

GABA-A-reseptorien kohdentaminen ja kuvantaminen
zirkonium-89:llä leimatun bispesifisen vasta-ainefragmentin
avulla

Leo Nissilä

Pro Gradu - Tutkielma

Radiofarmaseuttinen kemia

Kemian Laitos

Turun Yliopisto

Kesäkuu 2026

TURUN YLIOPISTO

Kemian Laitos

NISSILÄ LEO: GABA-A reseptorien kohdentaminen ja kuvantaminen zirkonium-89:llä
leimatun bispesifisen vasta-ainefragmentin avulla

Pro Gradu -tutkielma, 39 s

Kesäkuu 2026

GABA-A-reseptoriin sitoutuva γ -aminovoihappo (GABA) kuuluu tärkeimpiin keskushermoston estäviin välittäjäaineisiin. Häiriöt ja muutokset GABA välitteisessä signaloinnissa ja sen aktiivisuudessa voivat viitata keskushermoston sairauksiin tai häiriöihin, kuten epilepsiaan, skitsofreniaan tai autismiin. Tämän vuoksi GABA-A-reseptorien ja niiden alayksiköiden tarkan määrän ja aktiivisuuden määrittäminen on tärkeää näiden keskushermostoa vaivaavien ongelmien ymmärtämiseksi. Positroniemissiotomografia (PET) on tunkeutumaton ja tarkka menetelmä perinteisesti syöpäkasvainten kuvantamisessa. Sitä voidaan myös hyödyntää GABA-A-reseptorien kuvantamisessa. Aivoja kuvannettaessa käytettävän radiomerkkiaineen tulee läpäistä veriaivoeste (BBB). Tätä varten vasta-aineita hyödyntävässä immuno-PET-kuvantamisessa käytetään bispesifisiä vasta-aineita, jotka mahdollistavat BBB:n läpäisyn ja spesifin sitoutumisen GABA-A-reseptoreihin. Yhdistämällä bispesifisen vasta-aineen zirkonium-89:n kanssa saadaan radiolääke, jonka radionuklidin puoliintumisaika sopii täydellisesti vasta-aineen hitaan kinetiikan kanssa.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli testata kahta eri lähestymistapaa radionuklidi zirkonium-89:n ja bispesifisen vasta-ainefragmentti di-scFv1F4:n yhdistämiseksi. Onnistunut yhdistäminen oli mielenkiinnon kohteena, koska kuvatulokset bispesifiset radiolääkkeet mahdollistaisivat GABA-A-reseptorien kuvantamisen pitkällä aikavälillä. Tutkimus koostui radioleimaamisesta huoneenlämmössä, neutraalissa pH:ssa ja tuotteiden analysoinnista sekä lopuksi stabiilisuustesteistä. Stabiilisuustestit haluttiin suorittaa, jotta saataisiin tietoa siitä, kuinka luotettavia tuotteiden eri kelaattorit olisivat eläinkokeissa. Lopputuloksena [^{89}Zr] Zr-DFO*-NCS-di-scFv1F4 valmistettiin onnistuneesti korkealla radiokemiallisella saannolla ja puhtaudella. Myös stabiilisuustestit saatiin suoritettua. Toisen lopputuotteen [^{89}Zr] Zr-DFO-PEG₅-Tz-TCO-di-scFv1F4 synteesi ei onnistunut, mutta sen prekursorille onnistuttiin optimoimaan analyysimenetelmiä.

Avainsanat: positroniemissiotomografia, zirkonium-89, transferriini, bispesifinen vasta-aine, γ -aminovoihappo

Sisällysluettelo

1. JOHDANTO.....	1
1.1. Positroniemissiotomografia.....	1
1.1.1. Zirkonium-89.....	4
1.1.2. IEDDA.....	7
1.2. Aivojen kuvantaminen positroniemissiotomografian avulla.....	8
1.2.1. Zirkonium-89 PET-tutkimuksissa.....	10
1.2.2. Transferriinin toiminta.....	10
1.3. GABA.....	11
1.4. Tutkimuksen tarkoitus.....	13
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	13
2.1. Yleiset menetelmät.....	13
2.2. Lähtöaineen synteesi.....	14
2.2.1. DFO-PEG ₅ -Tz.....	14
2.2.2. Di-scFv1F4-TCO.....	15
2.2.3. DFO*-NCS-di-scFv1F4.....	15
2.3. Radiokemian yleiset menetelmät.....	16
2.4. Radioleimaus.....	16
2.4.1. [⁸⁹ Zr] Zr-DFO-PEG ₅ -Tz.....	16
2.4.2. [⁸⁹ Zr] Zr-DFO*-NCS-discFv1F4.....	17
2.5. Laadunvarmistus.....	18
2.5.1. DFO-PEG ₅ -Tz.....	18
2.5.1.1. RP-TLC.....	18
2.5.1.2. HPLC.....	18
2.5.1.3. ¹ H-NMR.....	18
2.5.2. Di-scFv1F4-TCO.....	19
2.5.2.1. SEC-HPLC.....	19
2.5.2.2. Nanodrop.....	19
2.5.3. DFO*-NCS-di-scFv1F4.....	19
2.5.3.1. SEC-HPLC.....	19
2.5.3.2. Nanodrop.....	20

2.5.4.	[⁸⁹ Zr] Zr-DFO-PEG ₅ -Tz.....	20
2.5.4.1.	Radio-TLC.....	20
2.5.4.2.	Radio-HPLC.....	20
2.5.5.	[⁸⁹ Zr] Zr-DFO*-NCS-di-scFv1F4.....	20
2.5.5.1.	Radio-TLC.....	20
2.5.5.2.	Radio-SEC-HPLC.....	21
2.5.5.3.	Stabiilisuustestit.....	21
3.	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU.....	22
3.1.	Lähtöaineen synteesi.....	22
3.1.1.	DFO-PEG ₅ -Tz.....	22
3.1.2.	Di-scFv1F4-TCO.....	23
3.1.3.	DFO*-NCS-di-scFv1F4.....	24
3.2.	Radioleimaus.....	25
3.2.1.	[⁸⁹ Zr] Zr-DFO-PEG ₅ -Tz-TCO.....	25
3.2.2.	[⁸⁹ Zr] Zr-DFO*-NCS-di-scFv1F4.....	28
3.3.	Stabiilisuustestit.....	30
3.3.1.	[⁸⁹ Zr] Zr-DFO*-NCS-di-scFv1F4.....	30
4.	JOHTOPÄÄTÖKSET.....	32
5.	VIITELUETTELO.....	33

Lyhenneluettelo

ACN = Asetonitriili

BBB = Veri-aivoeste; Blood Brain Barrier

DFO = Deferoksamiini

DMF = N,N-Dimetyyliformamidi

DMSO = Dimetyylisulfoksidi

DOTA = Tetraksetaani

DTPA = Dietyleenitriamiinipentaetikkahappo

EDTA = Etyleenidiamiinitetraetikkahappo

FDG = ^{18}F -fluorideoksigluooksi

FUS = Keskitetty ultraääni; Focused Ultrasound

GABA = γ -aminovoihappo, gamma-aminovoihappo

HATU = 2-(7-atsa-1H-bentsotriatsoli-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumheksafluorifosfaatti

HPLC = Korkean erotuskyvyn nestekromatografia; High-performance Liquid Chromatography

IEDDA = Käänteisesti elektronivajaa Diels-Alder; Inverse electron-demand Diels-Alder

NMR = Ydinmagneettinen resonanssi, Nuclear Magnetic Resonance

PBS = Fosfaatti puskuroitu suolaliuos; Phosphate-buffered saline

PEG = Polyetyleeniglykoli

PET = Positroniemissiotomografia

RMT = Reseptorivälitteinen transsytoosi

RP-TLC = Käänteisfaasikromatografia; Reversed Phase Thin Layer Chromatography

SEC = Kokoekskluusiokromatografia

SPE = kiinteäfaasiuutto

TCO = Trans-syklo-okteeni

TFA = Trifluorietikkahappo

TLC = Ohutlevykromatografia; Thin Layer Chromatography

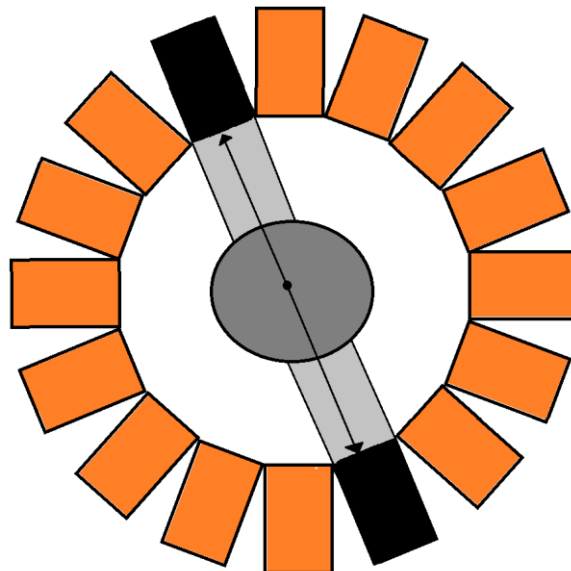
Tz = Tetratsiini

UP = Ultrapure

1. Johdanto

1.1 Positroniemiissiotomografia

Positroniemiissiotomografia (PET)-kuvantaminen on luotettavaksi todettu tunkeutumaton kuvantamismenetelmä tautien, kuten rintasyövän¹, munasarjasyövän², Alzheimerin³ ja epilepsian⁴ diagnosoinnissa. PET-kuvantamisella voidaan lisäksi seurata fysiologisia muuttujia.⁵ PET-kuvantaminen perustuu radionuklidien emittoimien positronien havaitsemiseen. Emittoitumisen jälkeen positroni käyttää kineettisen energiansa matkustamalla kudoksen läpi. Kun positroni on kuluttanut energiansa lähes loppuun, se yhdistyy elektronin kanssa muodostaen positroniumin. Positronium annihiloituu nopeasti, jolloin sen massa muuttuu energiaksi ja syntyy kaksi fotonia, joiden molempien energia on 511 keV. Nämä kaksi fotonia emittoituvat vastakkaisin suuntiin. Fotonit havaitaan detektorien avulla ja data tallennetaan. PET-kuva saadaan aikaiseksi PET-skannerin avulla, jossa detektoreita on ympyrän muodossa satoja. Havaitsemalla miljoonia fotonipareja, voidaan paikantaa ja kuvantaa annihilaatioiden sijainti.⁶



Kuva 1. Yksinkertaistettu kuva PET-kuvantamisesta. Kohde (tumman harmaa) on ympäröity detektoreilla (oranssit ja mustat laatikot). Onnistuneessa fotoniparin havaitsemisessa fotonit havaitaan lähes samanaikaisesti vastakkaisten detektorien kanssa.

PET-kuvantamisessa merkittävässä asemassa on käytettävän radionuklidin ominaisuudet. Tärkeimmät näistä ominaisuuksista ovat puoliintumisaika ja energia. Atomin ytimeä emittoituvat positronit omaavat kineettistä energiaa ja sen määrä on riippuvainen radionuklidista. Tämä energian määrä on suoraan verrannollinen positronin kulkemaan matkaan kudoksessa eli mitä suurempi määrä energiaa, sitä pidemmän matkan positroni kulkee ennen annihilaatiota. Tämä luonnollisesti johtaa siihen, että positroni kulkee kauemmas alkuperäisestä radionuklidista, jolloin kuvan laatu kärsii ja radiolääkemolekyylin tarkka paikallistaminen vaikeutuu.⁷ Puoliintumisaika on aika, minkä kuluttua radioaktiivisesta aineesta puolet on hajonnut. Ei ole olemassa huonoja tai hyviä puoliintumisaikoja vaan eri puoliintumisaikoja omaaville radionuklideille on omat käyttötarkoituksensa.

Lyhyissä puoliintumisajoissa on se etu, että useampia kuvantamisia voidaan suorittaa samaan kohteeseen tietyssä ajassa.⁸ Huonona puolena on se, että reaktiot ja laaduntarkastus pitää suorittaa nopeasti ja radionuklidin kuljetus kaukana sijaitsevaan sairaalaan ei ole mahdollista. Pitkillä puoliintumisajoilla voidaan tutkia pidemmän aikaa, vaikka koko kehoa, mutta samalla potilas tai eläin altistuu radioaktiivisuudelle kauemman aikaa.⁸

Taulukko 1. Eri radionuklidien puoliintumisajat, positronien energia ja matkustama matka.⁹

Radionuklidi	Maksimi energia (MeV)	Maksimi matka kudoksessa (mm)	Puoliintumisaika
¹¹ C	0.960	4.2	20.4 min
¹⁸ F	0.634	2.4	110 min
¹⁵ O	1.732	8.4	2 min
⁸⁹ Zr	0.902	3.8	78.4 h

Radionuklidin lisäksi tarvitaan myös tapa, jolla voidaan kuljettaa radionuklidi oikeaan paikkaan. Tämän tehtävän hoitaa kohdistusvektori. Vektorin ideana on se että se kuljettaa radioaktiivisen isotoopin kuvattavan kohteen, esimerkiksi syöpäkasvaimen luokse.¹⁰ Esimerkkinä kohdistusvektorista on laajalti syöpien kuvantamiseen ja havaitsemiseen käytetty sokerin

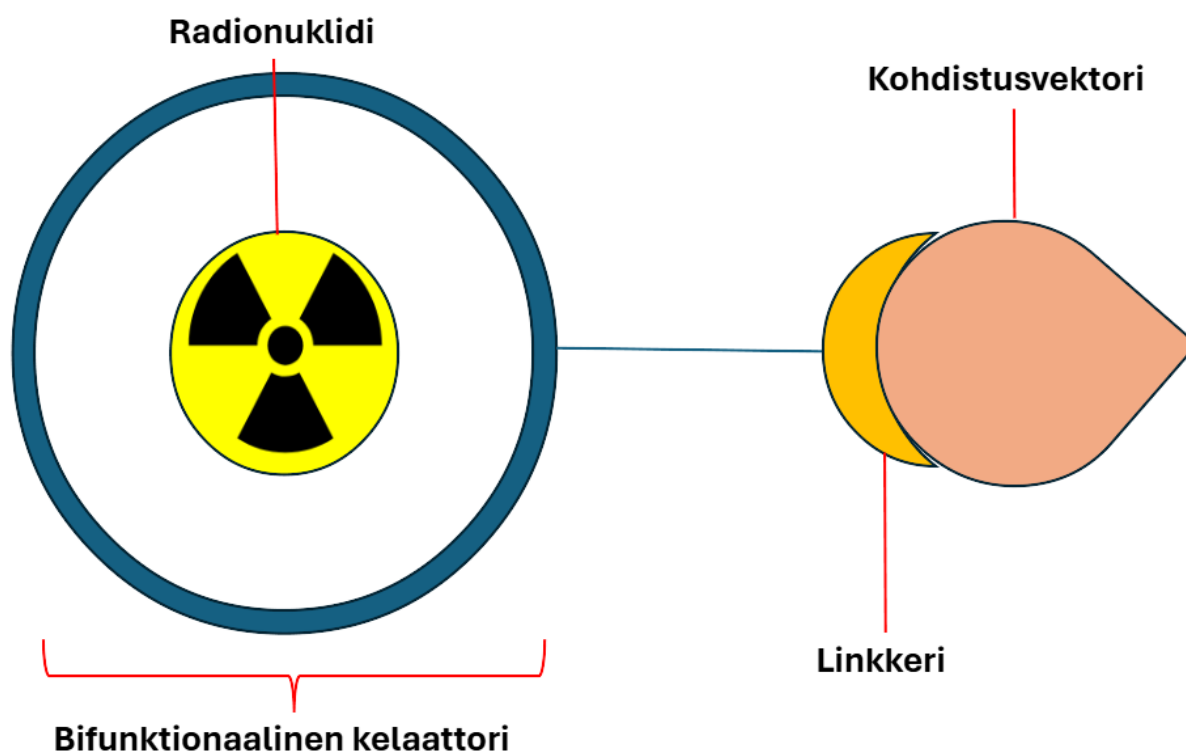
analogi, ^{18}F -fluorideoksiglukoosi (^{18}F -FDG).¹¹ ^{18}F -FDG:n toiminta perustuu syöpäkasvainten ominaisuuteen kuluttaa enemmän sokeria glykolyysiin.¹² Tällöin myös radioleimattua ^{18}F -FDG:tä kuluu enemmän syöpäsoluissa koska se toimii sokerin analogina.¹³ Samalla leimattu radionuklidi päätyy syöpäkasvainten sijaintiin tiheämmin ja ne voidaan paikantaa.¹⁴ Muita vektoreita voi olla muun muassa peptidit¹⁵, bisfosfonaatit¹⁶ ja vasta-aineet.¹⁷

Tärkeä osa radiolääkkeen suunnittelussa on valita radionuklidi, jonka ominaisuudet sopivat kohdistusvektorin kanssa tutkitun kohteen kuvantamiseen. Tähän valintaan vaikuttaa moni asia, mutta puoliintumisaika on erittäin kriittinen ominaisuus. Jotta radiolääke voi toimia, pitää molekyylin ensi kulkeutua kohteeseen ja ylimääräisten radiolääkemolekyylien poistua sen jälkeen kehosta. Tämä on tarpeellista, jotta kuvan laatu ja tarkkuus on hyvä. Tämän vuoksi on tarpeellista valita radionuklidi, jolla on tarpeeksi pitkä puoliintumisaika. Esimerkiksi vasta-ainefragmenttien kanssa tarvitaan radionuklidi, jonka puoliintumisaika on tuntien mittainen. Kokonaisten vasta-aineiden kanssa taas radionuklidin puoliintumisaika on oltava useita päiviä.^{18,19} Jodi-124:ää on käytetty esimerkiksi kokonaisten vasta-aineiden leimaamisessa²⁰, kun taas gallium-68:aa vasta-ainefragmenttien²¹ ja entsyymien²² leimaamisessa.

Radionuklidin ja kohdistusvektorin lisäksi kolmas osa, mitä varsinkin radiometallien kanssa tarvitaan usein, on bifunktionaalinen kelaattori. Tätä metodia, jossa käytetään bifunktionaalisia kelaattoreita kutsutaan epäsuoraksi leimaamiseksi.²³ Tämän leimaamismetodin vastakohtana toimii suora leimaaminen, jossa ei käytetä väliaineita, vaan leimaus suoritetaan kohdistusvektorin ja radionuklidin välillä suoraan kovalenttisella sidoksella. Suorassa leimaamisessa hyvänä puolena voi olla ajan säästäminen ja paremmat *in vivo* ominaisuudet. Radiohalogenaatio ja ^{11}C -metylaatio ovat esimerkkejä suorasta leimaamisesta.²⁴

Bifunktionaalisen kelaattorin tehtävä on sitoa kohdistusvektori ja radionuklidi toisiinsa yhdeksi molekyyliksi. Kohdistusvektoriin kelaattori sitoutuu joko suoraan tai välimolekyylin kautta kovalenttisesti.²³ Radiometallin kanssa kelaattorin tehtävä on muodostaa usean sidoksen kanssa vahva kompleksi. Jotta tämä kompleksinmuodostus on mahdollista, pitää radiolääkemolekyyliä suunniteltaessa ottaa huomioon käytetyn radiometallin-ionin ominaisuudet sekä kelaattorin omat ominaisuudet ja valita tilanteeseen ideaali kelaattori.²⁴ Näitä huomioitavia ominaisuuksia on muun muassa varaukset, radiometallin koordinaationluku ja kelaattorin donoriryhmien määrien

sopivuus ja kompleksinmuodostusnopeus. Yleisiä käytettyjä bifunktionaalisia kelaattoreita on esimerkiksi tetraksetaani (DOTA) ja dietyleenitriamiinipentaetikkahappo (DTPA).²⁵

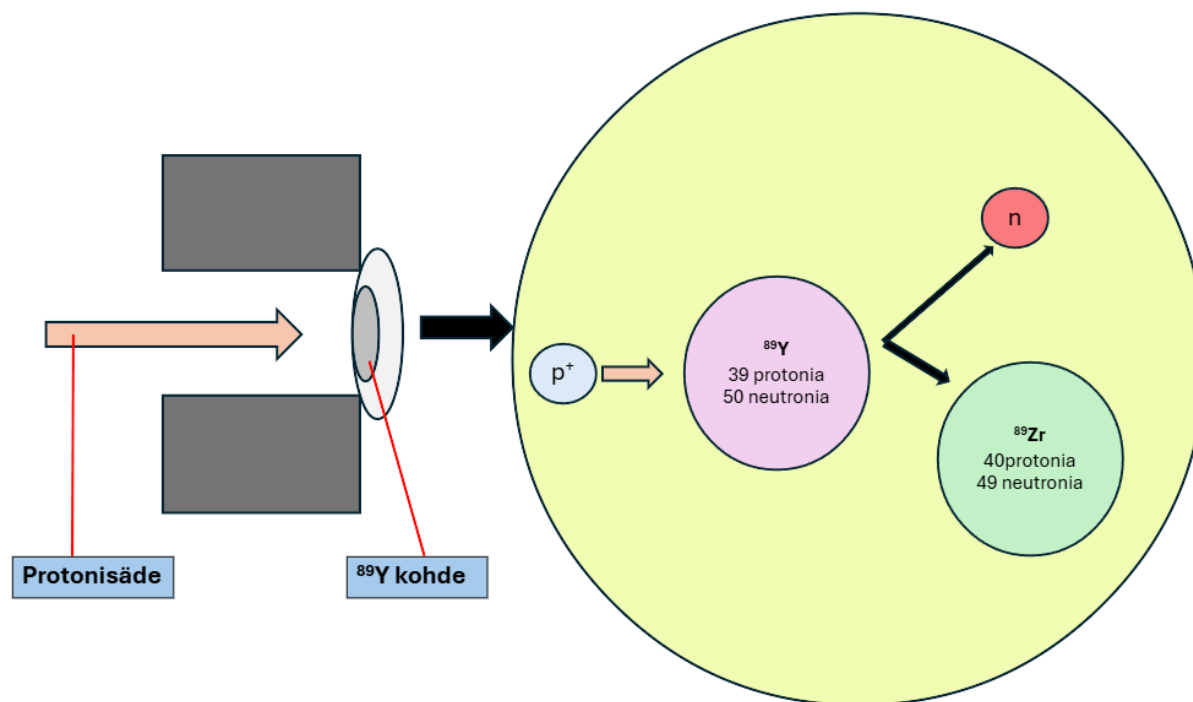


Kuva 2. Radiolääkkeen rakenne. Bifunktionaalinen kelaattori sitoo radionuklidin ja on kovalenttisesti liittynyt kohdistusvektoriin.

1.1.1 Zirkonium-89

Zirkonium-89 on positroneja emittoiva radiometalli, jonka ytimessä on 49 neutronia ja 40 protonia. Sen puoliintuessa 78,4 h välein ^{89}Zr hajoaa yttrium-89:ksi ja hajoaminen tapahtuu elektronikaappauksen (77 %) ja positroniemission (23 %) kautta.²⁶ Zirkonium-89:n yleisin valmistustapa on $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$. Tässä protoni-neutroni-ydinreaktiossa yttriumkohtioon ohjataan syklotronilla kiihdytettyjä protoneja törmäämään yttrium-89 atomeihin. Tällöin protoni absorboituu ja reaktiossa syntyy neutroni ja ^{89}Zr -isotooppi. Toinen tapa valmistaa ^{89}Zr -isotooppi on $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$ -reaktiolla.²⁷ Zirkonium-89 on kuvantamisessa suosittu radionuklidi osittain,

siksi koska sen valmistaminen yllä kuvatuilla metodeilla on edullista ja syklotronituotannossa voidaan hyödyntää erilaisia yttriumkohteita, kuten kalvoja tai jauheita.²⁶



Kuva 3. ^{89}Zr tuottaminen $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ -reaktiolla. Syklotronista peräisin oleva protonisäde (p^+) törmää ^{89}Y -kohteeseen. Tämän seurauksena protoni absorboituu ja neutroni (n) vapautuu.

Vasta-aineet ovat jo pitkään olleet mielenkiinnon kohteena syövän hoitamisessa ja kuvantamisessa, sillä ne sitoutuvat vahvasti ja spesifisti kohteisiinsa. Tämän vuoksi on pyritty kehittämään radiolääkkeitä, jotka kykenevät hyödyntämään vasta-aineita. Vaatimuksia on tietysti monia, mutta yksi tärkeimmistä ominaisuuksista, joka vaaditaan radioisotoopilta, on pitkä puoliintumisaika. Tämä on tärkeää, sillä vasta-aineet kulkeutuvat hitaasti kohteeseensa, joten tarvitaan radioisotooppi, jolla kyetään kuvantamaan pitkiä aikoja.²⁸ Tämän vuoksi perinteiset ja yleiset radionuklidit, kuten ^{18}F ja ^{11}C eivät toimi näiden vasta-aineiden leimaamiseen, koska niiden lyhyet puoliintumisaikat johtavat merkittävään radionuklidin hajoamiseen ennen kuin vasta-ainetta on ehtinyt kertyä kohteeseen.²⁷ Zirkonium-89:llä on tähän tarkoitukseen hyvät ominaisuudet. Sen 78,4 tunnin puoliintumisaika on tarpeeksi pitkä siihen, että vasta-aineella on aikaa kulkeutua kohteeseen. Lisäksi zirkonium-89:n energia on sopivan alhainen, että saadaan

hyvä resoluutio, sitä on halpa tuottaa ja sen avulla voidaan tuottaa stabiileja radiolääkkeitä *in vivo*.²⁸

⁸⁹Zr-isotooppia käytetään hyödyksi varsinkin eläinkokeissa, koska sillä saadaan pitkältä aikaväliltä tietoa radiolääkkeen käyttäytymisestä ja on testattu eläimissä vasta-aineiden kanssa.^{29–}

³¹ Vasta-aineiden lisäksi zirkonium-89:ää on testattu eläimissä monien muidenkin kohdistusvektorien kanssa. Näistä muutamia ovat neuroendokriinisten kasvainten kuvantaminen suoralla leimauksella liposomien kanssa³², melanooman kuvantaminen epäsuoralla ja suoralla leimauksella piidioksidi nanopartikkeleilla³³ sekä haimasyövän kasvainten kuvantaminen suoralla leimauksella ekosomien kanssa.³⁴ Kuten tästä voidaan todeta, prekliiniset kokeet ovat näyttäneet, että zirkonium-89:llä on käyttöä kuvantamisessa, mikä on taas mahdollistanut siirtymisen kliinisiin tutkimuksiin. Hyvä esimerkki onnistuneesta zirkonium-89:n käytöstä ihmisten kliinisessä kuvantamisessa on ⁸⁹Zr-trastutsumabi. Tämän monoklonaalisen vasta-aineen avulla toimivan radiolääkkeen kanssa havaittiin metastaattisia pesäkkeitä potilaissa, joilla oli HER2-positiivinen rintasyöpä.³⁵

Vaikka zirkonium-89:ää on käytetty kliinisissä tutkimuksissa, on sen käytössä silti haasteita, jotka estävät sen käytön. Yksinkertaisin syy on se, että käytettäessä zirkonium-89:ää verrattuna esimerkiksi fluori-18:ta, potilaat altistuvat paljon suuremmalle säteilyannokselle. Tämä johtuu zirkonium-89:n hajoamisessa syntyvästä 909 keV gammasäteilystä. Tämä saattaa joissain tapauksissa rajoittaa tutkimusten kestoa.^{36–39} Toinen merkittävä tekijä on zirkonium-89:n kertyminen luukudokseen, jonka epäillään johtuvan deferoksamiinin (DFO) epästabiiliudesta radiometallin kanssa, joka johtaa ⁸⁹Zr vapautumiseen ja kertymiseen luukudokseen. Luukudokseen kertynyt vapaa zirkonium-89 taas vaikeuttaa luussa sijaitsevien syöpäpesäkkeiden havaitsemista, vähentää kuvan tarkkuutta ja lisää luiden saamaa säteilyannosta.^{36,38,39} Zirkonium-89:ltä suojaaminen vaatii myös erilaista suunnittelua, koska verrattaessa ¹⁸F-FDG:hen zirkonium-89 aiheutti suuremman säteilyannoksen muissa huoneissa ja käytävillä, mutta pienemmän säteilyannoksen lähellä potilasta.⁴⁰

Zirkonium kuuluu ryhmän 4 metalleihin. Tämä tarkoittaa sitä, että zirkoniumioni esiintyy vesiliuoksessa pääasiallisesti muodossa Zr⁴⁺ ja pyrkii muodostamaan kahdeksan sidosta. Vaikka Zr⁴⁺ on käytetty perinteisten kelaattorien, kuten etyleenidiamiinitetraetikkahapon (EDTA),

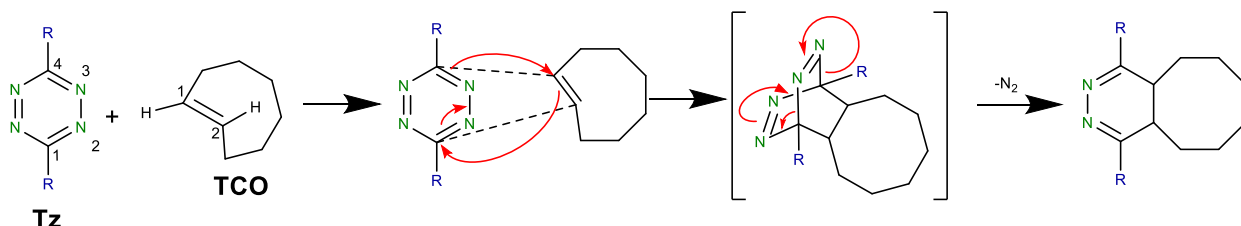
DTPA:n ja DOTA:n kanssa, niin toistaiseksi yleisimmässä käytössä on ollut DFO. DFO on rautaa sitova kelaattori, joka sitoo metallit kolmella hydroksaami-ryhmällä. Sillä on lisäksi amiinihantä, johon kyetään konjugoimaan kohdistusvektoreita. Zr^{4+} muodostaa DFO:n kanssa kahdeksan sidosta niin kuin perinteistenkin kelaattorien kanssa. Hydroksaami-ryhmien lisäksi sitomiseen osallistuu kaksi vesimolekyyliä.²⁸ Kuitenkin DFO itse täyttää vain kuuden kahdeksasta koordinaatiopaikasta. Tämän on epäilty olevan syy $^{89}Zr^{4+}$ - radiometallin ja DFO:n välillä havaittuun epävakauteen. Edelleen tämän epävakauden uskotaan johtavan ^{89}Zr vapautumiseen *in vivo* ja kertymiseen luihin. Tämän vuoksi DFO:n tilalle on kehitetty DFO:n analogi, jossa on yksi hydroksaami-ryhmä enemmän. Tämän uudemman kehitetyn kelaattorin nimi on DFO*. Verrattaessa DFO:ta DFO*:een *in vitro* stabiilisuustesteissä tulokset olivat vahvasti DFO*:n puolella. Lisäksi ei ole näyttöä siitä, että DFO* vaikuttaisi kohdistusvektorin ominaisuuksiin negatiivisesti.⁴¹ Toisessa vastakkainasettelussa trastutsumabi konjugoitiin ja kelaattoreita verrattiin *in vitro* lisäksi myös *in vivo* hiirissä. Tämän työn perusteella DFO* oli ylivoimaisesti parempi sekä *in vitro* stabiilisuustesteissä, että *in vivo* biodistributiossa.⁴²

1.1.2 IEDDA

Käänteisesti elektronivajaassa Diels-Alder (IEDDA) -reaktiossa elektronirikas dienofiili reagoi elektroniköyhän dieenin kanssa.⁴³ Reaktion ensimmäisessä vaiheessa tapahtuu reversiibeli $[4 + 2]$ sykloadditio. Tässä vaiheessa kaksi dieenin π -sidosta ja dienofiilin yksi π -sidoksia katkeavat. Katkenneiden sidosten elektronit muodostavat kolme uutta sidosta, joista kaksi on σ -sidoksia ja yksi on π -sidoks.⁴³ Tämän vaiheen seurauksena syntyy bisyklinen välituote, joka käy läpi retro-Diels-Alder-vaiheen samalla vapauttaen typpikaasua.⁴⁴ Vaihtoehtoisia dieenejä on paljon, mutta pääasiassa käytetään tetratsiinejä (Tz). Tästä syystä reaktiota kutsutaan myös nimellä tetratsiiniligaatio. Dienofiileinä voidaan käyttää muun muassa syklopropeeneja tai syklo-okteeneja ja dienofiileistä yleisin käytetty on trans-syklo-okteeni (TCO).^{45,46} Tz:aa ja TCO:ta käytetään paljon yhdessä koska ne reagoivat keskenään erittäin spesifisti eikä niiden reaktiota keskenään häiritse monet ihmisen kehossa olevista nukleofiileistä.⁴⁶

IEDDA-reaktio on bio-ortogonaalinen, erittäin nopea, selektiivinen ja spesifinen. Näiden ominaisuuksien takia se sopii hyvin kuvantamiseen. Reaktion nopeus, spesifisyys ja selektiivisyys mahdollistaa esikohdennetun kuvantamisen ilman että se häiritsee kehon normaalia toimintaa ja käyttämällä vain pieniä määriä lähtöaineita. Esikohdennetussa

kuvantamisessa kyetään kaksiosaisella prosessilla kuvantamaan haluttu kohde ilman, että potilas tai koe-eläin kärsii kovin suurta radioaktiivista altistumista. Ensimmäisessä osassa dienofiilillä modifioitu kohdistusvektori injektoidaan ja annetaan kohteesta riippuen aikaa kulkeutua kohteeseen. Kun tämän ensimmäisen molekyylin ylimäärälle on varattu riittävästi aikaa poistua verenkierrasta, injektoidaan radionuklidilla leimattu dieeni. Kun nämä kaksi molekyyliä kohtaavat niiden välillä tapahtuu IEDDA-reaktio. Reagoinnin jälkeen kohdistusvektorin ohjaama radionuklidi voidaan paikantaa PET-skannerilla. Esikohdennetun kuvantamisen etuna IEDDA-reaktion kanssa on se, että sen nopea reaktiokinetiikka mahdollistaa lyhytikäisten radionuklidien käytön, kun taas perinteisellä kuvantamisella tämä ei ole mahdollista, jos kohdistusvektori kulkeutuu hitaasti kohteeseensa.^{45,47} IEDDA-reaktiota on hyödynnetty ja testattu prekliinisissä tutkimuksissa onnistuneesti.^{47–49}



Kuva 4. IEDDA-reaktion reaktiomekanismi Tz ja TCO välillä. Reaktiossa toisen nuolen jälkeen nähdään bisyklinen välituote. Tästä välituotteesta vapautuu typpikaasua retro-Diels-Alder-reaktiossa ja syntyy stabiili lopputuote.

1.2 Aivojen kuvantaminen positroniemissiotomografian avulla

Kuten edellä mainittu, PET- kuvantamista on hyödynnetty paljon onkologiaan. Tämän lisäksi PET- kuvantamista on myös tarkasteltu mahdollisena metodina tutkia aivojen toimintaa ja terveyttä. Erityisesti mielenkiintona on erilaiset hermoston rappeutumissairaudet, kuten Alzheimerin tauti tai MS-tauti. Aivojen kudoksenäytteiden haastava saatavuus nostaa kuvantamisen ja sen kehittämisen tärkeyttä. Tässä tilanteessa PET-kuvantaminen tarjoaa tarkan tavan kuvantaa keskushermostoa.⁵⁰

Aivojen kuvantamisen kanssa ylimääräisenä haasteena on aivo-veriестeen (BBB) ohittaminen. BBB vaikeuttaa radiolääkkeiden suunnittelua, sillä muiden rajoitusten lisäksi se päästää passiivisella kuljetuksella läpi vain pieniä molekyylejä, joiden koko alittaa 400 Da ja ovat

lipofiilisiä. BBB on osa neurovaskulaarista yksikköä, joka mahdollistaa keskushermoston kommunikoinnin muun kehon kanssa. BBB:n monien tehtävien seasta esille nousee kaksi; se toimii fyysisenä seinänä ja erottaa aivot muusta verenkierrosta. BBB säätelee kuljetusmekanismeja, jotka määräävät monien keskushermostolle tärkeiden molekyylien siirtämisestä BBB:n läpi. BBB myös mahdollistaa edellä mainittujen radiolääkkeiden kuljettamisen aivoihin sekä aivojen tutkimisen. BBB on kokonaisuus, jonka tehtävä ja ominaisuus on säädellä kuinka ionit, kemikaalit ja solut liikkuvat aivojen ja veren välillä. Kun potilaalla on jokin keskushermostoa koskeva sairaus, esimerkiksi MS-tauti, BBB menettää osan sen ominaisuuksista eikä voi hoitaa tehtäviään. Ilman BBB:n täyttä toimintakykyä ionien säätely, homeostaasin signalointi ja molekyylien pääsy keskushermostoon häiriintyy. Tämä on vain yksi esimerkki monesta, minkä vuoksi on tärkeää saada lisää tietoa ihmisaivoista sekä kehittää aivojen kuvantamiseen tarkoitettuja lähestymistapoja.⁵¹

BBB:n ohittamisen vaikeuden vuoksi on kehitetty menetelmiä, joiden avulla saadaan korkea konsentraatio lääkemolekyyliä kuljetettua tehokkaasti aivoihin. Yksi menetelmä on kemiallisesti muokata kohdistusvektoria, jonka seurauksena se läpäisee BBB:n paremmin. Tämä voidaan saavuttaa esimerkiksi sitomalla polyetyleeniglykoli (PEG) kohdistusvektoriin. PEG:in sitominen lääkemolekyyliin muokkaa sen kokoa ja muita ominaisuuksia, mutta säilyttää biologiset toiminnot. BBB:n läpäisyn kannalta se pidentää verenkierron puoliintumisaikaa.⁵² Pitkä verenkierron puoliintumisaika aiheuttaa sen, että lääkemolekyyliä kertyy enemmän aivoihin.⁵³

Toinen menetelmä on käyttää keskitettyä ultraääntä (FUS) yhdessä mikrokuplien kanssa. Menetelmässä laskimonsisäisesti injektoidaan mikrokuplia, jonka jälkeen seuraa useamman minuutin pituinen aika, jolloin ultraääniaaltoja ohjataan eläimen tai ihmisen aivoja päin. Tämän jälkeen voidaan injektoida radiolääkemolekyyli. Menetelmä perustuu ultraäänen tuottamaan paineeseen, joka aiheuttaa mikrokuplien värähtelyä. Värähtelyssä kuplat laajenevat ja supistuvat jatkuvasti verisuonten seinämien välillä, joka johtaa solujen välisten liitosten löystymiseen. Tämä johtaa BBB:n toiminnan häiriöön ja mahdollistaa radiolääkkeiden parempaan kulkeutumiseen aivoihin. FUS-menetelmää on testattu prekliinisesti.⁵⁴

Kolmas menetelmä on hyödyntää kehon elintoimintoihin liittyviä mekanismeja, kuten reseptorivälitteistä transsytoosia (RMT). RMT on vesikulaarinen reitti, joka kulkee solujen läpi.

Sen tarkoituksena on kuljettaa aivolle tärkeitä makromolekyyliä, kuten insuliinia tai transferriiniä, BBB:n läpi. RMT-prosessi toimii siten että ligandi, vasta-aine tai proteiini sitoutuu reseptoriin aivojen endoteelisolujen luminaaliselle pinnalle, joka aktivoi sitten ligandi-reseptorikompleksin endosytoosin. Reitti kulkee solunsisäisten endosomaalisten osien läpi, jonka lopuksi sitoutunut ligandi vapautetaan aivokudoksen puolelle. Reseptori palautuu heti takaisin ja voi vastaanottaa uuden ligandin.⁵⁵ RMT:tä voidaan hyödyntää muokkaamalla vasta-aineita niin, että radiolääkemolekyyli kykenee läpäisemään BBB:n. Tämä tapahtuu hyödyntämällä sopivaa bispesifistä vasta-ainetta. Bi-spesifinen vasta-aine kykenee sitoutumaan reseptoriin, joka mahdollistaa RMT:n, sekä toiseen kohdreseptoriin aivoissa. Esimerkki tällaisesta bispesifistä vasta-aineesta on transferriini.⁵⁰ RMT:tä hyödyntämällä on onnistuttu prekliinisissä tutkimuksissa läpäisemään BBB.⁵⁶

1.2.1 Zirkonium-89 PET-kuvantamisessa

Verrattuna muihin aivojen PET-kuvantamisessa tutkittuihin pitkäaikaisiin radiometalleihin, zirkonium-89:n tarjoaa paljon etuja. Kun puhutaan kohdistusvektoreista, jotka vaativat radionuklidilta usean päivän puoliintumisaajan, käytännössä puhutaan vain kahdesta radionuklidista. Toinen on zirkonium-89 (puoliintumisaika: 3,27 päivää) ja toinen on jodi-124 (puoliintumisaika: 4,18 päivää). Verrattaessa jodi-124:ää zirkonium-89:ään, niin zirkonium-89:n valmistamiseen tarvittavat materiaalit ovat paremmin ja halvemmin saatavilla⁵⁷⁻⁵⁹ ja sen säteilystä pienempi osuus on gammasäteilyä.⁶⁰ Lisäksi jodi-124 poistuu nopeasti soluista vasta-aineiden sisäistämisen jälkeen ja hajoaa entsyymien toimesta. Tämä vaikeuttaa kuvantamista huomattavasti. Zirkonium-89 pysyy kohteen sisällä eikä poistu, mikä johtaa parempaa kuvanlaatuun.⁵⁸ Näiden etujen vuoksi zirkonium-89:ää on testattu kliinisissä tutkimuksissa muun muassa aivokasvainten kuvantamisessa vasta-aineita leimaamalla.^{61,62} Lisäksi jodi-124:ää ja zirkonium-89:ää vertaillessa vasta-aineiden leimaamisessa zirkonium-89:llä on kohdekasvaimiin kulkeutunut enemmän lääkemolekyyliä.⁶³

1.2.2 Transferriinin toiminta

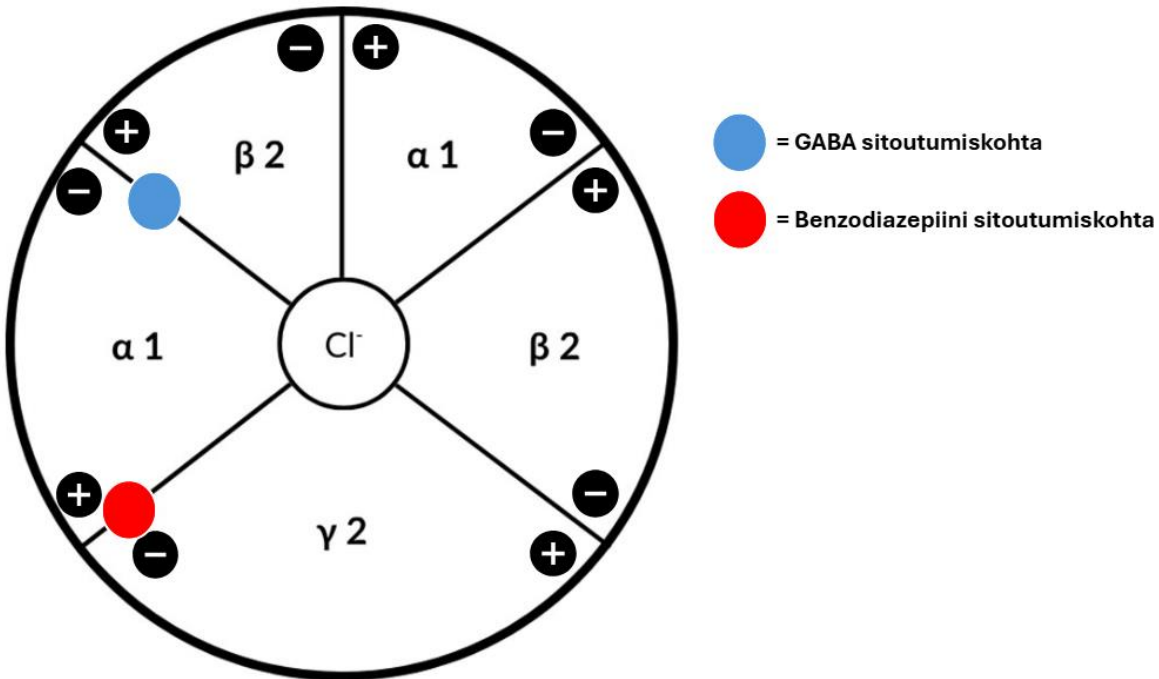
Vasta-aineisiin perustuvien radiolääkkeiden ongelma on vasta-aine molekyylien suuri koko, joka vaikeuttaa tai jossain tapauksissa kokonaan estää lääkemolekyylin pääsyn BBB:n ohi. Tämän vuoksi vasta-aineisiin perustuvien lääkkeiden suunnittelussa on hyödynnetty transferriiniproteiinin ja transferriinireseptorin aktivoimaa RMT:tä, mikä mahdollistaa

lääkemolekyylin kulkemisen BBB:n yli. Tätä hyödynnetään niin, että valmistetaan bispesifinen vasta-aine, jossa esimerkiksi transferriiniproteiinia muistuttava proteiini on konjugoitu vasta-aineeseen, joka sitoutuu aivoissa varsinaiseen hoidettavaan tai kuvannettavaan kohteeseen.⁶⁴ Esimerkiksi 8D3 on monoklonaalinen vasta-aine, joka on kehitetty sitoutumaan transferriinireseptoriin, joka aktivoi RMT:n jonka seurauksena lääkemolekyyli pääsee kulkemaan BBB:n ohi.⁶⁵ Esimerkki bispesifisestä vasta-aineesta on RmAb158-scFv8D3. Tämä bispesifinen vasta-aine koostuu monoklonaalisesta mAb158-vasta-aineketjusta, joka sitoutuu A β -protofibriileihin. Toinen osa, scFv8D3, koostuu kahdesta yksiketjuisesta vasta-ainefragmentista, jotka sitoutuvat transferriinireseptoriin. Nämä kaksi osaa on liitetty toisiinsa ja niitä testattiin prekliinisessä tutkimuksessa jodi-125:n kanssa.⁶⁶

1.3 GABA

Gamma-aminovoihappo (GABA) on keskushermoston tärkein estävä välittäjäaine. GABA:n toimintaa säätelee GABA-A- ja GABA-B-reseptorit. Tämän ns. GABA-ergisen välittäjäainejärjestelmän epänormaali toiminta voi olla seurausta useasta eri sairaudesta minkä vuoksi sen tutkiminen on tärkeää.⁶⁷

GABA-A reseptorit ovat ligandeilla säädettyjä ionikanavia, jotka voivat muodostua 19 mahdollisesta alayksiköstä. Näitä alayksikköyhdistelmiä on tutkittu paljon ja on saatu selville esimerkiksi se, missä osassa keskushermostoa kutakin erilaista GABA-A-reseptoria ilmenee ja mikä niiden tehtävä on. Paljon on kuitenkin vielä selvittämättä, sillä esimerkiksi ei ole vielä selkeää käsitystä siitä, mikä systeemi säätelee reseptorien rakentamista. Keskeisin GABA-A reseptorin rakenne on $\gamma 2\beta 2\alpha 1\beta 2\alpha 1$ kiertäen vastapäivään. GABA-A-reseptorin toiminta ja rakenne on esitetty kuvassa 5.⁶⁷



Kuva 5. Yleisin GABA-A-reseptorin rakenne, $\gamma 2\beta 2\alpha 1\beta 2\alpha 1$, esitettynä. Reseptoriin kuuluu useita sitoutumiskohtia sekä kloridi-ionikanava, joka sijaitsee alayksiköiden keskellä. GABA sitoutuu $\beta + / \alpha -$ pinnalla N-terminaaliin, kun taas benzodiazepiinin sitoutumiskohta sijaitsee $\alpha + / \gamma -$ risteyksessä. GABA:n sitoutuessa kloridi-ionien virtaus soluun kasvaa, josta seuraa hermosolun aktiivisuuden laskeminen. Benzodiazepiinin sitoutuminen aiheuttaa rakenteellisia muutoksia, joka lisää reseptorin lähettämiä inhibiittorisia signaaleja.⁶⁷

Autismin⁶⁸, epilepsian⁶⁹ ja Alzheimerin taudin⁷⁰ on todettu olevan kytköksissä GABA-ergisen järjestelmän mutaatioihin. Vaikka keskushermoston ja GABA-ergisen järjestelmän mutaatioiden välisestä yhteydestä ei vielä tiedetä kaikkea, joissain tapauksissa on yhteys voitu vetää reseptorien alayksikköjen aktiivisuuden tai määrän ja keskushermostosairauden välillä. Esimerkiksi potilailla, joilla on skitsofrenia, on todettu olevan myös normaalia alhaisempi määrä $\alpha 5$ -GABA-A reseptoreja hippokampuksessa.⁷¹ Tutkimuksessa mainitaan, että skitsofrenia voi vaikuttaa muiden reseptorityyppien määrän. Lisäksi tutkimuksissa on onnistuttu kehittämään alayksikköspesifisiä vasta-aineita, joiden avulla voidaan tutkia haluttuja aivotointoja tai sairauksia. Esimerkiksi 1F4 on GABA-A-reseptorin $\alpha 1$ -alayksikköön kohdentava yksiketjuinen vasta-ainefragmentti. Tähän vasta-ainefragmenttiin perustuvaa radiolääkettä testattiin hiirissä, mikä johti lupaaviin tuloksiin.⁷²

1.4 Tutkimuksen tarkoitus

Pro gradu -tutkimuksessa tavoitteena oli valmistaa kaksi radiolääkemolekyyliä [^{89}Zr] Zr-DFO*-NCS-di-scFv1F4 (**9**) ja [^{89}Zr] Zr-DFO-PEG₅-Tz-TCO-di-scFv1F4 (**10**). Molemmissa molekyyeissä radionuklidina toimi radiometalli zirkonium-89 ja vasta-ainefragmenttina bispesifinen di-scFv1F4. Erottavia tekijöitä oli konjugaatiomenetelmä, kelaattori ja se, miten vasta-ainefragmentti sidottiin kelaattoriin. Työ suoritettiin niin, että ensin valmistettiin prekursorit ja konjugoitiin vasta-ainefragmentit välituotteisiin, minkä jälkeen radioleimattiin lopputuotteet ja verrattiin näitä. Konjugaatioiden, synteesien ja radioleimausten tulosten varmistamiseksi väli- ja lopputuotteet analysoitiin käyttämällä HPLC- ja TLC-menetelmiä. Työssä oli samalla tavoitteena optimoida näitä metodeja. Lopuksi oli tarkoitus suorittaa stabiilisuustestejä eri ympäristöissä ja verrata radiolääkemolekyyliä keskenään. Hypoteesina oli se, että **9** olisi kestävämpi kuin **10** stabiilisuustesteissä. Tämän paremman kestävyuden oletus perustui siihen, että DFO*-kelaattorissa on yksi hydroksaamiryhmä enemmän sitomassa radiometallia ja täten DFO*:n ja radiometallin välinen sidos olisi vaikeampi katkaista.

Tutkimuksessa valmistettujen radiolääkemolekyylien suunniteltu käyttötarkoitus oli GABA-A-reseptorien kuvantaminen. Tämän mahdollistaisi vasta-ainefragmentti di-scFv1F4. Di-scFv1F4 on bi-spesifinen vasta-ainefragmentti, jolla on kyky sitoutua transferriinireseptoriin, joka taas mahdollistaa kuljetuksen BBB:n läpi. Aivoissa taas di-scFv1F4 kykenee sitoutumaan spesifisesti GABA-A-reseptoreihin. Stabiilisuustestien tarkoituksena oli antaa tietoa, kuinka hyvin radiolääkemolekyylit vastustaisivat hajoamista, kun ne altistettiin metalli- ja kelaattoriympäristölle 24 tunnin ajan. Nämä ympäristöt ovat verrattavissa taas siihen ympäristöön, mille molekyylit altistuisivat, jos ne injektoidaisiin tutkimusta varten ihmiseen tai eläimeen.

2. Materiaalit ja menetelmät

2.1 Yleiset menetelmät

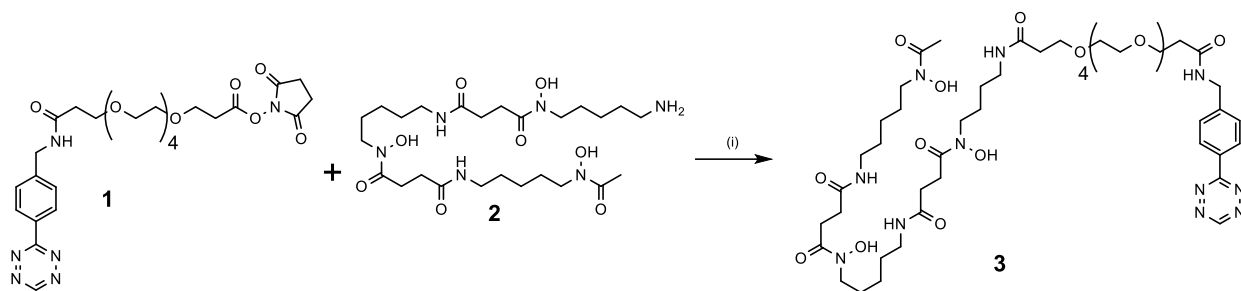
Väli- ja lopputuotteet valmistettiin kaupallisesti saatavilla olevista lähtöaineista. Lähtöaineita ei erikseen puhdistettu tai kuivattu, mutta reaktioissa käytetyt liuokset olivat aina valmistettu kahden viikon sisällä. Synteeseissä ja lähtöaineiden mittaamisessa ei käytetty laisinkaan metallisia välineitä tai astioita. Tämä tehtiin, jotta välttyttiin mahdollisilta epäpuhtauksilta.

2.2 Lähtöaineen synteesi

2.2.1 DFO-PEG₅-Tz

Prekursori DFO-PEG₅-Tz:n (**3**) synteesi perustui aikaisempaan tutkimukseen⁴⁷ ja se valmistettiin kahdella kerralla kaavassa 1 esitetyllä metodilla.

Tetrasiini-PEG₅-NHS-esteriä (**1**) (10 mg, 16,5 µmol, 1 eq) sekoitettiin desferrioksamiini B-mesyylaattin (**2**) (18,4 mg, 28 µmol, 1,7 eq) kanssa 2-(7-atsa-1H-bentsotriatsoli-1-yyli) -1,1,3,3-tetrametyyliuroniumheksafluorifosfaattiin (HATU) (12,6 mg, 33,1 µmol). Seokseen lisättiin vielä trietyyliamiinia (Et₃N) (4,1 mg, 40,5 µmol) sekä dimetyyliformamidia (DMF) (5 ml) ja annettiin sekoittua 24 h verran huoneenlämmössä folion alla. Inkuboinnin jälkeen reaktio oli valmis ja tuotteen, DFO-PEG₅-Tz (**3**), laatu testattiin ensin käänteisfaasikromatografialla (RP-TLC). Tämän jälkeen suoritettiin kiinteäfaasiuutto (SPE) käyttäen kahta SepPak C18-patruunaa. Kahta patruunaa käytettiin koska tuotteen tilavuus oli suuri. Patruunat huuhdeltiin asetonitrilillä (3 ml) ja ultrapuhtaalla (UP) -vedellä (20 ml) ja välituote **3** imettiin ruiskuun, jonka jälkeen vettä (40 ml) imettiin samaan ruiskuun. Puolet seoksesta injektoidiin toiseen C18-patruunaan ja toiset seoksesta injektoidiin toiseen. Lopuksi puhdistettu tuote saatiin ulos injektoimalla asetonitriliä (4 ml) ja vettä (20 ml) patruunoihin. Viimeiseksi patruunoihin injektoidiin vielä typpikaasua. Tämän jälkeen suoritettiin uusi RP-TLC samalla menetelmällä kuin ennen SPE-puhdistusta. Seuraavaksi tuotteesta haihdutettiin epäpuhtaudet ja ylimääräinen neste, tähän käytettiin pyöröhaihdutinta, typpikaasua ja vakuumpumppua. Kuivattu tuote liuotettiin HPLC-ajoa varten asetonitriliin ja 100 µl siirrettiin näyteastiaan. Tämän jälkeen tuote kuivattiin uudelleen käyttäen aikaisempia metodeja. Viimeiseksi välituote **3** analysoitiin ¹H-NMR:llä. Tätä varten kuivattu tuote liuotettiin metanoliin (600 µl).

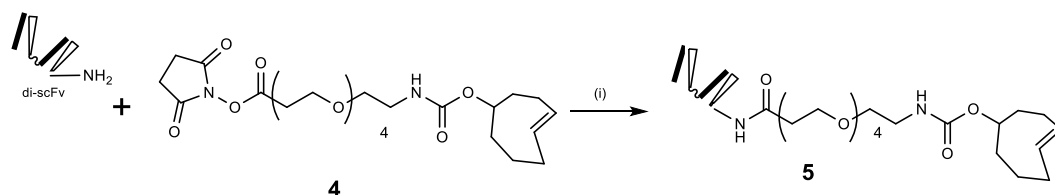


Kaavio 1. Lähtöaineen **3** synteesi. (i) DMF, HATU, trietyyliamini, 24 h, RT, pimeässä

2.2.2 Di-scFv1F4-TCO

Myös vasta-ainefragmentin di-scFv1F4:n konjugaatio perustui aikaisempaan työhön⁴⁷ Tämä reaktio on kuvattu kaavassa 2.

Välituotteen **5** konjugaatioreaktio suoritettiin niin että vasta-ainefragmenttia di-scFv1F4 (350 µl, 2,5 nmol, 1 eq) sekoitettiin yhdessä TCO-PEG₄-NHS-esterin (**4**) (19,3 µg, 37,5 nmol, 15 eq) kanssa, joka oli liuotettu dimetyylisulfoksidiin (DMSO). Tämä seos liuotettiin vielä fosfaatti puskuroituun suolaliuokseen (PBS) (1 ml, pH 8,5) ja reaktioliuoksen annettiin inkuboitua Protein Lobind 1,5 ml eppendorffissa neljän tunnin ajan huoneenlämmössä pimeässä. Inkuboinnin jälkeen reaktioseos siirrettiin Amicon Ultra-0.5 (10K) -suodattimeen puhdistusta varten. Puhdistus suoritettiin sentrifugoimalla suodatin (14000 rpm, 10 min). Kun tuote oli käsitelty, lisättiin sen sekaan 450 µl PBS:ää ja annettiin pyöriä samoin asetuksin. Tämä PBS:än lisääminen ja pyöritys toistettiin kuusi kertaa. Tuote analysoitiin tämän jälkeen kokoeksklusiokromatografialla (SEC) ja Nanodrop - spektrofotometrillä.



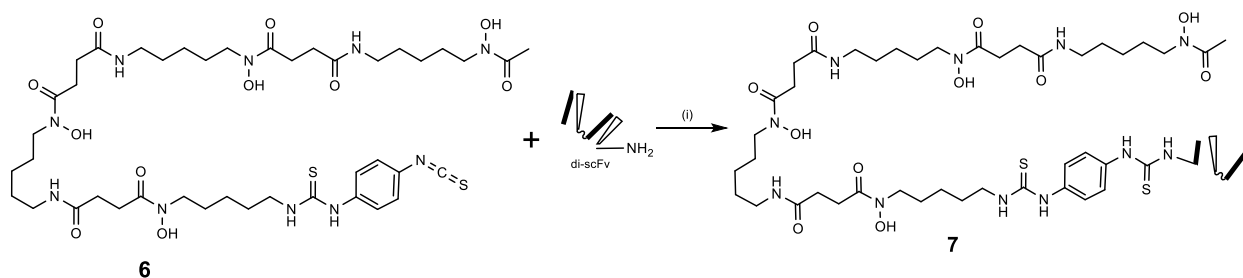
Kaavio 2. Di-scFv1F4 vasta-ainefragmentin konjugaatio TCO-PEG₄-NHS esterin kanssa. (i) PBS (pH 8.5), 4 h, RT, pimeässä

2.2.3 DFO*-NCS-di-scFv1F4

Välituotteen **7** reaktio perustui valmiiseen tutkimukseen.⁴² Reaktio on kuvattu kaavassa 3.

Vasta-ainefragmenttia di-scFv1F4 (550 µl, 8,9 nmol, 1 eq) sekoitettiin yhdessä DFO*-NCS:n **6** (127,3 µg, 133,5 nmol, 15 eq) kanssa, joka oli liuotettu DMSO:hon. Tämä seos lisättiin vielä PBS:än sekaan (1 ml, pH 9,1) ja reaktioliuoksen annettiin inkuboitua Protein Lobind 2,0 ml eppendorffissa (1 h, RT, 37 °C, 300 rpm). Inkuboinnin jälkeen reaktioseos siirrettiin Amicon Ultra-0.5 (10K) -suodattimeen puhdistusta varten. Puhdistus suoritettiin sentrifugoimalla

suodatin (14000 rpm, 10 min). Kun tuote oli käsitelty, lisättiin suodattimeen HEPES-puskuriliuosta (450 µl, pH 7) ja annettiin pyöriä samoin asetuksin. Tämä HEPES-puskuriliuoksen lisääminen ja sentrifugointi toistui yhteensä kuusi kertaa. Tuote analysoitiin tämän jälkeen SEC- HPLC:llä ja Nanodrop -spektrofotometrillä.



Kaavio 3. Di-scFv1F4 vasta-ainefragmentin konjugaatio DFO*-NCS **6** kanssa. (i) PBS (pH 9.1), 1 h, 37 C, 300 rpm

2.3 Radiokemian yleiset menetelmät

Synteeiseissä käytetyt liuokset olivat vasta valmistettuja eikä koskaan kahta viikkoa vanhempia.

Radioleimauksessa käytetty [^{89}Zr] Zr-oksalaatti pyrittiin käyttämään 1-4 päivän sisällä sen saapumisesta. Radioleimauksessa ei käytetty metallisia reaktioastioita eikä välineitä.

Radioleimattujen lopputuotteiden puhtaus varmistettiin radio-HPLC:llä ja radio-TLC:llä.

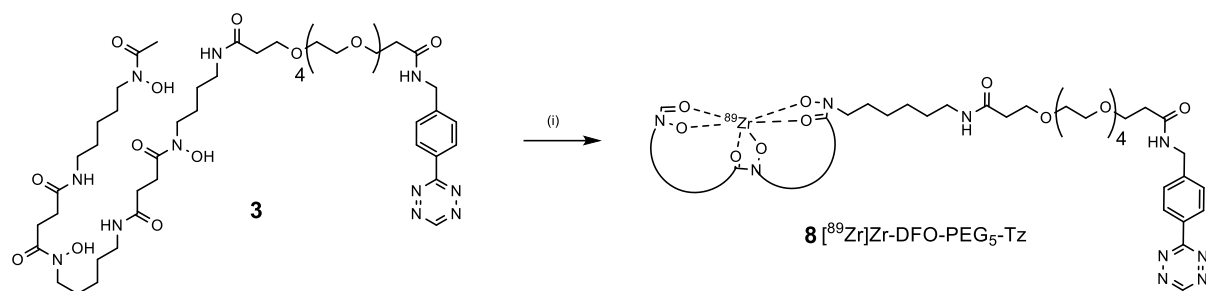
Lopuksi suoritettiin stabiilisuustestit kelaattori- ja metalliympäristöissä. Kaikkien tulosten radioaktiivisuusarvot ja saannot puoliintumisaika korjattiin ja taustaradioaktiivisuus on otettu huomioon.

2.4 Radioleimaus

2.4.1 [^{89}Zr] Zr-DFO-PEG₅-Tz

Radioaktiivinen [^{89}Zr] Zr-oksalaatti (2–25 MBq) lisättiin oksaalihappoon (1 M) niin että kokonaistilavuus oli 200 µl. Reaktio suoritettiin Protein Lobind 1,5 ml eppendorffissa. Tämän jälkeen seokseen lisättiin natriumkarbonaattia (2 M, 90 µl) ja annettiin seoksen reagoida 3 minuutin ajan huoneenlämmössä. Odotuksen jälkeen lisättiin prekursori **3** (50 µg, 50 nmol), joka oli liuotettu HEPES- puskuriliuokseen (0.5 M, pH 7, 0,5 ml). Reaktioseoksen annettiin inkuboitua 20 minuutin ajan huoneenlämmössä ravistelijassa (300 rpm). Inkuboinnin jälkeen

lopputuote **8** puhdistettiin C18 SepPak Light-patruunalla. Patruuna oli esikäsitelty 2 ml etanolia ja 10 ml UP-vettä. Puhdistuksessa reaktioseoksen injektoinnin jälkeen patruuna puhdistettiin 1 ml UP-vettä ja tuote otettiin talteen injektoimalla etanoli-saliini-seosta 1 ml (50/50). Tämän jälkeen radioaktiivisuudet mitattiin tuotteesta, SepPak-patruunasta, reaktioastiasta ja puhdistuksesta erotetusta suodatusjännöksestä. Lopuksi tuote analysoitiin radio-TLC:llä ja radio-HPLC:llä.

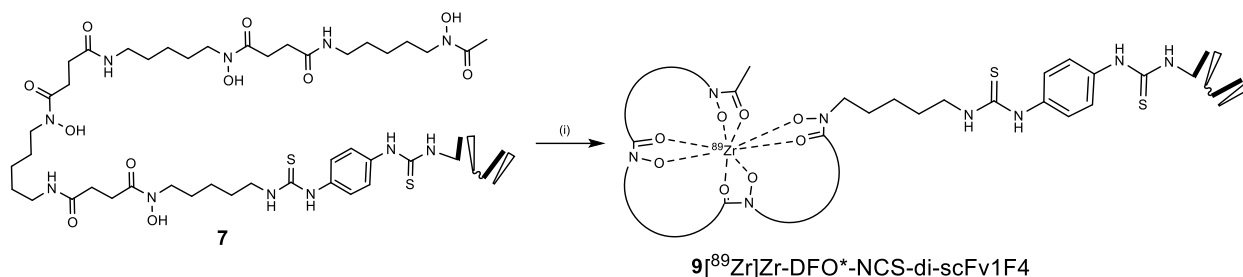


Kaavio 4. Prekursori **3**:n radioleimaus (i) Zr-89-oksalaatti, Na₂CO₃, oksaalihappo (1M), HEPES-puskuriliuos (pH 7), 23 minuuttia, RT, 300 rpm

2.4.2 [⁸⁹Zr] Zr-DFO*-NCS-discFv1F4

Radioaktiivinen [⁸⁹Zr] Zr-oksalaatti (10 MBq) lisättiin oksaalihappoon (1 M) niin että kokonaistilavuus oli 100 µl. Reaktio suoritettiin Protein Lobind 1,5 ml eppendorffissa. Tämän jälkeen seokseen lisättiin natriumkarbonaattia (2 M, 45 µl) ja annettiin seoksen reagoida 3 minuutin ajan huoneenlämmössä. Odotuksen jälkeen lisättiin välituote **7** (3 nmol), joka oli liuotettu HEPES- puskuriliuokseen (0.5 M, pH 7, 150 µl). Tämän jälkeen lisättiin vielä HEPES-puskuriliuosta niin että kokonaistilavuus oli 350 µl. Reaktioseoksen annettiin inkuboitua 60 minuutin ajan huoneenlämmössä ravistelijassa jatkuvassa liikkeessä (550 rpm). Leimauksen jälkeen reaktioliuos siirrettiin Amicon Ultra-0,5 ml (10K) -suodattimeen ja puhdistettiin. Puhdistuksessa aluksi pelkästään itse lopputuote **9** sentrifugoitiin (14000 rpm, 10 min). Tämän jälkeen tuote pestiin kolmeen kertaan HEPES-puskuriliuoksella (0.5 M, pH 7, 0.45 ml) ja sentrifugoitiin jälleen (14000 rpm, 10 min). Viimeiseksi tuote pestiin kolmeen kertaan PBS-puskuriliuoksella (0.01 M, pH 7.4, 0.45 ml) ja sentrifugoitiin (14000 rpm, 10 min). Jokaisen pesuvaiheen jälkeen suodatusjännös erotettiin, sen radioaktiivisuus mitattiin ja suoritettiin uusi

pesuvaihe lisäämällä uusi puskuriliuos. Lopuksi tuote analysoitiin radio-TLC:llä ja radio-SEC-HPLC:llä.



Kaavio 5. DFO*-NCS-Di-scFV1F4 (7) radioleimaus. (i) Zr-89-oksalaatti, Na₂CO₃, oksaalihappo, HEPES-puskuriliuos (pH 7), 60 min RT 550 rpm

2.5 Laadunvarmistus

2.5.1 DFO-PEG₅-Tz

2.5.1.1 RP-TLC

Välituotteen **3** RP-TLC ajettiin 1/1 H₂O/ CH₃CN- liuoksella. Menetelmässä ajettiin ensin ensimmäisessä levyssä välituote **3**. Tämän jälkeen toisessa levyssä ajettiin välituote **3** ja lähtöaine **1** niin että molemmat pipetoitiin samaan kohtaan. Tällä tavoin onnistuiko synteesi ja oliko tuotteessa epäpuhtauksia. Tuloksia verrattiin lähtöaineiden RP-TLC-tuloksiin.

2.5.1.2 HPLC

Välituotteen **3** optimoidussa HPLC-metodissa tuote liuotettiin asetonitriiliin ja 100 µl seosta siirrettiin HPLC-näyteputkeen. Tähän näyteputkeen lisättiin vielä UP-vettä (100 µl). Tuote analysoitiin Jupiter Proteo 90 Å, 4 µm, 250 x 4,6 mm - kolonnilla. Eluenttina toimi 0,1 % Trifluorietikkahappo (TFA) ACN-liuoksessa, gradientti 20–60 % 0–22,5 min. Toinen eluentti oli 0,1 % TFA vesiliuoksessa. Virtausnopeus oli 1 ml/min ja injektio-tilavuus 10 µl. Puhtaan tuotteen retentioaika oli noin 10–12 minuutin välillä.

2.5.1.3 ¹H-NMR

Tuote 3 karakterisoitiin ydinmagneettisella resonanssilla (NMR). ^1H - NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 10.23 (1H, s), 8.48–8.43 (2H, d, $J = 8,23$ Hz), 7.51–7.46 (2H, d, $J = 8,11$ Hz), 4.44 (2H, s), 3.71–3.68 (2H, t, $J = 5,86$ Hz), 3.61–3.58 (3H, m, $J = 6.03$ Hz) 3.56– 3.45 (26H, m) 3.07 (6H, m), 2.66 (3H, m), 2.48–2.43 (2H, t, $J = 5,78$ Hz), 2.40–2.29 (7H, m), 1.99 (3H, s), 1.53 (6H, m), 1.42 (7H, m), 1.24 (8H, m).

2.5.2 Di-scFv1F4-TCO

2.5.2.1 SEC-HPLC

Välituote **5** analysoitiin SEC-HPLC:llä. Näyte valmistettiin liuottamalla 10 μl tuotetta **5** 20 μl PBS:ää. Analysointiin käytettiin Superdex 75 increase 10/300 GL SEC-kolonnia. Eluenttina oli suodatettu PBS (pH 7,4). Virtausnopeus oli 0,3 ml/min ja ajoaika oli 100 minuuttia. Retentioaika oli 29–31 minuutin välillä.

2.5.2.2 Nanodrop

Välituotteen **5** vasta-ainefragmentin konsentraatio selvitettiin Nanodrop mikrovolumi-spektrofotometrillä. Nanodrop määrittää proteiinien konsentraation näytteen absorbanssin perusteella joko 280 tai 205 nm:n aallonpituudella. Nanodropin etuna on, ettei se vaadi standardeja, reagensseja ja mittaus on mahdollista suorittaa pienillä näyttemäärillä. Ennen näytteiden mittausta ja mittausten välissä sensorit pestiin UP-vedellä (5 μl) ja pyyhittiin laboratorioliiinalla. Ennen näytteen mittausta taustan asetuksiin valittiin “Muu proteiini” ja syötettiin arvo molekyylipainolle (55,29 kDa) ja molaariselle absorptiokertoimelle ($\epsilon/1000$) (104 210, 00 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Seuraavaksi tausta absorbanssi nollattiin pipetoimalla PBS:ää (2 μl), valitsemalla ”blank” ja suorittamalla mittaus. Tämän jälkeen sensorit puhdistettiin ja välituotteen **5** näytteen konsentraatio mitattiin pipetoimalla 2 μl näytettä.

2.5.3 DFO*-NCS-di-scFv1F4

2.5.3.1 SEC-HPLC

Välituotteelle **7** suoritettiin myös SEC-HPLC. Tätä varten 10 μl näyte tuotetta **7** liuotettiin 20 μl PBS. Näyte analysoitiin Superdex 75 increase 10/300 GL SEC-kolonnilla. Eluenttina oli suodatettu PBS (pH 7,4). Virtausnopeus oli 0,3 ml/min ja ajoaika oli 80 minuuttia. Retentioaika oli 29–31 minuutin välillä.

2.5.3.2 Nanodrop

Välituotteen **7** vasta-ainefragmentin konsentraatio selvitettiin Nanodrop mikrovolumi-spektrofotometrillä. Nanodrop määrittää proteiinien konsentraation näytteen absorbanssin perusteella joko 280 tai 205 nm:n aallonpituudella. Nanodropin etuna on, ettei se vaadi standardeja, reagensseja ja mittaus on mahdollista suorittaa pienillä näytemäärillä. Ennen näytteiden mittausta ja mittausten välissä sensorit pestiin UP-vedellä (5 µl) ja pyyhittiin laboratorioliiinalla. Ennen näytteen mittausta taustan asetuksiin valittiin "Muu proteiini" ja syötettiin arvo molekyylipainolle (55,29 kDa) ja molaariselle absorptiokertoimelle ($\epsilon/1000$) ($104\,210,00\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Seuraavaksi tausta absorbanssi nollattiin pipetoimalla PBS:ää (2 µl), valitsemalla "blank" ja suorittamalla mittaus. Tämän jälkeen sensorit puhdistettiin ja välituotteen **7** näytteen konsentraatio mitattiin pipetoimalla 2 µl näytettä.

2.5.4 [^{89}Zr] Zr-DFO-PEG₅-Tz

2.5.4.1 Radio-TLC

Lopputuotteen **8** RP-TLC ajettiin 1/1 EDTA/CH₃CN- liuoksella. Levylle asetettiin 1 µl tippa lopputuotetta **8** ja vapaata ^{89}Zr -oksalaattia. Levyjen annettiin kuivua huoneenlämmössä ennen analyysiä. Ajon jälkeen levyt skannattiin Fujifilm BAS 1800 II-biokuvantamislaitteella ja tulokset analysoitiin Tina 2.0-ohjelmistolla.

2.5.4.2 Radio-HPLC

Lopputuotteen **8** HPLC-metodissa injektoidun näytteen aktiivisuus oli 0,04 MBq. Tuote analysoitiin Jupiter Proteo 90 Å, 4 µm, 250 x 4,6 mm - kolonnilla. Menetelmässä käytettiin isokraattista eluutiota, jossa 25 % eluenttina toimi 0,1 % TFA vesiliuoksessa ja loput oli 0,1 % TFA ACN-liuoksessa. Virtausnopeus oli 2 ml/min ja ajoaika oli 20 minuuttia. Retentioaika oli 4-5 minuuttia.

2.5.5 [^{89}Zr] Zr-DFO*-NCS-di-scFv1F4

2.5.5.1 Radio-TLC

Lopputuotteen **9** RP-TLC ajettiin 1/1 EDTA/CH₃CN- liuoksella. Levylle asetettiin 1 µl tippa lopputuotetta **9** ja toinen 1 µl tippa vapaata ^{89}Zr -oksalaattia. Levyjen annettiin kuivua

huoneenlämmössä ennen analyysiä. Ajon jälkeen levyt skannattiin Fujifilm BAS 1800 II-biokuvantamislaitteella ja tulokset analysoitiin Tina 2.0-ohjelmistolla.

2.5.5.2 Radio-SEC-HPLC

Lopputuotteen **9** radio-SEC-HPLC-metodissa injektointiin samalla myös **7** ja lopullinen injektioilavuus oli 25 µl. Tuote analysoitiin Superdex 75 increase 10/300 GL SEC-kolonnilla. Eluenttina oli suodatettu PBS (pH 7,4). Virtausnopeus oli 0,3 ml/min ja ajoaika oli 80 minuuttia. Retentioaika oli 29–31 minuutin välillä.

2.5.5.3 Stabiilisuustestit

Lopputuotteelle **9** suoritettiin myös stabiilisuustestit metalli- ja kelaattoriympäristöissä.

Kelaattoriympäristössä testi suoritettiin sekä neutraalissa (pH = 7) että happamassa (pH = 5,5) pH-arvossa. Kelaattorina käytettiin EDTA:ta (1,3 µl, 10 mM). Sekä tuotteen **9** näyte (0,05–0,052 nmol) että EDTA lisättiin PBS:ään (pH 7 ja 5,5). Tämän lisäksi valmistettiin myös kontrolli. Kontrollissa vain tuotteen **9** näyte lisättiin PBS:ään (pH 7 ja 5,5). Seoksia inkuboitin (37 °C) 24 tunnin ajan. Luotettavuuden parantamiseksi jokainen stabiilisuustesti ja kontrolli suoritettiin kolmesti.

Radioaktiivisuus ja sitä myötä radioaktiivinen puhtaus varmistettiin mittaamalla 50 µl kolmesta näytteestä Amicon Ultra-9.5 ml (10K) -suodattimeen. Tähän lisättiin vielä 350 µl PBS:ää. Seos puhdistettiin sentrifugoimalla suodatin (14000 rpm, 10 min). Suodattimeen jäänyt radioaktiivisuus edusti ehjää lopputuotetta **9** ja suodatinjäännös edusti vapaata ⁸⁹Zr tai EDTA:n kompleksoimaa ⁸⁹Zr. Tämä mittaus suoritettiin 0, 0,5, 2, 6 ja 24 tunnin kohdalla.

Metalliympäristössä testi suoritettiin vain yhdessä pH-arvossa (7,4) PBS:n kanssa. Testissä metallivaikuttajana käytettiin rautakloridia (FeCl₃) (250 µl, 1 mM) joka oli liuotettu UP-veteen. Tämä rautakloridi lisättiin eppendorffiin yhdessä PBS:n (250 µl, pH = 7,4) kanssa ja lopputuotteen **9** näytteen (0,05–0,052 nmol) kanssa. Tämän lisäksi valmistettiin kontrolli, jossa oli vain PBS (500 µl, pH = 7,4) ja näyte tuotteesta **9** (0,05–0,052 nmol). Seoksia inkuboitin (37 °C) 24 tunnin ajan. Luotettavuuden parantamiseksi jokainen stabiilisuustesti ja kontrolli suoritettiin kolmesti.

Radioaktiivisuus ja sitä myötä radioaktiivinen puhtaus varmistettiin mittaamalla 50 µl kolmesta näytteestä Amicon Ultra-9.5 ml (10K) -suodattimeen. Tähän lisättiin vielä 350 µl PBS:ää. Seos puhdistettiin sentrifugoimalla suodatin (14000 rpm, 10 min). Suodattimeen jäänyt radioaktiivisuus edusti ehjää lopputuotetta **9** ja suodatinjäännös edusti vapaata ^{89}Zr . Tämä mittausta suoritettiin 0, 0,5, 2, 6 ja 24 tunnin kohdalla.

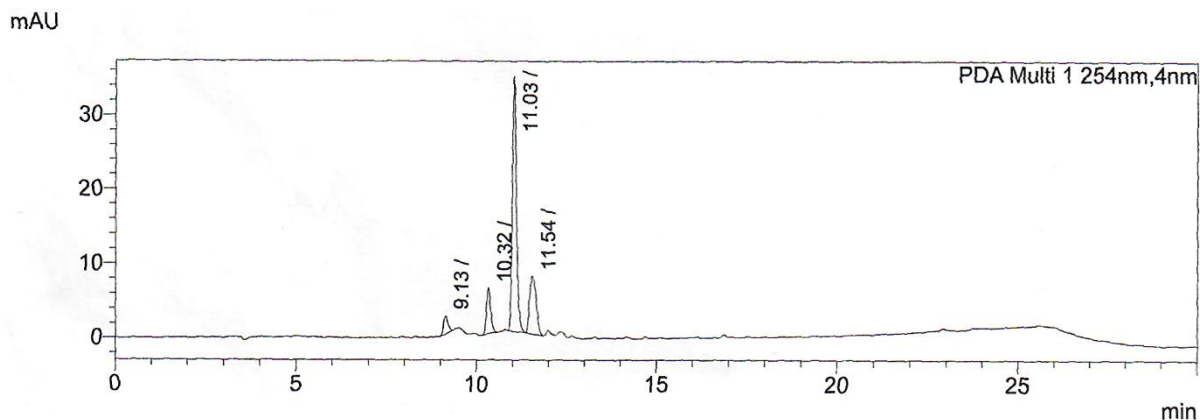
3. Tulokset ja niiden tarkastelu

Laadunvarmistus välituotteille ja lopullisille tuotteille suoritettiin TLC- ja HPLC-metodeilla, pH-paperilla ja visuaalisella tarkastuksella. Visuaalisen tarkastuksen avulla varmistettiin, että lähtöaineet ja lopputuotteet olivat silmämääräisesti puhtaita. Ph-paperin avulla varmistettiin radioleimauksen aikana, että olosuhteet olivat oikeat. Monelle väli- ja lopputuotteelle suoritettiin TLC- ja HPLC-testit.

3.1 Lähtöaineiden synteesi

3.1.1 DFO-PEG₅-Tz

Alun perin yhdistettä **3** saatiin valmistettua ensimmäisessä erässä ensin 3,8 mg ja myöhemmin toisessa erässä 2,3 mg. Näille erille välituotetta **3** suoritettiin useampi TLC-, HPLC- analyysi, NMR-ajot sekä SPE-puhdistus käyttäen C18 SepPak-patruunoita. Osittain nämä suoritettiin optimoinnin takia ja osittain epäpuhtauksien takia. Myöhemmin nämä erät yhdistettiin yhdeksi näytteeksi, mutta useiden analyysien, kuivaamisen, liuottamisen ja puhdistuksien jälkeen, radioleimaukseen jäi käytettäväksi 2,1 mg välituotetta **3**. Lopullinen saanto oli tällöin 38 %. Prekursori **3**:lle saatiin optimoitua hyvä HPLC-metodi. Tuotteessa havaittiin ^1H -NMR:ssä epäpuhtauksia, joiden epäillään olevan lähtöaineesta **1** peräisin. Mahdollisesti myös lähtöaineesta **2** on peräisin epäpuhtauksia, näitä kuitenkin pitäisi olla vähemmän kuin tuotteesta **2** ^1H -NMR perusteella. Tätä havaintoa vahvistaa, kun saatua NMR- spektriä verrataan alkuperäisen tutkimuksen omaan spektriin.⁴⁷ Lisäksi kuvassa 6. havaitaan tuotepiikki, **3**, jonka osuus on vain noin 61 %.



PDA Ch1 254nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Conc.	Unit	Resolution(USP)
1		9.13	21187	4.817		--
2		10.32	49858	11.336		4.998
3		11.03	269031	61.167		3.142
4		11.54	99755	22.680		1.825
Total			439831	100.000		

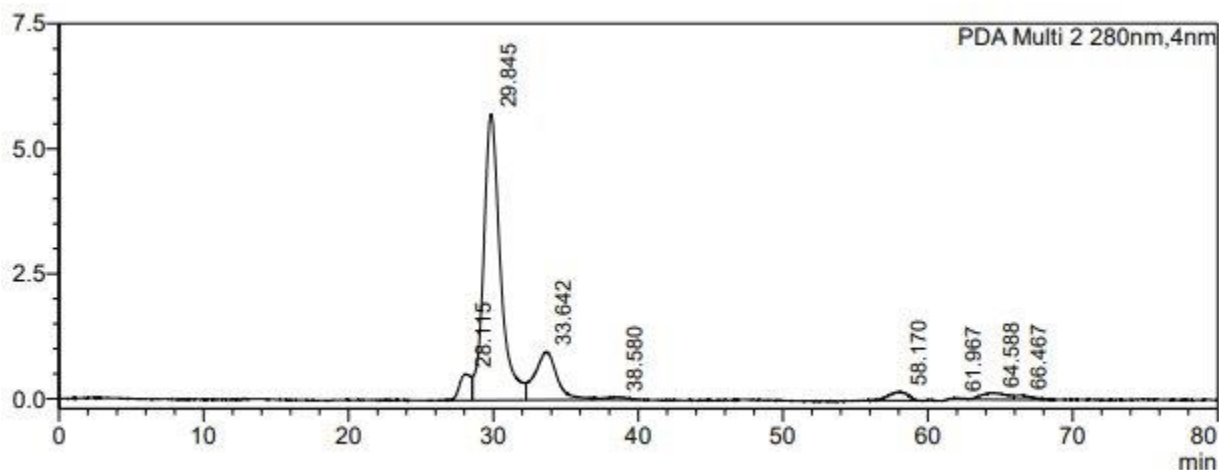
Kuva 6. Välituotteen **3** HPLC-kromatogrammi. Retentioaika 10–12 minuutin kohdalla.

3.1.2 Di-scFv1F4-TCO

Konjugaatio suoritettiin useaan otteeseen onnistuneesti kaavan 2 menetelmällä. Ensimmäisellä kerralla kun välituote **5** valmistettiin, niin puhdistaminen epäonnistui ja lopputuotteessa havaittiin erittäin paljon epäpuhtautta. Tämän vuoksi toisessa erässä keskityttiin paremman puhdistusmenetelmän löytämiseen. Taulukon 2 tulosten lisäksi välituotteen **5** analysoimiseksi saatiin kehitettyä luotettava puhdistusmenetelmä sekä SEC-HPLC-menetelmä.

Taulukko 2. Välituotteen **5** konjugointireaktion saannot ja konsentraatiot.

Erä	Saanto	Konsentraatio	Puhtaus
1.	43,1 %	0,993 mg/ml	95,5 %
2.	53,9 %	1,241 mg/ml	96,1 %
3.	44,9 %	4,420 mg/ml	92,9 %



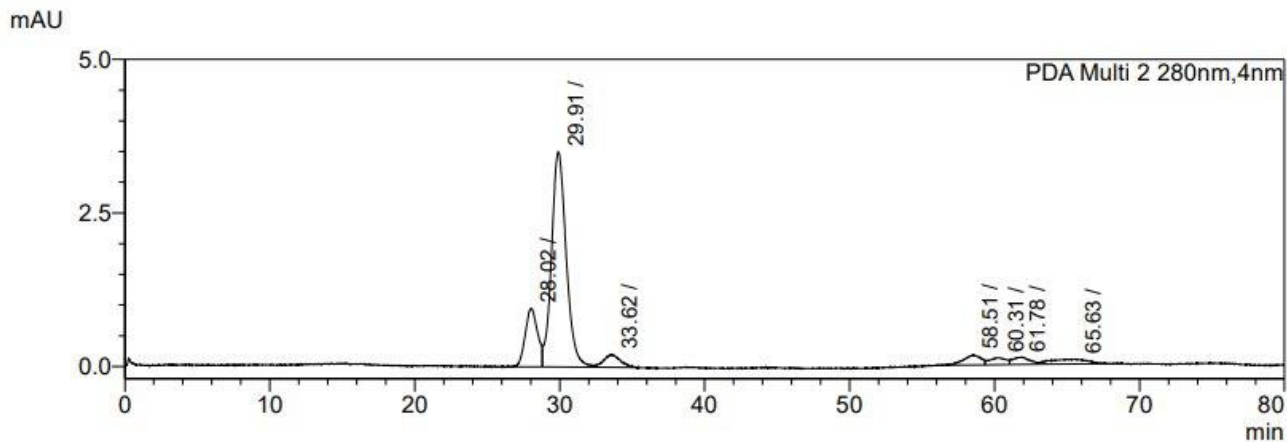
PDA Ch2 280nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	28.115	29017	523	4.548	6.834
2	29.845	460388	5719	72.165	74.672
3	33.642	103378	960	16.204	12.530
4	38.580	5757	55	0.902	0.723
5	58.170	15574	168	2.441	2.189
6	61.967	1265	23	0.198	0.301
7	64.588	16068	129	2.519	1.689
8	66.467	6520	81	1.022	1.062
Total		637966	7659	100.000	100.000

Kuva 7. Välituotteen **5** SEC-HPLC-tulokset konjugoinnin jälkeen, retentioaika 29–30 minuutin kohdalla

Kuvassa 7 nähdään onnistuneen välituotteen spektri, kyseisen näytteen Nanodrop-analyysitulokset olivat seuraavat; tilavuus = 50 µl, ainemäärä = 3,997 nmol ja konsentraatio = 4,420 mg/ml. Koko erän saanto oli 44,9 % ja puhtaus 92,9 %. Kuvasta 7 nähtävät piikit 1–3 tulevat tuotteesta ja piikit 4–8 ovat epäpuhtauksia.

3.1.3 DFO*-NCS-di-scFv1F4

Konjugaatioreaktio toisen lähtöainemolekyylin DFO*-NCS:n **6** kanssa saatiin myös onnistumaan. Konjugaatio suoritettiin vain kerran ja silloin saanto oli 50,9 % ja puhtaus oli 87,1 %. Samalla todennettiin, että SEC-HPLC ja puhdistusmenetelmä olivat toimivia. Kuvan 8 piikeistä 1–3 kuuluvat tuotteelle ja piikit 4–7 ovat epäpuhtauksia.



<Peak Table>

PDA Ch2 280nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Height%	Height
1	28.02	56091	15.3	18.564	951
2	29.91	246369	67.3	68.277	3498
3	33.62	16457	4.5	3.985	204
4	58.51	13868	3.8	3.158	162
5	60.31	9122	2.5	2.206	113
6	61.78	9622	2.6	2.294	118
7	65.63	14648	4.0	1.516	78
Total		366175	100.0	100.000	5124

Kuva 8. Välituotteen **7** SEC-HPLC-tulokset konjugoinnin jälkeen, retentioaika 29–30 minuutin kohdalla

Kuvassa 8. nähdään onnistuneen välituotteen spektri, kyseisen näytteen Nanodrop-analyysitulokset olivat seuraavat; tilavuus = 70 µl, ainemäärä = 4,531 nmol ja konsentraatio = 3,579 mg/ml.

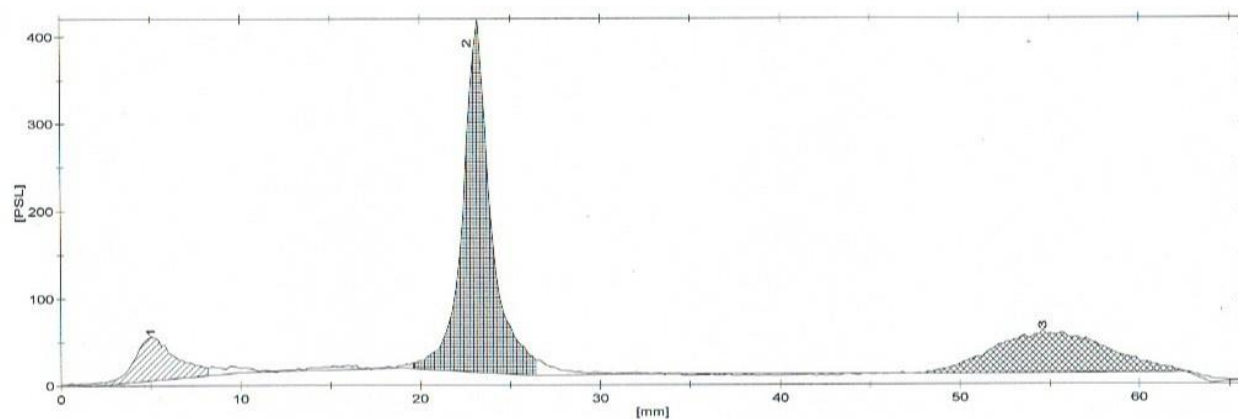
3.2 Radioleimaus

3.2.1 [^{89}Zr] Zr-DFO-PEG₅-Tz-TCO

Radioleimaus **3**:lle suoritettiin 13 kertaa vaihtelevin tuloksin. Tutkimuksen aikana myös testattiin leimausolosuhteiden muuttamista. Testattiin käyttää eri aloitusradioaktiivisuutta (2–20 MBq), eri määrää HEPES-puskuriliuosta, prekursoria **3** sekä etanoli-saliini-seosta radioleimausjälkeisessä puhdistuksessa. Tuotteelle **8** kehitettiin hyvä radio-TLC analyysimetodi ja HPLC-metodi. Radioaktiivisuudet, joilla radioleimausta suoritettiin, vaihtelivat välillä 2–25 MBq. Radiokemiallisten saannot vaihtelivat välillä 2–55 %. Radiokemialliset puhtaudet vaihtelivat välillä 16–78 %.

Taulukko 3. Lopputuotteen **8** radiokemialliset saannot ja puhtaudet. Erille 1. ja 2. suoritettiin erilainen TLC-menetelmä, joka todettiin huonoksi ja täten luotettavia tuloksia puhtauden suhteen ei saatu. Erät 10. ja 11. epäonnistuivat

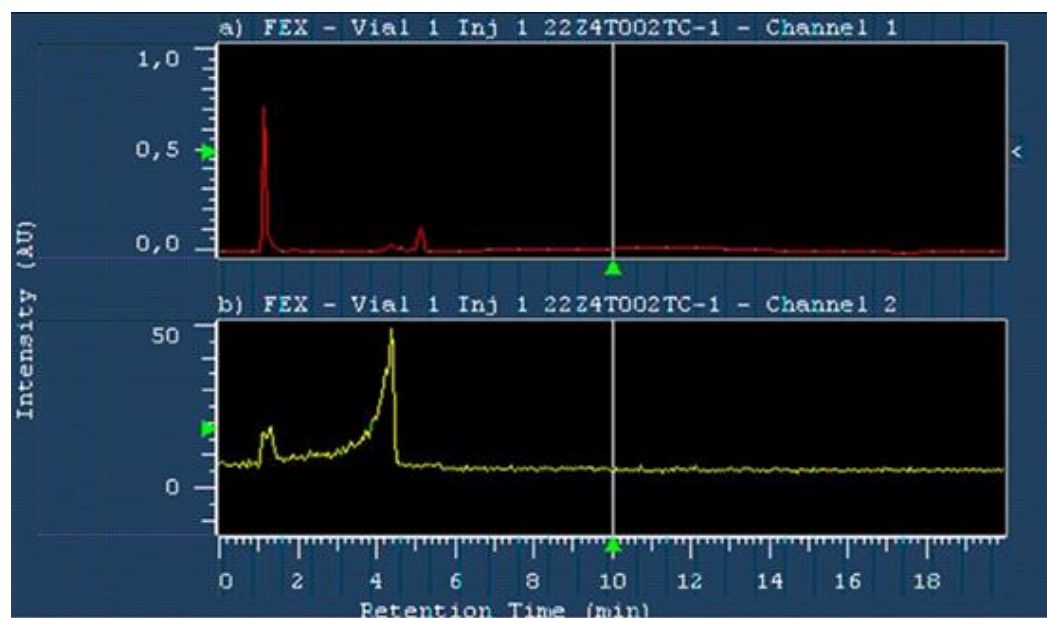
Erä	⁸⁹ Zr aloitus radioaktiivisuus (MBq)	Radiokemiallinen saanto (%)	Radiokemiallinen puhtaus (%)
1.	2,04	17,86	-
2.	4,18	44,38	-
3.	2,43	54,85	79,9
4.	2,25	47,26	19,6
5.	1,95	35,48	17,6
6.	19,68	34,91	60,1
7.	2,22	37,77	68,2
8.	10,09	7,56	9,2
9.	7,26	13,9	20,1
10.	13,89	4,3	-
11.	2,77	8,2	-
12.	20,30	9,02	61,7
13.	18,54	9,15	57,4



No	Width [mm]	Pos [mm]	PSL	%(PSL)	PSL/mm	PSL-Bkg	%(PSL-Bkg)	(PSL-Bkg)/mm
1	6.00	5.40	856.26	11.07	142.71	675.34	11.09	112.56
2	6.80	23.20	4178.62	54.01	614.50	3662.39	60.13	538.59
3	14.80	55.20	2702.28	34.93	182.59	1752.68	28.78	118.42
-	27.60	--	7737.17	100.00 *	280.33	6090.41	100.00 *	220.67
-	65.80	--	10411.98	134.57	158.24	6397.58	105.04	97.23

Kuva 9. Lopputuotteen 4 Radio-TLC-spektri. Leimatun tuotteen piikki havaitaan 20–27 mm välissä.

Kun lopputuote 8 saatiin onnistuneesti radioleimattua, saatiin radio-TLC:n tuloksena kuvassa 9 nähtävä kromatogrammi. Kuvassa lopputuote 4 nähdään kulkeutuneen 23 mm kohdalle ja sen RCP on 54 %. Kromatogrammissa loppuun asti on kulkeutunut vapaa zirkonium-89.



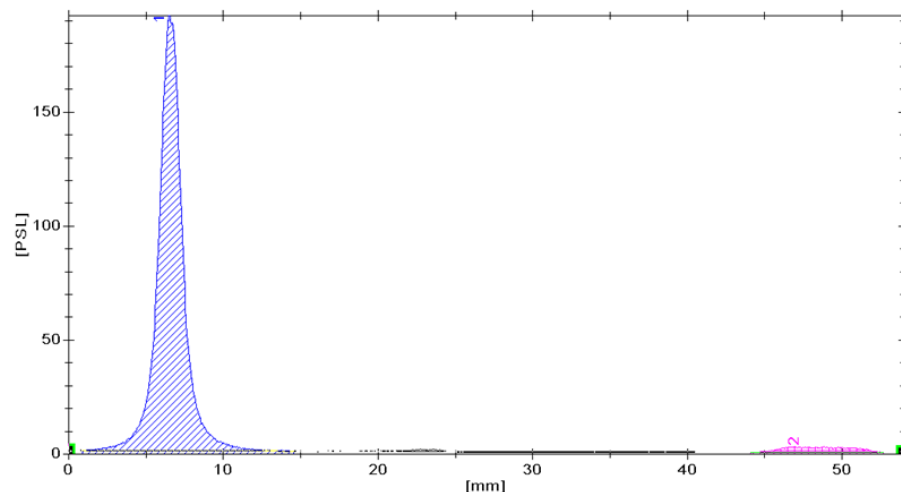
Kuva 10. Lopputuotteen 8 Radio-HPLC-kromatogrammi. Tuote havaitaan 4 minuutin kohdalla.

Kuvassa 10. nähdään hyvä HPLC-kromatogrammi. Kuvassa keltainen väri on radioaktiivisuutta mittaavan detektorin kanava ja punainen on UV-kanava. Tuotteessa nähdään korkea radioaktiivisuus eli leimaaminen on onnistunut. Kromatogrammin alussa nähdään vapaa zirkonium-89 jonka aktiivisuus taas ei ole kovin korkea.

Radioleimauksen toisessa vaiheessa oli tarkoitus sitoa vasta-ainefragmentin sisältävä molekyyli **5** ensimmäisessä vaiheessa radioleimattuun välituotteeseen **8**. Näin oli tarkoitus valmistaa suunniteltu lopputuote **10**. Tässä ei kuitenkaan onnistuttu tutkimuksen aikana kertaakaan. Luonnollisesti ei kyetty suorittamaan myöskään stabiilisuustestejä.

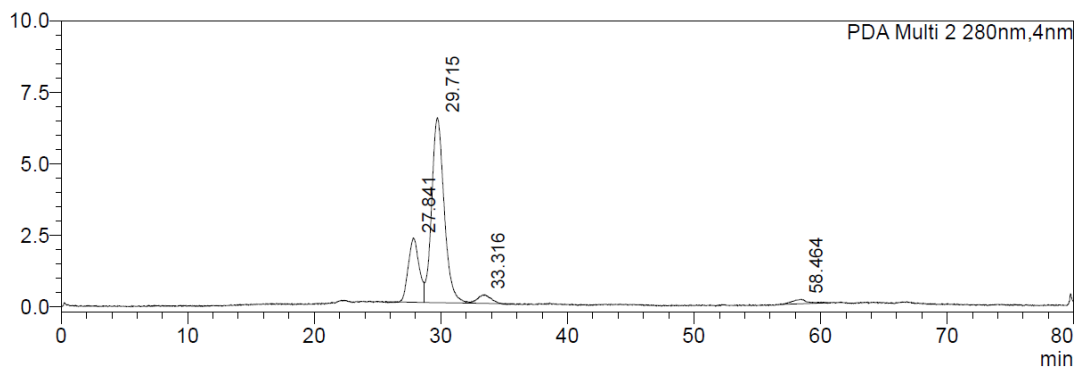
3.2.2 [^{89}Zr] Zr-DFO*-NCS-di-scFv1F4

Toisen molekyylin **7** kanssa suoritettu radioleimaus oli yksivaiheinen suoraleimaus, joka suoritettiin kaavan 6 mukaisesti. Radioleimaus suoritettiin kerran ja saatiin onnistumaan. Radiokemiallinen saanto oli 50.2 % ja radiokemiallinen puhtaus > 95 %.



Width [mm]	PSL	PSL/mm	%(PSL/mm)	PSL-Bkg	%(PSL-Bkg)	%(PSL-Bkg)/mm
13.65	7422.48	543.77	154.79	7422.48	95.17	154.79
8.55	376.33	44.02	12.53	376.33	4.83	12.53
22.20	7798.81	351.30	100.00 *	7798.81	100.00 *	100.00 *
54.00	8423.31	155.99	44.40	8423.31	108.01	44.40

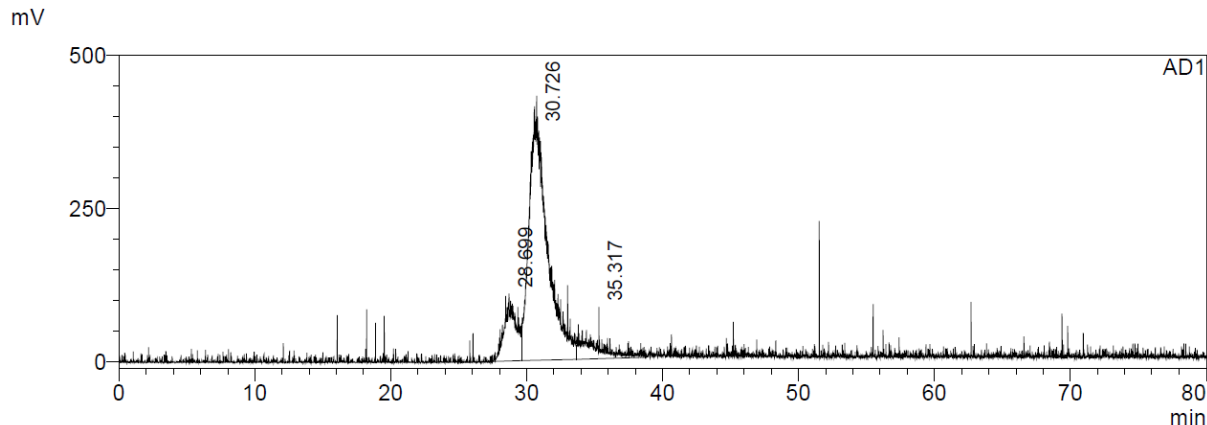
Kuva 11. Lopputuotteen 9 Radio-TLC-spektri. Leimatun tuotteen piikki havaitaan 0–12 mm välissä.



PDA Ch2 280nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Height	Height%
1	27.841	132861	21.662	2245	24.529
2	29.715	445551	72.644	6455	70.526
3	33.316	21880	3.567	298	3.260
4	58.464	13046	2.127	154	1.685
Total		613338	100.000	9153	100.000

Kuva 12. Lopputuotteen 9 SEC-HPLC-kromatogrammi. Retentioaika 29–30 minuutin välillä.



AD1

Peak#	Ret. Time	Area	Area%	Height	Height%
1	28.699	6370059	13.144	109915	17.589
2	30.726	37942913	78.294	431200	69.004
3	35.317	4149188	8.562	83781	13.407
Total		48462160	100.000	624896	100.000

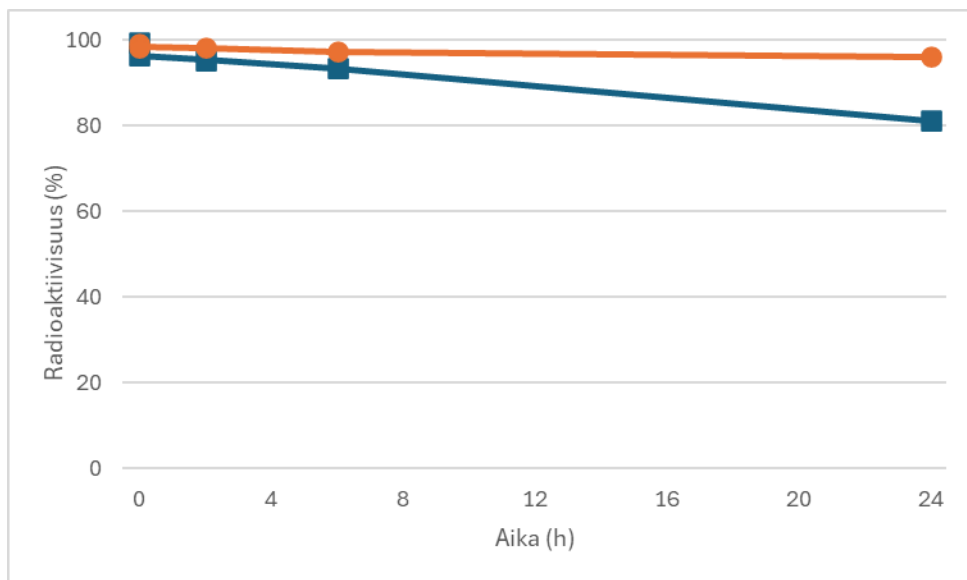
Kuva 13. Lopputuotteen 9 Radio-SEC-HPLC-kromatogrammi. Retentioaika 29–30 minuutin välillä.

3.3 Stabiilisuustestit

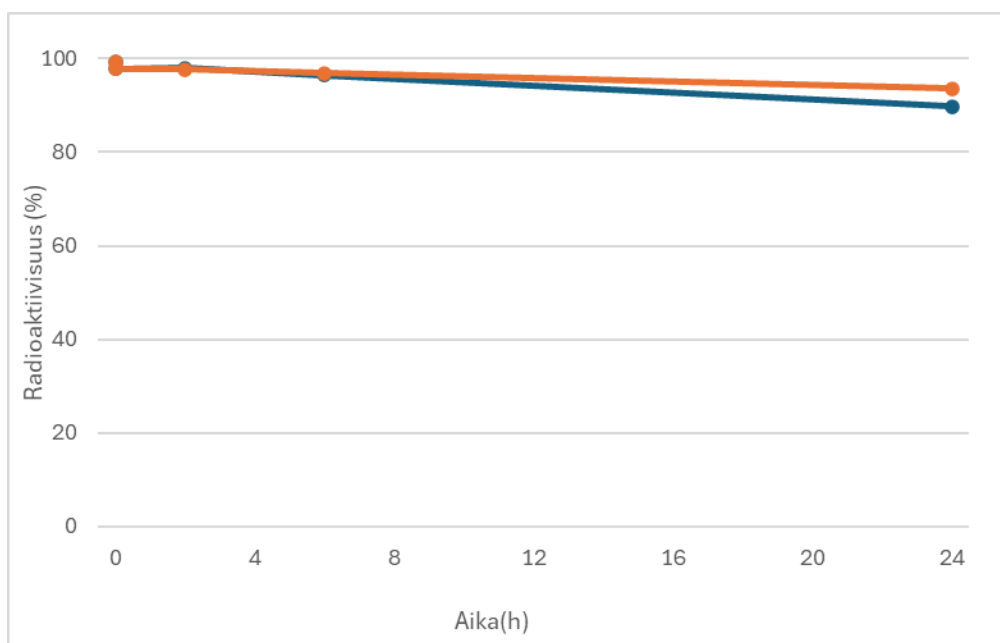
3.3.1 [^{89}Zr] Zr-DFO*-NCS-di-scFv1F4

Stabiilisuustesteissä käytettiin erää, jonka spektrit ja kromatogrammit on esitetty kuvissa 11–13.

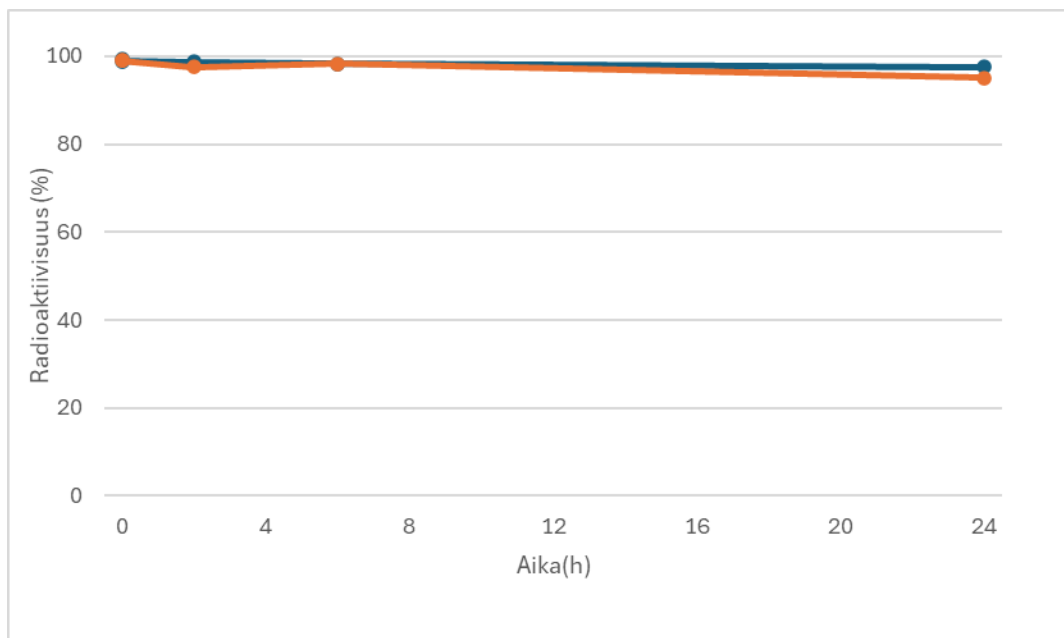
Lopputuotelle 9 suoritettujen stabiilisuustestien tuloksista kuvaajissa 14–16 nähdään että tuotteen kestävyys kelaattoriympäristössä oli erinomainen. Vuorokauden altistumisen jälkeen >90 % tuotteesta pysyi hajoamatta. Lisäksi havaittiin, että transkelaatiota tapahtuu herkemmin happamissa olosuhteissa. Tuotteen 9 kestävyys taas metalliympäristössä oli huomattavasti huonompi. Kuvaajista havaitaan että 20 % tuotteesta oli vapauttanut zirkonium-89 radionuklidin.



Kuva 14. Oranssi = kontrolli, sininen = FeCl_3 -ympäristö (0,5 mM).



Kuva 15. Oranssi = kontrolli, sininen = 5,5 pH EDTA-ympäristö (26 μM).



Kuva 16. Oranssi = kontrolli, sininen = 7,0 pH EDTA-ympäristö (26 μ M).

4. Johtopäätökset

Prekursori **3** saatiin valmistettua, mutta sen synteesi ja puhdistus olivat haastavia. Lisäksi saanto ei ollut kovin suuri. Kuten aiemmin mainittiin, työssä suoritettiin paljon puhdistusta, kuivausta ja analysointia välituotteelle **3**. Jatkotutkimuksissa olisi hyvä pyrkiä valmistamaan tuote niin, että mahdollisimman vähän näitä välivaiheita tarvitsisi suorittaa, jotta välituotteen **3** puhtaus ja saanto nousisi. Prekursorille optimoitu HPLC-menetelmä todettiin hyväksi koska välituote **3** saatiin toistettavasti ja selkeällä piikillä havaittua 10–12 min kohdalla.

Tuote **8** saatiin useampaan otteeseen radioleimattua vaihtelevin tuloksin. Näiden tuotteiden puhtaus ja saanto vaihteli todennäköisesti jo valmiiksi ei-puhtaan prekursori **3**:n vuoksi. Nämä epäpuhtaudet selittäisivät myös miksi radio-TLC-tuloksissa havaittiin joskus vapaan ^{89}Zr ja tuotteen lisäksi kolmas piikki. Tämä voisi mahdollisesti olla jokin DFO-rungon omaava epäpuhtaus, johon ^{89}Zr sitoutuu. Radioleimausten ohessa onnistuttiin löytämään selkeitä piikkejä tuottavat radio-HPLC- ja radio-TLC-menetelmät.

Lopputuote **9** saatiin valmistettua ja stabiilisuustestit suoritettua. Testien tuloksia vertaamalla kirjallisuudessa^{73,74} oleviin tuloksiin voidaan todeta, että ne ovat hyväksyttävät. Tuote on juuri niin kestävä, kuin hypoteesissa ajateltiin ja voidaan sanoa, että lopputuote **9** kestäisi hyvin *in vivo*

ympäristöjä. Tämän tuotteen tutkimista kannattaa jatkaa jatkotutkimuksin. Synteesi suoritettiin vain kerran, joten olisi hyvä varmistaa, että nykyinen metodi on toistettava. Jos synteesireitti todetaan toistettavaksi, niin voitaisiin harkita eläinkokeita. Voitaisiin myös harkita toisen vasta-ainefragmentin tai radionuklidin käyttöä.

5. Viitteet

1. Mahner, S.; Schirmacher, S.; Brenner, W.; Jenicke, L.; Habermann, C. R.; Avril, N.; Dose-Schwarz, J. Comparison between positron emission tomography using 2-[fluorine-18] fluoro-2-deoxy-D-glucose, conventional imaging and computed tomography for staging of breast cancer. *Ann. Oncol.* **2008**, *19*, 1249-1254. DOI: 10.1093/annonc/mdn057.
2. Rusu, G. A comparative study between 18f-fdg pet/ct and conventional imaging in the evaluation of progressive disease and recurrence in ovarian carcinoma. *Healthcare (Switzerland)* [online] **2021**, DOI: 10.3390/healthcare9060666. Saatavilla: <https://www.mdpi.com/2227-9032/9/6/666> (Viitattu 24.5.2026)
3. Wabik, A. *et al.* Comparison of dynamic susceptibility contrast enhanced MR and FDG-PET brain studies in patients with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *J. Transl. Med.* **2022**, DOI: 10.1186/s12967-022-03464-x. Saatavilla: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35672750/> (Viitattu 24.5.2026)
4. Kaprelyan, A.; Bochev, P.; Deleva, N.; Klissarova, A.; Geneva, S.; Tzoukeva, A. A Comparisson of (18)F FDG-PET, Morphological Neuroimaging and EEG Findings in Epilepsy. *Scr. Sci. Med.* **2010**, *42*, 177–180.
5. Vandehey, N. T.; Garell, P. C.; Hampel, J. A.; Murali, D.; Smith, E.; Davidson, R.; Converse, A. K.; Nickels, R. J.; Christian, B. T. J. PET measurement of changes in D2/D3 dopamine receptor binding in a nonhuman primate during chronic deep brain stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Neurosci. Methods.* **2009**, *176*, 129-135. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.08.03
6. Shukla, A. K. & Kumar, U. Positron Emission Tomography: An Overview. *J. Med. Phys.* **2006**, *31*, 13-21. DOI: 10.4103/0971-6203.25665.
7. Jødal, L.; Le Loirec, C.; Champion, C. Positron range in PET imaging: non-conventional isotopes. *Phys. Med. Biol.* **2014**, *59*, 7419–7434. DOI: 10.1088/0031-9155/59/23/7419
8. van Sluis, J. Extending the clinical capabilities of short- and long-lived positron-emitting radionuclides through high sensitivity PET/CT. *Cancer Imaging* **2022**, DOI: 10.1186/s40644-022-00507-w. Saatavilla: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36527149/> (Viitattu 24.5.2026)
9. Conti, M.; Eriksson, L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: A review and a discussion. *EJNMMI Phys.* **2016**, DOI: 10.1186/s40658-016-0144-5. Saatavilla: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27271304/> (Viitattu 24.5.2026)
10. Holik, H. A. The Chemical Scaffold of Theranostic Radiopharmaceuticals: Radionuclide, Bifunctional Chelator, and Pharmacokinetics Modifying Linker. *Molecules* **2022**, DOI: 10.3390/molecules27103062. Saatavilla: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/10/3062> (Viitattu 24.5.2026)

11. Almuhaideb, A.; Papathanasiou, N.; Bomanji, J. 18F-FDG PET/CT Imaging In Oncology. *Ann. Saudi. Med.* **2011**, 31, 3–13. DOI: 10.4103/0256-4947.75771
12. Hsu, P. P.; Sabatini, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* **2008**, 134, 703–707. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.021
13. Reivich, M.; Kuhl, D.; Wolf, A.; Greenberg, J.; Phelps, M.; Ido, T.; Casella, V.; Fowler, J.; Hoffman, E.; Alavi, A.; Som, P.; Sokoloff, L. The [18F] Fluorodeoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization in Man. *Circ. Res.* **1979**, 44, 127–137.
14. Li, X. F.; Ma, Y.; Sun, X.; Humm, J. L.; Ling, C. C.; O'Donoghue, J. A. High 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) uptake in microscopic peritoneal tumors requires physiological hypoxia. *J. Nucl. Med.* **2010**, 51, 632–638. DOI: 10.2967/jnumed.109.071233
15. Gabriel, M.; Decristoforo, C.; Kendler, D.; Dobrozemsky, G.; Heute, D.; Uprimny, C.; Kovacs, P.; Von Guggenberg, E.; Bale, R.; Virgolini, I. J. 68Ga-DOTA-Tyr3-Octreotide PET in Neuroendocrine Tumors: Comparison with Somatostatin Receptor Scintigraphy and CT. *J. Nucl. Med.* **2007**, 48, 508–518. DOI: 10.2967/jnumed.106.035667
16. Rösch, F.; Pfannkuchen, N. Novel radiolabeled bisphosphonates for PET diagnosis and endoradiotherapy of bone metastases. *Pharmaceuticals* **2017**, DOI: 10.3390/ph10020045. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5490402/> (Viitattu 24.5.2026)
17. Ulaner, G. A.; Hyman, D. M.; Lyashchenko, S. K.; Lewis, J. S.; Carrasquillo, J. A. 89Zr-trastuzumab PET/CT for detection of HER2-positive metastases in patients with HER2-negative primary breast cancer. *Clin. Nucl. Med.* **2017**, 42, 912–917. DOI: 10.1097/RLU.0000000000001820
18. Miller, P. W.; Aboagye, E. O.; Fu, R.; Carroll, L.; Yahiloglu, G. Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications. *ChemMedChem.* **2018**, 13, 2466–2478. DOI: 10.1002/cmdc.201800624
19. Wu, A. M. J. Antibodies and Antimatter: The Resurgence of Immuno-PET. *Nucl. Med.* **2009**, 50, 2–5. DOI: 10.2967/jnumed.108.056887
20. Wuest, F.; Koehler, L.; Gagnon, K.; McQuarrie, S. Iodine-124: A promising positron emitter for organic PET chemistry. *Molecules* **2010**, 15, 2686–2718. DOI: 10.3390/molecules15042686.
21. Smith-Jones, P. M.; Solit, D.; Afroze, F.; Rosen, N.; Larson, S. M. Early Tumor Response to Hsp90 Therapy Using HER2 PET: Comparison with 18F-FDG PET. *J. Nucl. Med.* **2006**, 47, 793–796.
22. Takano, S.; Inaki, A.; Hirata, K.; Sparks, R. B.; Sato, M.; Nomura, S.; Hattori, T.; Kambara, H.; Nguyen, Q.; Shiga, T.; Kinuya, S.; Hosono, M. Pharmacokinetics and dosimetry of [177Lu]Lu-PSMA-617 and [68Ga]Ga-PSMA-11 in Japanese patients with PSMA-positive mCRPC. *Ann. Nucl. Med.* **2025**, 39, 1201–1212. DOI: 10.1007/s12149-025-02079-8
23. Liu, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2008**, 60, 1347–1370. DOI: 10.1016/j.addr.2008.04.006

24. De Rosales, R. T. M.; Pellico, J.; Gawne, P. J. Radiolabelling of nanomaterials for medical imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 3355–3423. DOI: 10.1039/d0cs00384k
25. Brechbiel, M. W. Bifunctional Chelates for Metal Nuclides. *J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2008**, 52, 166-173.
26. Severin, G. W.; Engle, J. W. ⁸⁹Zr Radiochemistry for Positron Emission Tomography. *Med. Chem.* **2011**, 41, 389–394. DOI: 10.2174/157340611796799186
27. Baruta, S.; Niculae, D. Optimized production of ⁸⁹Zr as a medical radioisotope on a variable energy cyclotron and external beamline. *EJNMMI Phys.* **2025**, DOI: 10.1186/s40658-025-00755-2. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12069782/> (Viitattu 24.5.2026)
28. Lewis, J. S.; Deri, M. A.; Zeglis, B. M.; Francesconi, L. C. PET imaging with ⁸⁹Zr: From radiochemistry to the clinic. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, 40, 3–14. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2012.08.004
29. Perk, L. R.; Visser, G. W. M.; Vosjan, M. J. W. D.; Walsum, M. S.; Tijink, B. M.; Leemans, C. R.; Van Dongen, G. A. M. S. Zr as a PET Surrogate Radioisotope for Scouting Biodistribution of the Therapeutic Radiometals ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu in Tumor-Bearing Nude Mice After Coupling to the Internalizing Antibody Cetuximab. *J. Nucl. Med.* **2005**, 26, 1898-1906.
30. Aerts, H. J. W. L.; Dubois, L.; Perk, L.; Vermaelen, P.; Van Dongen, G. A. M. S.; Wouters, B. G.; Lambin, P. J. *Disparity between in vivo EGFR expression and ⁸⁹Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET.* *Nucl. Med.* **2009**, 50, 123–131. DOI: 10.2967/jnumed.108.054312
31. Holland, J. P.; Divilov, V.; Bander, N. H.; Smith-Jones, P. M.; Larson, S. M.; Lewis, J. S. ⁸⁹Zr-DFO-J591 for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo. *J Nucl. Med.* **2010**, 51, 1293–1300. DOI: 10.2967/jnumed.110.076174
32. Abou, D. S.; Thorek, D. L. J.; Ramos, N. N.; Pinkse, M. W. H.; Wolterbeek, H. T.; Carlin, S. D.; Beattie, B. J.; Lewis, J. S. ⁸⁹Zr-labeled paramagnetic octreotide-liposomes for PET-MR imaging of cancer. *Pharm. Res.* **2013**. DOI: 10.1007/s11095-012-0929-8. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3578092/> (Viitattu 24.5.2026)
33. Bradbury, M. S.; Wiesner, U.; Chen, F.; Ma, K.; Zhang, L.; Madajewski, B.; Zanzonico, P.; Sequeira, S.; Gonen, M. Target-or-clear zirconium-89 labeled silica nanoparticles for enhanced cancer-directed uptake in Melanoma: A comparison of radiolabeling strategies. *Chem. Mater.* **2017**, 29, 8269–8281. DOI: 10.1021/acs.chemmater.7b02567
34. De Rosales, R. T. M.; Khan, A. A.; Man, F.; Faruqu, F. N.; Kim, J.; Al-Saleme, F.; Carrascal-Minino, A.; Volpe, A.; Liam-Or, R.; Simpson, P.; Fruhwirth, G. O.; Al-jamal, K. T. PET Imaging of Small Extracellular Vesicles via [⁸⁹Zr]Zr(oxinate)₄ Direct Radiolabeling. *Bioconjug. Chem.* **2022**, 33, 473–485. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00597
35. Dijkers, E. C.; Oude Munnink, T. H.; Kosterink, J. G.; Brouwers, A. H.; Jager, P. L.; De Jong, J. R.; Van Dongen, G. A.; Schröder, C. P.; Lub-De Hooge, M. N.; De Vries, E. G. Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET Imaging of HER2-Positive Lesions in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, 87, 586–592. DOI: 10.1038/clpt.2010.12
36. Denat, F.; Heskamp, S. Raave, R.; Boerman, O.; Rijpkema, M.; Goncalves, V. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28, 2211–2223.

37. Yoon, J. K. Current perspectives on ⁸⁹Zr-PET imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, DOI: 10.3390/ijms21124309. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7352467/> (Viitattu 24.5.2026)
38. McKnight, B. N. & Viola-Villegas, N. T. ⁸⁹Zr-ImmunoPET companion diagnostics and their impact in clinical drug development. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2018**, DOI: 10.1002/jlcr.3605. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6050145/> (Viitattu 24.5.2026)
39. Dubois, J. Clinical nuclear medicine applications of zirconium-89 immuno-PET: a comprehensive review from a radiopharmaceutical perspective. *EJNMMI Radiophar. Chem.* **2026**, DOI: 10.1186/s41181-025-00418-8. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC13100247/> (Viitattu 24.5.2026)
40. Alzimami, K. S.; Ma, A. K. Effective dose to staff members in a positron emission tomography/ct facility using zirconium-89. *Br. J. Radiol.* **2013**, 86,1-8. DOI: 10.1259/bjr.20130318
41. Mindt, T. L.; Gasser, G.; Patra, M.; Bauman, A.; Mari, C.; Fischer, C. A.; Blacque, O.; Häussinger, D. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 11523–11525. DOI: 10.1039/c4cc05558f
42. Vugts, D. J.; Klaver, C.; Sewing, C.; Poot, A. J.; Adamzek, K.; Huegli, S.; Mari, C.; Visser, G. W. M.; Valverde, I. E.; Gasser, G.; Mindt, T. L.; Van Dongen, G. A. M. S. Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO*-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-pPhe-NCS for ⁸⁹Zr-immuno-PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, 44, 286–295. DOI: 10.1007/s00259-016-3499-x
43. Oliveira, B. L.; Bernardes, G. J. L.; Guo, Z. Inverse electron demand Diels-Alder reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4895–4950. DOI: 10.1039/c7cs00184c
44. Knall, A. C.; Slugovc, C. Inverse electron demand Diels-Alder (IEDDA)-initiated conjugation: A (high) potential click chemistry scheme. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 5131–5142. DOI: 10.1039/c3cs60049a
45. Pagel, M. Inverse electron demand Diels–Alder (IEDDA) reactions in peptide chemistry. *J. Pept. Sci.* **2019**, DOI: 10.1002/psc.3141. Saatavilla: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/psc.3141> (Viitattu 24.5.2026)
46. Seimbille, Y.; Handula, M.; Chen, K. T. Iedda: An attractive bioorthogonal reaction for biomedical applications. *Molecules.* **2021**, DOI: 10.3390/molecules26154640. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8347371/> (Viitattu 24.5.2026)
47. Lumen, D.; Vugts, D.; Chomet, M.; Imlimthan, S.; Sarparanta, M.; Vos, R.; Schreurs, M.; Verlaan, M.; Lang, P. A.; Hippeläinen, E.; Beaino, W.; Windhorst, A. D.; Airaksinen, A. J. Pretargeted PET Imaging with a TCO-Conjugated Anti-CD44v6 Chimeric mAb U36 and [⁸⁹Zr]Zr-DFO-PEG5-Tz. *Bioconjug. Chem.* **2022**, 33, 956–968. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.2c00164
48. Ruivo, E.; Adhikari, K.; Elvas, F.; Fissers, J.; Vangestel, C.; Staelens, S.; Stroobants, S.; Van der Veken, P.; Wyffels, L.; Augustyns, K. Improved stability of a novel fluorine-18 labeled TCO analogue for pretargeted PET imaging. *Nucl. Med. Biol.* **2019**, 76–77, 36–42. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2019.11.001

49. Sarparanta, M.; Keinänen, O. Pretargeting of internalizing trastuzumab and cetuximab with a ¹⁸F-tetrazine tracer in xenograft models. *EJNMMI Res.* **2017**, DOI: 10.1186/s13550-017-0344-6. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5712296/> (Viitattu 24.5.2026)
50. de Lucas, Á. G. ImmunoPET Directed to the Brain: A New Tool for Preclinical and Clinical Neuroscience. *Biomolecules.* **2023**, DOI: 10.3390/biom13010164. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9855881/> (Viitattu 24.5.2026)
51. Teleanu, R. I. Current Strategies to Enhance Delivery of Drugs across the Blood–Brain Barrier. *Pharmaceutics.* **2022**, DOI: 10.3390/pharmaceutics14050987. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9145636/> (Viitattu 24.5.2026)
52. Veronese, F. M. *Peptide and Protein PEGylation: A Review of Problems and Solutions.* *Biomaterials.* **2001**, 22, 205–417.
53. Andrieux, K.; Kim, H. R.; Gil, S.; Nicolas, V.; Appel, M.; Desmaele, D.; Taran, F.; Georgin, D.; Couvreur, P. Low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis of PEGylated nanoparticles in rat brain endothelial cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, 64, 356–364. DOI: 10.1007/s00018-007-6390-x
54. Truillet, C.; Tran, V. L.; Novell, A.; Tournier, N.; Gerstenmayer, M.; Schweitzer-Chaput, A.; Mateos, C.; Jegou, B.; Bouleau, A.; Nozach, H.; Winkeler, A.; Kuhnast, B.; Larrat, B. Impact of blood-brain barrier permeabilization induced by ultrasound associated to microbubbles on the brain delivery and kinetics of cetuximab: An immunoPET study using ⁸⁹Zr-cetuximab. *J. Control. Release.* **2020**, 328, 304–312. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.08.047
55. Zhang, W. Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human. *Fluids Barriers CNS.* **2020**, DOI: 10.1186/s12987-020-00209-0. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7376922/> (Viitattu 24.5.2026)
56. Battisti, U. M.; Kjaer, A.; Herth, M. M.; Gustavsson, T.; Kustermann, T.; Hvass, L.; Wuensche, T. E.; Clausen, A. S.; Stotz, S.; Shalgunov, V.; Van den Broek, S. L.; Knudsen, G. M.; Aldana, B.; Ferri, E.; Cannazza, G.; Niewoehner, J.; Gobbi, L.; Honer, M. Pretargeted Immuno-PET Enables Monoclonal Antibody Imaging Beyond the Blood–Brain Barrier. *Mol. Pharm.* **2025**, 22, 7600–7610. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5c01180
57. Wuensche, T. E.; Vugts, D. J.; Stergiou, N.; Mes, I.; Verlaan, M.; Schreurs, M.; Kooijman, E. J. M.; Janssen, B.; Windhorst, A. D.; Jensen, A.; Asuni, A. A.; Bang-Andersen, B.; Beaino, W.; Van Dongen, G. A. M. S. Advancing ⁸⁹Zr-immuno-PET in neuroscience with a bispecific anti-amyloid-beta monoclonal antibody – the choice of chelator is essential. *Theranostics.* **2022**, 12, 7067–7079. DOI: 10.7150/thno.73509
58. Wuensche, T. E.; Vugts, D.J. New prospects for ⁸⁹Zr-immuno-PET in brain applications – Alpha-synucleinopathies. *Nucl. Med. Biol.* **2025**, DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2024.108969. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969805124000957?via%3Dihub> (Viitattu 24.5.2026)
59. Verel, I.; Visser, G. W. M.; Boellaard, R.; Walsum, M. S.; Snow, G. B.; Van Dongen, G. A. M. S. *⁸⁹Zr Immuno-PET: Comprehensive Procedures for the Production of ⁸⁹Zr-Labeled Monoclonal Antibodies.* *J. Nucl. Med.* **2003**, 44, 1271–1281.

60. Seo, J. W.; Ferrara, K. W. The pharmacokinetics of Zr-89 labeled liposomes over extended periods in a murine tumor model. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2014.09.001. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4281498/> (Viitattu 24.5.2026)
61. Den Hollander, M. W.; Bensch, F.; Glaudemans, A. W. J. M.; Oude Munnink, T. H.; Enting, R. H.; Den Dunnen, W. F. A.; Heesters, M. A. A. M.; Kruijt, F. A. E.; Lub-de Hooge, M. N.; Cees de Groot, J.; Pearlberg, J.; Gietema, J. A.; De Vries, E. G. E.; Walenkamp, A. M. E. TGF- β antibody uptake in recurrent high-grade glioma imaged with ⁸⁹Zr-fresolimumab PET. *J. Nucl. Med.* **2015**, 56, 1310–1314. DOI: 10.2967/jnumed.115.154401
62. Jansen, M. H.; Veldhuijzen van Zanten, S. E. M.; Van Vuurden, D. G.; Huisman, M. C.; Vugts, D. J.; Hoekstra, O. S.; Van Dongen, G. A.; Kaspers, G. L. Molecular Drug Imaging: ⁸⁹Zr-Bevacizumab PET in Children with Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *J. Nucl. Med.* **2017**, 58, 711–716. DOI: 10.2967/jnumed.116.180216
63. Verel, I.; Visser, G. W. M.; Boerman, O. C.; Van Eerd, J. E. M.; Finn, R.; Boellaard, R.; Vosjan M. J. W. D.; Stigter-van Walsum, M.; Snow, G. B.; Van Dongen, G. A. M. S. *Long-Lived Positron Emitters Zirconium-89 and Iodine-124 for Scouting of Therapeutic Radioimmunoconjugates with PET. Cancer Biother. Radiopharm.* **2003**, 18, 655-661.
64. Sehlin, D.; Syvänen S. Engineered antibodies: new possibilities for brain PET? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **2019**, 46, 2848–2858. DOI: 10.1007/s00259-019-04426-0
65. Engelhardt, B.; Kissel, K.; Hamm, S.; Schulz, M.; Vecchi, A.; Garlanda, C. Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem. Cell. Biol.* **1998**, 110, 63-72.
66. Hultqvist, G.; Syvänen, S.; Fang, X. T.; Lannfelt, L.; Sehlin, D. Bivalent brain shuttle increases antibody uptake by monovalent binding to the transferrin receptor. *Theranostics.* **2017**, 7, 308–318. DOI: 10.7150/thno.17155
67. Ghit, A. GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2021**, DOI: 10.1186/s43141-021-00224-0. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8380214/> (Viitattu 24.5.2026)
68. Pericak-Vance, M. A.; Collins, A. L.; Ma, D.; Whitehead, P. L.; Martin, E. R.; Wright, H. H.; Abramson, R. K.; Hussman, J. P.; Haines, J. L.; Cuccaro, M. L.; Gilber, J. R. Investigation of autism and GABA receptor subunit genes in multiple ethnic groups. *Neurogenetics.* **2006**, 7, 167–174. DOI: 10.1007/s10048-006-0045-1
69. Macdonald, R. L., Kang, J. Q.; Gallagher, M. J. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J. Physiol.* **2010**, 588, 1861–1869. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.186999
70. Xu, Y. GABAergic Inhibitory Interneuron Deficits in Alzheimer’s Disease: Implications for Treatment. *Front. Neurosci.* **2020**, DOI: 10.3389/fnins.2020.00660. Saatavilla: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7344222/> (Viitattu 24.5.2026)
71. Marques, T. R.; Ashok, A. H.; Angelescu, I.; Borgan, F.; Myers, J.; Lingford-Hughes, A.; Nutt, D. J.; Veronese, M.; Turkheimer, F. E.; Howes, O. D. GABA-A receptor differences in schizophrenia: a positron emission tomography study using [¹¹C] Ro154513. *Mol. Psychiatry.* **2021**, 26, 2616–2625. DOI: 10.1038/s41380-020-0711-y

72. García de Lucas, Á.; Airaksinen, A. J.; Lopez-Picon, F.; Samani, N. A.; Moisio, O.; Kovacs, L.; Savela, R.; Soini, S. L.; Oksanen, S.; Helin, J. S.; Rajander, J.; Lamminmäki, U. Fluorine-18 Radiolabeled Single-Chain Antibody Variable Fragment 1F4 Targets α 1-Subunit Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptors in Mice. *J. Med. Chem.* **2026**, 69, 4288–4302. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5c02984
73. Wängler, B. Side-by-Side Comparison of Five Chelators for ^{89}Zr -Labeling of Biomolecules: Investigation of Chemical/Radiochemical Properties and Complex Stability. *Cancers*. **2021**, DOI: 10.3390/cancers13246349. Saatavilla: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/24/6349> (Viitattu 24.5.2026)
74. Vugts, D. J.; Chomet, M.; Schreurs, M.; Bolijn, M. J.; Verlaan, M.; Beaino, W.; Brown, K.; Poot, A. J.; Windhorst, A. D.; Gill, H.; Marik, J.; Williams, S.; Cowell, J.; Gasser, G.; Mindt, T. L.; Van Dongen, G. A. M. S. Head-to-head comparison of DFO* and DFO chelators: selection of the best candidate for clinical ^{89}Zr -immuno-PET. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. **2021**, 28, 694–707. DOI: 10.1007/s00259-020-05002-7

6. Liitteet

Liite 1. DFO-PEG₅-Tz **3** ¹H-NMRx§

