

Részletes zárójelentés

A daganatos kórfolyamatok diagnosztikus eszköztárában a molekuláris leképező eljárások jelentik jelenleg a leghatékonyabb módszereket. A pozitronemissziós tomográfia (PET) diagnosztikában jelenleg általánosan használt radiofarmakonok nem kizárólag egyes kórképre specifikus kölcsönhatások alapján dúsulnak a tumoros szövetekben. A daganatoknak ennél pontosabb, a környező normális szövetektől *in vivo* jelzéssel történő elkülönítésére és felismerésére elméletileg lehetőséget ad a malignusan transzformált sejtek egyedi fehérjestruktúráinak megjelenése, vagy az egészséges sejtekben csak kis mennyiségben található proteinek megemelkedett expressziója. A rendelkezésre álló kutatási eredmények azt mutatják, hogy a különböző humán tumorsejtek jelentős hányada expresszálja a luteinizáló hormon-releasing hormon- (LH-RH), a szomatosztatin- vagy a bombesin/ gasztrin releasing peptid (GRP) receptorok valamelyikét. Ezen „jelfogó” receptorok ligandum-felismerő képességét kihasználva a radioaktív jelzőmolekulát peptid hormon analógokhoz kapcsolva nagy specificitású, immáron PET diagnosztikai alkalmazásra felhasználható vegyületekhez juthatunk.

A projekt célkitűzése az volt, hogy Magyarországon először, ^{18}F -ral kemoszелеktív módon jelölt, peptid hormon receptorokon ható ligandumokat állítsunk elő olyan technológiával, amely továbbfejlesztve alkalmas lehet preklinikai vizsgálatokra is. Peptidek direkt jelölése ^{18}F -ral ugyanakkor néhány kivételtől eltekintve nem valósítható meg. Ezért a jelöléshez általában egy kismolekulát használnak, amely magán hordozza a radioaktív izotópot és egy olyan reaktív funkciós csoportot, amely a makromolekulával való konjugációt szolgálja. A kemoszелеktív oxim-képződést már számos esetben használták aminoszomszomszéd és aldehidek közötti reakcióban, amely így lehetővé teszi az egylépéses szintézis utáni konjugációt védőcsoportok nélküli peptidekkel, és vizes közegben lejátszatható folyamatban. E módszer megvalósíthatóságának tehát két alapfeltétele van – az aminoszomszomszéd-funkcionalizált peptid-, és a ^{18}F -t tartalmazó aldehyd szintézise.

A peptidek szintézisét szilárd fázisú peptid szintézissel valósítottuk meg. Három szekvencia elkészítését tűztük ki célul, és Rink-Amid MBHA gyantát használtunk. Az LH-RH receptor szelektív Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-*D*-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, a bombesin receptor szelektív Gln-Trp-Ala-Val-Gly-LeuΨ(CH₂-NH)-Leu-NH₂, valamint a szomatosztatin receptor szelektív *D*-Phe-Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Val-

Cys-Thr-NH₂ vázat bővítettük aminooxi ecetsavval (AoA) oly módon, hogy az első esetben a D-Lys oldalláncának amino csoportjára, míg a másik két esetben a peptidek amino-terminálására került a módosítás. A Boc védett AoA-ból pentaklorofenol segítségével aktív észtert képeztünk, és ezzel a származékkal hajtottuk végre a kapcsolást. A szelektív védőcsoport lehasítás érdekében a Fmoc/tBu védőcsoport kombinációt használtuk. A szelektíven deprotektált amino csoportra kapcsoltuk a Boc-védett AoA-t, és a Boc védőcsoport a végső védőcsoport eltávolítás során szintén lehasításra került. Az elkészült aminooxi-funkcionalizált peptideket RP-HPLC segítségével tisztítottuk, liofilizáltuk és mélyhűtőben tároltuk. A különböző szekvenciák elkészítése során azonban különböző problémákkal szembesültünk. Az LH-RH analóg elkészítése jó hatásfokkal működött, a tisztított peptid stabilitását pedig LC-MS-sel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy közvetlenül a tisztítás után a vegyület tisztasága jobb volt, mint 95%, azonban az első napokban a tárolás során 3-4% szennyeződés keletkezett. A tömegspektrometriás vizsgálat megállapította, hogy ez a szennyezés az acetonnal képződött addukt, amelynek mennyisége azonban a továbbiakban nem változott. Ennek megfelelően a prekursor peptid tárolása hónapokig lehetséges, felhasználásra kész állapotban. Ugyanakkor a ciklikus szomatosztatin származék esetében már több akadályba ütköztünk. Az aceton illetve formaldehid konjugátumok, mint melléktermékek abban az esetben is nagyobb mennyiségben jelentek meg, amennyiben igyekeztünk ezektől a vegyszerektől elzártan végezni a szintézist, friss HPLC-s oldószerekkel, illetve az acetonitrilt metanollal helyettesítve megvalósítani a tisztítást. Szintén problémás volt a diszulfid híd kiépítése, miután az AoA-s módosítást már elvégeztük. Ezért a következő megoldás vezetett eredményre. Elkészítettük a lineáris verziót, ahol a lizin oldallánc még mindig tartalmazott védőcsoportot. Utána az amino-terminálison elvégeztük a peptid módosítását, majd szimultán hasítottuk le a megmaradt védőcsoportot és alakítottuk ki a diszulfid hidat. A végső deprotektálásnál tízszeres feleslegben szabad AoA-t adtunk a rendszerhez, mint „karbonil gyökfogót”. Ezzel a módszerrel hosszabb ideig tárolásra alkalmas prekursorhoz jutottunk – igaz, a radioszintézishez egy szilárd fázisú extrakciós (SPE) lépésre van szükség. Hogy a minta-előkészítés mindössze egy szűrés lehessen, kipróbáltuk gyantához kötött karbonil gyökfogó alkalmazását a tisztított peptid mellett. Sajnos a melléktermékek keletkezését nem tudtuk hatékonyan gátolni, valószínűleg a törzsoldat nem megfelelő gyanta-nedvesítési tulajdonságai miatt. Ugyanakkor az SPE módszer bevált a gyakorlatban, hiszen a peptid/AoA elegy

feloldására van szükség 0,1%-os TFA-ban, egy C18-as SEP-PAK-on megkötjük a peptidet, és 75%-os MeOH/0,1%TFA-ban lemossuk az oszlopról. (Így a későbbiekben már nincs is szükség a savanyításra, az eluátumhoz közvetlenül adható a radioaktív oldat.) A bombezin analóg előállításánál más szempontból is nehézségekbe ütközött. Mivel a szekvenciában a leucin-leucin kötés redukált peptidkötés, ezért meg kellett oldani a redukív aminálással történő lánchosszabításos lépést is. Az első próbálkozások rendkívül alacsony hozammal sikerültek, és az elkészült vegyület minőségének ellenőrzése során négy „fő” termék jelenlétét állapítottuk meg. Ezek közül kettőnek a tömege megfelelt az általunk várt peptid tömegének, míg a másik kettő pedig az acetonnal képződött addukt tömege volt. Ezek után feltételeztük, hogy a redukív aminálás során racemizáció következik be. Mivel a kísérleti körülmények változtatásával érdemi javulást nem tudtunk elérni, ezért árajánlatot kértünk a Bachem cégtől (ahol hasonló, redukált peptidkötést tartalmazó bombezin származék katalógus termék) az általunk tervezett és AoA-val bővített peptid elkészítésére. Az első ajánlatuk irreális terheket rótt volna a pályázatra (a teljes költségvetés 30%-a), ezért ezt a megoldást elvetettük. A későbbiekben sikerült olyan érveket felsorakoztatni, hogy a cég vállalta a szintézis reális összegért. Sajnos a megegyezés mindössze a harmadik év közepére realizálódott, ezért ezzel a peptiddel mindössze a ^{19}F -benzaldehyddel történő konjugáció optimalizálására, a standard referencia-származék elkészítésére, tisztítására, azonosítására, valamint a ^{18}F -benzaldehyddel történő konjugációs kísérletek elkezdésére maradt időnk.

A $^{18}\text{F}^-$ radionuklid előállítása az $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ magreakció felhasználásával történt. A célanyag legalább 95% vagy annál nagyobb dúsítási fokú $[^{18}\text{O}]\text{víz}$. A besugárzást a Nukleáris Medicina Intézet PETTRACE típusú részecskegyorsítóján végeztük. A céltárgy anyaga ezüst és a térfogata 0,8 ml (az optimalizációs kísérletek során gyakran a rutin gyártás során a céltárgy falán adszorbeálódott fluorid iont használtuk fel, a céltárgy normál vízzel történő ismételt átöblítését alkalmazva). A besugárzott $^{18}\text{F}^-$ iont tartalmazó vizet – nagy tisztaságú hélium gáz segítségével az ólomárnyékolt szintézis fülkében lévő, házi készítésű automata szintetizáló panelen elhelyezett szilika bázisú, erősen hidrofíl töltettel rendelkező anioncserélő oszlopon (Light Accel plus QMA) vezettük keresztül. A QMA gyantán megkötött aktív fluor $\text{K}[^{18}\text{F}]\text{F}$ formában került a reakcióedénybe, az oszlop eluáló-eleggyel történő átmosását követően. Az eluáló elegy tartalmazza a fázistranszfer katalizátor (Kriptofix 2.2.2.) acetonitriles oldatát is, amely elősegíti, hogy a fluor szerves oldószerben is

szolvatálva legyen. Mivel a [^{18}F]4-fluorobenzaldehyd előállítása aromás nukleofil szubsztitúció segítségével történik, amelyhez biztosítanunk kellett a megfelelő vízmentességet, először 100°C-on és csökkentett nyomáson a vizes oldatot szárazra pároltuk, majd 0,5 ml abs. acetonitrilt jutattunk a rendszerbe és megemelt hőmérsékleten, csökkentett nyomáson bepároltuk. Az azeotróp bepárlási lépést még egyszer megismételtük. A vízmentes radioaktív fluorid ionhoz adagoltuk a prekursor molekulát szintén abszolút oldószerben. A prekursor molekula kezdetben a 4-nitrobenzaldehyd volt, amelynek előnye, hogy a kereskedelemben közvetlenül beszerezhető. Hátrányos ugyanakkor, hogy a termék elválasztása nem lehetséges HPLC tisztítás nélkül a kiindulási anyagtól, ami idővesztést jelent, és a rövid felezési idejű izotópos munkavégzés során lehetőség szerint elkerülendő. Pár, nem igazán sikeres próbálkozás után (DMSO oldószer, 115°C és 20 perc reakcióidő) feladtuk a vele való munkát. Erre az időre elkészült az alternatív kiindulási vegyület, a 4-formil-*N,N,N*-trimetilaniolinium triflát. Ezt a kereskedelemben megvásárolható 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehydből gyártottuk, metil triflát segítségével vízmentes diklórometánban (DCM) (szobahőmérséklet, 12 óra). Tisztítása átkristályosítással történt DCM/dietiléter (Et_2O) elegyből. A fehér kristályok szerkezetének azonosítására ^1H -NMR-t használtunk. Először a nitrobenzaldehydnél alkalmazotthoz hasonló körülmények között dolgoztunk (DMSO, 115°C és 25 perc) (kitermelés 30-40% bomláskorrigált), de később az újabb irodalmi eredmények hatására kipróbáltunk más reakcióközegeket is - a dimetilformamidot (DMF) – a közölt adatok szerint a DMSO-s közegben gyorsabban zajlik az aldehyd csoport oxidációja, ezáltal csökken a hozam, illetve a PET radiokémiában általában sokkal frekvéntáltabban használt oldószert, az acetonitrilt is. Minden esetben 3,5 mg prekuzzorral és 1 ml oldószerral végeztük a kísérleteket, DMF esetében 115, míg AcCN esetében 100°C-on. Az oldószerek cseréje azonban nem vezetett nagyobb kitermelés eléréséhez. Megpróbáltuk a hozam növekedését elérni nagyobb prekuzzor koncentráció alkalmazásával (erre is több irodalmi hivatkozást találtunk), de csak a fordított Menschutkin reakció felgyorsulását tapasztaltuk. Az optimalizálás során különböző hőmérsékleteket (75-125°C-ig) és reakcióidőket (5-25 perc) kipróbáltunk, érdemi javulás nélkül. Végezetül a DMSO, 115°C és 8 perc (bomláskorrigált kitermelés kb. 25%) körülményeknél maradtunk. A [^{18}F]4-fluorobenzaldehyd tisztítását eleinte RP-HPLC-vel valósítottuk meg, de a nagy vízőldékonyságbeli különbség a prekuzzor és a termék között lehetővé tette, hogy SPE-val is próbálkozhassunk. Alapvető cél volt,

hogy el kellett távolítani az el nem reagált fluoridot, illetve a prekursor feleslegét ahhoz, hogy a [^{18}F]4-fluorobenzaldehid köztiterméket sikeresen használhassuk fel a konjugációs reakcióban. A fluorid elválasztására kipróbáltunk alumina, szilika és anioncserés töltetet, míg a prekursor feleslegének eltávolítására szilika bázisú RP- és kationcserélő, polimer bázisú RP, valamint polimer alapú kationcserélő gyantát is felhasználtunk. A kísérletek végeztével a Waters cég semleges alumina / C18 SEP-PAK kombinációjánál maradtunk, ezzel a módszerrel 85% feletti radiokémiai tisztaság is elérhető, és viszonylag kis térfogatban visszanyerhető a termék. A korábban említett demetileződéssel járó mellékreakció azért különösen nagy gond, mert a keletkező 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid nem radioaktív, ezért nehezebben detektálható, a HPLC-n kis retenciós idő eltolódással jelentkezik a fluorobenzaldehidhez képest, viszont ugyanúgy részt képes venni az oxim képzési reakcióban, vagyis versenytárs a konjugációs reakcióban. Összehasonlítva azonban a HPLC tisztított és a SPE után nyert [^{18}F]4-fluorobenzaldehid konjugált LH-RH analóg specifikus aktivitását, arra a következtetésre jutottunk, hogy az utóbbi – gyorsabb és egyszerűbb – módszer is megfelelő minőségben szolgáltatja a konjugációs ágenszt. Hasonlóan az előbbi módszerhez terveztük megvalósítani a fluoro-szubsztituált piridinil karbalhidek szintézisét. Az alapgondolat az volt, hogy a bromo-származékból dimetilamin hidroklorid segítségével kialakított köztiterméket metil trifláttal reagáltatjuk, és a prekuzort átkristályosítással tisztítjuk. A szintézis azonban meglehetősen kis hozammal sikerült, ezért átgondoltuk a koncepciót és közvetlenül a bromo-származék heteroaromás nukleofil szubsztitúciós reakciójával valósítottuk meg a ^{18}F -jelölt kismolekula szintézisét. Ebben az esetben is az alumina/C18-as tisztító oszlopszort alkalmaztuk, ugyanakkor a HPLC-s elválasztás is nélkülözhetetlen volt. A Waters C18-as SPE oszlop nem volt képes kvantitatívan megkötni a fluoropiridinil karbaldehydet, ennek megfelelően az izolált kitermelés nem volt túl magasnak mondható – függetlenül attól, hogy az előkísérletek (DMSO, 100°C és 10 perc - bomláskorrigált kitermelés kb. 35% a radioHPLC csúcs alatti területéből számolva) biztatóak voltak. Az utóbbi időben beszereztünk nagyobb retenciós kapacitású fordított fázisú SPE oszlopot, ennek kipróbálása még nem történt meg, mivel a problémák ellenére is tudtunk olyan mennyiségű radioaktív anyagot produkálni, amely elegendő volt a konjugációs kísérletekhez. Mind a fluorobenzaldehiddel, mind pedig a fluoropiridinil karbalhidekkel történő munka során RP-HPLC-s analitikai vizsgálatot iktattunk be a köztitermék radiokémiai tisztaságának ellenőrzésére. Ez

eredetileg C18-as analitikai oszlopon történt, de a gazdasági válság következtében fellépő acetonitril-ellátási hiány arra sarkallt bennünket, hogy valami költséghatékony megoldásban gondolkodjunk. Ezt végül is a „narrowbore” oszlop felhasználásában találtuk meg, hiszen így az áramlási sebesség csökkentésén túl még a vizsgálati idővel is tudtunk takarékoskodni. A koncepció sikerét bizonyítja, hogy a továbbiakban is ennél a technikánál maradtunk, ezen a rendszeren végeztük el a kalibrációs sorok felvételét és a specifikus aktivitás meghatározását is.

A konjugációs kísérletek végrehajtása a következő volt. 4 mg peptidet feloldottunk 500 µl 75%-os metanolban és 1,1 ekvivalens fluorobenzaldehidet adtunk hozzá, valamint annyi TFA-t, hogy végső koncentrációja 0,04%-os legyen. A piridinil karbaldehydes verziók esetében az oxo vegyülettel azonos mennyiségű extra TFA-t is adtunk a reakcióelegyekhez. A reakcióelegyet 60°C-on egy órán keresztül kevertettük, majd szobahőmérsékletre lehűlés után vízzel ötszörösére hígítottuk és szemipreparatív PR-HPLC-vel (Waters Xterra C18) tisztítottuk. Detektálásukat 254nm-en végeztük. Liofilizálás után narrowbore (Supelco Discovery C18) RP-HPLC-vel ellenőriztük a tisztaságukat, Maldi-TOF tömegspektrométeren ellenőriztük a szerkezetet (2,5 dihidroxibenzoészav mátrixon). Az ilyen módon elkészített standardokat, melyek tisztasága minden esetben nagyobb volt 90%-nál, használtuk fel hígítási sor elkészítésére, illetve a radioszintézisek során a termék azonosítására.

A radioaktív munka során 1 µmol peptidet feloldottunk 60 µl vízben, 7 µl 2%-os metanolos TFA-t és 250 µl metanolos, radioaktív aldehidet tartalmazó adtunk hozzá. Az elegyet 60°C-on 10 percig hagytuk reagálni, majd hígítás után tisztítottuk. Kezdetben a szokásos acetonitril/0,1%TFA rendszert használtuk, de *in vivo* felhasználáshoz ez a módszer csak további feldolgozás után alkalmas. Ehhez a terméket vízzel hígítottuk, majd C18-as SPE oszlopra felkötöttük, vízzel tisztítottuk, és végül etanollal mostuk le az aktivitást az oszlopról. A felhasználáshoz izotóniás sóoldattal az alkohol-tartalmat 10%-ra csökkentettük. Mivel ez a folyamat meglehetősen időigényes és a kézi munkavégzés miatt a személyzet dózisterhelését megnövelte, ezért kidolgoztunk egy olyan HPLC-s elválasztást, amely biokompatibilis anyagokat tartalmaz – továbbra is az Xterra oszlopot használva. Ennek összetevői nátrium acetátos puffer és etanol, így a termék on-line steril szűrés után (esetleg izotóniás sóoldattal hígítva) közvetlenül felhasználható. A készítményt RP-HPLC-vel ellenőriztük radiodetektor és UV detektor segítségével. Utóbbin meghatároztuk az anyagmennyiséget, amely paraméter nélkülözhetetlen a specifikus

aktivitás meghatározásához (az értékek 10-30 GBq/ μ mol között változtak a kiindulási aktivitás függvényében). Egy ismételt HPLC-s futtatás során a radioaktív anyagból és a referenciavegyület törzsoldatából együtt injektálunk, ez a vizsgálat a kémiai azonosítást szolgálta. Mivel ezek a jelölt peptidek originális vegyületeknek minősülnek, ezért sort kerítettünk a stabilitási vizsgálatok elvégzése is. Patkány vérszérumhoz adtunk a radiofarmakon törzsoldatából, amelyet 30 percig inkubáltunk 37°C-on. Az oldatot centrifugáltuk, a felülúszót 50%-os acetonitril oldatba kevertük és a keveréket ismételten lecentrifugáltuk. Az oldat tisztáját RP-HPLC-n vizsgáltuk és a radiokémiai tisztaságot vizsgáltuk. A stabilitás értékével korrigálva a vegyületek alkalmasak lehetnek a biodisztribúciós vizsgálatok elvégzésére.

Az LH-RH receptor-szelektív szekvencián kipróbáltunk egy alternatív jelölőágenst, a rutin diagnosztikában használt ^{18}F -jelöl fluorodeoxiglükózt is. Ennek előállítása GE Tracerlab FX FDG szintetizáló-egységgel történt 1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-*O*-trifluorometánszulfonil-beta-*D*-mannopiranoz (TATM) prekursorból alifás nukleofil szubsztitúcióval és steril, izotóniás oldatban állt rendelkezésre. Kísérleteink azt mutatták, hogy a jelölt peptid nehezen választható el preparatív méretben az aminooxi funkcionálizált kiindulási szekvenciától, illetve a radioszintézis során rendkívül alacsony volt a konjugáció hatásfoka. A közben megjelent irodalmi hivatkozások is megerősítették, hogy a rutin vizsgálatok céljából termelt radiogyógyszer direkt felhasználása nem hatékony, viszont egy extra tisztítási lépés beiktatása javíthat az alacsony konverzió. Ez a fajta szisztematikus aldehidforrás-változtatás azért vált szükségessé, mivel a HPLC-s vizsgálatok nyilvánvalóvá tették, hogy a 4-fluorobenzaldehiddel konjugált származékok erősen lipofil tulajdonságot mutatnak. A 2-, illetve 6-fluoronikotinaldehiddel kapcsolt szekvenciák már jelentős retenciós idő csökkenést mutattak az összehasonlító vizsgálatok során, míg a polihidroxialdehyd alkalmazása még jelentősebben megnövelte a vízdékonyságot.

A szintetizált analógok receptor kötési affinitásának meghatározásához „radio receptor assay” módszer felhasználásával ún. „displacement” analízist alkalmaztunk. Előzetesen mRNS és receptoriális fehérje szinten is igazolt, receptor pozitív humán daganat sejteken (humán prosztata karcinóma és humán emlő karcinóma) illetve ezen minták membrán frakcióin végeztük el a méréseinket. A kötési adatok matematikai kiértékeléséhez és az illető kompetitor 50%-os gátlást okozó koncentrációjának az ún. IC₅₀ értéknek a megadásához számítógépes program állt a rendelkezésünkre. Megállapítottuk, hogy a konjugált származékok értékei ugyanúgy a nanomoláros

tartományban vannak, mint az eredeti hordozó peptidek és gyakorlatilag nincs különbség az eltérő konjugáló aldehidekkel képzett származékok affinitásában. Megkezdjük a biológiai eloszlás vizsgálatát is. Első lépésként tumort nem hordozó patkányokon végeztünk vizsgálatot – elsősorban az LH-RH receptor szelektív származékokkal. A szervi megoszlást *ex vivo*, illetve a helyi fejlesztésű kisállat PET kamerán *in vivo* vizsgáltuk és igyekeztünk olyan vizsgálati protokollt kidolgozni, amely alkalmas lesz az immunszuppresszált és humán tumorsejteket hordozó állatok vizsgálatára is. A kutatás folytatása biztosítva látszik, hiszen eddigi eredményeinkre – illetve a továbbfejlesztett koncepcióra alapozva beadtunk egy új pályázatot „Rosszindulatú daganatokban expresszáldó luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok mint új molekuláris célpontok a pozitron emissziós tomográfia számára” címmel, amelyet az OTKA is támogatásra érdemesnek minősített.

Összegzésként kiemelném, hogy a projekt keretén belül elkészült (illetve beszerzésre került) három, különböző, számos humán tumorban túlexpresszáldó receptorhoz szelektív peptid szekvencia. Ezen peptidek speciálisan módosítottak egy kemoszelektív ligálási technika számára. Magyarországon elsőként kidolgoztuk a ^{18}F -fluorbenzaldehyd szintézisét, illetve rutinszerűen, biológiai vizsgálatokhoz megfelelő mennyiségben gyártottuk azt. Szintén elsőként végeztünk ^{18}F -ral heteroaromás nukleofil szubsztitúciót, előállítva a 2- illetve 6- ^{18}F]fluoronikotinaldehydet. Ezeket a radioaktív aldehideket felhasználtuk a peptidek jelölésére, kidolgoztuk analitikájukat. A konjugált peptidek receptorális vizsgálatát megkezdjük és az eddigi eredmények alapján kijelenthető, hogy a jelölés végrehajtása nem változtatott jelentősen a kötési tulajdonságaikon. A biológiai eloszlási vizsgálatokat is megkezdjük. Ezzel Magyarországon hosszú idő után ismét folytatnak originális PET-radiofarmakon fejlesztést. Eredményeink – és a szakirodalomban megjelent új információk hatása következtében új koncepciót dolgoztunk ki, és ismételten sikeresen pályáztunk. Új pályázatunk szervesen épül azokra a tapasztalatokra, amelyeket az LH-RH receptor szelektív vegyülettel – mint referencia – elértünk és várhatóan a vizsgálatba vont humán tumor sejtvonalak száma növekszik. Az *in vivo* vizsgálatok is – az új, heterodimer származék mellett – új eredményekkel bővíthetnek, illetve a témában további publikációk várhatóak, ezért szeretnék élni azzal a lehetőséggel, hogy a publikációs minősítést egy későbbi időpontban véglegesítsék.

Az eszközbeszerzések során az eredetileg tervezetthez képest módosítást kértünk. Ennek oka az volt, hogy időközben a Nukleáris Medicina Intézet új épülete elkészült és a szintézis munkaterülete is átkerült az új telephelyre. Ezért a körülmények jelentősen megváltoztak – ezzel együtt pedig a munkavégzéshez szükséges feltételek. Ugyanakkor változatlan volt az igény egy fagyasztva szárító készülékre, amely nélkül az elkészült inaktív peptidek nem lettek volna kinyerhetőek. Ezt a terveknek megfelelően be is szereztük. Továbbfejlesztettük a HPLC-s rendszerünket. Ennek során egy új, több-felhasználós licenc, egy új pumpa, egy elektromos több pozíciós szelepváltó és az injektor „loop” közvetlen beavatkozás nélküli feltöltésére alkalmas fecskendőöltő került beszerzésre. Sajnos a kibontakozó gazdasági válság nem tette lehetővé, hogy egy korszerű szintézisegységet - saját erőből – beszerezzem az intézet, de ez a szituáció mindössze a szintézisek hatásfokát és üzembiztonságát érintette hátrányosan, nem pedig az elvégezhetőségét.

A támogatás felhasználásában egyedül jelentős eltérés (fel nem használt) a „konferenciárésztétel dologi kiadásai” tételnél mutatkozik. Ennek magyarázata, hogy a pályázat elején több forrásból is kaptam támogatást hasonló célokra, később pedig – a bombezín és a szomatosztatin szelektív prekursor peptidek szintézisével kapcsolatos problémák következtében kevesebb konferencián vettem részt, mint azt előzetesen beterveztem.