



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nino Jukić

**Radiokemijska sinteza i ispitivanje kvalitete
teranostičkog radiofarmaceutika
[¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 za liječenje raka prostate**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Sanda Rončević i prof. dr. sc. Dražen Huić

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nino Jukić

**Radiochemical synthesis and quality evaluation of
theranostic radiopharmaceutical
[¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 for treatment of prostate cancer**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Dr. Sanda Rončević, Univ. Prof. and Dr. Dražen Huić, Univ. Prof.

Zagreb, 2026

Ovaj doktorski rad izrađen je u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja
Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof. dr. sc. Sanda Rončević i prof. dr. sc.

Dražen Huić

Doktorski rad izrađen je u okviru istraživačkog projekta IAEA pod nazivom “*The
PIAF Trail on Arterial ^{18}F -FDG PET Imaging in Patients with a History
of Myocardial Infarction and Elevated Inflammatory Status*” (E13048)

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Sandi Rončević na tome što je prihvatila biti mojom mentoricom te na povjerenju, potpori i strpljenju tijekom izrade ove doktorske disertacije. Neizmjereno sam zahvalan na prenesenom znanju, stručnom vodstvu i vrijednim savjetima koji su uvelike pridonijeli mojem stručnom i osobnom razvoju te mi omogućili da tijekom izrade doktorske disertacije steknem nova znanja i iskustva.

Veliko hvala upućujem i mentoru, prof. dr. sc. Draženu Huiću dr. med., na povjerenju, potpori i pruženoj prilici za odlazak u Innsbruck, gdje sam imao priliku sudjelovati u osmišljavanju i razvoju eksperimentalnog dijela ove doktorske disertacije. Zahvaljujem mu se i na potpori u financiranju istraživanja te na podršci pri objavi znanstvenog rada u međunarodno priznatom znanstvenom časopisu.

Iskreno zahvaljujem kolegi Marijanu Žuviću na stručnim savjetima, pomoći i podršci tijekom izrade ovog rada te na pruženoj prilici za zaposlenje na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Ta mi je prilika omogućila da steknem vrijedno i praktično iskustvo u području radiokemije, osobito u radiokemijskoj sintezi i kontroli kvalitete te da bolje upoznam širi kontekst primjene radiofarmaceutika u nuklearnoj medicini.

Od srca zahvaljujem i svim svojim prijateljima koji su tijekom svih godina studiranja uvijek bili uz mene, spremni saslušati me, ohrabriti i pružiti podršku u trenucima kada je bila najpotrebnija.

Na kraju, najveće hvala mojoj obitelji, koja mi je tijekom cijelog studiranja i izrade doktorske disertacije bila neiscrpan izvor ljubavi, razumijevanja i podrške. Hvala vam što ste vjerovali u mene, poticali me da ustrajem i bili uz mene u svakom trenutku. Bez vaše podrške i razumijevanja ovaj put bio bi mnogo teži.

Sadržaj

SAŽETAK.....	III
ABSTRACT	IV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Opće značajke radiofarmaceutika.....	3
2.1.1. Osnovni pojmovi aktivnosti, doze i dozimetrije primjenom radiofarmaceutika	7
2.1.2. Utjecaj dodatka hvatača slobodnih radikala i kompleksirajućeg agensa	11
2.2. Instrumenti za mjerenje i detekciju zračenja u nuklearnoj medicini	13
2.3. Prostata specifični membranski antigen (PSMA) i inhibitori	16
2.3.1. Razvoj i sinteza spoja PSMA-617	23
2.4. Radiofarmaceutik [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617	27
2.4.1. Naziv i kemijska struktura	27
2.4.2. Radionuklid ¹⁷⁷ Lu	28
2.4.3. Proizvodnja radionuklida ¹⁷⁷ Lu.....	31
2.4.4. Radiokemijska sinteza PET radiofarmaceutika.....	32
2.4.5. Ispitivanje kvalitete radiofarmaceutika.....	34
2.4.6. Klinička uporaba i farmakološke značajke	36
2.5. Najnovija postignuća u razvoju ¹⁷⁷Lu-radiofarmaceutika i njihova budućnost – postignuća u sintezi.....	42
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	46
3.1 Popis kemikalija i pribora	46
3.2. Postupci pripreve otopine i uzoraka.....	47
3.2.1. Priprava mobilnih faza za tankoslojnu kromatografiju na radio-TLC skeneru (engl. radio-thin layer chromatography scanner).....	47
3.2.2. Priprava mobilnih faza za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. High performance liquid chromatography, HPLC).....	48
3.2.3. Priprava otopine natrijeva hidroksida (NaOH), $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$	48
3.2.4. Priprava pufera askorbinske kiseline	48
3.2.5. Priprava peptida PSMA-617	48
3.2.6. Priprava neradioaktivnog referentnog standarda ^{nat} Lu-PSMA-617	49
3.2.7. Priprava etanola ($w = 50 \%$)	49
3.2.8. Priprava otopine za određivanje bakterijskih endotoksina u radiofarmaceutiku	49
3.2.9. Priprava uzoraka za ICP-MS.....	49
3.3. Metode i instrumenti	50

3.4. Radni uvjeti i postupci obilježavanja radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 u modulu za automatiziranu sintezu	57
3.4.1. Postavljanje reagensa na kasetu za automatizirano obilježavanje radiofarmaceutika [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	57
3.4.2. Postavljanje kasete na modul Gaia&Luna za automatizirano obilježavanje radiofarmaceutika [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	58
3.4.3. Postupak radiokemijske sinteze radiofarmaceutika [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	60
3.4.4. Mijenjanje parametara prilikom obilježavanja radiofarmaceutika [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	60
3.4.5. Ispitivanje kvalitete radiofarmaceutika [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	63
3.5. Stabilnost radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 in vitro	64
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	65
4.1. Ispitivanje kvalitete radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617	65
4.1.1. Određivanje radiokemijskog identiteta, radiokemijske čistoće i radiokemijskog iskorištenja radiofarmaceutika [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	65
4.1.2. Određivanje količine peptida PSMA-617 nakon obilježavanja radiofarmaceutika [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	75
4.1.3. Utjecaj dodatka hvatača slobodnih radikala etanola i kompleksirajućeg agensa (Zn-DTPA) na radiokemijsku sintezu radiofarmaceutika [¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617	78
4.2. Određivanje radionuklidne čistoće radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617	80
4.3. Određivanje stabilnosti radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 metodom in vitro	82
4.4. Određivanje izvornih vrsta radionuklida ¹⁷⁷Lu u radiofarmaceutiku [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617	89
4.5. Utjecaj omjera liganda i metala [L] / [M] na radiokemijsku čistoću i radiokemijsko iskorištenje radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617	92
§ 5. ZAKLJUČCI	96
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ	99
§ 7. LITERATURNI IZVORI	101
§ 8. DODATAK	V
§ 9. ŽIVOTOPIS	LV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

RADIOKEMIJSKA SINTEZA I ISPITIVANJE KVALITETE TERANOSTIČKOG RADIOFARMACEUTIKA [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 ZA LIJEČENJE RAKA PROSTATE

Nino Jukić

Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Noviji pristup u liječenju metastatskog rezistentnog raka prostate usmjeren je na razvoj i primjenu teranostičkih radiofarmaceutika poput [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Ovaj spoj primjenjuje se u radioligandnoj terapiji pri čemu se ionizirajuće zračenje selektivno usmjerava na tumorske stanice. Cilj ovog istraživanja bio je razviti interni postupak radiokemijske sinteze teranostičkog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 u modulu za automatiziranu sintezu, ispitati kvalitetu radiofarmaceutika proizvedenog u vlastitom laboratoriju te usporediti njegova svojstva s referentnim lijekom Pluvicto[®]. Provedena su ispitivanja stabilnosti radiofarmaceutika *in vitro*, kao i ispitivanje radionuklidne čistoće. Također utvrđena je i mogućnost metoda spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) i gama spektrometrije za određivanje izvornih vrsta radionuklida ^{177}Lu koji se koriste za pripremu radiofarmaceutika. Proizvodnja interno pripravljenih radiofarmaceutika obilježenih s radionuklidom ^{177}Lu je pouzdana i isplativa metoda koja se može automatizirati što rezultira visokom kvalitetom i učinkovitom proizvodnjom radiofarmaceutika s radiokemijskom čistoćom > 95 % i radiokemijskim iskorištenjem > 96 %.

(109 + LVI stranica, 28 + D57 slika, 19 + D6 tablica, 158 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: [^{177}Lu]Lu-PSMA-617; ispitivanje kvalitete; obilježavanje radiofarmaceutika

Mentori: prof. dr. sc. Sanda Rončević i prof. dr. sc. Dražen Huić

Rad prihvaćen: 4. rujna 2026.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. doc. dr. sc. Ivan Nemet
3. dr. sc. Željka Knežević Medija



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

RADIOCHEMICAL SYNTHESIS AND QUALITY EVALUATION OF THERANOSTIC RADIOPHARMACEUTICAL [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 FOR TREATMENT OF PROSTATE CANCER

Nino Jukić

University Hospital Centre Zagreb, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb, Croatia

A novel approach to the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer focuses on the development and application of theranostic radiopharmaceuticals such as [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. This compound is used in radioligand therapy in which ionizing radiation is selectively directed toward tumor cells. The aim of this study was to develop an *in-house* procedure for the radiochemical synthesis of the theranostic radiopharmaceutical [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 using an automated synthesis module, to assess the quality of the radiopharmaceutical produced in-house and to compare its properties with those of the reference medicinal product Pluvicto[®]. *In vitro* testing of the radiopharmaceutical was performed including an assessment of radionuclidic purity. In addition, the applicability of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and gamma spectrometry for the determination of the elemental radionuclide species of ^{177}Lu used for radiopharmaceutical preparation was evaluated. The *in-house* production of ^{177}Lu -labeled radiopharmaceuticals is a reliable and cost-effective method that can be automated, resulting in high quality and efficient radiopharmaceutical production with radiochemical purity > 95 % and radiochemical yield > 96 %.

(109 + LVI pages, 28 + D57 figures, 19 + D6 tables, 158 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: [^{177}Lu]Lu-PSMA-617; quality evaluation; radiopharmaceutical labelling

Supervisors: Dr. Sanda Rončević, Full professor and Dr. Dražen Huić, Full professor

Thesis accepted: 4th September 2026

Reviewers:

Dr. Iva Juranović Cindrić, Full professor

Dr. Ivan Nemet, Assistant professor

Dr. Željka Knežević Medija, Senior Research Associate

§ 1. UVOD

Prema podacima Hrvatske lige protiv raka i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo rak prostate je prvi po učestalosti zloćudni tumor kod muškaraca u Hrvatskoj i treći uzrok smrti od karcinoma u muškoj populaciji u Europi 2022. godine s gotovo 100 000 smrti.¹ 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).^{2,3}

Za PET snimanje raka prostate, danas se u kliničkoj praksi koriste radiofarmaceutici 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 protein prostata specifični membranski antigen (PSMA) predstavlja idealan marker za obilježavanje radionuklidima u dijagnostičke i terapijske svrhe. Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) odobrila je 2020. godine [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 kao prvi dijagnostički radiofarmaceutik za PET snimanje raka prostate koji omogućuje specifično slikanje tumorskih stanica koje prekomjerno eksprimiraju PSMA.^{3,4}

Kod odraslih osoba s progresivnim metastatskim rakom prostate otpornim na kastraciju, koji je već bio liječen drugim terapijama protiv raka uključujući kemoterapiju i lijekove za smanjenje količine muških spolnih hormona primjenjuje se radioligandna terapija radiofarmaceutikom [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 komercijalnog naziva Pluvicto®.⁵ Radiofarmaceutik [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 se koristi ako stanice raka prostate imaju na svojoj površini protein PSMA, a to se utvrđuje snimanjem pacijenta na PET/CT uređaju apliciranjem dijagnostičkog radiofarmaceutika [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 intravenski.²

Cilj ovog rada bio je razviti interni postupak radiokemijske sinteze teranostičkog radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 u modulu za automatiziranu sintezu. Uz to je bilo potrebno ispitati kvalitetu dobivenog radiofarmaceutika te dobivene rezultate usporediti sa svojstvima referentnog komercijalno dostupnog radiofarmaceutika Pluvicto®.

Postavljene su dvije hipoteze rada. Prva hipoteza odnosi se na optimizaciju uvjeta radiokemijske sinteze kojom je moguće je dobiti kvalitetan teranostički radiofarmaceutik [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 siguran za internu upotrebu u medicinske svrhe.

Druga hipoteza odnosi se na povećanje radiokemijskog iskorištenja pomoću dodatka hvatača slobodnih radikala te na smanjivanje otpuštanja slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ uz dodatak kompleksirajućeg agensa Zn-DTPA.

Stoga je razvijen interni postupak radiokemijske sinteze teranostičkog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 u modulu za automatiziranu sintezu kojim je dobiven produkt usporedivih svojstava s komercijalno dostupnim radiofarmaceutikom Pluvicto®. U radu su provedena ispitivanja *in vitro* dobivenih internih produkata i referentnog radiofarmaceutika te ispitivanja čistoće spoja obzirom na prisutnost različitih radionuklida sedam dana nakon sinteza te sedam dana od datuma kalibracije referentnog radiofarmaceutika.

Nadalje, u ovom radu je iskorištena i mogućnost metoda spektrometrije masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) i gama spektrometrije za određivanje izvornih vrsta radionuklida ^{177}Lu koji se koriste u pripremi ovog radiofarmaceutika. Dobiveni rezultati u ovom radu pružaju temelj za definiranje optimalnih parametara radiokemijske sinteze potrebnih za proizvodnju prvog internog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 u Hrvatskoj, obilježenog radionuklidom ^{177}Lu , čija je kvaliteta usporediva s kvalitetom referentnog radiofarmaceutika Pluvicto® za radioligandnu terapiju.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Opće značajke radiofarmaceutika

Radiofarmaceutik je radiofarmaceutski pripravak koji se primjenjuje u nuklearnomedicinskoj dijagnostici pri ispitivanju strukture organa i njihove funkcije te u liječenju različitih bolesti.² Razvoj radiofarmaceutika započeo je 1920-ih i 1930-ih godina prošlog stoljeća kada su znanstvenici Blugmart i Weiss mjerili vrijeme prolaska krvi iz jedne ruke u drugu izotopom radij C koji je kasnije određen kao izotop ^{214}Bi .

Tehnecij dolazi od grčke riječi $\tau\epsilon\chi\nu\eta\tau\acute{o}\varsigma$, odnosno technetium na latinskom, što znači umjetan te je prvi kemijski element kojeg je čovjek umjetno proizveo i izolirao. To su prvi ostvarili znanstvenici Emilio Segrè i Carlo Perrier na Institutu za fiziku, danas Odjelu za fiziku i kemiju Sveučilišta u Palermu. Tehnecij, kemijskog simbola Tc s protonskim brojem 43, izoliran je iz folije molibdena koja je bila dio deflektora u ciklotronu Lawrence Berkeley National Laboratory u Kaliforniji, a koju je Ernest Lawrence poslao znanstveniku Emiliju Segrèu u Palermo. Godine 1938. znanstvenik Segrè je u suradnji s američkim kemičarem Glennom Theodoreom Seaborgom pomoću ciklotrona dobio karakteristični rendgenski spektar metastabilnog izotopa $^{99\text{m}}\text{Tc}$, čime je dodatno potvrđeno postojanje ovog elementa.⁶

Radionuklidi koji se rabe u nuklearnomedicinskim postupcima dobivaju se nuklearnim reakcijama fisije i zahvata neutrona u nuklearnom reaktoru te bombardiranjem ubrzanim česticama u akceleratoru kakav je najčešći ciklotron. Pojedini radionuklidi dobiveni na taj način mogu se rabiti za izgradnju radionuklidnih generatora kao što su generatori ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i ^{68}Ge - ^{68}Ga .²

Radionuklid $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se najviše približava idealnim svojstvima radiofarmaceutika. Ima kratko fizikalno vrijeme poluraspada ($T_{1/2} = 6 \text{ h}$), monokromatsko gama zračenje energije 140 keV optimalno za gama kamere, može ga se brzo dobiti pomoću generatora ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ te ima mogućnost stvaranja niza kemijskih spojeva zbog većeg broja oksidacijskih stanja.^{7,8} Kasnije je razvoj generatora ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ omogućio njegovu široku dostupnost i rutinsku kliničku primjenu.⁷ Tijekom 1970-ih godina intenzivno su razvijani različiti $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiofarmaceutici uključujući spojeve za hepatobilijarno i bubrežno oslikavanje čime je započela moderna era SPECT (engl. *singl-photon emission computerized tomography*)

dijagnostike.^{7,9,10} Daljnji napredak ostvaren je tijekom 1980-ih razvojem radiofarmaceutika ^{99m}Tc -eksasametazim (^{99m}Tc -d,l-HMPAO) za prikaz cerebralnog protoka krvi^{11,12} te ^{99m}Tc -sestamibi (^{99m}Tc -MIBI) koji je postao standard u perfuzijskom oslikavanju miokarda i ostao u širokoj primjeni do danas.^{13,14}

Značajnu prekretnicu u razvoju PET dijagnostike predstavlja uvođenje radiofarmaceutika ^{18}F -fluorodeoksiglukoza (^{18}F -FDG). Prvu sintezu radiofarmaceutika ^{18}F -FDG opisali su Ido i suradnici tijekom 1970-ih godina, dok je prvi klinički pregled ovim radiofarmaceutikom izveden 1976. godine snimanjem pozitronskom emisijskom tomografijom (PET).¹⁵ U početku se radiofarmaceutik ^{18}F -FDG primarno koristio u neurološkim istraživanjima za prikaz metabolizma glukoze u mozgu, a tijekom 1980-ih godina utvrđeno je njegovo intenzivno nakupljanje u tumorskom tkivu, što je omogućilo razvoj metode PET kao ključne metode u onkološkoj dijagnostici. Tijekom 1990-ih godina uslijedilo je regulatorno odobrenje radiofarmaceutika ^{18}F -FDG od strane FDA nakon čega se njegova primjena značajno proširila u području onkologije, neurologije i kardiologije. Danas radiofarmaceutik ^{18}F -FDG predstavlja najčešće korišteni PET radiofarmaceutik u kliničkoj praksi.

Razvoj radiofarmaceutika obilježenih radionuklidom ^{68}Ga posebno je intenziviran tijekom posljednjeg desetljeća, paralelno s razvojem teranostičkog pristupa liječenju koji spaja dijagnostiku i terapiju. Uvođenje radiofarmaceutika [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE i [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC omogućilo je visoko specifično PET oslikavanje neuroendokrinih tumora koji eksprimiraju somatostatinske receptore. Odobrenje ovih radiofarmaceutika od strane FDA tijekom 2010-ih godina označilo je važan korak prema integraciji dijagnostike i ciljane radionuklidne terapije. Primjena ^{68}Ga -radiofarmaceutika dodatno je proširena razvojem spojeva usmjerenih na prostata specifični membranski antigen (PSMA) čime je otvoreno novo poglavlje u dijagnostici i liječenju karcinoma prostate pa je tako 2020. godine, skoro 10 godina nakon otkrića odobren radiofarmaceutik [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 od strane FDA za snimanje raka prostate metodom PET/CT. Razvoj ^{68}Ga -radiofarmaceutika danas predstavlja jedan od najznačajnijih smjerova suvremene nuklearne medicine i personaliziranog pristupa liječenju bolesnika.^{16,17}

Radiofarmaceutik se sastoji od dvije komponente: radionuklida i farmaceutika. Svojstva farmaceutika određuju mehanizam distribucije i lokalizacije radiofarmaceutika u organizmu. Radionuklid kojim je obilježen farmak emitira gama zrake (γ) ili pozitronsko zračenje (β^+) što se detektira instrumentima u nuklearnoj medicini.

Radiofarmaceutici su točno određenog sastava, radiokemijske i kemijske čistoće te moraju biti sterilni, netoksični i apirogeni. Ovisno o vrsti zračenja koje radionuklidi proizvode radiofarmaceutici se mogu koristiti u dijagnostičke ili terapijske svrhe. Radionuklidi koji emitiraju β^- ili α zračenje koriste se u terapijske svrhe, dok se β^+ i γ emiteri koriste u dijagnostičke svrhe.¹⁸ Dijagnostički radiofarmaceutici se nakon biodistribucije u ljudskom organizmu oslikavaju SPECT ili PET kamerama. Nove SPECT i PET kamere pružaju uvid u anatomske lokalizacije radiofarmaceutika na mjestima pojačanog nakupljanja dodatkom CT skenera (SPECT/CT i PET/CT).² Terapijski radiofarmaceutici smanjuju ili uništavaju tumore, njegove metastaze i smanjuju bol, a moraju imati slab ili nikakav afinitet za krv ili zdravo tkivo.

To se postiže ako sve ili gotovo sve tumorske stanice imaju ciljani antigen, receptor ili kemijsku strukturu na koju se može vezati radionuklid, primjerice ^{131}I ili radiofarmaceutik.² Terapijski radionuklidi bi trebali imati vrijeme poluraspada između 6 sati i 14 dana, dok dijagnostički radiofarmaceutici imaju kraće vrijeme poluraspada što pomaže u smanjenju izloženosti zračenja pacijenta.¹⁹ Najčešće korišteni radionuklidi u nuklearnoj medicini, zajedno s njihovim osnovnim fizikalnim svojstvima i primjerima primjene, prikazani su u tablici 1.^{20,21,22}

Tablica 1. Najčešće korišteni radionuklidi u nuklearnoj medicini te njihova osnovna fizikalna svojstva i primjena^{20,21,22}

Radionuklid	$T_{1/2}$	vrsta zračenja	karakteristična energija zračenja*	primjena	primjer radiofarmaceutika
^{18}F	109,8 min	β^+	634 keV (β^+ max.)	PET	^{18}F FDG
^{68}Ga	67,7 min	β^+	1899 keV (β^+ max.)	PET	^{68}Ga Ga-PSMA-11 ^{68}Ga Ga-DOTA-TATE
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h	γ	140 keV	SPECT	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP
^{111}In	67,3 h	γ	171; 245 keV	SPECT	^{111}In -pentetretotid
^{131}I	8,02 d	β^- , γ	606 keV (β^- max.)	terapija	Na^{131}I
^{90}Y	64,1 h	β^-	2270 keV (β^- max.)	terapija	^{90}Y -mikrosfere
^{177}Lu	6,64 d	β^- , γ	498 keV (β^- max.)	teranostika	^{177}Lu Lu-PSMA-617 ^{177}Lu Lu-DOTA-TATE
^{153}Sm	46,5 h	β^- , γ	808 keV (β^- max.)	terapija koštanih metastaza	^{153}Sm -EDTMP
^{223}Ra	11,43 d	α	~5,7 MeV	α -terapija	^{223}Ra -diklorid
^{225}Ac	9,92 d	α	~5,8 MeV	teranostika	^{225}Ac Ac-PSMA

*za β^- i β^+ emitere navedena je maksimalna energija β^- i β^+ zračenja

Razvoj ciljanih radiofarmaceutika omogućio je istodobno korištenje molekularnih obilježja tumora za dijagnostičko oslikavanje i odabir bolesnika te ciljano terapijsko djelovanje što je dovelo do razvoja teranostike. Pojam „teranostika” objedinjuje terapiju („thera”) i dijagnostiku („nostic”). Teranostika je kombinirani pristup koji objedinjuje ciljanu terapiju s dijagnostičkim radiofarmaceuticima s ciljem optimizacije liječenja bolesnika u okviru personalizirane medicine. Ova strategija, koja se ubrzano razvija, pokazala je značajnu kliničku učinkovitost u liječenju metastatskih karcinoma, uz postizanje značajnih kliničkih rezultata i relativno nisku toksičnost.²³

Jedan od važnih terapijskih pristupa koji se razvijao unutar koncepta teranostike jest radioligandna terapija (RLT). Riječ je o obliku ciljane radionuklidne terapije u kojem se terapijski radionuklid povezuje s ligandom koji specifično prepoznaje određenu molekularnu metu na tumorskim stanicama. Nakon vezanja radioliganda na ciljanu strukturu, emitirano ionizirajuće zračenje omogućuje selektivno oštećenje i uništenje ciljnih tumorskih stanica, uz nastojanje da se istodobno ograniči izlaganje okolnog zdravog tkiva. Jedan od najznačajnijih primjera takve primjene je radiofarmaceutik [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, koji se primjenjuje u radioligandnoj terapiji bolesnika s metastatskim karcinomom prostate pozitivnim na prostata specifični membranski antigen (PSMA).^{24,25}

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

Farmaceutik mora biti netoksičan, siguran za aplikaciju pacijentima te mora osigurati stabilnost radiofarmaceutika *in vivo*. Može funkcionirati kao neradioaktivni nosač koji prenosi radionuklid do ciljnog organa/tkiva ili kao kompleksirajući agens koji nakon reakcije s radionuklidom tvori novi spoj s različitim kemijskim i biološkim svojstvima.²⁶

Budući da su radiofarmaceutici namijenjeni za primjenu kod ljudi nužno je ispitati njihovu kvalitetu. Ispitivanje kvalitete radiofarmaceutika uključuje nekoliko specifičnih testova i mjerenja koja osiguravaju čistoću, radiokemijski identitet proizvoda, biološku sigurnost i učinkovitost radiofarmaceutika. Svi postupci ispitivanja kvalitete koji se primjenjuju na neradioaktivne farmaceutike jednako su primjenjivi i na radiofarmaceutike.

Većinom testove ispitivanja kvalitete komercijalno dostupnih radiofarmaceutika provode proizvođači od početka proizvodnje pa sve do gotovog proizvoda. Međutim, priprema internih radiofarmaceutika u bolničkoj radiofarmaciji također zahtijeva ispitivanje kvalitete prije aplikacije pacijentima.^{4,27}

Ispitivanja kontrole kvalitete mogu se podijeliti u dvije kategorije: fizikalno-kemijska i biološka ispitivanja. Fizikalno-kemijskim ispitivanjima određuje se razina radionuklidnih i radiokemijskih nečistoća, vrijednost pH i fizikalno stanje uzorka, osobito u slučaju koloidnih pripravaka te prisutnost organskih otapala. Biološkim ispitivanjima utvrđuju se sterilnost, apirogenost i toksičnost materijala. Uz sve navedene testove provodi se i određivanje vremena poluraspada radionuklida korištenog za obilježavanje radiofarmaceutika u svrhu potvrde njegova radionuklidnog identiteta.⁴

2.1.1. Osnovni pojmovi aktivnosti, doze i dozimetrije primjenom radiofarmaceutika

Aktivnost radionuklida predstavlja broj radioaktivnih pretvorbi neke vrste jezgre u jedinici vremena i označava se simbolom A . Mjerna jedinica aktivnosti u Međunarodnom sustavu jedinica (SI) je bekerel oznake 1 Bq koji odgovara jednoj radioaktivnoj pretvorbi u sekundi. U nuklearnoj medicini najčešće se koriste jedinice kBq, MBq i GBq, ovisno o količini aktivnosti koja se primjenjuje. Aktivnost radionuklida smanjuje se tijekom vremena zbog radioaktivnog raspada, pri čemu se promjena aktivnosti može opisati formulom (1):²⁸

$$A_t = A_0 \cdot e^{-\lambda \cdot t} \quad (1)$$

pri čemu je A_t aktivnost u trenutku, A_0 početna aktivnost, λ konstanta raspada, a t vrijeme.

Kod primjene radiofarmaceutika posebno je važna aktivnost prilikom apliciranja, odnosno količina radioaktivnosti koja se primjenjuje bolesniku u određenom trenutku. Budući da se aktivnost radiofarmaceutika kontinuirano smanjuje radioaktivnim raspadom, pri navođenju aktivnosti potrebno je navesti i vrijeme na koje se vrijednost odnosi. U terapiji radiofarmaceuticima, poput [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, aktivnost radiofarmaceutika koja je aplicirana predstavlja jedan od osnovnih parametara koji određuju količinu ionizirajućeg zračenja kojoj su izloženi tumorsko tkivo i zdravi organi.²⁹

Prilikom apliciranja radiofarmaceutika pacijentu apsorbiranu dozu zračenja treba smanjiti na najmanju moguću mjeru. Apsorbirana doza zračenja određena je fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima radionuklida. Fizikalna svojstva radionuklida uključuju vrstu radioaktivnog raspada i fizikalno vrijeme poluraspada, kemijska svojstva radionuklida uključuju stabilnost *in vivo* i kemijsku stabilnost, a biološka svojstva radionuklida uključuju distribuciju, biološki put i biološko vrijeme eliminacije.²

Apsorbirana doza predstavlja srednju energiju koju ionizirajuće zračenje preda jedinici mase ozračenog materijala te se definira prema formuli (2):²⁸

$$D = \frac{E}{m} \quad (2)$$

pri čemu je D apsorbirana doza, E predana energija, a m masa ozračenog tkiva. Jedinica za mjerenje apsorbirane doze je grej (Gy), pri čemu je 1 Gy jednak 1 J kg⁻¹. Ako se apsorbirana doza podjeli s vremenom u kojem je primljena dobijemo veličinu koja se zove brzina apsorbirane doze, a mjeri se u Gy h⁻¹ ili mGy h⁻¹ ili slično. Apsorbirana doza osnovna je fizikalna veličina za opis količine energije koju zračenje predaje tkivu. Osim apsorbirane doze, koriste se ekvivalentna doza i efektivna doza, koje se izražavaju u sievertima (Sv). Ekvivalentna doza H_T odnosi se na pojedino tkivo ili organ, a vrijednost doze dobiva se množenjem apsorbirane doze D s težinskim koeficijentom zračenja W_R prema formuli (3):²⁸

$$H_T = W_R \cdot D_T \quad (3)$$

pri čemu je R zračenje vrste R , a T tkivo vrste T . Težinski koeficijenti zračenja ovise o vrsti zračenja i prikazani su u tablici 2.²⁸

Tablica 2. Težinski koeficijenti zračenja²⁸

vrsta i energija zračenja	težinski koeficijent
fotoni svih energija	1
elektroni svih energija	1
neutroni energije	
< 10 keV	5
> 10–100 keV	10
> 100 keV–2 MeV	20
> 2–20 MeV	10
> 20 MeV	5
protoni, osim raspršenih, energije > 2 MeV	5
alfa čestice, fisijski fragmenti, teške jezgre	20

Nadalje, nije svako tkivo jednako osjetljivo na ionizirajuće zračenje. Osjetljivost tkiva izražava se uvođenjem još jednog koeficijenta, W_T pri čemu je T težinski koeficijent tkiva. U tablici 3 dani su koeficijenti za određena tkiva.²⁸

Tablica 3. Koeficijenti za određena tkiva²⁸

tkivo ili organ	težinski koeficijenti tkiva
gonade	0,20
koštana srž (crvena)	0,12
debelo crijevo	0,12
pluća	0,12
želudac	0,12
mjehur	0,05
grudi	0,05
jetra	0,05
jednjak	0,05
štitna žlijezda	0,05
koža	0,01
površina kosti	0,01

Zbroj umnožaka težinskog tkiva i ekvivalentne doze tog tkiva naziva se efektivna doza E_T i dana je formulom (4):²⁸

$$E_T = \sum H_T \cdot W_T = \sum W_R \sum W_T \cdot D_T \quad (4)$$

Jedinica za efektivnu dozu opet je 1 Sv i dana je za cijelo tijelo.

Sva tkiva nisu jednako osjetljiva na zračenje, neka su više osjetljiva, a neka manje. Kod ocjene štetnosti određene vrste ionizirajućeg zračenja treba uzeti u obzir i tu osjetljivost. Naime, nije svejedno radi li se o alfa, beta ili gama zračenju. Ako je izvor alfa zračenja blizu tijela, neće se osjetiti nikakve posljedice, jer se ionizacija dogodila u zraku između izvora i kože te nema apsorpcije energije u tijelu, već izvan tijela. Ako je izvor gama zračenja blizu tijela, ionizirajuće zračenje odnosno fotoni se slabo apsorbira u zraku koji ima manju gustoću od tkiva, već se uglavnom apsorbira u tkivu i organima na tri načina, a to su fotoelektrični efekt, Comptonovo raspršenje i stvaranje para elektron-pozitron. Ionizirajuće zračenje oslabljeno za apsorbiranu energiju odnosno dozu izlazi čak iz tijela i odlazi dalje.²⁸

Dozimetrija radiofarmaceutika predstavlja procjenu doze ionizirajućeg zračenja koju radiofarmaceutik isporučuje pojedinim organima, tkivima i tumorskim lezijama. U slučaju terapijskih radiofarmaceutika, apsorbirana doza ovisi o raspodjeli i zadržavanju radiofarmaceutika u organizmu, njegovoj biokinetici, fizikalnom vremenu poluraspada radionuklida te masi ciljnih organa ili tkiva.^{30,31} Za određivanje apsorbirane doze u unutarnjoj dozimetriji često se primjenjuje pristup MIRD (engl. *medical internal radiation dose*) prema kojem se apsorbirana doza u ciljnom tkivu određuje na temelju kumulativne aktivnosti u izvoru i odgovarajućeg faktora S.^{32,34} Faktor S uzima se iz tablica/modela ili se izračunava računalnom simulacijom, posebno kod individualne dozimetrije.^{31,33} Apsorbirana doza u ciljnom tkivu izračunava se prema formuli (5):²⁸

$$D_T = A_S \cdot S(T \leftarrow S) \quad (5)$$

pri čemu je D_T apsorbirana doza u ciljnom tkivu T najčešće u Gy, A_S kumulativna aktivnost u izvornom tkivu u jedinicama $\text{Bq} \cdot \text{s}^{-1}$, a $S(T \leftarrow S)$ faktor S, odnosno doza koju ciljnom tkivu T isporuči jedinica kumulativne aktivnosti u izvoru S u jedinicama $\text{Gy Bq}^{-1} \text{s}^{-1}$.³²

Kod terapijskih radiofarmaceutika primjenjuje se i individualna dozimetrija koja omogućuje procjenu apsorbirane doze u tumorskim lezijama i zdravim organima te može pridonijeti optimizaciji odnosa između terapijskog učinka i izloženosti zdravih tkiva.^{35,36}

2.1.2. Utjecaj dodatka hvatača slobodnih radikala i kompleksirajućeg agensa

Razgradnja radiofarmaceutika pod utjecajem inkorporiranog radionuklida, odnosno radioliza, poznata je pojava koja se javlja tijekom obilježavanja radiofarmaceutika radionuklidom ^{177}Lu te drugih radiofarmaceutika obilježenih α ili β^- emiterima. Proces je pretežno posredovan solvatomiziranim elektronima, radikalima i visoko reaktivnim molekulama koje nastaju radiolizom vode, pri čemu se stvaraju i reaktivne kisikove vrste što predstavlja neizravnu radiolizu.³⁷

U manjoj mjeri radioliza može biti posljedica izravnog djelovanja ionizirajućeg zračenja na molekule radiofarmaceutika, odnosno izravne radiolize. Prisutnost radiolitičkih produkata u radiofarmaceutiku može uzrokovati neželjene i ozbiljne nuspojave. Stoga je ključno smanjiti radiolizu uporabom aditiva koji ublažavaju radiolizu. Takvi aditivi nazivaju se hvatači slobodnih radikala. U kliničkom kontekstu hvatači slobodnih radikala moraju biti prikladni za primjenu kod ljudi, a najčešće se upotrebljavaju askorbinska kiselina ili etanol. Oni ne smiju reagirati niti s jednim reagensom prilikom pripreme radiofarmaceutika^{4,38}

Vrlo prihvaćen način sinteze radiofarmaceutika je pomoću automatiziranih uređaja kojima se maksimalno povećava prinos tijekom sinteze, a također se smanjuje utjecaj mogućih kontaminacija do kojih bi došlo u sintezi klasičnim postupcima. Automatizirani postupci također omogućuju dodavanje aditiva tijekom postupka.

Primjerice, etanol se često koristi kao otapalo ili dodatak za povećanje topljivosti farmaceutskih pripravaka ili kao konzervans. Etanol je biokompatibilan, ne pokazuje toksičnost niti imunoreaktivnost i proizveden je u skladu sa smjernicama GMP (engl. *Good Manufacturing Practice*) te nema sposobnost vezanja na biološke mete.³⁹ Radiokemijska sinteza u modulu za automatiziranu sintezu s dodatkom hvatača slobodnih radikala općenito dovodi do manje potošnje količine peptida, smanjenog broja nusprodukata radiolize, minimalne izloženosti zračenju i maksimalne pouzdanosti i ponovljivosti. Uporaba etanola u takvom uređaju poboljšava prijenos peptida kroz cjevčice kasete za sintezu. Etanol utječe na topljivost peptida zbog čega se manja količina peptida zadržava na stijenkama cjevčica pa su sukladno tome i

gubici peptida tijekom prijenosa smanjeni na minimum. Kao rezultat toga, čak i pri vrlo niskim koncentracijama prekursora, ponovljivost sinteze i radiokemijsko iskorištenje se povećava.³⁸

Vrijednost pH radiofarmaceutika vrlo je važna za njegovu stabilnost i biološka svojstva. Održavanje odgovarajuće vrijednosti pH postiže se dodavanjem kiseline, lužine ili prikladnih pufera radiofarmaceutskom pripravku.⁴ Istraživanja su pokazala da je askorbinska kiselina dobar pufer za kontrolu vrijednosti pH te izvrstan antioksidans za stabilizaciju određenih radiofarmaceutika. Primjer za to su spojevi obilježeni radionuklidom ^{177}Lu , gdje dodatak askorbinske kiseline sprječava radiolizu spoja. Nakupljanje radiofarmaceutika u tumoru u velikoj je mjeri ovisno o vezanju radioaktivno obilježene biomolekule za receptor, a radiolitička razgradnja može dovesti do smanjene terapijske učinkovitosti i neželjene radijacijske toksičnosti za zdrave organe. Stoga je važno da radionuklid ostane vezan za ciljnu molekulu te da se očuva specifičnost ciljane biomolekule. Vrijednost pK_a askorbinske kiseline iznosi 4,2, a najveću pufersku sposobnost pokazuje u području pH 3,5–5,5. Pri višim koncentracijama ($> 50 \text{ mg mL}^{-1}$ ili $> 0,25 \text{ mol dm}^{-3}$) može imati dovoljnu pufersku sposobnost i u području pH 5,5–6,0.

Budući da askorbinska kiselina sadrži dvije hidroksilne skupine od kojih se jedna može deprotonirati pri $\text{pH} > 4,2$ ona također može djelovati kao slabi kelator i tako spriječiti stvaranje koloida radioaktivnih metala. Ako se askorbinska kiselina koristi u području pH 4,0–6,0 nema potrebe za dodatnim puferom za obilježavanje radiofarmaceutika.⁴⁰

U određenim slučajevima sinteze radiofarmaceutika, potrebno je dodavati kompleksirajuće reagense zbog izbjegavanja neželjenih učinaka nakon primjene. Primjer neželjenih učinaka je ponašanje radionuklida ^{177}Lu u slučaju kada se nađe kao slobodan ion u stanici. Čak i mala količina slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ može se nakupiti u kostima te tako može uzrokovati neželjeno ozračivanje koštane srži. Razlog nakupljanja u kostima leži u sličnoj veličini iona kao što je ion kalcija (Ca^{2+}) koji sudjeluje u izgradnji hidroksiapatita u koštanom sustavu.

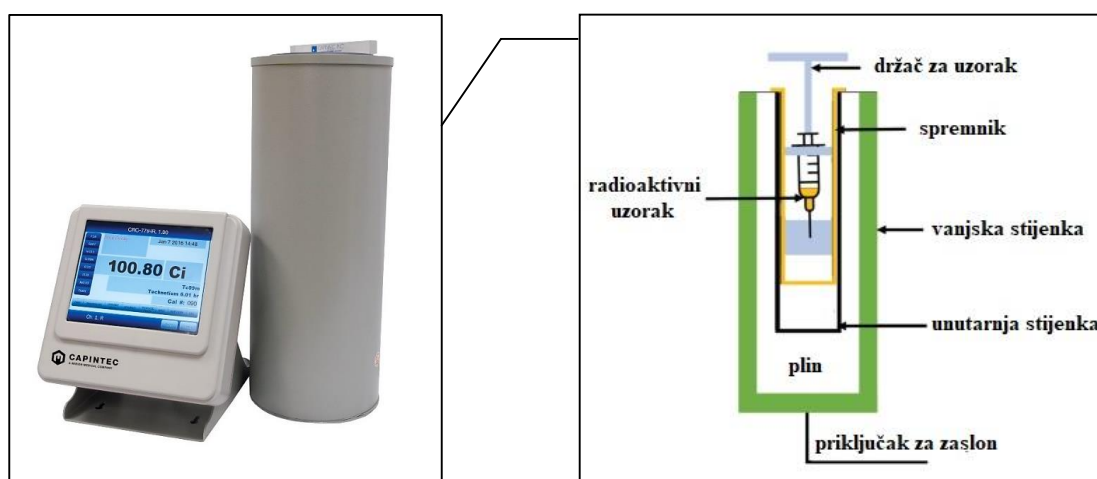
Tijekom sinteze takvih radiofarmaceutika potrebno je dodati kompleksirajući reagens. Dodatkom kompleksirajućeg agensa dietilentriaminpentaoctene kiseline (DTPA) na kraju radiokemijske sinteze ^{177}Lu -radiofarmaceutika, slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ se pretvara u stabilni kompleks ^{177}Lu -DTPA koji se brzo izlučuje putem bubrega. Iz tog razloga se nakon obilježavanja peptida radionuklidom ^{177}Lu preporučuje dodavanje DTPA prije intravenske

primjene. Time se značajno smanjuje nakupljanje radioaktivnosti u kostima te se povećava sigurnost terapije.⁴¹

2.2. Instrumenti za mjerenje i detekciju zračenja u nuklearnoj medicini

U nuklearnoj medicini jedan od najvažnijih instrumenata za mjerenje aktivnosti radionuklida, pripremu radiofarmaceutika te pripremu pojedinačnih doza je kalibrator doza (engl. *dose calibrator*). Kalibrator doza je zatvorena komora cilindričnog oblika s dvije koncentrične stijenke ispunjene plemenitim plinom pod visokim tlakom i središnjim spremnikom.

U komori se nalaze pozitivna i negativna elektroda koje su na potencijalu od 150 keV. Aktivnost se prikazuje na zaslonu kalibratora doze u odgovarajućoj jedinici (GBq, MBq, mCi, μ Ci).²⁷ Kalibrator doza sa shematskim prikazom unutrašnjosti instrumenta prikazan je na slici 1.^{42,43}



Slika 1. Kalibrator doza sa shematskim prikazom unutrašnjosti instrumenta^{42,43}

Dvije osnovne nuklearnomedicinske dijagnostičke slikovne metode za snimanje bioraspodjele radiofarmaceutika u tijelu su scintigrafija pomoću gama kamere i pozitronska emisijska tomografija (PET). Nakon apliciranja radiofarmaceutika pacijentu, najčešće intravenski i nakon njegove biodistribucije pomoću gama kamere dobiva se slikovni prikaz prostorne i vremenske raspodjele nakupljanja radiofarmaceutika u organu ili dijelu tijela od interesa. Gama kamera detektira gama zračenje pomoću scintilacijskog detektora izrađenog od kristala Na(Tl)I čime se dobije se scintigrafska snimka odnosno scintigram. Osnovni dijelovi gama kamere jesu: kućište, stol za bolesnika, detektor, kolimator, upravljačka radna stanica i

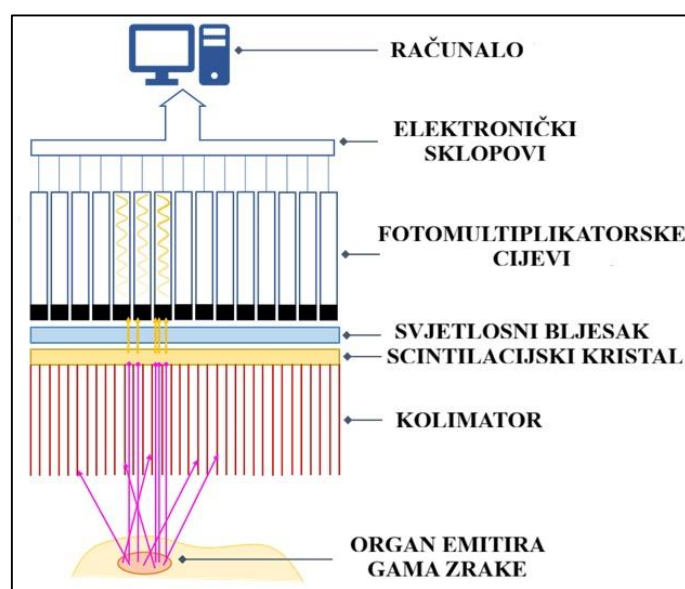
radna stanica za prikaz, obradu i pohranu snimljenih pretraga. Kućište gama kamere drži detektore (glave) gama kamere i stol u zajedničkoj cjelini koja omogućuje pomicanje detektora i stola na takav način da se pomoću uređaja provode sve vrste pretraga u nuklearnoj medicini.

Stol gama kamere tvori plohu na kojoj leži pacijent. Ploha je pomična i omogućava da ispitanikovo tijelo prolazi ispod glave gama kamere u određenom pomaku i u određenom vremenskom intervalu što omogućava snimanje scintigrama cijelog tijela. Konstrukcija stola omogućava da detektor gama kamere kruži oko bolesnika što omogućava snimanje emisijske kompjutorizirane tomografije (SPECT).

Kolimator služi za usmjeravanje gama zraka iz bolesnika prema kristalu gama kamere, a izgrađen je od olovnih ploča u kojima su izbušeni brojni kanali. Pregrade koje međusobno odvajaju kanale zaustavljaju gama zrake koje ne slijede smjer kanala i ne propuštaju ih do kristala. Na svaku gama kameru mogu se postaviti kolimatori različitih vrsta ovisno o pretrazi koja se izvodi i o energiji gama zračenja radionuklida koji se koristi. Dijele se na niskoenergijske (70–200 keV), srednjeenergijske (200–300 keV) i visokoenergijske (> 300 keV) ovisno o energiji gama zraka. Kolimator se postavlja na kućište detektora. Detektor gama kamere smješten je u kućište. Kućište ima otvor u kojem je smješten kristal detektora. Kolimator se postavlja ispred kristala detektora, a pričvršćuje se za kućište detektora. Kućište detektora omogućava pomake detektora u raznim smjerovima, pruža zaštitu detektora od udaraca, osnovnog ionizirajućeg zračenja i vidljive svjetlosti. Sastavni dijelovi detektora su: scintilacijski kristal, fotomultiplikatorske cijevi i elektroničke sklopovi detektora (pretpojačalo, pojačalo, pulsno-aritmetički elektronički krugovi, analizator visine impulsa). Scintilacijski kristal gama kamere čini natrijev jodid aktiviran talijem, NaI(Tl). Kristal se nalazi u zaštitnom aluminijskom ovitku kako bi se spriječio doticaj s vlagom, vanjskom svjetlošću ili najmanjim fizičkim oštećenjem te izvršno apsorbira gama zrake niske i srednje energije. Debljina kristala kreće se od 3,2 do 12,7 mm. Tanji kristali imaju bolju prostornu rezoluciju, ali slabije zaustavljaju gama zrake energija većih od 140 keV.

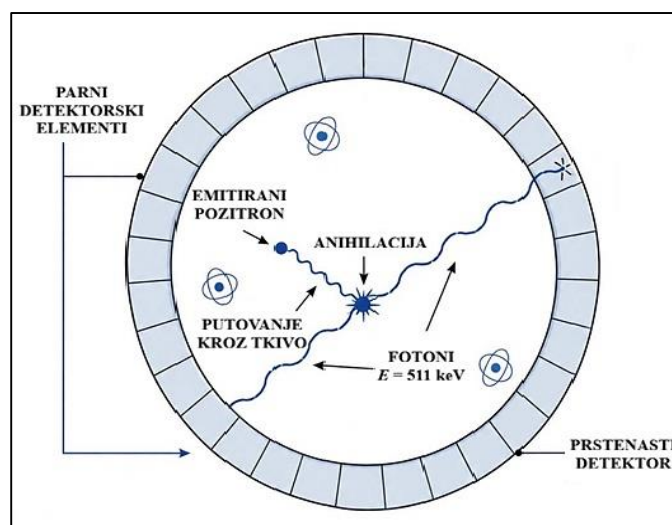
U nuklearnoj medicini se primjenjuju radionuklidi čije gama zrake ne prelaze energije veće od 400 keV. Kristali su najčešće pravokutnog oblika (540x400 mm) čime se dobiva široko vidno polje gama kamere. Interakcija gama zrake s kristalom rezultira ionizacijom koja u kristalu scintilacijskog detektora izaziva svjetlosni bljesak, odnosno scintilaciju koja je proporcionalna ionizaciji prouzrokovanoj gama zrakom. Fotomultiplikatori pokrivaju stražnju stranu kristala, a s kristalom su spojene tankim svjetlopropusnim slojem. Fotomultiplikatorske

cijevi pretvaraju svjetlosni impuls scintilacije u električni i pojačavaju ga. Scintilacija koja je nastala u kristalu dovoljno je snažna da je registriraju fotokatode svih fotomultiplikatora. Fotomultiplikator koji se nalazi najbliže izvoru bljeska registrirat će ga najsnažnije.¹ Osnovni dijelovi gama kamere prikazani su na slici 2.⁴⁴



Slika 2. Osnovni dijelovi gama kamere⁴⁴

Oslikavanje metodom PET temelji se na uporabi radiofarmaceutika koji u β^+ raspadu emitiraju pozitivno nabijeni elektron, e^+ odnosno pozitron, β^+ , česticu po svemu identičnu elektronu osim po predznaku električnog naboja. Pozitron nastao raspadom gubi kinetičku energiju u sudarima s atomima i kada dođe do točke zaustavljanja odnosno dosega, veže se s jednim negativnim 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° . Takvi su fotoni osnova detekcije u tehnici oslikavanja pozitronskom emisijskom tomografijom pa se PET zove i dvofotonska tomografija. Danas postoje moderniji i puno bolji kombinirani PET/CT uređaji koji su standard za PET slikanje.¹ Princip rada PET prstenastog detektora prikazan je na slici 3.⁴⁵

Slika 3. Shematski prikaz PET prstenastog detektora⁴⁵

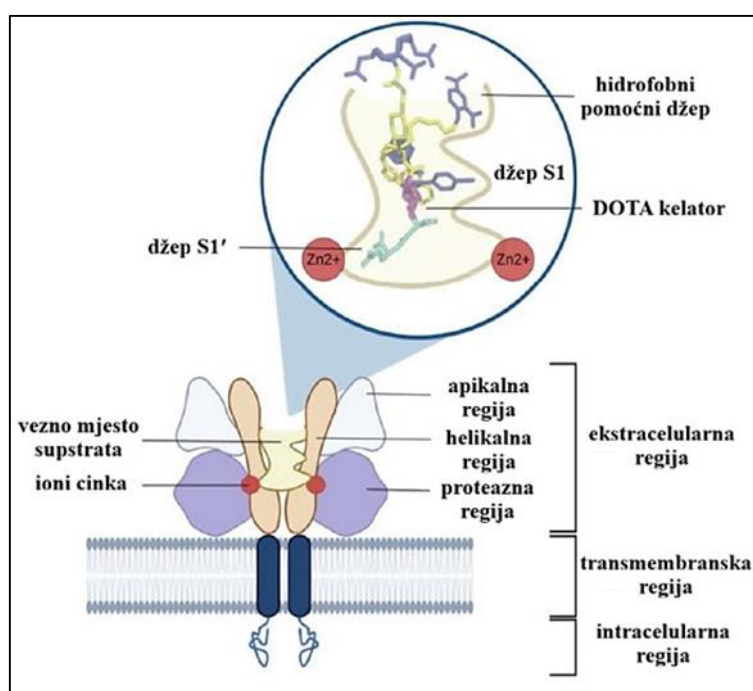
2.3. Prostata specifični membranski antigen (PSMA) i inhibitori

Prostata specifični membranski antigen (PSMA) je transmembranski glikoprotein tipa II koji se nalazi na površini stanica raka prostate. Fiziološka ekspresija prostata specifičnog membranskog antigena prisutna je u nekoliko zdravih tkiva, uključujući žlijezde slinovnice i suzne žlijezde, proksimalni dio tankog crijeva, bubrege, mozak, jetru i slezenu. Iako je prostata specifični membranski antigen izražen i u normalnom tkivu prostate, njegova je ekspresija značajno povećana u većini primarnih i metastatskih lezija karcinoma prostate. Ekspresija prostata specifičnog membranskog antigena također je prisutna u metastatski zahvaćenim limfnim čvorovima i koštanim metastazama. Posljednjih godina prostata specifični membranski antigen postao je važna molekularna meta za dijagnostiku, određivanje stadija bolesti i liječenje karcinoma prostate zbog selektivno povećane ekspresije u 90–100 % lezija karcinoma prostate.

Receptor prostata specifični membranski antigen (PSMA) sastoji se od 750 aminokiselina, pri čemu je 19 smješteno u unutarstaničnoj regiji, 24 u transmembranskoj regiji, a 707 u izvanstaničnoj regiji.^{18,19} Nakon vezanja liganda PSMA na receptor PSMA, kompleks se internalizira u stanicu endocitozom te se transportira u endosome koji se spajaju s lizosomima. Zatim se PSMA reciklira i vraća na plazmatsku membranu ili se razgrađuje lizosomalnom razgradnjom. Ligand se oslobađa unutar stanice i može djelovati dijagnostički ili terapijski.^{46,47,48}

Izvanstranični dio PSMA sastoji se od tri podregije: proteazne, apikalne i helikalne regije. Unutar tih regija nastaje velika šupljina koja tvori mjesto vezanja supstrata receptora

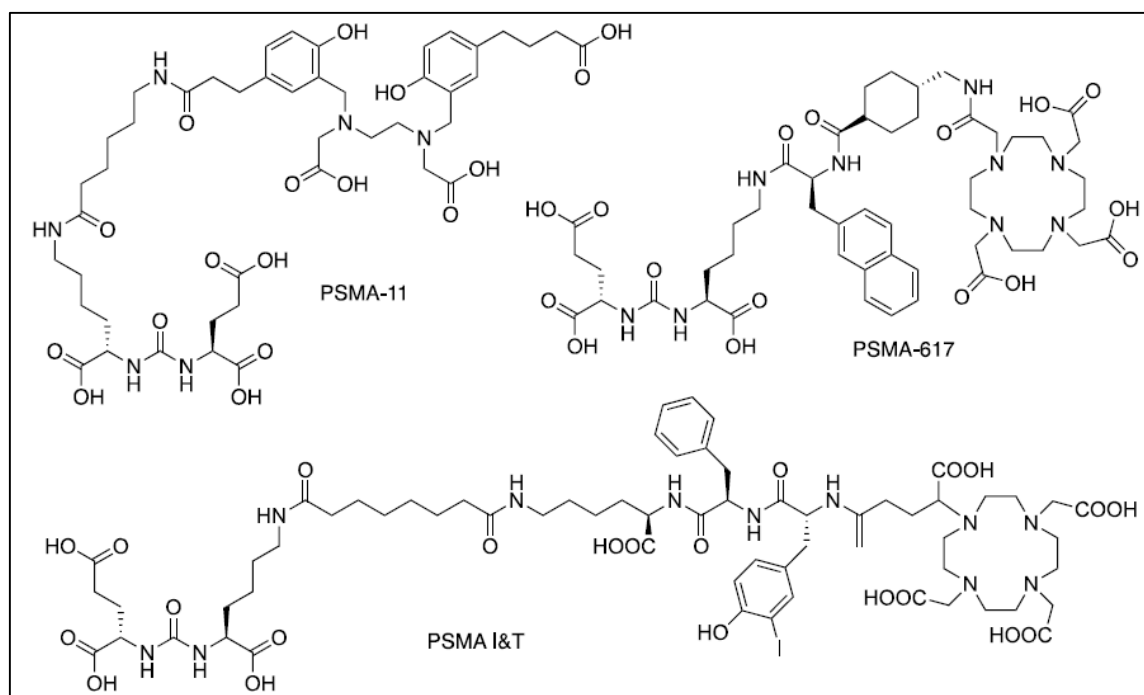
PSMA. Vezna šupljina receptora PSMA ima ulazni kanal lijevkastog oblika, duljine približno 20 Å. Zajednička značajka radiofarmaceutika koji sadrže ligand PSMA je strukturni motiv GluCO-Lys koji predstavlja gradivni element posebno pogodan za razvoj snažnih inhibitora PSMA. Aktivno vezno mjesto receptora PSMA sastoji se od dva cinkova iona Zn^{2+} , dva vezna džepa S1 i S1' te hidrofobnog pomoćnog džepa. Karboksilna skupina uree se veže na aktivno središte koje sadrži dva cinkova iona. Vezni džep S1 sudjeluje u vezanju i pravilnoj orijentaciji supstrata odnosno liganda unutar aktivnog mjesta receptora. Glutamat kao ionizirani oblik glutaminske kiseline, savršeno se uklapa u vezni džep S1' za prepoznavanje glutamata. Dodatne lipofilne interakcije obilježenih inhibitora PSMA s hidrofobnim pomoćnim džepom za vezanje aromatskih skupina dodatno povećavaju afinitet i selektivnost vezanja na receptor PSMA (slika 4).^{49,50} Spojevi kojima nedostaje jedna ili više ovih interakcija pokazuju znatno niži afinitet vezanja. Sve ove interakcije u veznom džepu receptora PSMA dovode do povoljnog afiniteta radiofarmaceutika koji iznosi $2,0 \pm 0,3$ nM za radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.⁵¹



Slika 4. Shematski prikaz strukture receptora prostata specifičnog membranskog antigena (PSMA)⁵⁰

Inhibitori prostata specifičnog membranskog antigena (PSMA) obilježeni radionuklidom ^{68}Ga za dijagnostičku ili radionuklidom ^{177}Lu za terapijsku svrhu značajno su

unaprijedili dijagnostiku i liječenje karcinoma prostate, a prikazani su na slici 5.⁴⁹ Među njima se ističu dijagnostički radiofarmaceutici poput [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 i [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE koji se primjenjuju u pozitronskoj emisijskoj tomografiji s kompjutoriziranom tomografijom (PET/CT) te terapijski radiofarmaceutici [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 i [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-I&T obilježeni radionuklidom ¹⁷⁷Lu, koji se koriste u ciljanoj radioligandnoj terapiji primjenom β⁻emitera.



Slika 5. Kemijske strukture inhibitora PSMA: PSMA-11, PSMA-617 i PSMA-I&T⁴⁹

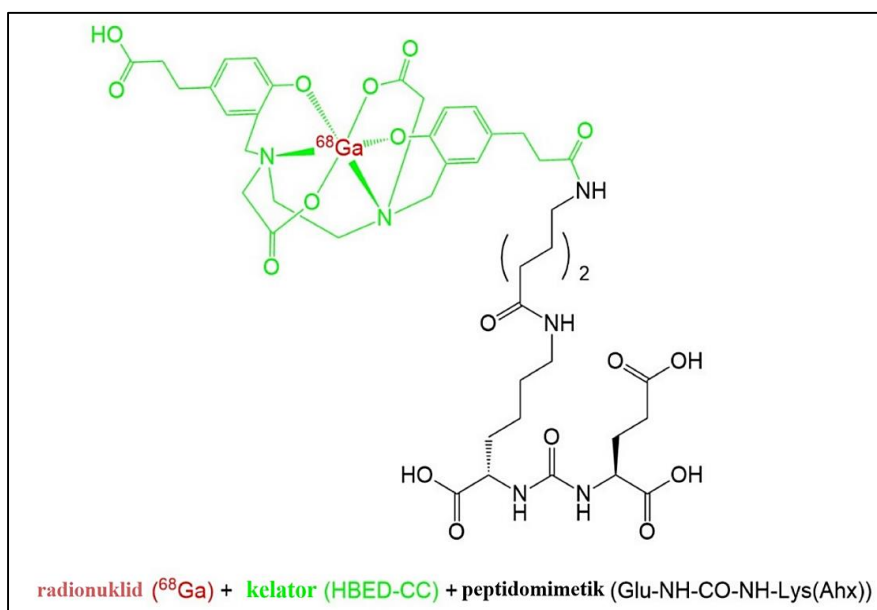
Kao primjer, [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 je dijagnostički radiofarmaceutik namijenjen za lokalizaciju pozitivnih PSMA lezija kod muškaraca s rakom prostate uporabom metode PET. Iznimno je koristan u slučajevima sumnje na metastaze kod početne terapije i u slučajevima sumnje na recidiv na temelju povišenih razina prostata specifičnog antigena (PSA) u serumu. Godine 2016. za PET snimanje raka prostate ovaj radiofarmaceutik predložen je kao ključna tehnologija za individualiziranu radioterapiju pacijenata s rakom prostate budući da je došlo do promjene terapija u 50,8 % slučajeva.^{16,52,53}

Agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila je 2020. godine [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 kao prvi radiofarmaceutik obilježen s radiounklidom ⁶⁸Ga za PET snimanje raka prostate. Ovo odobrenje upućeno je gotovo 10 godina nakon otkrića spoja.

Radiofarmaceutik [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 naziva se još i je još i [^{68}Ga]Ga-PSMA-HBED-CC, odnosno [^{68}Ga]Ga-HBED-CC-Ahx-Lys(OH)-CO-Glu(OH). Prema IUPAC nomenklaturi naziv radiofarmaceutika je [^{68}Ga]galij-(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 6 prikazana je kemijska struktura radiofarmaceutika [^{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 odnosno peptidni analog somatostatina koji se veže na ekstracelularnu domenu proteina PSMA aplikacijom radiofarmaceutika intravenski.¹⁶

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 poveznica u raznim biološki aktivnim strukturama.⁵³

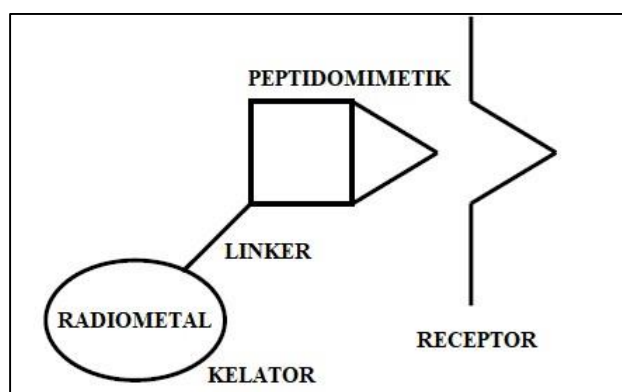


Slika 6. Kemijska struktura radiofarmaceutika [^{68}Ga]Ga-PSMA-11¹⁶

Obilježavanje radiofarmaceutika s radionuklidom ^{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.²

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.² Na slici 7 je shematski prikaz 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.⁵⁴



Slika 7. Shematski prikaz peptidomimetika obilježen radiometalom kovalentno vezan na kelator⁵⁴

Prekomjerna ekspresija somatostatinskih receptora (SSTR) u neuroendokrinim tumorima (engl. *neuroendocrine tumors*, *NET*) omogućila je razvoj dijagnostičkih metoda snimanja primjenom scintigrafije s radioaktivno obilježenim analogima somatostatina.^{55,56} Do danas je karakterizirano pet podtipova somatostatinskih receptora (engl. *somatostatin receptor*, *SSTR*) pri čemu su svi različito zastupljeni u neuroendokrinim tumorima. Receptori SSTR-2 i SSTR-5 eksprimirani su u 70–90 % neuroendokrinih tumora.

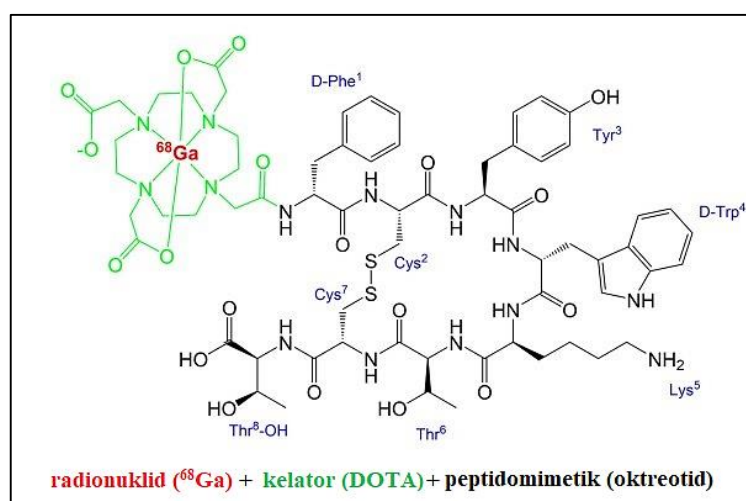
Nekoliko analoga somatostatina obilježenih radionuklidom ⁶⁸Ga, kao što su [DOTA⁰,Tyr³]-oktreotid (DOTA-TOC), [DOTA⁰,1-Na³]-oktreotid (DOTA-NOC) i [DOTA⁰,Tyr³,Thr⁸]-oktreotat (DOTA-TATE), uspješno se primjenjuju u dijagnostičkoj identifikaciji različitih tumora, a osobito neuroendokrinih tumora.⁵⁷⁻⁶⁴ Radiofarmaceutik [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE pokazuje pretežan afinitet prema receptoru SSTR-2 te omogućuje postizanje visokih omjera aktivnosti u ciljnom tkivu u odnosu na neciljno tkivo, odnosno visok omjer ciljano/neciljano (engl. *target-to-non-target*).⁶⁵

Agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila je 2019. godine radiofarmaceutik $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ za primjenu u pozitronskoj emisijskoj tomografiji (PET) u svrhu oslikavanja gastroenteropankreatičnih neuroendokrinih tumora s pozitivnom ekspresijom somatostatinskih receptora (SSTR).⁶⁶

Radiofarmaceutik $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ naziva se još i ^{68}Ga -edotreotid te $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(Tyr}^3\text{)-oktreotat}$. Prema IUPAC nomenklaturi naziv radiofarmaceutika je $[^{68}\text{Ga}]\text{galij-2-[4-[2-[[[(2R)-1-[(4R,7S,10S,13R,16S,19R)-10-(4-aminobutil)-4-[(1S,2R)-1-carboksi-2-hidroksipropil]karbamoil]-7-[(1R)-1-hidroksietil]-16-[(4-hidroksifenil)methyl]-13-(1H-indol-3-ilmethyl)-6,9,12,15,18-pentaokso-1,2-ditia-5,8,11,14,17-pentazacikloikos-19-il]amino]-1-oksoo-3-fenilpropan-2-il]amino]-2-oksoetil]-7,10-bis(karboksilatometil)-1,4,7,10-tetrazaciklododeka-1-il]acetat}$.⁶⁷

Radionuklid ^{68}Ga kompleksira bifunkcionalni kelator DOTA odnosno 1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraoctena kiselina, koji djeluje kao heksadentatni kelator oktaedarske geometrije te koordinira ^{68}Ga putem četiri atoma dušika i dviju karboksilnih skupina. Spoj $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ vezan je na somatostatinski peptidomimetik (D-Phe¹, Tyr³)-oktreotid.

Na slici 8 prikazana je struktura radiofarmaceutika $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ u pojednostavljenom strukturnom prikazu, uključujući geometriju i kompleksiranje iona $^{68}\text{Ga}^{3+}$ unutar DOTA kelatorskog sustava.⁶⁸



Slika 8. Kemijska struktura radiofarmaceutika $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ ⁶⁶

Kelator DOTA odnosno 1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraoctena kiselina korišten u spojevima PSMA-617 i PSMA-I&T, najprikladniji je kelator za smještaj unutar

vezujuće domene receptora PSMA ako je cilj terapijski učinak u usporedbi s kelatorom HBED-CC za dijagnostičku upotrebu.⁴⁹

Osim interakcija motiva Glu-CO-Lys unutar aktivnog mjesta, visoki afinitet spoja PSMA-11 odnosno PSMA-HBED-CC vjerojatno proizlazi i iz lipofilnih interakcija metalnog kelatora HBED-CC s mjestom za vezanje aromatskih skupina na receptor PSMA. Međutim, kelator HBED-CC ne može stabilno vezati terapijske radionuklide poput ¹⁷⁷Lu ili ²²⁵Ac. Zbog toga je razvijen spoj PSMA-617 u kojem je na motiv Glu-CO-Lys vezan metalni kelator DOTA. Zamjena kelatora HBED-CC s kelatorom DOTA dovodi do značajnog smanjenja afiniteta prema PSMA. Kako bi se očuvao afinitet, provedeno je istraživanje odnosa strukture i aktivnosti koristeći različite linkere u kombinaciji s kelatorom DOTA. Strukturnom optimizacijom identificiran je linker naftil-cikloheksil u spoju PSMA-617 koji ponovno uspostavlja visoki afinitet prema PSMA te omogućuje učinkovitu internalizaciju u PSMA pozitivne stanice raka prostate.^{49,69}

Istraživan je teranostički ligand PSMA-I&T koji cilja na receptor PSMA. Osnovu njegove strukture čini skelet DOTAGA-FFK(SubKuE), koji predstavlja fleksibilnu i prilagodljivu okosnicu za razvoj inhibitora PSMA temeljenih na motivu KuE. Kelator DOTA zamijenjen je kelatorom DOTAGA odnosno 1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1-(glutaminska kiselina)-4,7,10-trioctena kiselina, čime se olakšava postupak obilježavanja radionuklidima ¹⁷⁷Lu i ⁹⁰Y, uz istodobno poboljšanje farmakokinetičkih svojstava i potencijalno povećanje afiniteta prema receptoru PSMA.

Zamjenom jednog od ostataka D-fenilalanina s 3-jod-D-tirozinom u povezujućem peptidnom segmentu PSMA-I&T poboljšana je interakcija molekule liganda PSMA-I&T s udaljenim veznim mjestom receptora PSMA. Ove strukturne modifikacije, zajedno s povećanjem lipofilnih interakcija liganda s receptorom PSMA dovele su do razvoja teranostičkih liganda druge generacije, među kojima su DOTAGA-(I-y)fk(Sub-KuE) i PSMA I&T.^{68,70,71}

Iako uvođenje 3-jod-D-tirozinskog ostatka u peptidni segment PSMA I&T povećava afinitet liganda prema receptoru PSMA, prisutnost joda istodobno može pridonijeti njegovoj osjetljivosti na radiolitičku razgradnju.

Tijekom ispitivanja stabilnosti radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA I&T zabilježeno je stvaranje karakterističnog radiolitičkog produkta koji je identificiran kao dejodirani oblik PSMA I&T. Smatra se da radioliza vode, uzrokovana ionizirajućim zračenjem radiounklida

^{177}Lu , dovodi do nastanka reaktivnih kisikovih vrsta koje mogu uzrokovati cijepanje veze između joda i aromatskog prstena 3-jod-D-tirozinskog ostatka. Posljedično tome nastaje dejodirani produkt koji predstavlja jedan od glavnih radiolitičkih produkata radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA I&T.^{68,72}

2.3.1. Razvoj i sinteza spoja PSMA-617

Razvoj sinteze spoja PSMA-617 započeo je 2012. godine te se djelomično temelji na ranijim otkrićima vezanim uz motiv Glu-CO-Lys. Inhibitori PSMA na bazi ureje uvedeni su i karakterizirani prije približno dva desetljeća⁷³ dok su prvi rezultati pretkliničkog razvoja objavljeni 2005. godine.^{74,75} Iako su ovi spojevi pokazali povoljna svojstva ciljanja na tumorsko tkivo, inhibitori PSMA male molekulske mase na bazi ureje istodobno su pokazivali značajno nakupljanje u pojedinim organima, osobito u bubrezima čime je došlo do potrebe za optimizacijom strukture.^{69,76} Istraživanja su pokazala da je zadržavanje radiofarmaceutika u tumoru i proces internalizacije u velikoj mjeri određeni strukturnim značajkama koje nisu dio izvornog motiva Glu-CO-Lys.^{76,77,80}

S ciljem razvoja spoja prikladnog za teranostičku primjenu bilo je potrebno optimizirati njegova svojstva vezanja i farmakokinetičke karakteristike s posebnim naglaskom na smanjenje nakupljanja radiofarmaceutika u bubrezima i povećanju tumorske akumulacije. Polazeći od početnog motiva vezanja Glu-CO-Lys razvijena je i analizirana biblioteka različitih poveznica (engl. *linker*) u uvjetima *in vitro* i *in vivo*.⁷⁶ Utvrđeno je da regija poveznice, odnosno slijed aminokiselina smješten između motiva Glu-Co-Lys i kelatora DOTA ima ključnu ulogu u određivanju internalizacije i farmakokinetičkih svojstava cjelokupnog spoja.

Istraživanje Benešove i suradnika rezultiralo je identifikacijom spoja s optimalnim svojstvima za primjenu u teranostici.⁶⁹ Peptid PSMA-617 pokazao je najmanje nakupljanje u neciljajućim organima, osobito u bubrezima uz istodobno visoku akumulaciju u tumorskom tkivu s produljenim vremenom zadržavanja.

Prva značajna klinička iskustva s primjenom PSMA-617 u dijagnostici i radioligandnoj terapiji raka prostate objavljena su 2014. godine.^{79,80} Godine 2017. klinička vrijednost PSMA-617 dodatno je potvrđena kroz multicentrična klinička istraživanja.

Godine 2018. klinička istraživanja su dovršena, a 2022. godine radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 komercijalnog naziva Pluvicto[®] je odobren od strane Agencije za hranu i lijekove (FDA).

Kao lijek obilježen radionuklidom, PSMA-617 je prikladan za primjenu u teranostičkom pristupu liječenju onkoloških bolesnika. U radiofarmaceutskom teranostičkom pristupu pacijent se najprije snima PET radiofarmaceutikom [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 koji prikazuje njegovu specifičnu distribuciju i nakupljanje na ciljanom mjestu, primjerice na određenom receptoru koji je prekomjerno izražen u tumorskom tkivu. Ako odgovarajući tumor i moguće metastaze pokažu dodatno nakupljanje obilježenog radiofarmaceutika pacijent se potom može odabrati za radioligandnu terapiju odgovarajućim terapijskim radiofarmaceutikom koji ima istu ili sličnu strukturu kao dijagnostički radiofarmaceutik. U ovom slučaju to je radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Za praćenje učinka terapije, pacijent se ponovno može snimati pomoću PET ili SPECT kamere.¹⁶ Iako ne čine teranostički par po definiciji, radiofarmaceutici [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 i [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 često se koriste u radiofarmaceutskom teranostičkom pristupu liječenja.⁸¹

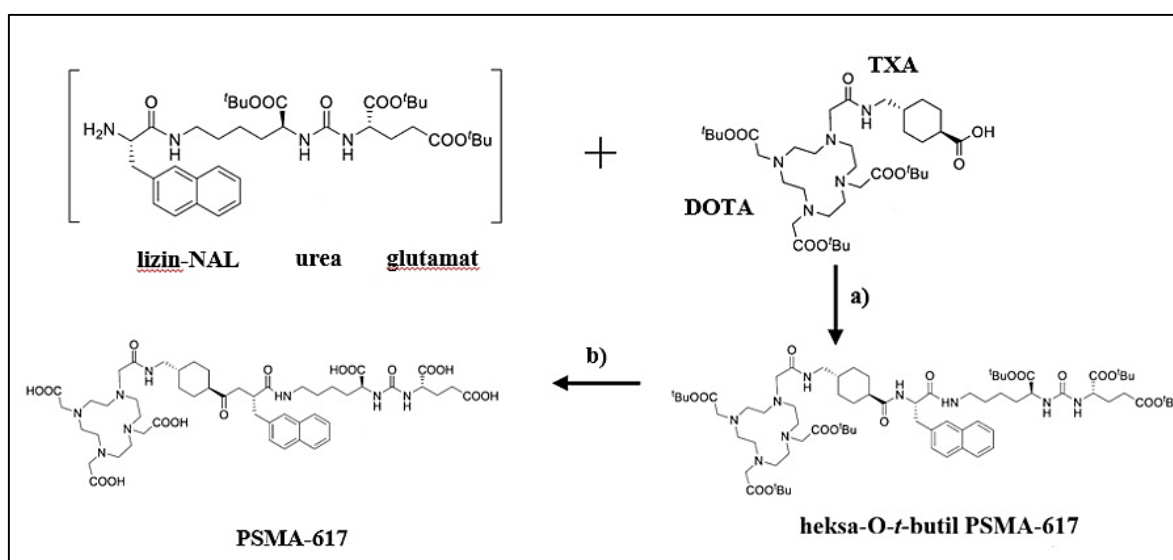
Sinteza spoja PSMA-617 uglavnom se provodi metodom sinteze na čvrstoj fazi (engl. *solid state synthesis*) koja zahtijeva uporabu skupih zaštićenih aminokiselina i reagensa. Godine 2022. razvijen je ekonomičniji postupak sinteze u otopini (engl. *solution phase synthesis*) pri čemu su uspoređena dva sintetska pristupa: linearni i konvergentni. Pokazano je da konvergentni pristup omogućuje jednostavniji postupak i bolje iskorištenje konačnog spoja.

U konvergentnom pristupu sinteza započinje pripremom pojedinačnih gradivnih jedinica koje čine strukturu PSMA-617. Osnovu molekule čini urea nastala povezivanjem lizina i glutaminske kiseline, dok se na bočni lanac lizina postupno ugrađuju 2-naftil-L-alanin (NaL) i traneksamična kiselina (engl. *tranexamic acid*, TXA). Završni dio molekule čini makrociklički kelator DOTA koji omogućuje stabilno vezanje radionuklida. Prije reakcija spajanja, funkcionalne skupine aminokiselina zaštićene su odgovarajućim zaštitnim skupinama kako bi se spriječile neželjene reakcije tijekom sinteze. Karboksilne skupine privremeno su esterificirane, amino skupine su zaštićene benziloksikarbonil (Cbz) ili *t*-butiloksikarbonil (Boc) zaštitnim skupinama, dok je kelator DOTA korišten u obliku *t*-butil zaštitne skupine. Nakon svakog koraka zaštitne skupine uklanjaju se selektivno čime je omogućeno daljnje produljenje peptidnog lanca. Zaštitne skupine benziloksikarbonil Cbz uklanjaju se katalitičkom hidrogenacijom u protočnom reaktoru ispunjenim katalizatorom Pd/C ($w = 10\%$).

Uklanjanje svih *t*-butil zaštitnih skupina provodi se smjesom trifluoroctene kiseline, vode, fenola i triizopropilsilana odnosno TFA-H₂O-PhOH-TIS. U konvergentnoj sintezi pojedini fragmenti molekule sintetiziraju se neovisno jedan o drugome, a zatim se spajaju u

završnim fazama sinteze. U konvergentnoj sintezi jedan fragment čini lizin-2-naftil-L-alanin-urea-glutamat dok drugi obuhvaća kelator DOTA povezan s traneksamičnom kiselinom.

Reakcija spajanja provedena je u otapalu *N,N*-dimetil formamid (DMF) uz reagens *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev heksafluorofosfat (HBTU) za aktivaciju karboksilne skupine i bazu *N,N*-diizopropiletilamin (DIEA). Reakcijska smjesa na početku je ohlađena na 0 °C, a zatim je miješana do postizanja sobne temperature i nastaje potpuno zaštićeni prekursor PSMA-617. Takva strategija smanjuje broj uzastopnih reakcija na istoj molekuli, olakšava pročišćavanje međuprodukata te rezultira većim ukupnim iskorištenjem u odnosu na linearni pristup. Prilagođena shema konvergetne sinteze spoja PSMA-617 prikazana je na slici 9.⁸²

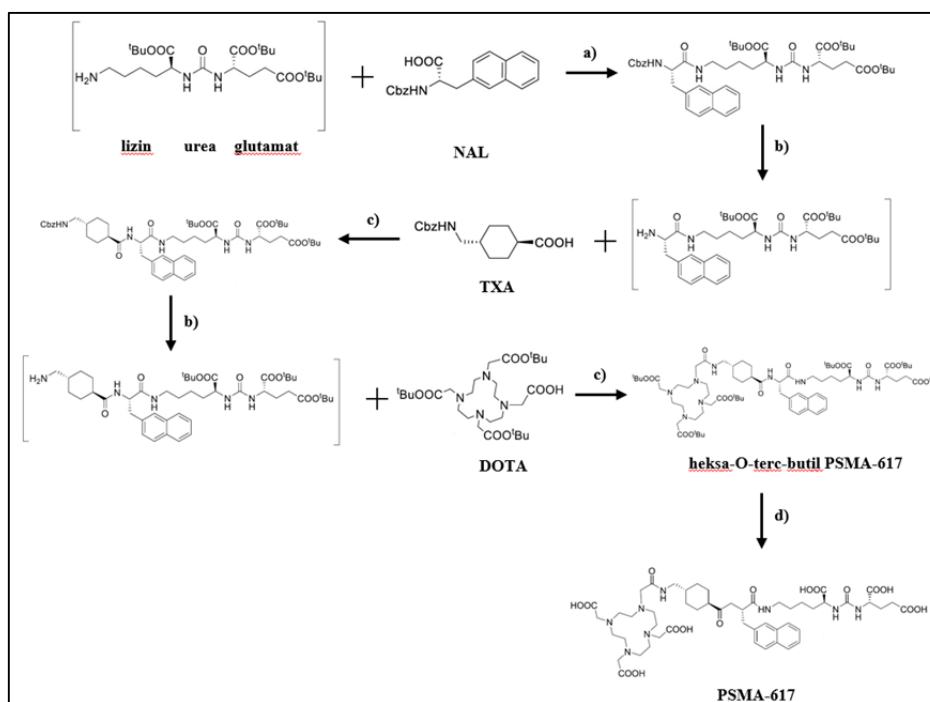


Slika 9. Shema konvergetne sinteze spoja PSMA-617: a) HBTU, DIEA, DMF, hlađenje reakcijske smjese na 0 °C i miješanje do postizanja sobne temperature; b) TFA-H₂O-PhOH-TIS⁸²

U linearnom sintetskom pristupu spoj PSMA-617 izgrađuje se postupnim povezivanjem pojedinačnih gradivnih jedinica pri čemu se svaki novi fragment dodaje na prethodno sintetizirani međuprodukt. Takav pristup omogućuje dobru kontrolu svake reakcijske faze, ali povećava broj uzastopnih sintetskih koraka te može dovesti do smanjenja ukupnog iskorištenja zbog gubitaka tijekom pročišćavanja međuprodukata.

Sinteza započinje pripremom odgovarajuće zaštićenih derivata 2-naftil-L-alanina (NAL) i traneksamične kiseline (TXA) nakon čega se oni sukcesivno vežu na jezgru urea-Lys-Glu. Reakcija spajanja provedena je uporabom reagensa *N,N'*-diizopropilkarbodiimida (DIC) za aktivaciju karboksilne skupine u smjesi diklormetana (CH_2Cl_2) i *N,N*-dimetilformamida (DMF) pri sobnoj temperaturi. Nakon svakog koraka spajanja provodi se selektivno uklanjanje zaštitnih skupina na isti način kao u konvergentnom pristupu. Prilagođena shema linearne sinteze spoja PSMA-617 prikazana je na slici 10.⁸²

Oba pristupa sinteze prate slijed koraka: zaštita skupina, spajanje fragmenata, povezivanje kelatora DOTA te uklanjanje zaštitnih skupina. U konvergentnoj sintezi reakcija spajanja započinje pri 0 °C kako bi se kontrolirala aktivacija karboksilne skupine otapalom HBTU i smanjila mogućnost nastajanja nusprodukata. Nakon formiranja aktiviranog međuprodukta reakcijska smjesa se zagrijava na sobnu temperaturu čime se omogućuje učinkovito stvaranje amidne veze. U linearnoj sintezi isti korak uspješno se odvija već pri sobnoj temperaturi, pa hlađenje nije potrebno.



Slika 10. Shema linearne sinteze spoja PSMA-617: a) DIC, CH_2Cl_2 -DMF, b) $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ ($w = 10\%$), MeOH; c) HBTU, DIEA, DMF na sobnoj temperaturi d) TFA- H_2O -PhOH-TIS⁸²

2.4. Radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

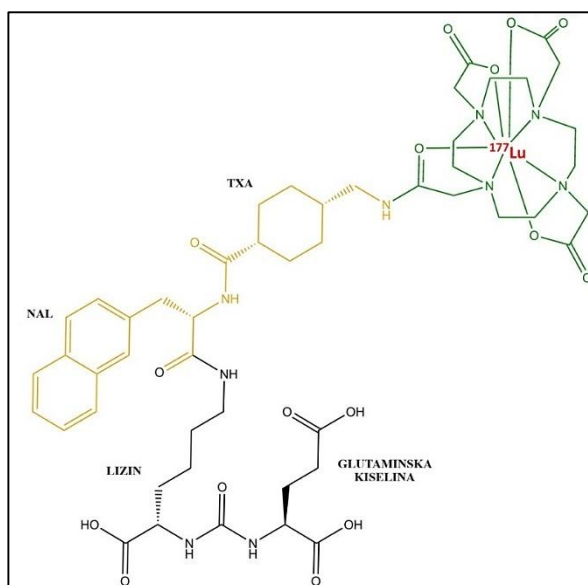
2.4.1. Naziv i kemijska struktura

Radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 naziva se još i lutecij-177 (^{177}Lu) vipivotid tetraksetan (engl. *lutetium (^{177}Lu) vipivotide tetraxetan*). Komercijalni naziv radiofarmaceutika je Pluvicto[®].

Odobren je 2022. godine od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA), a njegova uporaba je ograničena u smislu dostupnosti terapije samo za pacijente s metastatskim kastracijski rezistentnim rakom prostate (mCRPC) pozitivnim na prostate specifični membranski antigen (PSMA) koji su prethodno primili druge vrste liječenja, poput terapije usmjerene na inhibiciju androgenskog receptorskog puta i kemoterapije na bazi taksana.

Prema IUPAC nomenklaturi naziv radiofarmaceutika je [^{177}Lu]lutecij-2-[4-[2-[[4-[[[(2S)-1-[[[(5S)-5-karboksi-5-[[[(1S)-1,3-dikarboksipropil]karbo-moilamino]pentil]amino]-3-naftalen-2-il-1-oksopropan-2-il]-karbamoil]cikloheksil]-metilamino]-2-oksoetil]-4,7,10-tris(karboksilatometil)-1,4,7,10-tetraazaciklododeka-1-il]acetat.

Molekula teranostičkog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 sastoji se od PSMA vezujućeg motiva na koji je, preko poveznice naftil-cikloheksil koja sadrži aminokiselinu 2-naftil-L-alanin (NAL) i traneksamičnu kiselinu (TXA), vezan kelator DOTA (1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraoctena kiselina) kao što je prikazano na slici 11. Ova poveznica omogućuje ponovno uspostavljanje visokog afiniteta prema PSMA receptoru te visoku razinu internalizacije u stanice raka prostate s izraženom ekspresijom PSMA.⁸³ Oktadentatna koordinacija kelatora DOTA omogućuje stvaranje vrlo stabilnih koordinacijskih kompleksa s različitim radionuklidima.⁸⁴ Kompleksi s radionuklidima ^{68}Ga , ^{177}Lu i ^{225}Ac najčešće se primjenjuju u medicinske svrhe.¹⁶



Slika 11. Kemijska struktura teranostičkog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

2.4.2. Radionuklid ^{177}Lu

Iako su lantanidi prvi put otkriveni 1794. godine, njihova karakterizacija nije provedena sve do približno stotinu godina kasnije, prvenstveno zbog njihove slabe topljivosti i rijetke dostupnosti u čistom obliku.^{78,85} Lantanidi obuhvaćaju 15 elemenata, od lantana s protonskim brojem ($Z = 57$) do lutecija s protonskim brojem ($Z = 71$), a karakteriziraju ih visoki koordinacijski brojevi. Lantanidi su poznati i kao 4f-elementi jer njihovu elektronsku konfiguraciju karakterizira djelomična popunjenost podljuske 4f. Orbitale f učinkovito su zasjenjene popunjenim 5s, 5p i 6s podljuskama.^{85,86} Posljedica takve elektronske strukture jest relativno slab utjecaj ligandnog polja na trovalentne ione reda veličine 6 kJ mol^{-1} što odgovara učinku 20–60 puta manjem nego kod iona prijelaznih metala d-bloka.⁸⁶ Nadalje, na stereokemiju kompleksa lantanida prvenstveno utječu sterička svojstva liganada, dok spektroskopska i magnetska svojstva nisu u velikoj mjeri određena okolinom metalnog iona.^{85,86}

Kontrakcija lantanida posljedica je promjene ionskih polumjera duž serije lantanida. S porastom atomskog broja i gustoće naboja ionski se polumjer smanjuje. Ova je pojava karakteristično svojstvo lantanidnih metala. Ionski polumjeri elemenata u srednjem dijelu lantanidne serije usporedivi su s ionskim polumjerom iona Ca^{2+} . Kontrakcija lantanida ne utječe samo na kemijsku sintezu kompleksa lantanida, već i na biološke sustave. Primjerice, u tkivima

može doći do istiskivanja iona Ca^{2+} , što može utjecati na integritet kostiju ili dovesti do blokiranja Ca^{2+} -kanala i smanjenja ulaska Ca^{2+} u citosol.⁸⁸

Lantanidi su jake Lewisove kiseline koje koordiniraju s tvrdim bazama, kao što su karboksilati⁸⁵ te s donorima visoke elektronegativnosti, poput dušika ili kisika. Često je prisutna i koordinacija s molekulama vode. Sinteza brojnih kompleksa lantanida temelji se upravo na reaktivnosti ovih elemenata kao Lewisovih kiselina.⁸⁶ Zbog svojih iznimnih i teško usporedivih optičkih i magnetskih svojstava, lantanidi zauzimaju važno mjesto u području visokih tehnologija. Ovi se elementi primjenjuju u različitim strateški važnim područjima, kao što su optička stakla i laseri, telekomunikacije, rasvjeta i zasloni, magnetski materijali, tvrdi diskovi, sigurnosne tinte i oznake za zaštitu od krivotvorenja, kod katalize i u medicini. Iako su se dugo smatrali manje važnim elementima u području kemije prijelaznih metala, lantanidi su danas stekli značajno mjesto u koordinacijskoj kemiji, gdje se ugrađuju u složene funkcionalne i polifunkcionalne molekule i materijale.⁸⁸

Lutecij je posljednji član serije lantanoida, s 71 elektronom raspoređenim prema elektronskoj konfiguraciji $[\text{Xe}]4f^{14}5d^16s^2$. Tijekom kemijskih reakcija atomi lutecija gube dva elektrona iz najudaljenije ljuske, kao i jedini elektron iz 5d orbitale, pri čemu nastaje metalni kation oksidacijskog stanja +3. Kemijski gledano lutecij je tipičan predstavnik lantanoida jer je njegovo jedino uobičajeno oksidacijsko stanje +3 koje se javlja u njegovu oksidu, halogenidima i drugim spojevima. Za razliku od ostalih lantanoida koji se svrstavaju u f-blok periodnog sustava elemenata lutecij se može smatrati i prvim elementom d-bloka u šestoj periodi budući da posjeduje potpuno popunjenu 4f podljusku s 14 elektrona.

U svom najstabilnijem oksidacijskom stanju +3, ion Lu^{3+} ima prazne s-, p- i d-orbitale te zatvorenu 4f elektronsku podljusku. Elektroni u f-orbitalama ne sudjeluju u stvaranju kemijskih veza jer su snažno vezani uslijed visokog efektivnog nuklearnog naboja te na njih gotovo ne utječu ligandi koji okružuju metalni ion. Stoga je kemija iona Lu^{3+} kao tvrde Lewisove kiseline prvenstveno određena praznim s-, p- i d-orbitalama. Zbog potpuno popunjene 4f podljuske, ionski radijus iona Lu^{3+} najmanji je među svim lantanoidima (86,1 pm). Ion Lu^{3+} preferira vezanje s tvrdim Lewisovim bazama odnosno donorima koji imaju male slabo polarizabilne atome s lokaliziranim elektronskim parovima. To su najčešće ligandi koji sadrže kisik, dušik ili fluor. Zbog malog ionskog radijus iona Lu^{3+} broj liganada koji se mogu koordinirati oko iona Lu^{3+} je ograničen. Koordinacijski broj u najvećoj je mjeri određen

međusobnim odbojnim interakcijama između koordiniranih liganada te obično iznosi 8 ili 9, dok doprinos s-, p- i d- orbitala uključenih u stvaranje kemijskih veza ima zanemariv utjecaj.

Među kelirajućim ligandima posebno se ističe makrociklički ligand DOTA koji s ionima lantanoida (Ln^{3+}) tvori komplekse izrazito visoke termodinamičke stabilnosti i kinetičke inertnosti. Kompleksi s kelatorom DOTA općenito su kinetički inertniji od odgovarajućih kompleksa s DTPA. Iz tog razloga kompleksirajući agens DTPA dodaje se nakon obilježavanja radiofarmaceutika za uklanjanje tragova nevezanog slobodnog iona Lu^{3+} , ali nije sastavni dio konačnog radiofarmaceutika.

Prirodni lutecij sastoji se od stabilnog izotopa ^{175}Lu s prirodnim izotopnim udjelom od 97,41 % i radioizotopa ^{176}Lu s prirodnim izotopnim udjelom od 2,59 %, koji ima iznimno dugo vrijeme poluraspada od $3,78 \times 10^{10}$ godina. Do danas je proizvedeno više od 50 radionuklida lutecija uključujući 23 nuklearna izomera s masenim brojevima od 150 do 184. Radionuklidi lakši od stabilnog izotopa ^{175}Lu raspadaju se elektronskim zahvatom ili emisijom pozitrona, pri čemu nastaju izotopi iterbija. S druge strane, teži radionuklidi uglavnom se raspadaju β^- raspadom stvarajući izotope hafnija. Među 18 metastabilnih stanja lutecija najstabilniji su $^{177\text{m}}\text{Lu}$ s vremenom poluraspada od 160,4 dana i $^{174\text{m}}\text{Lu}$ s vremenom poluraspada od 142 dana. Njihova vremena poluraspada dulja su od vremena poluraspada osnovnih stanja određenih radionuklida lutecija.⁸⁹

Radionuklid ^{177}Lu s vremenom poluraspada od 6,65 dana raspada se 100 % emisijom β^- čestica do stabilnog izotopa ^{177}Hf i pogodan je za transport bez većeg gubitka aktivnosti. Značajna prednost radionuklida ^{177}Lu ili [^{177}Lu]Lu-liganada očituje se u njihovoj jednostavnoj i ekonomičnoj proizvodnji koja u pravilu rezultira visokom radiokemijskom čistoćom te odgovarajućom specifičnom aktivnošću. Tijekom ovog raspada maksimalna energija emitiranih β^- čestica iznosi 496,8 keV s emisijskim udjelom od 79,4 % dok je njihova srednja energija znatno niža i iznosi 133,6 keV. Doseg β^- čestica u tkivu ovisi o njihovoj energiji. Za radionuklid ^{177}Lu maksimalno prodiranje u tkivo iznosi približno 2,2 mm dok je srednji doseg oko 0,67 mm, zbog čega se ovaj radionuklid svrstava među emitere β^- čestica kratkog dometa. Takva karakteristika omogućuje učinkovito ozračivanje i uništavanje više susjednih stanica koje eksprimiraju ciljni peptidni receptor uz istodobno ograničeno oštećenje okolnog zdravog tkiva. Osim β^- čestica tijekom raspada radionuklida ^{177}Lu emitiraju se i γ fotoni niske energije 112,9 keV s emisijskim udjelom od 6,17 % i 208,4 keV s emisijskim udjelom od 10,4 %. Time je omogućeno scintigrafija ili snimanje SPECT kamerom nakon apliciranja radiofarmaceutika

[^{177}Lu]Lu-PSMA-617 čime je moguće provesti i individualizirana dozimetrijska mjerenja. Zbog istodobne mogućnosti terapijske primjene β^- zračenja i dijagnostičkog oslikavanja putem γ zračenja radionuklid ^{177}Lu se smatra intrinzičnim teranostičkim radiometalom.^{90,91,92}

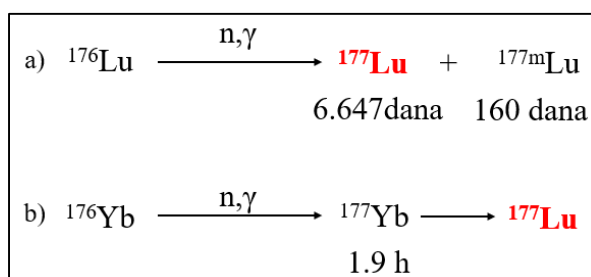
2.4.3. Proizvodnja radionuklida ^{177}Lu

Postoje dva osnovna načina proizvodnje radionuklida ^{177}Lu : direktni i indirektni put (slika 12). Direktni put proizvodnje započinje ozračivanjem izotopa ^{176}Lu dok se u indirektnom putu kao početni materijal koristi izotop ^{176}Yb . Direktni put proizvodnje, poznat kao metoda s nosačem (engl. *carrier-added, c.a.*) karakterizira činjenica da se početni izotop ^{176}Lu ne može u potpunosti ukloniti tijekom procesa separacije izotopa. Osim tog ovim postupkom nastaje radionuklidna nečistoća $^{177\text{m}}\text{Lu}$ čije vrijeme poluraspada iznosi 160,4 dana što može otežati provedbu mjera zaštite od zračenja i zbrinjavanje radioaktivnog otpada. Doprinos apsorbiranoj dozi zračenja koju uzrokuje $^{177\text{m}}\text{Lu}$ vrlo je malen u usporedbi s ukupnom dozom nakon aplikiranja ^{177}Lu -radiofarmaceutika. Pri omjeru $^{177\text{m}}\text{Lu}/^{177}\text{Lu}$ od 0,02 % terapijska doza radiofarmaceutika od 7,4 GBq sadrži približno 1,4–1,8 MBq izotopa $^{177\text{m}}\text{Lu}$.⁹²

U indirektnom putu proizvodnje neutronima se ozračuje visoko obogaćeni izotop ^{176}Yb pri čemu nastaje izotop ^{177}Yb koji se potom raspada u radionuklid ^{177}Lu , a čije vrijeme poluraspada iznosi 1,92 h. Nakon ozračivanja radionuklid ^{177}Lu se kemijski odvaja od ciljnog materijala čime se dobije radionuklid bez nosača (engl. *non-carrier-added, n.c.a.*). Ovakvim načinom proizvodnje postiže se visoka specifična aktivnost konačnog produkta te izostaje onečišćenje izotopom $^{177\text{m}}\text{Lu}$.⁷⁷

Nedostatak indirektnog puta proizvodnje ^{177}Lu jest potreba za velikom količinom visoko obogaćenog izotopa ^{176}Yb , oko 1 g, što predstavlja dva izazova. Prvo, kemijska separacija radionuklida ^{177}Lu od ciljnog materijala mora biti iznimno učinkovita, a postiže se analitičkim separacijskim tehnikama kao što su ekstrakcija, kromatografija na koloni i kombinacija obje tehnike. Drugo, obogaćeni izotop ^{176}Yb trenutačno je dostupan samo od proizvođača ograničenog proizvodnog kapaciteta u Rusiji. Zbog kontinuiranog porasta potražnje za radionuklidom ^{177}Lu , kao i aktualnih geopolitičkih okolnosti može doći do značajnog povećanja cijene ili čak ograničene dostupnosti radionuklida ^{177}Lu proizvedenog postupkom bez nosača.^{16,92}

Iako je primjena radionuklida ^{177}Lu proizvedenog metodom s nosačem za obilježavanje radiofarmaceutika odobrena od strane američke agencije za hranu i lijekove (FDA) za pripravu radiofarmaceutika, uključujući komercijalno dostupan lijek Pluvicto[®], prednost se daje radionuklidu ^{177}Lu proizvedenom metodom bez nosača zbog njegove veće specifične aktivnosti i radionuklidne čistoće.⁹³



Slika 12. Shematski prikaz proizvodnje radionuklida ^{177}Lu : a) direktni put i b) indirektni put

2.4.4. Radiokemijska sinteza PET radiofarmaceutika

Za proizvodnju PET radiofarmaceutika najčešći način proizvodnje je pomoću modula za automatiziranu sintezu. Ovakav način radiokemijske sinteze olakšava proizvodnju različitih radiofarmaceutika 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 kasete postavlja u modul za novu sintezu. Komercijalno su dostupne kasete sa setom reagensa za različite module u skladu sa zahtjevima GMP.¹⁶

Računalni program upravlja kontrolnim sustavom modula i korisnici ga ne mogu mijenjati. Specifičan je za modul, ali ne nužno i za proces. Za svaki proces zadan je popis uputa koji izvršava računalni program kako bi kontrolirao različite korake koji se provode tijekom radiokemijske sinteze radiofarmaceutika. Moduli se obično nalaze u izolatoru (engl. *hot cell*). Klasa čistoće zraka unutar izolatora obično je klase C ili D za zatvorene postupke, a klasa A za otvorene ili aspetičke postupke osim ako nije provedena odgovarajuća procjena rizika. Uz modul za automatiziranu sintezu može se nalaziti i modul za pripremu pojedinačnih doza radiofarmaceutika te modul za razrjeđivanje. Operateri moraju nositi odjeću prikladnu za dotičnu razinu radnog okoliša i trebaju nositi sterilne rukavice. Raspakiranje kasete i seta reagensa treba izvesti na način koji minimizira rizik od mikrobiološke kontaminacije predmeta.⁹⁴

Različiti pristupi za radiokemijsku sintezu stabilnog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 opisani su u literaturi pri čemu se mijenjaju parametri pH, temperatura na kojoj se odvija reakcija, omjer liganda i metala te izbor pufera.⁹⁵ Stabilizacija produkta često se postiže dodatkom hvatača slobodnih radikala poput etanola, askorbinske kiseline ili gentizinske kiseline kako bi se spriječila radioliza i očuvala visoka radiokemijska čistoća. Dodaje se i kompleksirajući agens DTPA za uklanjanje tragova nevezanog slobodnog iona Lu^{3+} .⁹⁶⁻¹⁰³ Unatoč vrlo visokim konstantama stabilnosti, nastajanje kompleksa $^{177}\text{Lu}^{3+}$ s kelatorom DOTA i drugim makrocikličkim ligandima odvija se relativno sporo osobito pri niskim koncentracijama lutecija i liganda koje se koriste u pripravi radiofarmaceutika.

Kinetička istraživanja pokazala su da prvi korak u nastajanju kompleksa lantanoidnih iona s kelatorom DOTA uključuje brzo stvaranje mono- ili diprotoniranog međuprodukta, dok brzinu cijelog procesa određuje bazom potpomognuta preraspodjela odnosno reorganizacija međuprodukta u konačni stabilni kompleks. Iz tog razloga reakcijska smjesa se zagrijava mikrovalnim načinom kako bi se ubrzalo keliranje. Zagrijavanje se uobičajeno provodi na 95 °C tijekom 25–30 minuta, čime se postižu gotovo potpuni prinosi radioobilježavanja.

U svim postupcima radioobilježavanja pH reakcijske smjese ima presudnu ulogu. Brzina nastajanja kompleksa povećava se s porastom vrijednosti pH, međutim pri vrijednostima pH iznad 6 lantanoidni kationi počinju tvoriti netopljive hidrokside. Stoga se optimalnim smatra područje pH između 4 i 6 koje se najčešće održava uporabom acetatnih pufera, poput natrijeva ili amonijeva acetata uz dodatak askorbinske kiseline kao hvatača slobodnih radikala. Posljednih godina koristi se moderan pristup u radiofarmaciji gdje se koristi pufer askorbinske kiseline za obilježavanje ^{177}Lu -radiofarmaceutika koji služi za regulaciju vrijednosti pH te djeluje kao hvatač slobodnih radikala i smanjuje se broj potrebnih reagensa za dobivanje željenog radiofarmaceutika.⁹²

2.4.5. Ispitivanje kvalitete radiofarmaceutika

Testovi ispitivanja kvalitete radiofarmaceutika dijele se u dvije kategorije: fizikalno-kemijska ispitivanja i biološka ispitivanja. Fizikalno-kemijski testovi uključuju određivanje radionuklidne i radiokemijske čistoće, kemijske čistoće s obzirom na prisutnost iona metala u tragovima, neobilježenog liganda ili prekursora, ostataka reagensa i otapala te vrijednost pH otopine produkta i vizualni pregled otopine posebice ako se radi o koloidu. Biološki testovi utvrđuju apirogenost određivanjem bakterijskih endotoksina, sterilnost inkubacijom uzorka 14 dana u određenom mediju i toksičnost radiofarmaceutika.¹⁰⁴

Upravo kod aplikacije lijeka injekcijom, posebnu pažnju treba dati sterilnosti tih pripravaka. Pripravci koji se koriste za injekcije i infuzije moraju biti potpuno sterilni i bez prisutnih pirogena. Takvi se pripravci nazivaju parenteralni pripravci. Njihova se kvaliteta ispituje na kraju proizvodnje, ali se i prije proizvodnje ispituju sve sirovine i oprema koja se koristi u proizvodnji. Pirogeni koji mogu kontaminirati ovakve pripravke jesu bakterijski endotoksini.^{105,106,107}

Bakterijski endotoksini su otrovi koji spadaju u skupinu pirogena te su sastavni dio stanične stijenke gram-negativnih bakterije, koja se sastoji od unutarnje i vanjske membrane. Upravo lipopolisaharid koji je sastojak vanjske membrane, ima toksično djelovanje. Ukoliko se nađu u parenteralnim pripravcima, bakterijski endotoksini mogu uzrokovati povišenje temperature, anafilaktički šok i smrt. Zbog toga je vrlo važno provoditi redovite analize sirovina koje se koriste u proizvodnji parenteralnih pripravaka, ali i analize gotovih proizvoda. Bakterijski endotoksini se određuju se prijenosnim spektrofotometrom, a računalni program mora biti usklađen s 21 CFR Part 11 kako bi uređaj zadovoljio službene standarde kvalitete Američke (engl. *United States Pharmacopeia, USP*) i Europske farmakopeje (engl. *European Pharmacopeia, Ph. Eur.*) za analitičke metode koje propisuje FDA.¹⁰⁸

Prijenosni spektrofotometar koristi kinetičku kromogenu metodologiju LAL (engl. *Limulus amoebocyte lysate*) za mjerenje intenziteta boje direktno povezane s koncentracijom endotoksina u uzorku. Dizajniran je za automatsko i brzo određivanje koncentracije bakterijskih endotoksina u određenom uzorku. Granica detekcije je 0,05 EU mL, a trajanje analize je 15 minuta. Test se provodi prema amebocitnom lizirajućem testu odnosno testu LAL. 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 oslobođenje kromofora koji je žute boje. Oslobođeni kromofor apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 405 nm te se određuje apsorbancijom. Količina apsorbirane svjetlosti je proporcionalna s koncentracijom endotoksina u uzorku. U slučaju intravenske aplikacije, maksimalna količina endotoksina koju čovjek može primiti po kilogramu tjelesne težine u jednom satu je 5 EU (engl. *Endotoxin Units*).¹⁰⁵

Sterilnost pripravljenih radiofarmaceutika ispituje se prema zahtjevima Europske farmakopeje. Ispitivanje sterilnosti radiofarmaceutika provodi se retrospektivno, nakon aplikacije dok se njegovo puštanje u primjenu temelji na prethodno definiranim kriterijima kvalitete i validiranom aseptičkom postupku proizvodnje koji se provjerava testom *media fill*. Primjerice takav pristup primjenjuje se u rutinskoj proizvodnji ⁶⁸Ga-radiofarmaceutika. Aseptičnost proizvodnog postupka provjerava se validacijom aseptičkog procesa primjenom simulacije aseptičkog procesa (engl. *aseptic process simulation*, APS), odnosno testa *media fill*. Tijekom testa *media fill* stvarni radiofarmaceutik zamjenjuje se sterilnom hranjivom podlogom pri čemu se reproduciraju kritični koraci rutinskog proizvodnog postupka, uključujući aseptičko sastavljanje sustava, prijenos materijala, manipulacije i intervencije operatera te završno punjenje. Nakon provedbe simulacije napunjene posude s hranjivom podlogom inkubiraju se i pregledavaju na znakove mikrobiološkog rasta. Cilj testa je dokazati sposobnost aseptičkog procesa da spriječi mikrobiološku kontaminaciju tijekom rutinske proizvodnje radiofarmaceutika.¹⁰⁹

Ispitivanje sterilnosti provodi se inokulacijom uzorka radiofarmaceutika u odgovarajuće hranjive podloge uz primjenu aseptičkih uvjeta. U skladu s postupkom opisanom za ⁶⁸Ga-radiofarmaceutike, uzorak se može izravno inokulirati u triptički sojin bujon (engl. *Tryptic Soy Broth*, TSB) koji se inkubira pri 20–25 °C tijekom 14 dana. Za dobivanje šireg spektra mikroorganizama može se primijeniti kombinacija triptičkog sojinog bujona (TSB) i fluidnog tioglikolatnog medija (FTM), pri čemu se triptički sojin bujon (TSB) inkubira pri 20–25 °C, a fluidnog tioglikolatnog medija (FTM) pri 30–35 °C. Podloge se tijekom inkubacije vizualno pregledavaju na znakove mikrobiološkog rasta, primjerice pojavu zamućenja.

Prema monografiji Europske farmakopeje za biološke testove inokulirane podloge inkubiraju se najmanje 14 dana.¹⁰⁴ Ako tijekom tog razdoblja nema znakova mikrobiološkog rasta, uzorak zadovoljava zahtjev ispitivanja sterilnosti. Važno je naglasiti da razdoblje od 14 dana predstavlja vrijeme potrebno za provedbu mikrobiološkog ispitivanja i nije povezano s vremenom poluraspada radionuklida ⁶⁸Ga. Prema monografiji Europske farmakopeje test

sterilnosti zahtijeva inkubaciju najmanje 14 dana jer se tijekom tog razdoblja omogućuje rast različitih potencijalno prisutnih mikroorganizama, uključujući one koji rastu sporije.¹⁰⁴

Budući da se rezultat testa sterilnosti dobiva retrospektivno, osiguravanje sterilnosti radiofarmaceutika prije primjene temelji se prvenstveno na validiranom aseptičkom postupku proizvodnje, odgovarajućoj kontroli okoliša, uporabi sterilnih materijala i sirovina te sterilizirajućoj filtraciji završnog pripravka. Nakon filtracije provodi se test integriteta filtera čime se potvrđuje da je filter tijekom proizvodnog postupka zadržao svoj integritet. Sterilnost samog proizvoda i integritet filtra predstavljaju različite pokazatelje kakvoće te se moraju razlikovati.¹¹⁰

Prilikom kontrole kvalitete radiofarmaceutika određuje se i radionuklidni identitet određivanjem vremena poluraspada korištenog radionuklida za obilježavanje radiofarmaceutika te ostatna otapala. Jedan od razloga zašto se određuje radionuklidni identitet je mogućnost križne kontaminacije čime se može utvrditi prisutnost drugog radionuklida ako je vrijeme poluraspada veće od vrijednosti radionuklida koji je korišten za obilježavanje radiofarmaceutika. Potvrđuje se i test integriteta filtera koji se koristi za sterilizacijsku filtraciju konačne radiofarmaceutске formulacije primjenom testa točke mjehurića (engl. *bubble point test*). Tijekom ispitivanja izmjereni tlak točke mjehurića mora biti jednak ili veći od propisane vrijednosti. Vrijednost niža od specifikacije može upućivati na oštećenje membrane ili druge nepravilnosti koje mogu narušiti integritet sterilizacijskog filtra. Sve analitičke metode moraju biti validirane, a korištena oprema kvalificirana kako bi se osigurala točnost, preciznost i ponovljivost rezultata.^{4,27} Kriteriji prihvatljivosti za svaki pripravljeni radiofarmaceutik navedeni su u monografijama Europske farmakopeje.¹¹¹

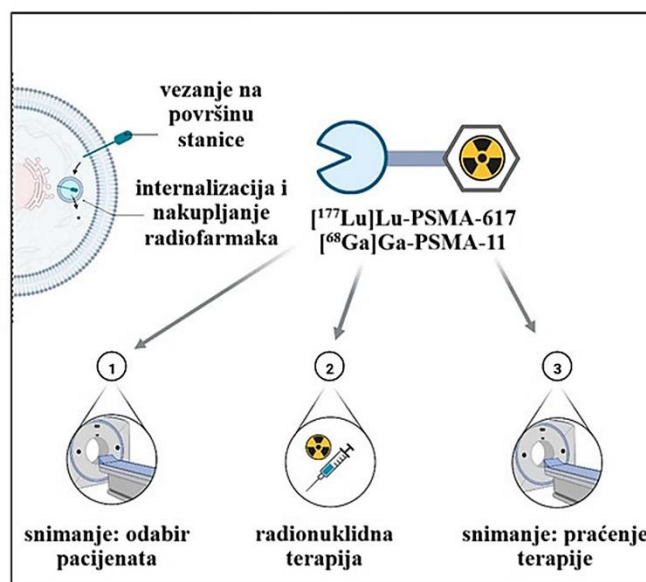
2.4.6. Klinička uporaba i farmakološke značajke

Liječenje radiofarmaceutikom [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 namijenjeno je odraslim muškim bolesnicima s progresivnim metastatskim rakom prostate rezistentnim na kastraciju prostate (engl. *metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC*) koji eksprimira prostata specifični membranski antigen (PSMA) izražen u stanicama raka prostate. Komercijalni naziv radiofarmaceutika je Pluvicto®. Koristi se zajedno s terapijom deprivacije androgena odnosno terapijom za smanjenje muškog spolnog hormona testosterona. Prije primjene peptidne receptorske radionuklidne terapije (PRRT) bolesnici moraju prethodno biti liječeni inhibitorima signalizacije putem androgenog receptora to jest lijekovima za liječenje raka prostate i jednom

ili dvije kemoterapije temeljene na taksanima te više ne smiju ostvarivati terapijski odgovor na navedene oblike liječenja.

Kako bi se utvrdila prikladnost bolesnika za liječenje radiofarmaceutikom [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 prije početka terapije potrebno je procijeniti ekspresiju PSMA u primarnom tumoru i metastatskim lezijama pretragom PET/CT. Pretraga se treba provesti odgovarajućim dijagnostičkim radiofarmaceutikom [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 čime se ostvaruje teranostički pristup liječenju (“thera” za terapiju i “nosc” za dijagnostiku), a prikazan je na slici 13.¹⁶

Pri odabiru bolesnika intenzitet nakupljanja radiofarmaceutika [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 u tumorskim lezijama uspoređuje se s fiziološkim nakupljanjem u jetri. Tumorske i metastatske lezije smatraju se PSMA pozitivnima ako pokazuju veće nakupljanje radiofarmaceutika od jetrenog parenhima. Kriteriji za uključivanje u liječenje zahtijevaju da bolesnik ima najmanje jednu PSMA pozitivnu tumorsku leziju. Istodobno, sve tumorske lezije koje prelaze unaprijed definiranu veličinu (≥ 1 cm u parenhimskim organima, $\geq 2,5$ cm u limfnim čvorovima i ≥ 1 cm u kostima) također moraju pokazivati povećano nakupljanje radiofarmaceutika, odnosno biti PSMA pozitivne. Ovim se kriterijem isključuju bolesnici s velikim PSMA negativnim lezijama koji zbog slabe ili odsutne ekspresije PSMA vjerojatno neće dobro akumulirati terapijski radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 te stoga neće pružiti dobar odgovor na liječenje.



Slika 13. Teranostički pristup liječenju¹⁶

Terapijska doza radiofarmaceutika iznosi 7,4 GBq, a primjenjuje se intravenski svakih šest tjedana, do ukupno šest ciklusa liječenja. U slučaju razvoja teških nuspojava poput mijelosupresije ili bubrežne toksičnosti razmak između pojedinih ciklusa može se produljiti do najviše deset tjedana ili se doza može smanjiti za 20 % na 5,9 GBq jedanput te se ne smije više povisivati. Liječenje treba trajno prekinuti ako nuspojave potraju dulje od četiri tjedna ili ako bi njihova težina zahtijevala dodatno smanjenje doze.

Radi osiguravanja sigurnosti bolesnika prije početka terapije te tijekom njezina provođenja potrebno je redovito pratiti kompletnu krvnu sliku i bubrežnu funkciju. U provedenom kliničkom ispitivanju najčešće zabilježene nuspojave bile su umor (48,0 %), suha usta (39,3 %), mučnina (35,7 %), anemija (31,9 %), smanjeni apetit (21,4 %) i konstipacija (20,2 %). Najčešće nuspojave stupnja 3 do 4 uključuju anemiju (12,9 %), trombocitopeniju (7,9 %), limfopeniju (7,8 %) i umor (6,6 %).^{16,112}

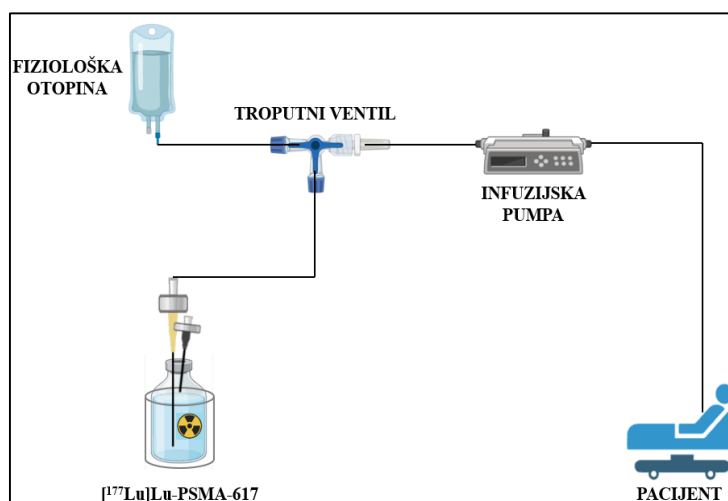
Toksičnost radiofarmaceutika je posljedica fiziološke ekspresije prostate specifičnog membranskog antigena (PSMA) u pojedinim zdravim tkivima, ponajprije u žlijezdama slinovnicama, bubrezima i tankom crijevu zbog čega dolazi do nakupljanja radiofarmaceutika i ozračenja tih organa. Najčešća nuspojava liječenja jest kserostomija odnosno suhoća usta koja se javlja u više od 30 % bolesnika, ali je najčešće blagog ili umjerenog intenziteta. Najozbiljnija nuspojava terapije je hematološka toksičnost koja se očituje razvojem anemije, trombocitopenije i leukopenije. Rizik hematološke toksičnosti osobito je izražen u bolesnika s opsežnim koštanim metastazama budući da nakupljanje radiofarmaceutika u metastatskim lezijama može dovesti do ozračenja okolne koštane srži. Bubrežna toksičnost relativno je rijetka. Tijekom liječenja opisan je i takozvani “*tumor sink*” učinak pri kojem smanjenje tumorske mase može dovesti do povećanog nakupljanja radiofarmaceutika u bubrezima. Međutim dosadašnja istraživanja upućuju na to da taj fenomen nema značajan utjecaj na ukupnu organsku toksičnost u većine bolesnika.^{113,114} Zbog mogućnosti razvoja hematološke i bubrežne toksičnosti tijekom liječenja preporučuje se redovito praćenje kompletne krvne slike i bubrežne funkcije te prilagodba terapijskog režima u slučaju pojave težih nuspojava. Sveukupno gledano, sigurnosni profil radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 smatra se povoljnim, a koristi liječenja nadmašuju rizik od razvoja ozbiljnih nuspojava.¹⁶

Radiofarmaceutik [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 pokazao se učinkovitim u produljenju vremena koje bolesnici prežive bez pogoršanja bolesti i vremena ukupnog preživljenja.

Glavno ispitivanje je pokazalo da su bolesnici koji su primali radiofarmaceutik živjeli u prosjeku 8,7 mjeseci bez progresije bolesti, u usporedbi s prosječno 3,4 mjeseca u bolesnika koji su primali samo standardno liječenje. Osim toga bolesnici koji su primali radiofarmaceutik živjeli su u prosjeku 15,3 mjeseca, dok su bolesnici koji su primali standardno liječenje živjeli 11,3 mjeseca.¹¹⁵

Prije aplikacije radiofarmaceutika pacijent popije antiemetik protiv povraćanja te prije aplikacije potrebno je primijeniti ispiranje intravenske linije s najmanje 10 mililitara fiziološke otopine ($w = 0,9\%$ NaCl) kako bi se osigurala prohodnost intravenske linije i smanjio rizik od ekstrasvazacije. Prije aplikacije pacijentu se snima elektrokardiograma odnosno EKG te se provjeravaju vitalne funkcije. Radi spriječavanja suhoće usta žlijezde slinovnice se hlade hladnim gelom koji se nalazi u dvije plastične vrećice. Vrećice se zamotaju u gaze, a zatim se velikom gazom oko žlijezda slinovnica postave hladne vrećice s gelom te se velika gaza omota oko glave pacijenta. Vrećice s hladnim gelom mijenjaju se svakih sat vremena.^{116,117}

Aplikacija radiofarmaceutika može se odvit i intravenski kao injekcija koristeći metodu sa štrcaljkom, kao infuzija koristeći gravitacijsku metodu ili kao infuzija koristeći metodu s peristaltičkom pumpom. Na slici 14 prikazana je shema aplikacije radiofarmaceutika metodom s peristaltičkom pumpom s troputnim ventilom. Trajanje infuzije ovisi o volumenu potrebnom za isporuku propisane radioaktivnosti od 7,4 GBq te je uobičajeno vrijeme oko 30 minuta, a protok je 25 mL h^{-1} .¹¹⁶



Slika 14. Shema aplikacije radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 metodom s peristaltičkom pumpom s troputnim ventilom

Nakon vezanja radiofarmaceutika za stanice raka koje eksprimiraju prostate specifični membranski antigen (PSMA), emisija β^- čestica iz radionuklida ^{177}Lu isporučuje terapijsko zračenje u ciljanu stanicu i u okolne stanice te inducira oštećenje DNA koje može dovesti do smrti stanice. Emiteri β^- čestica odlikuju se niskim linearnim prijenosom energije (engl. *linear energy transfer*, *LET*). Linearni prijenos energije predstavlja prosječnu količinu energije koju emitirana čestica predaje mediju po jedinici duljine svoje putanje. Zbog niske gustoće deponirane energije β^- emiteri prvenstveno uzrokuju jednolančane prekide molekule DNA pri čemu djeluju na većem dometu koji ovisi o energiji emitiranog elektrona. Zbog tih svojstava osobito su prikladni za liječenje većih tumora.¹⁶

Biodistribucija radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 pokazuje primarno nakupljanje u suznim žlijezdama, žlijezdama slinovnicama, bubrezima, stijenci mokraćnog mjehura, jetri, tankom crijevu te lijevom i desnom debelom crijevu. Terminalni poluvijek eliminacije radiofarmaceutika iz organizma je 41,6 sati te ne prolazi jetreni ili bubrežni metabolizam.¹⁶

Dozimetrija komercijalno dostupnog radiofarmaceutika Pluvicto[®] bila je prikupljena u 29 bolesnika u podispitivanju u sklopu kliničkog ispitivanja u svrhu izračuna dozimetrije ozračivanja cijelog tijela i organa. Srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) procijenjenih apsorbiranih doza u različitim organima za odrasle bolesnike koji su primili radiofarmaceutik prikazane su u tablici 4. Organi s najvišim apsorbiranim dozama su suzne žlijezde i žlijezde slinovnice.¹¹⁶

Tablica 4. Procijenjena apsorbirana doza za Pluvicto® u kliničkom ispitivanju¹¹⁶

	Apsorbirana doza po jedinici aktivnosti [mGy MBq ⁻¹] (N = 29)		Izračunata apsorbirana doza za primjenu 7400 MBq [Gy]		Izračunata apsorbirana doza za 6 x 7400 MBq (44 400 MBq kumulativne aktivnosti) [Gy]	
Organ	Sred. vr.	SD	Sred. vr.	SD	Sred. vr.	SD
nadbubrežne žlijezde	0,033	0,026	0,25	0,19	1,5	1,1
mozak	0,0069	0,0051	0,051	0,038	0,30	0,23
oči	0,022	0,025	0,16	0,18	0,98	1,1
stijenka žučnog mjehura	0,028	0,026	0,21	0,19	1,3	1,2
stijenka srca	0,17	0,12	1,3	0,88	7,8	5,3
bubrezi	0,42	0,19	3,1	1,4	19	8,4
suzne žlijezde	2,1	0,48	15	3,6	92	21
lijevo debelo crijevo	0,58	0,14	4,3	1,0	26	6,1
jetra	0,093	0,050	0,69	0,37	4,1	2,2
pluća	0,11	0,11	0,78	0,83	4,7	5,0
jednjak	0,025	0,026	0,18	0,19	1,1	1,2
osteogene stanice	0,036	0,029	0,26	0,21	1,6	1,3
gušterača	0,027	0,026	0,20	0,19	1,2	1,2
prostata	0,027	0,026	0,20	0,19	1,2	1,2
rektum	0,56	0,14	4,1	1,1	25	6,3
crvena koštana srž	0,035	0,020	0,26	0,15	1,5	0,91
desno debelo crijevo	0,32	0,079	2,4	0,58	14	3,5
žlijezde slinovnice	0,63	0,37	4,6	2,7	28	16
tanko crijevo	0,071	0,031	0,52	0,23	3,1	1,4
slezena	0,061	0,028	0,45	0,21	2,7	1,2
želučana stijenska	0,025	0,026	0,19	0,19	1,1	1,2
testisi	0,023	0,025	0,17	0,19	1,0	1,1
timus	0,024	0,026	0,18	0,19	1,1	1,2
štitnjača	0,26	0,37	1,9	2,8	11	17
cijelo tijelo	0,037	0,027	0,28	0,20	1,7	1,2
stijenka mokraćnog mjehura	0,32	0,025	2,4	0,19	14	1,1
efektivna doza	0,12 [mSv MBq ⁻¹]	0,043 [mSv MBq ⁻¹]	0,89 [Sv]	0,315 [Sv]	5,3 [Sv]	1,9 [Sv]

2.5. Najnovija postignuća u razvoju ^{177}Lu -radiofarmaceutika i njihova budućnost – postignuća u sintezi

Radiofarmaceutici obilježeni radionuklidom ^{177}Lu danas predstavljaju jedno od najbrže rastućih područja nuklearne medicine i teranostike. Uspjeh se temelji se na kombinaciji selektivnog molekularnog ciljanja tumorskih stanica i povoljnih fizikalnih svojstava radionuklida ^{177}Lu koji emitira β čestice prikladne za terapiju te γ zračenje koje omogućuje postterapijsko snimanje i dozimetriju. Upravo ta kombinacija omogućuje individualizirani pristup liječenju uz istodobno praćenje raspodjele radiofarmaceutika u organizmu. Najveći klinički uspjeh postigli su radiofarmaceutici [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 i [^{177}Lu]Lu-PSMA-I&T za liječenje raka prostate te [^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE za neuroendokrine tumore koji omogućuju selektivno vezanje za tumorske stanice uz istodobno smanjenje oštećenja okolnog zdravog tkiva. Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj novih molekularnih nosača i tumorskih meta kako bi se primjena radiofarmaceutika obilježenih radionuklidom ^{177}Lu proširila i na druge vrste tumora uključujući karcinom dojke, želuca, jetre i mozga.¹¹⁸

Suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj novih molekularnih meta koje bi proširile primjenu ^{177}Lu -radiofarmaceutika izvan trenutno odobrenih indikacija. Do srpnja 2025. registrirano je više od 400 kliničkih ispitivanja koja istražuju radioligandnu terapiju (RLT).¹¹⁹ Lijekovi usmjereni na receptore somatostatina (SSTR) i prostata specifičnog membranskog antigena (PSMA) čine približno 65 % svih registriranih ispitivanja. Posebnu pozornost privlače molekularne mete proteina aktivacijskog fibroblasta (engl. *fibroblast activation protein, FAP*), receptora za gastrin oslobađajući peptid (engl. *gastrin-releasing peptide receptor, GRPR*), karboanhidraze IX (engl. *Carbonic Anhydrase IX, CAIX*) i drugih tumorskih biomarkera koji pokazuju povećanu ekspresiju u različitim solidnim tumorima. Iako do danas nijedan radiofarmaceutik usmjeren na FAP, GRPR ili CAIX nije dobio regulatorno odobrenje za kliničku primjenu, brojna klinička ispitivanja rane faze već su završena ili su još u tijeku, a dosadašnji rezultati upućuju na obećavajuću terapijsku učinkovitost u različitim vrstama tumora.

Istodobno se intenzivno razvijaju novi ligandi i poboljšani kelatori s ciljem povećanja specifičnosti vezanja, produljenja retencije u tumorskom tkivu te smanjenja apsorbirane doze u kritičnim organima, ponajprije bubrezima i koštanoj srži.¹¹⁹⁻¹²²

Važan smjer daljnjeg razvoja predstavlja optimizacija personalizirane radionuklidne terapije primjenom individualizirane dozimetrije kojom se terapijska aktivnost prilagođava biološkim obilježjima tumora i karakteristikama pojedinog bolesnika. Takav pristup mogao bi povećati terapijski omjer odnosno maksimalno povećati apsorbiranu dozu u tumoru uz istodobno ograničavanje toksičnosti u zdravim tkivima. Nadalje, očekuje se sve šira primjena kombiniranih terapijskih protokola u kojima se radiofarmaceutici obilježeni radionuklidom ^{177}Lu primjenjuju zajedno s kemoterapijom, imunoterapijom, inhibitorima poli(ADP-riboze) polimeraze (engl. *poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, PARP*) ili drugim ciljanim lijekovima radi prevladavanja rezistencije i postizanja sinergijskog antitumorskog učinka.

Kombinacija terapije ^{177}Lu -radiofarmaceuticima i inhibitora poli(ADP-riboze) polimeraze (PARP) predmet je intenzivnih istraživanja pri čemu se ispituje mogućnost povećanja terapijskog učinka inhibicijom mehanizama popravka oštećenja DNA.^{120,121,123} Beta zračenje koje emitira radionuklid ^{177}Lu uzrokuje oštećenja DNA u tumorskim stanicama. Istodobna primjena inhibitora poli(ADP-riboze) polimeraze (PARP) smanjuje sposobnost tumorskih stanica da poprave ta oštećenja čime se može povećati osjetljivost tumora na zračenje i pojačati terapijski učinak. Takav pristup mogao bi biti osobito koristan u liječenju tumora koji razvijaju djelomičnu otpornost na radionuklidnu terapiju.

Unatoč velikom kliničkom potencijalu daljnju primjenu ^{177}Lu -radiofarmaceutika ograničava povezanost s proizvodnjom radionuklida, dostupnost specijalizirane infrastrukture, regulatorni zahtjevi te potreba za standardizacijom dozimetrijskih postupaka i kriterija odabira bolesnika. Budući razvoj neće ovisiti isključivo o otkrivanju novih molekularnih ciljeva već i o osiguravanju održive proizvodnje radionuklida ^{177}Lu , međunarodnoj suradnji te integraciji precizne molekularne dijagnostike i terapije u svakodnevnu kliničku praksu. Očekuje se da će upravo daljnji razvoj teranostičkog koncepta omogućiti širenje primjene ^{177}Lu -radiofarmaceutika na veći broj malignih bolesti te dodatno učvrstiti njihovu ulogu kao jednog od ključnih stupova budućnosti onkologije.¹²⁴

Nadalje, razvoj umjetne inteligencije i napredne obrade medicinskih slika omogućit će preciznije planiranje terapije, automatsku procjenu dozimetrije i predviđanje terapijskog odgovora čime bi se dodatno unaprijedio individualizirani pristup liječenju.¹²⁵

Još jedan pristup liječenju metastatskog raka prostate rezistentnim na kastraciju prostate kada više nema odgovora na terapiju s radiofarmaceutikom [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 je ciljana alfa terapija (engl. *targeted alpha therapy, TAT*) pri čemu se koriste radiofarmaceutici obilježeni

radionuklidom ^{225}Ac , ^{225}Ac -PSMA-617 i ^{225}Ac -PSMA-I&T. Za razliku od β emitera poput radionuklida ^{177}Lu , radionuklid ^{225}Ac , čije je vrijeme poluraspada 9,92 dana, emitira α -čestice visokog linearnog prijenosa energije (LET) koje imaju vrlo kratak domet u tkivu (50–100 μm), ali uzrokuju izrazito učinkovita dvostruka pucanja zavojnice DNA, što rezultira snažnim citotoksičnim učinkom na tumorske stanice uz ograničeno oštećenje okolnog zdravog tkiva.

Kliničke studije pokazale su da ^{225}Ac -PSMA-617 ostvaruje visoke stope biokemijskog odgovora uključujući značajno sniženje vrijednosti prostate specifičnog antigena (PSA) čak i u bolesnika kod kojih je prethodno došlo do progresije bolesti nakon terapije s radiofarmaceutikom [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Zbog snažnog biološkog učinka α zračenja ova terapija može biti učinkovita u uklanjanju mikrometastatske bolesti i tumorskih stanica rezistentnih na β zračenje, zbog čega se smatra važnim terapijskim pristupom u kasnijim linijama liječenja metastatskog raka prostate rezistentnim na kastraciju prostate.⁵⁶ Ipak, budućnost radionuklida ^{225}Ac značajno je uvjetovana tehničkim i logističkim izazovima. Ključni problem predstavlja ograničena dostupnost radionuklida što izravno ograničava širu kliničku primjenu i razvoj velikih kliničkih studija. Paralelno se razvijaju novi proizvodni putovi koji uključuju ciklotronsku proizvodnju i dobivanje radionuklida ^{225}Ac iz radionuklida ^{229}Th s ciljem stabilizacije opskrbnog lanca.¹²⁶

Proizvodnja teranostičkih radiofarmaceutika obilježenih s radionuklidom ^{177}Lu u vlastitoj ustanovi i dalje predstavlja moguću opciju osobito u regijama u kojima komercijalno dostupni pripravci nisu dostupni ili je njihova nabava financijski neprihvatljiva. U literaturi se različiti izvori radionuklida ^{177}Lu i njihovi različiti oblici često navode kao međusobno ekvivalentni pri čemu se zanemaruje njihov mogući utjecaj na kvalitetu konačnog proizvoda. Dodatno, nabava ključnog potrošnog materijala potrebnog za radiokemijsku sintezu, uključujući prekursore, od više dobavljača iz različitih dijelova svijeta dodatno otežava procjenu utjecaja tih varijabli na kvalitetu konačnog proizvoda. Literatura o proizvodnji i stabilnosti teranostičkih radiofarmaceutika obilježenih s radionuklidom ^{177}Lu pri početnim aktivnostima većim od 40 GBq vrlo je oskudna, ako uopće postoji.¹²⁷⁻¹³⁵

Iz tog razloga jedan od novijih smjerova razvoja teranostičkog pristupa koji uključuje ^{177}Lu -radiofarmaceutike usmjeren je na optimizaciju proizvodnje visokih aktivnosti i višedoznih serija uz očuvanje odgovarajuće radiokemijske čistoće i radiokemijske stabilnosti radiofarmaceutika.

Hunt i suradnici analizirali su 355 kliničkih serija radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-DOTA-TATE (n = 101), [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (n = 169) i [^{177}Lu]Lu-PSMA-I&T (n = 85) te pokazali da na kvalitetu konačnog proizvoda ne utječu samo radiolitički procesi, već složena interakcija između izvora prekursora, proizvođača radionuklida ^{177}Lu (otopine $^{177}\text{LuCl}_3$), odnosno metoda proizvodnje radionuklida bez nosača (*non-carrier-added, n.c.a.*) ili s nosačem (*carrier-added, c.a.*) i koncentracije radioaktivnosti. Posebno je pokazano da radionuklid ^{177}Lu proizveden metodom s nosačem (*carrier-added, c.a.*) pri visokim koncentracijama može pokazivati veću radiostabilnost od radionuklida ^{177}Lu proizvedenog metodom bez nosača (*non-carrier-added, n.c.a.*). To upućuje na mogućnost da veća količina prekursora koja se uobičajeno koristi kod radionuklida ^{177}Lu s nosačem ili samog radionuklida pruža zaštitni učinak protiv radiolitičke razgradnje. Ovi rezultati upućuju na potrebu individualne optimizacije proizvodnih parametara za pojedini proizvedeni ^{177}Lu -radiofarmaceutik, osobito pri povećanju aktivnosti i proizvodnji višedoznih serija radiofarmaceutika za veći broj pacijenata.^{136,137}

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Popis kemikalija i pribora

U radu su korištene sljedeće kemikalije i materijali:

- acetonitril, (CH_3CN), stupnja čistoće za LC-MS; Supelco, Merck, Njemačka
- trifluoroctena kiselina (TFA), *for spectroscopy*; Supelco, Merck, Njemačka
- etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), *Reag. Ph Eur*; Supelco, Merck, Njemačka
- metanol (CH_3OH), stupnja čistoće za LC-MS; Supelco, Merck, Njemačka
- amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), *for analysis*; Merck, Njemačka
- natrijev acetat (CH_3COONa), *anhydrous for analysis*; Supelco, Merck, Njemačka
- natrijev citrat dihidrat ($\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$), *pro analysi*; T. T. T., Hrvatska
- natrijev hidroksid (NaOH), *for analysis*; Supelco, Merck, Njemačka
- limunska kiselina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), *anhydrous for synthesis*; Sigma Aldrich, Austrija
- ultračista voda, NIROSTA d.o.o., Hrvatska
- Aqua Pro, voda za injekcije, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
- fiziološka otopina: natrijev klorid ($w = 0,9 \%$); Fresenius Kabi d.o.o., Hrvatska
- pH-indikatorske trakice, pH raspon 2,0-9,0; Merck, Njemačka
- iTLC-SG kromatografski papir impregniran sa silika gelom; Agilent Technologies, SAD
- LAL kaseta za određivanje bakterijskih endotoksina; Charles River, SAD
- LAL reagens voda; Charles River, SAD
- peptid PSMA-617, Vipovitide tetraxetan ($\text{C}_{49}\text{H}_{71}\text{N}_9\text{O}_{16}$), $m = 10 \text{ mg}$
MedChemExpress, SAD
- otopina lutecijevog (III) klorida ($^{177}\text{LuCl}_3$), $A = 4 \text{ GBq}$; LutaPol, Polatom, Poljska
- lutecijev(III) klorid (LuCl_3 , $> 99,99 \%$ *trace metal basis*), $m = 1 \text{ g}$; Sigma Aldrich, SAD
- pufer askorbinske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$); $m = 50 \text{ mg}$; Polatom, Poljska
- cinkov 2-[bis[2-[bis(karboksilatometil)amino]etil]amino]acetat (Zn-DTPA); Heyl, Berlin, Njemačka
- ultračista klorovodična kiselina (HCl), $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$; Eckert&Zeigler, Njemačka
- dušična kiselina (HNO_3), $w = 65 \%$; Fischer Scientific, UK

- standardna otopina elemenata (multielementni kalibracijski standard 1); Agilent Technologies, SAD
- filter za špricu CHROMAFIL, regenerirana celuloza; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka
- kasete za automatiziranu sintezu ^{177}Lu radiofarmaceutika; ABX, Njemačka
- set reagensa za sintezu ^{177}Lu radiofarmaceutika; ABX, Njemačka
- inzulinske štrcaljke
- humani serumi
- Marinelli čaše; Leybold, Njemačka
- referentni multigama izvor za kalibraciju gama spektrometra s visokočistim detektorom HPGe; LEA (laboratoire etalnos d'activité), Francuska
- vaga: Mettler Toledo XPR206DR, Švicarska

3.2. Postupci pripreme otopine i uzoraka

3.2.1. Priprava mobilnih faza za tankoslojnu kromatografiju na radio-TLC skeneru (engl. *radio-thin layer chromatography scanner*)

Pripravljene su dvije mobilne faze za tankoslojnu kromatografiju na radio-TLC skeneru. Prva mobilna faza je otopina amonijeva acetata u vodi ($c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$) i metanola u volumnom omjeru 1:1 v/v. Pripravljena je tako da je u odmjernu tikvicu od 50 mL odvagano 3,85 g amonijevog acetata te je tikvica nadopunjena do oznake ultračistom vodom. Dobivena otopina je prebačena u bočicu od 100 mL te je pomiješana s 50 mL metanola. Druga mobilna faza je otopina natrijevog citrata dihidrata u vodi ($c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 5,0). Otopina je pripravljena tako da je u odmjernu tikvicu od 100 mL odvagano 2,94 g natrijevog citrata dihidrata i tikvica je nadopunjena do oznake ultračistom vodom. Potom je otopina prebačena u bočicu od 50 mL. Nakon toga odvagano je 700 mg limunske kiseline i dodano u bočicu. Sve je dobro promiješano. Nakon što je sadržaj dobro promiješan, vrijednost pH otopine provjerena je pomoću pH-indikatorske trake.

3.2.2. Priprava mobilnih faza za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography, HPLC*)

Kao mobilna faza A pripremljena je 0,1% TFA u ultračistoj vodi. U bocu od 1000 mL dodano je 1000 mL ultračiste vode i 1 mL TFA. Kao mobilna faza B pripremljena je 0,1% TFA u acetonitrilu (CH_3CN). U bocu od 1000 mL dodano je 1000 mL acetonitrila i 1 mL TFA. Obje mobilne faze se dobro promiješaju i ostavi ih se na ultrazvučnoj kupelji 5 minuta.

3.2.3. Priprava otopine natrijeva hidroksida (NaOH), $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$

U odmjernu tikvicu od 100 mL odvagano je 1 g NaOH i tikvica je nadopunjena ultračistom vodom do oznake.

3.2.4. Priprava pufera askorbinske kiseline

Pripravljen je pufer askorbinske kiseline vrijednosti pH 4,5, 5,0 i 5,5 ($c = 0,28, 0,19$ i $0,16 \text{ mol dm}^{-3}$). U prvu bočicu pufera askorbinske kiseline dodan je 1 mL Aqua pro vode za injekcije (pH = 4,5). U drugu bočicu dodan je 1 mL Aqua pro vode za injekcije i 494 μL otopine NaOH (pH = 5,0). U treću bočicu dodan je 1 mL Aqua pro vode za injekcije i 634 μL otopine NaOH (pH = 5,5).

3.2.5. Priprava peptida PSMA-617

Peptid PSMA-617 ($m = 10 \text{ mg}$) je otopljen u 1 mL Aqua Pro vode za injekcije ($\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$). Iz dobivene otopine pripravljene su tri otopine koncentracija 1 mg mL^{-1} za radiokemijsku sintezu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 i pripravu standarda ^{nat}Lu -PSMA-617. Za izradu kalibracijske krivulje pripravljena je otopina iste koncentracije u svrhu određivanja količine peptida u radiofarmaceutiku nakon sinteze i u referentnom radiofarmaceutiku. Otopine su pripravljene tako da je otpipetirano 100 μL izvorne otopine u svaku kivetu i dodano 900 μL Aqua pro vode za injekcije. Za izradu kalibracijske krivulje iz izvorne otopine pripravljene su četiri otopine peptida koncentracija 4,10, 20, 25 i 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.6. Priprava neradioaktivnog referentnog standarda ^{nat}Lu-PSMA-617

Lutecijev(III) klorid (LuCl_3 , $m = 1\text{ g}$) otopljen je u 1 mL klorovodične kiseline ($c = 0,1\text{ mol dm}^{-3}$). Iz dobivene otopine pripravljena je otopina masene koncentracije 10 mg mL^{-1} . Potom je otpipetirano $50\text{ }\mu\text{L}$ otopine i dodano u reakcijsku bočicu u kojoj se već nalazilo $500\text{ }\mu\text{g}$ peptida PSMA-617. Odvagano je 187 mg bezvodnog natrijevog acetata (CH_3COONa) i otopljeno u 2 mL Aqua pro vode za injekcije. Otpipetirano je $50\text{ }\mu\text{L}$ otopine i dodano u reakcijsku bočicu. Potom je bočica zatvorena čepom s aluminijskim navojem i stavljena u termoblok 15 minuta na $90\text{ }^\circ\text{C}$. Nakon kuhanja otopina je ostavljena se da se ohladi na sobnoj temperaturi 10 minuta i potom je profiltrirana špricom sa sterilnim filterom Millex Gv u sterilnu kivetu.

3.2.7. Priprava etanola ($w = 50\%$)

U sterilnu kivetu otpipetirano je $250\text{ }\mu\text{L}$ etanola ($w = 96\%$) i dodano $230\text{ }\mu\text{L}$ Aqua pro vode za injekcije te se sadržaj dobro promiješao.

3.2.8. Priprava otopine za određivanje bakterijskih endotoksina u radiofarmaceutiku

U sterilnu kivetu je otpipetirano $490\text{ }\mu\text{L}$ LAL reagens vode i dodano $10\text{ }\mu\text{L}$ radiofarmaceutika te se sadržaj dobro promiješao.

3.2.9. Priprava uzoraka za ICP-MS

Uzorci za ICP-MS analizu pripremljeni su na Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon 180 dana, odnosno nakon potpunog radioaktivnog raspada, iz svakog je uzorka otpipetirano $73,6\text{--}300\text{ }\mu\text{L}$ uzorka u plastične pruvete, ovisno o raspoloživom volumenu uzoraka. Uzorcima je potom dodano $4,72\text{ mL}$ dušične kiseline (HNO_3 , $w = 3\%$), a po potrebi i dodatni volumen iste kiseline, kako bi konačni volumen otopine iznosio 5 mL . Svi su uzorci pripremljeni u duplikatu, čime su ukupno pripremljena 64 uzorka.

3.3. Metode i instrumenti

Radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 sintetiziran je pomoću Gaia&Luna modula za automatiziranu sintezu (Elysia Raytest, Njemačka).

Tankoslojna kromatografija provedena pomoću radio-TLC skenera miniGita (Elysia Raytest, Njemačka). Parametri TLC kromatografske metode su prikazani u tablici 5. Uzorak se pipetom nanese na iTLC-SG trakicu u volumenu od približno 5 μL , pri čemu aktivnost uzorka iznosi približno 4,77 μCi . Trakica se postavi u komoru u kojoj se nalazi mobilna faza amonijev acetat ($c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$) i metanol (50:50 v/v) ako se određuje postotak ^{177}Lu -koloida u uzorcima, a ako se određuje postotak slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ mobilna faza je natrijev acetat dihidrat ($c = 1,0 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 5,0). Kada mobilna faza dođe do 2/3 fronte otapala trakica se posuši da ne dođe do migracije radioaktivnosti. Trakica se potom postavi na ploču radio-TLC skenera i analiza traje 5 minuta. Potom se integriraju površine pikova.

Radio-TLC skenerom određen je postotak ^{177}Lu -koloida u internim produktima i referentnom radiofarmaceutiku, budući da se koloid ne eluira s HPLC kolone te postotak slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Određen je i postotak kompleksa [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Provjeren je stabilnost *in vitro* internih produkata i referentnog radiofarmaceutika u serumu i fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C nakon 24, 48 i 72 sati od inkubacije pri čemu je određen postotak kompleksa [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.

Tablica 5. Parametri kromatografske metode TLC

stacionarna faza	iTLC-SG trakice, Agilent Technologies
mobilna faza	amonijev acetat ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i metanol (50:50 v/v)
mobilna faza	natrijev citrat dihidrat ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 5,0)
kolimator	10 mm (60–250 keV)
vrijeme analize	5 minuta
duljina skeniranja trakice	0–115 mm
fronta uzorka	10 mm
fronta otapala	105 mm

Analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti provedena je na Shimadzu Nexera XR uređaju opremljen s UV-Vis detektorom i scintilacijskim detektorom NaI(Tl) GabiStar Nova (Elysia Raytest, Njemačka) i kolonom s obrnutom fazom (Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 mikrona, Phenomenex, SAD). Mobilne faze su 0,1 % TFA u vodi (MF_A) i 0,1 % TFA u acetonitrilu (MF_B) uz izokratno eluiranje i protok od 0,6 mL min⁻¹. Kromatogrami su detektirani UV-Vis detektorom na valnoj duljini od 280 nm i radiodetektorom smjesom mobilnih faza 22 % acetonitrila i 78 % H₂O, a vrijeme trajanja analize je 20 minuta. Volumen injektiranja je 10 µL. Analiza produkata provedena je prema parametrima koji su prikazani u tablici 6.

Metodom HPLC određena je radiokemijska čistoća, postotak slobodnog iona ¹⁷⁷Lu³⁺ te količina peptida u internim produktima i referentnom radiofarmaceutiku. Radiokemijski identitet internih produkata i referentnog radiofarmaceutika određen je pomoću standarda ^{nat}Lu-PSMA-617. Provjerena je i stabilnost *in vitro* internih produkata i referentnog radiofarmaceutika u humanom serumu nakon 24, 48 i 72 sati od inkubacije na 37 °C, pri čemu se gledala promjena oblika vrha pika i retencijsko vrijeme pika radiofarmaceutika na radiokromatogramu. Retencijsko vrijeme slobodnog iona ¹⁷⁷Lu³⁺ utvrđeno je injektiranjem otopine ¹⁷⁷LuCl₃ kako bi se pik mogao lakše detektirati u internim produktima i referentnom radiofarmaceutiku. Metodom HPLC detektiran je i pik kompleksa ¹⁷⁷Lu-DTPA na radiokromatogramu.

Tablica 6. Parametri kromatografske metode HPLC

kromatografska kolona	Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 mikrona		
mobilna faza MF _A	0,1 % TFA u vodi		
mobilna faza MF _B	0,1 % TFA u acetonitrilu		
izokratni profil eluiranja	vrijeme analize [min]	MF _A [%]	MF _B [%]
	20	22	78
volumen injektiranja	10 µL		
protok pokretne faze	0,6 mL min ⁻¹		
temperatura kromatografske kolone	25 °C		
detekcija (DAD)	280 nm		

Analiza plinskom kromatografijom provedena je pomoću plinskog kromatografa Shimadzu Nexis GC-2030 opremljenog Shimadzu kolonom SH-1, 30 m, s unutarnjim promjerom 0,53 mm. Korišten je plin nosač dušik. Plameno-ionizacijski detektor (FID) postavljen je na 250 °C, a temperatura pećnice programirana je od 50 °C do 245 °C. Temperatura pećnice na početku iznosi 50 °C kroz 3 minute, zatim se pećnica kroz svaku minutu zagrijava 40 °C više da bi na kraju postigla temperaturu od 200 °C. Potom se pećnica kroz svaku minutu zagrijava 25 °C pri čemu se postigne temperatura od 245 °C i vrijeme zadržavanja je 1,5 minuta. Temperatura injektora prilikom uzimanja uzorka iznosi 250 °C te je vrijeme uzorkovanja 30 sekundi. Volumen injektiranja bio je 0,2 µL, a vrijeme analize 10 minuta. Svi parametri kromatografske metode GC prikazani su u tablici 7.

Metodom GC s FID detektorom određena je količina etanola u dva interna produkta te je analiziran i referentni radiofarmaceutik da se utvrdi moguća prisutnost etanola kao hvatača slobodnih radikala.

Tablica 7. Parametri kromatografske metode GC

kolona	30 m x 0,53 mm kapilarna kolona debljina filma 3 µm (SH-1)		
temperatura injektora	250 °C		
temperatura detektora	250 °C		
plin nosioc	dušik, N ₂		
protok plina nosioca kroz kolonu	5,78 mL min ⁻¹		
protok sintetskog zraka	200 mL min ⁻¹		
protok vodika	32 mL min ⁻¹		
protok <i>makeup</i> plina	24 mL min ⁻¹		
mod injektora	<i>split</i>		
<i>split</i> omjer	20:1		
temperaturni program pećnice	<i>t</i> [min]	<i>t</i> [°C]	vrijeme zadržavanja
	-	50	3
	40	200	0
	25	245	1,5
volumen injektiranja	0,2 µL		
vrijeme analize	10 minuta		

Spektrometar masa uz induktivno spregnutu plazmu Agilent 7900 ICP-MS korišten je sa sljedećim optimalnim radnim uvjetima: snaga radiofrekventne (RF) plazme 1500 W, protok plina argona $0,90 \text{ L min}^{-1}$, dodatni protok plina argona $0,20 \text{ L min}^{-1}$, raspršivač MicroMist, pumpa raspršivača 0,10 rpm (engl. *round per minutes*), dvostruki prolaz Scottove komore za raspršivanje, vrijeme integracije 0,10 s te je korištena metoda vanjskog standarda. Uzorci su analizirani u duplikatu. Uvjeti mjerenja na ICP-MS uređaju prikazani su u tablici 8.

Spektrometrijom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) utvrdit će se ishodne vrste radionuklida ^{177}Lu korištenih pri radiokemijskoj sintezi internog i referentnog radiofarmaceutika, zasebno i u serumu, preko raspada radionuklida ^{177}Hf . Analiza će se provesti nakon potpunog pada radioaktivnosti na uzorcima interno pripremljenih radiofarmaceutika, referentnog radiofarmaceutika i otopine $^{177}\text{LuCl}_3$.

Tablica 8. Radni uvjeti na uređaju ICP-MS

Optimalni uvjeti rada ICP-MS	
RF-snaga	1500 W
protok plina nosioca (Ar)	$0,90 \text{ L min}^{-1}$
dodatan protok plinske faze (Ar)	$0,20 \text{ L min}^{-1}$
raspršivač	<i>MicroMist</i>
pumpa raspršivača	0,10 rps
komora za raspršenje	<i>Scott double pass</i>
vrijeme integracije	0,10 s
ponovljeni uzorci	dva
kalibracija	vanjska

Spektrofotometrijskom metodom određeni su bakterijski endotoksini u internim produktima i referentnom radiofarmaceutiku prijenosnim spektrofotometrom Endosafe® nexgen-PTS™ (Charles River Laboratories, SAD). U sterilnu kivetu otpipetira se $490 \mu\text{L}$ LAL reagens vode i doda se $10 \mu\text{L}$ internog produkta ili referentnog radiofarmaceutika. Potom se uložak (engl. *cartridge*) umetne u uređaj pri čemu se zagrijava do 37°C . Nakon toga otpipetira se po $25 \mu\text{L}$ uzorka u četiri jažice uloška. Analiza traje 15–20 minuta.

Gama spektrometrija provedena je na gama spektrometru s visoko čistim detektorom HPGe (Canberra, SAD) sa softverom Gennie 2000 (Gamma Acquisition & Analysis), koji uključuje biblioteke nuklida gdje su odabrani izotopi zabilježeni kao ^{177}Lu i ^{177}Lu x. Radionuklid, koji se zapisuje kao ^{177}Lu x, sadrži energije koje uključuju gama energiju od 228 keV, što je karakteristična energija nečistoće $^{177\text{m}}\text{Lu}$ nastale tijekom ozračivanja izotopa ^{176}Lu (radionuklid ^{177}Lu s dodanim nosačem, engl. *carrier-added*). Kalibracija energije i efikasnost detektora provedena je korištenjem referentnog izvora Multigamma Mixture prije snimanja spektara. Za analizu spektara, identifikaciju radionuklida i izračune aktivnosti pojedinih energija korišten je programski softver Genie 2000 (Gamma Acquisition & Analysis).

Gama spektrometrijom visoke razlučivosti određena je radionuklidna čistoća internih produkata, sedam dana od svake radiokemijske sinteze, a za referentni radiofarmaceutik i otopinu $^{177}\text{LuCl}_3$ sedam dana od datuma kalibracije. Korišten je visoko čisti detektor HPGe pri čemu se u Marinellijevu čašu menzurom doda 1000 mL vode, a potom se inzulinskom špricom doda maksimalno 500 kBq uzorka budući da mrtvo vrijeme prilikom mjerenja mora biti < 10 %. Ako se stavi aktivnost > 500 kBq vrijeme mjerenja se korigira prema mrtvom vremenu. Marinellijeva čaša se postavi na detektor te se olovni štiti zatvori. Marinellijeva čaša ima istu geometriju kao i vial referentnog multigama izvora za kalibraciju gama spektrometra s visokočistim detektorom HPGe. Aktivnosti mjerenih uzoraka i mrtvo vrijeme na kraju mjerenja prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Aktivnosti uzoraka za mjerenje na detektoru HPGe i vrijednosti mrtvog vremena

uzorci	A [kBq]	mrtvo vrijeme [%]
produkt 1	503	5,13
produkt 2	376	9,04
produkt 3	398	5,64
produkt 4	363	7,03
produkt 5	311	5,12
produkt 6	235	3,26
produkt 7	342	5,45
produkt 8	446	2,84
produkt 9	317	4,19
otopina $^{177}\text{LuCl}_3$ (I)	1072	38,48
otopina $^{177}\text{LuCl}_3$ (II)	341	4,23
Pluvicto [®]	343	3,01

Prije mjerenje svakog uzorka mjereno je pozadinsko zračenje nakon čega su i uzorci mjereni 2 sata. Impulsi uzoraka pri izračunu aktivnosti oduzimaju se od impulsa izmjenjenog pozadinskog zračenja na energijama od interesa. Nakon dobivenih spektara za svaki uzorak označe se tri regije interesa, odnosno dvije gama energije karakteristične za radionuklid ^{177}Lu , 113 keV i 208 keV te gama energija metastabilnog $^{177\text{m}}\text{Lu}$, 228 keV. Iz regija interesa pri energijama $E_\gamma = 208 \text{ keV}$ i $E_\gamma = 228 \text{ keV}$ očitaju se izmjereni impulsi od svakog uzorka koji se potom koriste za izračun efikasnosti detektora prema formuli (6):

$$\ln(\text{eff}) = -287,3 + 225,1 \cdot \ln(E) - 71,07 \cdot \ln(E)^2 + 11,20 \cdot \ln(E)^3 - 88,46 \cdot \ln(E)^4 + 279,9 \cdot \ln(E)^5 \quad (6)$$

pri čemu je eff efikasnost detektora HPGe, a E energija.

Efikasnosti su izračunate samo za energiju $E_\gamma = 208$ keV budući da ima veću zastupljenost (11,1 %) od gama fotona $E_\gamma = 113$ keV te za nečistoću $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ($E_\gamma = 228$ keV).

Potom se računa radionuklidna čistoća prema formuli (7):¹³⁸

$$P_{RN} = \frac{\Lambda}{\Lambda_i} + \Lambda \cdot 100 \quad (7)$$

pri čemu je P_{RN} radionuklidna čistoća, Λ aktivnost radionuklida ^{177}Lu pri energiji $E_\gamma = 208$ keV, a Λ_i aktivnost nečistoće $^{177\text{m}}\text{Lu}$ pri energiji $E_\gamma = 228$ keV.

Aktivnost radionuklida ^{177}Lu i nečistoće $^{177\text{m}}\text{Lu}$ računa se prema formuli (8):

$$\Lambda = A \cdot \frac{F_c}{t} \cdot \text{eff} \cdot p \quad (8)$$

pri čemu je A površina pika, F_c faktor korekcije, t - vrijeme mjerenja, eff efikasnost detektora HPGe i p vjerojatnost γ zrake.

Prema kriterijima monografije Europske farmakopeje za otopinu $^{177}\text{LuCl}_3$ radionuklidna čistoća izotopa ^{177}Lu mora biti najmanje 99,9 % s obzirom na ukupnu radioaktivnost.¹³⁹

Mjerenja aktivnosti otopina $^{177}\text{LuCl}_3$, reakcijskih bočica, bočica s internim produktima, bočice s referentnim produktom i uzoraka u inzulinskoj štrcaljki za mjerenja na detektoru HPGe provedena su pomoću kalibratora doza VIK-202/5051 (COMECER, Nizozemska).

Za interne produkte i referentni radiofarmaceutik vrijednost pH određuje se nanošenjem par kapi uzorka s inzulinskom špricom na pH indikatorsku trakicu te se nakon toga promjena boja trakice uspoređuje s referentnom ljestvicom boja. S pH indikatorskim trakicama provjerena je i vrijednost pH otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ i pufera korištenih za radiokemijsku sintezu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.

Radiokemijsko iskorištenje za sve provedene serije izračunato je u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima, odnosno dijeljenjem aktivnosti radionuklida ^{177}Lu na kraju sinteze s aktivnošću radionuklida ^{177}Lu na početku sinteze bez korekcije za radiokemijsku čistoću.^{140,141}

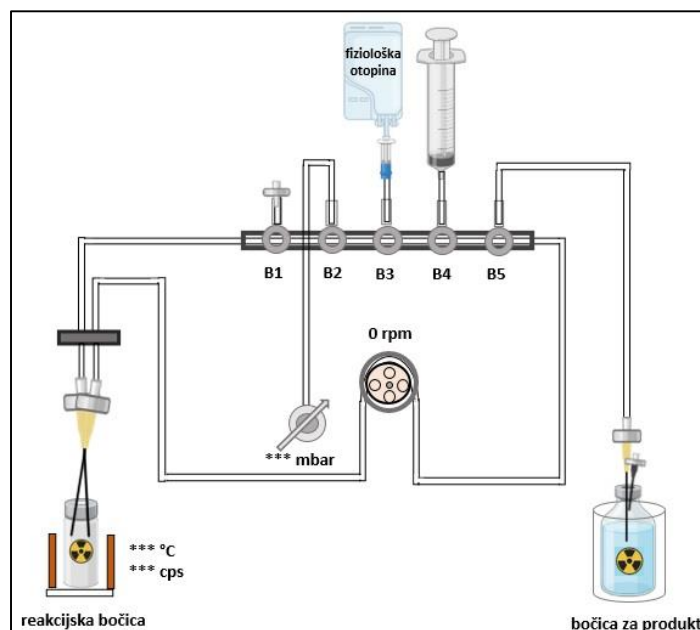
3.4. Radni uvjeti i postupci obilježavanja radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 u modulu za automatiziranu sintezu

Radiokemijska sinteza radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 provedena je u modulu Gaia&Luna za automatiziranu sintezu ^{68}Ga - i ^{177}Lu -radiofarmaceutika. Za sintezu su korištene jednokratne kasete s pripadajućim setom reagensa. Set reagensa sadržavao je bočicu za otpad i produkt, fiziološku otopinu ($w = 0,9\%$), injekcijsku špricu volumena 5 mL, sterilni filter Millex GV s veličinama pora $0,2\ \mu\text{m}$, 3 žute Sterican igle 20G ($0,90 \times 70\ \text{mm}$), 2 igle sa sterilnim filterom ($1,1 \times 30\ \text{mm}$) i spojnik za držanje igli.

Sve radiokemijske sinteze su se odvale u reakcijskoj bočici volumena 10 mL s ravnim dnom zatvorena s bimetalnim magnetskim čepom. U reakcijsku bočicu je prvo dodana otopina $^{177}\text{LuCl}_3$, zatim pufer i peptid te je reakcijska bočica postavljena u dio modula Luna u mikrovalnu peć.

3.4.1. Postavljanje reagensa na kasetu za automatizirano obilježavanje radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Kaseta se u unutarnjoj plastičnoj ambalaži stavi u LAF kabinet (engl. *Laminar Air Flow*) te se potom otvori. Prije postavljanja reagensa na kasetu, vizualno se provjeri cjelovitost kasete. Provjeri se čvrstoća svakog spoja na kaseti tako da se svaki navoj učvrsti zakretanjem (B1-B4). Na položaj B1 umetne se sterilni filter koji se skine sa Sterican igle. Na položaju B2 nalazi se cjevčica koja se postavlja u senzor tlaka u modulu. Na položaju B3 je cjevčica koja se spaja na spremnik fiziološke otopine nakon postavljanja kasete u modul. Na položaj B4 postavlja se prazna injekcijska šprica od 5 mL. Uobičajeno je da se postavi šprica u kojoj je peptid s puferom, ali zbog malih volumena reagenasa tijekom sinteze pufer i peptid su stavljeni direktno u reakcijsku bočicu. Na položaju B5 na cjevčicu za dostavu produkta spoji se sterilni filter i žuta Sterican igla 20G ($0,90 \times 70\ \text{mm}$). Lijevo od položaja B1 i desno od položaja B5 nalaze se dvije cjevčice na koju se spoje žute Sterican igle 20G. Na slici 15 je shematski prikaz kasete s reagensima za radiokemijsku sintezu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.

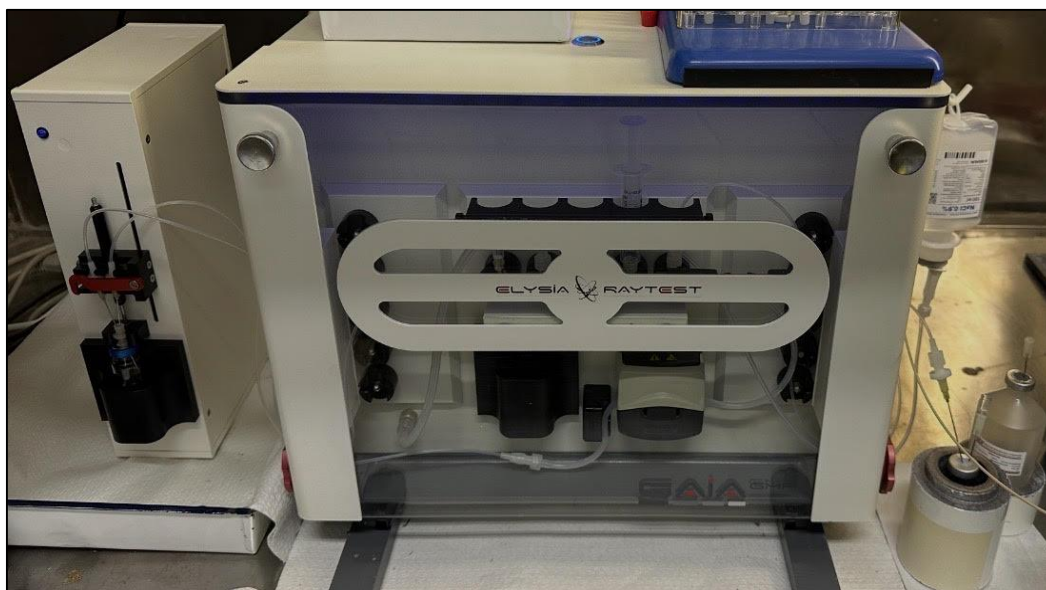


Slika 15. Shematski prikaz kasete s reagensima za radiokemijsku sintezu radiofarmaceutika $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

3.4.2. Postavljanje kasete na modul Gaia&Luna za automatizirano obilježavanje radiofarmaceutika $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

Vrata modula se otvore pritiskom gumba na gornjoj plohi modula. Kaseta se postavi sa strane tako da ventili gledaju prema osobi koja ju postavlja. Središnji dio s B položajima se učvrsti s vijcima. S desne strane modula postavi se olovni štit u kojem je bočica za dostavu radiofarmaceutika. S bočice se ukloni zaštitni poklopac i septa se prebriše tupferom natopljenim izopropanolom ($w = 70\%$). Septum bočice se probuši s iglom za odzračivanje s filterom. Nakon toga uzme se cjevčica za dostavu radiofarmaceutika na kojoj su filter i Sterican igla te se njome probuši septum bočice za produkt. Igla se uroni otprilike do $2/3$ volumena bočice jer igla treba ostati iznad tekućine prilikom dostave radiofarmaceutika. Cjevčica koja se spaja na spremnik fiziološke otopine provuče se kroz utor od modula s desne strane, spoji na spremnik te se objesi na kukicu s desne strane modula. S lijeve strane modula nalazi se dio uređaja Luna koji se sastoji od pećnice u koju se postavlja reakcijska bočica. Kroz utor modula s lijeve strane provuku se dvije cjevčice: jedna koja se nastavlja lijevo od položaja B1, a jedna koja se nastavlja desno od položaja B5. Cjevčica koja se nastavlja desno utisne se u pumpu modula i zatvori se preklopom. Odgovarajući dio cjevčice se se utisne u utor senzora s lijeve strane pumpe.

Cjevčica koja se nastavlja lijevo samo se provuče kroz utor modula. Na obje cjevčice su postavljene žute Sterican igle čiji se gornji plastični dio umetne u plastične utore Luna dijela modula. Igle se namjeste u V-položaj i crvenom polugom se pričvrste. Najdeblja cjevčica (položaj B2) spoji se na senzor tlaka modula. Slika 16 prikazuje modul Gaia&Luna sa složenim sustavom za obilježavanje radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.



Slika 16. Prikaz modula Gaia&Luna sa složenim sustavom za obilježavanje radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (KBC Zagreb)

3.4.3. Postupak radiokemijske sinteze radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Sinteza radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 traje 30 minuta na 90 °C i odvija se prema metodi softvera *Gaia&Luna control*, a sastoji se od sljedećih koraka:

1. spuštanje lifta sa žutim iglama kroz septu reakcijske bočice
2. test integriteta kasete pri čemu se kasete podvrgava tlaku od 2500 mbar čime se provjerava propusnost kasete
3. podizanje lifta sa žutim iglama iz reakcijske bočice
4. obilježavanje peptida s radionuklidom ^{177}Lu 30 minuta na 90 °C
5. hlađenje grijača na 40 °C i isključivanje
6. spuštanje lifta sa žutim iglama kroz septu reakcijske bočice i razrjeđivanje produkta s fiziološkom otopinom tri puta s približno 2 mL (2–3 mL), uz ispiranje cijelog sustava dva puta nakon prvog i drugog razrjeđivanja produkta
7. premještanje igle produkta u bočicu s otpadom
8. kraj sinteze

Nakon svake sinteze odvojeno je proveden test integriteta filtera prema metodi softvera *Gaia&Luna control*.

3.4.4. Mijenjanje parametara prilikom obilježavanja radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

U svrhu postizanja najveće radiokemijske čistoće i iskorištenja provedeno je ukupno 9 radiokemijskih sinteza radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 pri čemu su mijenjati vrijednost pH i omjer [L] / [M], pri čemu je [L] količina peptida PSMA-617, a [M] količina otopine lutecijevog (III) klorida ($^{177}\text{LuCl}_3$). Ispitan je i dodatak etanola i Zn-DTPA kao hvatača slobodnih radikala i kompleksirajućeg agensa na internom produktu koji je imao najveću radiokemijsku čistoću nakon ispitivanja kvalitete radiofarmaceutika. U tablici 10 prikazani su uvjeti obilježavanja i korišteni parametri za pripravu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.

Tablica 10. Uvjeti obilježavanja i korišteni parametri za pripravu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

sinteza	$A(^{177}\text{LuCl}_3)$ [MBq]	$V(^{177}\text{LuCl}_3)$ [μL]	$m(\text{PSMA-617})$ [μg]	parametri			
				$V(\text{EtOH})$ [μL]	$V(\text{Zn-DTPA})$ [μL]	pH	[L] / [M]
1	195,3	85	20	/	/	4,5	6,36
2	211,6	110	20	/	/	5,0	5,87
3	236,2	160	20	/	/	5,5	5,26
4	237,1	180	20	20	/	5,5	5,24
5	658,4	290	20	/	/	5,5	1,89
6	127,1	90	20	/	/	5,5	9,77
7	237,4	250	20	/	83,8	5,5	5,23
8	236,7	145	20	/	1	5,5	5,25
9	172,5	125	20	27,2		5,5	7,20

Radiokemijske sinteze su provedene u dva dijela: u sintezama 1,2 i 3 promijenjene su vrijednosti pH pufera askorbinske kiseline (pH = 4,5, 5,0 i 5,5), a količina peptida ($m = 20 \mu\text{g}$) i aktivnost otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ zadržani su na istim razinama ($A = 200 \text{ MBq}$) mijenjanjem volumena otopine u prve tri sinteze. U sintezi 4 dodan je etanol ($w = 50 \%$) koji je činio 7 % ukupnog volumena reagensa.

U sintezi 5 dodan je etanol ($w = 50 \%$) koji je činio 10 % ukupnog volumena reagensa. U prvom dijelu eksperimenta korištena je otopina $^{177}\text{LuCl}_3$ (I) u volumenu 0,013 mL. Radi dobivanja koncentracije aktivnosti od 2 GBq mL^{-1} (2000 MBq mL^{-1}) otopina je razrijeđena do 1 mL s $0,04 \text{ mol dm}^{-3} \text{ HCl}$.

U drugom dijelu eksperimenta ispitan je dodatak kompleksirajućeg agensa Zn-DTPA. Otopina Zn-DTPA je razrijeđena na masenu koncentraciju $2,11 \text{ mg mL}^{-1}$. Kompleksirajući agens Zn-DTPA dodan je na dva načina u reakcijsku bočicu: u sintezi 7 prije početka sinteze, a u sintezi 8 na kraju sinteze s inkubacijom od 15 minuta. U sintezi 7 Zn-DTPA dodan je u 20 puta većem molarnom suvišku u odnosu na peptid PSMA-617, a u sintezi 8 prema procijenjenoj koncentraciji slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ u produktu. U sintezama 5 i 9 mijenjat je omjer [L] / [M]. Za sintezu 5 iznosio je ~ 2 , a za sintezu 9 ~ 10 , dok se u ostalim sintezama kretao između 5 i 7.

U drugom dijelu eksperimenta otopinu $^{177}\text{LuCl}_3$ (II) nije bilo potrebno razrijeđivati jer je koncentracija aktivnosti bila 2 GBq mL^{-1} . U tablici 11 prikazane su referentne, izmjerene aktivnosti i volumen otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ (I i II) na datum kalibracije. U svim sintezama dodano je $100 \mu\text{L}$ pufera, osim u sintezi 5 gdje je dodano $400 \mu\text{L}$.

Tablica 11. Referentne, izmjerene aktivnosti i volumen otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ na datum kalibracije

otopina $^{177}\text{LuCl}_3$	V [mL]	A [MBq]	A(izmjereno) [GBq]	A_s [MBq μg^{-1}]
I	0,013	2000	2404	370
II	1	2000	2242	370

* A_s – specifična aktivnost

Nakon provedenih radiokemijskih sinteza izmjeri se aktivnost internih produkata i referentnog produkta u kalibratoru doza u jedinicama MBq te se izračuna iskorištenje internih produkata u odnosu na početnu aktivnost radionuklida ^{177}Lu . U tablici 12 navedeni su podaci o aktivnosti, volumenu i koncentraciji aktivnosti referentnog radiofarmaceutika (Pluvicto[®]).

Tablica 12. Aktivnosti, volumen i koncentracija aktivnosti referentnog radiofarmaceutika Pluvicto[®] na dan kalibracije

V [mL]	A [MBq]	[MBq mL^{-1}]
10,13	10313	1018,1

3.4.5. Ispitivanje kvalitete radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Nakon radiokemijskih sinteza radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 uslijedilo je ispitivanje kvalitete internih produkata i referentnog radiofarmaceutika Pluvicto[®] koje mora zadovoljiti kriterije prihvatljivosti prema monografiji Europske farmakopeje „Lutetium (^{177}Lu) zadavotide guraxetan injection“ (04/2025:3170). Svi kriteriji prihvatljivosti za radiofarmaceutik navedeni su u tablici 13.¹⁴²

Tablica 13. Kriteriji prihvatljivosti za radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-I&T¹⁴²

Parametar	Metoda	Kriterij prihvatljivosti
izgled	vizualni pregled	bistra, bezbojna tekućina
vrijednost pH	pH trakice	4–7
radiokemijski identitet	HPLC	slično retencijsko vrijeme prema referentnom standardu ^{177}Lu zadavotide guraxetan
radiokemijska čistoća		
^{177}Lu zadavotide guraxetan	HPLC	$\geq 95 \%$
slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$	HPLC	$< 3 \%$ ¹⁴³
^{177}Lu specije koje migriraju, $R_f < 0,7$	TLC	$\leq 2 \%$
ostatno otapalo (etanol)	GC	$< 10 \%$ v/v
bakterijski endotoksini	LAL test	$< 175/V_{\max} \text{ IU mL}^{-1}$

Za otopinu $^{177}\text{LuCl}_3$ kriteriji prihvatljivosti su prema monografiji Europske farmakopeje „Lutetium (^{177}Lu) solution for radiolabelling (07/2017:2798)“. Svi kriteriji prihvatljivosti za otopinu $^{177}\text{LuCl}_3$ navedeni su u tablici 14.¹³⁹

Tablica 14. Kriteriji prihvatljivosti za otopinu $^{177}\text{LuCl}_3$ ¹³⁹

Parametar	Metoda	Kriterij prihvatljivosti
radionuklidna čistoća	gama spektrometrija	$E_\gamma(^{177}\text{Lu}) = 113 \text{ i } 208 \text{ keV}$
		$E_\gamma(^{177\text{m}}\text{Lu}) = 228 \text{ keV}$
		$\geq 99,9 \% ^{177}\text{Lu}$
		$\leq 0,07 \% ^{177\text{m}}\text{Lu}$
		ostale nečistoće $\leq 0,01 \%$
	vrijednost pH	1–2

3.5. Stabilnost radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 *in vitro*

Bakterijski endotoksini određeni su u internim produktima i referentnom radiofarmaceutiku prije provođenja ispitivanja *in vitro*. U tu svrhu korištena je spektrofotometrijska metoda (uređaj za određivanje bakterijskih endotoksina Endosafe PTS Nexgen).

Stabilnost internih produkata i referentnog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 provedena je *in vitro* korištenjem fiziološke otopine i uzoraka humanih seruma. Krv je izvađena od šestoro zdravih radnika u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u Vacutainer epruvete. Epruvete su centrifugirane 10 minuta na 2000 rpm (engl. *round per minutes*) u svrhu dobivanja humanih seruma. Alikvot od 200 μL interno pripremljenih radiofarmaceutika pomiješan je s 200 μL fiziološke otopine ili humanog seruma u sterilne kivete koje su postavljene u mikrobiološki inkubator na 25 °C i 37 °C na inkubaciju od 72 sata.

Postotak interno pripremljenog kompleksa [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 i referentnog radiofarmaceutika određen je nakon 24, 48 i 72 sata korištenjem radio-TLC skenera. Uzorci humanog seruma su izravno injektirani i analizirani metodom HPLC, a stabilnost radiofarmaceutika procijenjena je promjenama u profilu vrha i retencijskom vremenu na HPLC radiokromatogramima nakon 24, 48 i 72 sata. Ukupno 96 pripremljenih uzoraka analizirano je metodama radio-TLC i HPLC.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

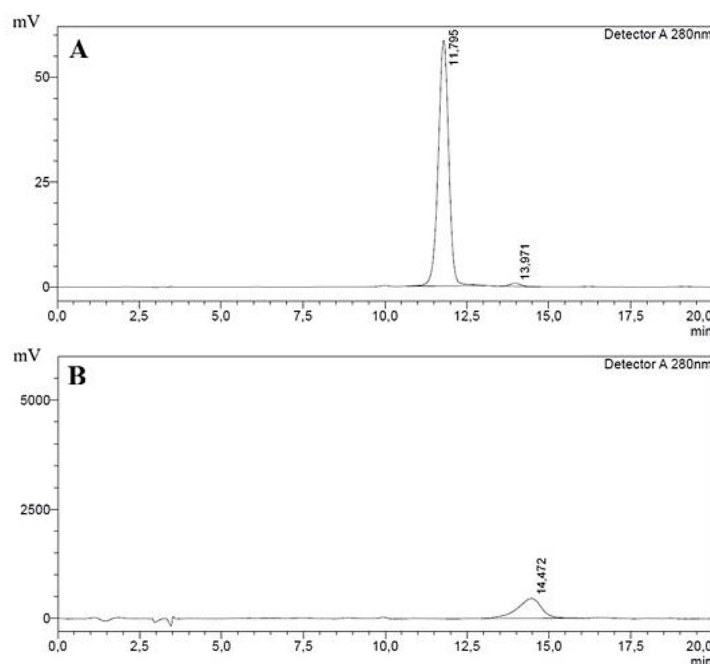
4.1. Ispitivanje kvalitete radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

4.1.1. *Određivanje radiokemijskog identiteta, radiokemijske čistoće i radiokemijskog iskorištenja radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617*

Postupak internog obilježavanja peptida PSMA-617 radionuklidom ^{177}Lu korištenjem modula za automatiziranu sintezu ispitan je mijenjanjem reakcijskih parametara kao što su omjer liganda i metala, pH reakcijske smjese te dodatak etanola i Zn-DTPA kao hvatača slobodnih radikala odnosno kompleksirajućeg agensa. Provedeno je devet radiokemijskih sinteza za pripravu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 nakon čega su konačni produkti podvrgnuti postupcima ispitivanja kvalitete. Kvaliteta radiofarmaceutika mora zadovoljiti kriterije prihvatljivosti propisane monografijom Europske farmakopeje (European Pharmacopoeia, 2025). Monografija se odnosi na radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-I&T u kojem je kelator DOTAGA (1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1-glutarna kiselina-4,7,10-trioctena kiselina), derivat kelatora DOTA s glutarnom kiselinom povezan s peptidom PSMA-I&T.^{138,144} Međutim, zbog srodnih medicinskih učinaka oba radiofarmaceutika, isti pristup ispitivanja kvalitete primijenjen je i na interne produkte radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 dobivenog u ovom istraživanju. Za određivanje radiokemijske čistoće u svih devet provedenih serija postupaka obilježavanja, korišten je HPLC sustav opremljen UV i radiodetektorom, a za određivanje radiokemijskog iskorištenja korišten je kalibrator doza.

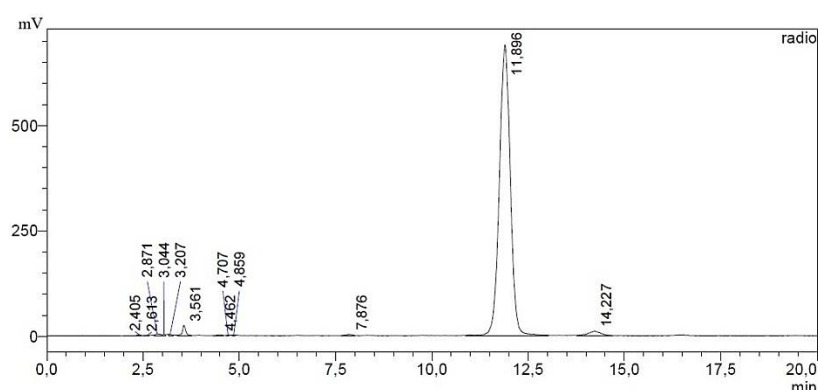
Ispitivanje kvalitete radiofarmaceutika započelo je analizom smjese spojeva $^{\text{nat}}\text{Lu}$ -PSMA-617 i peptide PSMA-617 metodom HPLC uz UV detektor. U prvom spoju neradioaktivni prirodni lutecij, $^{\text{nat}}\text{Lu}$, sastoji se od jednog stabilnog izotopa ^{175}Lu čiji je udio 97,40 % i jednog dugoživućeg radioaktivnog izotopa ^{176}Lu čiji je udio 2,60 %. Rezolucija kromatografskih signala koji su prikazani na slici 17A iznosila je 4,22 čime je potvrđeno učinkovito razdvajanje smjese spojeva. Vrijednost rezolucije važan je pokazatelj specifičnosti analitičke metode, jer je potrebno dokazati da je radioaktivni produkt jasno razdvojen od svih potencijalno interferirajućih radioaktivnih nečistoća. Takav zahtjev definiran je i kriterijima prihvatljivosti monografije Europske farmakopeje prema kojima rezolucija navedenih pikova na kromatogramu mora biti veća od 2.^{142,145}

Iz kromatograma smjese neradioaktivnog referentnog standarda ^{nat}Lu -PSMA-617 i peptide PSMA-617 dobivenih uz detekciju u UV području utvrđena su retencijska vremena koja su iznosila 11,8 min za ^{nat}Lu -PSMA-617, odnosno 14,0 min za PSMA-617. Dodatno je izmjereno retencijsko vrijeme same standardne otopine peptida PSMA-617 koja eluira pri 14,4 min, čime je potvrđeno dobro slaganje kao i pri injektiranju smjese spojeva (slika 17B).



Slika 17. HPLC kromatogrami neradioaktivnog referentnog standarda ^{nat}Lu -PSMA-617 i peptida PSMA-617 (A) te peptida PSMA-617 (B)

Radiokemijska čistoća produkata dobivenih radioobilježavanjem ispitana je također metodom HPLC, međutim uz korištenje scintilacijskog detektora na instrumentu. Najprije je analiziran referentni spoj Pluvicto[®] čiji je radiokromatogram prikazan na slici 18. Iz slike je vidljivo da se retencijska vremena kromatografskih pikova podudaraju s vremenima određenim pri injektiranju smjese ^{nat}Lu -PSMA-617 i PSMA-617. U ovom kromatogramu pojavljuje se također i signal pri 2,4 min, koji se pripisuje slobodnom ionu $^{177}\text{Lu}^{3+}$ prisutnom u otopini referentnog uzorka. Ova činjenica objašnjena je kromatografskom analizom otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ (slika D1 u poglavlju 8), koja potvrđuje retencijsko vrijeme iona pri 2,4 min. Iz kromatografskih signala izračunata je radiokemijska čistoća uzorka koja za referentni produkt Pluvicto[®] iznosi 95,6 %.

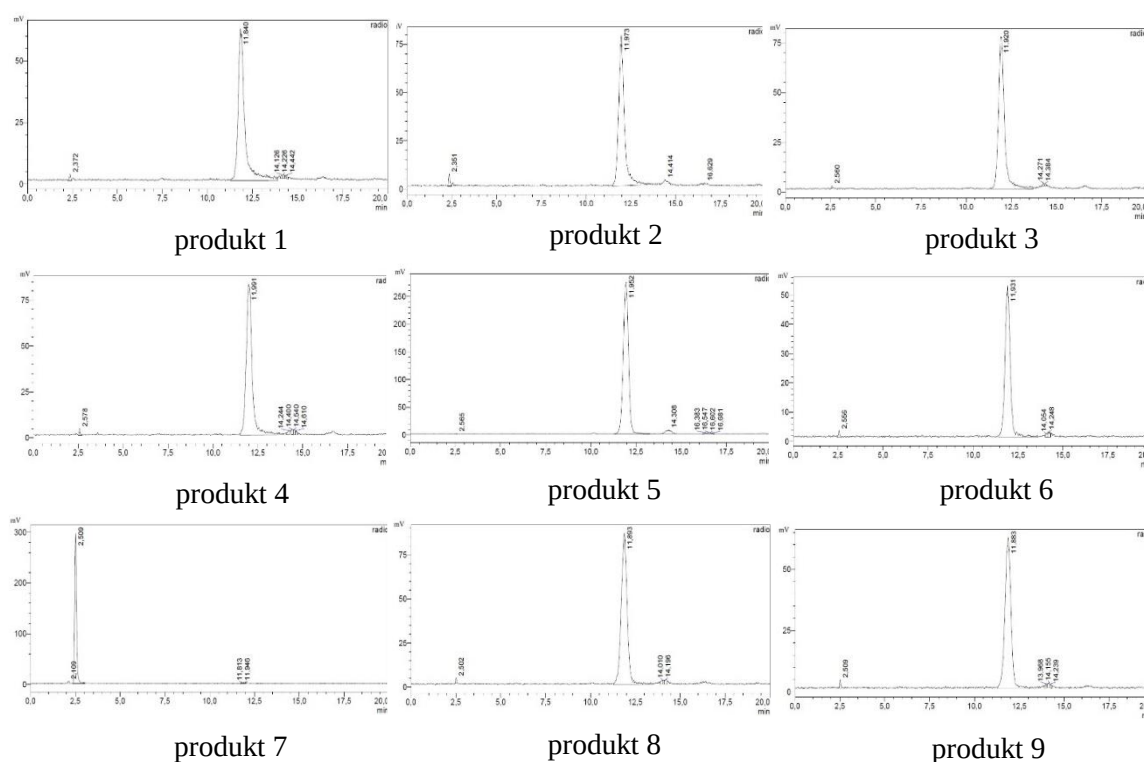


Slika 18. HPLC kromatogram referentnog spoja Pluvicto®

Na slici 19 prikazani su HPLC radiokromatogrami svih 9 produkata radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 dobivenih internim postupkom radiosinteze. Na svim radiokromatogramima, osim na radiokromatogramu produkta 7, vidljiv je glavni signal sintetiziranog produkta s retencijskim vremenom od 11,9 min te signal slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ s retencijskim vremenom od 2,5 min. U produktu 7 vidljiv je i signal pri retencijskom vremenu od 2,1 min, koji se može pripisati spoju ^{177}Lu -DTPA.

U svim internim produktima radiofarmaceutika i referentnog spoja Pluvicto® od iznimne važnosti je bilo bitno pratiti signal slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Primjer neželjenih učinaka je ponašanje radionuklida ^{177}Lu kada se nađe kao slobodan ion u stanici. Čak i mala količina slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ može se nakupiti u kostima te tako može uzrokovati neželjeno ozračivanje koštane srži. Razlog nakupljanja u kostima leži u sličnoj veličini iona kao što je ion kalcija (Ca^{2+}) koji sudjeluje u izgradnji hidroksiapatita u koštanom sustavu.

Dodatkom kompleksirajućeg agensa dietilentriaminpentaoktene kiseline (DTPA) na kraju radiokemijske sinteze ^{177}Lu -radiofarmaceutika slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ se pretvara u stabilni kompleks ^{177}Lu -DTPA koji se brzo izlučuje putem bubrega. Iz tog razloga se nakon obilježavanja peptida radionuklidom ^{177}Lu preporučuje dodavanje DTPA prije intravenske primjene. Time se značajno smanjuje nakupljanje radioaktivnosti u kostima te se povećava sigurnost terapije.⁴¹



Slika 19. Radiokromatogrami produkata dobivenih u devet internih postupaka radiokemijske sinteze radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Svih 8 internih produkata pokazalo je radiokemijsku čistoću veću od 95,0 % što je zadovoljavajuće prema kriterijima monografije Europske farmakopeje. Produkt 7 nije pokazao zadovoljavajuću radiokemijsku čistoću (0,63 %), jer je obilježavanje radiofarmaceutika bilo neuspješno te je gotovo sav radionuklid ^{177}Lu ostao u obliku slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (97,6 %).

Produkt 7 nije pokazao zadovoljavajuću radiokemijsku čistoću je u reakciji nije došlo do učinkovitog kompleksiranja radionuklida ciljnom molekulom. Jedan od mogućih, a ujedno i vrlo vjerojatnih razloga za neuspjeh obilježavanja jest dodatak kompleksirajućeg agensa DTPA prije početka sinteze.

Kompleksirajući agens DTPA je polidentatni kelator koji pokazuje visok afinitet prema trovalentnim metalnim ionima, uključujući ion Lu^{3+} . Stoga, njegovo prisustvo u reakcijskoj smjesi prije odnosno tijekom procesa obilježavanja može dovesti do kompeticije između DTPA i kelirajuće skupine ciljne molekule za vezanje radionuklida ^{177}Lu .

U slučaju kada je kompleksirajući agens DTPA prisutan u reakcijskoj smjesi prije nego što se radionuklid učinkovito veže na ciljnu molekulu, dio radionuklida može biti usmjeren prema kompleksiranju s DTPA, čime se smanjuje njegova raspoloživost za reakciju obilježavanja. Posljedično, ciljna molekula odnosno peptid PSMA-617 ostaje neobilježen, dok se povećava udio radionuklida koji nije ugrađen u željeni radiofarmaceutik.

Prisutnost kompleksirajućeg agensa DTPA prije sinteze moglo je dodatno promijeniti kemijsko okruženje radionuklida te time smanjiti vjerojatnost njegova uspješnog vezanja na ciljnu molekulu. Dobiveni rezultat stoga sugerira da je redoslijed dodavanja komponenti bio kritičan za uspješnost obilježavanja produkta 7. Kompleksirajući agens DTPA, s obzirom na njegova kelirajuća svojstva, potrebno je dodati nakon formiranja željenog kompleksa s radionuklidom ^{177}Lu s ciljnom molekulom, odnosno peptidom PSMA-617, u fazi u kojoj njegova prisutnost više ne može značajno interferirati prilikom procesa obilježavanja.

U osam od ukupno devet provedenih eksperimenata utvrđeno je da je produkt $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ dobiven uz radiokemijsko iskorištenje veće od 95,0 %, kao što je prikazano u tablici 15. Interni produkt 3 pokazao je najveću radiokemijsku čistoću dok su interni produkti 4 i 9 ostvarili najveće radiokemijsko iskorištenje.

Uočeno je da se radiokemijsko iskorištenje od 97 % može postići korištenjem 20 μg (19,1 nmol) peptida PSMA-617 pri vrijednosti pH reakcijske smjese od 4,5. Radiokemijsko iskorištenje za sve provedene serije eksperimenata izračunato je u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima, odnosno dijeljenjem aktivnosti radionuklida ^{177}Lu na kraju sinteze s aktivnošću radionuklida ^{177}Lu na početku sinteze bez korekcije na radiokemijsku čistoću.^{111,112} Dobiveni rezultati pokazali su da se radiofarmaceutik $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ zadovoljavajuće radiokemijske čistoće i visokog radiokemijskog iskorištenja može pripremiti uz relativno malu potrošnju početnih reagensa primjenom modula za automatiziranu sintezu.

Tablica 15. Prikaz omjera liganda i metala, vrijednost pH, radiokemijskog iskorištenja, radiokemijske čistoće i aktivnosti internih produkata [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 i referentnog spoja Pluvicto[®] na kraju sinteze

produkt	[PSMA-617] / [Lu]	pH	RKI* [%]	RKČ* [%]	A (^{177}Lu) [MBq] EOS*
1	6,36	4,5	91	97,3	178,0
2	5,87	5,0	94	96,1	199,5
3	5,26	4,5	94	99,1	223,2
4	5,24	4,5	97	95,7	229,4
5	1,89	4,5	96	96,0	631,7
6	9,77	4,5	83	96,8	106,1
7	5,23	4,5	99	0,63	235,4
8	5,25	4,5	93	97,2	221,1
9	7,20	4,5	97	96,7	167,0
R	-	5,5	-	95,6	10313

*RKI – radiokemijsko iskorištenje; RKČ – radiokemijska čistoća; EOS – na kraju sinteze

Određivanje radiokemijske čistoće i radiokemijskog iskorištenja predstavlja važan dio karakterizacije ^{177}Lu -radiofarmaceutika, budući da ovi parametri pružaju informacije o uspješnosti postupka obilježavanja željenog radiofarmaceutika te kvaliteti dobivenog radiofarmaceutika. Radiokemijska čistoća definira udio ukupne radioaktivnosti prisutne u željenom radiokemijskom obliku, odnosno u željenom ^{177}Lu -radiofarmaceutiku, u odnosu na ukupnu radioaktivnost u uzorku. Preostala radioaktivnost može biti prisutna u obliku slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ili drugih radiokemijskih nečistoća nastalih tijekom postupka obilježavanja.

Visoka radiokemijska čistoća od osobite je važnosti jer osigurava da najveći udio primijenjene radioaktivnosti bude povezan sa željenim kelatorom te da se radiofarmaceutik vezanjem na receptor očekivano distribuira prema ciljnim strukturama u organizmu. Prisutnost slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ili drugačije kemijski vezanog radionuklida ^{177}Lu može rezultirati

promijenjenom biodistribucijom radiofarmaceutika, smanjenim nakupljanjem u ciljanom tkivu te povećanom izloženošću zdravih tkiva ionizirajućem zračenju. Iz tog razloga radiokemijska čistoća predstavlja jedan od ključnih parametara koji se uzimaju u obzir pri procjeni kvalitete i prikladnosti radiofarmaceutika za daljnju primjenu.

Radiokemijsko iskorištenje opisuje udio početno dostupnog radiounklida ^{177}Lu koji je tijekom postupka obilježivanja ugrađen u željeni radiofarmaceutik. Visoko radiokemijsko iskorištenje upućuje na učinkovito odvijanje reakcije obilježivanja radiofarmaceutika te omogućuje dobivanje veće količine željenog radiofarmaceutika iz raspoložive početne aktivnosti radionuklida. To je osobito značajno kod radionuklida ^{177}Lu zbog njegova radioaktivnog raspada, pri čemu se s vremenom smanjuje raspoloživa aktivnost pripravka. Visoko iskorištenje stoga može pridonijeti učinkovitijem korištenju raspoložive radioaktivnosti i smanjenju gubitka radionuklida tijekom radiokemijske sinteze.

Važno je razlikovati radiokemijsko iskorištenje od radiokemijske čistoće. Radiokemijsko iskorištenje opisuje uspješnost nastanka željenog proizvoda u odnosu na početnu količinu radionuklida, dok radiokemijska čistoća opisuje raspodjelu ukupne izmjerene radioaktivnosti između željenog radiofarmaceutika i prisutnih radiokemijskih nečistoća. Stoga se oba parametra određuju i interpretiraju zasebno. U idealnom slučaju postupak obilježivanja karakteriziraju visoko radiokemijsko iskorištenje i visoka radiokemijska čistoća, što ukazuje na učinkovito iskorištenje radionuklida i dobivanje pripravka u kojem najveći udio radioaktivnosti odgovara željenom kemijskom obliku.

Kontrola ova dva parametara je ključna za standardizaciju i reproducibilnost pripreve ^{177}Lu -radiofarmaceutika te za osiguravanje njegove odgovarajuće kvalitete prije primjene pacijenatima.

Za ispitivanje nečistoća u produktima dobivenih u svim serijama internog postupka radiokemijskog obilježivanja radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 korištene su metode HPLC i TLC. Obje metode preporučene su u monografijama Europske farmakopeje za ispitivanje kakvoće usporedivih radiofarmaceutika.^{23,140,142} Visokoosjetljiva HPLC metoda omogućuje određivanje radiokemijske čistoće radiofarmaceutika te pouzdano otkrivanje različitih vrsta mogućih radiokemijskih nečistoća uključujući slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$.

Metoda TLC odlikuje se jednostavnošću primjene i brzinom provedbe analize budući da se koloidne nečistoće u pravilu ne eluiraju s HPLC kolone. Uobičajeno se koristi pri određivanju sadržaja prisutnih ^{177}Lu -koloida i ^{68}Ga -koloida nakon sinteze radiofarmaceutika.¹⁴⁰

Udio slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ određen je metodama tankoslojne kromatografije (TLC) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Za TLC analizu ^{177}Lu -radiofarmaceutika često se koristi plastični scintilacijski detektor (engl. *plastic scintillation detector*, *PMC*) jer u usporedbi s NaI(Tl) detektorom omogućuje veći broj registriranih impulsa i bolju prostornu razlučivost kromatograma. Također plastični scintilacijski detektor registrira prvenstveno β zračenje, a radionuklid ^{177}Lu emitira velik broj β čestica.

Na primjeru određivanja udjela slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ uspoređene su djelotvornosti obje primijenjene metode kromatografije. Rezultati su pokazali da je primjenom metode HPLC prisutnost slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ detektirana u svim produktima za razliku od metode TLC (tablica 16). U većini uzoraka analiziranih metodom HPLC udio slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ bio je manji od preporučene granične vrijednosti od $\leq 3\%$.¹⁴³ Iznimku predstavlja interni produkt 7 gdje postupak obilježavanja nije bio uspješan te se cjelokupni sadržaj radionuklida zadržao u obliku slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$, a to je i vidljivo na HPLC radiokromatogramu gdje se vidi pik slobodnog $^{177}\text{Lu}^{3+}$ iona s retencijskim vremenom od 2,5 min (slika 19).

Radiokromatogrami produkata sinteze dobiveni primjenom metode TLC prikazani su u poglavlju 8. Dodatak. Za usporedbu s analizom pomoću metode HPLC, signal slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ je vidljiv i na TLC radiokromatogramu (slika D7B). Iz ostalih priloga može se istaknuti slika D6A gdje radiokromatogram pokazuje signal pomaknut u desno, a koji najvjerojatnije odgovara produktu [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 i kompleksu ^{177}Lu -DTPA, odnosno predstavlja zbroj svih kelirajućih kompleksa koje migriraju s frontom otapala. U slučaju kada je sinteza bila neuspješna, metoda TLC nije bila dovoljno selektivna da razlikuje sve prisutne vrste spojeva u pripremljenom radiofarmaceutiku.

U usporednim ispitivanjima radio-TLC skenera za ^{177}Lu -radiofarmaceutike pokazano je da plastični scintilacijski detektor ostvaruje užu kromatografski vrh (engl. *Full Width at Half Maximum*; *FWHM*) i veću osjetljivost od NaI(Tl) detektora čime se dobiju precizniji rezultati kada se određuje količina slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ i ^{177}Lu -koloida u radiofarmaceuticima obilježenim s radionuklidom ^{177}Lu .¹¹³ Iz tog razloga je u ovom istraživanju za neke produkte količina slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ i ^{177}Lu -koloida bila ispod granice kvantifikacije budući da je korišten radio-TLC skener s NaI(Tl) detektorom koji detektira samo gama fotone i volframov kolimator od 10 mm za radionuklide s gama energijama od 60 do 250 keV.

Iz tog razloga se preporuča korištenje obje metode HPLC i TLC pri ispitivanju kontrole kvalitete radiofarmaceutika. U skladu s monografijom Europske farmakopeje za srodne

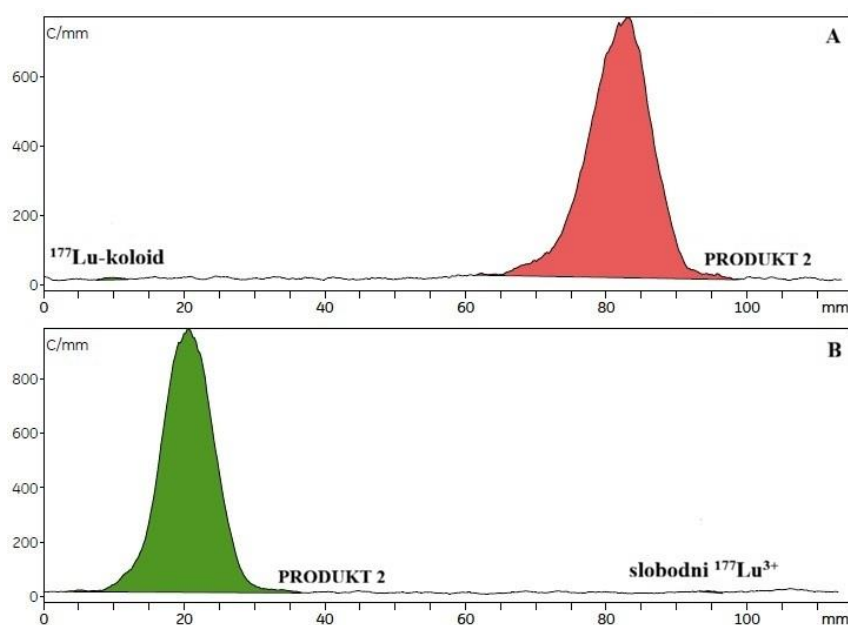
radiofarmaceutске pripravke prihvatljiva granična vrijednost za sadržaj ^{177}Lu -koloida određena metodom TLC iznosi $< 2\%$.²³

U provedenim eksperimentima utvrđen je nizak udio koloidnih nečistoća pri čemu su dobivene vrijednosti u pravilu bile vrlo blizu granice kvantifikacije primijenjene analitičke metode TLC. Korištenjem otopine metanola i amonijevog acetata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) u omjeru 1:1 (v/v) kao mobilne faze na iTLC-SG trakici kao stacionarna faza, ^{177}Lu -koloid ostao je na mjestu nanošenja uzorka ($R_f = 0-0,3$), dok je slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ migrira prema fronti otapala ($R_f = 0,9-1,0$) korištenjem otopine natrijeva citrata dihidrata ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 5,0) kao mobilne faze. Primjeri TLC radiokromatograma produkta 2 i referetnog produkta prikazani su na slikama 20 i 21.

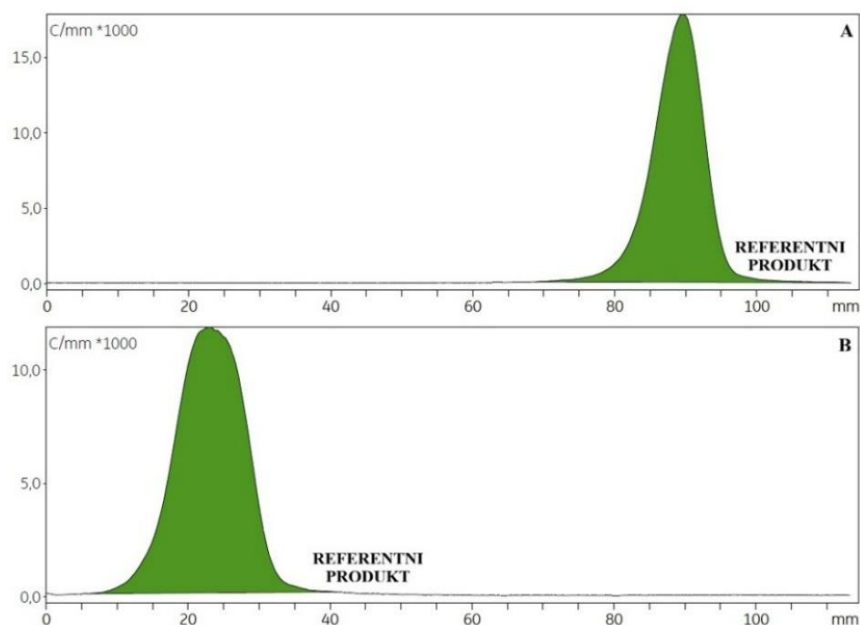
Tablica 16. Radiokemijske nečistoće u obliku slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ i ^{177}Lu -koloida određene metodama HPLC i TLC

produkt	slobodni $^{177}\text{Lu}^{3+}$ [%]	slobodni $^{177}\text{Lu}^{3+}$ [%]	^{177}Lu -koloid [%]
	HPLC	TLC	TLC
1	0,99	0,37	< LOQ
2	1,74	0,15	0,24
3	0,23	0,06	< LOQ*
4	0,89	0,11	< LOQ*
5	0,05	< LOQ*	< LOQ*
6	1,16	0,33	< LOQ*
7	97,6	100,0	0,56
8	0,62	< LOQ*	0,09
9	1,08	0,13	0,34
R	0,09	< LOQ*	< LOQ*

*LOQ = 0.01 %



Slika 20. TLC radiokromatogrammi internog produkta 2 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)



Slika 21. TLC radiokromatogrammi referentnog produkta Pluvicto[®] koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)

4.1.2. Određivanje količine peptida PSMA-617 nakon obilježavanja radiofarmaceutika

 $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$

Količina peptida PSMA-617 nakon postupka obilježavanja radiofarmaceutika $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ određena je metodom HPLC, a rezultati su prikazani u tablici 17. U svakom od devet produkata prije postupka obilježavanja dodano je 20 μg peptida u reakcijsku bočicu. Izmjereni rezultati pokazali su nešto veću količinu peptida u internim produktima (20,8–31,4 μg) pri čemu je srednja vrijednost iznosila $26,52 \pm 3,14 \mu\text{g}$ ($n = 9$).

Tablica 17. Količina peptida PSMA-617 u internim produktima radiofarmaceutika $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ i u referentnom produktu Pluvicto[®]

produkt	površina pika [mV]	R_t [min]	m [μg]	V_{uk} [mL]	$\gamma_{\text{PSMA-617}}$ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	A_{eff} [MBq μg^{-1}]
1	770	16,86	20,8	6	3,4680	8,90
2	1363	17,01	24,1	6	4,0096	9,98
3	1166	15,53	26,8	7	3,8297	11,16
4	1275	15,47	31,4	8	3,9292	11,47
5	1083	14,74	26,3	7	3,7539	31,59
6	1506	14,79	29,0	7	4,1402	5,31
7	1549	12,93	29,3	7	4,1795	11,77
8	883	15,17	25,0	7	3,5712	11,06
9	1039	13,01	26,0	7	3,7137	8,35
R	4748	14,70	71,9	10,13	7,1009	143,44

* A_{eff} – efektivna specifična aktivnost

Količina peptida PSMA-617 nakon provedenih postupaka obilježavanja pokazala je manja odstupanja u odnosu na početnu masu dodanog peptida. Zbog mogućih pogrešaka pri razrjeđivanju i gubitaka tijekom rukovanja uzorcima, koncentracija peptida u konačnom analitičkom uzorku bila je blizu donje granice kalibracijskog područja metode (4–50 µg/mL) što je moglo utjecati na točnost kvantifikacije. Dodatni razlog za uočeno odstupanje može biti činjenica da je pik peptida PSMA-617 u svim produktima izmjeren u blizini granice detekcije instrumenta te je UV signal peptida PSMA-617 bio vrlo nizak i blizu razine šuma bazne linije što može utjecati na preciznost određivanja površine pika. To je vidljivo na UV kromatogramu internog produkta 4 (slika D17). Važno je naglasiti da se navedeno odnosi na izmjerenu količinu peptida u konačnom analitičkom uzorku nakon obilježavanja i pročišćavanja, a ne na početnu količinu peptida dodanu na početku obilježavanja. Početna radioaktivnost sama po sebi ne bi trebala izravno utjecati na UV kromatogram budući da UV detekcija ovisi isključivo o masenoj koncentraciji peptida. S druge strane, veća injektirana radioaktivnost uzorka može utjecati na radiokromatogram uzrokujući proširenje kromatografskog pika ili zasićenje detektora. Uočene promjene oblika signala i smanjenje intenziteta UV maksimuma pri višim aktivnostima vjerojatnije su posljedica radiolitičke razgradnje peptida odnosno promjena u njegovoj kemijskoj strukturi i kemijskim vezama nakon obilježavanja radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617.

Određivanje količine odnosno mase peptida nakon radiokemijske sinteze radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 ključan je korak u kontroli kvalitete koji izravno utječe na terapijsku učinkovitost, sigurnost pacijenta i regulatornu usklađenost radiofarmaka. Određivanjem ukupne mase obilježenog i neobilježenog peptida izračunava se specifična aktivnost (A_s) odnosno omjer radioaktivnosti i količine odnosno mase peptide (GBq mol⁻¹ ili GBq mg⁻¹). Ako je količina peptida prevelika, specifična aktivnost bit će niska. To znači da će u finalnom produktu biti prisutna velika količina „hladnog” odnosno neobilježenog peptida PSMA-617 koji se natječe s radiofarmaceutikom [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 za ista receptorska mjesta na stanicama raka prostate.¹⁰¹

Receptori prostata specifičnog membranskog antigena (PSMA) na površini tumorskih stanica imaju ograničen kapacitet vezanja odnosno zasićenja receptora. Kada se pacijentu primjeni radiofarmaceutik s prevelikom količinom neobilježenog peptida, neobilježeni molekularni nosači okupirat će i zasititi receptore PSMA.

Posljedično tome, terapijski radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 neće se moći dovoljno dobro vezati za tumor, što drastično smanjuje unutarstaničnu dozu zračenja u tumorskom tkivu i narušava uspjeh terapije. Preostali radiofarmaceutik dulje ostaje u cirkulaciji, povećavajući izloženost zdravih organa zračenju.

Iz tog razloga bitno je strogo definiranje i ograničavanje mase peptida čime se jamči da se pacijentu neće dati količina koja bi mogla izazvati neželjene farmakološke odgovore ili kemijsku toksičnost.

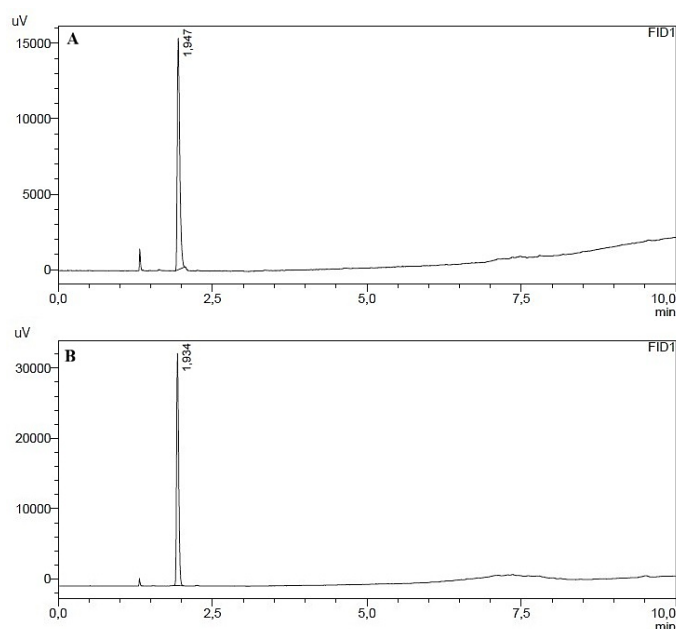
Prema standardima Europske farmakopeje (Ph. Eur.) i smjernicama dobre proizvođačke prakse (GMP), svaka serija (engl. *batch*) radiofarmaceutika mora imati reproducibilan sastav. Kvantifikacija peptide metodom HPLC s UV detektorom obvezna je za dokazivanje kemijske čistoće i osiguravanje da je produkt unutar specificiranih i odobrenih granica za kliničku primjenu.¹⁰¹

Prema istraživanju iz 2025. godine prosječna koncentracija peptida PSMA-617 u referentnom produktu Pluvicto[®] iznosi $6,31 \pm 0,72 \text{ } \mu\text{g/mL}$, a volumen po jednoj bočici je 7,5–12,5 mL (ovisno o aktivnosti i kalibraciji radiofarmaceutika).¹⁴⁶ To znači da jedna doza Pluvicta[®] sadrži 47–79 μg peptida PSMA-617 što odgovara količini peptida od 71,9 μg određena metodom HPLC u ovom istraživanju.

4.1.3. Utjecaj dodatka hvatača slobodnih radikala etanola i kompleksirajućeg agensa (Zn-DTPA) na radiokemijsku sintezu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Osim određivanja nečistoća koje potječu od slobodnih i neobilježenih kemijskih vrsta radionuklida ^{177}Lu i neobilježenog peptida, ispitan je i utjecaj dodatka etanola i Zn-DTPA na kvalitetu obilježenih internih produkata. Etanol se uobičajeno koristi kao hvatač slobodnih radikala, dok Zn-DTPA djeluje kao kompleksirajući agens.^{146,147,148}

Usporedbom internih produkata 4 i 9, u kojima je etanol dodan u volumnim udjelima od 7 % i 10 %, redom utvrđena je veća radiokemijska čistoća u internom produktu 9 (tablica 15). Povećalo se i radiokemijske iskorištenje na 97 % u oba navedena interna produkta. Iako je sadržaj etanola u internom produktu 9 (~10 % v/v) bio blizu gornje granice specifikacije ostao je unutar unaprijed definiranih kriterija prihvatljivosti za konačnu formulaciju radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Nakon obilježavanja radiofarmaceutika preostali sadržaj etanola u konačnom produktu 9 iznosio je 0,22 % čime je potvrđena usklađenost s postavljenim kriterijima prihvatljivosti monografije Europske farmakopeje gdje sadržaj etanola u radiofarmaceutiku mora biti < 10 %.^{23,142} Na slici 22. prikazani su GC kromatogrami etanola u obilježenim internim produktima 4 (A) i 9 (B). U referentnom produktu Pluvicto® nije utvrđena prisutnost zaostalih otapala poput etanola.



Slika 22. GC kromatogrami etanola u obilježenim internim produktima 4 (A) i 9 (B)

Dodatak kompleksirajućeg agensa Zn-DTPA u 20 puta većem molarnom suvišku u odnosu na peptid PSMA-617, koji je u sintezi 7 dodan na početku postupka obilježavanja, rezultirao je izostankom nastanka aktivnog produkta. Izostanak produkta posljedica je toga što je gotovo sav radionuklid ^{177}Lu ostao u obliku slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (97,6 %), radiokemijska čistoća spoja iznosila je 0,63 % te je nastao i kompleksni spoj ^{177}Lu -DTPA (1,0 %) (slika 19, produkt 7).¹⁴⁸ Budući da je kompleksirajući agens DTPA dodan prije peptida PSMA-617, radionuklid je bio izložen kompetitivnom keliranju prije nego što je mogao stupiti u reakciju kompleksiranja s peptidom PSMA-617.

U sintezi 8, u kojoj je kompleksirajući agens Zn-DTPA dodan na kraju obilježavanja prema procijenjenoj koncentraciji slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$, dobiveni produkt pokazao je zadovoljavajuću radiokemijsku čistoću. Manje razlike u izmjerenoj radiokemijskoj čistoći između produkata pripremljenih u vlastitom laboratoriju i referentnog produkta mogu biti posljedica blago različitih vrijednosti pH. Složeni utjecaj pH na radiokemijsku čistoću i iskorištenje reakcije detaljno je prethodno istražen u radu Watanabe i suradnika.¹¹⁹ Općenito, porastom vrijednosti pH povećava se stupanj deprotonacije kelirajućeg agensa, što može pogodovati koordinaciji metalnog iona i nastanku kompleksa. Nadalje, tijekom procesa obilježavanja, ugradnja radionuklida ^{177}Lu u PSMA-617 može dodatno utjecati na oslobađanje iona H^+ što rezultira smanjenom pH vrijednošću u krajnjem produktu.^{149,150}

U ovom radu uočene su promjene vrijednosti pH kod sinteza 4-9 gdje je početni pH reakcijske smjese iznosio 5,5 a u produktima je pH iznosio 4,5. U svim provedenim eksperimentima korišteni su relativno mali volumeni reagensa. Zbog mogućih gubitaka reagensa tijekom uzorkovanja mjerenje vrijednosti pH reakcijske smjese neposredno prije sinteze nije bilo prikladno. Jedno od mogućih objašnjenja odstupanja vrijednosti pH internih produkata (4-9) od početne vrijednosti pH 5,5 jest nedostatan puferni kapacitet reakcijske smjese. Naime, količina dodanog pufera možda nije bila dovoljna za održavanje vrijednosti pH tijekom procesa obilježavanja, dok je u referentnom produktu pH nakon obilježavanja ostao 5,5. Izmjereni pH otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ pomoću pH-indikatorske trakice iznosio je 2 što je u skladu s kriterijima monografije Europske farmakopeje.¹³⁹

4.2. Određivanje radionuklidne čistoće radiofarmaceutika

[¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617

Radionuklidna čistoća interno pripremljenih produkata, referentnog produkta i otopine ¹⁷⁷LuCl₃ određena je nakon 7 dana korištenjem HPGe detektora. Za određivanje radionuklidne čistoće za izračun su u obzir uzete dvije energije radionuklida ¹⁷⁷Lu: 208 keV i 228 keV koja pripada jednom od metastabilnih stanja lutecija ^{177m}Lu. Energija od 113 keV radionuklida ¹⁷⁷Lu bila je vidljiva u spektru referentnog produkta, kao i u svim spektrima interno pripremljenih produkata. Međutim, ova energija nije uzeta u obzir pri određivanju radionuklidne čistoće budući da intenzitet emisije gama zraka za energiju od 113 keV iznosi 6,6 %, a za energiju od 208 keV iznosi 11 %.¹⁵¹

Udio jednog od metastabilnog stanja lutecija ^{177m}Lu bio je manji od 0,1 %, što je ispod prihvatljivih granica i u skladu s monografijom Europske farmakopeje za srodne spojeve.¹³⁹ Radionuklidna čistoća internih produkata radiofarmaceutika [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, referentnog produkta i otopina ¹⁷⁷LuCl₃ ostala je nepromijenjena tijekom razdoblja od 7 dana (> 99,9 % ukupne radioaktivnosti) čime je potvrđeno da se unutar tog vremenskog razdoblja ne očekuju značajne promjene u radionuklidnom sastavu. Snažna koordinacijska kemija kelatora DOTA omogućila je visoku kinetičku i termodinamičku stabilnost kompleksa s radionuklidom ¹⁷⁷Lu, čime je spriječena disocijacija radionuklida i nastanak nečistoća povezanih s radiometalom. Mrtvo vrijeme (engl. *dead time*) HPGe detektora je bilo < 10 % prilikom mjerenja svih uzoraka. To je od iznimne važnosti jer mrtvo vrijeme predstavlja vrijeme tijekom kojeg detektor HPGe ne može ispravno registrirati novi gama foton nakon što je zabilježio prethodni. To izravno utječe na točnost mjerenja i povećava nesigurnost rezultata, stoga je bilo nužno razrijediti uzorke radionuklida ¹⁷⁷Lu kako bi mrtvo vrijeme bilo što niže.¹²¹ Tablica 18 prikazuje radionuklidnu čistoću internih produkata, referentnog produkta i otopine ¹⁷⁷LuCl₃ nakon 7 dana od sinteza i datuma kalibracije referentnog produkta i otopine ¹⁷⁷LuCl₃.

Tablica 18. Radionuklidna čistoća internih produkata, referentnog produkta i otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ nakon 7 dana od sinteza i datuma kalibracije referentnog produkta i otopine $^{177}\text{LuCl}_3$

uzorci	Površina pika $E_\gamma = 208$ keV	$\pm$ [%]	Površina pika $E_\gamma = 228$ keV	$\pm$ [%]	A ($E_\gamma =$ 208 keV)	A_i ($E_\gamma =$ 228 keV)	P_{RN} (7 dana kasnije) [%]
produkt 1	3870614	0,05	2876	3,96	317116,7	72,8	99,98
produkt 2	7014976	0,04	4754	3,88	574732,1	120,4	99,98
produkt 3	4260337	0,05	5472	2,48	349046,4	138,6	99,96
produkt 4	5369756	0,04	6791	2,26	439940,4	172,0	99,96
produkt 5	3968059	0,05	3537	3,33	325100,3	89,6	99,97
produkt 6	2443916	0,06	2140	3,92	200228,3	54,2	99,97
produkt 7	17861580,88	0,22	9948	1,42	1463386,9	252,0	99,98
produkt 8	9793505,9	0,33	5667	2,08	802375,1	143,5	99,98
produkt 9	16506500,2	0,32	9405	1,42	1352366,1	238,2	99,98
$^{177}\text{LuCl}_3$ otopina (I)	36462590	0,02	13385	3,64	2987354,6	339,0	99,99
$^{177}\text{LuCl}_3$ otopina (II)	3266197	0,06	2335	3,36	267597,2	59,1	99,98
referentni produkt	2278359	0,07	43	117,7	186664,4	1,1	99,99

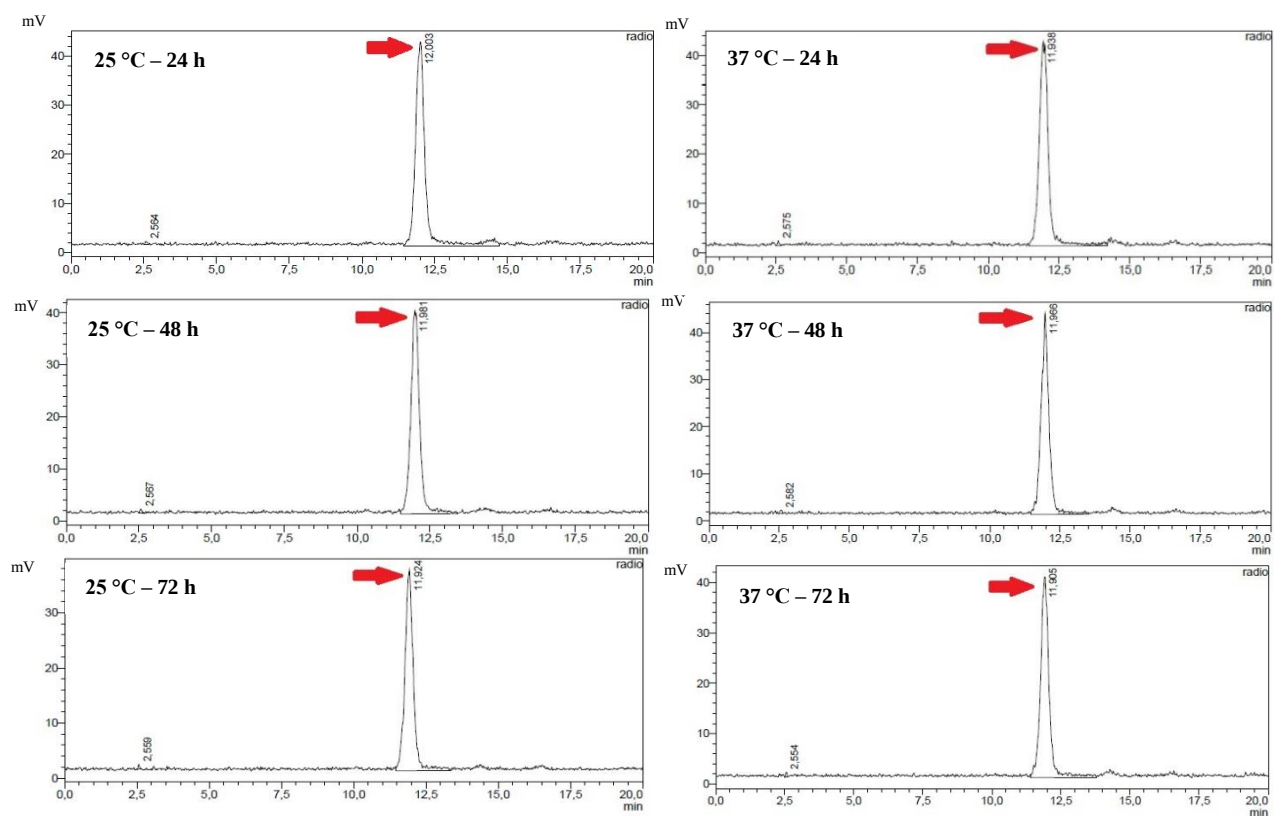
* P_{RN} - radionuklidna čistoća

Radionuklidna čistoća veća od 99,9 % kod ^{177}Lu -radiofarmaceutika od iznimne je važnosti kako bi se pacijentu smanjila nepotrebna izloženost zračenju i osigurala precizna terapija tumora. Nusproizvodi i nečistoće poput metastabilnog lutecija ^{177m}Lu mogu emitirati nepoželjne vrste zračenja koje oštećuju zdrave organe i tkiva umjesto samo ciljanih stanica raka. Radiounklid ^{177}Lu ima povoljno vrijeme poluraspada od oko 6,65 dana, što znači da se brzo raspada nakon što se pacijentu aplicira radiofarmaceutik. Nečistoće s dužim vremenom poluraspada kao što je metasabilno stanje lutecija ^{177m}Lu s vremenom poluraspada od 160,4 dana dulje bi zadržale radioaktivnost u tijelu pacijenta. Radionuklidna čistoća je važna i u dozimetriji budući da liječnici moraju točno znati koliku dozu zračenja prima tumor. Prisutnost drugih radionuklida mijenja te račune i otežava planiranje terapije. Što se tiče sigurnosti osoblja i okoliša manji udio nečistoća smanjuje rizik za medicinsko osoblje koje rukuje pripremkom i olakšava kasnije zbrinjavanje radioaktivnog otpada.

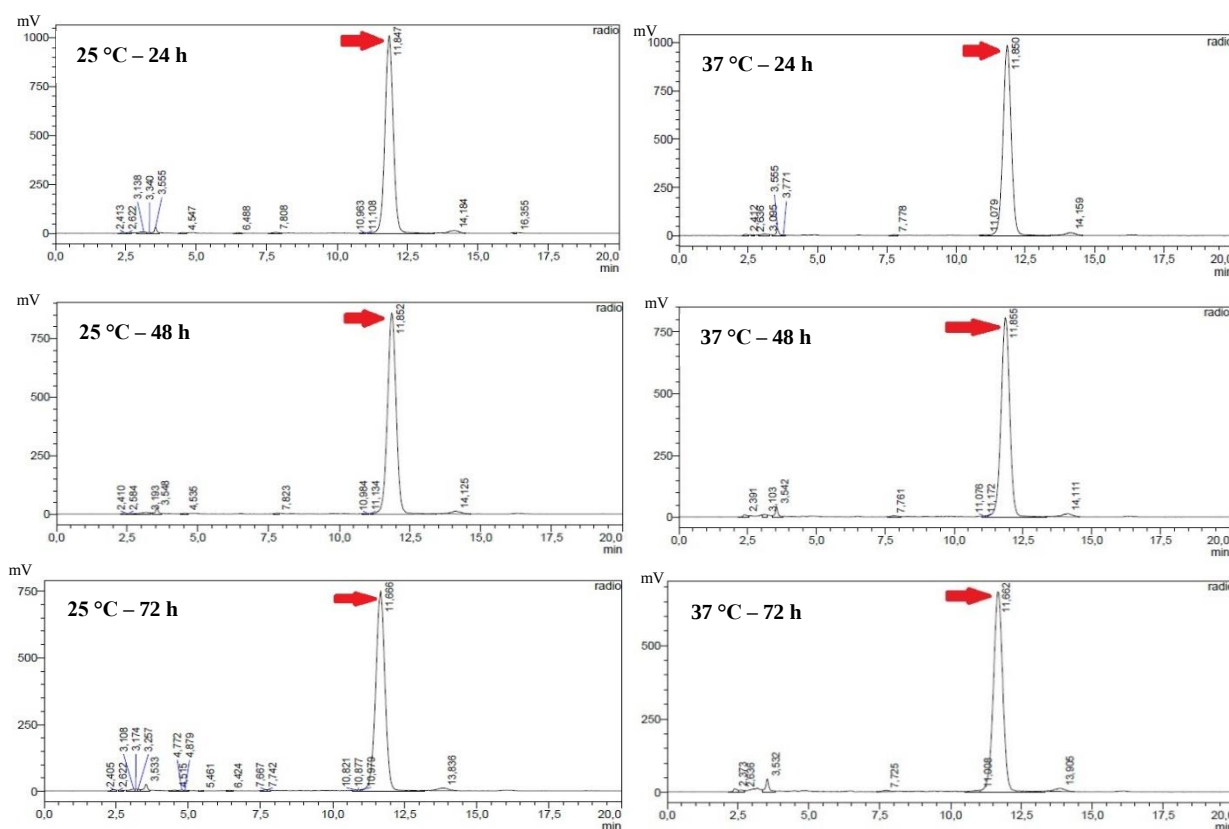
4.3. Određivanje stabilnosti radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 metodom *in vitro*

Postupci obilježavanja radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 provedeni u ovom radu rezultirali su dobivanjem radiofarmaceutskog pripravka namijenjenog terapijskoj primjeni kod pacijenata s progresivnim metastatskim rakom prostate rezistentnim na kastraciju prostate. Iz tog su razloga provedena ispitivanja stabilnosti radiofarmaceutika metodom *in vitro* u fiziološkoj otopini i humanom serumu pri čemu su uzorci inkubirani tijekom 72 sata na 25 °C i 37 °C. Prije provedbe ispitivanja radiofarmaceutika metodom *in vitro* spektrofotometrijski je određena razina bakterijskih endotoksina u svim internim produktima te u referentnom produktu. U svim uzorcima količina bakterijskih endotoksina je bila niža od 5,0 EU mL⁻¹, što je bilo u skladu s kriterijima prihvatljivosti propisanim monografijom Europske farmakopeje.¹⁴²

Stabilnost internih produkata inkubiranim u humanom serumu ispitana je primjenom metode HPLC. Procjena stabilnosti provedena je praćenjem promjena vrha pika i retencijskog vremena svakog internog produkta i referentnog produkta (tablica D2). Vrh glavnog pika internih produkata kao i njihovo retencijsko vrijeme (11,9 min) nakon 72 sata inkubacije u humanom serumu na 25 °C i 37 °C nisu pokazali značajne promjene, a to vrijedi i za referentni produkt. HPLC radiokromatogrami internog produkta 3 i referentnog produkta u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata s označenim vrhom pika produkta prikazani su na slikama 23 i 24. Ostali HPLC radiokromatogrami internih produkata prikazani su na slicama D25-D39.



Slika 23. HPLC radiokromatogrami internog produkta 3 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 h



Slika 24. HPLC radiokromatogrammi referentnog produkta u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 h

Radiokemijska čistoća radiofarmaceutskih pripravaka korištenih u ispitivanjima stabilnosti metodom *in vitro* određena je metodama radio-TLC i HPLC nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije u fiziološkoj otopini i humanom serumu, a dobiveni rezultati inkubacijom radiofarmaceutika u humanom serumu dobiveni metodom radio-TLC prikazani su u tablici D4. Rezultati pokazuju da je radiokemijska čistoća pripravaka tijekom 48 sati nakon pripreme otopina ostala viša od 99 % pri 25 °C te viša od 98 % pri 37 °C. Tijekom prvih 24 i 48 sati inkubacije nije zabilježeno oslobađanje slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ što upućuje na visoku stabilnost radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 u uvjetima ispitivanja. Stabilnost *in vitro* internog produkta 3 najveće radiokemijske čistoće u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu (HS) pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije prikazana je na slici 25.

Najmanja promjena u udjelu slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ između 48 i 72 h inkubacije pri 37 °C u humanom serumu iznosila je 0,02 %. Ovaj je rezultat od posebne važnosti budući da je poznato kako se slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ nakuplja u koštanom tkivu (do 60 % ^{177}Lu -radiofarmaceutika) i jetri (do 10 %) zbog čega njegov udio treba biti sveden na najmanju moguću mjeru.^{110,111} Nakon 72 sata zabilježen je blagi porast udjela slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (0,11–1,62 %). Istodobno je u internim produktima nakon inkubacije u humanom serumu uočen i porast udjela ^{177}Lu -koloida (0,63–1,63 %).

Referentni produkt Pluvicto® korišten za usporedbu svojstava s interno pripremljenim radiofarmaceutikom [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 općenito je pokazao manje promjene radiokemijske čistoće tijekom 72 sata ispitivanjem stabilnosti radiofarmaceutika u humanom serumu *in vitro* (tablica D5). Nakon 72 sata inkubacije oslobađanje slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ bilo je manje izraženo (0,27–0,36 %) nego kod internih produkata. Kao pomoćne tvari u referentnom produktu Pluvicto® prisutni su gentizatna kiselina i natrijev askorbat te oba spoja djeluju kao hvatači slobodnih radikala.¹²² Zbog kombiniranog djelovanja ovih pomoćnih tvari Pluvicto® pokazuje vrlo dobru radiokemijsku stabilnost tijekom deklariranog roka uporabe uz minimalno oslobađanje slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$. U referentnom produktu je zbilježeno i nastajanje ^{177}Lu -koloida pri čemu je njegov udio iznosio 0,06–0,55 % (slika 26).

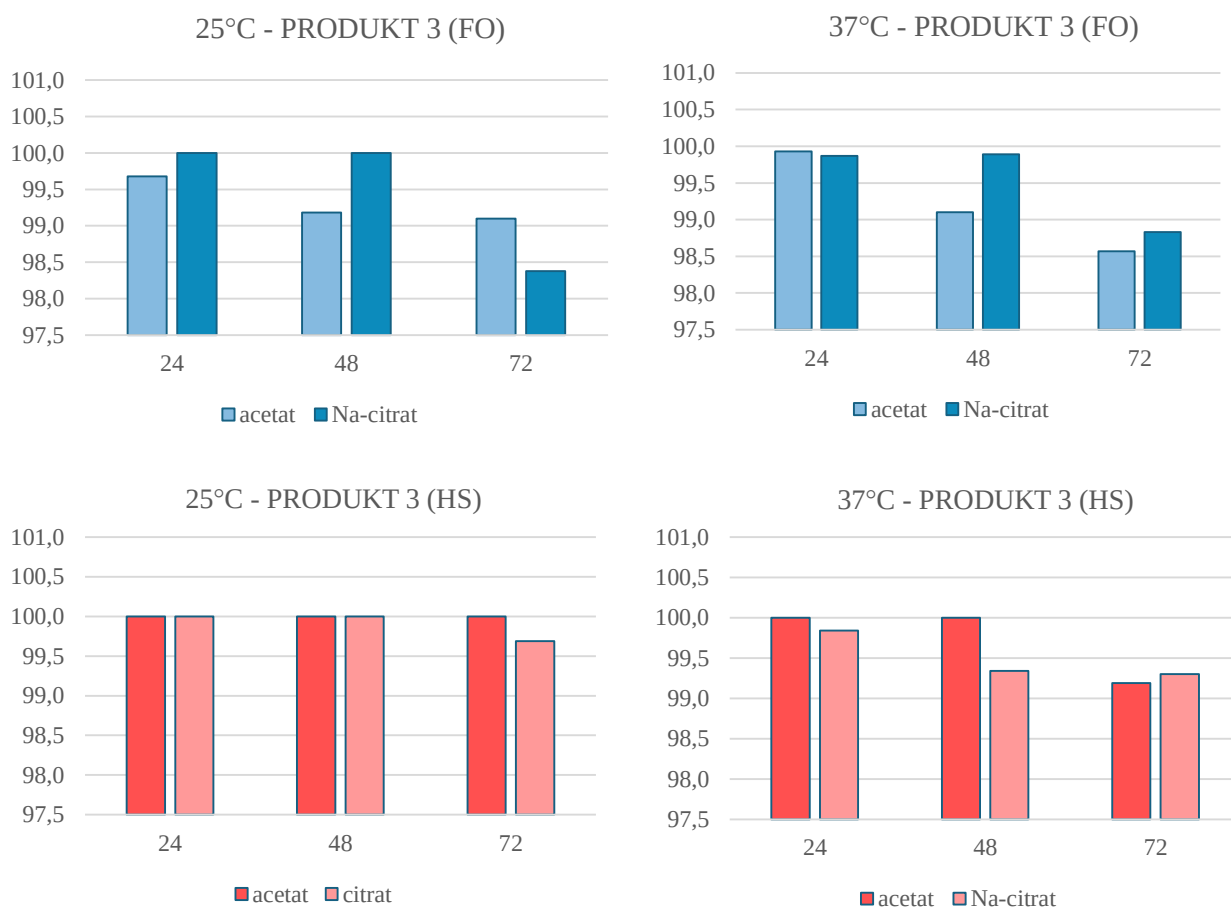
Rezultati dobiveni inkubacijom radiofarmaceutika u fiziološkoj otopini metodom radio-TLC prikazani su u tablici D3. Rezultati pokazuju da je radiokemijska čistoća pripravaka tijekom 48 sati nakon pripreme otopina ostala viša od 99 % pri 25 °C te viša od 98 % pri 37 °C. Vrlo je opravdano zaključiti da je radiofarmaceutik stabilan u fiziološkoj otopini tijekom 72 sata pri obje ispitivane temperature. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 pokazao zadovoljavajuću stabilnost u fiziološkoj otopini tijekom 72 h pri 25 °C i 37 °C bez značajnog povećanja udjela slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ i ^{177}Lu -koloida. Stabilnost [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 ispitana je pri 25 °C, jer ta temperatura predstavlja uvjete rukovanja i čuvanja radiofarmaceutika, te pri 37 °C koja odgovara približnoj fiziološkoj temperaturi ljudskog organizma i omogućuje procjenu stabilnosti kompleksa u uvjetima relevantnim za njegovu primjenu.

Uočene razlike u vrijednostima slobodnog $^{177}\text{Lu}^{3+}$ iona i ^{177}Lu -koloida između internih produkata i referentnog produkta mogu se objasniti načinom detekcije radionuklida ^{177}Lu tijekom skeniranja iTLC-SG trakica radio-TLC skenerom. Naime, interni produkti imali su nižu početnu aktivnost radionuklida ^{177}Lu u odnosu na referentni produkt zbog čega je tijekom

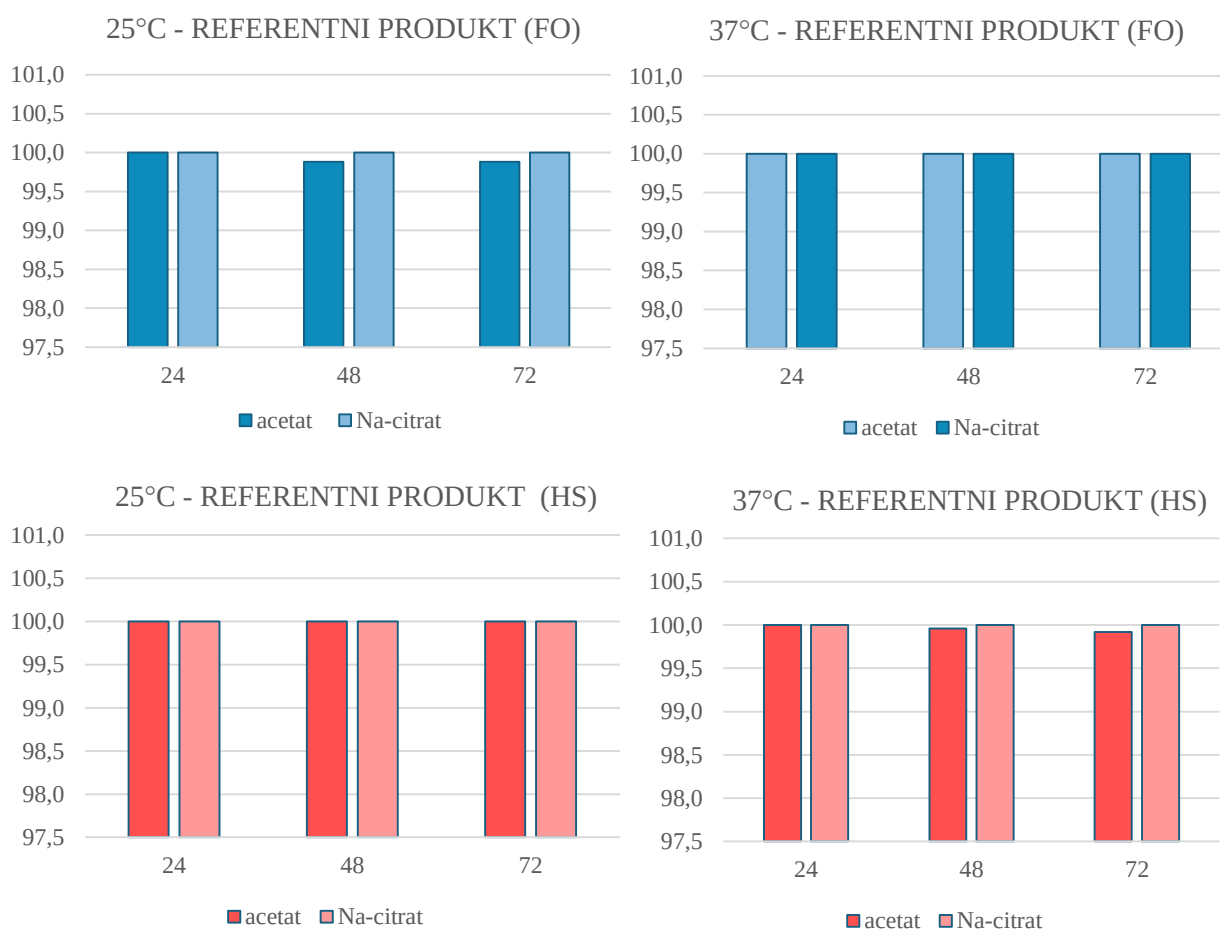
skeniranja trakica i izrade radiokromatograma zabilježen manji broj impulsa te su kromatografski pikovi bili širi. Posljedično, određivanje udjela kompleksiranog radionuklida u internim produktima bilo je manje precizno nego u referentnom produktu koji je imao puno veću početnu aktivnost.

Unatoč tome, interno pripremljeni radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 pokazao je zadovoljavajuću stabilnost određenu metodom *in vitro*. Prihvatljiva radiokemijska stabilnost održana je tijekom 48 sati, što odgovara vremenskom razdoblju preporučenom za kliničku primjenu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 za terapiju bolesnika s progresivnim metastatskim rakom prostate. Askorbinska kiselina ima ulogu hvatača slobodnih radikala i kao antioksidans značajno produljuje stabilnost ^{177}Lu -radiofarmaceutika za najmanje 30 sati čime se omogućuje produljenje vremenskog intervala unutar kojeg se pripravak može sigurno primijeniti u terapiji bolesnika.¹³⁷

Uzorci humanog seruma korišteni za ispitivanje stabilnosti *in vitro* metodom pri 25 °C i 37 °C čuvani su tijekom 180 dana nakon čega su razrijeđeni i analizirani metodom ICP-MS. Dobiveni rezultati prikazani su u dodacima (tablica D6). Promjena temperature inkubacije nije uzrokovala značajne razlike u koncentraciji nastalih stabilnih izotopa ^{177}Hf nakon 24 i 48 sati inkubacije, što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima određivanja stabilnosti primjenom metode HPLC.



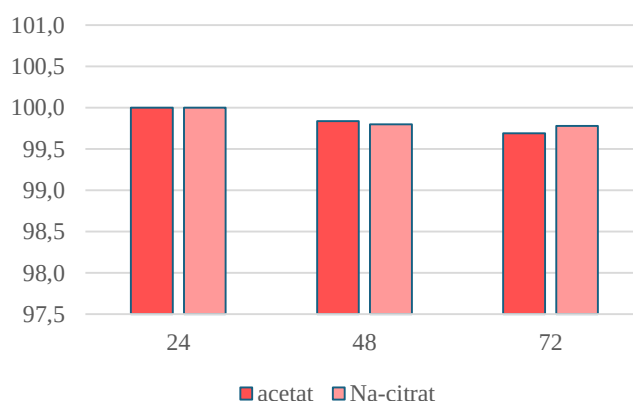
Slika 25. Stabilnost *in vitro* internog produkta 3 u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu s vremenom inkubacije od 72 h na 25 °C i 37 °C



Slika 26. Stabilnost *in vitro* referentnog produkta Pluvicto® u fiziološkoj otopini i humanom serumu (HS) s vremenom inkubacije od 72 h na 25 °C i 37 °C

Dodatak kompleksirajućeg agensa Zn-DTPA utjecao je na najniže otpuštanje slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ između 48 i 72 h ispitivanjem stabilnosti internog produkta 8 u humanom serumu na 37°C metodom *in vitro*. Najmanja zabilježena razlika u oslobađanju slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ između 48 i 72 h inkubacije pri 37 °C u humanom serumu iznosila je 0,02 (tablica D4).

Ovaj je rezultat od osobite važnosti jer su istraživanja pokazala da se slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ nakuplja u koštanom tkivu i jetri, što može dovesti do povećanja apsorbirane doze zračenja tih organa. Stoga je nužno njegovu koncentraciju održavati na što nižoj razini.^{142,143} Slika 27 prikazuje stabilnost *in vitro* internog produkta 8 u humanom serumu (HS) pri 37 °C tijekom 72-satnog razdoblja inkubacije pri čemu svijelocrveni stupci pokazuju jako malu razliku otpuštanja slobodnog $^{177}\text{Lu}^{3+}$ iona između 48 i 72 h.



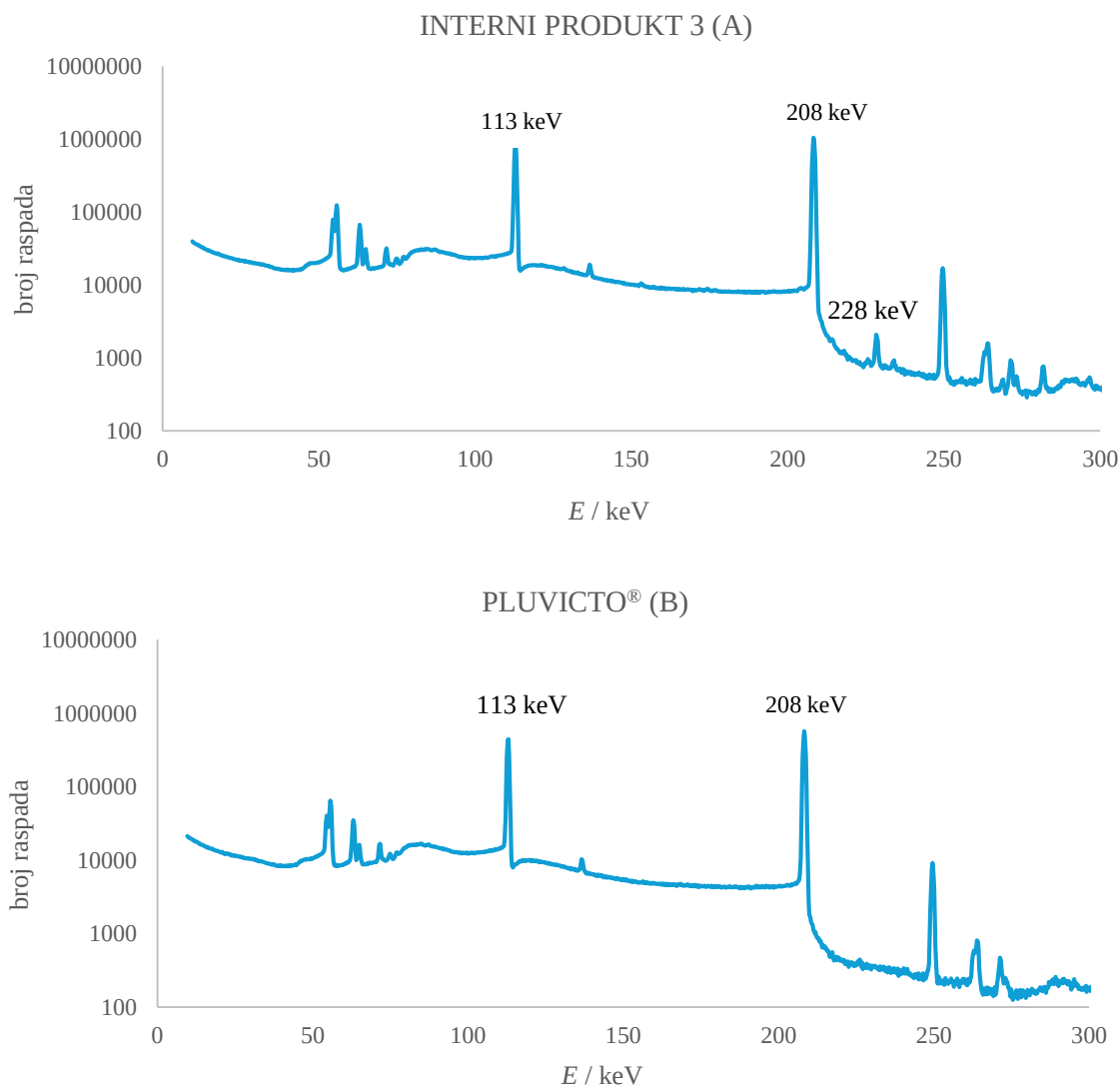
Slika 27. Stabilnost *in vitro* internog produkta 8 u humanom serumu (HS) pri 37 °C tijekom 72-satnog razdoblja

4.4. Određivanje izvornih vrsta radionuklida ^{177}Lu u radiofarmaceutiku ^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Izvorne vrste radionuklida ^{177}Lu korištene za pripravu internih produkata radiofarmaceutika ^{177}Lu]Lu-PSMA-617 i referentnog produkta određene su metodama gama spektrometrije s visoko čistim germanijskim detektorom (HPGe) i induktivno spregnute plazme uz spektrometriju masa (ICP-MS). Nakon snimanja uzoraka na detektoru HPGe na spektrima analizirana su dva energijska pika: 208 keV, karakterističan za radionuklid ^{177}Lu i 228 keV, karakterističan za metastabilni stanje lutecija $^{177\text{m}}\text{Lu}$. Energijski pik pri 113 keV, također karakterističan za radionuklid ^{177}Lu bio je vidljiv u spektru referentnog produkta te u svim spektrima interno pripremljenih produkata. Radi preglednosti prikazan je samo spektar internog produkta 3 budući da je za taj pripravak utvrđena najveća radiokemijska čistoća (slika 28A). Ostali spektri prikazani su u dodacima (slika D54-D56). U spektru referentnog produkta (slika 28B) nije uočen energijski pik pri 228 keV, što upućuje na način proizvodnje korištenog radionuklida prilikom obilježavanja radiofarmaceutika ^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Izostanak energijskog pika pri 228 keV, karakterističnog za metastabilno stanje lutecija $^{177\text{m}}\text{Lu}$ upućuje na to da je prilikom obilježavanja referentnog produkta Pluvicto[®] korišten radionuklid ^{177}Lu proizveden indirektnim putem, poznat kao metoda bez nosača (engl. *non-carrier-added, n.c.a.*).

Nasuprot tome, postupci obilježavanja radiofarmaceutika provedeni u ovom radu temeljili su se na uporabi radionuklida ^{177}Lu proizvedenog direktnim putem, poznat kao metoda

s nosačem (engl. *carrier-added, c.a.*) u otopinama $^{177}\text{LuCl}_3$ (I i II). Spektri otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ (I i II) prikazani su na slici D57.



Slika 28. HPGe spektar internog produkta 3 (A) i referentnog produkta Pluvicto® (B) s karakterističnim energijama gama zračenja radionuklida ^{177}Lu ($E_\gamma = 113$ i 208 keV) te metastabilnog izotopa $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ($E_\gamma = 228$ keV)

Poznato je da direktni put proizvodnje radionuklida ^{177}Lu rezultira nastankom stabilnog izotopa ^{177}Hf , koji ne utječe na obilježavanja radiofarmaceutika.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Prisutnost metastabilnog izotopa $^{177\text{m}}\text{Lu}$ u niskim koncentracijama u pripremljenim internim produktima potvrđena je gama spektrometrijom. S obzirom na dulje vrijeme poluraspada ovog metastabilnog izotopa, provedena su dodatna ispitivanja inkubiranih uzoraka humanog seruma s ciljem procjene udjela nastalih izotopa ^{177}Hf .

U tu su svrhu uzorci humanog seruma i radiofarmaceutika (interni produkti i referentni produkt) analizirani metodom ICP-MS. Iako je riječ o iznimno osjetljivoj analitičkoj metodi, njezina je primjena u novijim istraživanjima koja se bave kontrolom kvalitete radiofarmaceutika još uvijek relativno rijetko opisana. U analizi bioloških matriksa metoda ICP-MS pruža analitičke mogućnosti koje nadilaze mogućnosti gama spektrometrije osobito u određivanju stabilnih produkata raspada i elemenata u tragovima. Međutim ova se metoda najčešće primjenjuje za karakterizaciju neradioaktivnih metal-peptidnih konjugata.¹⁵²⁻¹⁵⁴ U tom kontekstu, analitičke metode temeljene na ICP-MS predstavljaju obećavajuću alternativu za ranu fazu evaluacije radiofarmaceutskih pripravaka.

Metoda ICP-MS omogućuje kvantifikaciju metala, metaloida, pa čak i pojedinih nemetala u tekućim uzorcima pri iznimno niskim koncentracijama, sve do razina ng L^{-1} pa čak i ispod ng L^{-1} . Primjenom plazme s temperaturom ionizacije od približno 7500 K molekule se razgrađuju na sastavne atome koji se potom ioniziraju te prenose u spektrometar masa, gdje se razdvajaju i detektiraju prema omjeru mase i naboja (m/z). Iako se tijekom ovog procesa gubi informacija o molekularnoj strukturi analiziranih spojeva metali koje oni sadrže mogu se odrediti na ultraniskim koncentracijskim razinama bez potrebe za primjenom standarda specifičnih za pojedinu kemijsku vrstu tijekom kvantifikacije. Dovoljni su standardi odgovarajućeg elementa, neovisno o tome u kojem se kemijskom spoju on izvorno nalazi.

Primjerice 2019. godine Holzapfel i suradnici konjugat DOTA-PSMA-617 su obilježili s neradioaktivnim europijem kako bi odredili afinitet vezanja konjugata na PSMA receptor. Europij je jedan od elemenata s najvećom osjetljivošću detekcije metodom ICP-MS, pri čemu se može određivati u koncentracijama reda ppt (ng L^{-1}). Kao trovalentni kation europij pokazuje kemijska svojstva vrlo slična lutecijevom ionu (Lu^{3+}) te poput njega tvori stabilne koordinacijske komplekse s kelatorima tipa DOTA.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷

Iz tog razloga su u ovom istraživanju uzorci humanog seruma analizirani tek nakon značajnog smanjenja njihove radioaktivnosti, čime su osigurani odgovarajući uvjeti za pouzdanu ICP-MS analizu. Uzorci humanog seruma korišteni za ispitivanje stabilnosti *in vitro* pri 25 °C i 37 °C čuvani su tijekom 180 dana, nakon čega su razrijeđeni i analizirani metodom ICP-MS. Dobiveni rezultati prikazani su u poglavlju 8. Dodatak (tablica D6).

Koncentracija nastalog stabilnog izotopa ^{177}Hf u otopinama humanog seruma i internih produkata bila je različita u odnosu na referentni produkt koji je sadržavao ^{177}Lu bez nosača (engl. *non-carrier-added, n.c.a.*). Dobiveni rezultati potvrđuju da metoda ICP-MS omogućuje razlikovanje radiofarmaceutskih pripravaka proizvedenih iz ^{177}Lu s nosačem (engl. *carrier-added, c.a.*) i bez nosača (engl. *non-carrier-added, n.c.a.*) na temelju određivanja koncentracije stabilnih izotopa hafnija nastalih tijekom proizvodnje i radioaktivnog raspada.

4.5. Utjecaj omjera liganda i metala [L] / [M] na radiokemijsku čistoću i radiokemijsko iskorištenje radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

Prilikom pripreme radiofarmaceutika postupkom obilježavanja poželjno je održavati što manji omjer liganda i radionuklida. U slučaju pripravaka temeljenih na radionuklidu ^{177}Lu s nosačem (engl. *carrier-added, c.a.*), kao što je prikazano u ovom istraživanju, omjer liganda i metala [L] / [M] može se smanjiti povećanjem količine radiometala u reakcijskoj smjesi. Primjenom fiksne količine od 20 µg peptida PSMA-617, različiti omjeri liganda i metala postignuti su dodatkom od 2,0 do 10,2 nmol otopine $^{177}\text{LuCl}_3$.

Rezultati su pokazali da se zadovoljavajuće iskorištenje obilježavanja radiofarmaceutika s radiounklidom ^{177}Lu od 96 % može postići već pri omjeru [L] / [M] ~2 što je ostvareno u internom produktu 5, a prikazano je u tablici. U tim je uvjetima u molekulu PSMA-617 uvedeno je približno 1,78 µg radionuklida ^{177}Lu . Uzimajući u obzir da je specifična aktivnost početne otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ iznosila 370 GBq mg⁻¹, može se izračunati da navedena količina lutecija odgovara aktivnosti od približno 658 MBq u obilježenom pripravku.

Na temelju dobivenih rezultata može se procijeniti da se pojedinačna terapijska doza radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 aktivnosti od 7,4 GBq može pripremiti uporabom približno 225 µg liganda PSMA-617 i oko 20 µg radionuklida ^{177}Lu uz pretpostavku da specifična aktivnost korištenog radionuklida ^{177}Lu iznosi 370 GBq mg⁻¹ prema dobivenom certifikatu otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ proizvođača Polatom (Poljska). Što je veća specifična aktivnost

radonuklida time je potrebna manja količina prekursora PSMA-617 za uspješno obilježavanje radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.

Kada se priprava radiofarmaceutika temelji na radiometalu ^{177}Lu proizvedenom metodom s nosačem (engl. *carrier-added, c.a.*), kao u ovom istraživanju, omjer liganda i metala može se smanjiti postupnim povećanjem količine radiometala u reakcijskoj smjesi uz održavanje optimalne koncentracije liganda (20 μg).

Radiokemijska čistoća radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 pripremljenih uz različite koncentracije lutecija s nosačem prikazana je u tablici 19. Dobiveni rezultati pokazali su da se radiokemijska čistoća od 96 % može postići već pri omjeru $[\text{L}] / [\text{M}] \sim 2$.

Dobiveni rezultati pokazuju da smanjenje omjera $[\text{L}] / [\text{M}]$ nije nužno povezano sa smanjenjem radiokemijske čistoće. Naime, pri najnižem ispitivanom omjeru $[\text{L}]/[\text{M}]$ od 1,89 kod internog produkta 5 ostvarene su radiokemijska čistoća od 96,0 % i radiokemijsko iskorištenje od 96 %. Istodobno, pri najvišem omjeru $[\text{L}] / [\text{M}]$ od 9,77 radiokemijska čistoća iznosila je 96,8 %, uz radiokemijsko iskorištenje od 83 %. Ovi rezultati upućuju na to da se u ispitivanim uvjetima količina liganda može značajno smanjiti u odnosu na količinu radiometala, a da se pritom zadrže zadovoljavajuće vrijednosti radiokemijske čistoće i iskorištenja. Stoga se omjer $[\text{L}] / [\text{M}]$ od približno 2 može smatrati prikladnim za daljnje razmatranje u kontekstu priprave terapijskog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617.

Iz dobivenih rezultata (tablica 19.) vidljivo je da radiokemijsko iskorištenje i radiokemijska čistoća ne pokazuju nužno istu tendenciju promjene s omjerom $[\text{L}] / [\text{M}]$. To je osobito vidljivo kod internog produkta 7, kod kojeg je zabilježeno radiokemijsko iskorištenje od 99 %, ali radiokemijska čistoća svega 0,63 %. Ovaj rezultat jasno pokazuje da visoko radiokemijsko iskorištenje samo po sebi nije dovoljan pokazatelj kvalitete konačnog radiofarmaceutika. Iako je visok udio početno uvedenog radionuklida ^{177}Lu sudjelovao u reakciji, gotovo sva radioaktivnost prema rezultatu određene radiokemijske čistoće metodom HPLC nije bila prisutna u željenom kemijskom obliku odnosno nije dobiven spoj [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Stoga je pri procjeni uspješnosti postupka radiobilježavanja potrebno istodobno uzeti u obzir oba parametra pri čemu visoka radiokemijska čistoća potvrđuje da se radioaktivnost pretežno nalazi u željenom radiofarmaceutskom obliku, dok radiokemijsko iskorištenje daje informaciju o učinkovitosti pretvorbe početno dostupnog radionuklida u željeni produkt.

Tablica 19. Prikaz utjecaja omjera [L] / [M] na radiokemijsku čistoću i radiokemijsko iskorištenje internih produkata radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617

produkt	$m(\text{PSMA-617})$ [μg]	$m(\text{Lu})$ [μg]	$n(\text{Lu})$ [nmoL]	[PSMA-617] / [Lu]	RKČ [%]	RKI [%]
1	20	0,528	3,02	6,36	97,3	91
2	20	0,572	3,27	5,87	96,1	94
3	20	0,638	3,65	5,26	99,1	94
4	20	0,641	3,66	5,24	95,7	97
5	20	1,780	10,17	1,89	96,0	96
6	20	0,344	1,96	9,77	96,8	83
7	20	0,642	3,67	5,23	0,63	99
8	20	0,640	3,66	5,25	97,2	93
9	20	0,466	2,66	7,20	96,7	97

Ova metoda radiokemijske sinteze kompleksa [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 može se primijeniti za pripravu jedne ili više doza za bolesnike tijekom jedne sinteze. U slučaju primjene za više bolesnika raspodjela doze mora se provesti ručno. Na temelju objavljenih podataka o dozimetriji primjene radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 kod ljudi, u pojedinim je publikacijama jasno pokazano da je povećanje apsorbirane doze zračenja uzrokovano prisutnošću metastabilnog stanja $^{177\text{m}}\text{Lu}$ zanemarivo pri klinički značajnim razinama doza, barem u kontekstu peptidne receptorske radionuklidne terapije (PRRT).^{100,158}

U optimiziranim uvjetima proizvodnje, objavljene vrijednosti omjera $^{177\text{m}}\text{Lu}/^{177}\text{Lu}$ iznose između 0,01 % i 0,02 % na kraju ozračivanja (engl. *end of bombardment*, *EOB*). Pri omjeru $^{177\text{m}}\text{Lu}/^{177}\text{Lu}$ od 0,02 % to znači da primijenjena doza sadrži približno 1,4–1,8 MBq $^{177\text{m}}\text{Lu}$. Primjerice referentni produkt Pluvicto® koji sadrži radionuklid ^{177}Lu bez nosača (engl. *non-carrier-added*, *n.c.a.*) rezultira efektivnom dozom po jedinici aktivnosti od 0,12 mSv MBq⁻¹, odnosno ukupnom efektivnom dozom od 0,89 Sv primjenom jedne doze radiofarmaceutika s aktivnošću od 7,4 GBq.

Kada se priprava radiofarmaceutika temelji na radionuklidu ^{177}Lu proizvedenom metodom bez nosača (engl. *non-carrier-added*, *n.c.a.*) bolje je koristiti što manju količinu prekursora budući da radionuklid ^{177}Lu dobiven metodom nema značajnu količinu stabilnog

radionuklida ^{176}Lu čime se omogućuje učinkovito obilježavanje liganda uz visoku molarnu aktivnost (MBq nmoL^{-1}).¹⁴⁰

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja pokazuju da se pri uporabi radionuklid ^{177}Lu proizvedenog metodom s nosače (engl. *carrier-added*, *c.a.*) radiofarmaceutik $^{177}\text{Lu}[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ može učinkovito pripremiti uz relativno nizak omjer $[\text{L}] / [\text{M}]$. Pri omjeru od približno 1,9 ostvarene su vrijednosti radiokemijske čistoće i radiokemijskog iskorištenja od 96 %, što ukazuje na mogućnost smanjenja količine peptide PSMA-617 potrebne za pripremu radiofarmaceutika uz zadržavanje zadovoljavajuće učinkovitosti radiobilježavanja.

Međutim, rezultati također pokazuju da omjer $[\text{L}] / [\text{M}]$ nije dovoljan za predviđanje kvalitete konačnog pripravka, zbog čega je potrebno istodobno optimirati količinu i specifičnu aktivnost radionuklida ^{177}Lu te uvjete reakcije. U tom smislu, uporaba radionuklida ^{177}Lu visoke specifične aktivnosti predstavlja važan preduvjet za smanjenje količine liganda i dobivanje radiofarmaceutika visoke molarne aktivnosti.

§ 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu uspješno je provedena radiokemijska sinteza radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 primjenom automatiziranog modula za obilježavanje radiofarmaceutika s radionuklidima ^{68}Ga i ^{177}Lu . Ispitan je utjecaj različitih parametara, uključujući omjer liganda PSMA-617 i metala Lu u otopini $^{177}\text{LuCl}_3$, vrijednost pH otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ te dodatak etanola kao hvatača slobodnih radikala kompleksirajućeg agensa Zn-DTPA tijekom postupka obilježavanja radiofarmaceutika.

Pripremljeni radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, uz vrlo malu potrošnju početnih reagensa, pokazao je zadovoljavajuću radiokemijsku čistoću u rasponu od 95,6 do 99,1 %, što je u skladu s kriterijima monografije Europske farmakopeje za radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-I&T. Također je postignut visok radiokemijski prinos, u rasponu od 83 do 97 %. Navedeni rezultati radiokemijske čistoće i radiokemijskog prinosa ne uključuju interni produkt 7 jer u tom slučaju nije dobiven željeni radiofarmaceutik. Dodatkom etanola kao hvatača slobodnih radikala dobiveno je visoko radiokemijsko iskorištenje od 97 %, a dodatak kompleksirajućeg agensa Zn-DTPA smanjuje otpuštanje slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$ nakon apliciranja radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 u vremenskom razdoblju između 48 i 72 sati.

Ispitivanja stabilnosti metodom *in vitro* potvrdila su da je radiofarmaceutik ostao stabilan tijekom 72 sata u fiziološkoj otopini i humanom serumu pri temperaturama od 25 °C i 37 °C. Kombinirana primjena metode ICP-MS i gama-spektrometrije primjenom detektora HPGe omogućila je jasno razlikovanje izotopa ^{177}Lu proizvedenog indirektnim putem metodom bez nosača (engl. *non-carrier-added*, *n.c.a.*) od izotopa ^{177}Lu proizvedenog direktnim putem metodom s dodanim nosačem (*carrier-added*, *c.a.*) u pripremljenom radiofarmaceutiku.

Ispitivanja kontrole kvalitete, provedena u skladu s monografijom Europske farmakopeje koja se odnosi na srodne radiofarmaceutske pripravke, pokazala su prihvatljivost pripremljenog radiofarmaceutika za medicinsku primjenu u liječenju raka prostate. Glavne prednosti opisanog postupka pripreme radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 u vlastitoj ustanovi jesu smanjenje troškova pripreme te, posljedično, veća dostupnost radiofarmaceutika obilježenih s radionuklidom ^{177}Lu .

Važno je napomenuti da pojedine pomoćne tvari i sirovine korištene tijekom obilježavanja radiofarmaceutika u vlastitoj ustanovi, uključujući hvatač slobodnih radikala etanol, peptid PSMA-617, otopinu $^{177}\text{LuCl}_3$ i kompleksirajući agens Zn-DTPA nisu bile farmaceutske kvalitete prema zahtjevima dobre proizvođačke prakse (GMP). Stoga bi za buduće povećanje opsega proizvodnje i rutinsku kliničku primjenu bilo preporučljivo koristiti materijale u potpunosti usklađene sa zahtjevima dobre proizvođačke prakse (GMP) te provesti odgovarajuća mikrobiološka ispitivanja. U svrhu validacije rada automatiziranog modula u budućim istraživanjima planirano je provođenje dodatnih ispitivanja, uključujući ispitivanje sterilnosti konačnog proizvoda i *media fill* test za ispitivanje sterilnosti kasete.

Na temelju svih provedenih radiokemijskih sinteza, ispitivanja kvalitete i stabilnosti radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 radiokemijska sinteza za aplikaciju radiofarmaceutika pacijentu uključivala bi uporabu radiofarmaceutskog prekursora, otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ bez nosača (engl. *non-carrier-added*), peptida PSMA-617, pufera askorbinske kiseline, etanola kao hvatača slobodnih radikala i kompleksirajućeg agensa DTPA za vezanje preostalog slobodnog iona $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Uporabom otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ bez nosača koristit će se relativno mala količina prekursora PSMA-617 za obilježavanje radiofarmaceutika s radionuklidom ^{177}Lu koja daje zadovoljavajuću radiokemijsku čistoću uz visoku molarnu aktivnost produkta. Uz uporabu odgovarajućih sirovina i pomoćnih tvari te provedbu radiokemijske sinteze prema zahtjevima dobre proizvođačke prakse (GMP), opisani postupak može predstavljati osnovu za pripravu radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 namijenjenog intravenskoj primjeni u bolesnika s metastatskim kastracijski rezistentnim karcinomom prostate.

Općenito, usporedbom parametara kvalitete radiofarmaceutika pripremljenog u vlastitoj ustanovi s referentnim radiofarmaceutikom Pluvicto[®] nisu utvrđena značajna odstupanja koja bi mogla ugroziti prihvatljivost proizvoda prema kriterijima utvrđenima važećim standardima i tako spriječiti aplikaciju oboljelom pacijentu.

Unatoč tome, radiofarmaceutik [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 pripremljen s izotopom ^{177}Lu s dodanim nosačem (*carrier-added, c.a.*), kakav je korišten u ovom istraživanju, predstavlja ekonomski isplativiju opciju zbog nižih troškova proizvodnje, što se posljedično odražava i na cijenu konačnog proizvoda.

Cilj ovog rada bio je razviti interni postupak radiokemijske sinteze teranostičkog radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 u modulu za automatiziranu sintezu. Također je bio

cilj ispitati kvalitetu dobivenog radiofarmaceutika te dobivene rezultate usporediti sa svojstvima referentnog komercijalno dostupnog radiofarmaceutika Pluvicto®.

Dobiveni rezultati ovog istraživanja pokazali su da je optimizacijom uvjeta radiokemijske sinteze moguće dobiti kvalitetan teranostički radiofarmaceutik [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 koji će biti siguran za internu upotrebu u medicinske svrhe za liječenja raka prostate kod muškaraca.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

^{177}Lu – lutecij-177

^{18}F – fluor-18

^{225}Ac – akitinij-225

^{68}Ga – galij-68

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ – tehnecij-99m

A_{eff} – efektivna specifična aktivnost

A_{S} – specifična aktivnost

c.a. – s nosačem

CT – kompjutorizirana tomografija

DOTA – 1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraoctena kiselina

DOTAGA – 1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1-glutarna kiselina-1,4,7,10-trioctena kiselina

FDA – Agencija za hranu i lijekove

GBq – gigabekerel

GC – plinska kromatografija

HCl – klorovodična kiselina

HNO_3 – dušična kiselina

HPGe – poluvodički detektor od germanija visoke čistoće

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ICP-MS – induktivno spregnuta plazma sa spektrometrijom masa

LAF – kabinet s laminarnim protokom zraka

LAL – limulus amebocitni lizat

LET – linearni prijenos energije

LOQ – granica kvantifikacija

MBq – megabekerel

mCRPC – metastatski rezistentni karcinom prostate

n.c.a. – bez nosača

NAL – 2-naftil-L-alanin

NaOH – natrijev hidroksid

PET – pozitronska emisijska tomografija

Ph. Eur. – Europska farmakopeja

P_{RN} – radionuklidna čistoća

PRRT – peptidna receptorska radionuklidna terapija

PSA – prostata specifični antigen

PSMA – prostata specifični membranski antigen

RKČ – radiokemijska čistoća

RKI – radiokemijsko iskorištenje

SPECT – jednofotonska emisijska kompjutorizirana tomografija

T_{1/2} – vrijeme poluraspada

TAT – ciljane alfa terapija

TFA – trifluoroctena kiselina

TLC – tankoslojna kromatografija

TXA – traneksamična kiselina

UV-Vis – ultraljubičato-vidljivo (detektor)

v/v – volumen/volumen

Zn-DTPA – cink-trinatrijev-pentetat

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. <https://hlpr.hr/o-raku/rak-prostate/> (preuzeto: 16. rujna 2026.)
2. D. Huić, D. Dodig, Z. Kusić, *KLINIČKA NUKLEARNA MEDICINA*, Medicinska naklada, Zagreb, 2023, str. 1–429.
3. B. Mioč, *PET/CT u dijagnostici karcinoma prostate*, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2023, str. 1–21
4. G. B. Saha, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer, USA, 2018, str. 93–105
5. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pluvicto> (preuzeto: 8. lipnja 2026.)
6. <https://www.primapagina.sif.it/article/911/1937-palermo-the-discovery-of-technetium> (preuzeto: 16. rujna 2026.)
7. S. Banerjee, M. R. Pillai, N. Ramamoorthy, *Semin. Nucl. Med.* **31(4)** (2001) 260–277.
8. International Atomic Energy Agency (IAEA), *Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Status and Trends*, IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Series No. 1. Beč: IAEA 2010.
9. L. R. Chervu, A. D. Nunn, M. D. Loberg, *Semin. Nucl. Med.* **12(1)** (1982) 5–17.
10. R. W. Arnold, G. Subramanian, J. G. McAfee, R. J. Blair, F. D. Thomas, *J. Nucl. Med.* **16(5)** (1975) 357–367.
11. A. R. Andersen, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1(4)** (1989) 288–318.
12. H. J. Biersack, F. Grünwald, J. Kropp, *Semin. Nucl. Med.* **21(1)** (1991) 2–10.
13. E. V. Garcia, C. D. Cooke, K. F. Van Train, R. Folks, J. Peifer, E. G. DePuey, J. Maddahi, N. Alazraki, J. Galt, N. Ezquerra, J. Ziffer, J. Areeda i D. Berman, *Am. J. Cardiol.* **66(13)** (1990) 23E–31E.
14. D. S. Berman, H. Kiat, K. F. Van Train, E. Garcia, J. Friedman, J. Maddahi, *Semin. Nucl. Med.* **21(3)** (1991) 190–212.
15. J. S. Fowler, T. Ido, *Semin. Nucl. Med.* **32(1)** (2002) 6–12.
16. U. Hennrich, M. Eder, *Pharmaceuticals* **14** (2021) 1–12.
17. P. Brugarolas, J. Comstock, D. W. Dick, T. Ellmer, J. W. Engle, E. Suzanne, E. Lapi, H. Steven, H. Liang, E. E. Parent, N. V. K. Pillarsetty, S. Selivanova, X. Sun, A. Vavere, P. J.H. Scott, *J. Nucl. Med. Technol.* **48** (2020) 34–39
18. International Atomic Energy Agency (IAEA), *Guidance for preclinical studies with radiopharmaceuticals*, IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals series, IAEA, Beč, 2023, str. 6

19. S. Zhang, X. Wang, X. Gao, X. Chen, L. Li, G. Li, C. Li, M. Yuan, R. Wang, K. Hu, Sig. *Transduct. Target Ther.* **10** (2025) 1–51.
20. Z. Talip, C. Favaretto, S. Geistlich, N. P. van der Meulen, *Molecules*, **25(4)** (2020) 966.
21. H. A. Holik, F. M. Ibrahim, A. A. Elaine, B. D. Putra, A. Achmad, A. H. S. Kartamihardja, *Molecules* **27(10)** (2022) 3062.
22. K. Herrmann, L. Giovanella, A. Santos, J. Gear, P. O. Kiratli, J. Kurth, A. Denis-Bacelar, R. Hustinx, M. Patt, R. L. Wahl, D. Pacz, F. Giammarile, H. Jadvar, N. Pandit-Taskar, M. Ghesani, J. Kunikowska, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **49** (2022) 2300–2309.
23. S. Todde, P. Kolenc Peitl, P. Elsinga, J. Koziorowski, V. Ferrari. E. M. Ocak, O. Hjelstuen, M. Patt, T. L. Mindt, M. Behe, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2** (2017) 1–29.
24. R. Ritawidya, H. Wongso, N. Effendi, A. Pujiyanto, W. Lestari, H. Setiawan, T. S. Humani, *Adv. Pharm. Bull.* **13(4)** (2023) 701–711.
25. A. Konopnicki, M. Zaliznyak, M. Roy, B. Jana, *Discov Oncol.* **15(1)** (2024) 791.
26. A. Owunwanne, M. Patel, S. Sadek, *The Handbook of Radiopharmaceuticals*, Chapman & Hall, London, 1995, str. 10–11
27. International Atomic Energy Agency (IAEA), *Quality Control in the Production of Radiopharmaceuticals*, IAEA, Beč, 2018, str. 1–53
28. Dopunska izobrazba i obnova znanja o primjeni mjera radiološke sigurnosti: osobe odgovorne za zaštitu od ionizirajućeg zračenja (priručnik za ispit), 2019. Scribd.
<https://www.scribd.com/document/612237346/dopunska-izobrazba-i-obnova-znanja-o-primjeni-mjera-radiolo%c5%a0ke-sigurnosti-priru%c4%8cnik-za-ispit> (preuzeto: 16. rujna 2026.)
29. C. Kratochwil, W. P. Fendler, M. Eiber, M. S. Hofman, L. Emmett, J. Calais, J. R. Osborne, A. Iravani, P. Koo, L. Lindenberg, R. P. Baum, M. F. Bozkurt, R. C. Delgado Bolton, S. Ezziddin, F. Forrer, R. J. Hicks, T. A. Hope, L. Kabasakal, M. Konijnenberg, K. Kopka, M. Lassmann, F. M. Mottaghy, W. J. G. Oyen, K. Rahbar, H. Schoder, I. Virgolini, L. Bodei, S. Fanti, U. Haberkorn, K. Hermann, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **50(9)** (2023) 2830–2845.
30. S. R. Cherry, J. A. Sorenson, M. E. Phelps, *Physics in Nuclear Medicine*, Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2012., str. 1–544.
31. M. G. Stabin, *Fundamentals of Nuclear Medicine Dosimetry*, Springer, New York, 2008., str. 1–237.
32. W. E. Bolch, K. F. Eckerman, G. Sgouros, S. R. Thomas, *J. Nucl. Med.* **50(3)** (2009) 477–484.
33. W. E. Bolch, L. G. Bouchet, J. S. Robertson, B. W. Wessels, J. A. Siegel, R. W. Howell, A. K. Erdi, B. Aydogan, S. Costes, E. E. Watson, A. B. Brill, N. D. Charkes, D. R. Fisher, M. T. Hays, S. R. Thomas, *J. Nucl. Med.* **40(1)** (1999) 11S–36S.

34. R. Loevinger, T. F. Budinger, E. E. Watson, *MIRD Primer for Absorbed Dose Calculations*, Society of Nuclear Medicine, Virginia, 1991., str. 1–128.
35. M. Lassmann, C. Chiesa, G. Flux, M. Bardiès, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**(1) (2011) 192–200.
36. G. Flux, M. Bardiès M. Monsieurs, S. Savolainen, S.-E. Strands, M. Lassmann, *Z. Med Phys.* **16**(2) (2006) 85–94.
37. S. Schmitl, J. Raitanen, S. Witoszynskyj, E.-M. Patronas, L. Nics, M. Ozenil, V. Weissenböck, T. L. Mindt, M. Hacker, W. Wadsak, M. R. Brandt, M. Mitterhauser, *Molecules* **28**(23) (2023) 7696.
38. M. Meisenheimer, S. Kürpig, M. Essler, E. Eppard, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **4** (2019) 1–10.
39. I. Velikyan, *Molecules* **20** (2015) 12913–12943.
40. S. Liu, C. E. Ellars, D. Scott Edwards, *Bioconjugate Chem.* **14** (2003) 1052–1056.
41. W. A. Breeman, K. van der Wansem. B. F. Bernard, A. van Gameren, J. L. Erion, T. J. Visser, E. P. Krenning, M. de Jong, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **30** (2003) 312–315.
42. <https://www.mirion.com/products/medical/nuclear-medicine-instrumentation/delivery-detection-and-diagnosis/dose-calibrators-accessories/dose-calibrators/crc-77thr-dose-calibrator> (preuzeto: 18. lipnja 2026.)
43. P. Tandon, D. Prakash, S. C. Kheruka, N. N. Bhat, *Radiation Safety Guide for Nuclear Medicine Professionals*, Springer, Singapore, 2022, str. 1–360
44. <https://www.studysmarter.co.uk/explanations/physics/medical-physics/gamma-camera/> (preuzeto: 25. kolovoza 2026.)
45. H. Zeismann, J. O'Malley, J. Thrall, *Nuclear medicine: The Requisites*, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2014, str. 61
46. D. S. O'Keefe, D. J. Bacich, S. S. Huang, W. D. W. Heston, *J. Nucl. Med.* **59** (2018) 1007–1013.
47. F. Pu, M. Salarian, S. Xue, J. Qiao, J. Feng, S. Tan, A. Patel, X. Li, K. Mamouni, K. Hekmatyar, J. Zou, D. Wu, J. J. Yang, *Nanoscale* **8** (2016) 12668–12682.
48. O. B. Goodman, O.B., S.P. Barwe, B. Ritter, P. S. McPherson, A. J. Vasko, J. H. Keen, D. M. Nanus, N. H. Bander, A. K. Rajasekaran, *Int. J. Oncol.* **31** (2007) 1199–1203.
49. S. Martin, R. Tönnemann, I. Hierlmeier, S. Maus, F. Rosar, J. Ruf, J. P. Holland, S. Ezziddin, M. D. Bartholomä, *J. Med. Chem.* **64** (2021) 4960–4971.
50. S. van der Gaag, I. H. Bartelink, A. N. Vis, G. L. Burchell, D. E. Oprea-Lager, H. Hendrikse, *Biomedicines* **10** (2022) 3020.
51. R. Tönnemann, P.T Meyer, M. Eder, A.-C- Baranski, *Pharmaceuticals* **12** (2019) 18.
52. 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.

53. A. Markowska, A. R. Markowski, I. J. Karpowicz, *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2022) 1–18.
54. I. Velikyan, *Sinteza, karakterizacija i aplikacija ⁶⁸Ga-obilježenih makromolekula*, Doktorski rad, Sveučilište Uppsala, 2005, str. 20
55. L. Mu, R. Hesselmann, U. Oezdemir, L. Bertschi, A. Blanc, M. Dragic, D. Löffler, C. Smuda, A. Johayem, R. Schibli, *Appl. Radiat. Isot.* **76** (2013) 63–69.
56. A. Al-Nahhas, Z. Win, T. Szyszko, A. Singh, C. Nanni, S. Fanti, D. Rubello, *Anticancer Res.* **27** (2007) 4087–4094.
57. M. Papotti, M. Bongiovanni, M. Volante, E. Allia, S. Landolfi, L. Helboe, M. Schindler, S. L. Cole, G. Bussolati, *Virchows Arch.* **440** (2002) 461–475.
58. V. Ambrosini, D. Campana, L. Bodei, C. Nanni, P. Castellucci, V. Allegri, G. C. Montini, P. Tomassetti, G. Paganelli, S. Fanti, *J.Nucl.Med.* **51** (2010) 669–673.
59. V. Ambrosini, C. Nanni, M. Zompatori, D. Campana, P. Tomassetti, P. Castellucci, V. Allegri, D. Rubello, G. Montini, R. Franchi, S. Fanti, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **37** (2010) 722–727.
60. P. Antunes, M. Ginj, H. Zhang, B. Waser, R. P. Baum, J. C. Reubi, H. Maecke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **34** (2007) 982–993.
61. B. G. Conry, N. D. Papathanasiou, V. Prakash, I. Kayani, M. Caplin, S. Mahmood, J. B. Bomanji, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **37** (2010) 49–57.
62. M. Hofmann, H. Maecke, A. R. Borner, E. Weckesser, P. Schoffski, M. L. Oei, J. Schumacher, M. Henze, A. Heppeler, G. J. Meyer, W. H. Knapp, *Eur. J. Nucl. Med.* **28** (2001) 1751–1757.
63. C. Pettinato, A. Sarnelli, M. DiDonna, S. Civollani, C. Nanni, G. Montini, D. DiPierro, M. Ferrari, M. Marengo, C. Bergamini, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **35** (2008) 72–79.
64. D. Wild, H. R. Mäcke, B. Waser, J. C. Reubi, M. Ginj, H. Rasch, J. Muller-Brand, M. Hofmann, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **32** (2005) 724.
65. R. Srirajaskanthan, I. Kayani, A. M. Quigley, J. Soh, M. E. Caplin, J. Bomanji, *J. Nucl. Med.* **51** (2010) 875–882.
66. U. Hennrich, M. Benešová, *Pharmaceuticals* **13** (2020) 38.
67. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68Ga-DOTATATE#section=3D-Status> (preuzeto: 28. kolovoza 2026.)
68. V. Kubicek, J. Havlickova, J. Kotek, G. Tircso, P. Hermann, E. Toth, I. Lukes, *Inorg. Chem.* **49** (2010) 10960–10969
69. M. Benešová, M. Schäfer, U. Bauder-Wüst, A. Afshar-Oromieh, C. Kratochwil, W. Mier, U. Haberkorn, K. Kopka, M. Eder, *J. Nucl. Med.* **56** (2015) 914–920.
70. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68Ga-DOTATATE#section=3D-Status> (preuzeto: 28. kolovoza 2026.)

71. S. Schmitl, J. Raitanen, S. Witoszynskyj, E. M. Patronas, L. Nics, M. Ozenil, V. Weissenböck, T. L. Mindt, M. Hacker, M. Mitterhauser, *Molecules* **28**(23) (2023) 7696.
72. M. Weineisen, M. Schottelius, J. Simecek, R. P. Baum, A. Yildiz, S. Beykan, H. R. Kulkarni, M. Lassmann, M., I. Klette, M. Eiber, M. Schwaiger, H. J. Wester, *J. Nucl. Med.* **56** (2015) 1169–1176.
73. A. P. Kozikowski, F. Nan, P. Conti, J. Zhang, E. Ramadan, T. Bzdega, B. Wroblewska, J. H. Neale, S. Pshenichkin, J. T. Wroblewski, *J. Med. Chem.* **4** (2001) 298–301.
74. C. A. Foss, R. C. Mease, H. Fan, Y. Wang, H. T. Ravert, Dannals, R. F. Olszewski, R. T. Heston, W. D. Kozikowski, A. P. Pomper, M. G. *Clin. Cancer Res.* **11** (2005) 4022–4028.
75. C. Barinka, Y. Byun, C. L. Dusich, S. R. Banerjee, Y. Chen, M. Castanares, A. P. Kozikowski, R. C. Mease, M. G. Pomper, J. Lubkowski, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 7737–7743.
76. M. Benešová, U. Bauder-Wüst, M. Schäfer, K. D. Klika, W. Mier, U. Haberkorn, K. Kopka, M. Eder, *J. Med. Chem.* **59** (2016) 1761–1775.
77. K. Hashimoto, H. Matsuoka, S. Uchida, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **255** (2003) 575–579.
78. V. Di Iorio, S. Boschi, C. Cuni, M. Monti, S. Severi, G. Paganelli, C. Masini, *Molecules* **27** (2022) 4143.
79. A. Afshar-Oromieh, H. Hetzheim, C. Kratochwil, M. Benešová, M. Eder, O. C. Neels, M. Eisenhut, W. Kübler, T. Holland-Letz, F. L. Giesel, W. Mier, K. Kopka, U. Haberkorn, *J. Nucl. Med.* **56** (2015) 1697–1705.
80. C. Kratochwil, F. L. Giesel, M. Stefanova, M. Benešová, M. Bronzel, A. Afshar-Oromieh, W. Mier, M. Eder, K. Kopka, U. Haberkorn, *J. Nucl. Med.* **57** (2016) 1170–1176.
81. C. W. Wichmann, U. Ackermann, S. Poniger, K. Young, B. Nguyen, G. Chan, J. Sachinidis, A. M. Scott, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **64** (2021) 140–146.
82. K. S. Ajish Kumar, A. Mathur, *Eur. J. Med. Chem.* **6** (2022) 100084.
83. M. Benešová, M. Schäfer, U. Bauder-Wüst, A. Afshar-Oromieh, C. Kratochwil, W. Mier, U. Haberkorn, K. Kopka, M. Eder, *J. Nucl. Med.* **56** (2015) 914–920.
84. S. Aime, A. Barge, M. Botta, M. Fasano, J. D. Ayala, G. Bombieri, *Inorg. Chim. Acta* **246** (1996) 423–426.
85. M. Kraihammer, P. Garnuszek, A. Bauman, M. Maurin, M. Alexandre Lafont, R. Haubner, E. von Guggenberg, M. Gabriel, C. Decristoforo, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **8** (2023) 7.
86. T. Wüstemann, M. Haberkorn, U. Bauder-Wüst, et al., *Theranostics* **6** (2016) 1085–1095.
87. V. Zepf, J. Simmons, A. Reller, *Materials Critical to the Energy Industry: An Introduction*, BP plc, drugo izdanje, 2014. str. 1–94.
88. C. S. Lim, J. W. Kampf, V. L. Pecoraro, *Inorg. Chem.* **48** (2009) 5224–5233.
89. S. Banerjee, M. R. Pillai, F. F. Knapp, *Chem. Rev.* **115** (2015) 2934–2974.

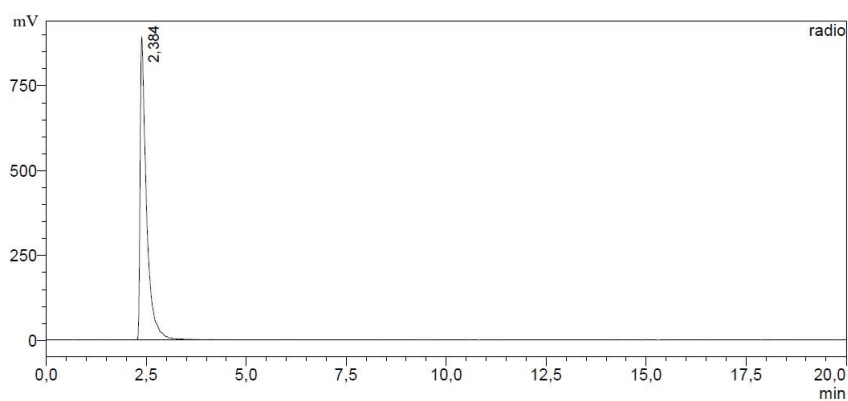
90. S. Chakraborty, K. V. Vimalnath, R. Chakravarty, H. D. Sarma, A. Dash, *Appl. Rad. Isotop.* **139** (2018) 91–97.
91. A. Afshar-Oromieh, J. W. Babich, C. Kratochwil, F. L. Giesel, M. Eisenhut, K. Kopka, U. Haberkorn, *J. Nucl. Med.* **57** (2016) 79–89.
92. R. Seifert, K. Kessel, K. Schlack, M. Weber, K. Herrmann, M. Spanke, W. P. Fendler, B. Hadaschik, J. Kleesiek, M. Schafers, M. Weckesser, M. Boegemann, K. Rahbar, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **48** (2020) 1200–1210.
93. W. V. Vogel, S. C. van der Marck, M. W. J. Versleijen, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **48** (2021) 2329–2335.
94. J. Aerts, J. R. Ballinger, M. Behe, C. Decristoforo, P. H. Elsinga, A. F. Chauvet, T. L. Mindt, P. K. Peitl, S. C. Todde, J. Kozirowski, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **57** (2014) 615–620.
95. S. Martin, R. Tönnemann, I. Hierlmeier, S. Maus, F. Rosar, J. Ruf, J. P. Holland, S. Ezziddin, M. D. Bartholomä, *J. Med. Chem.* **64** (8) (2021) 4960–4971.
96. C.-L. Peng, C.-T. Chen, I.-C. Tang, *Int. J. Mol. Sci.* **26** (2025) 5970.
97. S. Martin, R. Tönnemann, I. Hierlmeier, S. Maus, F. Rosar, J. Ruf, J. P. Holland, S. Ezziddin, M. D. Bartholomä, *J. Med. Chem.* **64** (2021) 4960–4971.
98. S. Chakraborty, R. Chakravarty, P. Shetty, K. V. Vimalnath, I. B. Sen., A. Dash, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **59** (2016) 364–371.
99. S. Chakraborty, K. V. Vimalnath, R. Chakravarty, H. D. Sarma, A. Dash, *Appl. Radiat. Isot.* **139** (2018) 91–97.
100. A. Larenkov, I. Mitrofanov, M. Rakhimov, *Pharmaceutics*. **16** (2024) 1535.
101. E. A. Aalbersberg, T. T. Cao, M. M. Geluk-Jonker, J. J. M. A Hendrix, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **7** (2022) 24.
102. C. W. Wichmann, U. Ackermann, S. Poniger, K. Young, B. Nguyen, C. Gordon, J. Sachinidis, A. M. Scott, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **64** (2021) 140–146.
103. R. M. S. De Zanger, H. S. Chan, W. A. P. Breeman, E. Blois, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **321** (2019) 285–291.
104. European Pharmacopoeia (2005) 2.6.1. Sterility, 01/2005:20601. 5th ed. Strasbourg: EDQM.
105. N.C. Martinez-Gomez, N. H. Vu, E. Skovran, *Inorg Chem.* **55**(20) (2016) 10083–10089.
106. J. C. G. Bünzli, *J. Coord. Chem.* **67** (2014) 3706–3733.
107. D. Delač, *Određivanje sadržaja bakterijskih endotoksina u injekcijama azitromicina*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 1–38
108. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/features.html> (preuzeto 16. rujna 2026.)

109. B. Venkateswara Reddy, B. Rasmitha Reddy, K. Navaneetha, V. Sampath Kumar, V., *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **3** (2013) 596–610.
110. J. Vraneš, Patogeneza bakterijskih infekcija, *Medicinska mikrobiologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013. str. 86–95.
111. <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia> (preuzeto: 21. rujna 2026.)
112. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pluvicto>. (preuzeto: 1. srpnja 2026.)
113. S. M. B. Peters, B. Privé, M. De Bakker, F. De Lange, W. Jentzen, A. Eek, C. H. J. Muselaers, N. Mehra, J. A. Witjes, M. Gotthardt, J. Nagarajah, M. W. Konijnenberg, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **49**(2) (2022) 460–469.
114. C. Filss, A. Heinzl, B. Müller, A. T. J. Vogg, K. J. Langen, F. M. Mottaghy, *Nuklearmedizin*. **57**(1) (2018) 19–25.
115. O. Sartor, J. de Bono, K. N. Chi, K. Fizazi, K. Herrmann, K. Rahbar, S. T. Tagawa, L. T. Nordquist, N. Vaishampayan, G. El-Haddad, C. H. Park, T. M. Beer, A. Armour, W. J. Pérez-Contreras, M. DeSilvio, E. Kpamegan, G. Gericke, R. A. Messmann, M. J. Morris, B. J. Krause., *N. Engl. J Med.* **385**(12) (2021) 1091–1103.
116. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/epar/pluvicto>. (preuzeto: 1. srpnja 2026.)
117. L. W. Kalmthout, A. Braat, B. De Keizer, MGEH Lam, JMH De Klerk, *EJNMMI Research*. **8**(1) (2018) 56.
118. T. Niu, M. Fan, B. Lin, F. Gao, B. Tan, X. Du, *Exp. Ther. Med.* **27** (2024) 225.
119. G. Ninatti, S. T. Lee, A. M. Scott, *Cancers* **17**(21) (2025) 3412.
120. A. Hallqvist, E. Brynjarsdóttir, T. Krantz, M. Sjögren, J. Svensson, P. Bernhardt, *J. Nucl Med.* **66**(5) (2025) 707–712.
121. Rauch, H., Kitzberger, C., Janghu, K., *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **51**, 4099–4110 (2024).
122. S. Walrand, F. Jamar, *Int. J. Mol. Sci.* **22**(15) (2021) 8326.
123. Y. Wang, J. McKenzie, S. Sandhu, *J. Nucl Med.* **67** (2026) 20S–29S.
124. G. Ninatti, S. T. Lee, A.M. Scott, *Cancers* **17** (2025) 3412.
125. S. Zhang, X. Wang, X. Gao, X. Chen, L. Li, G. Li, C. Liu, Y. Miao, R. Wang, K. Hu, *Signal Transduct. Target. Ther.* **10** (2025) 1.
126. E. L. Hooijman, V. Radchenko, S. W. Ling., M. Konijnenberg, T. Brabander, S. L. W. Koolen, E. de Blois, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **9** (2024) 9.
127. European Pharmacopoeia (2005) 2.6.1. Sterility, 01/2005:20601. 5th ed. Strasbourg: EDQM.
128. L.B. Solnes, R. A. Werner, K. M. Jones, M. S. Sadaghiani, C. R. Bailey, C. Lapa, M. G. Pomper, S. P. Rowe, *J. Nucl Med.* **61**(3) (2020) 311–318.
129. A. Aslani, G. M. Snowden, D. L. Bailey, G. P. Schembri, E. A. Bailey, N. Pavlakis, P. J. Roach, *Asia Ocean J. Nucl. Med. Biol.* **3**(2) (2015) 107–115.

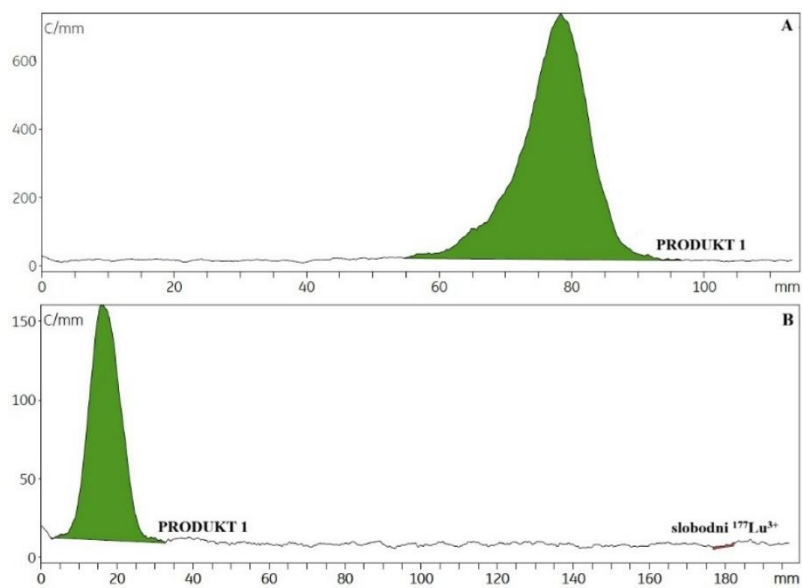
130. V. Di Iorio, S. Boschi, C. Cuni, M. Monti, S. Severi, G. Paganelli, C. Masini, *Molecules* **27** (2022) 4143.
131. E. L. Hooijman, C. M. Ntiabose, T. G. A. Reuvers, J. Nonnekens, E. A. Aalbersberg, J. R. J. P. van de Merbel, J. E. Huijmans, S. L. W. Koolen, J. J. M. A. Hendrikx E. de Blois E., *EJNMMI Radiopharm Chem.* **7(1)** (2022) 29.
132. A. Mukherjee, S. Lohar, A. Dash, H. D. Sarma, G. Samuel, A. Korde, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **58(4)** (2015) 166–172.
133. C.V. Boasa, L. Diasa, M. Matsudaa, E. Araujoa, *Braz. J. Radiat. Sci.* (2021) 1619.
134. M. Guleria, J. Amirdhanayagam, H. D. Sarma, R. P. Rallapeta, V. S. Krishnamohan, A. Nimmagadda, R. Parthasarathy, P. Sailaja, K. Tekchand, D. Tapas, *Biomed Res Int.* **1** (2021) 1–12.
135. M. Weineisen, M. Schottelius, J. Simecek, R. P. Baum, A. Yildiz, S. Beykan, R. H. Kulkarni, M. Lassmann I. Klette M. Eiber, M. Schwaiger, H. J. Wester, *J. Nucl. Med.* **56(8)** (2015) 1169–1176.
136. M. A. Sorensen, V. L. Andersen, H. W. Hendel, C. Vriamont, C. Warnier, J. Masset, C. Vriamont C. Warnier, A. F. Chauvet, J. A. Delage, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **63(8)** (2020) 393–403.
137. W. Hunt, M. Long, U. Kamil, S. Kellapatha, W. Noonan, P. D. Roselt, N. Papa, B. Emmerson, Hofman, M. S., Haskali, M. B. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **10** (2025) 47.
138. B. Neacsu, C. Cimpeanu, C. Barna, *Rom.Rep.Phys.* **65** (2013) 155–167.
139. European Pharmacopoeia. Lutetium (^{177}Lu) solution for radiolabelling. 07/2017:2798. (10th edition) (2017)
140. N. Gillings, S. Todde, M. Behe, C. Decristoforo, P. Elsinga, P., V. Ferrari, O. Hjelstue, P. Kolenc Peitl, J. Kozirowski, P. Laverman, T. L. Mindt, M. Ocak, M. Patt, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **5** (2020) 7.
141. E. L. Hooijman, C. M. Ntiabose, T. G. A. Reuvers, J. Nonnekens, E. A. Aalbersberg, J. R. J. P., van de Merbel, J. E. Huijmans, S. L. W. Koolen, J. J. M. A. Hendrikx, E. de Blois, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **7** (2022) 29.
142. European Pharmacopoeia. (^{177}Lu) zadavotide guraxetan injection. 04/2025:3170. (11th edition) (2025).
143. V. Di Iorio, S. Boschi, C. Cuni, M. Monti, S. Severi, G. Paganelli I C. Masini, *Molecules.* **27** (2022) 4143.
144. P. E. Hartrampf, F.-X. Weinzierl, A. K. Buck, S. P. Rowe, T. Higuchi, A. K. Seitz, H. Kübler, A. Schirbel, M. Essler, R. A. Bundschuh, R. A. Werner **49(9)** (2022) *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 3269–3276.
145. S. Todde, P. Kolenc Peitl, P. Elsinga, J. Kozirowski, V. Ferrari. E. M. Ocak, O. Hjelstuen, M. Patt, T. L. Mindt, M. Behe, *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2** (2017), 1–29.

146. D. D. Borade, A. Jha, S. Mithun, R. YadhavJha, U. Jha, B. Valve, G. Meena, *Indian J. Nucl. Med.* **34** (2019) 109.
147. I. E. Wang, A. F. Brooks, P. J. Scott, B. L. Viglianti, *J. Nucl. Med.* **66** (2025) 824.
148. R. P. Klok, A. D. Windhorst, *Nucl. Med. Biol.* **33(7)** (2006) 935–938.
149. S. Watanabe, K. Hashimoto, S. Watanabe, Y. Iida, H. Hanaoka, K. Endo, N. Ishioka, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **303(1)** (2015) 935–940.
150. A. Larenkov, I. Mitrofanov, E. Pavlenko, M. Rakhimov, *Molecules.* **28(4)** (2023) 1884.
151. A. Larenkov, I. Mitrofanov, M. Rakhimov, *Pharmaceutics* **16** (2024) 1535.
152. European Medicines Agency (2026) *Pluvicto (lutetium (¹⁷⁷Lu) vipivotide tetraxetan): EPAR – Medicine overview*. Amsterdam: European Medicines Agency.
153. V. C. Adya, A. Sengupta, S. Chakraborty, K. Vimalnath, S. K. Thulasidas, *J. ISAS* **1(2)** (2022) 58–67.
154. R. H. Wallimann, H. Hensinger, R. Kneuer, C. Schibli, R. Müller, R. Schibli, R. Kneuer, P. Schindler, *Pharmaceutics* **16(3)** (2024) 299.
155. K. D. Klika, J. Han, M. S. Busse, V. A. Soloshonok, R. Javahershenas, F. Vanhaecke, A. Makarem, A. *J. Am. Chem. Soc.* **146(45)** (2024) 30717–30727.
156. F. E. Lichte, A. L. Meier, J. G. Crock, *Anal. Chem.* **59(8)** (1987) 1150–1157.
157. R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray, C. E. Taylor, *Anal. Chem* **52(14)** (1980) 2283–2289.
158. A. Dash, M. R. A. Pillai, F. F. Knapp Jr. *Nucl. Med. Mol. Imaging* **49(2)** (2015) 85–107.

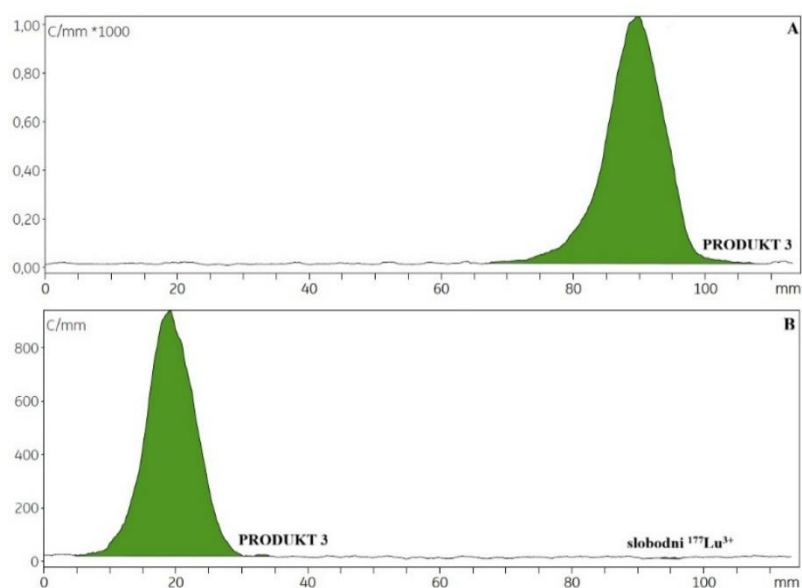
§ 8. DODATAK



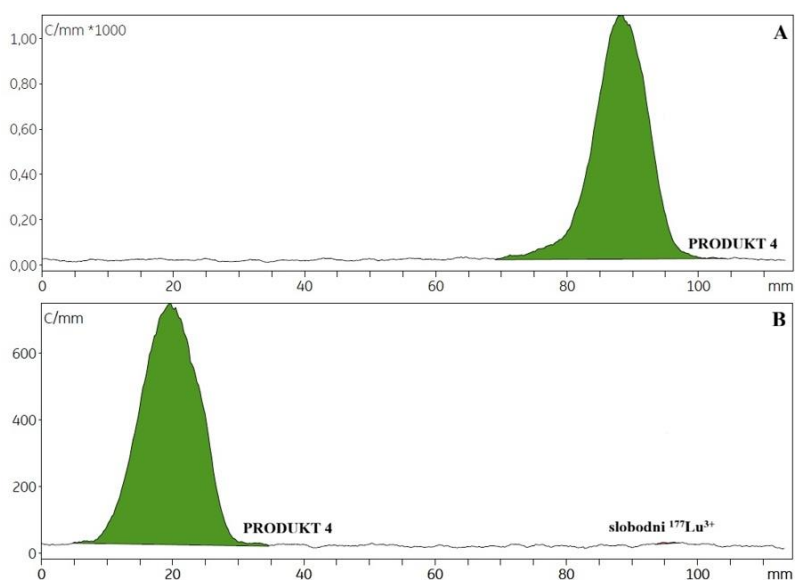
Slika D1. HPLC radiokromatogram otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ (I i II) ($R_t = 2,4$ min)



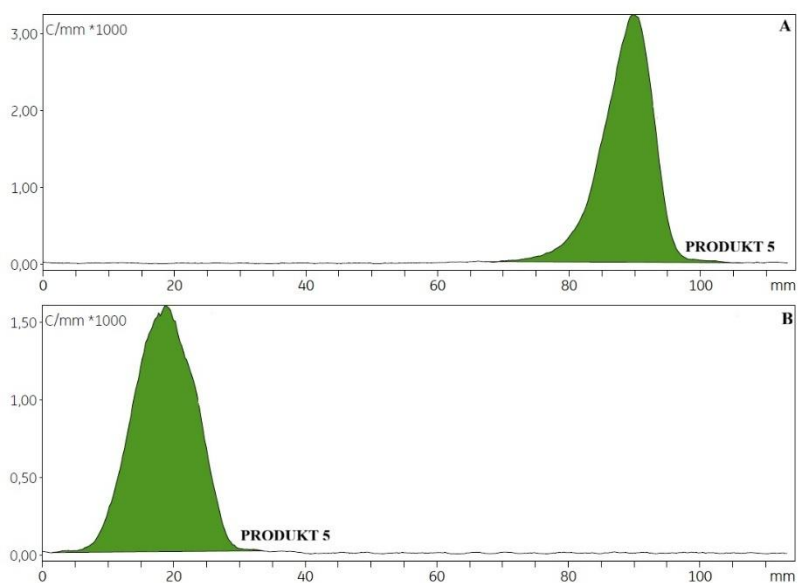
Slika D2. TLC radiokromatogrami internog produkta 1 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se nekompleksirani $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)



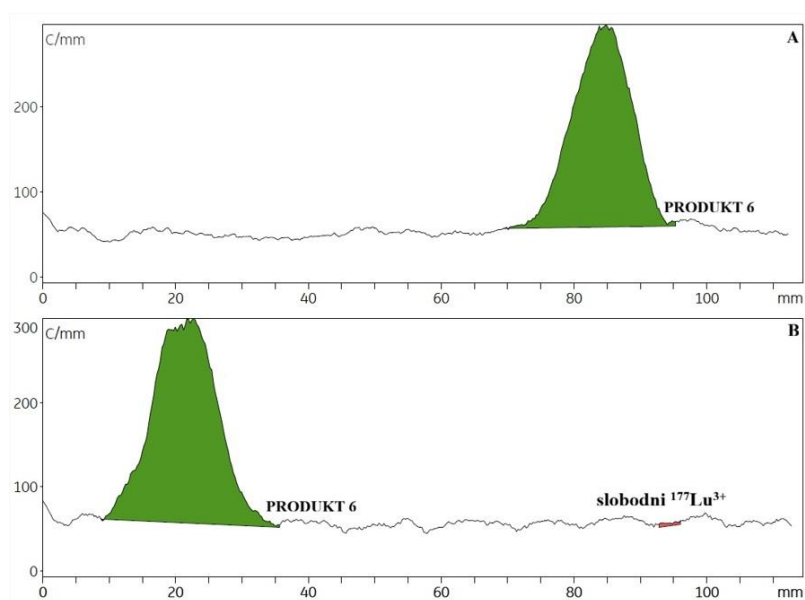
Slika D3. TLC radiokromatogrammi internog produkta 3 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se nekompleksirani $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)



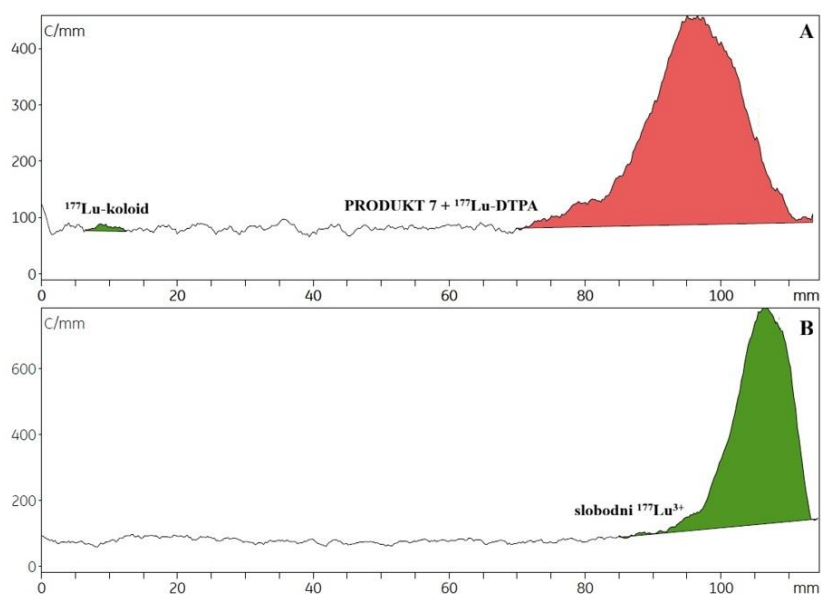
Slika D4. TLC radiokromatogrammi internog produkta 4 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se nekompleksirani $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)



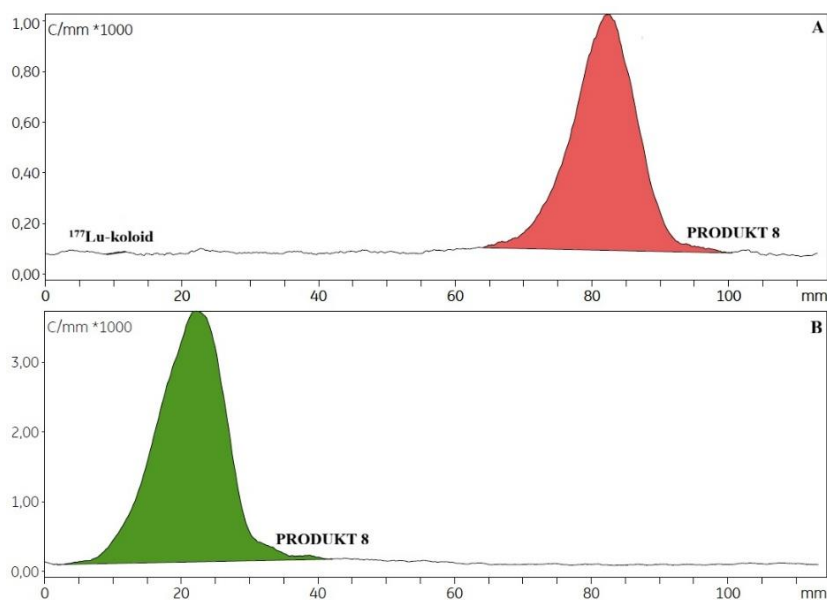
Slika D5. TLC radiokromatogrami internog produkta 5 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se nekompleksirani $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)



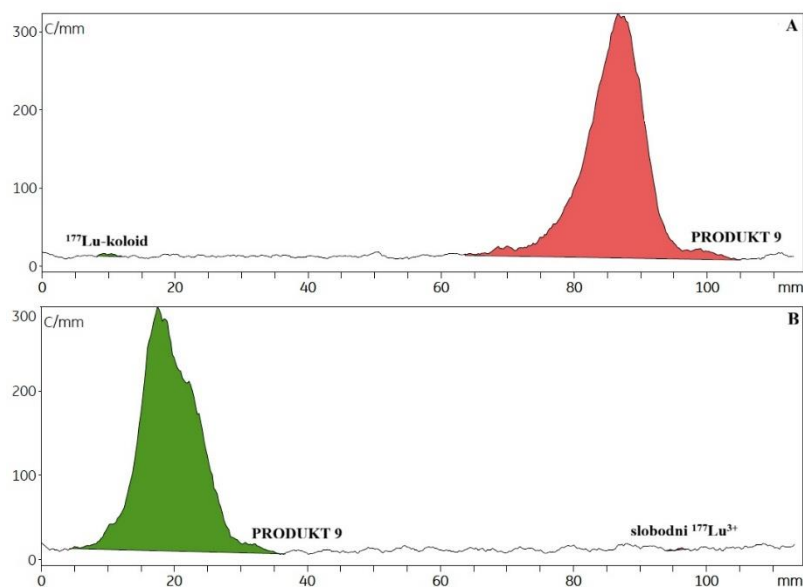
Slika D6. TLC radiokromatogrami internog produkta 6 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se nekompleksirani $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)



Slika D7. TLC radiokromatogrami internog produkta 7 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se nekompleksirani $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)



Slika D8. TLC radiokromatogrami internog produkta 8 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se nekompleksirani $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)

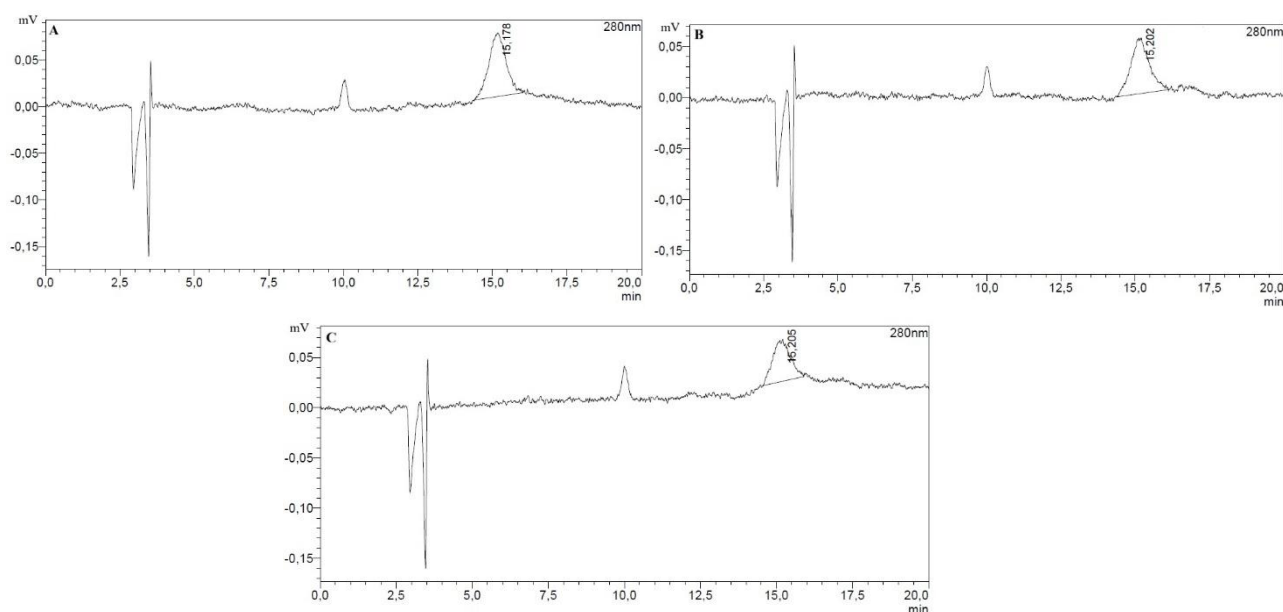
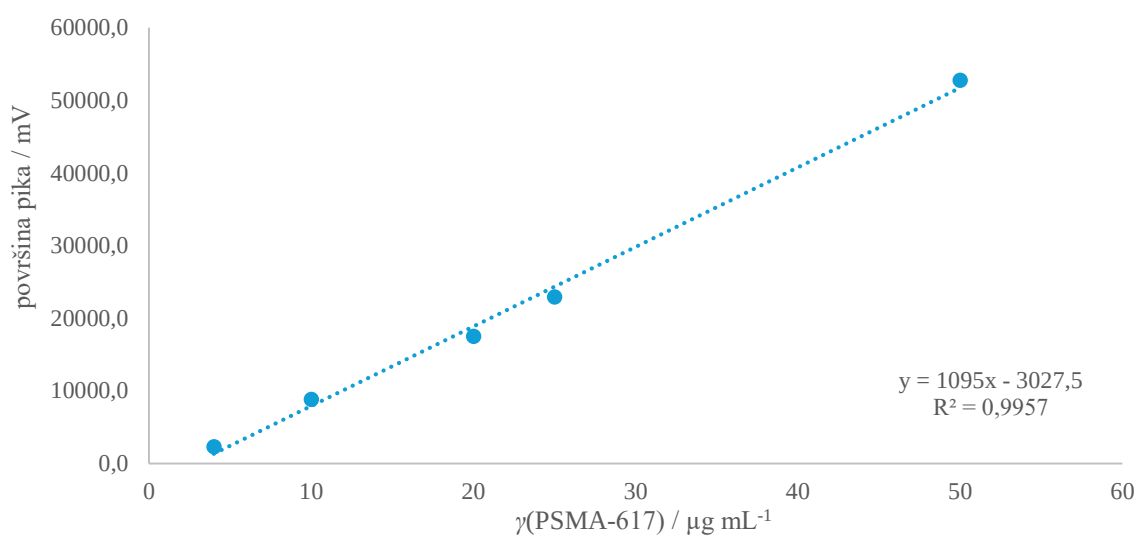


Slika D9. TLC radiokromatogrami internog produkta 9 koji pokazuju da je ^{177}Lu -koloid ostao na mjestu nanošenja uzorka (A), dok se nekompleksirani $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pomaknuo prema fronti otapala (B)

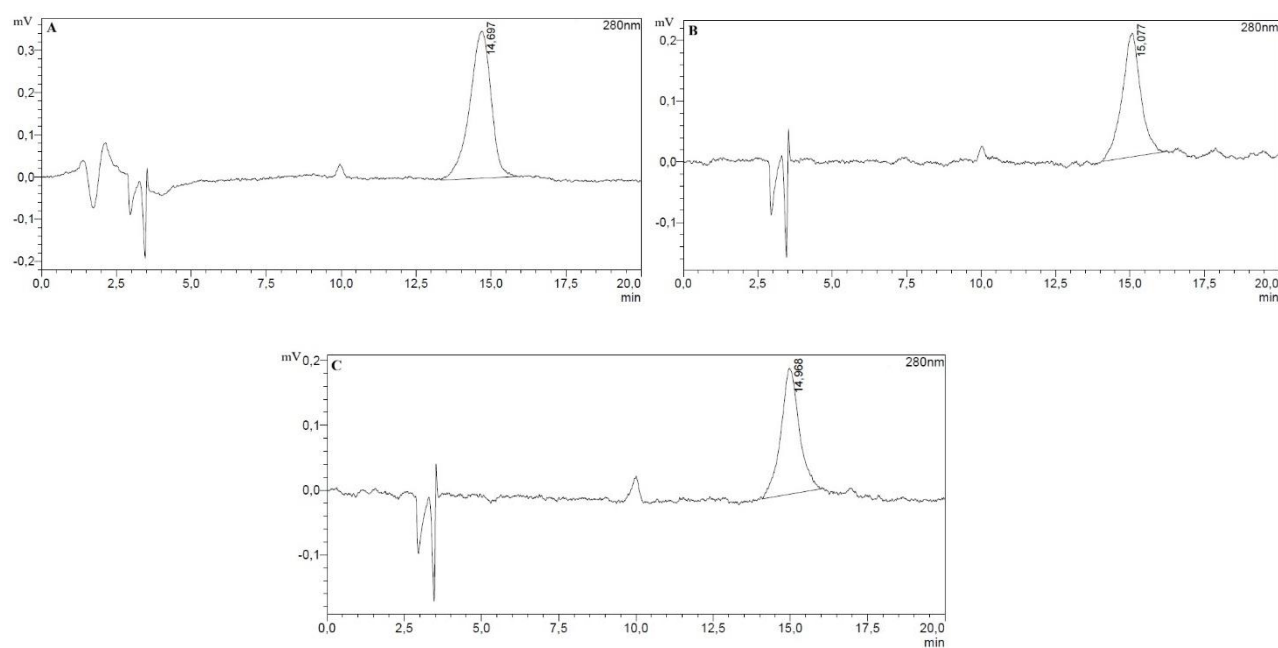
Tablica D1. Kalibracijski podaci za određivanje količine peptida PSMA-617 u internim produktima i referentnom produktu metodom HPLC

$\gamma(\text{PSMA-617})$ [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	površina pika [mV]	R_t [min]
4	1677	15,21
	2362	15,20
	2748	15,72
10	8107	14,97
	8895	15,08
	9377	15,06
20	18249	14,75
	16978	14,74
	17295	14,70
25	23350	14,47
	23553	14,48
	21855	14,60
50	51849	14,47
	52528	14,56
	53832	14,50

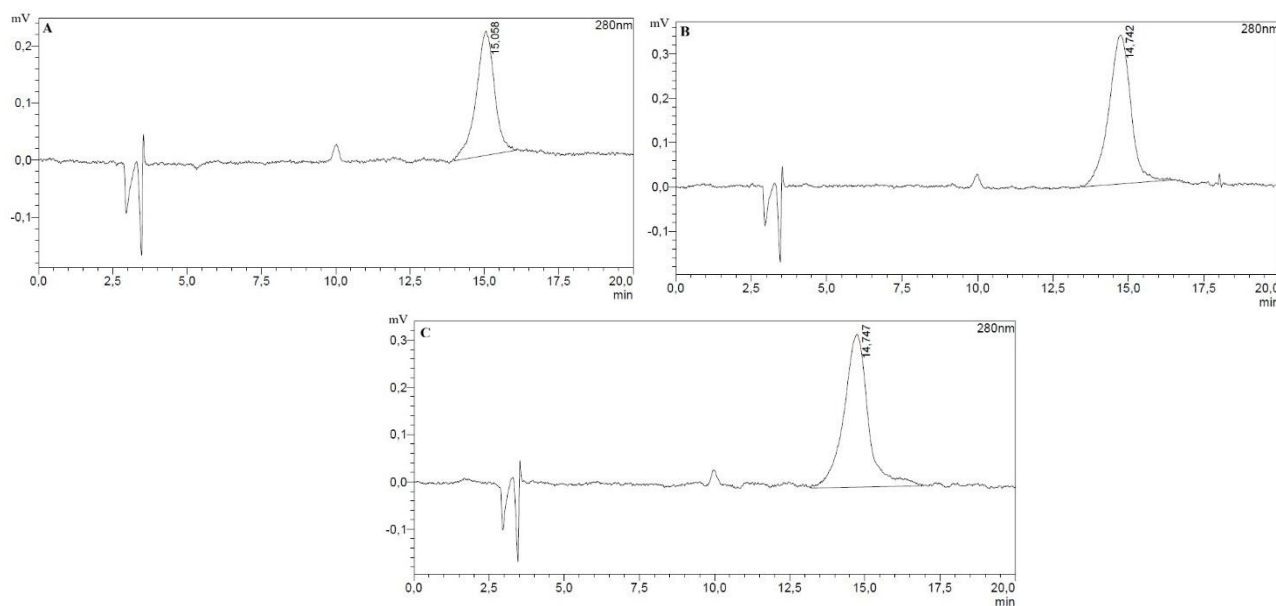
Slika D10. Kalibracijska krivulja peptida PSMA-617



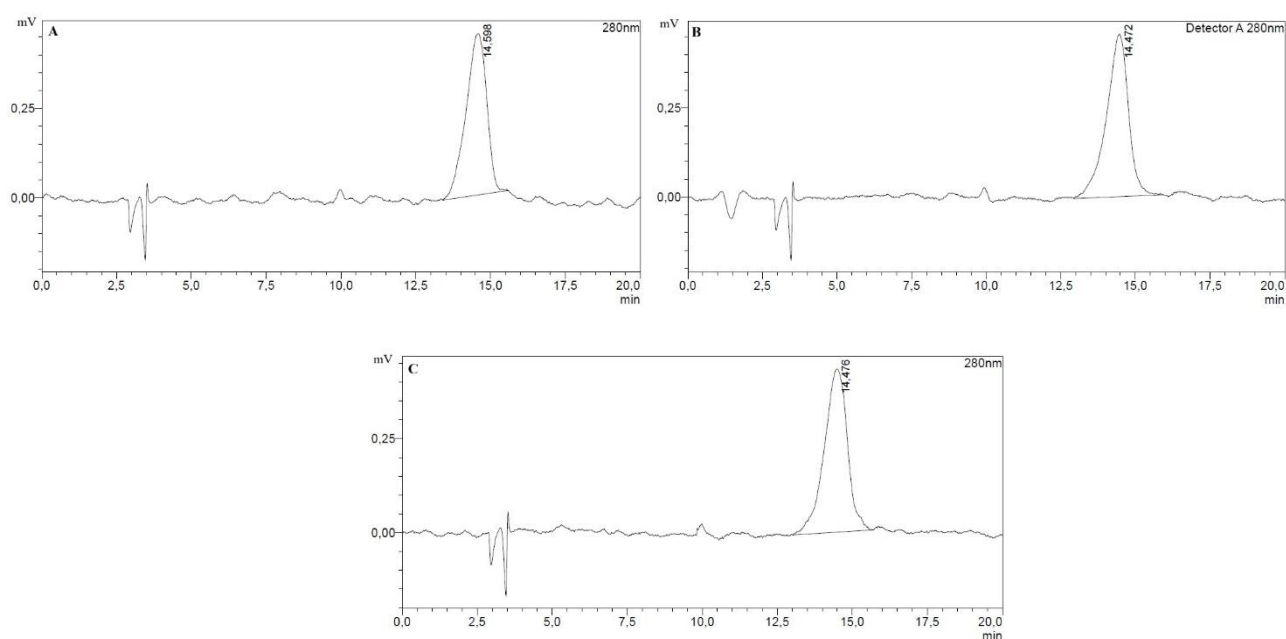
Slika D11. UV kromatogrami peptida PSMA-617 ($\gamma = 4 \mu\text{g mL}^{-1}$): A – prvo injektiranje;
B – drugo injektiranje; C – treće injektiranje



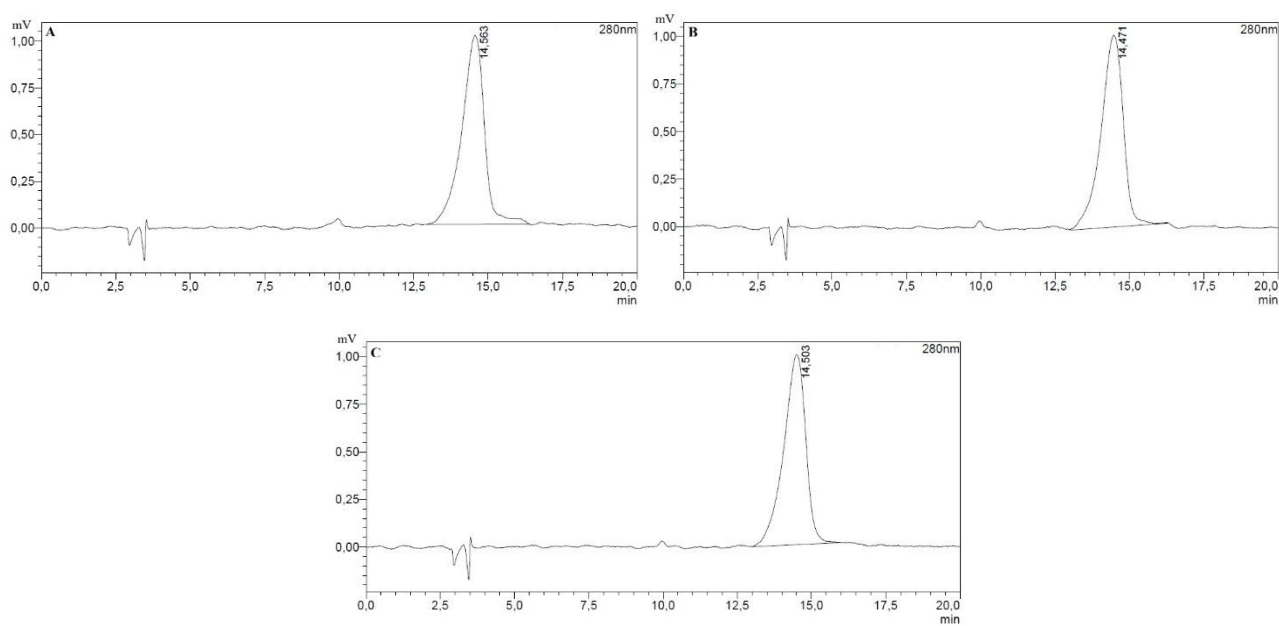
Slika D12. UV kromatogrami peptida PSMA-617 ($\gamma = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$): A – prvo; B – drugo injektiranje; C – treće injektiranje



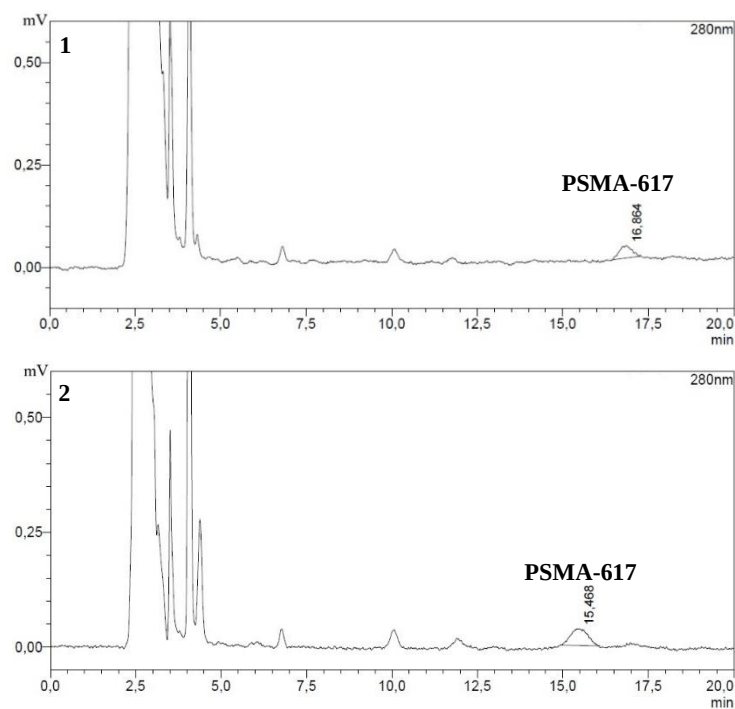
Slika D13. UV kromatogrami peptida PSMA-617 ($\gamma = 20 \mu\text{g mL}^{-1}$): A – prvo injektiranje; B – drugo injektiranje; C – treće injektiranje



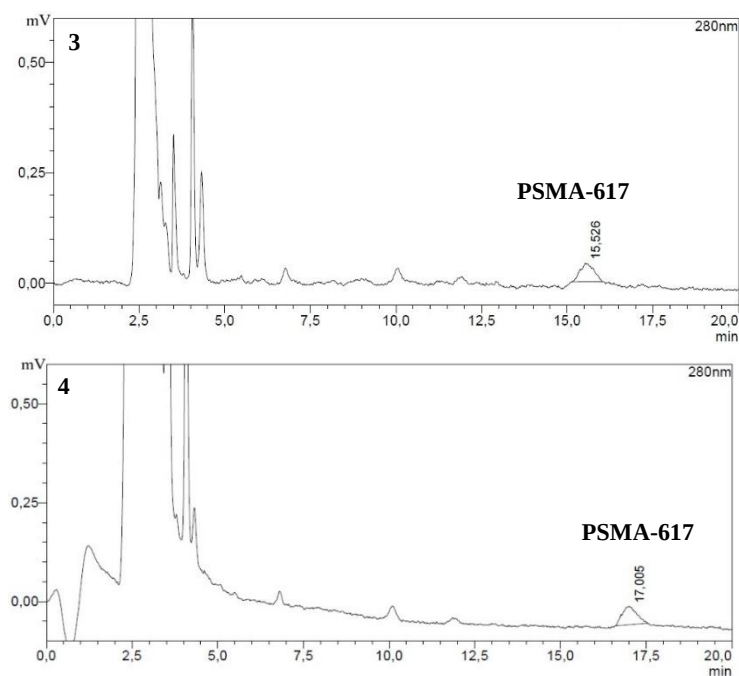
Slika D14. UV kromatogrami peptida PSMA-617 ($\gamma = 25 \mu\text{g mL}^{-1}$): A – prvo injektiranje; B – drugo injektiranje; C – treće injektiranje



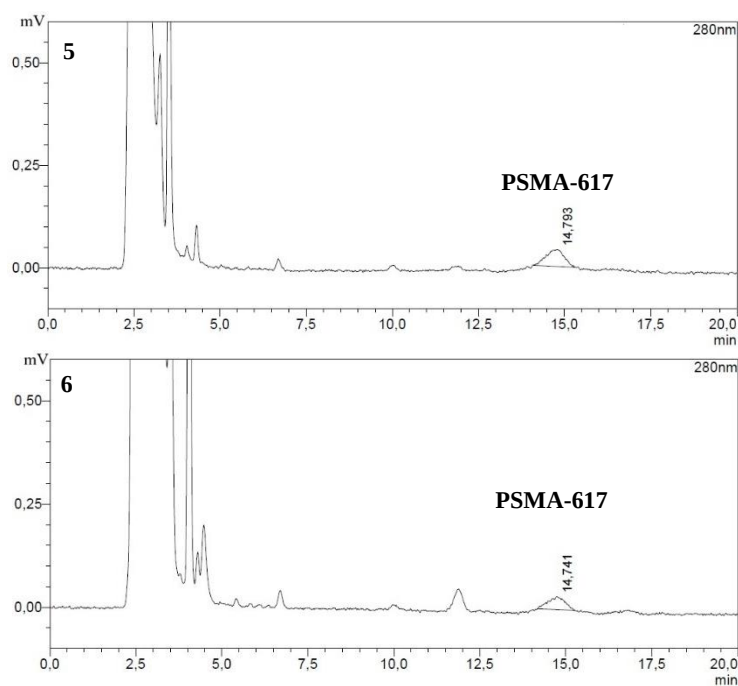
Slika D15. UV kromatogrami peptida PSMA-617 ($\gamma = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$): A – prvo injektiranje; B – drugo injektiranje; C – treće injektiranje



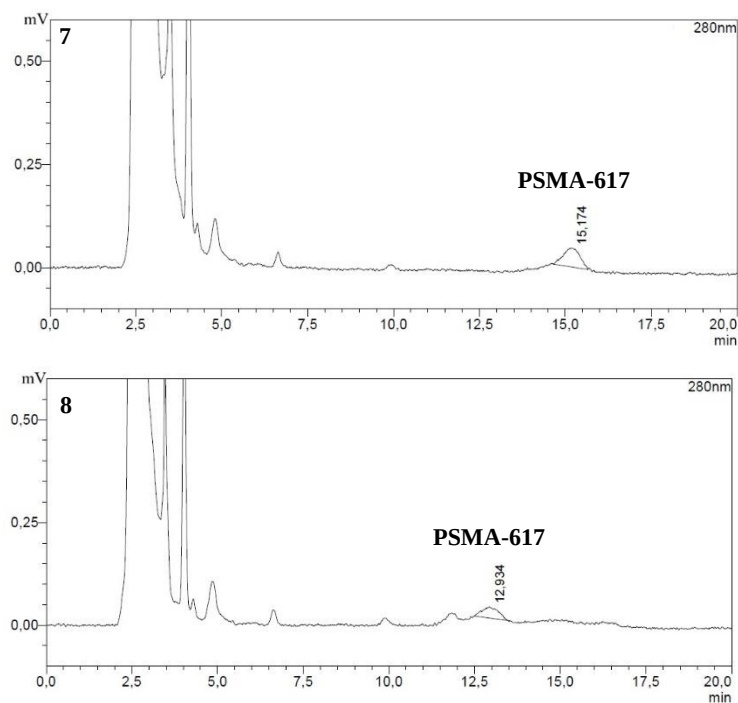
Slika D16. UV kromatogrami internih produkata 1 i 2 s integriranim pikom peptida
PSMA-617



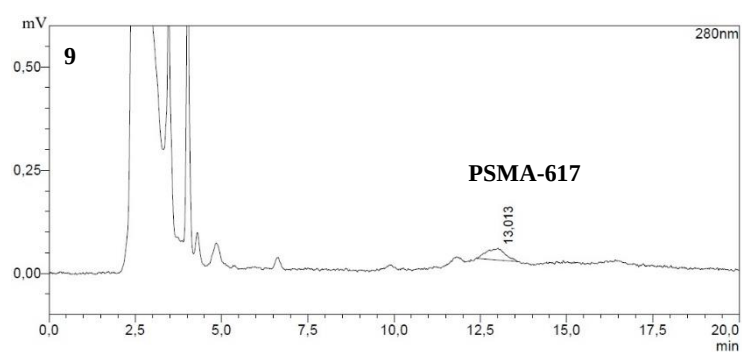
Slika D17. UV kromatogrami internih produkata 3 i 4 s integriranim pikom peptida
PSMA-617



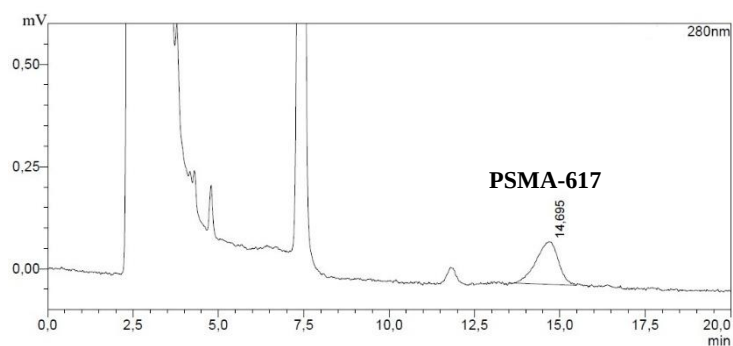
Slika D18. UV kromatogrami internih produkata 5 i 6 s integriranim pikom peptida PSMA-617



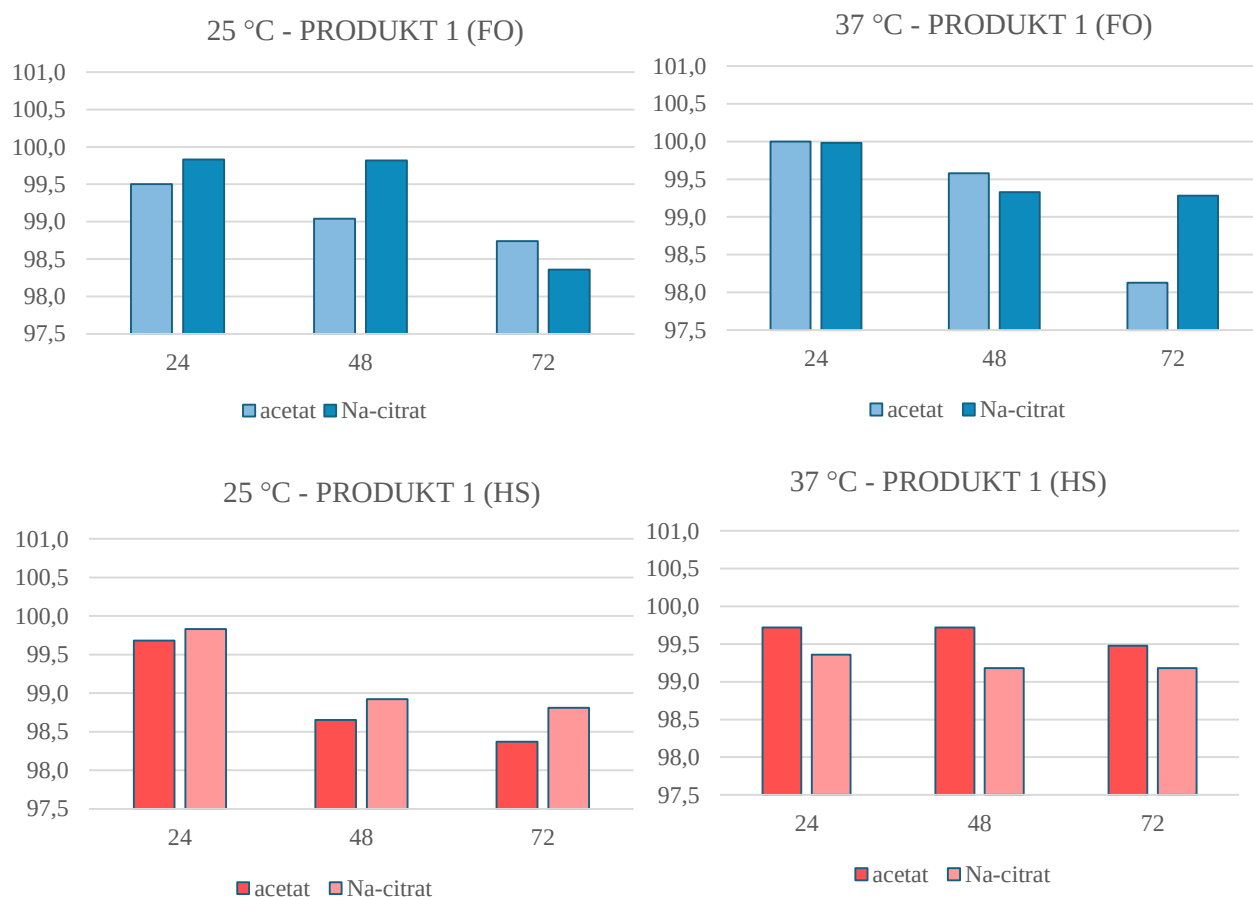
Slika D19. UV kromatogrami internih produkata 7 i 8 s integriranim pikom peptida PSMA-617



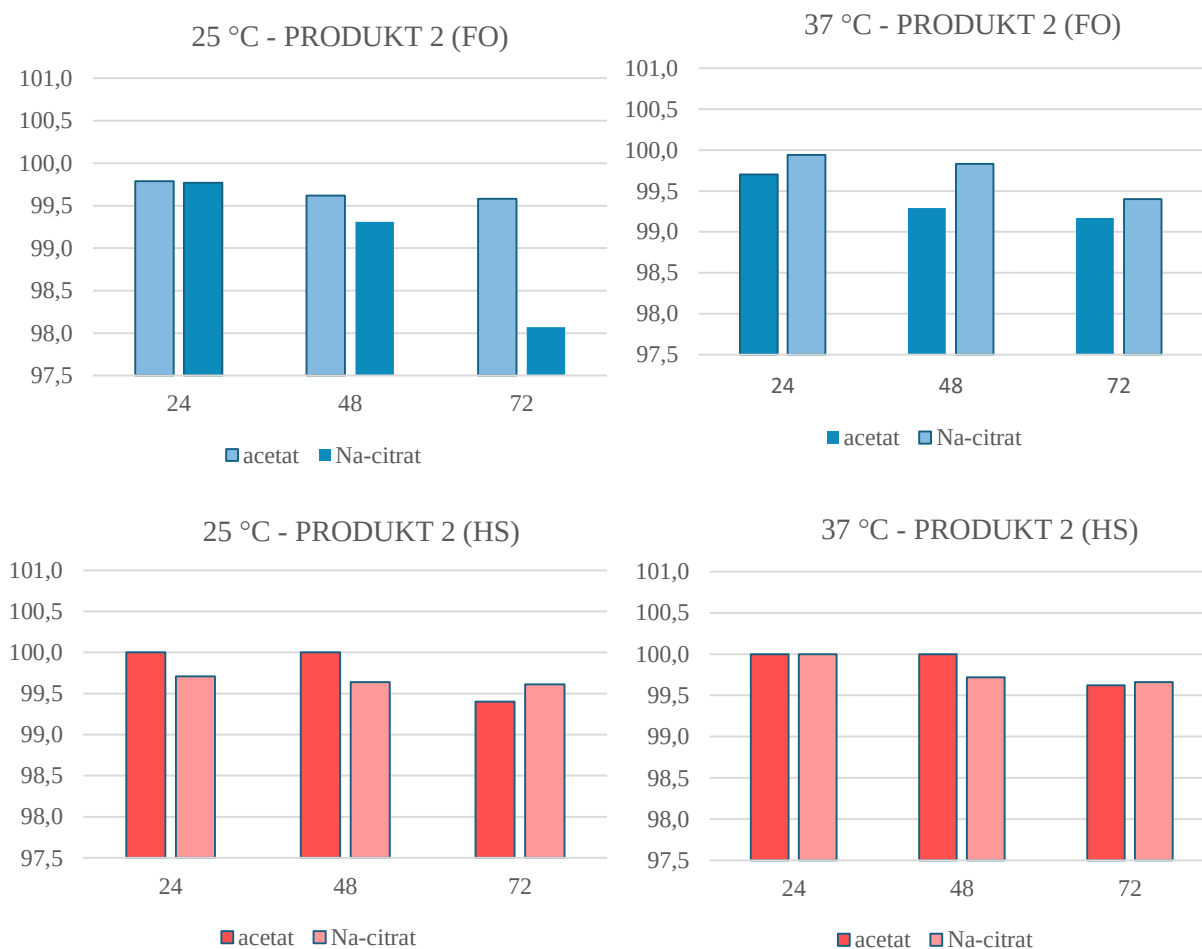
Slika D20. UV kromatogram internog produkata 9 s integriranim pikom peptida PSMA-617



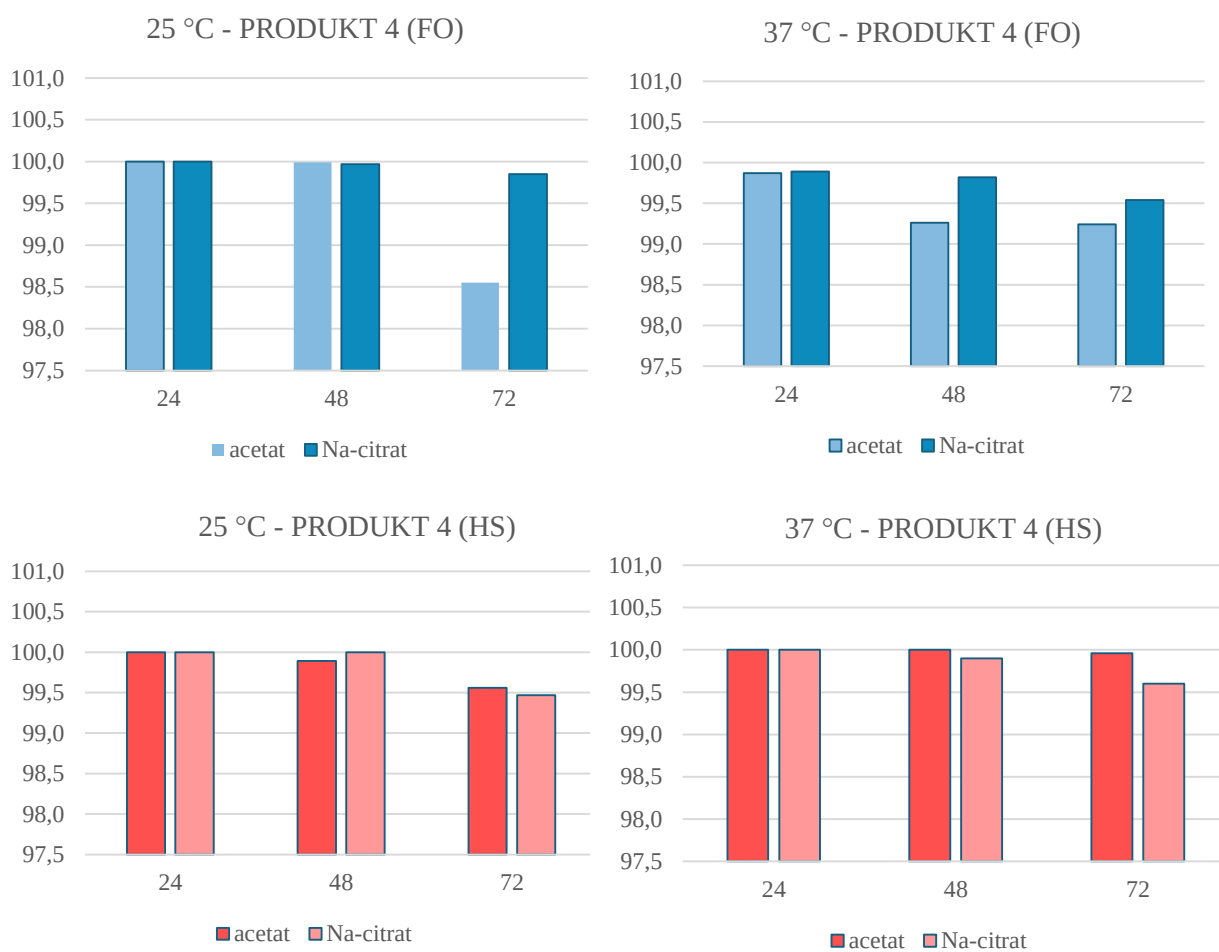
Slika D21. UV kromatogram referentnog produkta Pluvicto® s integriranim pikom peptida PSMA-617



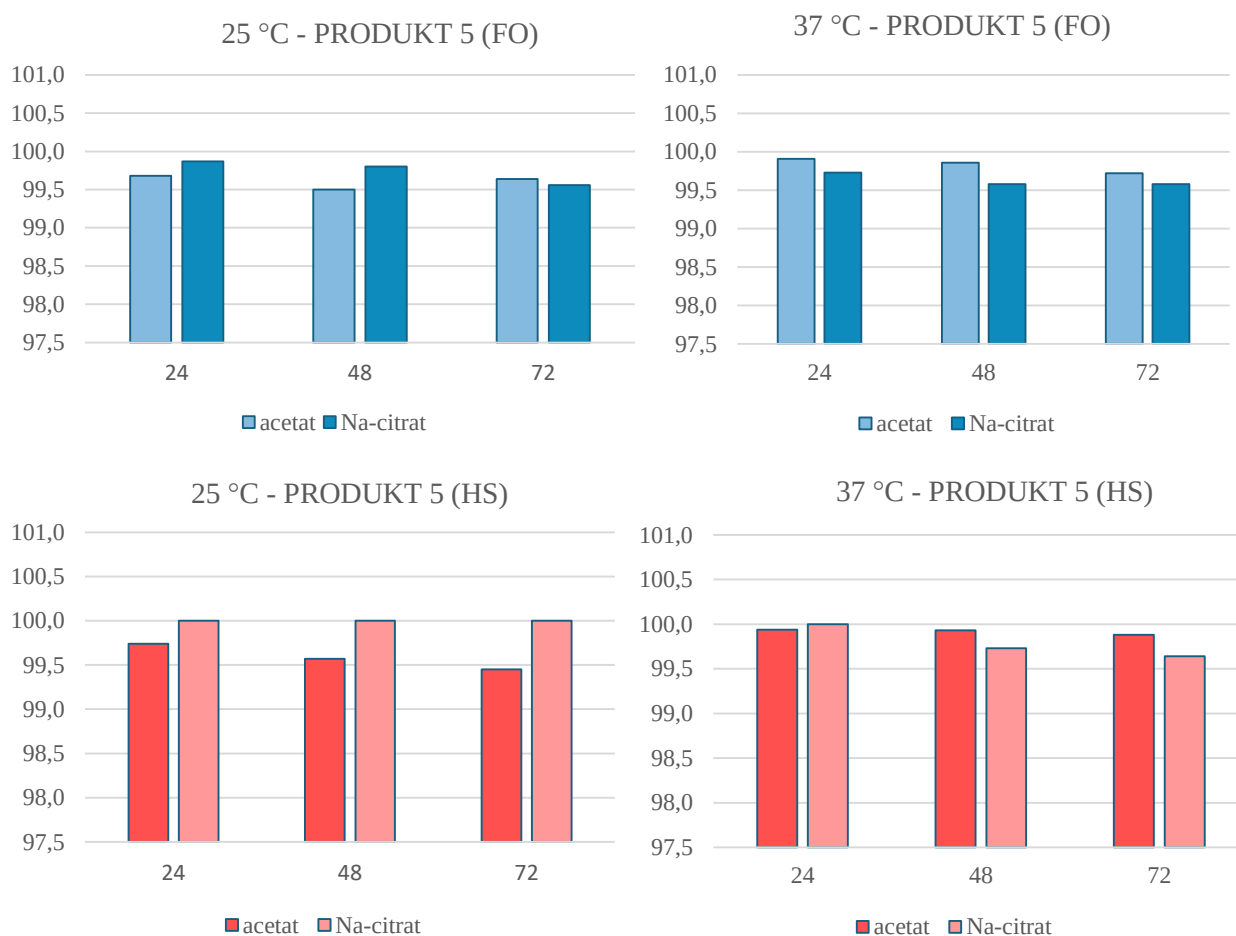
Slika D22. Stabilitet *in vitro* internog produkta 1 u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu (HS) pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije



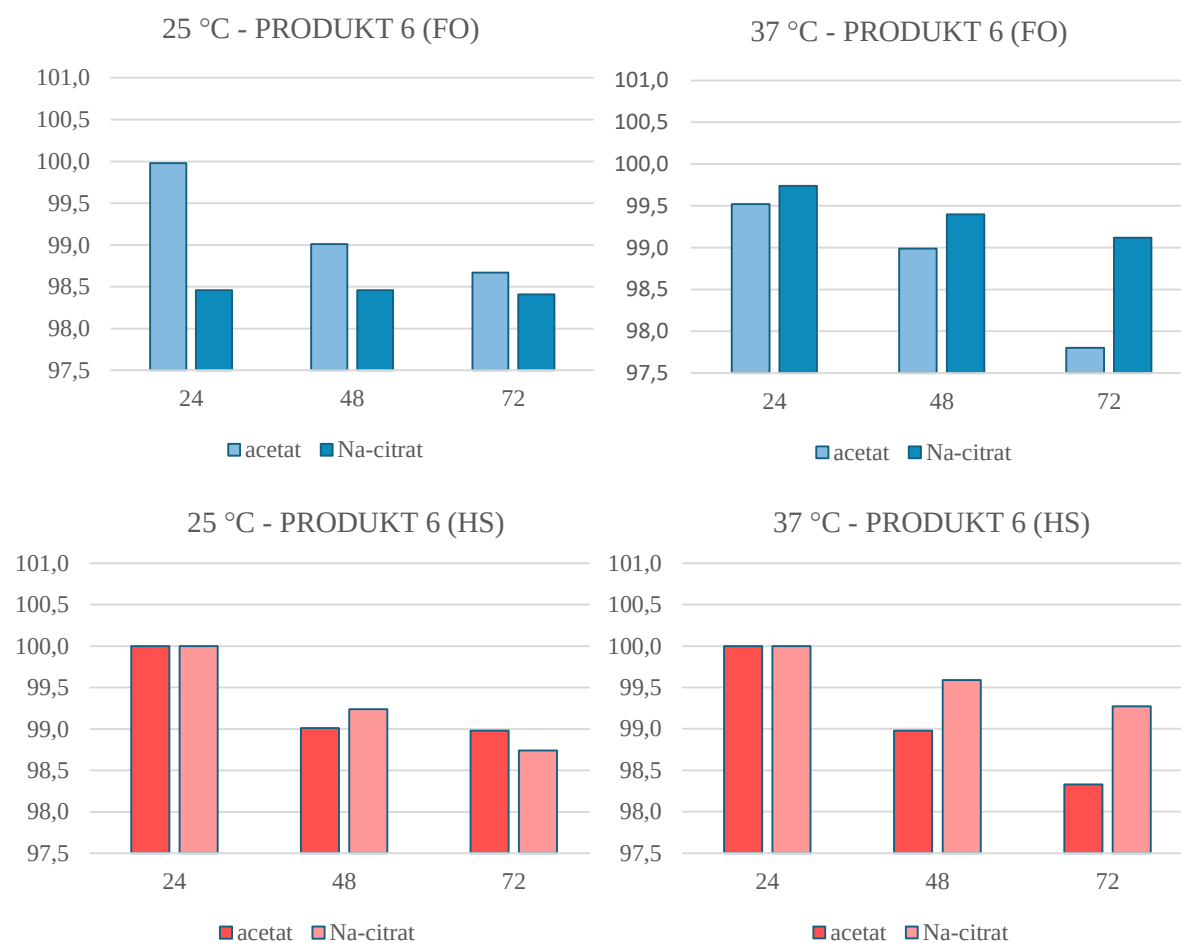
Slika D23. Stabilnost *in vitro* internog produkta 2 u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu (HS) pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije



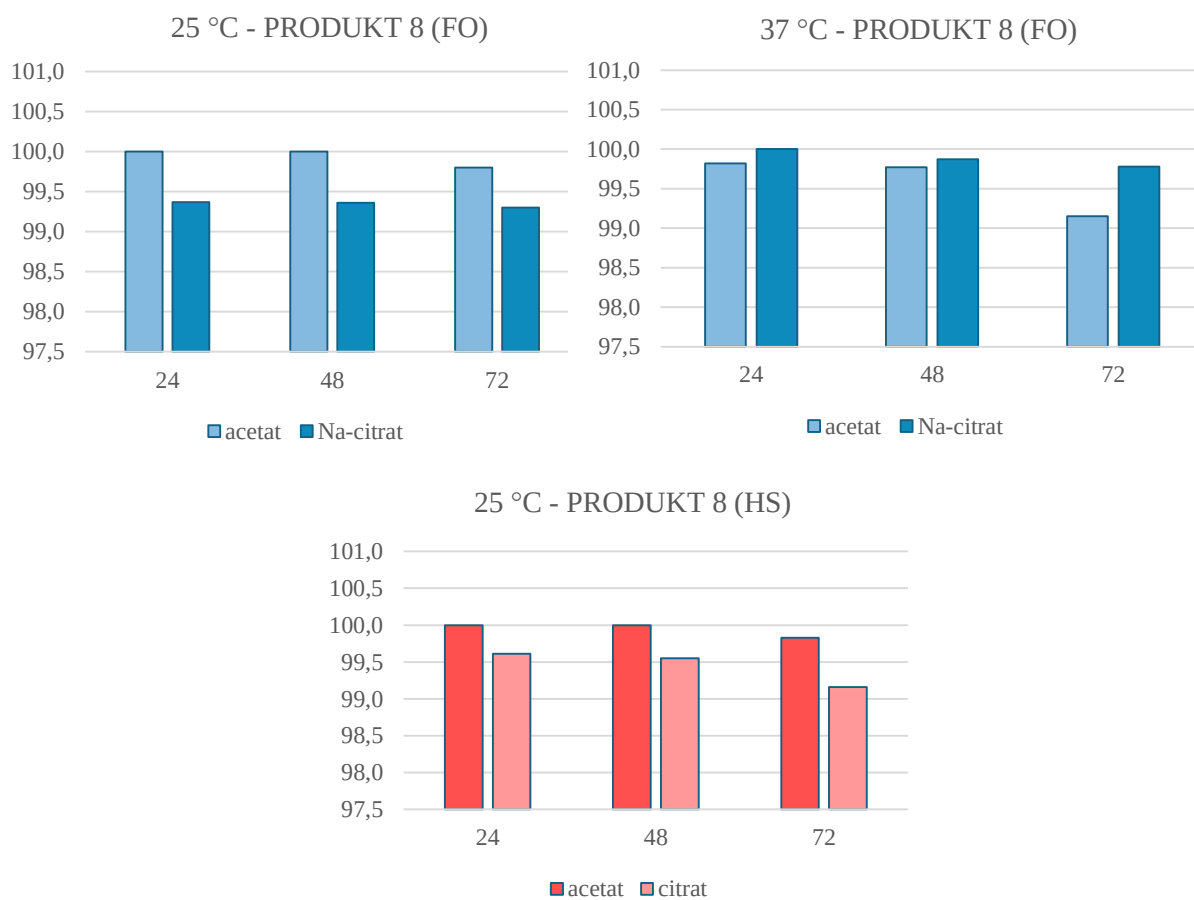
Slika D24. Stabilnost *in vitro* internog produkta 4 u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu (HS) pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije



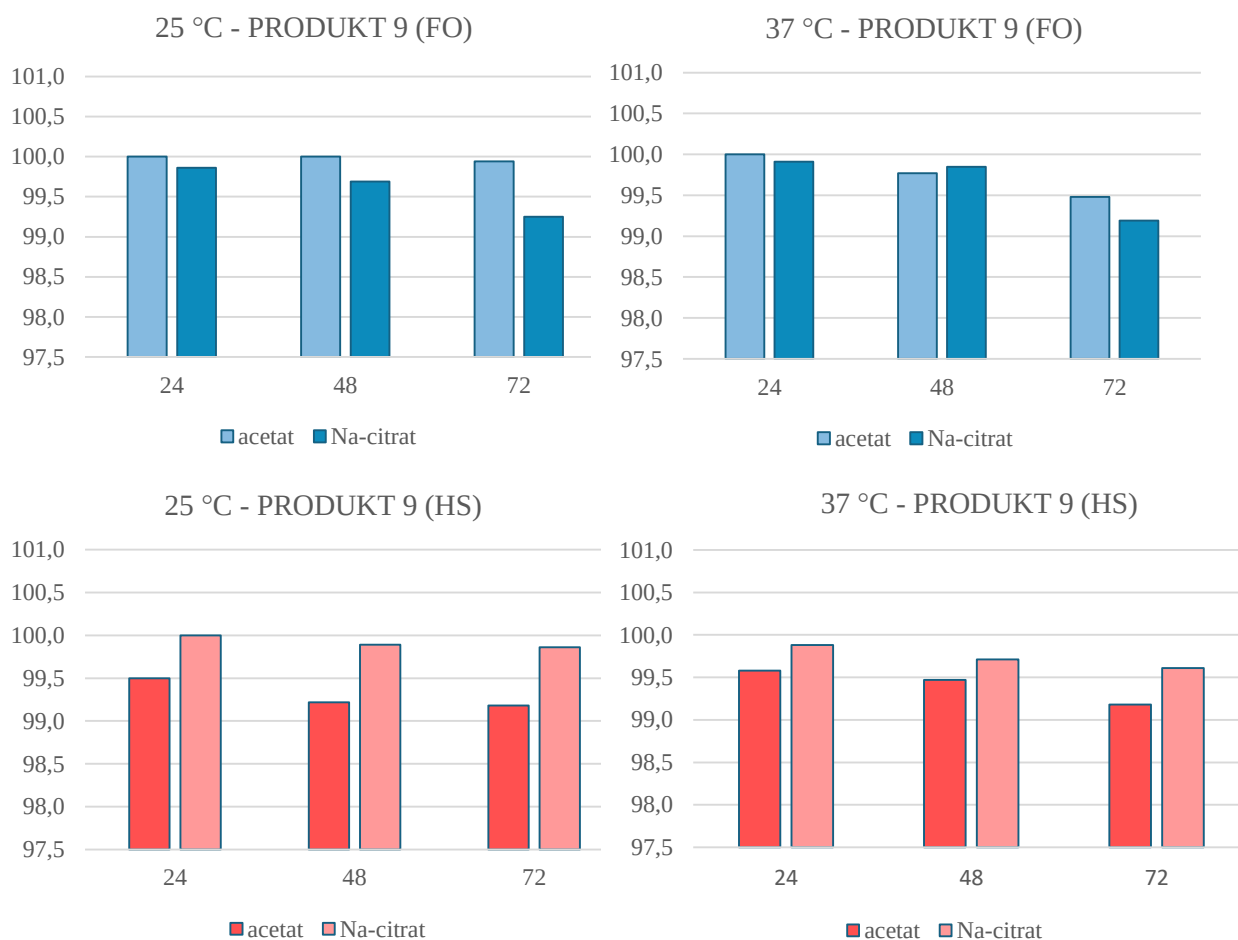
Slika D25. Stabilnost *in vitro* internog produkta 5 u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu (HS) pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije



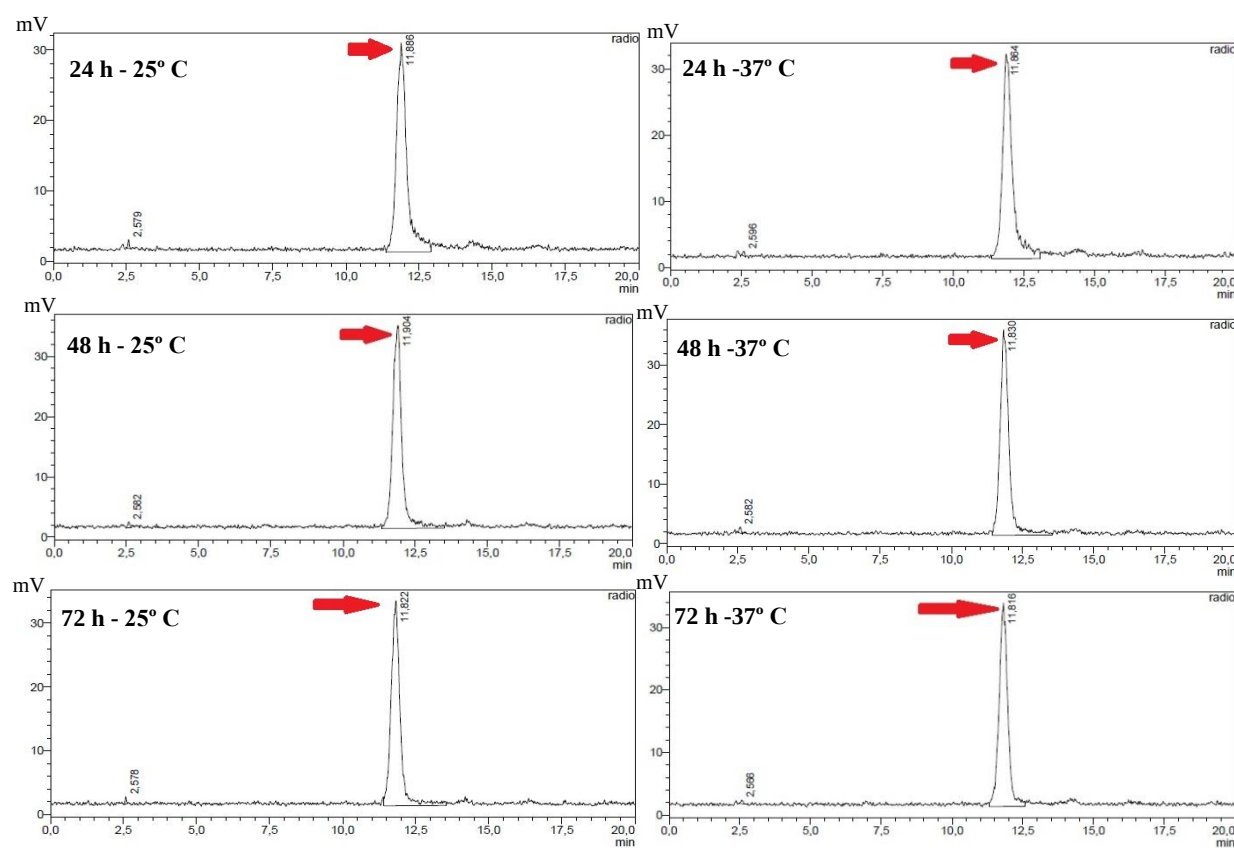
Slika D26. Stabilnost *in vitro* internog produkta 6 u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu (HS) pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije



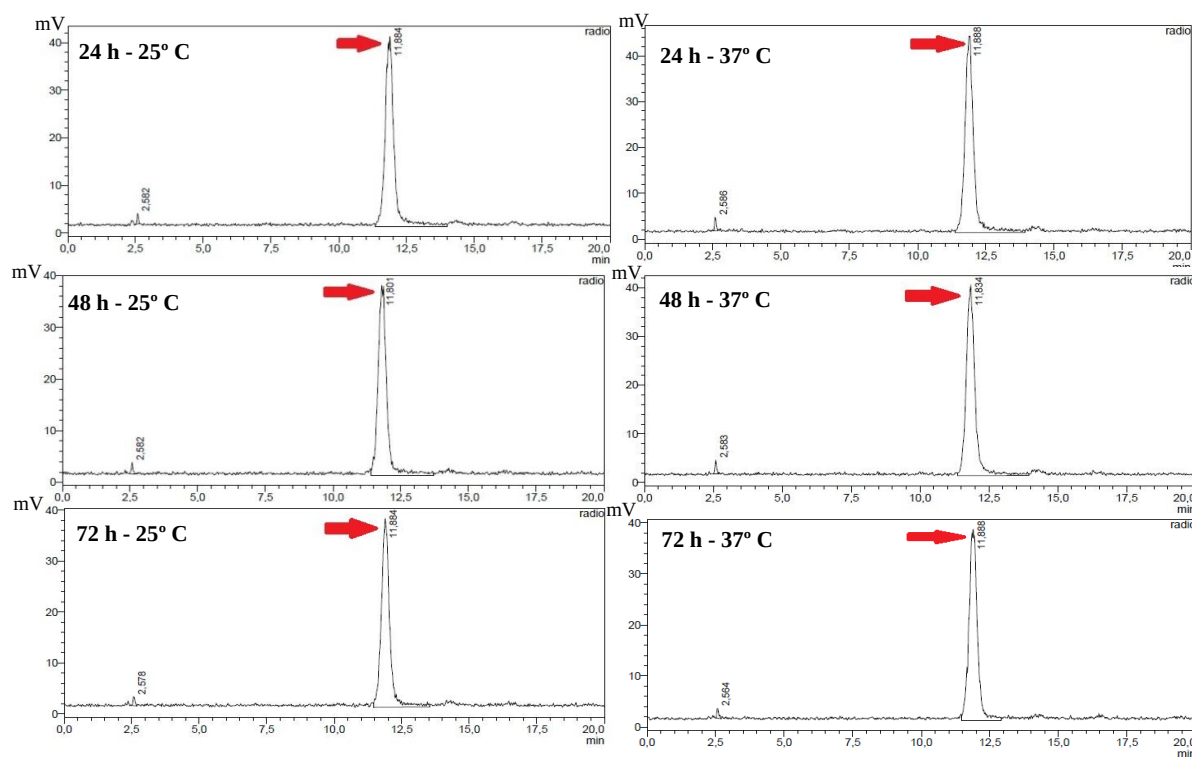
Slika D27. Stabilnost *in vitro* internog produkta 8 u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu (HS) pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije



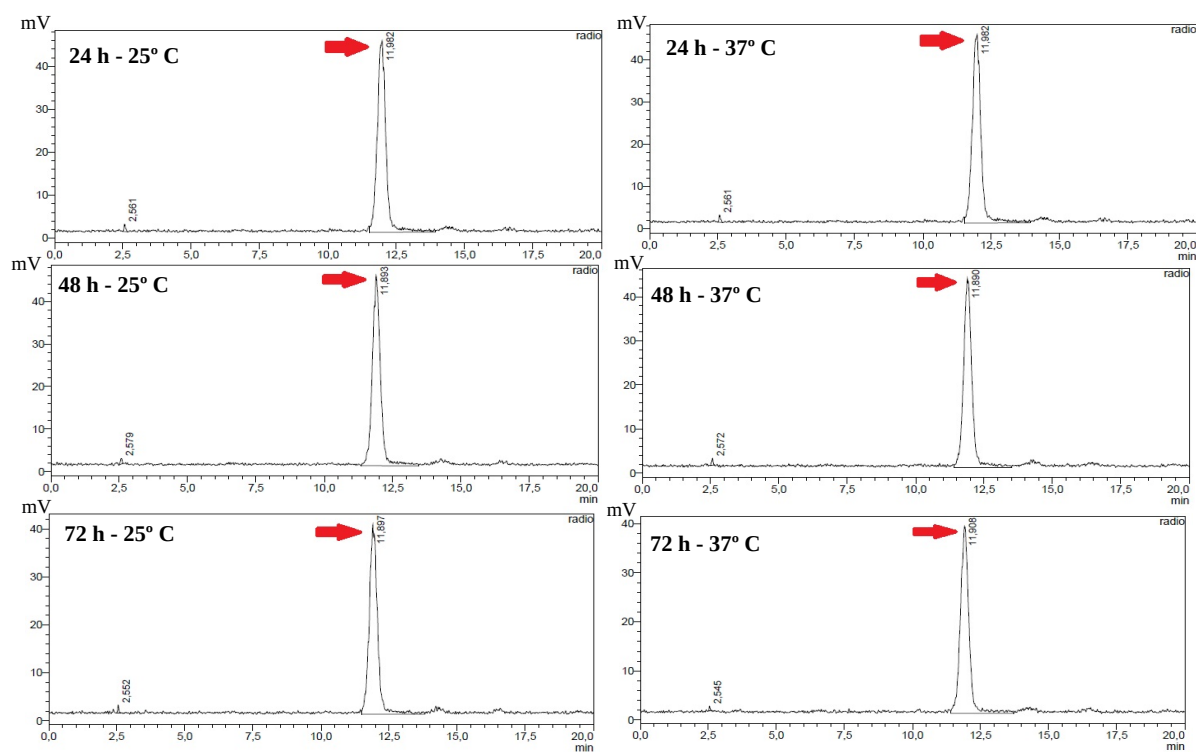
Slika D28. Stabilnost *in vitro* internog produkta 9 u fiziološkoj otopini (FO) i humanom serumu (HS) pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije



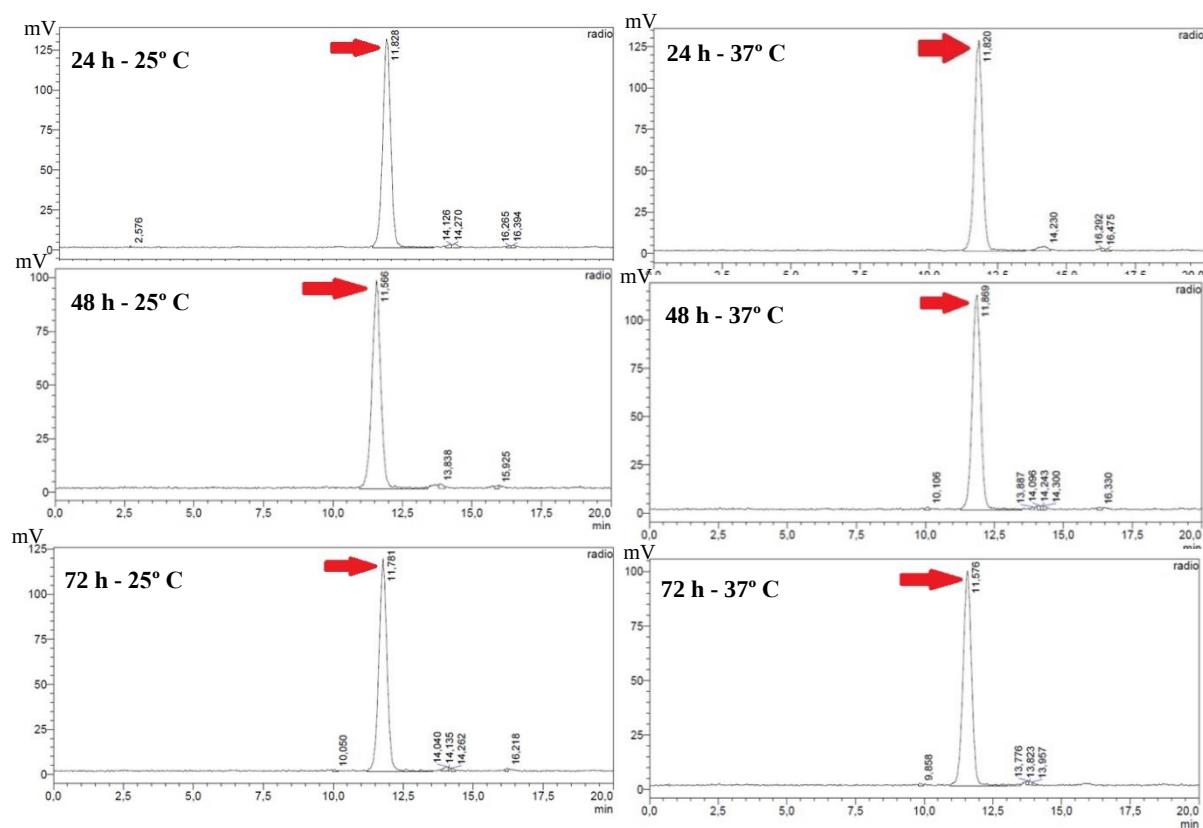
Slika D29. HPLC radiokromatogrammi internog produkta 1 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



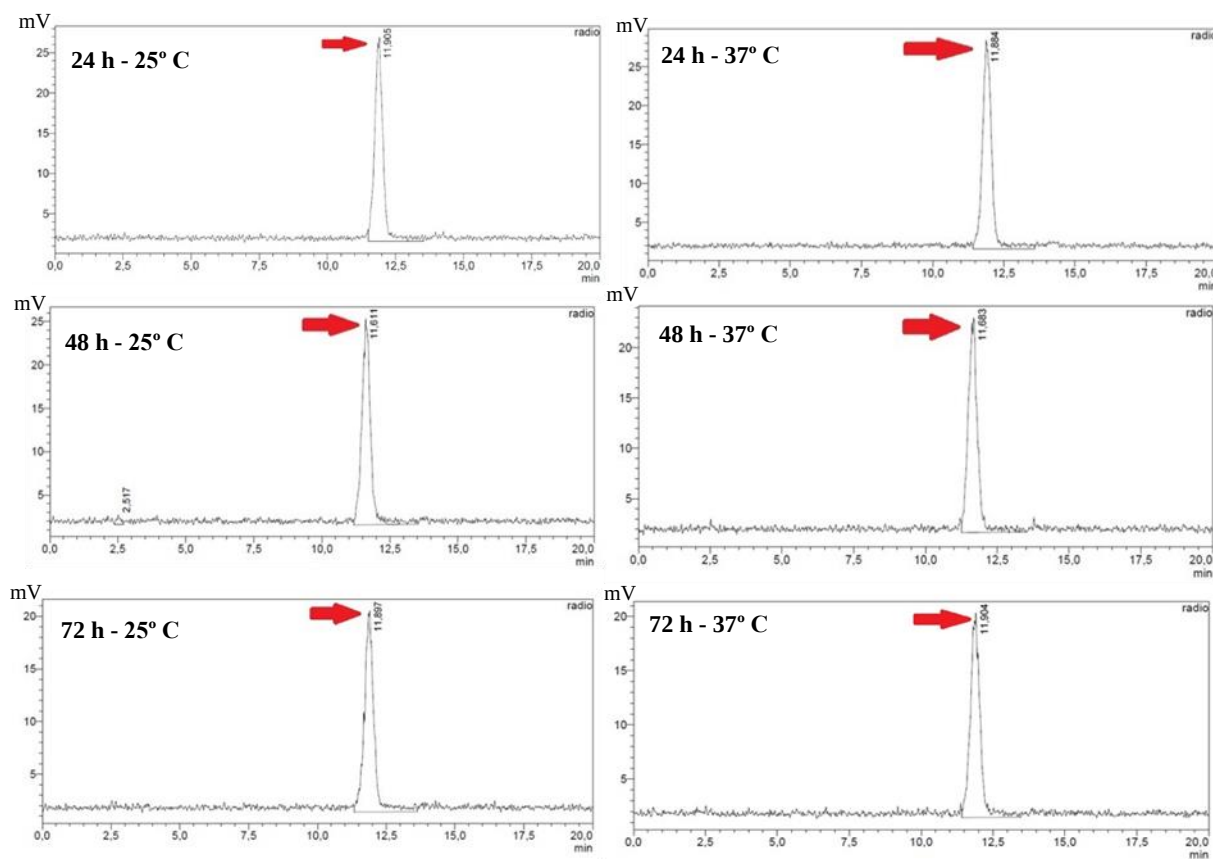
Slika D30. HPLC radiokromatogrami internog produkta 2 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



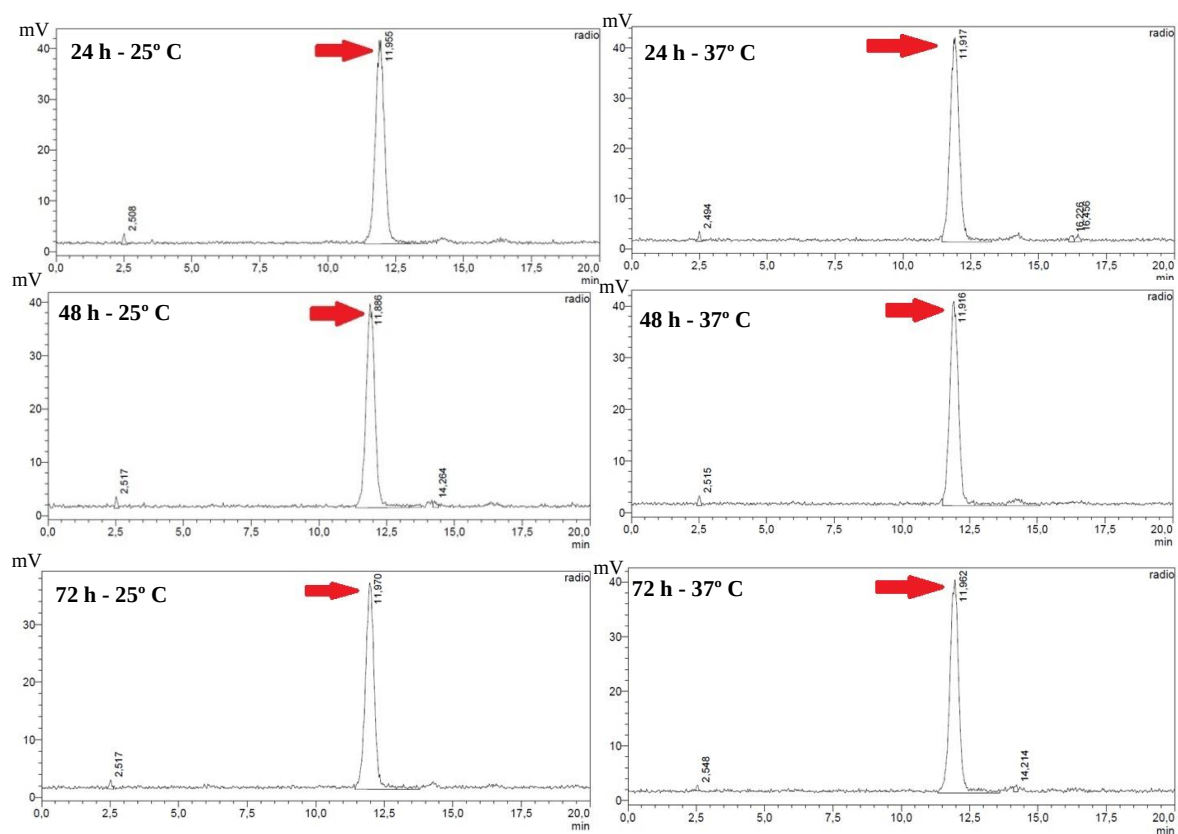
Slika D31. HPLC radiokromatogrami internog produkta 4 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



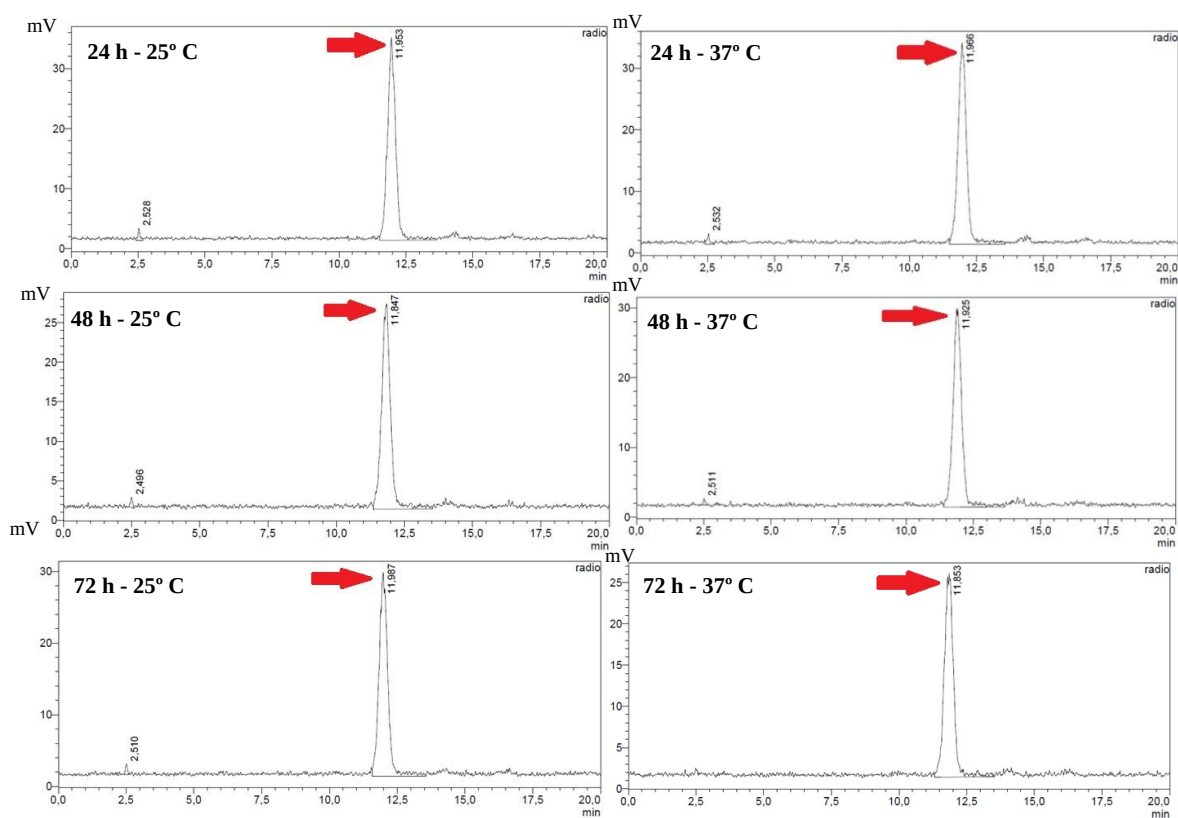
Slika D32. HPLC radiokromatogrammi internog produkta 5 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



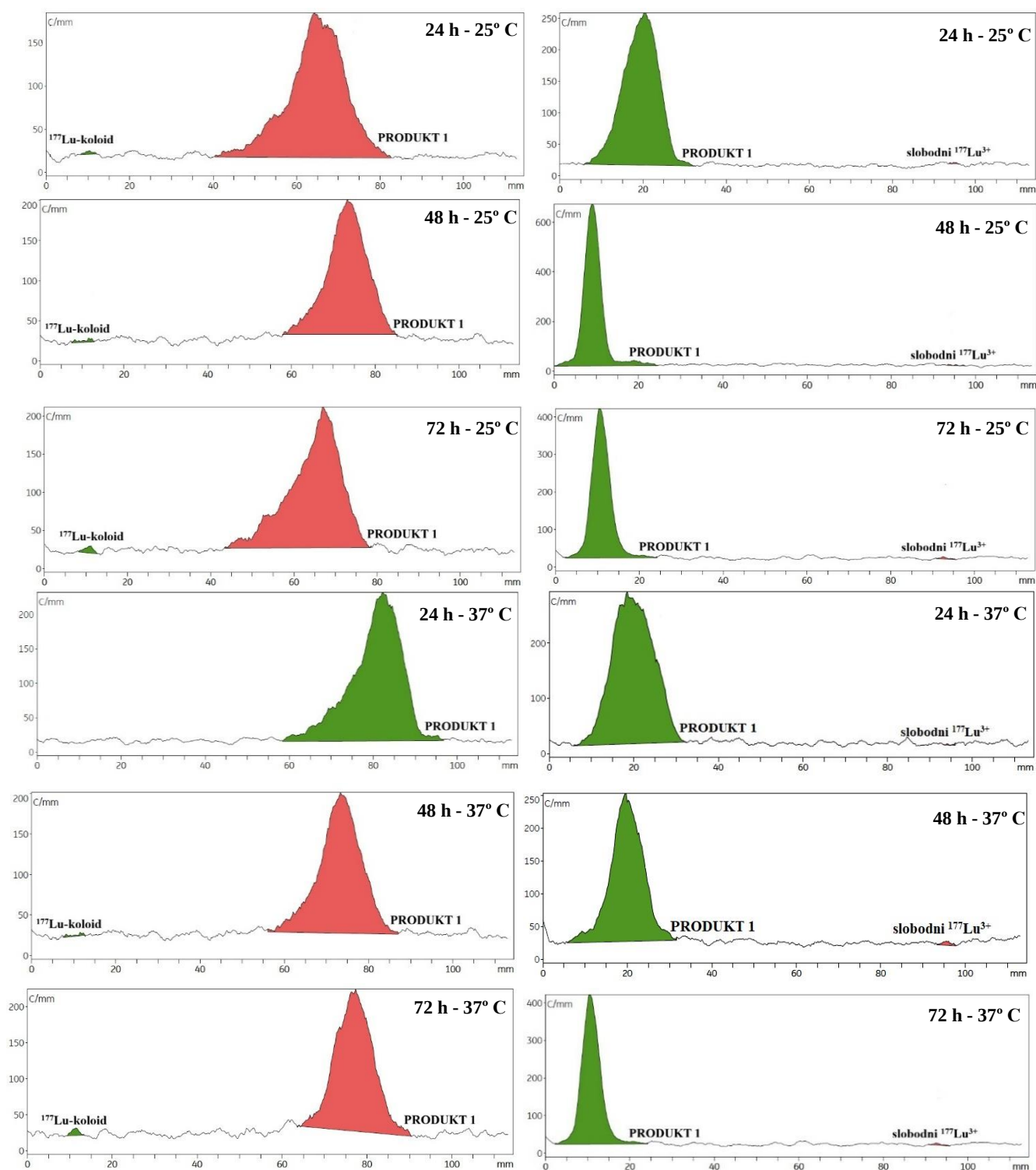
Slika D33. HPLC radiokromatogrammi internog produkta 6 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 h



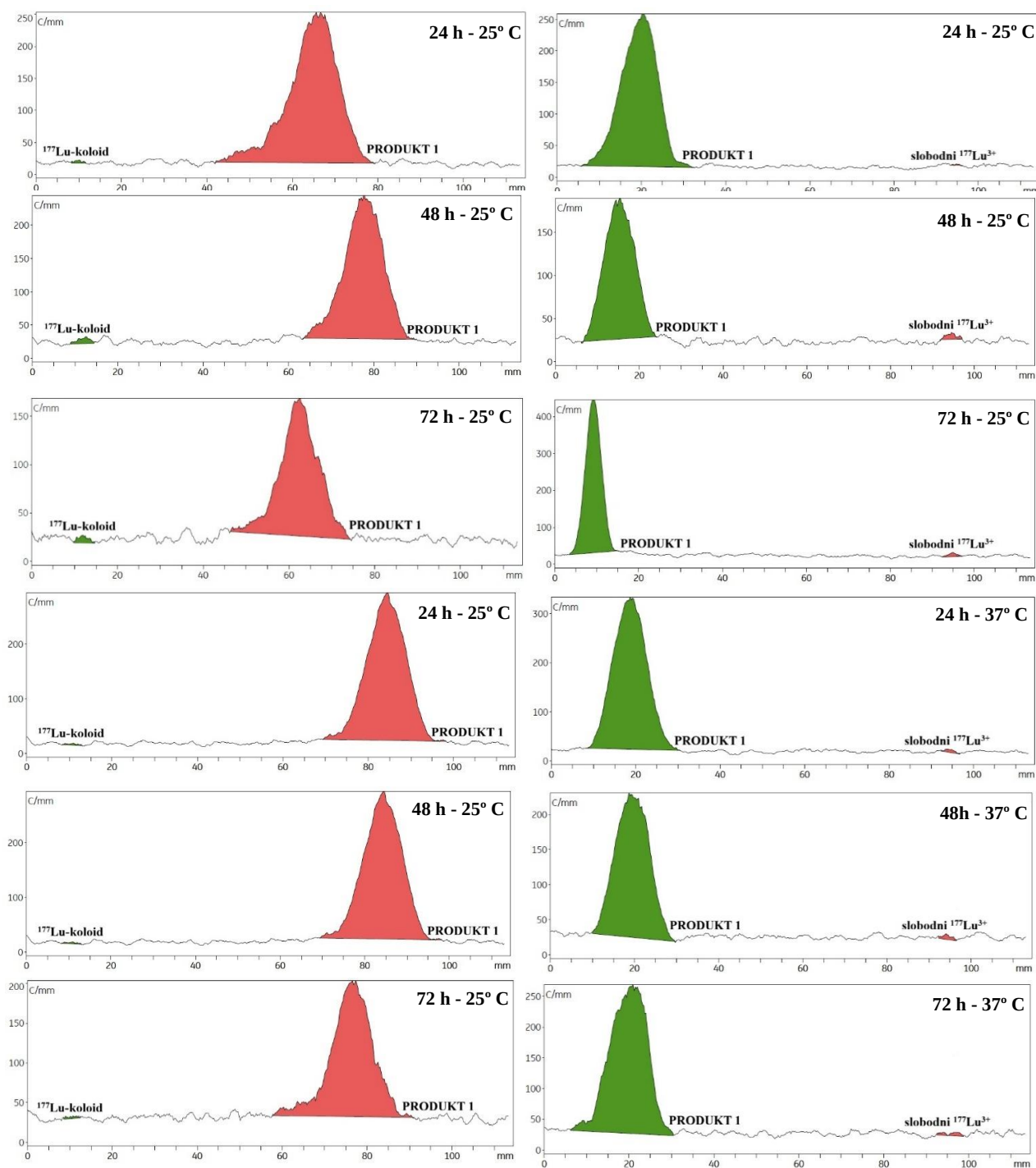
Slika D34. HPLC radiokromatogrammi internog produkta 8 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



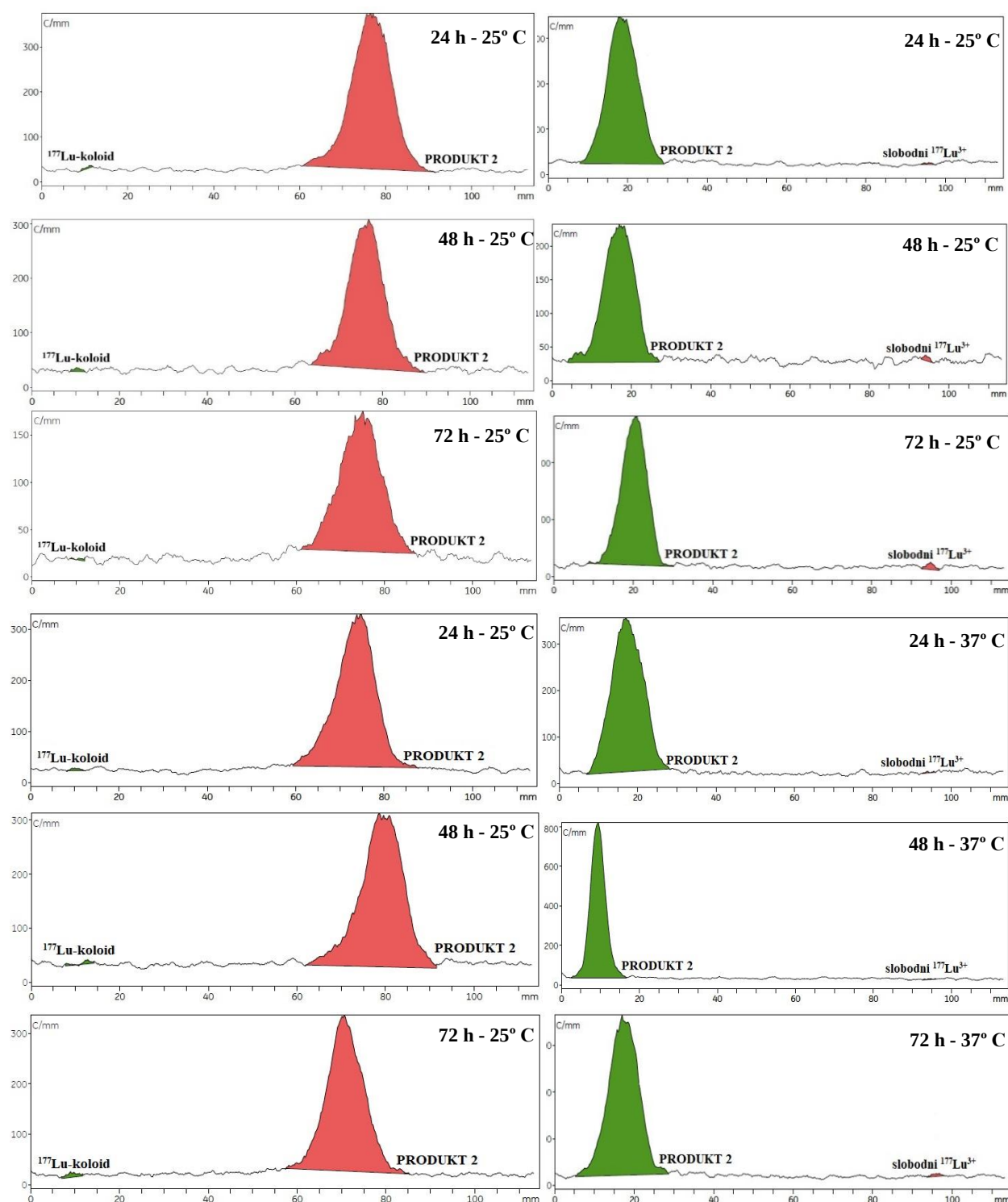
Slika D35. HPLC radiokromatogrammi internog produkta 9 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



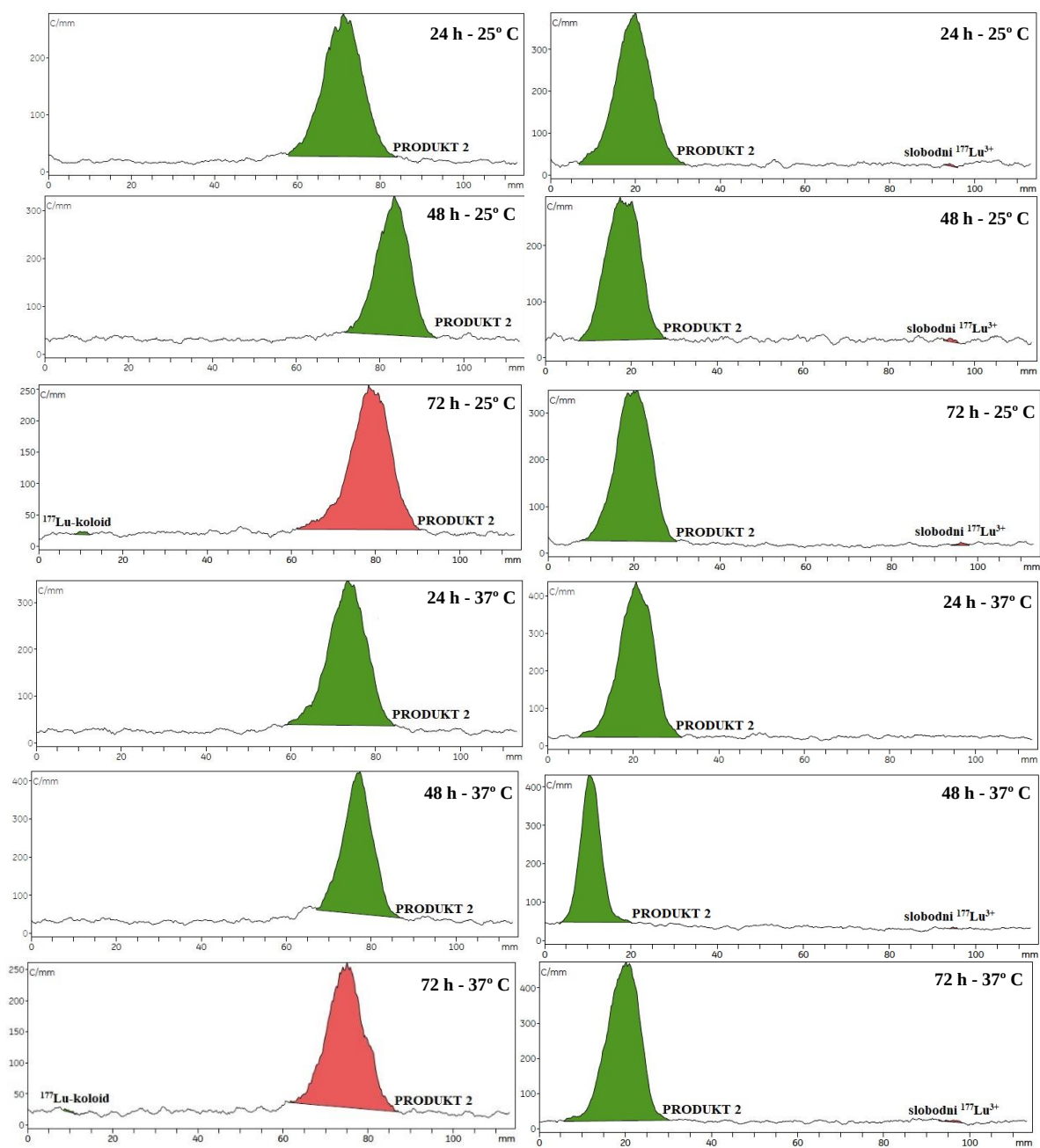
Slika D36. TLC radiokromatogrami internog produkta 1 u fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



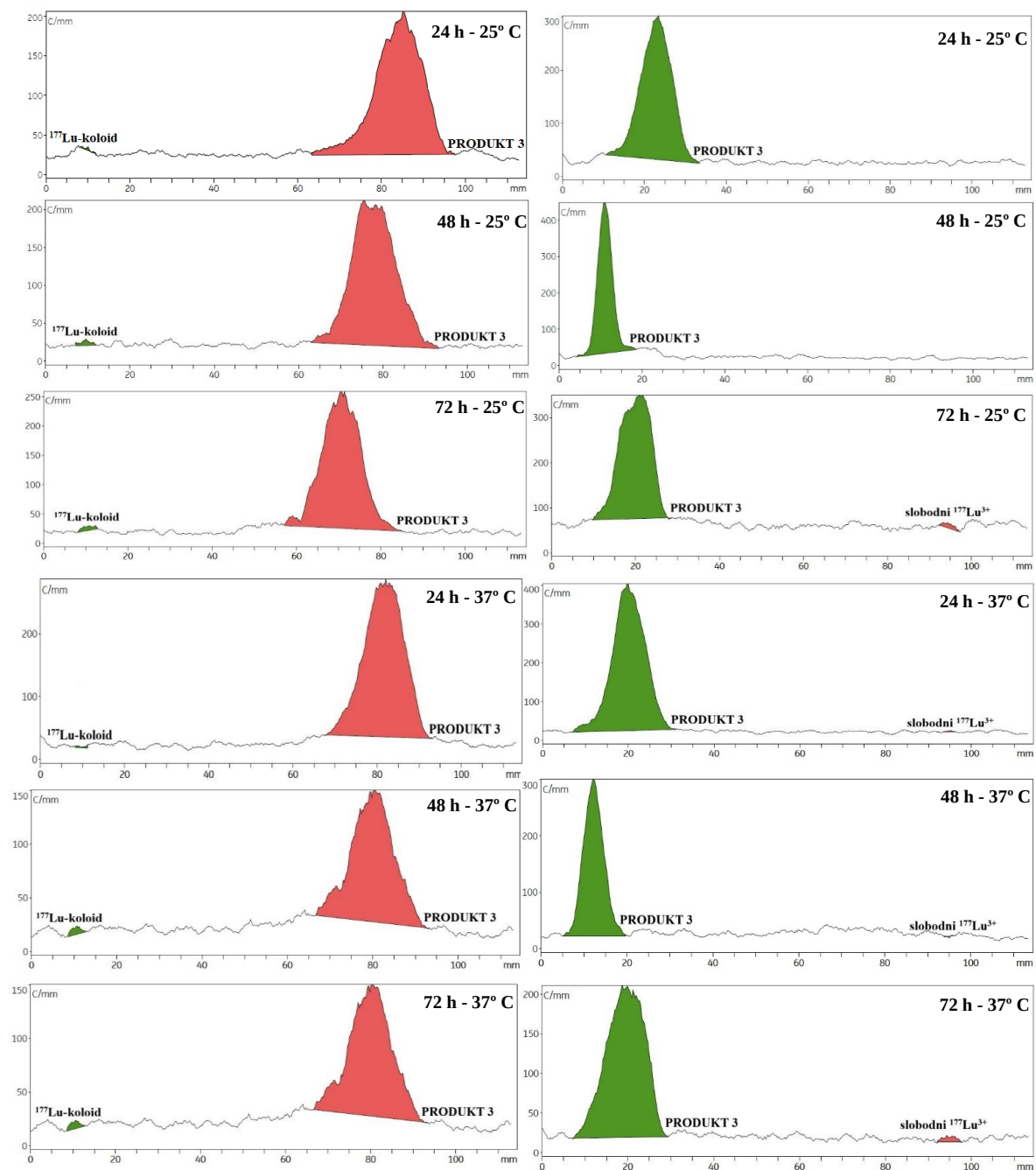
Slika D37. TLC radiokromatogrami internog produkta 1 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



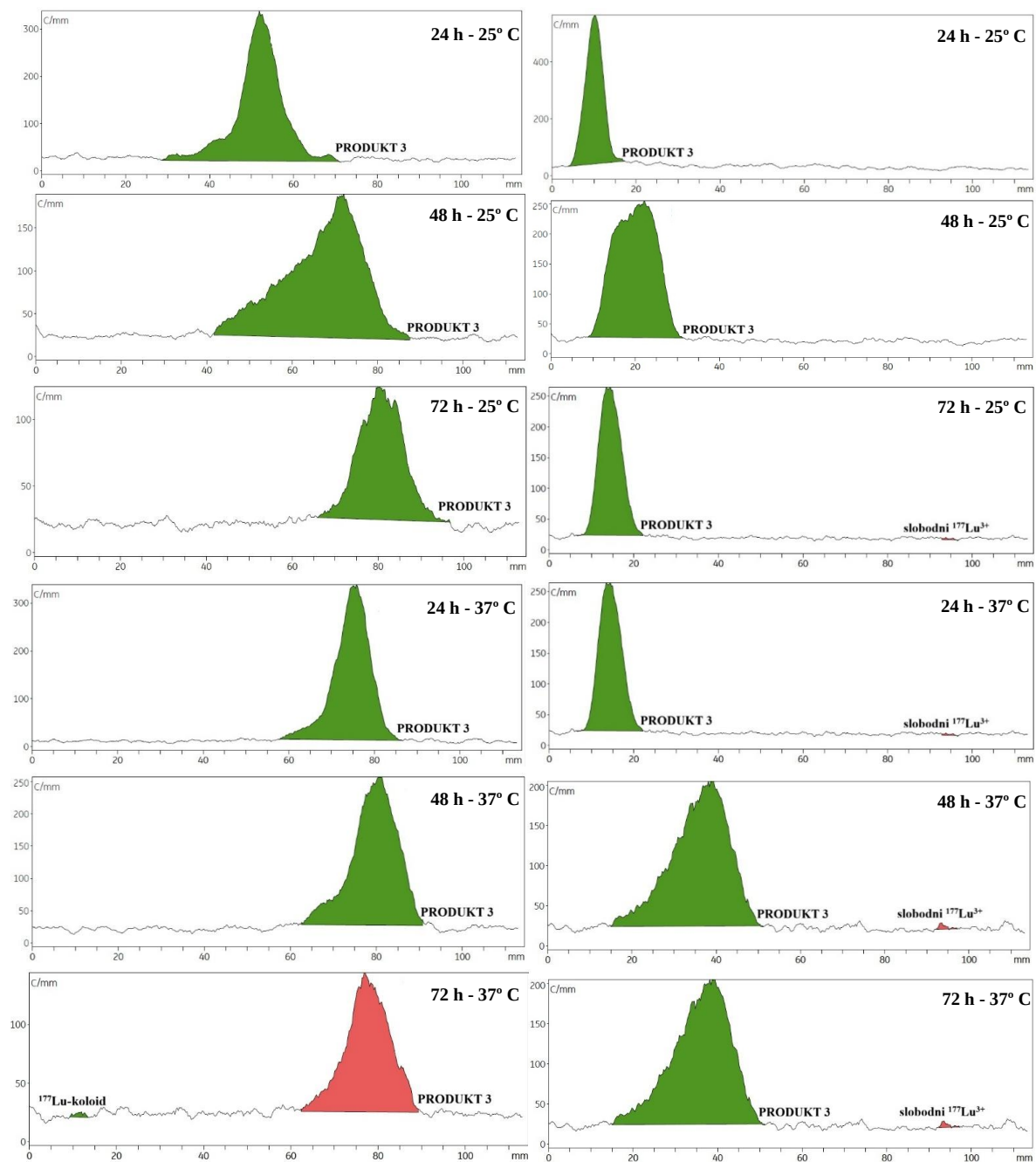
Slika D38. TLC radiokromatogrami internog produkta 2 u fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



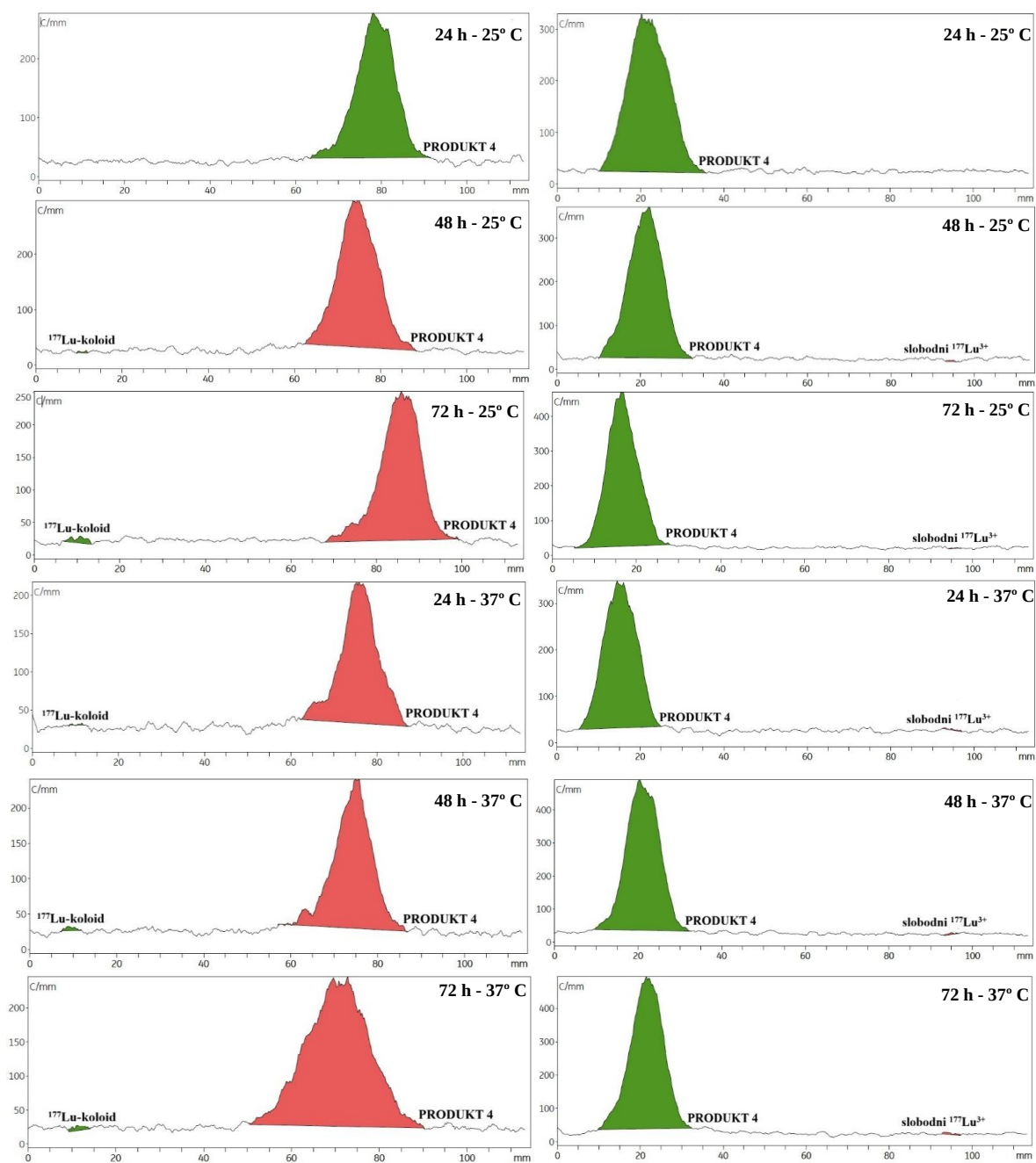
Slika D39. TLC radiokromatogrami internog produkta 2 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



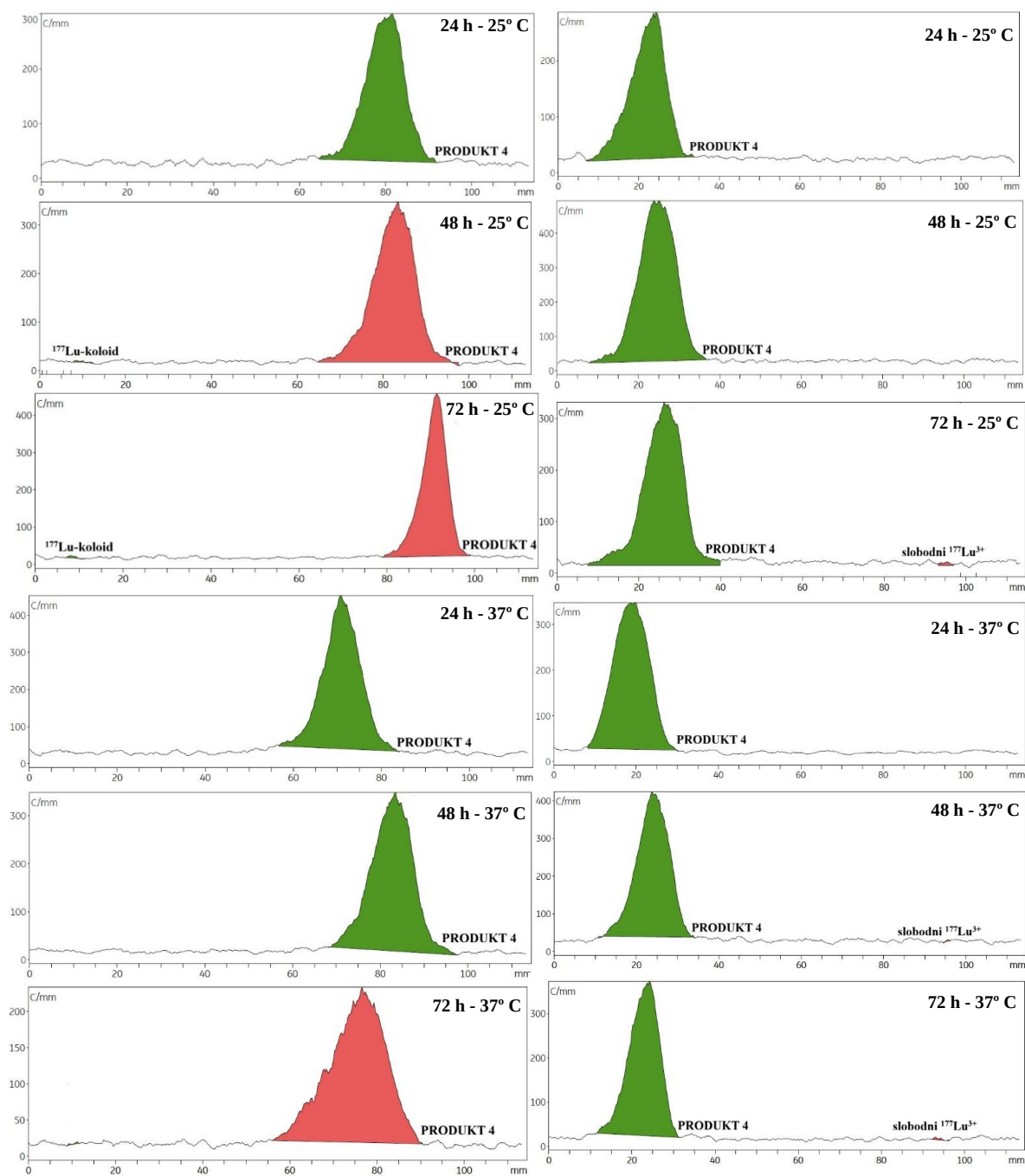
Slika D40. TLC radiokromatogrami internog produkta 3 u fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



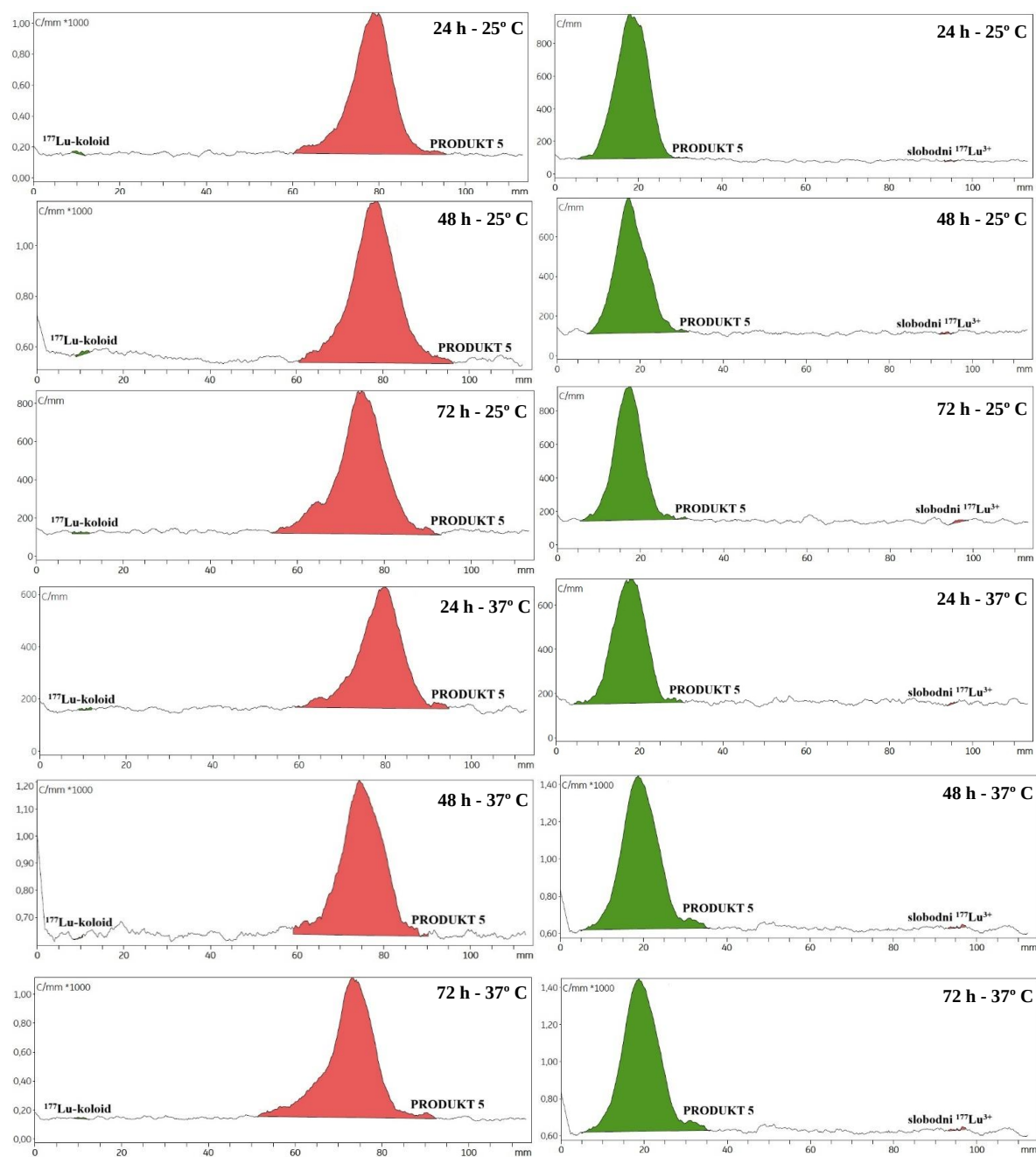
Slika D41. TLC radiokromatogrami internog produkta 3 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



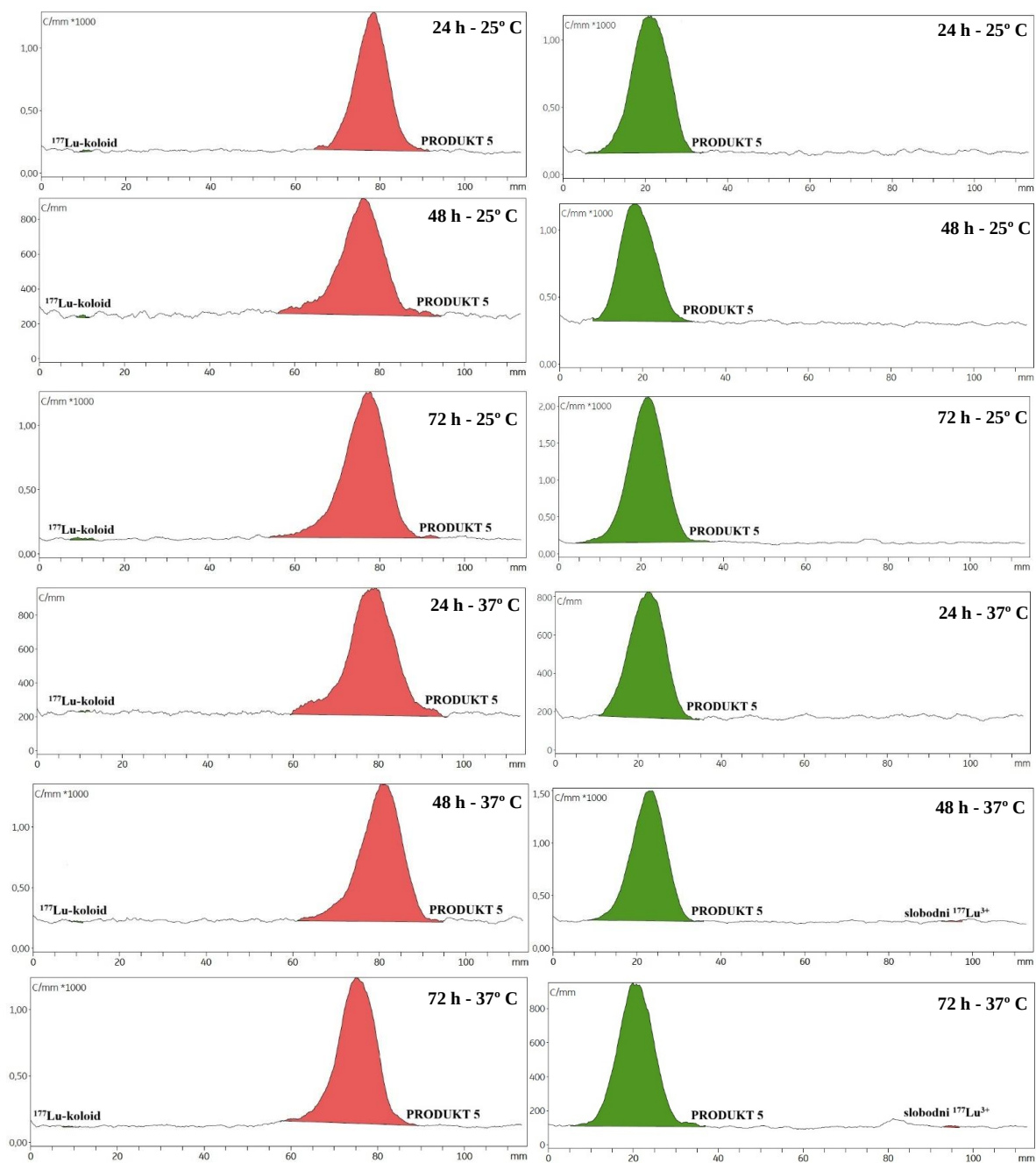
Slika D42. TLC radiokromatogrami internog produkta 4 u fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



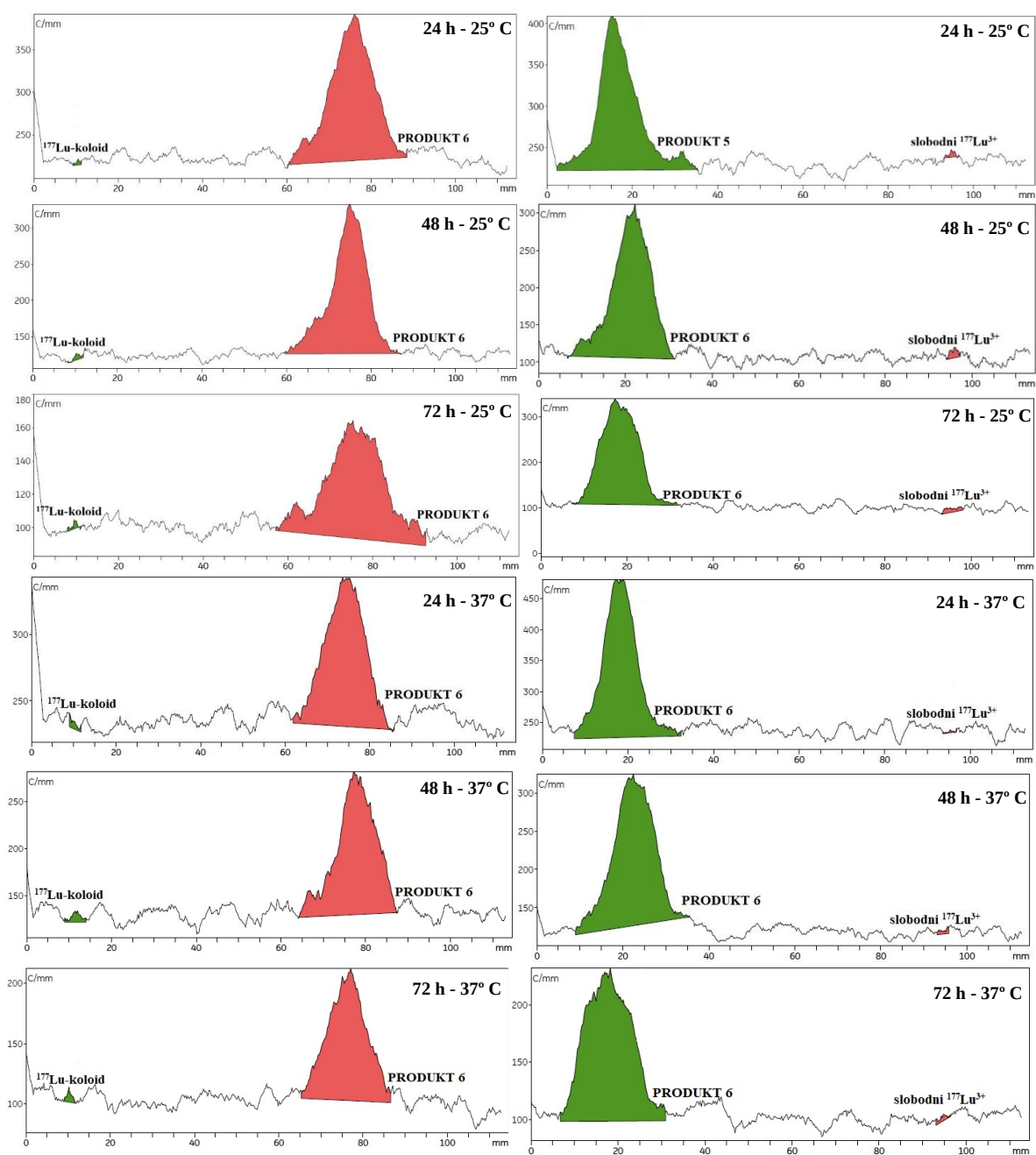
Slika D43. TLC radiokromatogrami internog produkta 4 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



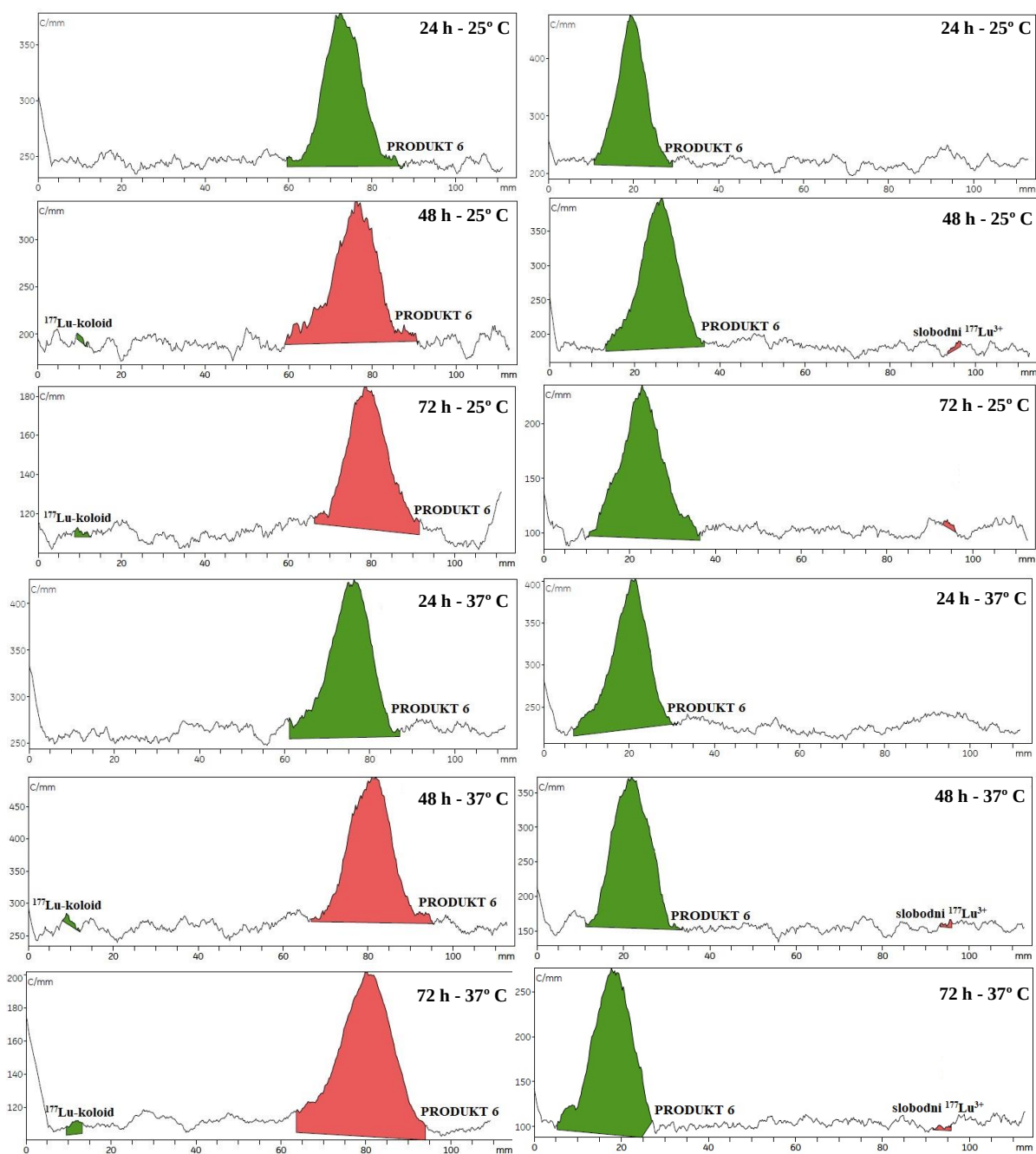
Slika D44. TLC radiokromatogrami internog produkta 5 u fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



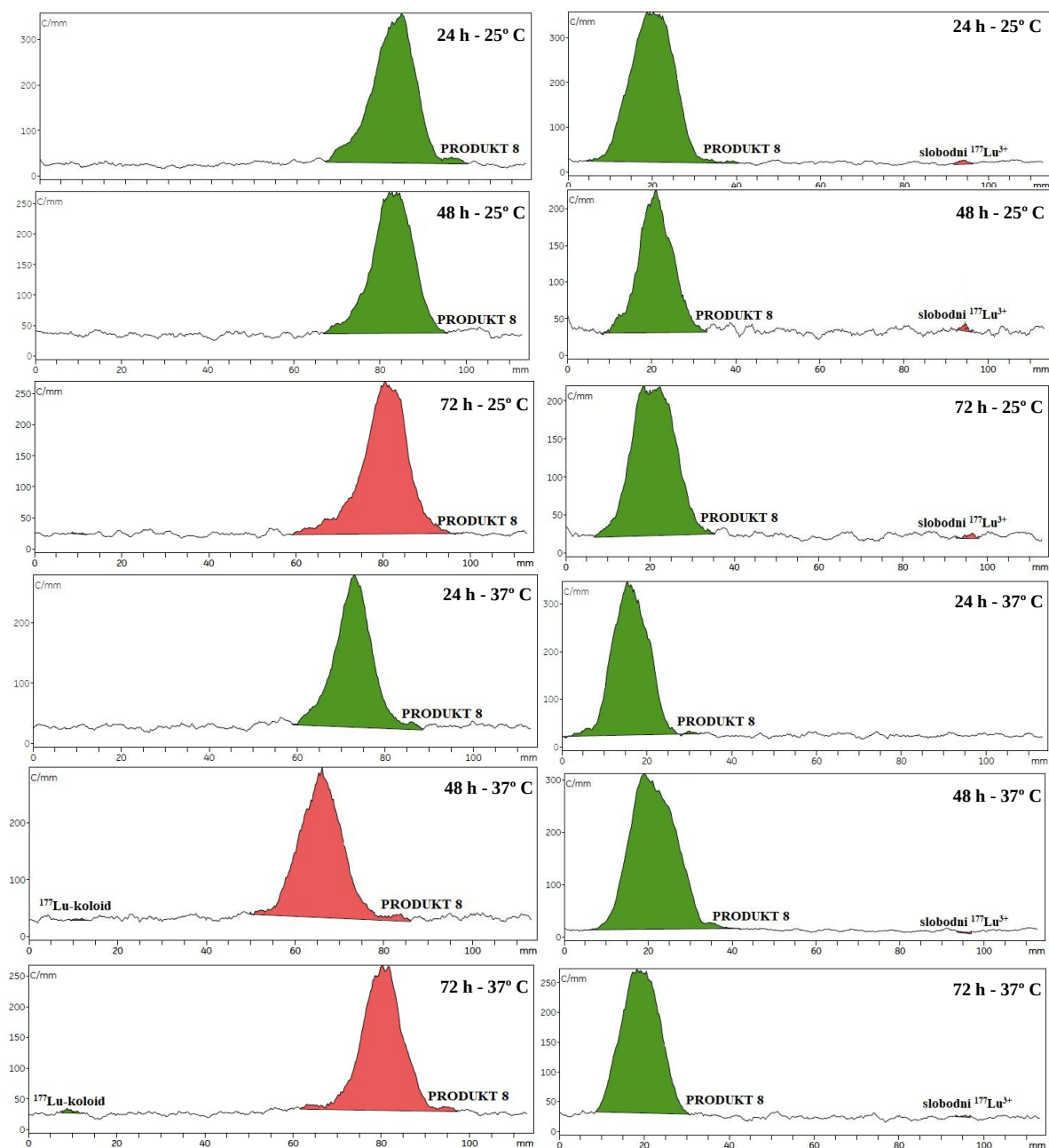
Slika D45. TLC radiokromatogrami internog produkta 5 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



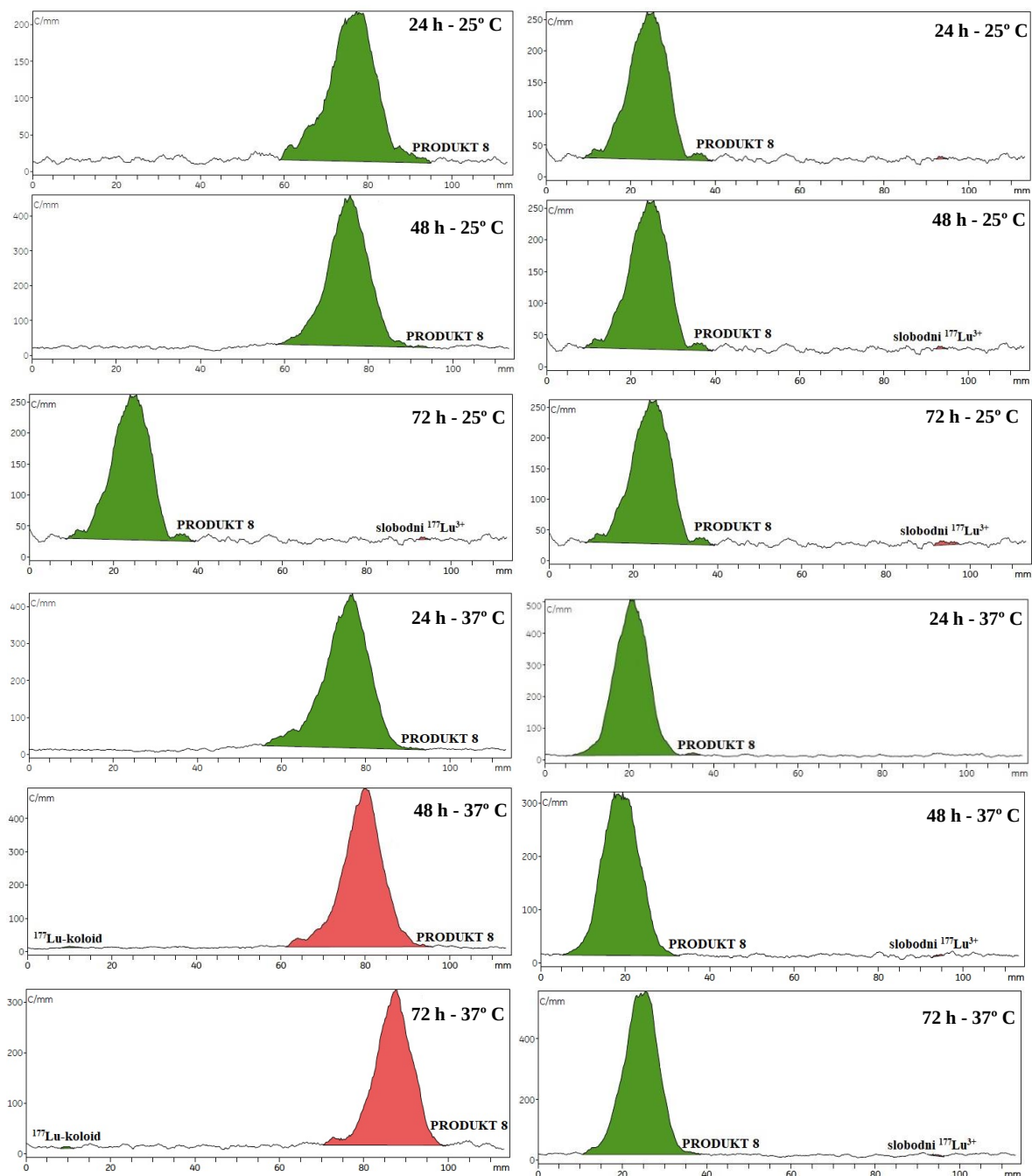
Slika D46. TLC radiokromatogrami internog produkta 6 u fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



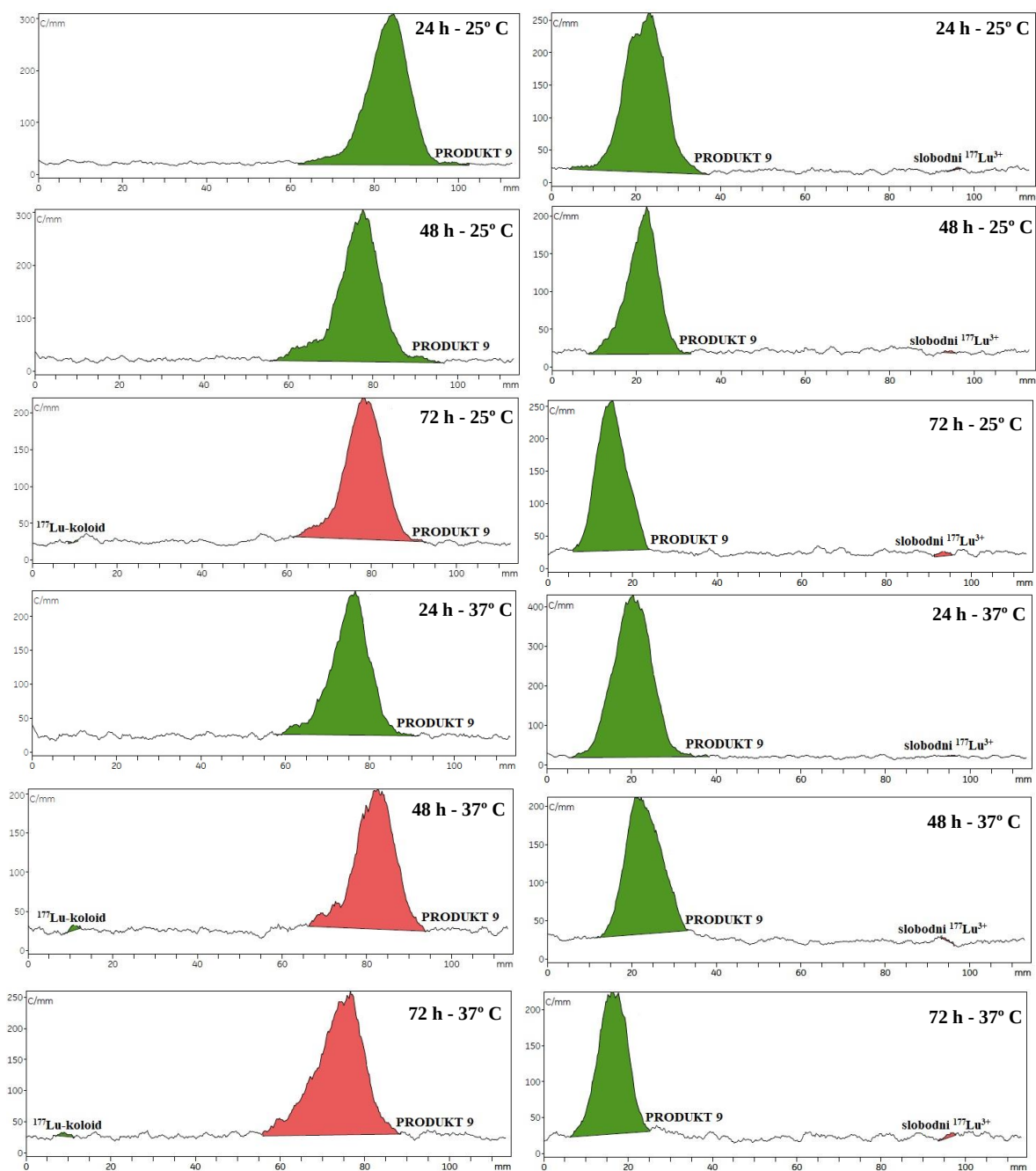
Slika D47. TLC radiokromatogrami internog produkta 6 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



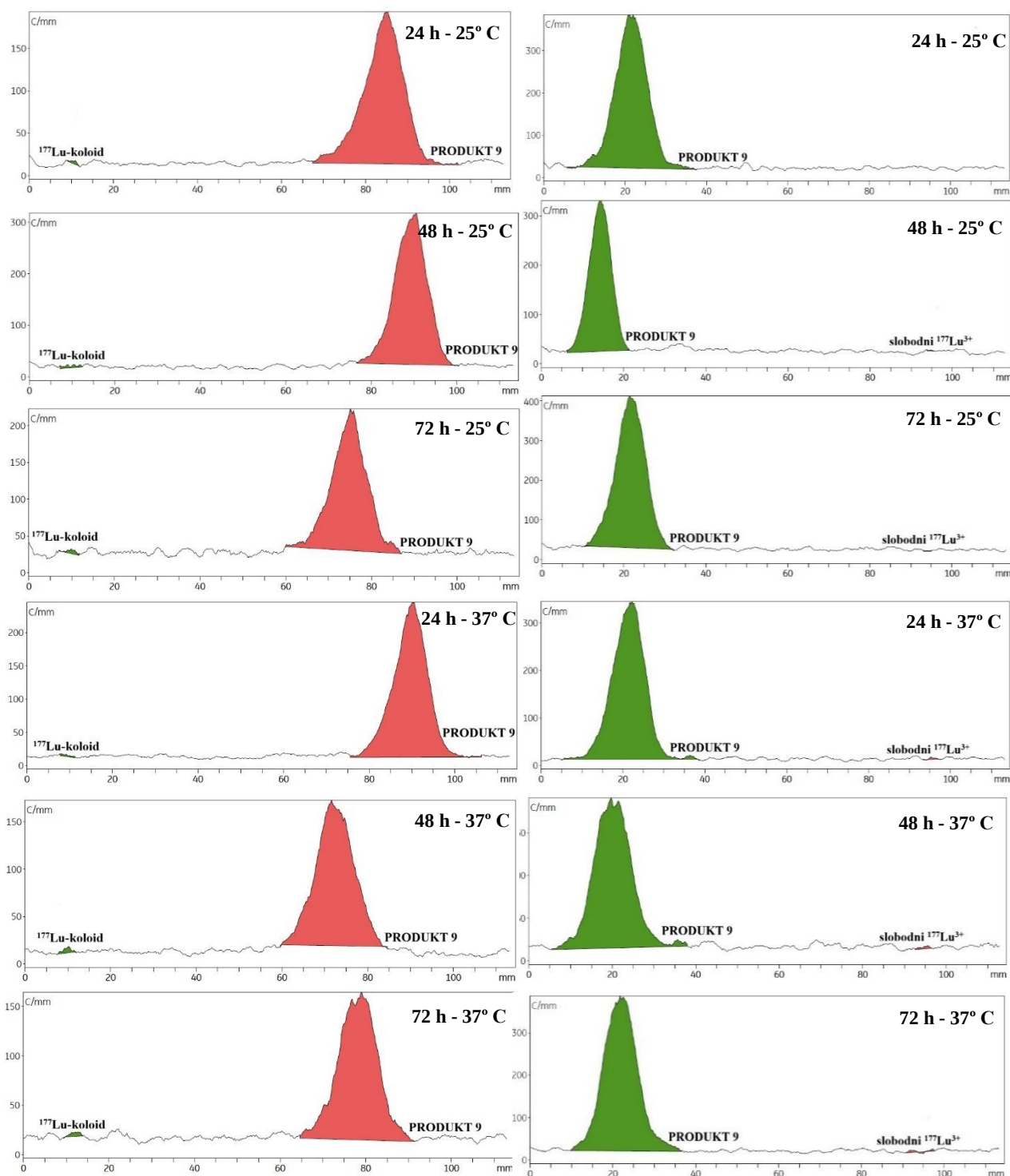
Slika D48. TLC radiokromatogrami internog produkta 8 u fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



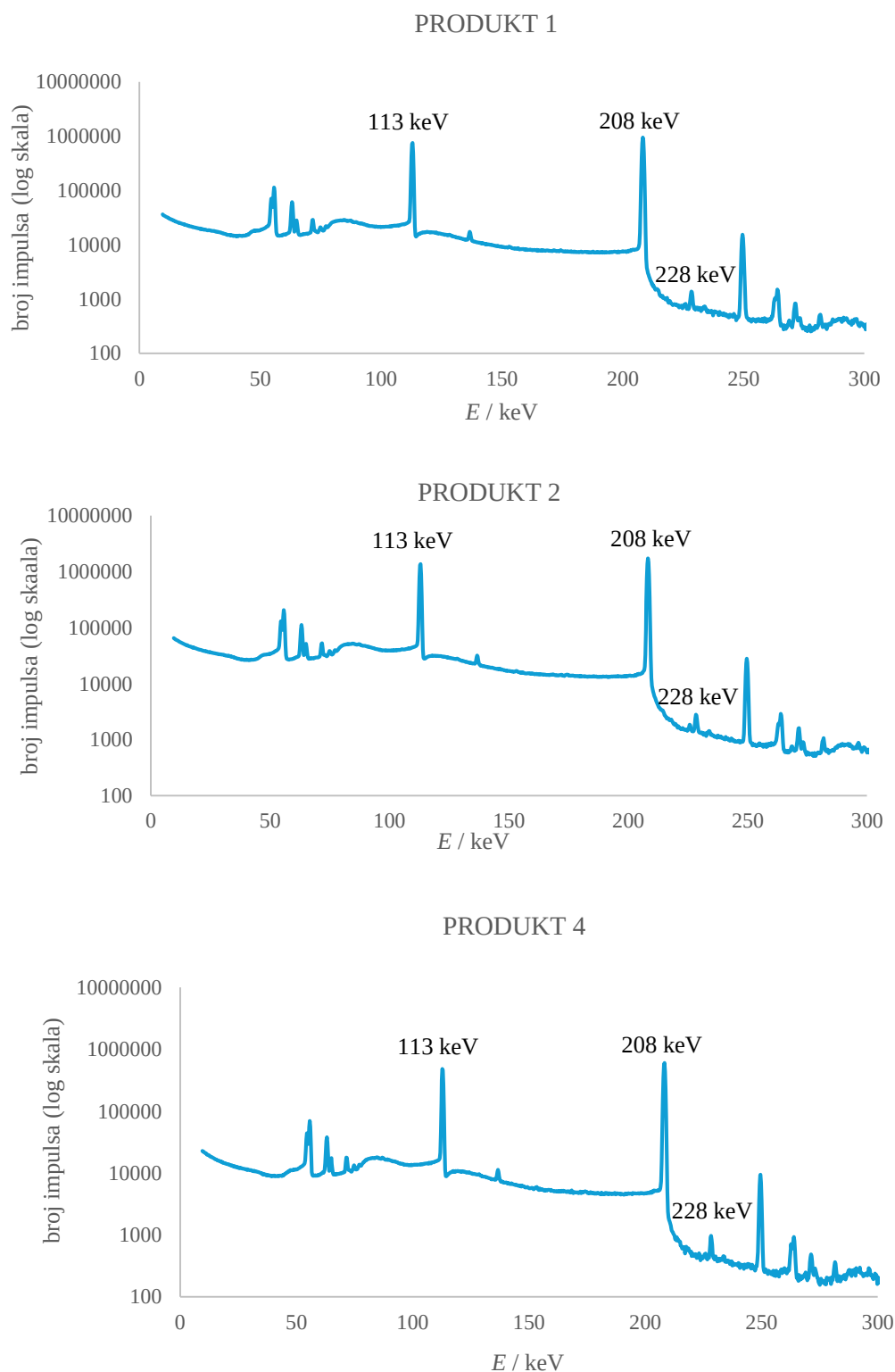
Slika D49. TLC radiokromatogrami internog produkta 8 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



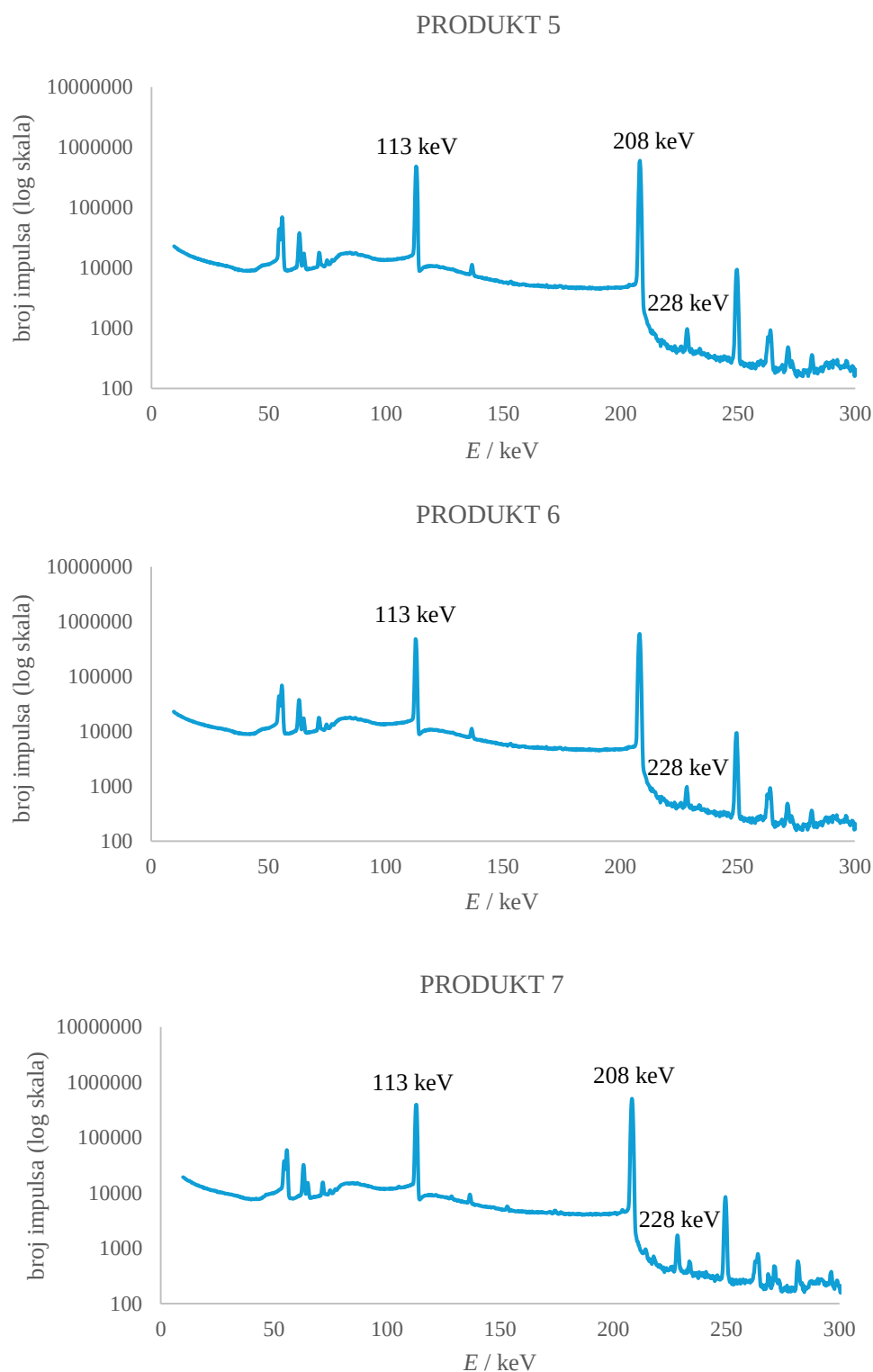
Slika D50. TLC radiokromatogrami internog produkta 9 u fiziološkoj otopini na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



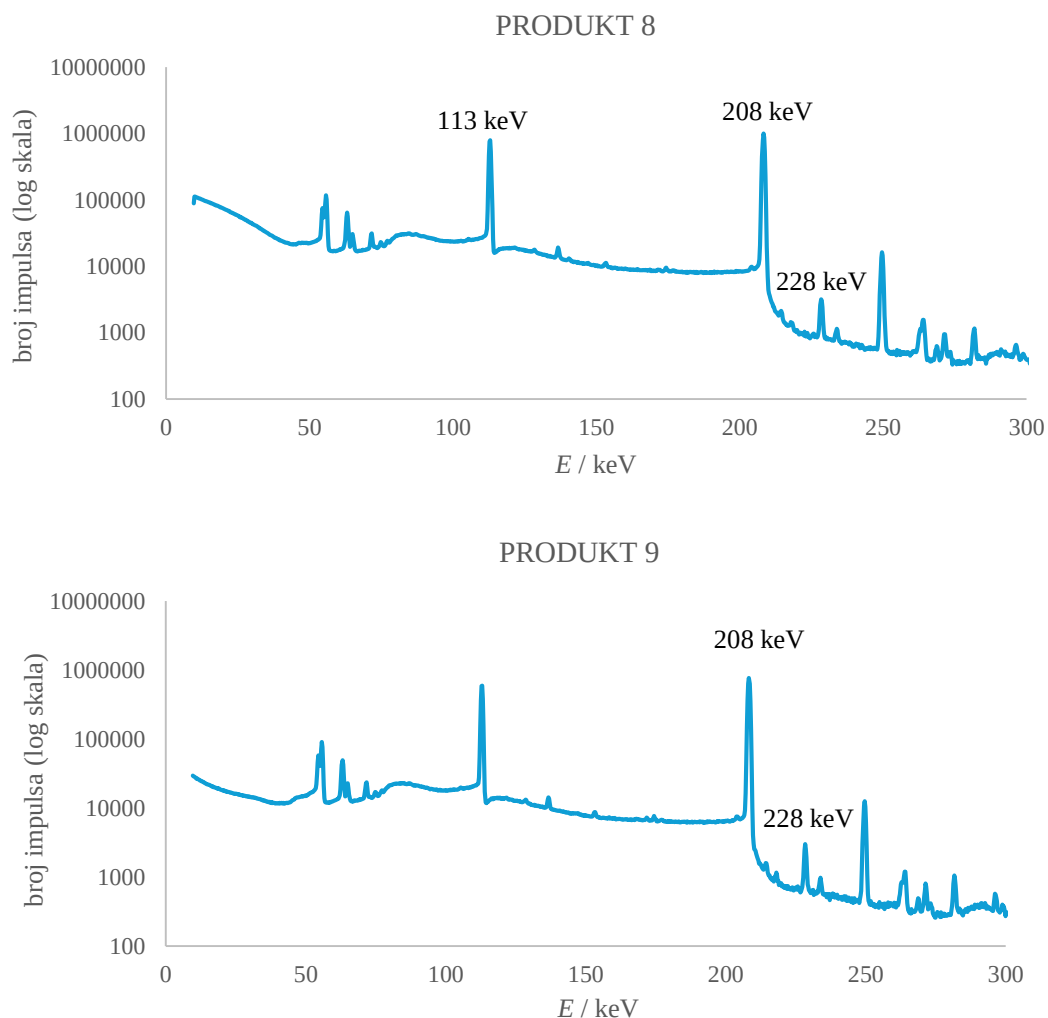
Slika D51. TLC radiokromatogrami internog produkta 9 u humanom serumu na 25 °C i 37 °C s vremenom inkubacije od 72 sata



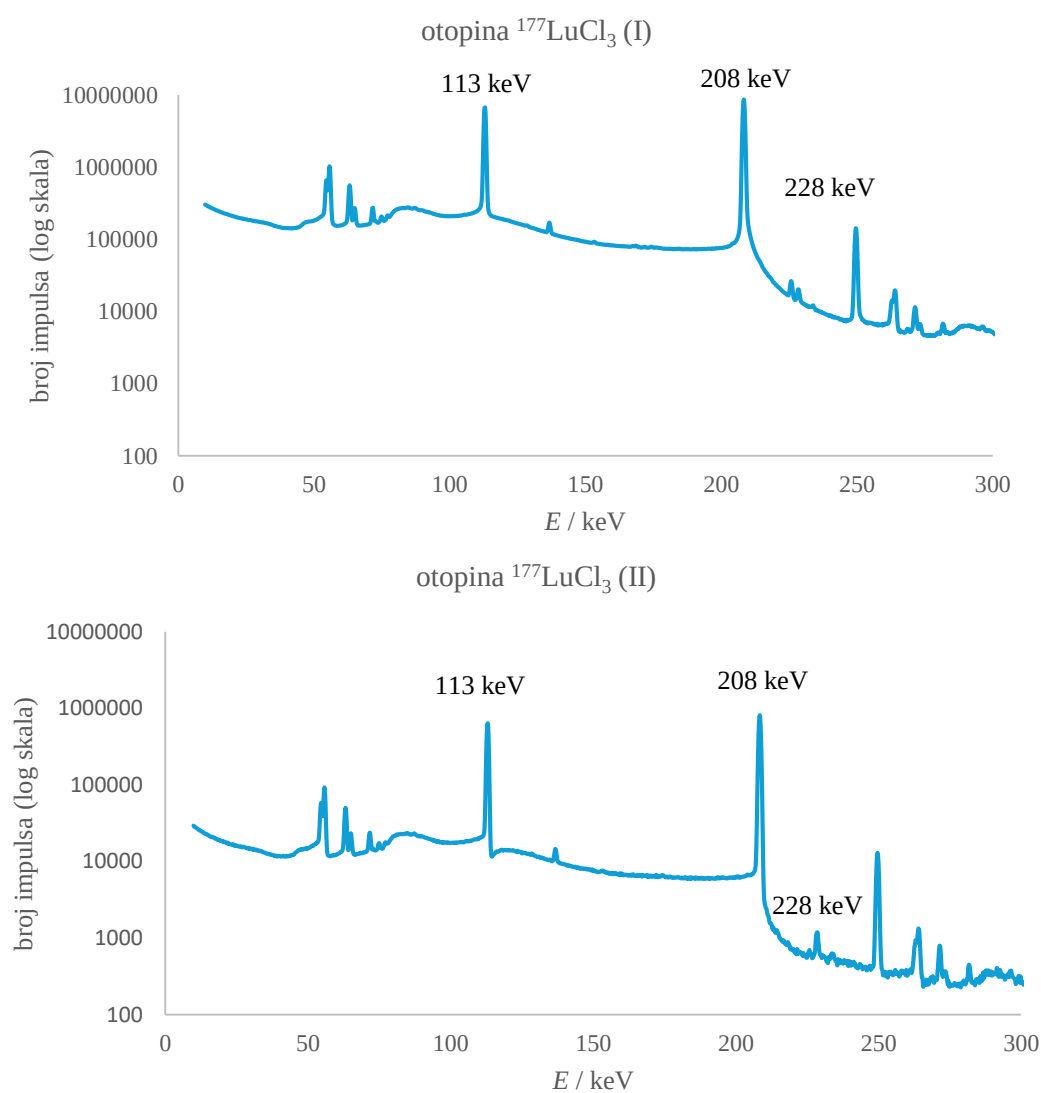
Slika D54. HPGe spektri internih produkata 1,2 i 4 s karakterističnim energijama gama zračenja radionuklida ^{177}Lu ($E_\gamma = 113$ i 208 keV) te metastabilnog izotopa $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ($E_\gamma = 228$ keV)



Slika D55. HPGe spektri internih produkata 5, 6 i 7 s karakterističnim energijama gama zračenja radionuklida ^{177}Lu ($E_\gamma = 113$ i 208 keV) te metastabilnog izotopa $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ($E_\gamma = 228$ keV)



Slika D56. HPGe spektar internih produkata 8 i 9 s karakterističnim energijama gama zračenja radionuklida ^{177}Lu ($E_\gamma = 113$ i 208 keV) te metastabilnog izotopa $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ($E_\gamma = 228$ keV)



Slika D57. HPGe spektar otopine $^{177}\text{LuCl}_3$ (I) i (II) s karakterističnim energijama gama zračenja radionuklida ^{177}Lu ($E_\gamma = 113$ i 208 keV) te metastabilnog izotopa $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ($E_\gamma = 228$ keV)

Tablica D2. Retencijska vremena internih produkata radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 i referentnog produkta Pluvicto[®] određena metodom HPLC u humanom serumu pri 25 i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije

produkt	t [°C]		25	37
	R_t [min]	t [h]	R_t [min]	R_t [min]
1	11,84	24	11,88	11,86
		48	11,90	11,83
		72	11,82	11,82
2	11,97	24	11,88	11,89
		48	11,80	11,83
		72	11,88	11,89
3	11,92	24	12,00	11,94
		48	11,98	11,97
		72	11,92	11,90
4	11,99	24	11,98	11,98
		48	11,89	11,89
		72	11,90	11,91
5	11,95	24	11,83	11,82
		48	11,78	11,87
		72	11,57	11,58
6	11,93	24	11,91	11,88
		48	11,61	11,68
		72	11,90	11,90
8	11,89	24	11,96	11,92
		48	11,89	11,92
		72	11,97	11,96
9	11,88	24	11,95	11,97
		48	11,99	11,93
		72	11,85	11,85
referentni produkt	11,90	24	11,85	11,82
		48	11,85	11,85
		72	11,67	11,66

Tablica D3. Radiokemijska čistoća internih produkata radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 određena metodom radio-TLC u fiziološkoj otopini pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije

		[^{177}Lu]Lu-PSMA-617 [%]				^{177}Lu -koloid [%]		slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ [%]	
mobilna faza		CH ₃ COONH ₄ :CH ₃ OH = 1:1		Na-citrat, pH = 5,0		CH ₃ COONH ₄ :CH ₃ OH = 1:1		Na-citrat, pH = 5,0	
temperatura		t [°C]		t [°C]		t [°C]		t [°C]	
produkt	t [h]	25	37	25	37	25	37	25	37
1	24	99,50	100,00	99,83	99,98	0,50	N/D	0,17	0,02
	48	99,04	99,58	99,82	99,33	0,96	0,42	0,18	0,67
	72	98,74	98,13	98,36	99,28	1,26	1,87	1,64	0,72
2	24	99,79	99,70	99,77	99,94	0,21	0,30	0,23	0,06
	48	99,62	99,29	99,29	99,83	0,38	0,71	0,71	0,17
	72	99,58	99,17	98,70	99,40	0,42	0,83	1,30	0,60
3	24	99,68	99,93	100,00	99,87	0,32	0,07	N/D	0,13
	48	99,18	99,10	100,00	99,89	0,82	0,90	N/D	0,11
	72	99,10	98,57	98,38	98,83	0,90	1,43	1,62	1,17
4	24	100,00	99,87	100,00	99,89	N/D	0,13	N/D	0,11
	48	99,99	99,26	99,97	99,82	0,01	0,63	0,03	0,18
	72	98,55	99,24	99,85	99,54	1,45	0,76	0,15	0,46
5	24	99,68	99,91	99,87	99,73	0,32	0,09	0,13	0,27
	48	99,50	99,86	99,86	99,58	0,50	0,14	0,14	0,42
	72	99,64	99,72	99,56	99,58	0,36	0,28	0,44	0,42
6	24	99,98	99,52	98,46	99,74	0,02	0,48	1,54	0,26
	48	99,01	98,99	98,46	99,40	0,99	1,01	1,54	0,60
	72	98,67	97,80	98,41	99,12	1,33	2,20	1,59	0,88
8	24	100,00	99,82	99,37	100,00	N/D	0,18	0,63	N/D
	48	100,00	99,77	99,36	99,87	N/D	0,23	0,64	0,13
	72	99,80	99,15	99,30	99,78	0,20	0,85	0,70	0,22
9	24	100,00	100,00	99,86	99,91	N/D	N/D	0,14	0,09
	48	100,00	99,77	99,69	99,85	N/D	0,23	0,31	0,15
	72	99,94	99,48	99,25	99,19	0,06	0,52	0,75	0,81

Tablica D4. Radiokemijska čistoća internih produkata radiofarmaceutika [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 određena metodom radio-TLC u humanom serumu pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije

mobilna faza temperatura produkt		[^{177}Lu]Lu-PSMA-617 [%]				^{177}Lu -koloid [%]		slobodni ion $^{177}\text{Lu}^{3+}$ [%]	
		CH ₃ COONH ₄ :CH ₃ OH = 1:1		Na-citrat, pH = 5,0		CH ₃ COONH ₄ :CH ₃ OH = 1:1		Na-citrat, pH = 5,0	
		t [°C]		t [°C]		t [°C]		t [°C]	
	t [h]	25	37	25	37	25	37	25	37
1	24	99,68	99,72	99,83	99,36	0,32	0,28	0,17	0,64
	48	98,65	99,72	98,92	99,18	1,35	0,28	1,08	0,82
	72	98,37	99,48	98,81	99,18	1,63	0,52	1,19	0,82
2	24	100,00	100,00	99,71	100,00	N/D	N/D	0,29	N/D
	48	100,00	100,00	99,64	99,72	N/D	N/D	0,36	0,28
	72	99,40	99,62	99,61	99,66	0,60	0,38	0,39	0,34
3	24	100,00	100,0	100,00	99,84	N/D	N/D	N/D	0,16
	48	100,00	100,0	100,00	99,34	N/D	N/D	N/D	0,66
	72	100,00	99,19	99,69	99,30	N/D	0,81	0,31	0,70
4	24	100,00	100,00	100,00	100,00	N/D	N/D	N/D	N/D
	48	99,89	100,00	100,00	99,90	0,11	N/D	N/D	0,10
	72	99,56	99,96	99,47	99,60	0,44	0,04	0,53	0,40
5	24	99,74	99,94	100,00	100,00	0,26	0,06	N/D	N/D
	48	99,57	99,93	100,00	99,73	0,43	0,07	N/D	0,27
	72	99,45	99,88	100,00	99,64	0,55	0,12	N/D	0,36
6	24	100,00	100,00	100,00	100,00	N/D	N/D	N/D	N/D
	48	99,01	98,98	99,24	99,59	0,99	1,02	0,76	0,41
	72	98,98	98,33	98,74	99,27	1,02	1,67	1,26	0,73
8	24	100,00	100,00	99,61	100,00	N/D	N/D	0,39	N/D
	48	100,00	99,84	99,55	99,80	N/D	0,16	0,45	0,20
	72	99,83	99,69	99,16	99,78	0,17	0,31	0,84	0,22
9	24	99,50	99,58	100,00	99,88	0,50	0,42	N/D	0,12
	48	99,22	99,47	99,89	99,71	0,78	0,53	0,11	0,29
	72	99,18	99,18	99,86	99,61	0,82	0,82	0,14	0,39

Tablica D5. Radiokemijska čistoća referentnog produkta Pluvicto® određena metodom TLC u fiziološkoj otopini i humanom serumu pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije

		[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA-617 [%]				¹⁷⁷ Lu koloid [%]		slobodni ion ¹⁷⁷ Lu ³⁺ [%]	
mobilna faza		CH ₃ COONH ₄ :CH ₃ OH = 1:1		Na-citrat, pH = 5,0		CH ₃ COONH ₄ :CH ₃ OH = 1:1		Na-citrat, pH = 5,0	
temperatura		t [°C]		t [°C]		t [°C]		t [°C]	
referentni produkt	t [h]	25	37	25	37	25	37	25	37
fiziološka otopina	24	100,00	100,00	100,00	100,00	N/D	N/D	N/D	N/D
	48	99,88	100,00	100,00	100,00	0,12	N/D	N/D	N/D
	72	99,88	100,00	100,00	100,00	0,12	N/D	N/D	N/D
humani serum	24	100,00	100,00	100,00	100,00	0,26	0,06	N/D	N/D
	48	100,00	99,96	100,00	100,00	0,43	0,07	N/D	0,27
	72	100,00	99,92	100,00	100,00	0,55	0,12	N/D	0,36

Tablica D6. Masene koncentracije izotopa ^{175}Lu i ^{177}Hf određene metodom ICP-MS u internim produktima i referentnom produktu Pluvicto® u humanom serumu pri 25 °C i 37 °C tijekom 72 sata inkubacije

t [°C]		25 °C	25 °C	25 °C	37 °C	37 °C	37 °C		25 °C	25 °C	25 °C	37 °C	37 °C	37 °C
uzorak	bez inkubacije	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	bez inkubacije	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
$\mu\text{g L}^{-1}$	^{175}Lu	^{175}Lu	^{175}Lu	^{175}Lu	^{175}Lu	^{175}Lu	^{175}Lu	^{177}Hf	^{177}Hf	^{177}Hf	^{177}Hf	^{177}Hf	^{177}Hf	^{177}Hf
produkt 1	10,607	5,889	6,481	6,112	6,584	6,184	6,579	58,617	32,335	35,783	32,776	36,315	33,211	36,131
produkt 2	13,262	8,270	8,157	8,484	8,571	8,543	8,839	73,318	45,749	45,199	46,724	46,829	46,707	48,429
produkt 3	17,609	11,855	11,880	11,107	11,890	11,698	13,086	96,434	64,412	64,267	61,166	64,365	64,931	71,791
produkt 4	21,111	14,283	14,436	14,937	17,236	15,185	14,844	116,329	78,563	79,824	82,559	96,892	83,593	80,638
produkt 5	32,083	21,693	25,646	24,394	21,912	22,543	23,292	249,119	167,467	198,704	187,353	168,347	172,395	181,142
produkt 6	7,027	4,587	6,769	N/A	4,785	4,492	5,561	54,076	35,767	52,321	N/A	37,153	34,842	36,581
produkt 7	18,613	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	143,560	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
produkt 8	17,918	12,864	13,194	12,297	12,617	12,569	17,589	138,624	98,022	101,501	94,505	97,362	95,396	133,531
produkt 9	14,633	8,794	8,518	7,229	9,380	10,522	9,317	113,383	68,637	65,234	54,214	70,730	79,111	71,581
ref. produkt	68,987	26,452	27,482	28,260	26,808	26,766	28,498	0,906	0,523	0,366	0,302	0,220	0,242	0,223

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Nino Jukić

Datum rođenja: 11. listopada 1995.

Mjesto i država rođenja: Zagreb, Hrvatska

Email adresa: njukic@chem.pmf.hr

Obrazovanje:

2014.–2018. Preddiplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2018.–2021. Diplomski studij kemije, istraživački smjer, grane: analitička i anorganska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2023.–2026. Poslijediplomski studij kemije, grana: analitička kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Radno iskustvo:

2021. – Radiokemičar

Klinički zavod za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, Klinički bolnički centar Zagreb, Hrvatska

2018.–2021. Studentski posao

Teva api R&D Analitika, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb

Znanstvena i stručna usavršavanja:

2024./2025. Petodnevni boravak u Klinici za nuklearnu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Innsbrucku, Austrija

Nastava:

2023./2024. – Poslijediplomski studij: nuklearna medicina; kolegij Radiokemija i radiofarmaci

2026./2027. – Poslijediplomski studij: nuklearna medicina; kolegij Radiokemija i radiofarmaci

Znanstveni radovi u časopisima (baza WoS):

1. **N. Jukić**, D. Huić, M. Žuvić, I. Nemet, S. Rončević, Development and evaluation of improved in-house procedure for radiolabelling of theranostic agent [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617., *EJNMML. Radiopharm. Chem.* (2026) <https://doi.org/10.1186/s41181-026-00462-y>
2. I. Rogić, A. T. Golubic, M. Zuvic, T. Smitran, **N. Jukic**, M. Gamulin, Z. Kastelan, D. Huic, Clinical utility of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 PET/CT in initial staging of patients with prostate cancer and importance of intraprostatic SUVmax values, *Nucl Med Rev Cent East Eur.* **27** (2024) 6–12. doi: 10.5603/nmr.97424
3. I. Rogić, A. T. Golubić, M. Dobrenić, M. Žuvić, T. Šmitran, **N. Jukić**, D. Huić, Indications and Results for Ga-68 PSMA PET/CT in Patients with Biochemical Relapse of Prostate Cancer, *Acta Clinica Croatica* **63** (2024) 7–12. doi: 10.20471/acc.2024.63.s2.1

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

1. D. Huić, I. Rogić, A. T. Golubić, M. Žuvić, T. Šmitran, **N. Jukić**, Indikacije i rezultati primjene PSMA PET/CT-a u KBC Zagreb, Knjiga sažetaka 9. znanstvenog sastanka TUMORI PROSTATE održanog 11. studenoga 2022. u Zagrebu u Hrvatskoj akademiji znanosti i umjetnosti, 2022. 10–11, Zagreb, Hrvatska
2. **N. Jukić**, T. Šmitran, P. Šćulac, M. Žuvić, Radiolabeling and Quality Control of the [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 and [⁶⁸Ga]Ga-DOTATATE for Clinical Use, 11. Međunarodni kongres Hrvatskog društva za nuklearnu medicinu, Pula, Hrvatska, 2024. (usmeno izlaganje)
3. **N. Jukić**, T. Šmitran, P. Šćulac, M. Žuvić, Our Experience in Automated Radiosynthesis of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 and [⁶⁸Ga]Ga-DOTATATE for Clinical Use using Gaia Elysia-raytest Automated Synthesizer, 11. Međunarodni kongres Hrvatskog društva za nuklearnu medicinu Pula, Hrvatska, 2024. (postersko izlaganje)
4. **N. Jukić**, Synthesis, quality control and clinical use of the ⁶⁸Ga radiopharmaceuticals: [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 and [⁶⁸Ga]Ga-DOTATATE, 9th Faculty of Science PhD Student Symposium, Zagreb, Hrvatska, 2025. (usmeno izlaganje)
5. I. Rogić, A. T. Golubić, M. Dobrenić, M. Žuvić, T. Šmitran, **N. Jukić**, D. Huić, The most important clinical factors connected with the positive Ga-68-PSMA PET-CT scan in patients with biochemical recurrence of prostate cancer, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **49** (2022) 492–493. doi: 10.1007/s00259-022-05924-4