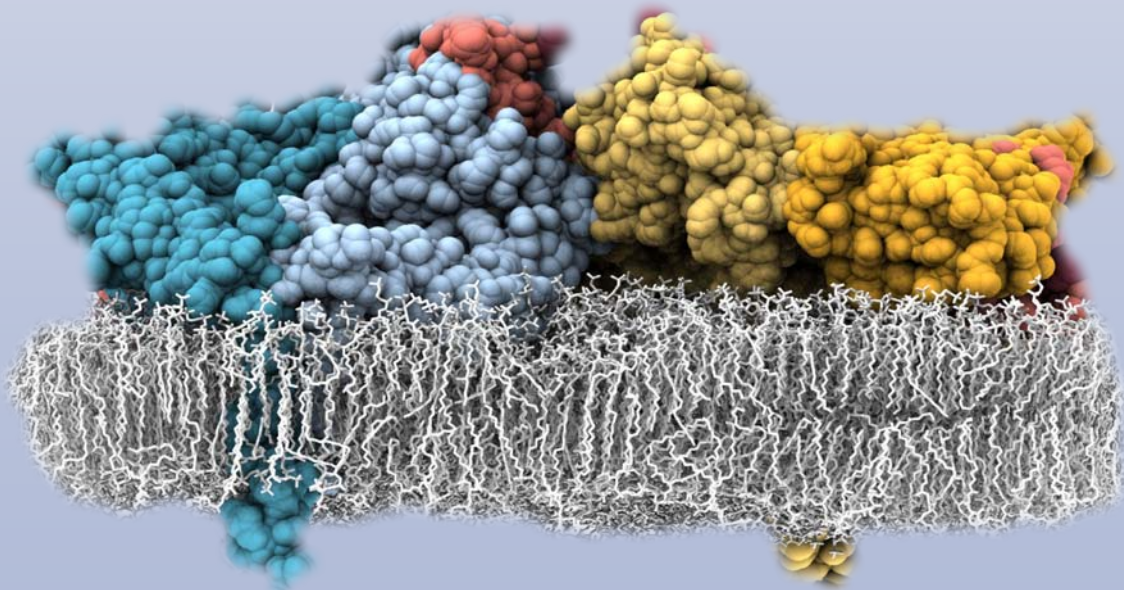


**ΕΑ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΩΣ
ΠΘΑΝΟΙ ΡΑΔΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΙ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
NEW QUINAZOLINE DERIVATIVES
AS POTENTIAL
RADIOPHARMACEUTICALS
FACTORS**

ΕΛΕΝΗ ΜΑΡΡΑ





Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μ. Παπαδόπουλος

Ερευνητής Α΄

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Ι. Πιρμεττής

Ερευνητής Α΄

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Δ. Κομιώτης

Καθηγητής

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Επιβλέπων

Μ. Παπαδόπουλος

Ερευνητής Α΄

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Συνεπιβλέπων

Δ. Κομιώτης

Καθηγητής

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2016-2017 στο Εργαστήριο Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε) «Δημόκριτος» με συνεργασία του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Δρ. Μηνά Παπαδόπουλου.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Μηνά Παπαδόπουλο, επιβλέπων της πτυχιακής μου εργασίας, για την αμέριστη υποστήριξη από την αρχή της εκπόνησης της και τις πολύτιμες υποδείξεις του, ιδιαιτέρως δε, για την καθοδήγησή του και την εμπιστοσύνη του. Αντίστοιχα, θερμές ευχαριστίες στον Δρ. Ιωάννη Πιρμεττή, Ερευνητή Α΄ του Εργαστηρίου του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για την πολύπλευρη ουσιαστική υποστήριξη και βοήθεια στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Δημήτριο Κομιώτη για την συνεχή βοήθειά και υποστήριξη.

Εγκάρδιες ευχαριστίες στον Δρ. Χρήστο Κυρίτση για υποστήριξη, την βοήθεια και την καθοδήγηση που υπέδειξε από την αρχή της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον διδακτορικό φοιτητή Αντώνη Σεγκάνη και στην διδακτορική φοιτήτρια Ιωάννα Ρούπα για την άρτια υποστήριξή τους καθώς και για τις υποδείξεις τους όλο αυτό το διάστημα. Ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ στην φοιτήτρια Μυρτώ Ισχυροπούλου για την υποστήριξη και την βοήθεια της. Όλα τα παιδιά του εργαστηρίου φρόντισαν να με αγκαλιάσουν σαν οικογένεια και τους ευχαριστώ πραγματικά για αυτό.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους δικούς μου ανθρώπους που αγαπώ, για την υποστήριξή τους σε κάθε μου βήμα όλο αυτό το διάστημα των σπουδών μου και την συνεισφορά τους στην υλοποίηση των στόχων μου. Ακόμα, ευχαριστώ εγκάρδια τον Πάρη Τρυπάνη για την αμέριστη στήριξη και υπομονή που υπέδειξε όλο αυτό το διάστημα, και που με έμαθε πως με υπομονή και πείσμα μπορούμε να επιτύχουμε όλα όσα θέλουμε.

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2017



*Αφιερωμένη στον άνθρωπο που με αφύπνισε να ακολουθήσω αυτόν τον επιστημονικό
κλάδο και μακάρι να ήταν μαζί μας
Στονθείο μου, Παναγιώτη Μαρινάκη*



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν νέα κιναζολινικά παράγωγα με την χρήση των στοιχείων του ρηνίου ($^{185/187}\text{Re}$) και του τεχνητίου ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), με σκοπό την στόχευση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EpidermalGrowthFactorReceptor–EGFR) στα καρκινικά κύτταρα. Το ρήνιο και το τεχνητίο εξαιτίας της θέσης τους στον Περιοδικό Πίνακα έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες για τον λόγο αυτό σύμπλοκα του τεχνητίου αυτοποιοούνται και χαρακτηρίζονται με την χρήση του ρηνίου. Το μόριο της κιναζολίνης καθώς και τα παράγωγά της έχουν βρεθεί να επιδρούν ανασταλτικά στον υποδοχέα EGFR. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τεσσάρων συμπλόκων (δύο σύμπλοκα ρηνίου και δύο σύμπλοκα τεχνητίου-99m). Για την σύνθεση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος [2+1] συζευγμένου μορίου με διδραστικού υποκαταστάτες το πικολινικό οξύ και το κιναλδικό οξύ, ενώ ως μονοδραστικού υποκαταστάτη χρησιμοποιήθηκε ένα ισοκύανο παράγωγο της κιναζολίνης. Για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων έγινε χρήση διαφόρων τεχνικών όπως IR, $\text{H}^1\text{-NMR}$ και HPLC. Τέλος τα σύμπλοκα του τεχνητίου μελετήθηκαν παρουσία ισχυρών ανταγωνιστών όπως τα αμινοξέα κυστεΐνη και ιστοιδίνη προκειμένου να αξιολογηθούν για την σταθερότητά τους.

ABSTRACT

In this study, new quinazoline derivatives were synthesized and characterized using the rhenium ($^{185/187}\text{Re}$) and the technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) element in order to target the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in cancer cells. The rhenium and technetium due to their position in the Periodic Table have similar physicochemical properties. For this reason, technetium complexes are characterized by the use of rhenium. The quinazoline molecule and its derivatives have been found to act as inhibitors to the EGFR. For this purpose the synthesis of four complexes (two rhenium complexes and two technetium-99m complexes) was performed. For the synthesis the [2+1] conjugated molecule has been used, with bidentate ligand picolinic acid and quinaldic acid and monodentate ligand isocyanate derivative of quinazoline. A variety of techniques such as IR, $\text{H}^1\text{-NMR}$ and HPLC were used in order to characterize the complexes. In the end of this study, the technetium complexes were studied in the presence of amino acids cysteine and histidine in order to evaluate for the stability.



Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
I.(α). Ραδιοφάρμακα	7
I.(β). Διαγνωστικά Ραδιοφάρμακα	8
I.(γ). Θεραπευτικά ραδιοφάρμακα	8
II. Ρήνιο και Τεχνητίο.....	9
II.(α) Τεχνητίο- ^{99m}Tc	10
II.(β) Μέθοδος παραγωγής του ^{99m}Tc	10
II.(γ) Φυσικοχημικές ιδιότητες τεχνητίου και ρηνίου	12
II.(δ) Ραδιοφάρμακα ^{99m}Tc	12
II.(ε) Ραδιοφάρμακα ^{186}Re	15
III. Νεότερες στρατηγικές σχεδιασμού ραδιοφαρμάκων του Τεχνητίου (Tc) και του Ρηνίου (Re).....	16
IV. Οξειδωτική βαθμίδα (I)	17
V. Κιναζολίνες.....	18
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	20
VI. Υλικά και όργανα.....	22
VII. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
VII(α). Σύνθεση υποκαταστατών	25
(a) Σύνθεση μεικτού συμπλόκου πικολινικού οξέος με την πρόδρομη ένωση του ρηνίου	25
(b) Σύνθεση του μεικτού συμπλόκου Κιναλδικό οξύ με πρόδρομη ένωση του ρηνίου.....	26
VII(β). Σύνθεση μεικτού συμπλόκου [2+1] ρήνιο πικολινικό κιναζολινικό	27
VII(γ). Σύνθεση μεικτού συμπλόκου [2+1] ρήνιο κιναλδικό κιναζολινικό.....	28
VII(γ). Αξιολόγηση αποτελεσμάτων	29
(a). Αξιολόγηση μεικτού συμπλόκου [2+1] ρήνιο πικολινικό κιναζολινικό.....	29
(b). Αξιολόγηση μεικτού συμπλόκου [2+1] ρήνιο κιναλδικό κιναζολινικό.....	30
VII(δ). ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ	31
Παρασκευή του πρόδρομου συμπλόκου τεχνητίου	31
(α) Παρασκευή επισημασμένου μεικτού συμπλόκου [2+1] τεχνητίο πικολικό κιναζολινικό.....	32



(β) Παρασκευή επισημασμένου μεικτού συμπλόκου [2+1] τεχνητό κιναλδικό κινάζολινικό.....	33
VIII.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	38
IX. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.(α). Ραδιοφάρμακα

Πρόκειται για οργανικές ή ανόργανες ενώσεις ραδιονουκλιδίων, οι οποίες προορίζονται για χρήσιμη και ασφαλή χορήγηση στον άνθρωπο, και ανάλογα το είδος της ακτινοβολίας που εκπέμπουν χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση ή τη θεραπεία παθήσεων.

Τα ραδιοφάρμακα μετά τη χορήγησή τους, συγκεντρώνονται σε ένα συγκεκριμένο όργανο στόχο ή σύστημα, ανάλογα τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπου και παραμένουν για μεγάλο ή μικρό χρονικό διάστημα.

Είναι σημαντικό να γίνει διαφοροποίηση του όρου «δόση» για τα ραδιοφάρμακα, σε σχέση με τα υπόλοιπα φαρμακευτικά σκευάσματα. Στα ραδιοφάρμακα ο όρος «δόση» αφορά τη χορηγούμενη ακτινοβολία και όχι στην ποσότητα της χορηγούμενης ουσίας. Ακόμη, ο όρος «θεραπευτική δόση» όταν χρησιμοποιείται στα ραδιοφάρμακα αφορά στην ποσότητα ακτινοβολίας που δρα θεραπευτικά.

Η χορήγηση των ραδιοφαρμάκων γίνεται κυρίως ενδοφλέβια και ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες με βάση με τη φαρμακολογική τους συμπεριφορά:

- i. Σε εκείνα που η πρόσληψη στο όργανο-στόχο καθορίζεται αποκλειστικά από την αιματική ροή.
- ii. Σε εκείνα που παρουσίαζαν εκλεκτική πρόσληψη σε ένα όργανο ή ιστό του σώματος.

Η εκλεκτική αυτή εντόπιση οφείλεται στην εξειδικευμένη αλληλεπίδραση του ραδιοφαρμάκου με συγκεκριμένο βιοχημικό υπόστρωμα (ενζυμικές αντιδράσεις ή δέσμευση σε υποδοχείς) και είναι αποτέλεσμα κατάλληλου σχεδιασμού της χημικής δομής και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του μορίου π.χ. μέγεθος, φορτίο, λιποφιλικότητα. Το ραδιοφάρμακο, ανάλογα με τις φυσικοχημικές ή βιολογικές ιδιότητες του καθλώνεται για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα σε όργανα ή ιστούς μεταφέροντας δόση ακτινοβολίας στο όργανο-στόχο. Η ακτινοβολία αυτή είτε δρα θεραπευτικά, είτε ανιχνεύεται εξωτερικά με κατάλληλη ανιχνευτική διάταξη και χρησιμεύει για τη μελέτη της λειτουργικότητας του οργάνου ή τον εντοπισμό τυχούσας βλάβης.^(1,2)



I.(β). Διαγνωστικά Ραδιοφάρμακα

Τα διαγνωστικά ραδιοφάρμακα φέρουν στο μόριο τους ραδιονουκλίδια που εκπέμουν γ -ακτινοβολία, όπως ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I ή ποζιτρόνια (β^+) όπως ^{201}Tl , ^{64}Cu , ^{18}F κλπ. Η εκπομπή ποζιτρονίων οδηγεί στο φαινόμενο εξαΰλωσης κατά την οποία η μάζα τους μετατρέπεται σ' ενέργεια, υπό τη μορφή δυο φωτονίων με πολύ υψηλή ενέργεια (2γ , 511 KeV). Η χορηγούμενη δόση πρέπει να απεικονίζει τις παθολογικές εστίες του εξεταζόμενου μέσω εκπομπής ραδιενέργειας, η οποία ανιχνεύεται από ειδικές εξωτερικές απεικονιστικές διατάξεις.

Οι ιδανικές ιδιότητες ενός ραδιονουκλιδίου στη διαγνωστική πρακτική είναι οι εξής:

1. Να εκπέμπει αποκλειστικά ηλεκτρομαγνητική γ ακτινοβολία χωρίς την ταυτόχρονη εκπομπή σωματιδιακού ακτινοβολίας (α ή β^-).
2. Η γ ακτινοβολία την οποία εκπέμπει πρέπει να είναι μονοενεργειακής ενέργειας άνω των 80 KeV (μέση ενέργεια 150 KeV), ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση της με τις υπάρχουσες ανιχνευτικές διατάξεις (γ -camera). Ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ποζιτρόνια ανιχνεύονται με PET camera.
3. Να έχει χρόνο ημιζωής επαρκή για τη σύνθεση του ραδιοφαρμάκου και την ολοκλήρωση της εξέτασης για την οποία προορίζεται. Τα ραδιονουκλίδια με πολύ μεγάλους χρόνους ημιζωής πρέπει να αποφεύγονται, ώστε να αποφεύγεται η άσκοπη ακτινοβολήση του ασθενούς.
4. Να έχει εύκολη μέθοδο παραγωγής και χαμηλού κόστους.
5. Να έχει υψηλή ειδική ραδιενέργεια.⁽³⁾

I.(γ). Θεραπευτικά ραδιοφάρμακα

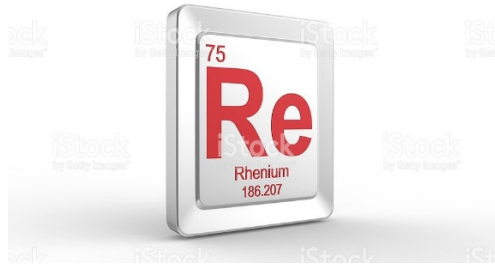
Τα θεραπευτικά ραδιοφάρμακα φέρουν στο μόριο τους ραδιονουκλίδια τα οποία διασπώνται με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

- a. Εκπομπή σωματιδίων α
- b. Εκπομπή ηλεκτρονίων β^-
- c. Εκπομπή ηλεκτρονίων Auger.^(4,5)

Τα ραδιονουκλίδια που διασπώνται με εκπομπή σωματιδίων β^- χρησιμοποιούνται ευρέως για θεραπεία στη ραδιοφαρμακευτική. Τα σωματίδια β^- έχουν μεγαλύτερη διεισδυτική ικανότητα (^{188}Re 11mm) από τα σωματίδια α (70 μm) και τα ηλεκτρόνια Auger και χρησιμοποιούνται για ακτινοβολήση μικρού ως μεσαίου μεγέθους όγκων.^(6,4)



II. Ρήνιο και Τεχνητίο



Είναι το 75^ο στοιχείο του Περιοδικού Πίνακα. Ανήκει στην 6^η περίοδο και στην 7^η ομάδα (VIIB) του Π.Π. και η ηλεκτρονιακή του δομή είναι $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^5 6s^2$.

Το 1871, οMendeleev είχε προβλέψει την ύπαρξη του ρηνίου, όπως και του τεχνητίου στον Π.Π. ως ομολόγου του μαγγανίου όμως πέρασε μισός αιώνας για να γίνει η ταυτοποίηση του.^(7,8) Η ανακάλυψη του αποδίδεται στους W.Noddack, I.Tackeκαι O.Berg,^(9,10) οι οποίοι το 1925 ανέφεραν ότι ανακάλυψαν το στοιχείο με τον ατομικό αριθμό 75 στο φάσμα ακτινών X δειγμάτων από ορυκτά λευκόχρυσου και κολουμβίτη. Ανέφεραν επίσης ότι βρήκαν αποδείξεις για την ύπαρξη του και σε δείγματα μολυβδαινίτη και γαδολινίτη. Το 1928 ανακοίνωσαν ότι κατόρθωσαν να απομονώσουν 1 gr του στοιχείου μετά από επεξεργασία 660 Kg μολυβδαινίτη. Μερικά δείγματα μολυβδαινίτη όπως το θειούχο ορυκτό του μολυβδαινίου, περιέχουν ρήνιο μέχρι και 20 ppm. Το ρήνιο είναι ένα από τα σπανιότερα στοιχεία του ηλιακού μας συστήματος. Είναι καταμεμημένο στο στερεό φλοιό της γης σε ποσοστό 0,1-10 ppm.⁽¹¹⁾ Στη φύση το ρήνιο το συναντάμε σαν μίγμα του μοναδικού σταθερού ισότοπου νουκλιδίου ^{185}Re και του ασταθούς αλλά και εξαιρετικά μακρόβιου ^{187}Re σε αναλογία 37,4% προς 62,6%.⁽¹²⁾ Το φυσικό ισότοπο νουκλιδίου ^{187}Re έχει χρόνο ημιζωής $7 \cdot 10^{10}$ έτη, εκπέμπει ασθενή ακτινοβολία β^- και μεταπίπτει στο θυγατρικό ^{187}Os (όσμιο) που βρίσκεται σε όλα τα πετρώματα που περιέχουν ρήνιο. Επειδή οι φυσικοχημικές ιδιότητες του ρηνίου και του τεχνητίου είναι παρόμοιες, το φυσικό ρήνιο ($^{185}\text{Re}/^{187}\text{Re}$) χρησιμοποιείται εναλλακτικά με το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ για την ταυτοποίηση των συμπλόκων του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ τα οποία δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με τις κλασικές μεθόδους.⁽¹³⁾



atomic number	43	(98)	atomic weight
symbol	Tc	D	acid-base properties of higher-valence oxides
electron configuration	$[\text{Kr}]4d^55s^2$	=	physical state at 20° C (68° F)
name	technetium		

Το στοιχείο τεχνήτιο ($Z=43$) ανήκει στην 5^η περίοδο, στην 2^η σειρά των στοιχείων μετάπτωσης και μαζί με τα στοιχεία μαγγάνιο και ρήνιο απαρτίζουν την 7^η ομάδα (VIB) του Περιοδικού Πίνακα. Το τεχνήτιο είναι το τελευταίο από τα στοιχεία μετάπτωσης που ανακαλύφθηκε, έχει 7 ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα και η ηλεκτρονιακή του δομή είναι $[\text{Kr}] 4d^5 5s^2$. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο Mendeleev είχε προβλέψει τη θέση του στον Περιοδικό Πίνακα ανάμεσα στο μολυβδαίνιο και το ρουθένιο αλλά παρέμενε κενή μέχρι το 1937. Το 1937 οι E.Segre και C.Perrier κατέφεραν να απομονώσουν νουκλίδια του στοιχείου με ατομικό αριθμό 43 από μολυβδαίνιο που τους έστειλε ο Lawrence αφού το είχε βομβαρδίσει με πυρήνες δευτερίου στο κύκλοτρο του Berkeley. Οι E.Segre και C.Perrier το 1947 πρότειναν την ονομασία τεχνήτιο (technetium, με σύμβολο Tc) για το καινούριο αυτό στοιχείο από την ελληνική λέξη «τεχνητός» επειδή ήταν το πρώτο στοιχείο που παρασκευάστηκε τεχνητά.^(14,15)

II.(α) Τεχνήτιο- ^{99m}Tc

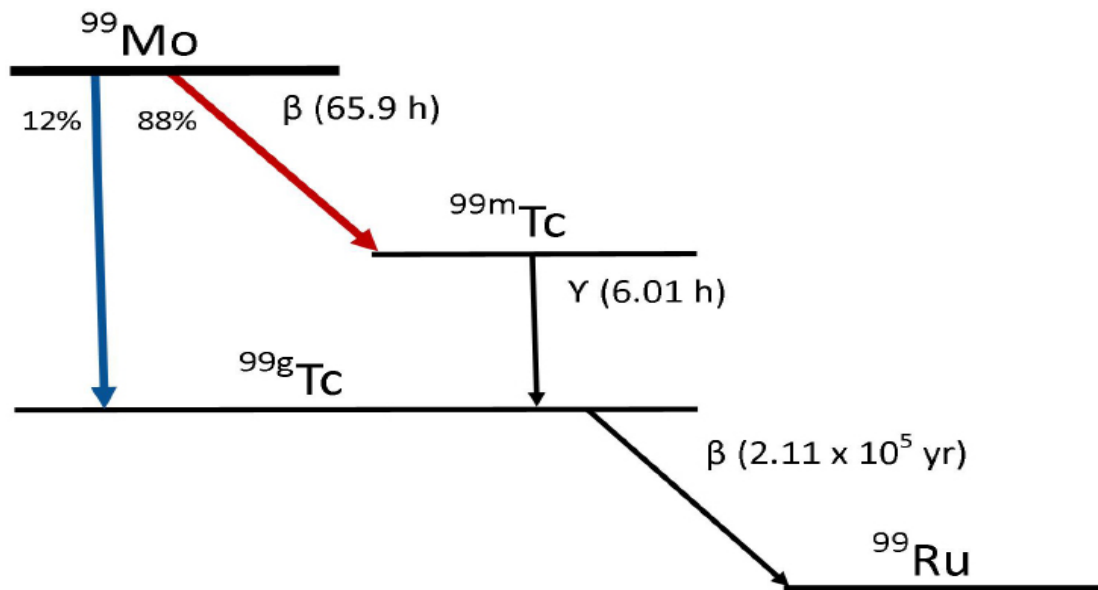
Στην πυρηνική ιατρική το μετασταθερό ^{99m}Tc χρησιμοποιείται εκτεταμένα ως διαγνωστικός παράγοντας εξαιτίας των καλών φυσικών ιδιοτήτων του. Ο χρόνος ημιζωής του ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6.02$ hours) είναι επαρκής για την σύνθεση ραδιοφαρμάκων και χρήση σε πλήθος εξετάσεων, χωρίς την έκθεση των ασθενών για υπερβολικά χρονικά διαστήματα σε ραδιενέργεια. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η έλλειψη σωματιδιακής β^- ακτινοβολίας.⁽¹⁶⁾ Η γ ακτινοβολία, ενέργειας 140,5 KeV διαπερνά ευχερώς τους ιστούς του σώματος και ανιχνεύεται εύκολα από τις υπάρχουσες ανιχνευτικές διατάξεις. Στα πλεονεκτήματα αυτά του ^{99m}Tc προστίθεται και το συγκριτικά μικρό κόστος παρασκευής τους καθώς και η ικανότητα διάθεσής τους σε μεγάλες αποστάσεις από τον τόπο παραγωγής του με τις γεννήτριες $^{99}\text{Mo}-^{99m}\text{Tc}$.⁽¹⁷⁾

II.(β) Μέθοδος παραγωγής του ^{99m}Tc

Το ^{99m}Tc παράγεται κατά τη διάσπαση του μητρικού ραδιονουκλιδίου ^{99}Mo . Το ^{99}Mo ($t_{1/2} = 66.02$ hours) διασπάται με εκπομπή β^- ακτινοβολίας προς το μετασταθερό ραδιονουκλίδιο ^{99m}Tc (87.5%) και προς το ψευδοσταθερό ^{99}Tc (12,5%). Το ^{99m}Tc



διασπάται με εκπομπή γ ακτινοβολίας (140,5 KeV, IT) προς το ^{99}Tc . Αυτό στη συνέχεια υφίσταται μεταστοιχείωση προς το σταθερό ρουθίνιο (^{99}Ru) με εκπομπή β^- ακτινοβολίας.⁽¹⁷⁾ Το ^{99}Mo απομονώνεται από τα προϊόντα σχάσης με ειδική χημική κατεργασία, είναι υψηλής ειδικής ραδιενέργειας με συνηθέστερες προσμίξεις ^{131}I και ^{103}Ru και χρησιμοποιείται για την παρασκευή γεννήτριας ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Ο διαχωρισμός του παραγόμενου $^{99\text{m}}\text{Tc}$ από το μητρικό του ^{99}Mo βασίζεται στις διαφορές της σταθεράς διασπάσεως (λ) των δύο νουκλιδίων σε συνδυασμό με τις διαφορετικές τους χημικές ιδιότητες. Για τον διαχωρισμό του θυγατρικού $^{99\text{m}}\text{Tc}$ από το μητρικό ^{99}Mo χρησιμοποιείται η χρωματογραφία στήλης, η οποία είναι η πιο απλή, πιο εύχρηστη και κατά συνέπεια πιο διαδεδομένη μέθοδο.



Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής του $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Σε αυτή τη μέθοδο στηρίχτηκε η ανάπτυξη των γεννητριών ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$, συστήματος τα οποία χρησιμοποιούνται για εύκολη παραγωγή στείρου διαλύματος υπερτεχνητικού νατρίου κατάλληλο για φαρμακευτικές εφαρμογές. Οι γεννήτριες ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ κατέστησαν δυνατή την εύκολη διάθεση του ραδιονουκλιδίου στην πυρηνική ιατρική. Οι γεννήτριες είναι ανθεκτικά συστήματα, μικρών διαστάσεων και αποτελούνται από μικρή γυάλινη στήλη χρωματογραφίας η οποία περιέχει οξείδιο του αργιλίου. Στη στήλη αυτή είναι επιστοιβαδευμένο το μητρικό ραδιονουκλίδιο με τη μορφή μολυβδαινικών ανιόντων $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$, το οποίο διασπώμενο παράγει συνεχώς το θυγατρικό $^{99\text{m}}\text{Tc}$ με τη μορφή $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$. Αυτό αποχωρίζεται με έκλυση της στήλης με το στείρο διάλυμα φυσιολογικού ορού ενώ τα $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$ κατακρατούνται στη στήλη. Μετά το τέλος κάθε έκλυσης το $^{99\text{m}}\text{Tc}$ αρχίζει και πάλι να αναγεννάται από το μητρικό ^{99}Mo μέσα στη στήλη ενώ την ίδια στιγμή διασπάται προς ^{99}Tc εκπέμποντας γ ακτινοβολία.



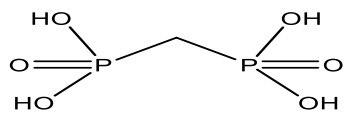
II.(γ) Φυσικοχημικές ιδιότητες τεχνητίου και ρηνίου

Το τεχνητίο και το ρήνιο έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Ανήκουν και τα δύο στα στοιχεία μετάπτωσης της 7^{ης} ομάδας του Π.Π.. Η χημική αυτή συμπεριφορά είναι γενική για τα στοιχεία μεταπτώσεως της δεύτερης και της τρίτης σειράς τα οποία ανήκουν στην ίδια υπομονάδα και οφείλεται στην λανθανιδική συστολή. Η αναμενόμενη αύξηση της ατομικής ακτίνας μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου στοιχείου μετάπτωσης της ίδιας ομάδας δεν πραγματοποιείται παρά μόνο ελάχιστα εξαιτίας της συμπλήρωσης των εσωτερικών τροχιακών 4f⁽¹⁸⁾. Έτσι οι ατομικές ακτίνες του τεχνητίου και του ρηνίου είναι ισοδύναμες και επομένως έχουν σε μεγάλο βαθμό παρόμοιες ιδιότητες. Το Re και το Tc σχηματίζουν με τα ίδιους υποκαταστάτες, παρόμοια σύμπλοκα, για αυτό και τα σύμπλοκα του Re επειδή δεν είναι ραδιενεργά και μπορούν να χαρακτηριστούν πιο εύκολα, χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των σύμπλοκα του ^{99m}Tc. Ένας τρόπος ταυτοποίησης είναι η ταυτόχρονη έκχυση ραδιενεργού (^{99m}Tc) και μη ραδιενεργού Re συμπλόκου από την HPLC, και εφόσον οι χρόνοι έκλυσης των δύο είναι παραπλήσιοι, τότε θεωρείται ότι τα σύμπλοκα διαθέτουν την ίδια δομή.

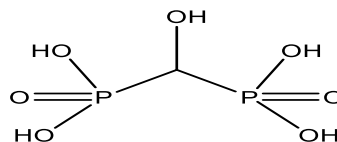
II.(δ) Ραδιοφάρμακα ^{99m}Tc

Τα ραδιοφάρμακα πρώτης γενιάς τα οποία αναπτύχθηκαν κατά τη δεκαετία του 1960 και του 1970 περιλαμβάνουν κολλοειδή σωματίδια ή μικροσωματίδια επισημασμένα με τεχνητίο και σχετικά απλές ενώσεις του τεχνητίου.⁽¹⁾ Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι χρησιμοποιούνται σύμπλοκα των οποίων η δομή δεν είναι γνωστή.

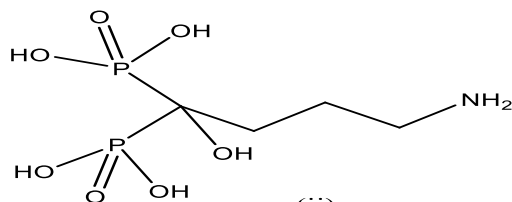
Το 1970 χαρακτηρίζεται από τη σημαντική ανακάλυψη συμπλόκων του ^{99m}Tc με διφωσφονικές ενώσεις, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σαν διαγνωστικά φάρμακα για την απεικόνιση του σκελετού και καρκινικών μεταστάσεων στα οστά.⁽¹⁹⁾ Οι περιφερειακοί υποκαταστάτες είναι διφωσφονικές ενώσεις κατάλληλα τροποποιημένες όπως φαίνεται στα παρακάτω σχήματα.



(i)



(ii)



(iii)

Δομή (i) MDP, (ii) HMDP, (iii) ABP

Πίνακας με τα κυριότερα ραδιοφάρμακα του τεχνητίου ^{99m}Tc και η χρήση τους στην πυρηνική ιατρική.

	ΡΑΔΙΟΦΑΡΜΑΚΟ	ΕΞΕΤΑΣΗ
1 ^{ης} γενιάς	$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$	Απεικόνιση θυρεοειδούς και σιελογόνου αδένων
	^{99m}Tc -DTPA	Απεικόνιση νεφρών
	^{99m}Tc -HIDA	Μελέτη ηπατοχολινικού
	^{99m}Tc -tagged red blood cells	Απεικόνιση ηπατικού αιμαγγειώματος
	^{99m}Tc -sulfur colloid	Απεικόνιση σπλήνα, ήπατος, μυελού των οστών
	^{99m}Tc -MDP	Απεικόνιση οστών
2 ^{ης} γενιάς	^{99m}Tc -MAG3	Απεικόνιση νεφρών
	^{99m}Tc -HMPAO	Απεικόνιση- τοπικής Εγκεφαλικής ροής
	^{99m}Tc -ECD	Αξιολόγηση ισχαιμικών εγκεφαλικών επεισοδίων
	^{99m}Tc -tetrofosmin	Απεικόνιση μυοκαρδίου
	^{99m}Tc -sestamibi	Απεικόνιση μυοκαρδίου
3 ^{ης} γενιάς	^{99m}Tc -Cl(SS-estradiol)(CO) ₃	Απεικόνιση υποδοχέων οιστρογόνου
	^{99m}Tc -TRODAT	Απεικόνιση υποδοχέων ντοπαμίνης

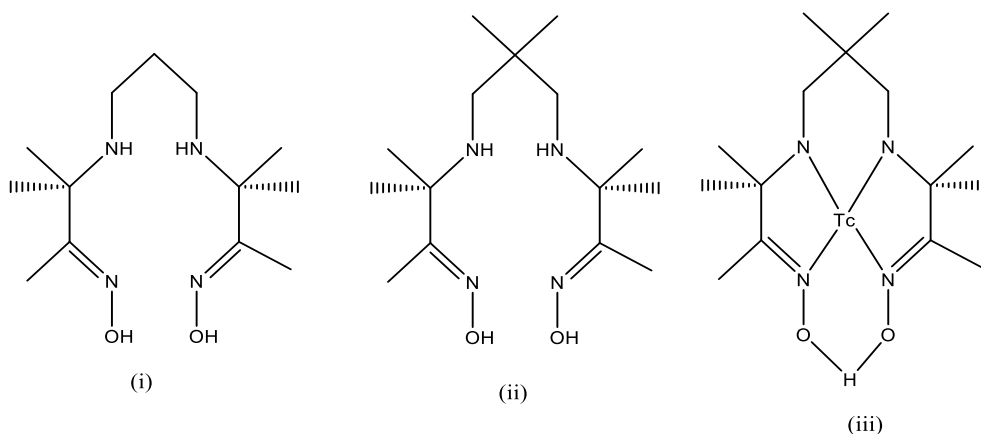
Έτσι, ως περιφερειακούς υποκαταστάτες χρησιμοποιούνται το μεθανοδιφωσφονικό οξύ (MDP), το υδροξυ-μεθανο-διφωσφονικό οξύ (HMDP) και το 1-υδροξυ-4-αμινοβουτανο-1,1-διφωσφονικό οξύ (ABP). Ο ακριβής τους χαρακτηρισμός δεν έχει επιτευχθεί, πιστεύεται όμως ότι σχηματίζονται ολιγοπολυμερή. ⁽²⁰⁻²²⁾



Η βασική έρευνα γύρω από το ραδιονουκλίδιο του ^{99m}Tc και τα ραδιοφάρμακα του, προχώρησε με γρήγορο ρυθμό, με αποτέλεσμα η Ραδιοφαρμακευτική Χημεία του τεχνητίου να ξεχωρίζει ως ιδιαίτερος κλάδος της ραδιοφαρμακευτικής.

Τα πρώτα υποσχόμενα σύμπλοκα ήταν σύμπλοκα του Tc(V) που περιείχαν τον πυρήνα TcO_3^+ και ως περιφερειακοί υποκαταστάτες τροποποιημένες προπυλενοαμινο-οξίμες. Οι προπυλενοαμινο-οξίμες (PnAO) φέρουν 4 άζωτα ως άτομα δότες. Όταν χρησιμοποιήθηκε ως περιφερειακό υποκαταστάτη η διοξίμη της 3,3,9,9-τετραμεθυλο-4,8-διαζαενδεκανο-2,10- διόνης το προκύπτον σύμπλοκο ^{99m}Tc - PnAO ήταν ουδέτερο στο pH του αίματος, λιπόφιλο και περνούσε από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε υψηλό ποσοστό αλλά δεν παρέμεινε για ικανοποιητικό χρονικό διάστημα στον εγκέφαλο. Η παγίδευση αυτή επιτεύχθηκε με τροποποίηση του σκελετού της αμινοξίμης με την παρασκευή της διοξίμης της d,1,3,6,6,9- τετραμεθύλο-4,8- διαζαενδεκανο - 2,10- διόνης (HMPAO).

Το σύμπλοκο αυτό είναι το ^{99m}Tc - HMPAO και συνδυάζει τις ιδιότητες της υψηλής πρόσληψης και της παρατεταμένης καθήλωσης στον εγκέφαλο και αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ραδιοφαρμάκων 2^{1c} γεννιάς. Η δράση του αποδίδεται στη διάσπαση του προς ένα ή περισσότερα υδρόφιλα παράγωγα.⁽²³⁻²⁸⁾



Δομή (i) PnAO, (ii) HMPAO και (iii) ^{99m}Tc -HMPAO

Σήμερα το ^{99m}Tc - HMPAO κυκλοφορεί με το εμπορικό όνομα Ceretec (GE Health care) και χρησιμοποιείται σε καθημερινή κλινική πράξη για τη μέτρηση της τοπικής αιματικής ροής του εγκεφάλου με SPECT. Χρησιμοποιείται με επιτυχία στη διάγνωση διαφόρων ασθενειών όπως εγκεφαλικών επεισοδίων, ισχαιμίας, επιληψίας, νόσο του Parkinson και άνοιας.⁽²⁹⁻³¹⁾ Επίσης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση όγκων και τραυμάτων στον εγκέφαλο καθώς και για την επιβεβαίωση του εγκεφαλικού θανάτου.⁽³²⁻³³⁾ Ένα άλλο ραδιοφάρμακο του τεχνητίου είναι ^{99m}Tc - ECD που κυκλοφορεί με το εμπορικό όνομα NeuroLite.⁽³⁴⁾ Σε αυτόν τον περιφερειακό υποκαταστάτη είναι ο διαιθυλεστεράς της L,L'-N,N'- αιθυλενοδικυστεΐνης (ECD: L,L'- ethylcysteinatedimer) και ανήκει στην κατηγορία των διαμινο- διθειολών (BAT: bis-amino-bis-thiol)

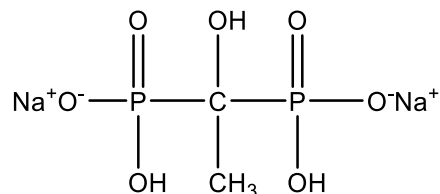


Το σύμπλοκο διαθέτει δύο εστερομάδες οι οποίες υδρολύονται με την επίδραση των εστερασών προς τα αντίστοιχα οξέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον ιονισμό της ένωσης και την παγίδευση της στον εγκέφαλο. Η υδρόλυση είναι στεροειδική, μόνο το L,L'ισομερές υδρολύεται γρήγορα και παραμένει στον εγκέφαλο, η δε πρόσληψη του φτάνει το 6%.⁽³⁵⁻³⁶⁾Το σύμπλοκο αυτό δίνει καλή εικόνα της αιματικής ροής του εγκεφάλου και μπορεί να απεικονίσει τη φαιά ουσία, τα βασικά γάγγλια, το θάλαμο και τα ημισφαίρια. Χρησιμοποιείται κυρίως για την εκτίμηση της εικόνας ασθενώς με εγκεφαλικό επεισόδιο.⁽³⁵⁻³⁷⁾

Στη συνέχεια άρχισε η ανάπτυξη ραδιοφαρμάκων του ^{99m}Tc τρίτης γενεάς. Βασικό ζητούμενο της κατηγορίας αυτής είναι τα ραδιοφάρμακα να δεσμεύονται σε υποδοχείς.⁽³⁸⁾Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σύμπλοκο ^{99m}Tc - TRODAT που περιλαμβάνει ένα περιφερειακό υποκαταστάτη της ομάδας των διαμινοδιθειολών ο οποίος συνδέεται με δακτύλιο τροπανίου. Το σύμπλοκο αυτό χρησιμοποιείται με επιτυχία για την απεικόνιση των μεταφορέων της ντοπαμίνης και έχει στόχο την *in vivo* εκτίμηση της απώλειας ντοπανινεργικών νευρώνων κατά την νόσο του Parkinson και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες.^(39,40,41,42,6)

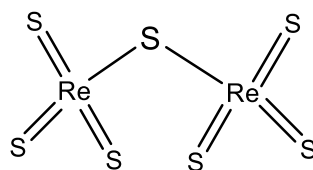
II.(ε)Ραδιοφάρμακα ^{186}Re

Το επισημασμένο με ^{186}Re 1- υδροξυαιθανο-1,1-διφωσφονικό νάτριο ή $^{186}\text{ReHEDP}$ είναι ένα νεότερο θεραπευτικό ραδιοφάρμακο του ρηνίου για ανακούφιση των πόνων από μεταστάσεις στα οστά. Τα ραδιοφάρμακα παρασκευάζονται με αναγωγή των υπερρηνικών ιόντων με SnCl_2 παρουσία του υποκαταστάτη HEDP.⁽²⁾



Δόμη του 1- υδροξυαιθανο- 1,1 διφωσφονικό νάτριο (HEDP)

Άλλο ραδιοφάρμακο του ^{186}Re είναι το κολλοειδες επτασουλφιδίου του ρηνίου το οποίο σχηματίζεται με όξινη αναγωγή του θειοθειικού νατρίου παρουσία υπερρηνικών και προορίζεται για τοπική ενδοαρθρική χορήγηση (ραδιοϋμενόλυση).^(2,43)



Δομή $^{186}\text{Re}_2\text{S}_7$



III.Νεότερες στρατηγικές σχεδιασμού ραδιοφαρμάκων του Τεχνητίου (Tc) και του Ρηνίου(Re)

Η σύγχρονη έρευνα προσανατολίζεται στο σχεδιασμό νέων εξειδικευμένων ραδιοφαρμάκων τα οποία φέρουν κατάλληλες φαρμακοφόρες ομάδες ώστε να αλληλεπιδρούν εκλεκτικά σε κυτταρικό ή μοριακό επίπεδο με το βιολογικό υπόστρωμα. Επομένως λαμβάνονται πολύτιμες πληροφορίες για την φυσιοπαθολογία μιας νόσου με σκοπό την αποτελεσματικότερη διάγνωση και πρόγνωση διαφόρων ασθενειών καθώς επίσης και τον σχεδιασμό εξατομικευμένων θεραπευτικών σχημάτων.⁽⁴⁴⁾ Η στρατηγική σχεδιασμού νέων ραδιοφαρμάκων του τεχνητίου περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- i. Επιλογή της κατάλληλης οξειδωτικής βαθμίδας του μετάλλου.
- ii. Σταθεροποίηση του μετάλλου με κατάλληλους υποκαταστάτες ώστε να σχηματιστεί σταθερό και βιολογικά αδρανές σύμπλοκο. Ο πυρήνας του μετάλλου μαζί με τον περιφερειακό προσδέτη αποτελούν τον «δομικό λίθο» (buildingblock).
- iii. Πρόσδεση του «δομικού λίθου» σε βιολογικά δραστική ένωση ή φαρμακοφόρο ομάδα ώστε το τελικό σύμπλοκο να εμφανίζει την επιθυμητή βιολογική δράση. Η πρόσδεση γίνεται με δύο τρόπους : α) με τη μέθοδο του Συζευγμένου Μορίου (PendantApproach) και β) με τη μέθοδο του Ενιαίου Μορίου (IntegratedApproach).

Η μέθοδος του Συζευγμένου Μορίου πραγματοποιείται μέσω ενός διλειτουργικού υποκαταστάτη, ο οποίος διαθέτει αφ' ενός κατάλληλο σύστημα ατόμων δοτών για την σταθερή σύμπλεξη του μετάλλου και αφ' ετέρου κατάλληλη ομάδα, η οποία μπορεί να σχηματίσει ομοιοπολικό δεσμό με το βιομόριο. Η μέθοδος του Ενιαίου Μορίου αναφέρεται στην αντικατάσταση τμήματος μιας βιολογικά δραστικής ένωσης από τον «δομικό λίθο» με κατάλληλο τρόπο. Οι χηλικοί δακτύλιοι που προκύπτουν από την συναρμογή του μετάλλου από τους περιφερειακούς υποκαταστάτες μπορεί να θεωρηθεί ότι αντικαθιστούν δακτυλίους της πρότυπης ένωσης. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί ελάχιστες μόνο εφαρμογές της συγκεκριμένης μεθόδου. Βασικά σημεία και των δύο μεθόδων είναι η επιλογή του «δομικού λίθου» και του φαρμακοφόρου. Η εύρεση σταθερών «δομικών λίθων», με ποικίλα συστήματα ατόμων δοτών και κατ' επέκταση διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, δίνει μεγάλη ώθηση στην ανάπτυξη της Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας. Η δυνατότητα επιλογής του καταλληλότερου «δομικού λίθου» για την κάθε περίπτωση, σε σχέση με το φαρμακοφόρο και την περιοχή στόχευση επιτρέπει τη σύνθεση εξειδικευμένων ραδιοφαρμάκων με τις βέλτιστες φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Παράλληλα, η πάθηση που εξετάζεται και κατ' επέκταση το όργανο στόχος καθορίζει το φαρμακοφόρο που χρησιμοποιείται.



IV.Οξειδωτική βαθμίδα (I)

Το Tc στην οξειδωτική βαθμίδα (I) (d^6) σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με υποκαταστάτες οι οποίοι φέρουν ομάδες ικανές να σταθεροποιούν το μέταλλο με το φαινόμενο της π- οπισθοσύνδεσης όπως είναι οι φωσφίνες και τα ισοκυανίδια, καθώς και τα καρβονύλια. Οι υποκαταστάτες που εμφανίζουν το φαινόμενο π - οπισθοσύνδεσης είναι περιορισμένοι και τα σύμπλοκα του Tc(I) που είχαν μελετηθεί ήταν θετικά φορτισμένα μόρια. Τα σύμπλοκα του Tc είναι κινητικά και θερμοδυναμικά σταθερά όταν ο αριθμός συναρμογής τους είναι έξι.

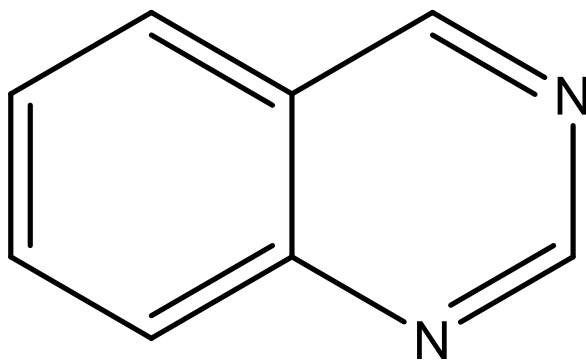
Η παρασκευή των συμπλόκων του ρηνίου και του ^{99m}Tc στην οξειδωτική βαθμίδα (I) βασίστηκε στη μέθοδο αντικατάστασης υποκαταστατών (ligandexchange reactions) με τη χρήση πρόδρομων συμπλόκων στα οποία ο πυρήνας του μετάλλου έχει σταθεροποιηθεί στην επιθυμητή οξειδωτική βαθμίδα (I) από τρία καρβονύλια και τρεις ευκίνητους υποκαταστάτες (Βγια το ρήνιο και H_2O για το τεχνήτιο 99m). 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 τα ευκίνητα.

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 αντικαταθιστούν και τα τρία μόρια νερού, ενώ διδραστικοί είναι οι υποκαταστάτες εκείνοι που έχουν ως δότες ηλεκτρονία δύο άτομα με αποτέλεσμα να παραμένει στο σύμπλοκο ένα μόριο νερού. Αντίστοιχα μονοδραστικοί είναι οι υποκαταστάτες οι οποίοι έχουν ως δότες ηλεκτρονίων ένα άτομο. Χρησιμοποιώντας συνδυασμούς υποκαταστατών, μπορούν να προκύψουν ένα πλήθος πιθανών συμπλόκων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες.



V. Κιναζολίνες

Οργανική ένωση με συντακτικό τύπο $C_8H_6N_2$. Είναι ένας αρωματικός ετεροκυκλικός με δικυκλική δομή αποτελούμενη από δύο συντηγμένους εξαμελείς αρωματικούς δακτυλίους, έναν δακτύλιο βενζολίου και έναν δακτύλιο πυριμιδίνης. Είναι ένα ανοικτό κίτρινο κρυσταλλικό στερεό που είναι διαλυτό στο νερό. Η κιναζολίνη έλαβε το όνομά της ως ένα παράγωγο της κινολίνης, ενώ είναι γνωστή και ως 1,3-διαζαναφθαλένιο. Αν και το μητρικό μόριο κιναζολίνης αναφέρεται σπάνια από μόνο του στην τεχνική βιβλιογραφία, τα υποκατεστημένα παράγωγα έχουν συντεθεί για ιατρικούς λόγους όπως αντικαρκινικοί παράγοντες. Η κιναζολίνη είναι ένα επίπεδο μόριο. Είναι ισομερές με τα άλλα διαζαναφθαλένια της υπομονάδας βενζοδιαζίνης: κινολίνη, κινόξαλίνη και φθαλαζίνη.



Σχηματική απεικόνιση του μορίου της κιναζολίνης

Παράγωγα των κιναζολινών και ιδιαίτερα τα ανιλίνο- παρουσιάζουν έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς έχουν μελετηθεί ως αντιστρεπτοί και μη αντιστρεπτοί αναστολείς των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor/EGFR). Η μελέτη του συγκεκριμένου υποδοχέα γίνεται διότι αποτελεί ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη αντικαρκινικών ενώσεων καθώς έχει βρεθεί πως η υπερέκφραση αυτού συνδέεται με την έναρξη, την εξέλιξη και την μετάσταση διαφόρων τύπων ανθρώπινου καρκίνου. Συγκεκριμένα, υπερεκφράζεται σε όγκους της κεφαλής και του τραχήλου αλλά και σε καρκίνους των νεφρών, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, του μαστού, του προστάτη, των ωοθηκών, του προστάτη, της κύστης, του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, γλοιοβλαστώματος, ενώ έχει παρατηρηθεί και σε διάφορους καρκίνους του επιθηλίου.

Έχουν αναφερθεί διάφορες φαρμακευτικές ουσίες- αναστολείς του EGFR από τις οποίες τα παράγωγα της 4-ανιλίνο-κιναζολίνης εμφανίζουν την πιο ισχυρή και εκλεκτική δράση. Τα παράγωγα αυτά έχουν επιστημανθεί ως διαγνωστικά με F-18, C-11 και I-124 για PET απεικόνιση (Positron Emission Tomography). Το ^{99m}Tc , το οποίο αποτελεί ραδιονουκλίδιο επιλογής για SPECT απεικόνιση (Single Photon Emission Computed Tomography), με τις άριστες φυσικοχημικές ιδιότητες και με το



μικρό κόστος παρασκευής συγκρινόμενο με τα ραδιονουκλίδια για PET, δικαιολογεί την ανάγκη για αναζήτηση ραδιοεπισημασμένων ^{99m}Tc - κιναζολίνες παραγώγων.

Τα τελευταία χρόνια μελετάται η οξειδωτική βαθμίδα I, μέσω του πυρήνα $\text{fac-}[\text{M}(\text{CO})_3]^+$, ($\text{M}=\text{Re}$ ή ^{99m}Tc). Η πρόδρομη ένωση $\text{fac-}[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης λιπόφιλων και σταθερών συμπλόκων. Τα τρία μόρια νερού μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν με κατάλληλα μόρια δότες είτε ενός τριδραστικού υποκαταστάτη είτε με συνδυασμό ενός διδραστικού και ενός μονοδραστικού υποκαταστάτη σχηματίζοντας τα μικτά [2+1] σύμπλοκα.

Στην μικτή [2+1] προσέγγιση τα 3 ευκίνητα μόρια νερού του $\text{fac-}[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ $\text{M}=\text{Re}$, ^{99m}Tc αντικαθίσταται από συνδυασμό ενός διδραστικού (AB) και ενός μονοδραστικού υποκαταστάτη. Το υποκατεστημένο ισοκυανίδιο φέρει τμήμα της ανίλινο-κιναζολίνης.⁽⁴⁵⁾

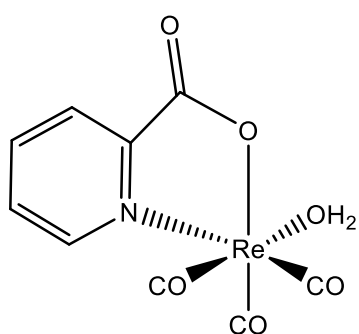
Έως σήμερα η μοναδική μελέτη στη διεθνή βιβλιογραφία για ανίλο-κιναζολικά παράγωγα του τεχνητίου ως διαγνωστικούς βιοδείκτες του EGFR, είναι δύο δημοσιεύσεις του εργαστηρίου ραδιοφαρμακευτικής του Δημοκρίτου⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾. Σε αυτές τις δημοσιεύσεις συντέθηκαν νέα μικτά σύμπλοκα του Re και ^{99m}Tc του πυρήνα $\text{fac-}[\text{M}(\text{CO})_3]^+$, και αποδείχτηκε πειραματικά ότι τα μεταλλικά αυτά σύμπλοκα διαθέτουν την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες των A431, αναστέλλοντας σημαντικά την αυτοφωσφορυλίωση και την ανάπτυξη τους, παρά την παρουσία του μεταλλικού πυρήνα.



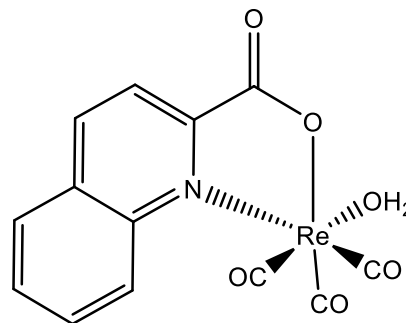
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων ουδέτερων συμπλόκων του ρηνίου ($^{185/187}\text{Re}$) και του τεχνητίου ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), τα οποία φέρουν τον οργανομεταλλικό πυρήνα $fac\text{-}[\text{M}(\text{CO})_3]^+$, όπου $\text{M} = ^{185/187}\text{Re}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, με μονοδραστικό υποκαταστάτη ένα παράγωγο της κιναζολίνης το οποίο φέρει ένα ισονιτρίλιο στο έκτο άτομο του άνθρακά της (φαρμακοφόρο) και με διδραστικούς υποκαταστάτες το πικολινικό οξύ και το κιναλδικό οξύ. Επιπλέον τα σύμπλοκα αυτά θα εξεταστούν σε επίπεδο τεχνητίου ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) ως προς την σταθερότητά τους στην πάροδο του χρόνου παρουσία ισχυρών ανταγωνιστών όπως είναι τα αμινοξέα κυστεΐνη και ιστιδίνη.

Για τη σύνθεση των τελικών συμπλόκων της εργασίας, αρχικά θα συντεθούν τα ενδιάμεσα σύμπλοκα δηλαδή θα γίνει πρόσδεση του πικολινικού οξέος στο πρόδρομο σύμπλοκο του ρηνίου στην οξειδωτική βαθμίδα I και θα επαναληφθεί αντίστοιχα η ίδια συνθετική διαδικασία με το κιναλδικό οξύ.



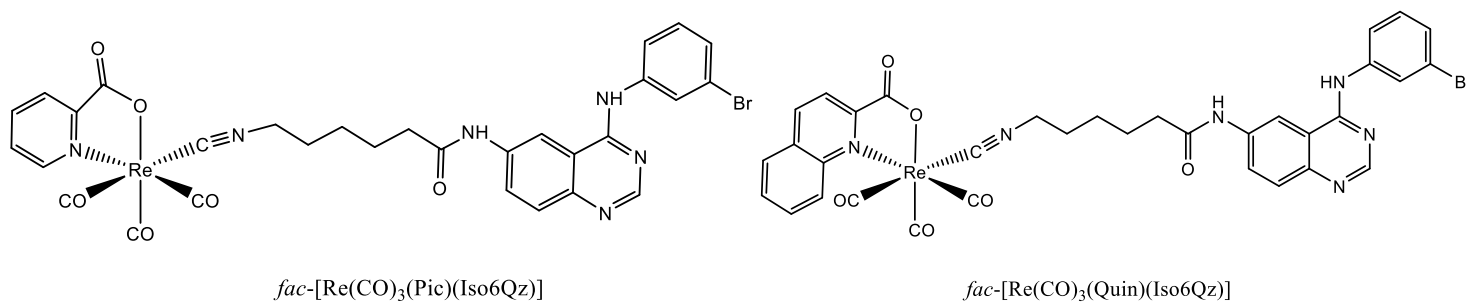
$fac\text{-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Pic})(\text{H}_2\text{O})]$



$fac\text{-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Quin})(\text{H}_2\text{O})]$

Απεικόνιση των ενδιάμεσων συμπλόκων ρηνίου.

Στην συνέχεια τα ενδιάμεσα αυτά σύμπλοκα αναμένεται να λειτουργήσουν ως υποστρώματα στα οποία θα προσδεθεί το φαρμακοφόρο ως μονοδραστικός υποκαταστάτης στην θέση του νερού.



Απεικόνιση των μεικτών συμπλόκων [2+1] ρηνίου

Σε επίπεδο τεχνητίου- 99m θα παρασκευαστούν τα σύμπλοκα με την χρήση του πρόδρομου μορίου $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. Η ταυτοποίηση των συμπλόκων θα ταυτοποιηθεί με συγκριτική χρωματογραφία HPLC με τα ανάλογα χαρακτηρισμένα σύμπλοκα του ρηνίου. Σε όλα τα σύμπλοκα θα πραγματοποιηθούν μελέτες σταθερότητας με ισχυρούς ανταγωνιστές όπως είναι τα αμινοξέα κυστεΐνη και ιστιδίνη.



VI. Υλικά και όργανα

Οι συσκευές και τα αναλυτικά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν εξοπλισμό των Εργαστηρίων Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».

Οι μετρήσεις του pH των διαλυμάτων έγιναν με pH μετρικό χαρτί.

Ο ζυγός που χρησιμοποιήθηκε που χρησιμοποιήθηκε ήταν αναλυτικός ζυγός τύπου KERN 770 τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ($d 0.1\text{mg}$).

Τα φάσματα υπερύθρου ελήφθησαν με φασματογράφο τύπου FT-IR-Nicolet 6700 στην περιοχή $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ ελήφθησαν με φασματόμετρο τύπου 500 MHzDRX – Avance της εταιρείας Bruker στο Εργαστήριο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Τα φάσματα ελήφθησαν σε διάλυμα δευτεριωμένου διμεθυλοσουλφοξειδίου ($\text{DMSO-}d_6$) σε θερμοκρασία 25°C . Οι χημικές μετατοπίσεις (δ , ppm) υπολογίστηκαν με τη χρήση τετραμεθυλοσιλανίου (TMS), ως εσωτερικού προτύπου.

Η συσκευή παρασκευής υπερκάθαρου νερού που χρησιμοποιήθηκε ήταν διπλής όσμωσης της εταιρείας TEMAK.

Τα στερεά προϊόντα που παρασκευάστηκαν ξηράθηκαν όταν απαιτήθηκε, σε ξηραντήρα κενού παρουσία P_2O_5 .

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση, την ταυτοποίηση και την απομόνωση των συμπλόκων του τεχνητίου αποτελείται από:

- Αντλία τύπου 600 Waters
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος (loop) των $500\ \mu\text{L}$
- Αναλυτική στήλη αντίστροφης φάσης τύπου Nucleosil 100-C18 ec διαστάσεων $4,6\text{mm} \times 250\text{mm}$ και μεγέθους $10\ \mu\text{m}$.
 - Ανιχνευτή UV, με την δυνατότητα ταυτόχρονης καταγραφής φασμάτων σε 2 διαφορετικά μήκη κύματος (220 και $254\ \text{nm}$) DualAbsorbanceDetector τύπος 2487 της εταιρείας Waters
 - Ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος ελέγχει τη λειτουργία της αντλίας, του ανιχνευτή, συλλέγει και επεξεργάζεται τα δεδομένα
 - Ανιχνευτή ακτινοβολίας γ -GABI-Raytest

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με σύστημα διαλυτών, την κινητή φάση Α μεθανόλη / $0,1\%$ τριφθορικό οξύ (TFA) και την κινητή φάση Β H_2O / $0,1\%$ TFA. Οι διαλύτες έκλουσης είχαν υποστεί απαέρωση με διαβίβαση ηλίου υψηλής καθαρότητας. Για την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα του χρωματογράφου χρησιμοποιείται σύριγγα των $100\ \mu\text{L}$. Η ροή των διαλυμάτων έκλουσης στη χρωματογραφική στήλη ρυθμίζεται σε $1\text{mL}/\text{min}$. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα μίγματος διαλυτών κλιμακωτά μεταβαλλόμενης σύστασης (gradient) όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί :



#	Χρόνος (min)	Ροή (ml)	%A	%B
1	0,00	1,00	5,0	95,0
2	1,00	1,00	5,0	95,0
3	5,00	1,00	70,0	30,0
4	8,00	1,00	85,0	15,0
5	20,00	1,00	85,0	15,0
6	22,00	1,00	90,0	10,0
7	26,00	1,00	90,0	10,0
8	27,00	1,00	95,0	5,0
9	35,00	1,00	95,0	5,0
10	37,00	1,00	5,0	95,0

Πίνακας με το gradient που χρησιμοποιήθηκε

Η ραδιενέργεια των διαλυμάτων μετρήθηκε με μετρητή ακτινοβολίας ραδιοϊσοτόπων (isotopeCalibrator) της εταιρείας Capitec.

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η προμήθεια τους έγινε από τις εταιρείες Fluka, Aldrich, Sigma, Riedel-de-Haen, Ferak, Jannsen, Acros και Merck.

Τα αέρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας μονοξείδιο του άνθρακα, ήλιο και άζωτο, από την εταιρεία AirLiquidHellas.

Το διάλυμα $\text{Na}[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$ σε φυσιολογικό ορό προήλθε από γεννήτριες $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$ (6.45 GBq) της εταιρείας MallinkrodtMedicalB.V.. Οι εκλούσεις της γεννήτριας ελάμβαναν χώρα κάθε 24 ώρες περίπου.

Ο υποκαταστάτης της κιναιζολίνης με το ισονιτρίλιο στο έκτο άτομο άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσης πτυχιακής εργασίας, έχει παρασκευαστεί στο εργαστήριο Ραδιοφαρμακευτικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος.

Οι λοιπές πρώτες ύλες παρασκευάστηκαν και ταυτοποιήθηκαν είτε με μεθόδους της βιβλιογραφίας είτε με μεθόδους που περιγράφονται στη συνέχεια.



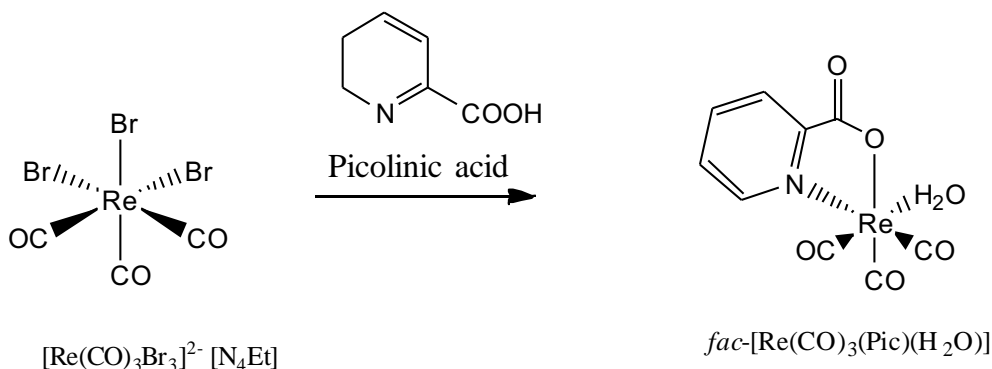
VII. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



VII(α). Σύνθεση υποκαταστατών

- (a) Σύνθεση μεικτού συμπλόκουπικολινικού οξέος με την πρόδρομη ένωση του ρηνίου

Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης



Σε δύο φιαλίδια ζυγίζονται και μεταφέρονται ξεχωριστά 24,6mg πικολινικού οξέος και 154 mg πρόδρομης ένωσης του ρηνίου. Γίνεται θέρμανση των ανωτέρω στον ελάχιστο δυνατό όγκο νερού έως ότου διαλυτοποιηθούν πλήρως. Ακολουθεί ανάμειξη των δύο φιαλιδίων σε σφαιρική φιάλη. Για την αποφυγή δημιουργίας παραπροϊόντων, εισήχθη πρώτα η διαλυτοποιημένη πρόδρομη ένωση και στην συνέχεια το διάλυμα του υποκαταστάτη (πικολινικό οξύ). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θέρμανση υπό επαναροή (reflux) για 4 ώρες στους 70°C με την χρήση ελαιόλουτρου υπό συνεχή ανάδευση. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης ήταν ένα κίτρινο ίζημα το οποίο το διηθούμε υπό κενό.

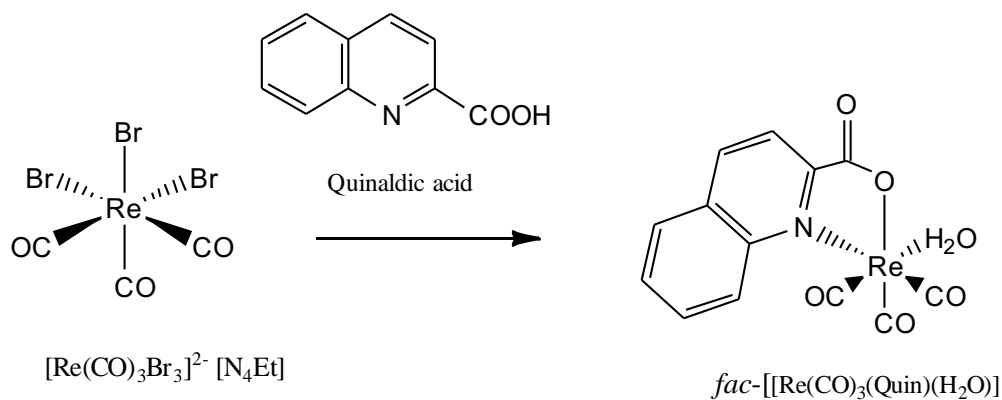
Ακολουθούν διαδοχικές πλήσεις με νερό ώστε τα αρχικά αντιδραστήρια οποία είναι ευδιάλυτα στο νερό (πικολινικό οξύ και [Re(CO)₃Br₃]²⁻ [N₄Et]⁺) να απομακρυνθούν.

Από την αντίδραση που περιγράφηκε σχηματίστηκε προϊόν βάρους 36,5 mg (απόδοση 44,4%). Το προϊόν της αντίδρασης αποθηκεύτηκε στον ξηραντήρα.



- (b) Σύνθεση του μεικτού συμπλόκου Κιναλδικό οξύ με πρόδρομη ένωση του ρηνίου

Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης



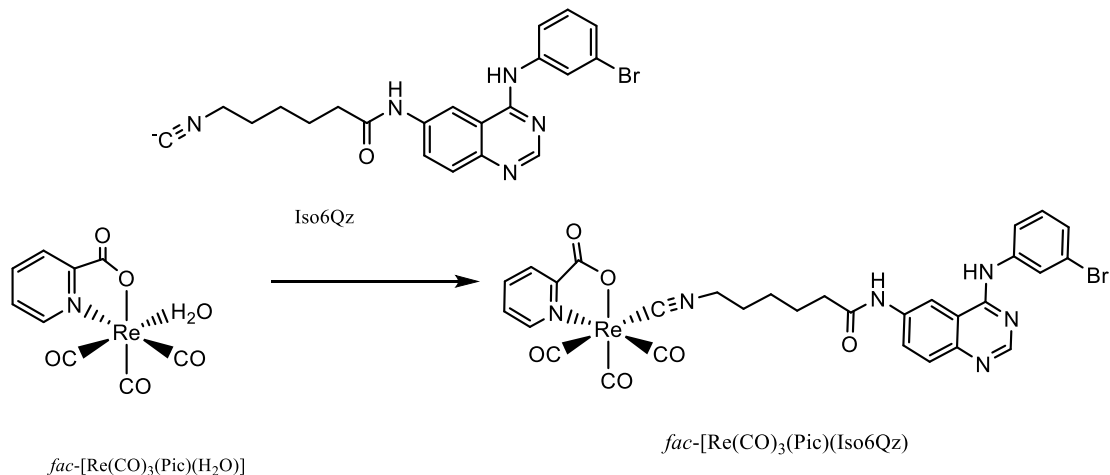
Σε δύο φιαλίδια ζυγίζονται και μεταφέρονται ξεχωριστά 17,3mg κιναλδικού οξέος στο ένα και 77 mg πρόδρομης ένωσης ρηνίου στο άλλο. Ακολουθήθηκε μια ανάλογη πειραματική διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε για το αντίστοιχο σύμπλοκο του πικολινικού οξέος.

Από την αντίδραση σχηματίστηκε προϊόν βάρους 42,2mg (απόδοση 91,65%). Το προϊόν της αντίδρασης αποθηκεύθηκε στον ξηραντήρα.



VII(β). Σύνθεση μεικτού συμπλόκου [2+1] ρήνιο πικολινικό κιναζολινικό

Σχηματική απεικόνιση όλης της αντίδρασης

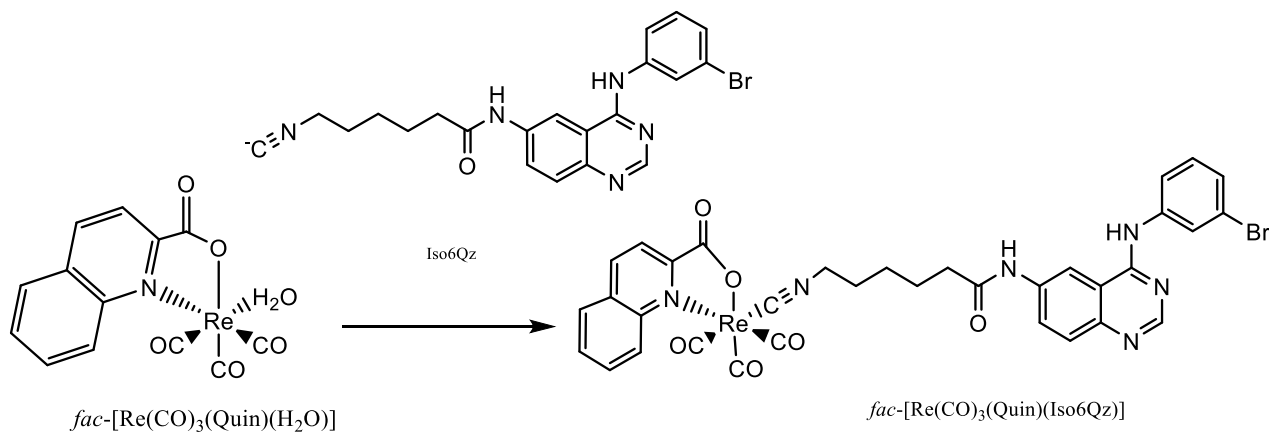


Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 20,5mg $fac-[Re(CO)_3(Pic)(H_2O)]$ και 21,9mg συμπλόκου ισονιτριλίου- κιναζολίνης (Iso6Qz). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (MeOH) και διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) στον ελάχιστο δυνατό όγκο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση για όλο το βράδυ. Το προϊόν της αντίδρασης ελέγχθηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης όπως περιγράφεται σε επόμενες ενότητες.



VII(γ). Σύνθεση μεικτού συμπλόκου [2+1] ρήνιο κιναλδικό κιναζολινικό

Σχηματική απεικόνιση όλης της αντίδρασης



Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 24 mg συμπλόκου κιναλδικού οξέος – ρηνίου και 22,9 mg συμπλόκου ισονιτριλίου-κιναζολίνης. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (MeOH) και διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl) στον ελάχιστο δυνατό όγκο. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση για όλο το βράδυ. Το προϊόν της αντίδρασης ελέγχθηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης όπως περιγράφεται σε επόμενες ενότητες.



VII(γ). Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

(α). Αξιολόγηση μεικτού συμπλόκου [2+1] ρήνιο πικολινικό κιναζολινικό

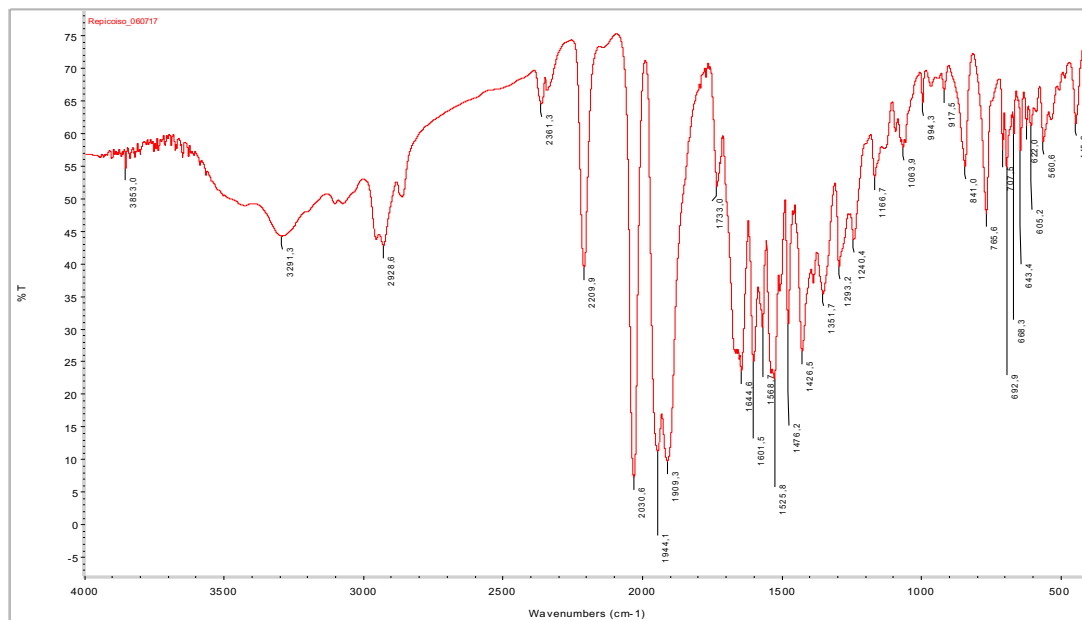
Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων της αντίδρασης ακολούθησε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (thin layer chromatography - TLC). Δοκιμάστηκαν αρκετά συστήματα διαλυτών προκειμένου να είναι διακριτό το προϊόν και να ακολουθήσει η χρωματογραφία στήλης για καθαρισμό. Το σύστημα το οποίο βρέθηκε να είναι πιο κατάλληλο αποτελούταν από 85% οξικόαιθυλεστέρα και 15% μεθανόλη.

Σημειώνεται ότι η στήλη αρχικά εκλούεται με τον πιο άπολο διαλύτη (οξικό αιθυλεστέρα) και στη συνέχεια αυξάνεται βαθμιαία η πολικότητα με τον πιο πολικό διαλύτη (μεθανόλη). Από την επεξεργασία αυτή συλλέχθηκε καθαρό προϊόν βάρους 16,4 mg καθώς τα παραπροϊόντα ξεκίνησαν να εκλύονται νωρίς. Ο έλεγχος των κλασμάτων της στήλης γινόταν με συνεχή εφαρμογή TLC.

Ακολούθως έγινε αξιολόγηση του προϊόντος με φασματοσκοπία NMR και IR.

IR (cm^{-1}): 2209 (N≡C), 2030 (CO), 1944 (CO), 1909 (CO), 1733 (COO), 1644 (NHCO).

^1H NMR (DMSO- d_6 , ppm): 10.22 (1H, s, NHCO), 9.89 (1H, s, NH), 8.85-7.29 (12H, aromatic), 3.82 (2H, t, CH_2), 2.32 (2H, t, CH_2), 1.56-1.52 (4H, m, CH_2), 1.19-1.16 (2H, t, CH_2).



Ενδεικτική απεικόνιση φάσματος IR του μεικτού συμπλόκου [2+1] πικολινικού οξέος



(b). Αξιολόγηση μεικτού συμπλόκου [2+1] ρήνιο κιναλδικό κιναζολινικό

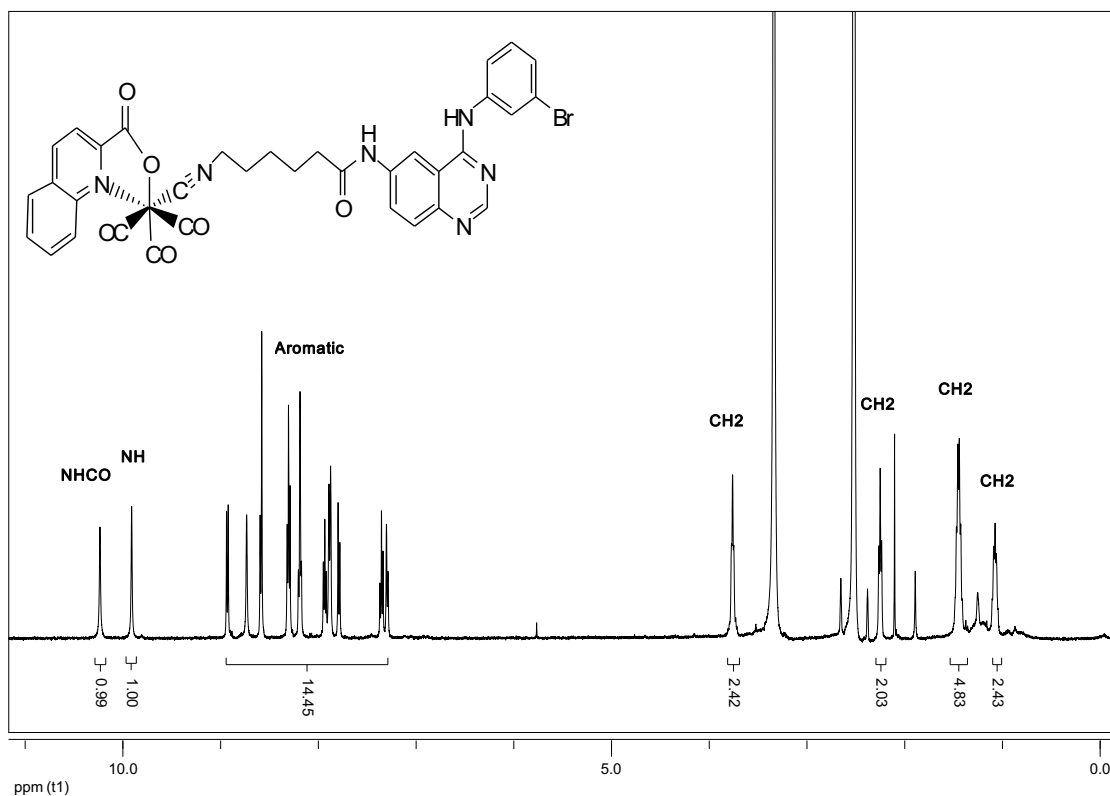
Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων της αντίδρασης ακολούθησε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (thin layer chromatography - TLC). Δοκιμάστηκαν αρκετά συστήματα διαλυτών προκειμένου να είναι διακριτό το προϊόν και να ακολουθήσει η χρωματογραφία στήλης για καθαρισμό. Το σύστημα το οποίο βρέθηκε να είναι πιο κατάλληλο αποτελούταν από 80% οξικό αιθυλεστέρα και 20% μεθανόλη.

Όπως προηγουμένως, η στήλη αρχικά εκλούεται με τον πιο άπολο διαλύτη (οξικό αιθυλεστέρα) και στη συνέχεια αυξάνεται βαθμιαία η πολικότητα με τον πιο πολικό διαλύτη (μεθανόλη). Από την επεξεργασία αυτή συλλέχθηκε καθαρό προϊόν βάρους 10 mg καθώς τα παραπροϊόντα ξεκίνησαν να εκλύονται νωρίς. Ο έλεγχος των κλασμάτων της στήλης γινόταν με συνεχή εφαρμογή TLC.

Ακολούθως έγινε αξιολόγηση του προϊόντος με φασματοσκοπία NMR και IR.

IR (cm⁻¹): 2208 (N≡C), 2030 (CO), 1944 (CO), 1905 (CO), 1733 (COO), 1652 (NHCO).

¹HNMR (DMSO-d₆, ppm): 10.23 (1H, s, NHCO), 9.91 (1H, s, NH), 8.93-7.28 (14H, aromatic), 3.75 (2H, t, CH₂), 2.23 (2H, t, CH₂), 1.45-1.40 (4H, m, CH₂), 1.09-1.02 (2H, m, CH₂).



Ενδεικτική απεικόνιση φάσματος NMR του μεικτού συμπλόκου [2+1] [Re(CO)₃QuinIso6Qz]



VII(δ). ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

Παρασκευή του πρόδρομου συμπλόκου τεχνητίου

Σε πρώτο στάδιο έγινε έκλυση της γεννήτριας προκειμένου να ληφθούν υπερτεχνητικά $[\text{TcO}_4^-]$. Χρησιμοποιώντας αυτά θα ακολουθήσει η παρασκευή του πρόδρομου συμπλόκου Tc. Για την παρασκευή του πικέρσορα Tc, μεταφέρθηκαν σε ένα φιαλίδιο 4,4 mg Na_2CO_3 το οποίο συμβάλλει στην επίτευξη της τιμής του pH 14, 7-8 mg NaBH_4 , το οποίο λειτουργεί ως αναγωγικό και τέλος 20mg τρυγικο-NaK, το οποίο έχει τον ρόλο του σταθεροποιητή, δηλαδή σταθεροποιεί τα υπερτεχνητικά σε βασικό περιβάλλον. Το φιαλίδιο σφραγίστηκε και ακολούθησε χορήγηση μονοξειδίου του άνθρακα προκειμένου να επιτευχθεί η παροχή καρβονυλίων αλλά και για την σταθεροποίηση του τεχνητίου στην οξειδωτική βαθμίδα I. Η χορήγηση μονοξειδίου του άνθρακα έγινε για 10 λεπτά υπό 1 barr.

Με το πέρας των 10 λεπτών εισήχθη στο φιαλίδιο με σύριγγα 1ml υπερτεχνητικών. Ακολούθησε βρασμός στους 90°C για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο. Στη συνέχεια το φιαλίδιο ξεσφραγίστηκε και ρυθμίστηκε η τιμή του pH στο 7 ώστε να σταθεροποιηθεί ο πικέρσορας.

Το πρόδρομο σύμπλοκο του τεχνητίου στην οξειδωτική βαθμίδα I που συντέθηκε χρησιμοποιείται για την εκτέλεση των πειραμάτων που θα περιγραφούν στη συνέχεια.



(α) Παρασκευή επισημασμένου μεικτού συμπλόκου [2+1] τεχνητίο πικολικό
κιναζολινικό

Σε φιαλίδιο ζυγίστηκε ποσότητα πικολινικού οξέος 1,2mg. Προστέθηκαν 400μl μεθανόλης. Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε σε δοχείο κατασκευασμένο από μολύβι για την αποφυγή έκθεσης σε ραδιενεργή ακτινοβολία. Ακολούθως, στο φιαλίδιο προστέθηκαν 200μl πρόδρομοι συμπλόκου του τεχνητίου και σφραγίστηκε. Για την επίτευξη αδρανών συνθηκών έγινε χορήγηση αζώτου για ένα λεπτό περίπου. Το φιαλίδιο οδηγήθηκε σε βρασμό για 30 λεπτά στους 70°C με τη χρήση υδατόλουτρου.

Με το πέρας των 30 λεπτών το φιαλίδιο αφέθηκε να κρυώσει και ακολούθησε εκτόνωση και αποσφράγιση. Το προϊόν της αντίδρασης εγχύθηκε στην HPLC προκειμένου να διαπιστωθεί ο σχηματισμός του ενδιάμεσου συμπλόκου.

Στη συνέχεια έγινε εισαγωγή 100μl του ισονιτριλίου της κιναζολίνης (1mg ισονιτριλίου/ ml MeOH) διαλυμένο σε μεθανόλη. Ο τελικός όγκος μέσα στο φιαλίδιο ήταν 1ml καθώς προστέθηκαν ακόμη 300μl MeOH. Το φιαλίδιο το οποίο τοποθετήθηκε σε δοχείο κατασκευασμένο από μολύβι οδηγήθηκε στον κλίβανο και αφέθηκε εκεί για 30 λεπτά στους 70°C. Στην συνέχεια ακολούθησε ένεση δείγματος στην HPLC για την αξιολόγηση της αντίδρασης.



(β) Παρασκευή επισημασμένου μεικτού συμπλόκου [2+1] τεχνητίο κιναλδικό
κιναζολινικό

Σε φιαλίδιο ζυγίστηκε ποσότητα κιναλδικού οξέος 1,7mg. Προστέθηκαν 400μl μεθανόλης. Ακολουθήθηκε μια ανάλογη πειραματική πορεία με αυτή του πικολινικού οξέος.

Με το πέρας των 30 λεπτών το φιαλίδιο αφέθηκε να κρυώσει και ακολούθησε εκτόνωση και αποσφράγιση. Το προϊόν της αντίδρασης οδηγήθηκε στην HPLC να διαπιστωθεί ο σχηματισμός του ενδιάμεσου συμπλόκου.

Στη συνέχεια έγινε εισαγωγή του ισονιτριλίου της κιναζολίνης με ανάλογες ποσότητες και την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.

Τα αποτελέσματα από τις επισημάνσεις με το τεχνητίο αξιολογήθηκαν περαιτέρω για την σταθερότητά τους στο πέρας του χρόνου, όπως περιγράφεται ακολούθως.



VII(ε). ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΣΩ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

(i) Μεικτού συμπλόκου [2+1] τεχνήτιο πικολινικό κιναζολινικό

Προκειμένου να αξιολογηθεί το σύμπλοκο ως προς την σταθερότητα αρχικά έγινε απομόνωση του συμπλόκου του τεχνητίου με το πικολινικό οξύ και το φαρμακοφόρο γνωρίζοντας από την ένεση στην HPLC που είχε προηγηθεί πως το σύμπλοκο εκλύεται από τα 12,8 λεπτά έως τα 13,5 λεπτά, χρονικό διάστημα στο οποίο έγινε και η συλλογή αυτού.

Για την αξιολόγηση της σταθερότητας χρησιμοποιήθηκαν τα αμινοξέα κυστεΐνη και ιστιδίνη καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία τα δύο αυτά αμινοξέα είναι πιο πιθανό να συναντηθούν μέσα στον οργανισμό και να παρεμποδίσουν το σύμπλοκο στην λειτουργία του, καθώς αποτελούν ισχυρούς ανταγωνιστές.

Σε δύο φιαλίδια ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν ξεχωριστά 1,5mg ιστιδίνης και 1,2mg κυστεΐνης. Αυτά διαλυτοποιούνται πλήρως σε 1ml απιονισμένου νερού.

Εν συνεχεία, από το σύμπλοκο που απομονώθηκε από την HPLC μεταφέρθηκαν από 100μl σε κάθε φιαλίδιο. Ακολούθησε προσθήκη στο ένα φιαλίδιο 100μl από το διάλυμα του αμινοξέος ιστιδίνης και στο άλλο φιαλίδιο 100 μl από το διάλυμα του αμινοξέος κυστεΐνης. Προκειμένου ο όγκος των δύο φιαλιδίων να είναι 1ml συμπληρώθηκαν με 800μl φυσιολογικού ορού έκαστος ώστε η τελική συγκέντρωση των αμινοξέων να είναι 10^{-3} , συγκέντρωση η οποία προσομοιάζει την συγκέντρωση στον ανθρώπινο οργανισμό.

Τα δύο αυτά φιαλίδια αφού τοποθετήθηκαν σε δοχεία από μολύβι οδηγήθηκαν στον κλίβανο στους 37°C από όπου λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα.



(ii) *Μεικτού συμπλόκου [2+1] τεχνητίο κινάλδικο κιναζολινικό*

Προκειμένου να αξιολογηθεί το σύμπλοκο ως προς την σταθερότητα αρχικά έγινε απομόνωση του συμπλόκου του τεχνητίου με το κινάλδικο οξύ και το φαρμακοφόρο γνωρίζοντας από την ένεση στην HPLC που είχε προηγηθεί πως το σύμπλοκο εκκλύεται από τα 16,5 λεπτά έως τα 17,4 λεπτά, χρονικό διάστημα στο οποίο έγινε και η συλλογή αυτού.

Για την αξιολόγηση της σταθερότητας χρησιμοποιήθηκαν τα αμινοξέα κυστεΐνη και ιστιδίνη με ανάλογες ποσότητες και την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως.

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται όλα τα σύμπλοκα σε αντιστοίχιση με το ποσοστό σταθερότητάς τους.

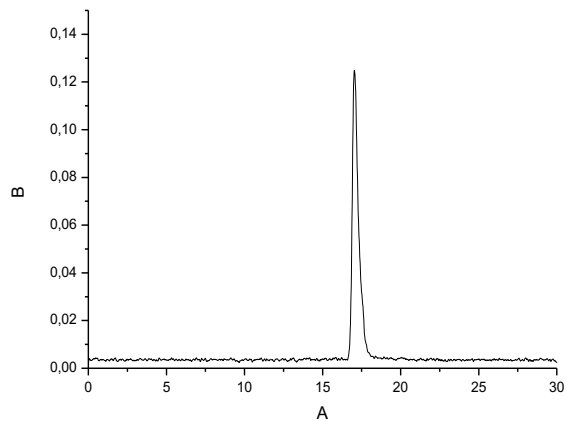
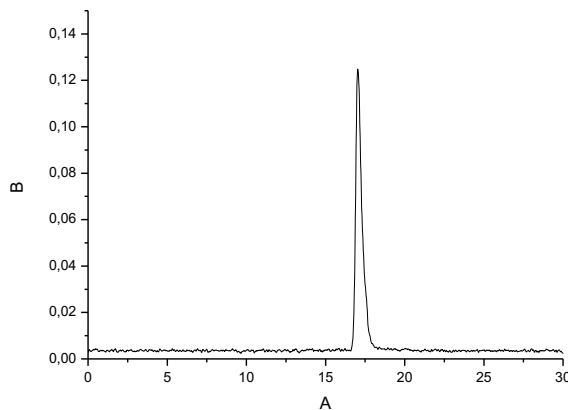
Περίσσεια Ιστιδίνης (1 ώρα) 99%	Περίσσεια Κυστεΐνης (1 ώρα) 98%
$fac-[^{99m}Tc(CO)_3(Pic)(Iso6Qz)]$	
Περίσσεια Ιστιδίνης (18 ώρες) 97%	Περίσσεια Κυστεΐνης (18 ώρες) 98%



Περίσσεια Ιστιδίνης (1 ώρα) 97%	Περίσσεια Κυστεΐνης (1 ώρα) 98%
$fac-[^{99m}Tc(CO)_3(Quin)(Iso6Qz)]$	
Περίσσεια Ιστιδίνης (18 ώρες) 97%	Περίσσεια Κυστεΐνης (18 ώρες) 97%

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει το συμπέρασμα πως τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν, παρουσία ισχυρών ανταγωνιστών (κυστεΐνη και ιστιδίνη) ήταν σταθερά στον χρόνο. Έτσι δίνεται η δυνατότητα για περισσότερη μελέτη των συμπλόκων αυτών όσο αναφορά την δράση και την λειτουργία τους.

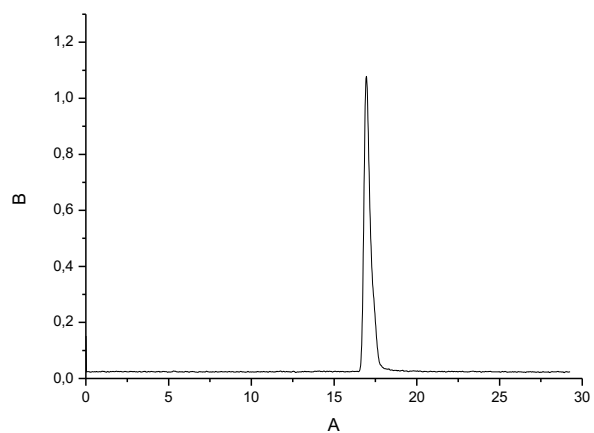
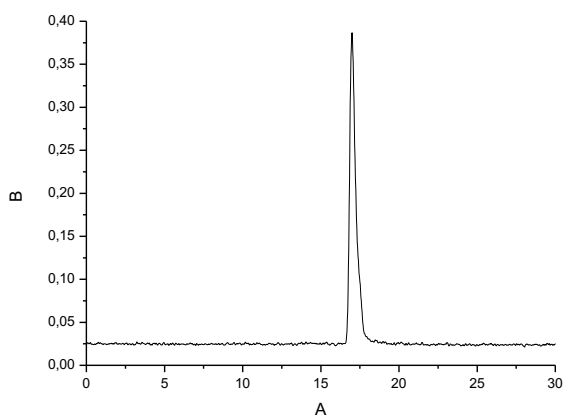
Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα γραφήματα από το μεικτό σύμπλοκο του κιναιδικού οξέος με το φαρμακοφόρο παρουσία ανταγωνιστών έπειτα από μία ώρα και έπειτα από δεκαοχτώ ώρες.





*Απεικόνιση γραφήματος από την HPLC του μεικτού συμπλόκου fac-
[^{99m}Tc(CO)₃(Quin)(Iso6Qz)] παρουσία ιστιδίνης έπειτα από μία ώρα (δεξιά) και έπειτα
από δεκαοχτώ ώρες (αριστερά).*

Σημειώνεται ότι ο άξονας B αφορά την κλίμακα της ραδιενέργειας όπως την ποσοτικοποιεί το μηχάνημα σε mV ενώ ο άξονας A αφορά τον χρόνο σε λεπτά της ώρας.

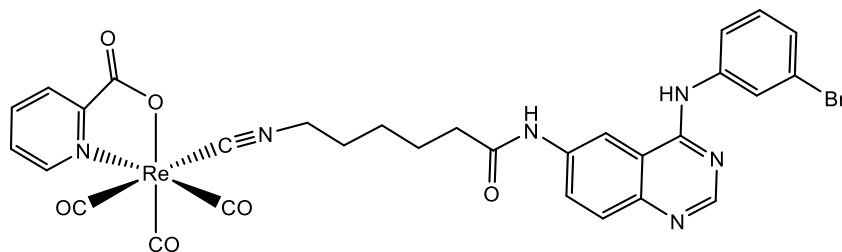


*Απεικόνιση γραφήματος από την HPLC του μεικτού συμπλόκου fac-
[^{99m}Tc(CO)₃(Quin)(Iso6Qz)] παρουσία κυστεΐνης έπειτα από μία ώρα (δεξιά) και έπειτα
από δεκαοχτώ ώρες (αριστερά).*

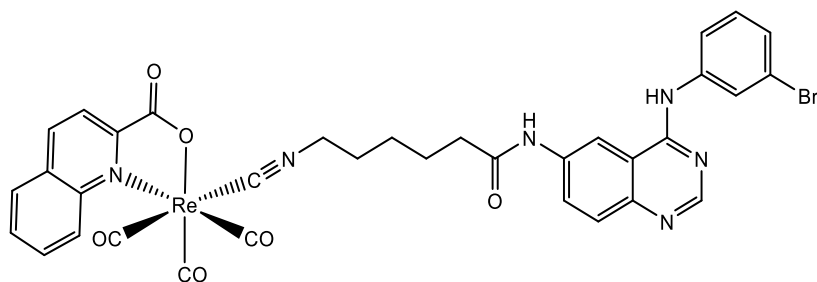


VIII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν νέα μεικτά σύμπλοκα του ρηθινικού οξέος και του κιναλδικού οξέος με μόριο κιναζολίνης ως φαρμακοφόρο το οποίο φέρει στο έκτο άτομο του άνθρακά του ισονιτρίλιο.



fac-[Re(CO)₃PicIso6Qz]



fac-[Re(CO)₃QuinIso6Qz]

Τα σύμπλοκα που απεικονίζονται ανωτέρω, συντέθηκαν τόσο σε επίπεδο ρηθίνου στην οξειδωτική βαθμίδα (I) όσο και σε επίπεδο τεχνητίου. Παρά το γεγονός ότι σε επίπεδο ρηθίνου, το μεικτό σύμπλοκο [2+1] ρηθινικό έδωσε προϊόν σε χαμηλή απόδοση, σε επίπεδο τεχνητίου παρουσίασε σταθερότητα έως και 6 ώρες παρουσία ισχυρών ανταγωνιστών όπως η ιστιδίνη και η κυστεΐνη. Το μεικτό σύμπλοκο [2+1] κιναλδικό σε επίπεδο ρηθίνου έδωσε προϊόν σε υψηλότερη απόδοση και επιπλέον σε επίπεδο τεχνητίου παρουσίασε σταθερότητα έως και 18 ώρες παρουσία ισχυρών ανταγωνιστών. Αξίζει να σημειωθεί πως ενδέχεται το μήκος της αλυσίδας του ισονιτρίλιου (n=6) να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς ορίζει την απόσταση ανάμεσα στο φαρμακοφόρο και στο μέταλλο, ως προς τη σταθερότητα τους.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ήταν σταθερά στην πάροδο του χρόνου, γεγονός που υποδηλώνει πως θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως ικανά θεραπευτικά ή διαγνωστικά μόρια. Επιπλέον με βάση τις μέχρι τώρα μελέτες του εργαστηρίου θεωρείται πιθανό τα σύμπλοκα αυτά να μπορούσαν να συνδεθούν εκλεκτικά με τον



υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παραγόντα (EGFR), και να αποτελέσουν ικανούς αναστολείς του παράλογο της παρουσία του μεταλλικού πυρήνα.

Σε μελλοντικές μελέτες τα σύμπλοκα που έχουν συντεθεί θα μελετηθούν ως προς τον τρόπο λειτουργία τους σε βιολογικές κατανομές σε ζώϊκά μοντέλα (*in vivo*), αλλά και σε επίπεδο κυτταρικών σειρών (*in vitro*), προκειμένου να εξεταστεί η λειτουργικότητά τους ως πιθανοί διαγνωστικοί ιχνηθέτες για την απεικόνιση του EGFR.



IX. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Saha GP. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 5thed, Springer- Verlag, New York, 2004
2. Χιωτέλης Ε. *Ραδιοφαρμακευτική Χημεία*. Εκδόσεις Πήγασος 2000, Θεσσαλονίκη, 2004.
3. Anderson CJ, Welch MJ. Radiometal –Labeled Agents (Non- Technetium) for Diagnostic Imaging. *Chem Rev* **1999**, 99(9), 2219-2234.
4. Adelstein SJ, Kassis AI. Radiobiologic implications of the microscopic distribution of energy from radionuclides. *Int J Rad Appl Instr Part B Nucl Med Biol* **1987**, 14(3), 165-169.
5. Hashimoto K, Yoshihara K. Rhenium complexes labeled with ^{186,188}Re for nuclear medicine. *Top current chem* **1996**, 176, 275-291.
6. WA Volkert, TJ Hoffman. Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Chem Rev* **1999**, 99(9), 2269-2292.
7. Herrmann G. Technetium or masurium- a comment on the history of element 43. *Nuclear Physics A* **1989**, 505(2), 52-360.
8. De Jonge FAA, Pawels EKJ. Technetium, the missing element. *Eur J Nucl Med* **1996**, 23(3), 336-344.
9. Παπαδόπουλος Μ, Πιρμεττής Ι, Χιωτέλης Ε. ^{99m}Tc Κύριος ιχνηθέτης της Πυρηνικής Ιατρικής. Χημεία του τεχνητίου (μέρος Α) . Ελληνική Πυρηνική Ιατρική **1998**, 1(1), 26-32.
10. Schwochau K. The present status of Technetium chemistry. *Radiochim Acta* **1983**, 32, 139-152.
11. Tukerian KK. *Handbook of Geochemistry* I. Wedepohl KH (ed), Springer Verlag, Heidelberg, 1969.
12. Riley GH. Isotopic analysis of rhenium from a thermal ionization source. *J Sci Instrum* **1967**, 44(9), 769-774.
13. Peacock RD. *The chemistry of technetium an rhenium*. Elsevier Publishing Company, London 1966.
14. Perrier C, Segre E. Radioactive Isotopes of Element 43. *Nature* **1937**, 140(3535), 193-194.
15. Perrier C, Segre E. Some Chemical Properties of Element 43. *J Chem Phys* **1937**, 5(9), 712-716.
16. Smith EM. Internal Dose Calculation for ^{99m}Tc. *J Nucl Med* **1965**, 6, 231-251.
17. Alberto R. New Organometallic Technetium Complexes for Radiopharmaceutical Imaging. *Top Curr Chem* **2005**, 252, 1-44.
18. Πνευματικάκης Γ. *Μαθήματα χημείας στοιχείων μετάπτωσης*. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΟΕΔΒ, Αθήνα, 1987.
19. Subramanian G., McAfee J.C., “A new complex of ^{99m}Tc for skeletal imaging”, *Radiology*, **1971**, 99(1), 613-621.
20. Wilson GM, Pinkerton TC. Determination of charge and size of technetium diphosphonate complexes by anion- exchange liquid chromatography. *Anal Chem* **1985**, 57(1), 246-253.



21. Pinkerton TC, Heineman WR, Deutsch E. Separation of technetium hydroxyethylidene diphosphonate complexes by anion-exchange high performance liquid chromatography. *Anal Chem* **1980**, 52(7), 1106-1110.
22. Jurisson S, Berning D, Wei J, Dangshe M. Coordination compounds in nuclear medicine. *Chem Rev* **1993**, 93(3), 1137-1156.
23. Ell PJ, Jarritt PH, Cullum I, Hocknell JML, Costa DC, Lui D, Jewkes RF, Steiner TJ, Nowotnik TP, Pickett RD, Neirinckx RD. Regular cerebral blood flow mapping with ^{99m}Tc-labelled compound. *Lancet* **1985**, 2(8445), 50-51.
24. Ell PJ, Hocknell JML, Jarritt PH. A ^{99m}Tc-labelled radiotracer for the investigation of cerebral vascular disease. *Nucl Med Commun* **1985**, 6(8), 427-441.
25. Neirinckx RD, Canning LR, Piper IM, Nowotnik TP, Pickett RD, Holmes RA, Volkert WA, Foster AM, Weisner PS, Marriott JA, Chaplin SB. Technetium-^{99m}d,1-HM-PAO: A new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. *J Nucl Med* **1987**, 28(2), 191-202.
26. Holmes RA, Chaplin SB, Royston KG, Hoffman TJ, Volkert WA, Nowotnik DP, Canning LR, Cumming SA, Harrison RC, Higley B, Nechvatal G, Pickett RD, Piper IM, Neirinckx RD. Cerebral uptake and retention of ^{99m}Tcexamethylpropyleamine oxime (^{99m}Tc-HM-PAO). *Nucl Med Commun* **1985**, 6(8), 443-447.
27. Leonard JP, Nowotnik DP, Neirinckx RD. Technetium-^{99m}-d,1-HM-PAO: A new radiopharmaceutical for imaging regional brain perfusion using SPECT—a comparison with iodine-123 HIPDM. *J Nucl Med* **1986**, 27(12), 1819-1823.
28. Sharp PF, Smith FW, Gemmell HG, Lyall D, Evans NTS, Gvozdanovic D, Davidson J, Tyrell D, Pickett RD, Neirinckx RD. Technetium-^{99m}HM-PAO Stereoisomers as Potential Agents for Imaging Regional Cerebral Blood Flow: Human Volunteer Studies. *J Nucl Med* **1986**, 27(2), 171-177.
29. Jurisson S, Schlemper EO, Troutner DE, Canning LR, Nowotnik DP, Neirinckx RD. Synthesis, characterization and x-ray structural determinations of technetium (V)-oxo-tetradentate amine oxime complexes. *Inorg Chem* **1986**, 25(4), 543-549.
30. Gemmell HG, Sharp PF, Besson JAO, Crawford JR, Ebmeier KP, Davison J, Smith FW. Differential diagnosis in dementia using the cerebral blood flow agent ^{99m}Tc Hm-PAO: A spect study. *J Computer Assist Tomog* **1987**, 11(3), 398-402.
31. Biersack HJ, Linke D, Brassel F, Reichman K, Kurthen K, Durwen HF, Reuter BM, Wappense J, Stephen H. Technetium-^{99m} HM-PAO brain SPECT in epileptic patients before and during unilateral hemispheric anesthesia (Wada test): Report of three cases. *J Nucl Med* **1987**, 28(11), 1763-1767.
32. Reid RH, Gulenchyn KY, Ballinger JR. Clinical Use of Technetium-^{99m} HM-PAO for Determination of Brain Death. *J Nucl Med* **1989**, 30(10), 1621-1626.
33. Laurin NR, Driedger AA, Hurwitz GA, Mattar AG, Power JE, Champerlain MJ, Zabel PL, Pavlosky WF. Cerebral Perfusion Imaging with Technetium-^{99m} HM-PAO in Brain Death and Severe Central Nervous System Injury. *J Nucl Med* **1989**, 30(10), 1627-16635.
34. Leveille J, Demoncaun G, Walovitch RC. Intrasubject comparison between technetium-^{99m}-ECD and technetium-^{99m}-HMPAO in healthy human subjects. *J Nucl Med* **1992**, 33(4), 480-484.



35. Holman JL, Bioschofdelaloye A, Hill TC, Rigo PM, VanheertumRL, Ell PJ, Buell U, Deroo MC, Morgan RA. Biodistribution, Dosimetry, and Clinical Evaluation of Technetium-99m Ethyl Cysteinate Dimer in Normal Subjects and in Patients with Chronic Cerebral Infarction. *J Nucl Med* **1989**, 30, 1018-1024.
36. Walovitch RC, Hill TC, Garrity ST, Cheesman Eh, Burgess BA, Oleary DH, Watson AD, Ganey MV, Morgan RA, Williams SJ, Characterization of Technetium-99m-*L,L*-ECD for Brain Perfusion Imaging, Part 1: 118 Pharmacology of Technetium-99m ECD in Nonhuman Primates. *J Nucl Med* 1989, 30, 1892-1901.
37. Leveille J, Demonceau G, Deroo M, Rigo P, Taillefer R, Morgan RA, Kupranick D, Walovitch RC. Characterization of Technetium-99m-*L,L*-ECD for Brain Perfusion Imaging, Part 2: Biodistribution and Brain Imaging in Humans. *J Nucl Med***1989**, 30, 1902-1910.
38. Verbruggen AM. Radiopharmaceuticals:state of the art. *Eur J Nucl Med***1990**, 17(6-80), 346-364.
39. Meegalla, SK, Plossl K, Kung MP, Stevenson DA, Mu, Kushner S, Liable-Sands LM, Rheingold AL, Kung HF. Specificity of diastereomers of [99mTc] TRODAT-1 as dopamine transporter imaging agents. *J Med Chem***1998**,41(4),428-436.
40. Kung HF, Kim HJ, Kung MP, Meegalla SK, Plossl K, Lee HK. Imaging of dopamine transporters in humans with technetium-99m TRODAT 1. *Eur J Nucl Med* 1996, 23(11), 1527-1530.
41. Kung MP, Stevenson DA, Plossl K, Meegalla SK, Beckwith A, Essman, WD, Mu, Lucki I, Kung HF. [99mTc] TRODAT-1: a novel technetium- 99m complex as a dopamine transporter imaging agent. *Eur J Nucl Med***1997**, 24(4), 372-380.
42. Volkert WA, GoeckelerWF, EhrhardtGJ, Ketring AR. Therapeutic Radionuclides: Production and Decay Property Considerations. *J Nucl Med***1991**, 32, 174-185.
43. Venkatesan PP, Shortkroft S, Zalutsky MR, Sledge CB. Rhenium heptasulfide: a potential carrier system for radiation synovectomy. *Int J RadApplInstrumB***1990**, 17(4), 357-362.
44. Τσουκαλάς Χ, Παπαδόπουλος Μ, Μάινα Θ, Χιωτέλλης Ε. Νεότερες προσεγγίσεις στο σχεδιασμό ραδιοφαρμάκων του 99mTc. *Ελληνική Πυρηνική Ιατρική***1999**,2(3), 145-153.
45. Fernandes C., Santos I., PietzschHJ., Kunstler JU., KrausW., Rey A., Margaritis N., Bourkoula A., Chiotellis A., Paravatou-Petsotas M., Pirmettis I. Rhenium and Technetium complexes bearing quinazoline derivatives: progress towards a ^{99m}Tc biomarker for EGFR-TK imaging. *Dalton Transactions*, **2008**,3215-3225.
46. Bourkoula A., Paravatou-Petsovas M., Papadopoulos M., Santos A., Santos I., Pietzsch H.J., Livaniou E., Pelecanou M., Papadopoulos M., Pirmettis I., *Eur J Med Chem***2009**,44(10), 4021.

