (монозаместен и дизаместен), в зависимост от

количеството на [^{18}F]FDG в реакционната смес. Също така не дава информация каква част от тетразините конкурентно се свързват с нерадиоактивната глюкоза (получена след разпада на ^{18}F до ^{18}O), присъстваща в реакционната смес.

ИЗВОДИ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведените в рамките на настоящата дисертация експерименти водят до следните по-значителни резултати:

- Предлага се методика за модифициране на аминокси функционализиран тетразин чрез формиране на оксимна връзка с [^{18}F]FDG. Чрез тази методика се радиомакират 4 тетразина (Tz1, R1, R2 и R3).
- Предлага се методика за модифициране на хидразин функционализиран тетразин чрез формиране на хидразонна връзка с [^{18}F]FDG. По този начин се маркира 1 тетразин (Tz2).
- При $T=70-75^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4$ и в присъствие на катализатор *p*-метоксианилин или *p*-диаминобензен се получават радиомаркирани продукти с най-добър RCY между 80 и 93%.
- Проследяването на синтезите и потвърждаването на получените маркирани продукти се извършва с прости, евтини и достъпни в клиниката методи и апаратура.
- За пръв път в България реакциите за формиране на оксимна и хидразонна връзка се провеждат изцяло в клинична обстановка, а не в специализирана радиохимична лаборатория, при меки реакционни условия, за относително кратко време. Методът би бил напълно приложим за клинични цели.
- Провеждат се „студени“ синтези (без радиоактивност) между подбрани тетразини и производни на TCO и се проследява тяхната бърза кинетика, което ги прави приложими при радиомаркиране за предварително насочване.

Разработването и оптимизирането на методика за индиректно ^{18}F радиомаркиране на специфични макромолекули може да намери ценно приложение в нуклеарната медицина, което да улесни модифицирането на вече съществуващи и често прилагани радиофармацевтици с цел повишаване на тяхната ефективност и селективност. Предимство на получените модифицирани продукти е, че могат да се приложат в стратегии за предварително насочено изобразяване, което значително би намалило облъчването на пациента и би подобрило контраста на изображението.

ПРИНОСИ

Основен принос на дисертационния труд е разработването на процедура, изцяло адаптирана към клинични условия, за модифициране на широко използвания радиофармацевтик [^{18}F]FDG с цел повишаване на неговите специфичност и селективност. Разработва се подходящ радиохимичен синтез, протичащ при меки реакционни условия и съобразен с относително краткия период на полуразпад на използвания ПЕТ радионуклид ^{18}F (109 минути). Използваната стратегия за разработване на нови ПЕТ визуализиращи агенти включва хемоселективно модифициране (чрез формиране на оксимна или хидразонна връзка) на бифункционален тетразин, способен да участва в последваща клик реакция с транс-циклооктен. Реакцията между тетразин съдържаща молекула (Tz) и ТСО съдържаща молекула протича бързо при физиологични условия, като се получава стабилно дихидропиразиново съединение. Посредством този подход може да се осъществи бързо, селективно и нетоксично радиофлуориране на чувствителни биомолекули, което от своя страна ще е полезно при разработването на нови по-специфични и по-ефективни радиофармацевтици.

За това избраната тема на дисертацията е много актуална и представените подходи ще са бъдещето в нуклеарната медицина. Идеята, заложена в нашата работа, е иновативна и ще иницира създаване на ново научно направление в областта на синтеза на радиотераностици за ПЕТ-СТ изследвания. За първи път в България се съобщава за използване на тези биоортогонални реакции на конюгация, изцяло адаптирани към стандартни клинични условия.

СПИСЪК НА СОБСТВЕНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. *Modification of ^{18}F -fluororesoxy-glucose (^{18}F -FDG) radiopharmaceutical by oxime conjugation*, **Gergana Simeonova**, Boyan Todorov, Valentina Lyubomirova; RAP Conf. Proc., Vol. 6, 11–15; DOI: 10.37392/RapProc.2021.03 (без квартал Q)
2. *Method for indirect radiofluorination with ^{18}F FDG by biorthogonal reaction*, **Gergana Simeonova**, Boyan Todorov, Valentina Lyubomirova; Eur. Phys. J. Spec. Top. 232, 1555–1562 (2023); DOI: 10.1140/epjs/s11734-023-00885-7 (Q2 от 2022г.; IF 2,8 от 2022)
3. *An approach to develop personalized radiopharmaceuticals by modifying 2- ^{18}F -fluorodeoxyglucose (2- ^{18}F FDG)*, **Gergana Simeonova**, Boyan Todorov; Nuclear Medicine Review 2023, 26, 109–115; DOI: 10.5603/nmr.93869 (Q4 от 2022г.; IF 0,9 от 2022)

СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ И КОНФЕРЕНЦИИ

1. XIX Национална конференция за студенти и докторанти, организирана от Факултет по химия и фармация с доклад на тема: *Производство и модифициране на радиофармацевтика [^{18}F]-флуордезоксиглюкоза (^{18}F -FDG)*, Гергана Симеонова, Боян Тодоров, Валентина Любомирова; 04.06.2021г.
2. RAP 2021 Online Conference с постер на тема: *Modification of ^{18}F -fluorodesoxy-glucose (^{18}F -FDG) radiopharmaceutical by oxime conjugation*, Gergana Simeonova, Boyan Todorov; 08.09.2021г.
3. Седми Фармацевтичен бизнес форум – Научно-практическа конференция с доклад на тема: *Synthesis of ^{18}F -labeled radiopharmaceuticals and possible prospect*, Gergana Simeonova, Boyan Todorov, Valentina Lyubomirova; 23.10.2021г. Присъждане на първа награда за най-добра презентация в категория докторанти.
4. RAP Conference 2022 с доклад на тема: *Method for indirect radiofluorination with [^{18}F]-FDG by biorthogonal reaction*, Gergana Simeonova, Boyan Todorov; 06.06.2022г.
5. RAP Conference 2022 с постер на тема: *Monitoring and evaluation of factors affecting radiolabeling with [^{18}F]-FDG by oxime formation*, Gergana Simeonova, Boyan Todorov; 07.06.2022г.
6. 11-та национална конференция по химия с доклад на тема: *Use of [^{18}F]-FDG as a prosthetic group for indirect radiofluorination*, Gergana Simeonova, Boyan Todorov, Valentina Lyubomirova; 23-24.06.2022г.
7. Joint Forum SEEC-IMAB 12-th South-East European Conference of chemotherapy, infections and cancer & 32-st Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria с постер на тема: *An approach to develop personalized radiopharmaceuticals by modifying [^{18}F]-fluorodeoxy-glucose (^{18}F -FDG)*, Gergana Simeonova, Boyan Todorov, 20-23.10.2022г.
8. Осми Фармацевтичен бизнес форум – Научно-практическа конференция с доклад на тема: *Chemoselective radiofluorination with [^{18}F]-FDG*, Gergana Simeonova, Boyan Todorov, Valentina Lyubomirova; 28-29.10.2022г., Присъждане на втора награда за най-добра презентация в категория докторанти.
9. 12-та Научна конференция по химия с постер на тема: *Click reactions with [^{18}F]FDG and their application in the Nuclear medicine*, Gergana Simeonova, Boyan Todorov; 13-15.10.2023

УЧАСТИЕ В НАУЧНО-ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТИ

Участие в изпълнение на научен проект на тема „Изследване възможностите за радиомаркиране на биоактивни молекули с [¹⁸F]FDG чрез нови бифункционални съединения“ КП – 06-Н29/4 от 2018г. към Фонд научни изследвания на Министерството на Образованието и Науката.

СПИСЪК НА ВКЛЮЧЕНИТЕ ФИГУРИ

1. Фигура 1 – Времеви етапи на производствения цикъл	9 стр.
2. Фигура 2 – Синтез на [¹⁸ F]FDG	10 стр.
3. Фигура 3 – Равновесие на [¹⁸ F]FDG във воден разтвор	10 стр.
4. Фигура 4 – Реакционни смеси при начални експерименти	12 стр.
5. Фигура 5 – Реакционни флакони	12 стр.
6. Фигура 6 – Времеви етапи на радиомаркирането и потвърждаването на продукта	15 стр.
7. Фигура 7 – Реакция за получаване на Pr1 в присъствие на K2	19 стр.
8. Фигура 8 – TLC анализ на модифициран Tz1	20 стр.
9. Фигура 9 – Радио -TLC хроматограма на модифициран Tz1	20 стр.
10. Фигура 10 – Радио -TLC хроматограма на изходна [¹⁸ F]FDG	21 стр.
11. Фигура 11 – HPLC хроматограма от модифициране на Tz1	21 стр.
12. Фигура 12 – Реакция за получаване на Pr2 в присъствие на K3	23 стр.
13. Фигура 13 – TLC анализ на модифициран Tz2	24 стр.
14. Фигура 14 – Радио -TLC хроматограма на модифициран Tz2	25 стр.
15. Фигура 15 – Радио- HPLC анализ при модифициране на Tz2	25 стр.
16. Фигура 16 – Получаване на тетразин R1	26 стр.
17. Фигура 17 – Обобщена реакция за получаване на Pr3	26 стр.
18. Фигура 18 – TLC анализ на модифициран R1	27 стр.
19. Фигура 19 – Радио -TLC хроматограма на модифициран R1	27 стр.
20. Фигура 20 – Радио- HPLC анализ при маркиране на R1	28 стр.
21. Фигура 21 – Получаване на тетразин R2	28 стр.
22. Фигура 22 – Обобщена реакция за получаване на Pr4 и Pr5	29 стр.
23. Фигура 23 – TLC анализ на модифициран R2	29 стр.
24. Фигура 24 – Радио -TLC анализ на модифициран R2	30 стр.
25. Фигура 25 – Радио- HPLC анализ при маркиране на R2	30 стр.
26. Фигура 26 – Обобщена реакция за получаване на Pr6 и Pr7	31 стр.
27. Фигура 27 – TLC анализ на получаването на Pr6 и Pr7	31 стр.
28. Фигура 28 – Радио -TLC хроматограма на модифициран R3	32 стр.

29. Фигура 29 – HPLC анализ на модифициран R3	32 стр.
30. Фигура 30 – Обща схема на IEDDA реакции между модифицирани с [¹⁸ F]FDG тетразини и транс-циклооктен	34 стр.
31. Фигура 31 – Реакционна схема на възможните комбинации на иТСО модифицираните тетразини	34 стр.
32. Фигура 32 – Модифициране на Tz1 при вариране на температурата	36 стр.
33. Фигура 33 – Модифициране на Tz2 при вариране на температурата	36 стр.
34. Фигура 34 – Модифициране на R3 при вариране на температурата	36 стр.
35. Фигура 35 – Модифициране на Tz1 при вариране рН на средата	38 стр.
36. Фигура 36 – Графична зависимост на RCY при вариране на рН на средата	38 стр.
37. Фигура 37 – Модифициране на Tz1 при вариране вида катализатора	39 стр.
38. Фигура 38 – Модифициране на Tz1 при вариране концентрацията на катализатор	40 стр.
39. Фигура 39 – Графична зависимост на RCY от реакционното време	41 стр.

СПИСЪК НА ВКЛЮЧЕНИТЕ ТАБЛИЦИ

Таблица 1 – Параметри на HPLC анализ	6 стр.
Таблица 2 – Параметри на радио-HPLC анализ	7 стр.
Таблица 3 – Структури на бифункционалните съединения	8 стр.
Таблица 4 – Обобщение на реакционните условия	17 стр.
Таблица 5 – Получени данни от модифицирането на Tz1	22 стр.
Таблица 6 – Обобщени резултати при маркирането на Tz1	22 стр.
Таблица 7 – Получени данни от модифицирането на Tz2	25 стр.
Таблица 8 – Обобщени резултати при маркирането на Tz2	25 стр.
Таблица 9 – Получени данни от модифицирането на R3	33 стр.
Таблица 10 – Обобщени резултати при маркирането на R3	33 стр.
Таблица 11 – Зависимост на радиохимичния добив от температурата	37 стр.
Таблица 12 – Зависимост на радиохимичния добив от рН на средата	38 стр.
Таблица 13 – Концентрация на работните разтвори на катализаторите	40 стр.
Таблица 14 – Зависимост на RCY от концентрацията на катализатора	40 стр.
Таблица 15 – Зависимост на RCY от продължителността на синтеза	41 стр.

БЛАГОДАРНОСТИ

На първо място изказвам искрена признателност и благодарност на моя научен ръководител доцент д-р Валентина Любомирова за търпението, всеотдайността и подкрепата от нейна страна по време на моята докторантура. Благодаря за предоставената апаратура, с помощта на която бяха извършени анализи на част от продуктите. Благодаря за съдействието по време на HPLC анализите на пробите, оптимизирането на аналитичния метод и обработката на резултатите. Благодаря ѝ за насоките и ценните съвети при редактирането и оформянето на дисертационния труд.

Благодаря на моя научен консултант доцент д-р Боян Тодоров, който ме подкрепяше и напътстваше през последните няколко години. Благодаря му, че ми предостави възможността да се докосна до тази интересна научна област и да задълбоча познанията си, свързани с клик химията и приложението ѝ в нуклеарната медицина. Благодаря за предоставеното пространство, в което да се проявя, да израствам и да се науча да бъда изследовател. Благодаря за съдействието при писането и обсъждането на научните публикации.

Изказвам искрени благодарности на професор д-р Анелия Клисарова, лекар-специалист в клиниката по Нуклеарна медицина към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, в която работя. Благодаря ѝ, че подкрепи темата на моята дисертация и даде своето съгласие експериментът да се извърши на територията на клиниката. Благодаря ѝ за това, че винаги мотивира младите колеги да се развиват и израстват и че винаги се стреми към новостите, които при възможност да се въведат в клиничната работа. Искрено се надявам в близкото бъдеще подходите и реакциите, разгледани и разработени в дисертационния ми труд, да се превърнат в част от рутинната клинична дейност и да позволят по-точна и прецизна диагностика.

Благодаря на инженер физик Нонка Желева за съдействието, което ми оказва при подготовката за кандидат-докторантския конкурс, предоставяйки ми материали и лични разработки по част от темите.

Бих искала също да благодаря на всички мои приятели, които ми помогнаха да балансирам живота и работата си и ме подкрепиха в това голямо предизвикателство да бъда докторант и успешно да се дипломирам, получавайки научно-образователна степен „доктор“.

Благодаря на моите родители, които ме подкрепиха още от самото начало в избора ми като студент да уча химия в СУ “Климент Охридски“. Благодаря им, че ме отменяха в грижите за детето, когато аз трябваше да пътувам, за да участвам в научни

форуми в страната и чужбина, свързани с представянето на резултати от дисертационния ми труд.

Благодаря на моето дете Магдалена, която въпреки крехката си възраст прояви нужното търпение, докато работех вкъщи пред компютъра.

Благодаря и на себе си, че въпреки сложността на живота, успявам с упорит труд и постоянство да постигна поставените си цели и да се справям с предизвикателствата по моя житейски път. Благодарна съм, че имах възможността да измина Пътя на Сантяго (Camino de Santiago) в Испания, където намерих отговорите на много вътрешни въпроси и успех да пренаредя целите в живота си – една от които беше да завърша докторантура. И това се случи. Когато човек е наясно какво иска, намира начина как да го постигне въпреки трудностите, пред които го изправя животът. Пожелавам си и занапред все така да следвам мечтите и целите си.

Благодаря и на Бог, който в тежки времена на пандемия опази мен и семейството ми в добро здраве.

Издавам благодарност за оказаната финансова подкрепа при разработката на този дисертационен труд на Фонд Научни Изследвания към Министерство на Образованието и Науката (договор № КП-06-Н29/4).

В тези изследвания е използвано оборудване на Разпределената научна инфраструктура ИНФРАМАТ, част от Националната пътна карта на България за научна инфраструктура, подкрепена финансово от Министерство на образованието и науката.