



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Nino Jukić

[⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11: Prvi odobreni radiofarmak za PET snimanje raka prostate

Kemijски seminar 1

Poslijediplomski sveučilišni studij Analitička kemija

Izrađen prema:

U. Hennrich, M. Eder, The first FDA-approved ⁶⁸Ga-radiopharmaceutical for PET imaging of prostate cancer, *Pharmaceuticals* **14**, (2021), 1-12.

Zagreb, 2024.

Sadržaj

§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. PSMA	2
2.2. Nazivi i kemijska struktura [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	3
2.3. Galij-68 (⁶⁸ Ga)	4
2.4. Sinteza i kontrola kvalitete ⁶⁸ Ga-PSMA-11	7
2.4.1. Analitičke metode određivanja [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	11
2.5. Medicinski i farmaceutski pregled [⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	14
2.5.1. Klinička upotreba.....	14
2.5.2. Aplikacija.....	14
2.5.3. Farmakologija i farmakokinetika.....	14
2.6. Zaključak.....	15
§ 3. LITERATURNI IZVORI	XVI

§ 1. UVOD

Radiofarmak je radiofarmaceutski pripravak koji se primjenjuje u nuklearnomedicinskoj dijagnostici pri ispitivanju strukture organa i njihove funkcije te u liječenju različitih bolesti.¹ Sastoji se od dvije komponente: radionuklida i farmaka. Svojstva farmaka određuju mehanizam distribucije i lokalizacije radiofarmaka u organizmu. Radionuklid kojim je obilježen farmak emitira zrake koje se detektiraju instrumentima u nuklearnoj medicini.^{1,2}

Radiofarmaci su točno određenog sastava, radiokemijske i kemijske čistoće te moraju biti sterilni, netoksični i apirogeni. Pretežno se rabe u dijagnostičke svrhe te apsorbiranu dozu zračenja treba smanjiti na najmanju moguću mjeru, a određena je fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima radionuklida.

Idealan radiofarmak mora imati sljedeća svojstva: brza, efikasna i jednostavna priprema, kratko vrijeme efektivne polueliminacije, T_{ef} (kombinacija fizikalnog vremena poluraspada radionuklida, $t_{1/2}$ i biološkog vremena polueliminacije radiofarmaka iz organizma, T_B), radionuklid emitira fotone energije između 30 i 300 keV izomernim prijelazom ili elektronskim uhvatom te nakupljanje radiofarmaka u ciljnom organu mora se znatno razlikovati od nakupljanja u okolnim organima i tkivima.²

Karcinom prostate je najčešći zloćudni tumor kod muškaraca u Hrvatskoj i treći uzrok smrti od karcinoma u zemljama Europske unije. Pozitronska emisijska tomografija (PET) pokazala se kao obećavajuća nuklearnomedicinska metoda za određivanje primarnog i rekurentnog raka prostate, a u kombinaciji s kompjutoriziranom tomografijom (CT) daje najcjelovitiju sliku lokacije raka i metabolizma (PET/CT).^{1,3}

Za PET snimanje raka prostate, danas se u kliničkoj praksi koriste radiofarmaci koji ciljaju na protein prostata specifični membranski antigen (PSMA). Fiziološki se nalazi u benignom tkivu prostate te je najizraženiji u adenokarcinomu prostate. Radi svoje ekspresije PSMA predstavlja idealan marker za obilježavanje radionuklidima u dijagnostičke i terapijske svrhe.^{4,5}

Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) odobrila je 2020. godine [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 kao prvi radiofarmak za PET snimanje raka prostate koji omogućuje specifično slikanje tumorskih stanica koje prekomjerno ekspimiraju PSMA.⁴

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. PSMA

Antigen PSMA je transmembranski glikoprotein tipa II koji se nalazi na površini stanica raka prostate. Protein pokazuje umjerenu do nisku zastupljenost u zdravom tkivu, dok normalne stanice prostate i stanice raka prostate pokazuju najvišu razinu zastupljenosti u tijelu što čini inhibitore PSMA prikladnima za dijagnostiku (vjerojatnost progresije ili recidiva) i terapiju raka prostate. Antigen PSMA poznat je i kao glutamat karboksipeptidaza II (GCPII) ili folat hidrolaza 1 (FOLH1) što ukazuje na njegovu metaloenzimsku funkciju.^{4,6,7}

Razvoj metoda PET molekula za slikanje raka prostate zasniva se na molekulama PSMA na bazi uree. Sintetizirano je više molekula PSMA obilježenih radionuklidima koje vezanjem na ekstracelularnu domenu PSMA proteina dovode do internalizacije kompleksa antigen-protutijelo čime se omogućava veća osjetljivost i kvaliteta snimki. Neki od primjera su: [¹⁸F]DCFBC, [¹⁸F]DCFPyL, [¹⁸F]PSMA-1007 i najzastupljeniji [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11. Koriste se još i radiofarmaci [¹¹C]kolin, [¹⁸F]kolin te [¹⁸F]NaF.

Kolin je vrijedan alat za procjenu ranog raka prostate, dok [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 i [¹⁸F]NaF imaju veću korist u uznapredovaloj bolesti.^{3,4,8}

Aktivno vezno mjesto PSMA se sastoji od dva strukturalna motiva: jedan je lipofilni dio, a drugi ostvaruje interakciju s inhibitorima na bazi uree. Takvo složeno vezno mjesto zahtjeva lipofilne interakcije unutar bočnog lijevog aktivnog mjesta PSMA. Pokazalo se da aromatski ogranci linkera kod PSMA inhibitora na bazi uree značajno mijenjaju svojstva internalizacije i nakupljanje radiofarmaka u tumoru je veće (konstanta inhibicije, $K_i = 12,0 \pm 2,8$ nM; internalizacija ~ 10%).^{4,9}

Godine 2011. (HBED-CC) uvodi se kao linker i kelator za PSMA inhibitore na bazi uree. Spoj ili linker HBED-CC sadrži dva aromatska ogranka, a istovremeno djeluje kao kelator za kompleksiranje ⁶⁸Ga te kao funkcionalni dio koji pokreće internalizaciju i nakupljanje radiofarmaka u tumoru. Tako je 2011. godine PSMA-HBED-CC (PSMA-11) prvi put upotrijebljen za PET snimanje kod pacijenata s rakom prostate.⁴ Godine 2016. za PET snimanje raka prostate radiofarmak [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 predložen je kao ključna tehnologija za individualiziranu radioterapiju pacijenata s rakom prostate budući da je došlo do promjene terapija u 50,8% slučajeva.¹⁰⁻¹¹

Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*) 1. prosinca 2020., gotovo 10 godina nakon otkrića, odobrila je [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 kao prvi radiofarmak obilježen s ^{68}Ga za PET snimanje raka prostate.

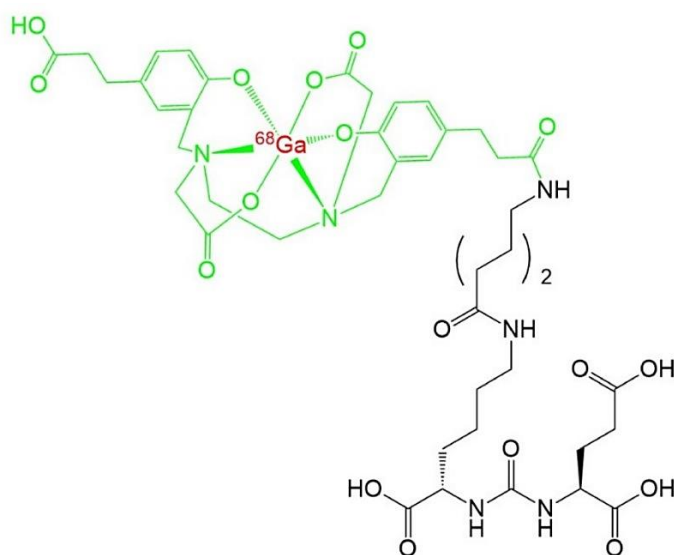
2.2. Nazivi i kemijska struktura [^{68}Ga]Ga-PSMA-11

Drugi naziv za [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 je još i [^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC, odnosno [^{68}Ga]Ga-HBED-CC-Ahx-Lys(OH)-CO-Glu(OH).

Prema IUPAC-u naziv spoja je: [^{68}Ga]galiij (3S,7S)-22-[3-[[[2-[[[5-(2-karboksietil)-2-hidroksifenil]-metil](karboksimetil)amino]etil](karboksimetil)amino]-metil]-4-hidroksifenil]-5,13,20-triokso-4,6,12,19-tetraazadokosan-1,3,7-trikarboksilna kiselina.

Na slici 1. prikazana je kemijska struktura kompleksnog spoja [^{68}Ga]Ga-PSMA-11. Radionuklid ^{68}Ga je kompleksiran s HBED-CC, acikličkim heksadentatnim kelatorom s oktaedarskom geometrijom. Koordiniran je s dva dušikova atoma, dvije hidroksilne i dvije karboksilne skupine. Kompleks [^{68}Ga]Ga-HBED-CC je kovalentno vezan na PSMA peptidomimetik (peptidni analog somatostatina) koji se veže na ekstracelularnu domenu PSMA proteina aplikacijom radiofarmaka intravenski.⁴

Sekvenca PSMA je Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx), a Ahx je 6-aminoheksanska kiselina. To je ω -aminokiselina, derivat aminokiseline lizin bez α -amino skupine te se često se koristi kao linker u raznim biološki aktivnim strukturama.¹²

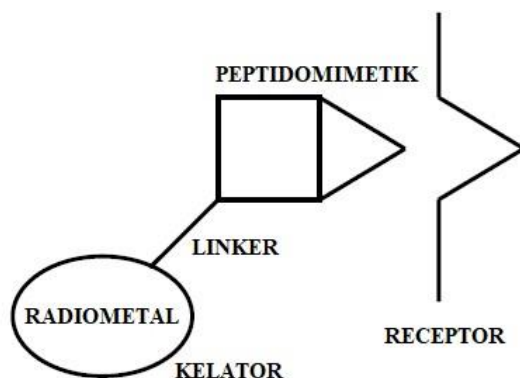


radionuklid (^{68}Ga) + kelator (HBED-CC) + peptidomimetik (Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx))

Slika 1. Kemijska struktura [^{68}Ga]Ga-PSMA-11⁴

Radiometal se ne može izravno vezati na molekule peptida analoga somatostatina, nego je za obilježavanje potreban bifunkcionalan kelator čija veličina šupljine odgovara veličini radiometala kojeg se obilježava.¹

Slika 2. prikazuje shemu određenog peptidomimetika obilježenog radiometalom koji je kovalentno vezan na kelator preko linkera te ulazi u stanicu nakon vezanja na receptore aplikacijom radiofarmaka intravenski. Na taj način se ostvaruje oslikavanje tumora.¹³



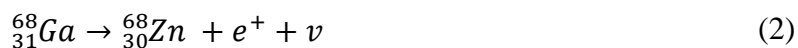
Slika 2. Shematski prikaz peptidomimetika obilježen radiometalom kovalentno vezan na kelator¹³

2.3. Galij-68 (⁶⁸Ga)

Oslikavanje metodom PET temelji se na uporabi radiofarmaka koji u β^+ raspadu emitiraju pozitivno nabijeni elektron, e^+ (pozitron, β^+), česticu po svemu identičnu elektronu osim po predznaku električnog naboja (1).



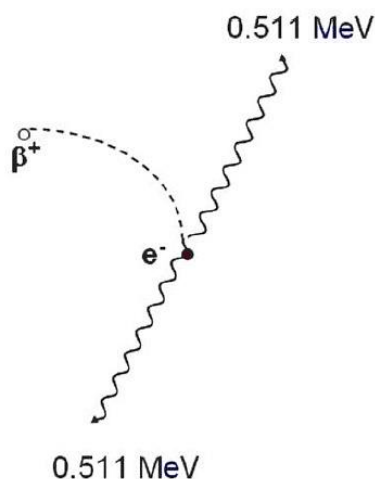
Zbog pretvorbe protona u neutron jezgra potomak ima atomski broj smanjen za 1. Primjer β^+ raspada je radionuklid ⁶⁸Ga (2).



Pozitron nastao raspadom gubi kinetičku energiju u sudarima s atomima i kada dođe do točke zaustavljanja (doseg) veže se s jednim elektronom iz okoliša. Tada dolazi do anihilacije, poništavanja pozitrona i elektrona pri čemu nastaju dva gama-fotona. Svaki je energije 511 keV i odlaze u nasuprotnim smjerovima iz točke anihilacije (pod kutom od 180°) što je prikazano

na slici 3. Takvi su fotoni osnova detekcije u tehnici oslikavanja pozitronskom emisijskom tomografijom pa se PET zove i dvofotonska tomografija.¹

Najvažniji parametar za kvalitetu PET slike je srednji domet pozitrona u mekom tkivu koji iznosi 1,05 mm.⁴



Slika 3. Anihilacija pozitrona (β^+) i elektrona (e^-)¹

Radionuklid ^{68}Ga ($t_{1/2} = 67,7$ min) nastaje raspadom ^{68}Ge ($t_{1/2} = 271$ d), a raspada se uz emisiju pozitrona, β^+ (89,1%) i elektronskim zahvatom (11%) na stabilni ^{68}Zn . Maksimalna energija pozitrona je 1,899 keV, a prosječna 836 keV.

Dobiva se eluiranjem generatora $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ otopinom klorovodične kiseline, HCl u obliku otopine galij-68(III) klorida, $^{68}\text{GaCl}_3$. Koncentracija HCl ovisi o tipu generatora. Eluat se dobiva pomoću titanijevog dioksida, TiO_2 koji je nanesen na staklenu ili plastičnu kolonu na koju je nanesen germanij-68(III) klorid, $^{68}\text{GeCl}_3$. Eluat se ne može direktno koristiti kao radiofarmak, već samo za obilježavanje spojeva.¹

Generatori su dostupni u istraživačke svrhe, a ako se koriste za pacijente kupuju se od ovlaštenih proizvođača. U Europi to su GalliaPharm (Eckert&Zeigler[®], Berlin, Njemačka) i Galli Ad[®] (IRE Elit, Fleurus, Belgija). Najveća aktivnost generatora koju nude proizvođači je $A = 1,85$ GBq.

Generator se može eluirati više puta dnevno, a može se koristiti godinu dana budući da u tom razdoblju proizvođači jamče sigurno korištenje generatora bez proboja ^{68}Ge . Svakim eluiranjem generatora mala količina ^{68}Ge se ispire s kolone generatora. Proboj ^{68}Ge mora biti manji od 0,001% s obzirom na ukupnu aktivnost ^{68}Ga eluata.

Generator postiže potpunu ravnotežu 7 sati nakon eluiranja, ali može ga se u principu eluirati i nakon 4 sata.⁴ Generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ tvrtke Eckert&Zeigler[®] prikazan je na slici 4.



Slica 4. Generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ tvrtke Eckert&Zeigler[®]¹⁴

Obilježavanje radiofarmaka s ^{68}Ga ne zahtijeva ciklotron na mjestu priprave. Generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ omogućava obilježavanje *in situ*. Obilježavanje je automatizirano čime se na minimum smanjuje izloženost osoblja zračenju te se povećava reproducibilnost sinteze.¹

Zbog manje dostupne aktivnosti, povećane cijene i dugog čekanja isporuke trenutno se istražuje proizvodnja ^{68}Ga pomoću ciklotrona zračenjem tekuće ili krute mete koje sadrže ^{68}Zn . Uporabom tekuće mete dobiveno je do $A = 9,85 \text{ GBq}$ ^{68}Ga , a čvrste mete do $A = 194 \text{ GBq}$. Ovakvim načinom proizvodnje ^{68}Ga ima veliki potencijal i može konkurirati najkorištenijem PET radionuklidu, fluoru-18 (^{18}F).^{4,15}

2.4. Sinteza i kontrola kvalitete ^{68}Ga -PSMA-11

Gotova otopina za injekciju [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 komercijalno je dostupna samo na području SAD-a (Los Angeles i San Francisco), a zbog kratkog poluvremena raspada isporuka ^{68}Ga je moguća samo u obližnjim mjestima.

Iz tog razloga su za pripremu [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 u klinikama dostupne dvije metode: korištenje sterilnih „hladnih kitova“, tj. posebne opreme bez uporabe čiste sobe (engl. *clean room*) te automatizirana sinteza u modulu za obilježavanje radiofarmaka u čistim sobama.

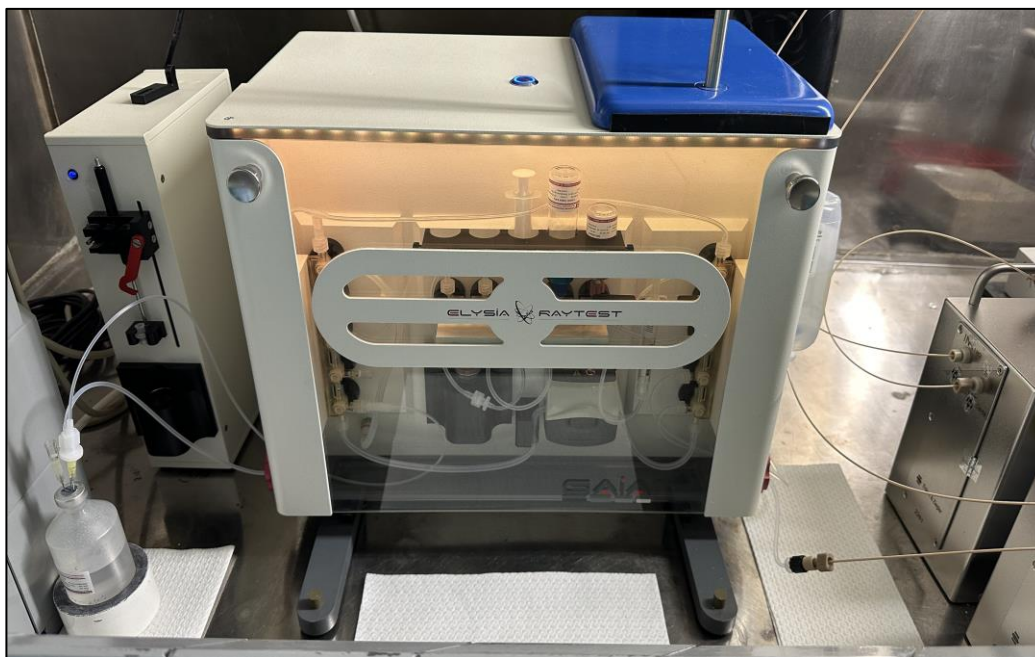
Komercijalno su dostupne dvije vrste takve opreme: TLX591-CDx, IllumetTM ili Illuccix[®] (Telix Pharmaceuticals; Melbourne, Australija) i isoPROtrace-11 (Isotopia Molecular Imaging; Petah Tikva, Izrael).⁴

Oba sustava se mogu koristiti uporabom komercijalno dostupnih i autoriziranih generatora $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. Potvrđena je kvaliteta oba sustava i njihova klinička primjenjivost, ali nedostatak je taj što nisu odobreni od strane međunarodnih tijela te se trenutno mogu koristiti samo u istraživačke svrhe.^{16,17}

Sustav TLX591-CDx sadrži tri viala, a isoPROtrace-11 jedan vial što pogoduje sintezi radiofarmaka.¹⁸ Uporabom isoPROtrace-11 kita, spoj [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 dobije se dodavanjem ^{68}Ga eluata u sterilni vial kita koji sadrži liofilizirani prekursor i reakcija traje 5 minuta na sobnoj temperaturi. Ako se koristi TLX591-CDx kit, najprije se eluira ^{68}Ga u zasebni sterilni vial prije dodavanja u otopljeni prekursor. Vrijeme trajanja reakcije i temperaturni uvjeti su isti za oba kita.¹⁸

Za proizvodnju PET radiofarmaka najčešći način proizvodnje je pomoću modula za automatiziranu sintezu. Ovakav način sinteze olakšava proizvodnju različitih radiofarmaka na jednom modulu jer nakon sinteze postupak čišćenja nije potreban. Za sintezu se koriste jednokratne kasete s pripadajućim reagensima koje se nakon sinteze bacaju u pripadajući otpad te se iduća postavlja na modul za novu sintezu. Komercijalno su dostupne kasete s pripadajućim reagensima za različite module u skladu s GMP zahtjevima (engl. *Good Manufacturing Practice*).

Na slici 5. prikazan je modul Gaia tvrtke Elysia-Raytest za automatiziranu sintezu ^{68}Ga radiofarmaka s postavljenom jednokratnom kasetom i reagensima u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, KBC Zagreb.



Slika 5. Modul GAIA tvrtke Elysia-Raytest za automatiziranu sintezu ^{68}Ga radiofarmaka

Ključni koraci automatizirane sinteze [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 na modulu su:

1. Sakupljanje i koncentriranje ^{68}Ga na koloni s ionskim izmjenjivačem (kolona SCX)

Eluat se prvo sakupi na koloni SCX i potom se eluira u reakcijski vial koji sadrži prekursor za obilježavanje, PSMA-11 ($m = 10 \mu\text{g}$) otopljen u puferu natrijevog acetata, CH_3COONa i askorbinske kiseline, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$.⁴

U ovom se koraku sinteze eluat pročišćava na koloni čime se smanjuje mogućnost probijenog ^{68}Ge te se smanjuje mogućnost željeza i cinka u tragovima da se natječu s ^{68}Ga za molekule bifunkcionalnog kelatora.¹

2. Termičko pospješivanje reakcije

Reakcija se odvija na 100°C 10 minuta.⁴ Keliranje ^{68}Ga radiofarmaka uz uporabu makrocikličkih kelatora zbiva se pri povišenoj temperaturi kako bi ono bilo brzo i kvantitativno.¹

Vrijeme trajanja reakcije mora biti smanjeno na minimum zbog kratkog vremena poluraspada ^{68}Ga . Zbog toga se koristi mikrovalno zagrijavanje. Uzorak se pod utjecajem mikrovalnog zračenja zagrijava sa svih strana jednoliko u svakoj točki što rezultira vrlo brzim zagrijavanjem.¹³

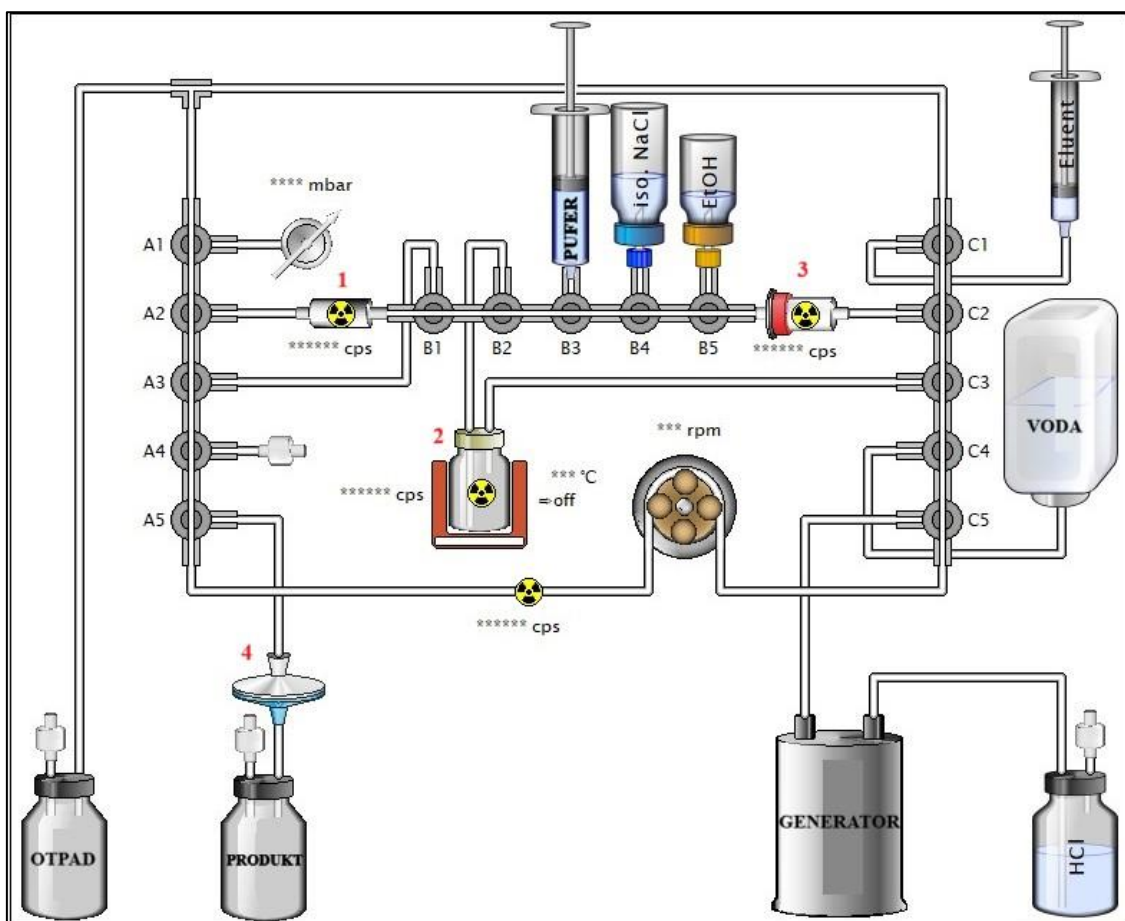
3. Sakupljanje produkta sinteze na koloni C18 te ispiranje nečistoća nastalih tijekom reakcije

Produkt se sakuplja na koloni C18 te se ispiri s otopinom etanola i vode i razrjeđuje s fiziološkom otopinom.

4. Sterilna filtracija konačnog produkta

Ukupno vrijeme trajanja reakcije je 30 min. Prema zahtjevima GMP svi reakcijski koraci se moraju odvijati u čistoj sobi klase C, a sterilna filtracija produkta u čistoj sobi klase A, ali to se može razlikovati od zemlje do zemlje.

Na slici 6. prikazana je shema kasete s pripadajućim regensima te generator $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, a brojevima su označeni ključni koraci u sintezi.



Slika 6. Shematski prikaz kasete za automatiziranu sintezu $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ na modulu GAIA, Klinički zavod za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, KBC Zagreb

Kako bi se osigurala sigurnost pacijenata, kvaliteta svakog radiofarmaka mora se provjeriti prije aplikacije. Na području Europe svi kriteriji prihvatljivosti i potrebne analitičke metode za kontrolu kvalitete [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 opisani su u monografiji Europske Farmakopeje (engl. *Ph. Eur.*) „*Gallium-68 PSMA-11 injection solution*“ (04/2021:3044).

U tablici 1. navedeni su svi kriteriji prihvatljivosti prema monografiji.

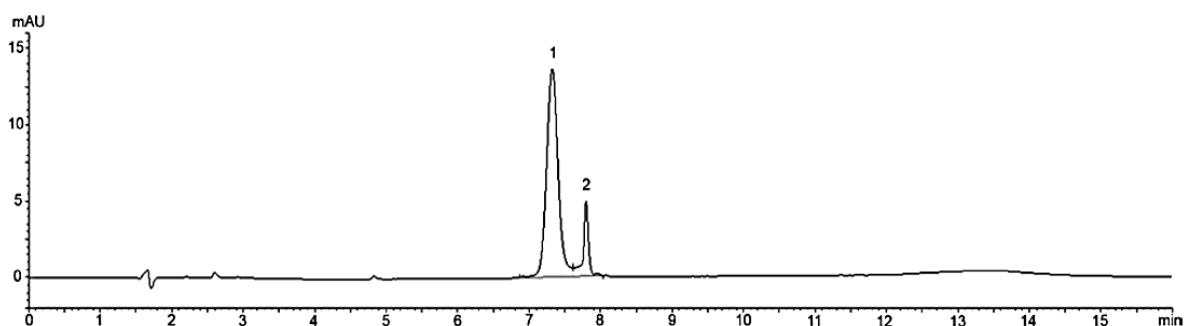
Tablica 1. Kriteriji prihvatljivosti [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 prema monografiji 04/2021:3044.

Parametar	Metoda	Kriterij prihvatljivosti
izgled	vizualni pregled	bistra, bezbojna tekućina
pH vrijednost	pH trakice	4-8
radiokemijski identitet	HPLC	slično retencijsko vrijeme prema referentnom standardu Ga-PSMA-11
radiokemijska čistoća		
[⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	HPLC	zbroj površina pikova stereoizomera PSMA-11 ≥ 95%
⁶⁸ Ga specije koje migriraju, $R_f < 0,2$	TLC	≤ 3%
bakterijski endotoksini	LAL test	< 175/V _{max} IU/mL
etanol	GC	< 10% V/V
radionuklidna čistoća		
vrijeme poluraspada	ionizacijska komora	61-75 min
proboj ⁶⁸ Ge	gama spektrometrija	energije: 511, 1022 i 1077 keV
		proboj < 0,001% i 90-110% radiaktivnosti ⁶⁸ Ga
sterilnost	inkubacija produkta u određenom mediju 14 dana	sterilno

2.4.1. Analitičke metode određivanja [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

Sve analitičke metode moraju biti validirane prema zahtjevima GMP. Za određivanje kemijske i radiokemijske čistoće [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*) s UV i radio-detektorom. Ovisno o temperaturi, vremenu trajanja reakcije i pH otopine mogu se formirati dijastereoizomeri [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 koji se detektiraju kao tri pika na radiokromatogramu. Preklinička ispitivanja na stanicama su pokazala da se dijastereoizomeri ne vežu različito na PSMA receptor, stoga ne utječu na kvalitetu PET slika. Obično se nakon HPLC analize vide dva pika, koji odgovoraju termodinamički najstabilnijem dijastereoizomeru i drugom dijastereoizomeru, a zbroj površina mora biti $\geq 95\%$ s obzirom na ukupnu detektiranu radioaktivnost. Kemijska čistoća spoja određuje se s obzirom na PSMA-11 i ostale prisutne tvari. Njihov sadržaj se određuje usporedbom površina pikova s površinom pika referentnog standarda PSMA-11.⁴

Na slici 7. prikazan je radiokromatogram [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11.

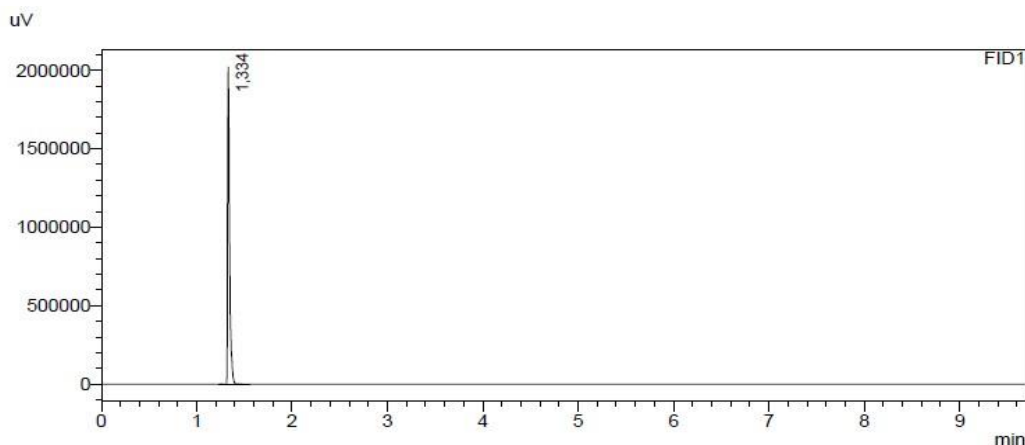


Slika 7. Radiokromatogram [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11(1- stereoizomer 1; 2- stereoizomer 2)¹⁹

Sadržaj etanola u spoju određuje se plinskom kromatografijom (engl. *Gas Chromatography, GC*). Koristi se plinski kromatograf najčešće s plameno ionizacijskim detektorom (engl. *Flame Ionization Detector, FID*) prema vlastitoj metodi.

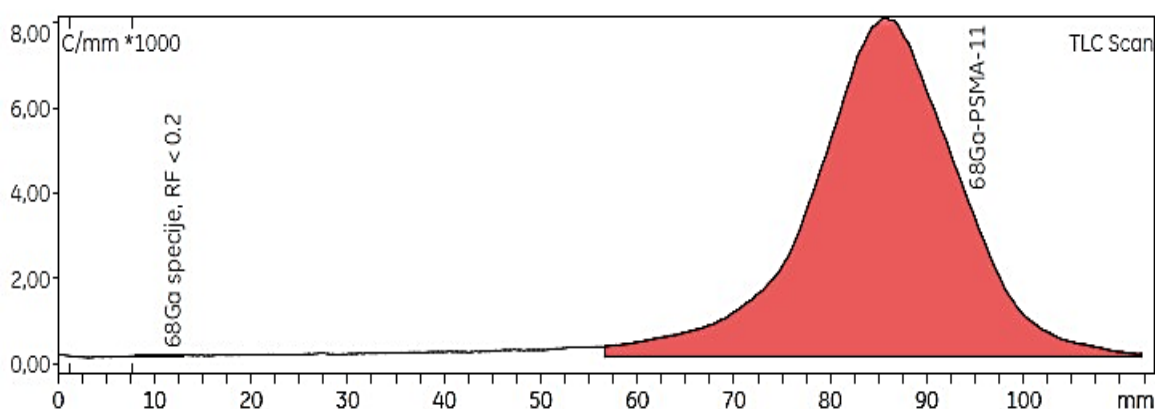
Etanola u produktu mora biti manje od 10%. Etanol pripada skupini otapala klase 3. Njime se povećava topljivost lijekova i djeluje kao aditiv. Korištenjem automatizirane sinteze u modulu i etanola postižu se određeni rezultati: potrebno je manje peptida za sintezu, nastaje manje nusprodukata radiolizom, minimalna je izloženost zračenju osoblja i maksimalna je ponovljivost rezultata.²⁰

Na slici 8 prikazan je kromatogram etanola dobiven analizom spoja $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ Nexis GC-2030, Shimadzu u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, KBC zagreb. Retencijsko vrijeme je $t_R = 1,344$ min, a koncentracija etanola u uzorku je 4,675%.



Slika 8. Kromatogram etanola dobiven analizom spoja $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$

Spoj može sadržavati neizreagirani slobodni $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ ion koji se ne može odrediti metodom HPLC jer nije vidljiv na radiokromatogramu. Iz tog razloga se određuje tankoslojnom kromatografijom (engl. *Thin-layer chromatography, TLC*), ali u obliku koloida. Jedna do dvije kapljice dobivenog spoja nanese se na stacionarnu fazu, iTLC-SG (*Instant Thin Layer Chromatography- Silica Gel*) trakicu. Potom se trakica postavi u komoricu u kojoj je mobilna faza, otopina amonijevog acetata i metanola u omjeru 1:1 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4 : \text{CH}_3\text{OH} = 1:1$). Kada mobilna faza dođe do 2/3 razine fronte mobilne faze, trakica se analizira na TLC skeneru. Rezultat je kromatogram na slici 9 dobiven skeniranjem trakice MiniGita skenerom. Veći pik pripada spoju ($R_f = 0,8-1$), a manji pik ^{68}Ga specijama ($R_f < 0,2$).



Slika 9. Kromatogram $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ dobiven TLC skenerom

Bakterijski endotoksini su otrovi koji spadaju u skupinu pirogena te su sastavni dio stanične stijenke gram-negativnih bakterija. Kod ljudi i životinja uzrokuju povišenu tjelesnu temperaturu i mnoge druge komplikacije.

Određuju se prijenosnim spektrofotometrom odobrenog od strane Agencije za hranu i lijekove (FDA). Dizajniran je za automatsko i brzo određivanje koncentracije bakterijskih endotoksina u određenom uzorku. Granica detekcije je $0,05 \text{ EU mL}^{-1}$ a trajanje analize je 15 minuta. Test se provodi prema amebocitnom lizirajućem testu (LAL test). Lizat sadrži enzim koji se aktivira u prisutnosti endotoksina čime se omogućava detekcija bakterijskih endotoksina.

U metodi se koristi sintetski kromogeni supstrat koji sadržava specifičnu sekvencu aminokiselina kojom se oponaša mjesto cijepanja u koagulogenu. Aktivirani enzimi kataliziraju reakciju cijepanja mjesta rascjepa te oslobodjenje kromofora koji je žute boje. Oslobodeni kromofor apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 405 nm te se određuje apsorbancija. Količina apsorbirane svjetlosti je proporcionalna s koncentracijom endotoksina u uzorku.²¹

Na slici 10. prikazan je uređaj za određivanje bakterijskih endotoksina i uložak (engl. *cartridge*) u koje se pipetira po $V = 25 \mu\text{L}$ uzorka.



Slika 10. Uređaj za bakterijsko određivanje endotoksina i uložak (Klinički zavod za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, KBC Zagreb)

U slučaju intravenske aplikacije, maksimalna količina endotoksina koju čovjek može primiti po kilogramu tjelesne težine u jednom satu je 5 EU (engl. *Endotoxin Units*).²¹

Ako se koriste hladni kitovi za pripremu spoja kontrola kvalitete je ograničena. Dovoljno je napraviti TLC kromatografiju i odrediti pH vrijednost.⁴

2.5. Medicinski i farmaceutski pregled [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11

2.5.1. Klinička upotreba

Spoj [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 je dijagnostički radiofarmak namijenjen za lokalizaciju pozitivnih PSMA lezija kod muškaraca s rakom prostate uporabom metode PET. Iznimno je koristan u slučajevima sumnje na metastaze kod početne terapije i u slučajevima sumnje na recidiv na temelju povišenih razina prostata specifičnog antigena (PSA) u serumu.⁴

2.5.2. Aplikacija

Preporučena količina radioaktivnosti radiofarmaka za intravensku injekciju je između 111 i 259 MBq kod odraslih osoba. Nakon injekcije radiofarmaka potrebno je provesti intravensko ispiranje fiziološkom otopinom. Pacijenti bi trebali piti dosta vode nakon primjene radiofarmaka kako bi se smanjila izloženost zračenju čestim mokrenjem. Neposredno prije snimanja pacijent treba mokriti, a snimanje traje 50 minuta nakon intravenske injekcije (50-100 min).⁴

2.5.3. Farmakologija i farmakokinetika

Svi inhibitori PSMA na bazi uree pokazuju vrlo sličnu i karakterističnu biodistribuciju. Intenzivno fiziološko nakupljanje može se opaziti u gušterači, slinovnicama i suznim žlijezdama, umjereno nakupljanje u jetri i žučnom mjehuru, a mnogo manje u slezeni, koštanoj srži, štitnjači i testisima. Radiofarmak se izlučuje bubrezima.^{1,4}

Srednja efektivna doza je 0,023 mSv/MBq PET snimanjem, odnosno 4,7 mSv injiciranjem 200 MBq [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11. Od svih organa bubrezi primaju najveću apsorbiranu dozu s prosječnom dozom od 0,262 mGy/MBq.

Tipično mjesto s metastazama je zdjelična regija često popraćena s metastazama kostiju i udaljenim limfnim čvorovima. Spoj [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 pokazuje osjetljivost od 85% i specifičnost od 98%.⁴

2.6. Zaključak

Inhibitori PSMA pokazuju sve veći interes kao radiofarmaci za PET snimanje raka prostate. Do danas razvijeno je nekoliko spojeva koji ciljaju na PSMA receptor, pokazujući utjecaj u mnogim medicinskim područjima: radiologija, radijacijska onkologija, ciljana radionuklidna terapija i intraoperativno usmjeravanje.

Kroz nekoliko studija dokazan je utjecaj [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 na planiranje radioterapije te primarne dijagnoze. S ovim radiofarmakom identificirane su pozitivne regije unutar prostate kod pacijenata s dokazanim rakom prostate biopsijom s osjetljivošću od 67% i specifičnošću od 92%. U kombinaciji s MRI (engl. *Magnetic resonance Imaging*) snimanje s [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 pokazuje veliki utjecaj kod planiranja biopsije.

U budućnosti PSMA inhibitori obilježeni s ^{18}F također će biti od velike važnosti, jer pokazuju slično djelovanje kao i [^{68}Ga]Ga-PSMA-11, a zbog duljeg vremena poluraspada ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min) omogućava se centralna proizvodnja i distribucija radiofarmaka.

Prema odobrenju Agencije za hranu i lijekove (FDA) [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 se upotrebljava kod pacijenata sa sumnjom na metastaze raka prostate koje su potencijalno izlječive kirurškim zahvatom ili terapijom zračenjem, kao i za pacijente sa sumnjom na recidiv raka prostate. Snimanje PET s [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 pokazuje povećanu točnost, osjetljivost i specifičnost u usporedbi s uobičajenim snimanjima. Kod pacijenata s niskim vrijednostima PSA značajno je poboljšana stopa otkrivanja lezija što pomaže u pojedinačnom liječenju pacijenata i terapija u različitim medicinskim područjima.⁴

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. Huić, D. Dodig, Z. Kusić, *KLINIČKA NUKLEARNA MEDICINA*, Medicinska naklada, Zagreb, 2023, str. 1-429.
2. G. B. Saha, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer, USA, 2018, str. 93-105
3. B. Mioč, *PET/CT u dijagnostici karcinoma prostate*, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2023, str. 1-21
4. U. Hennrich, M. Eder, *Pharmaceuticals* **14** (2021) 1-12.
5. Ž. Kaštelan, T. Kuliš, *Knjiga sažetaka 9. znanstvenog sastanka TUMORI PROSTATE održanog 11. studneog 2022. u Hrvatskoj akademij znanosti i umjetnosti*, Zagreb, 2022, str. 10-11
6. J. S. Ross, C. E. Fisher, H. A. G., R. P. Kaufman, Jr., P. Kaur, K. Gray, I. Webb, G. S. Gray, R. Mosher, B. V. S. Kallakury, *Clin. Cancer Res.* **9** (2003) 6357-6362.
7. S. Perner, M. D. Hofer, R. Kim; R. B. Shah, Kaufman, H. Li, P. Moller, R. E. Hautmann, J. E. Kuefer, R. Rubin, M. A., *Hum. Pathol.* **38** (2007) 696-701.
8. J. J. Fox, H. Schöder, S. M. Larson, *Curr. Opin. Urol.* **40** (2012) 320-327.
9. M. Eder, M. Schafer, U. Bauder-Wust, W.-E. Hull, C. Wangler, W. Mier, U. Haberkorn, M. Eisenhut, *Bioconj. Chem.* **23** (2012) 688-697.
10. F. Sterzing, C. Kratochwil, H. Fiedler, S. Katayama, G. Habl, K. Kopka, A. Afshar-Oromieh, J. Debus, U. Haberkorn, F. L. Giesel, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **43** (2016) 34-41.
11. W.P Fendler, J. Ferdinandus, J. Czernin, M. Eiber, R.R. Flavell, S.C. Behr, I.K. Wu, C. Lawhn, M.H. Pampaloni, R.E. Reiter, *J. Nucl. Med.* **61** (2020), 1793-1799.
12. A. Markowska, A. R. Markowski, I. J. Karpowicz, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2022), 1-18.
13. I. Velikyan, *Sinteza, karakterizacija i aplikacija ⁶⁸Ga-obilježenih makromolekula*, Doktorski rad, Sveučilište Uppsala, 2005, str. 20.
14. <https://www.wiikpharma.dk/ga68generator> (datum pristupa: 8. ožujka 2024.)
15. K. Kumar *Cancer Biother. Radiopharm.* **35** (2020), 163-165.
16. L. Calderoni, A. Farolfi, D. Pianori, E. Maietti, V. Cabitza, A. Lambertini, G. Ricci, S. Telo, F. Lodi, P. Castellucci i dr. *J. Nucl Med.* **61** (2020), 716-722.
17. M. M. Kurash, R. Gill, M. Khairulin, H. Harbosh, Z. Keidar, *Nat. Res.* **10** (2020), 3109.

18. D. Satpati, *Bioconj. Chem.* **32** (2021), 430-447.
19. Pharmeuropa 29.4 Gallium (^{68}Ga) PSMA-11 injection (XXXX:3044), DRAFT
20. M. Meisenheimer, S. Kurpig, M. Essler, E. Eppard, *EJNMMI radiopharm. chem.* **4**, **26** (2019) 1-10.
21. D. Delač, *Određivanje sadržaja bakterijskih endotoksina u injekcijama azitromicina*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 1-38