

České vysoké učení technické v Praze

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie

***Štúdium a príprava PSMA s terapeutickými
rádionuklidmi***

Study and synthesis of PSMA with therapeutical radionuclides



Paulína Pažitková

Bakalárska práca

2023

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Pažitková** Jméno: **Paulína** Osobní číslo: **502554**
Fakulta/ústav: **Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská**
Zadávací katedra/ústav: **Katedra jaderné chemie**
Studijní program: **Jaderná chemie**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Studium a příprava PSMA s terapeutickými radionuklidy

Název bakalářské práce anglicky:

Study and synthesis of PSMA with therapeutical radionuclides

Pokyny pro vypracování:

1. Provedení literární rešerše
2. Srovnání metodiky značení s ^{225}Ac , ^{177}Lu a ^{161}Tb
3. Příprava značeného PSMA-617
4. Vyhodnocení a sepsání práce

Seznam doporučené literatury:

1. Sinnes, JP., Bauder-Wüst, U., Schäfer, M. et al. ^{68}Ga , ^{44}Sc and ^{177}Lu -labeled AAZTA5-PSMA-617: synthesis, radiolabeling, stability and cell binding compared to DOTA-PSMA-617 analogues. EJNMMI radiopharm. chem. 5, 28 (2020). <https://doi.org/10.1186/s41181-020-00107-8>

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Martin Vík, Ph.D. katedra jaderné chemie FJFI

Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **20.10.2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **02.08.2023**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.10.2024**


RNDr. Martin Vík, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) práce


podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry


doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D.
podpis děkana(ky)


III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Studentka bere na vědomí, že je povinna vypracovat bakalářskou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v bakalářské práci.

29-10-2022

Datum převzetí zadání




Podpis studentky

Čestné vyhlásenie

Čestne vyhlasujem, že som túto bakalársku prácu spracovala samostatne a všetky použité zdroje a literatúra sú riadne citované.

V Prahe dňa 1. 8. 2023

Podpis 

Pod'akovanie

V prvom rade by som sa chcela poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Martinovi Vlkovi, PhD. za odborné vedenie, ochotu, poskytnutie hodnotných rád a všetok čas, ktorý mi venoval počas celej doby spracovania tejto bakalárskej práce. Ďalej chcem poďakovať celému kolektívu rádiofarmaceutickej skupiny na Katedre jadrovej chémie Fakulty jadrového a fyzikálneho inžinierstva Českého vysokého učenia technického za ich cenné rady, priateľský prístup a príjemné pracovné prostredie. V neposlednom rade patrí veľké poďakovanie za pomoc a podporu mojej rodine.

Názov práce: Štúdium a príprava PSMA s terapeutickými rádionuklidmi

Autorka: Paulína Pažitková

Obor: Jaderná chemie

Druh práce: Bakalárska práca

Vedúci práce: RNDr. Martin Vlk, PhD.

Abstrakt: V úvodnej časti bakalárskej práce bola vykonaná literárna rešerš, v ktorej bola popísaná problematika PSMA, cielenej rádionuklidovej terapie, chemické vlastnosti rádionuklidov ^{177}Lu , ^{225}Ac a ^{161}Tb , ich využitia pre terapeutické účely karcinómu prostaty a metodiky značenia. Experimentálna časť zahŕňala prípravu rádiofarmák ^{161}Tb]Tb-PSMA-617 a ^{68}Ga]Ga-PSMA-11 metódou nepriameho značenia molekuly PSMA-617, resp. PSMA-11 rádionuklidom ^{161}Tb , resp. ^{68}Ga cez chelátotvorné činidlá. Rádionuklid ^{68}Ga bol zvolený ako modelový s výhodou jeho krátkeho polčasu premeny a zároveň jeho možnej elúcie z $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru. V prípade rádiofarmaka ^{161}Tb]Tb-PSMA-617 bolo cieľom nájsť optimálne podmienky značenia, teda vhodný pomer ligandu a kovu; pH a reakčnú dobu. Značenie bolo vykonané v rozmedzí pH 3-6. U pripravených rádiofarmák bola overená rádiochemická čistota pomocou metód TLC a HPLC. Výťažky značenia pre ^{161}Tb]Tb-PSMA-617, pripraveného za optimálnych podmienok, a ^{68}Ga]Ga-PSMA-11 mali hodnotu >99 %, teda značenie bolo efektívne.

Kľúčové slová: PSMA, terbium-161, rádiofarmaká

Title: Study and synthesis of PSMA with therapeutical radionuclides

Author: Paulína Pažitková

Branch: Nuclear Chemistry

Type of thesis: Bachelor thesis

Advisor: RNDr. Martin Vlk, PhD.

Abstract: In the introductory part of the bachelor's thesis, a literature search was carried out, in which the issue of PSMA, targeted radionuclide therapy, chemical properties of radionuclides ^{177}Lu , ^{225}Ac and ^{161}Tb , their use for the therapeutic purposes of prostate cancer and labeling methodology were described. The experimental part included the preparation of radiopharmaceuticals ^{161}Tb]Tb-PSMA-617 and ^{68}Ga]Ga-PSMA-11 by the method of indirect labeling of the PSMA-617, resp. PSMA-11 molecule with radionuclide ^{161}Tb , resp. ^{68}Ga through chelating agents. The radionuclide ^{68}Ga was chosen based on its short half-life and at the same time its possible elution from the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator. In the case of the radiopharmaceutical ^{161}Tb]Tb-PSMA-617, the goal was to find optimal labeling conditions, i.e. a suitable ratio of ligand and metal; pH and reaction time. Labeling was performed in the pH range 3-6. The radiochemical purity of the prepared radiopharmaceuticals was verified using TLC and HPLC methods. Labeling yields for ^{161}Tb]Tb-PSMA-617, prepared under optimal conditions, and ^{68}Ga]Ga-PSMA-11 were >99 %, thus radiolabeling was efficient.

Key words: PSMA, terbium-161, radiopharmaceuticals

Zoznam skratiek

PSMA	prostatický špecifický membránový antigén
PSA	prostatický špecifický antigén
mCRPC	metastatický karcinóm prostaty odolný voči kastrácii (<i>Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer</i>)
PET	pozitronová emisná tomografia (<i>Positron Emission Tomography</i>)
SPECT	jednofotónová emisná počítačová tomografia (<i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>)
CT	počítačová tomografia (<i>Computed Tomography</i>)
DOTA	kyselina tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
EZ	elektrónový záchyt
IP	izomerný prechod
DNA	deoxyribonukleová kyselina
mAb	monoklonálna protilátka
LET	lineárny prenos energie
iTLC–SG	silikagél naimpregnovaný na vrstve sklenených vlákien
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
TLC	chromatografia na tenkej vrstve
R _F	retenčný faktor
t _R	retenčný čas

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Teoretická časť.....	2
2.1	Prostatický špecifický membránový antigén.....	2
2.1.1	Prostatický špecifický antigén.....	4
2.2	Cielená rádionuklidová terapia.....	5
2.3	Terapeutické rádionuklidy.....	10
2.3.1	Lutécium-177.....	10
2.3.2	Aktínum-225.....	13
2.3.3	Terbium-161.....	16
3	Experimentálna časť.....	18
3.1	Značenie PSMA-11 gáliom-68.....	18
3.2	Značenie PSMA-617 terbiom-161.....	19
3.2.1	Kinetika značenia.....	22
3.3	Kontrola rádiochemickej čistoty rádiofarmák.....	23
3.3.1	Stanovenie rádiochemickej čistoty pomocou TLC.....	23
3.3.2	Stanovenie rádiochemickej čistoty rádiofarmaka pomocou HPLC.....	25
4	Diskusia.....	29
5	Záver.....	30
6	Literatúra.....	31

1 Úvod

Karcinóm prostaty predstavuje u mužov druhú najčastejšiu príčinu úmrtia na malígne nádorové ochorenie po karcinóme pľúc. Prostatický špecifický membránový antigén zaznamenal v posledných rokoch masívny nárast záujmu v oblasti cielenej rádionuklidovej terapie karcinómu prostaty z dôvodu nadmernej expresie PSMA pri rakovine prostaty s iba obmedzenou expresiou v zdravých tkanivách. V súčasnosti je [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 najvýznamnejším rádiofarmakom zameraným na PSMA pre PET zobrazovanie karcinómu prostaty. Ligand PSMA-617 sa ukázal ako účinný pre terapiu karcinómu prostaty, príp. mCRPR po naviazaní β^- žiariča ^{177}Lu alebo α žiariča ^{225}Ac . Vďaka svojim vynikajúcim charakteristikám sa cieľná rádionuklidová terapia prostredníctvom PSMA stala súčasťou rutínnej klinickej starostlivosti a nahradila predchádzajúci klinický štandard tam, kde sú dostupné potrebné zariadenia a predpisy umožňujú použitie PSMA pred dokončením formálnych skúšok účinnosti a farmaceutických registračných postupov. [4, 6] V rámci Českej republiky liečbu karcinómu prostaty prostredníctvom [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 poskytuje Fakultná nemocnica v Motole a Fakultná nemocnica Olomouc.

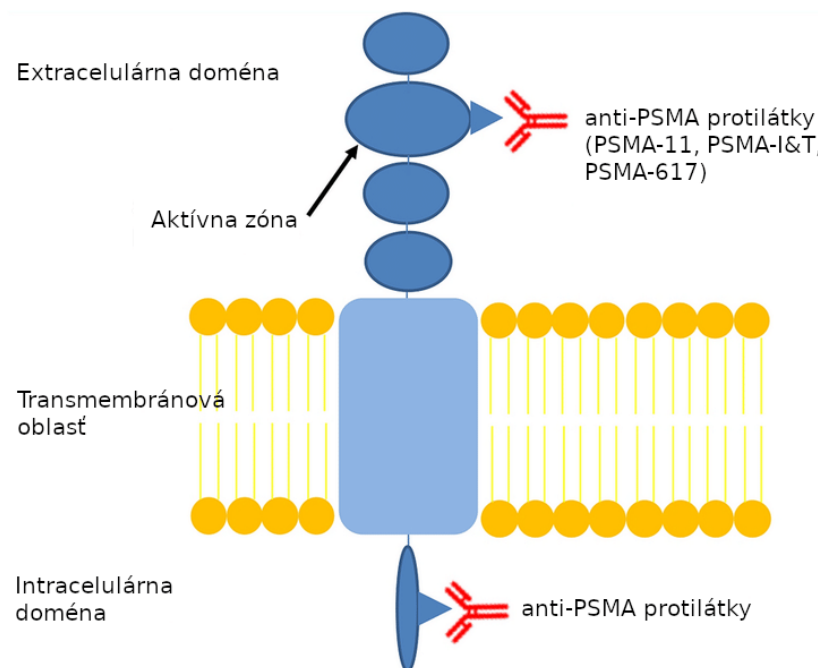
Rádionuklid ^{161}Tb prejavuje veľký potenciál byť budúcim kandidátom na cieľnú rádionuklidovú terapiu karcinómu prostaty. Terbium-161 má podobné vlastnosti a terapeutické využitie ako už úspešne používané ^{177}Lu , pričom oproti nemu sa očakáva zvýšená terapeutická účinnosť, spôsobená väčším zastúpením konverzných a Meitner-Augerových elektrónov na 1 rozpad.

Cieľom tejto práce bolo vypracovanie literárnej rešerše, v ktorej bola popísaná problematika PSMA, cielenej rádionuklidovej terapie, chemické vlastnosti rádionuklidov ^{177}Lu , ^{225}Ac a ^{161}Tb , ich využitie pre terapiu karcinómu prostaty a metodiky značenia. Ďalším cieľom bola príprava rádiofarmák [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 a [^{161}Tb]Tb-PSMA-617 a overenie ich rádiochemickej čistoty pomocou metód TLC a HPLC. V prípade rádiofarmaka [^{161}Tb]Tb-PSMA-617 bolo cieľom nájsť optimálne podmienky značenia, teda vhodný pomer ligandu a kovu; pH a reakčnú dobu. Posledným cieľom bolo vyhodnotenie nameraných dát.

2 Teoretická časť

2.1 Prostatický špecifický membránový antigén

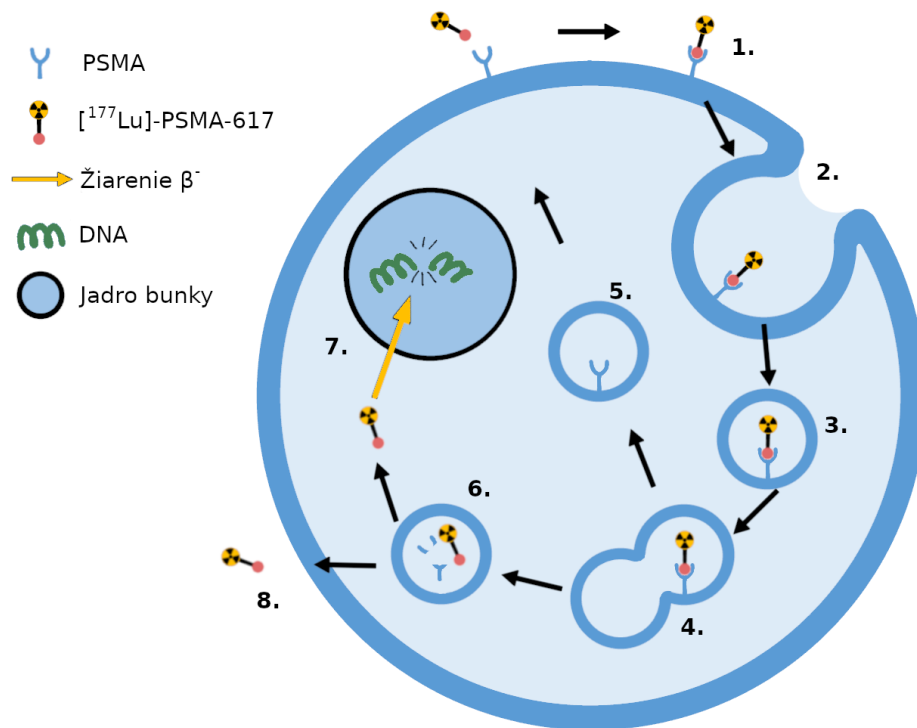
Prostatický špecifický membránový antigén je transmembránový glykoproteín typu II, ktorý je nadmerne exprimovaný na bunkách rakoviny prostaty. Glykoproteíny obsahujú sacharidové reťazce (monosacharidy alebo oligosacharidy) kovalentne pripojené k ich polypeptidovej štruktúre. Ide o interaktívne štruktúry na povrchu všetkých eukaryotických buniek, pričom ich bielkovinová zložka zakotvuje glykoproteín do membrány a sacharidová slúži ako receptor. Mnohé glykoproteíny, ktoré slúžia ako receptory, môžu modulovať alebo prenášať informácie do vnútra bunky. Zatiaľ čo ich peptidová časť je syntetizovaná na ribozóme procesom translácie, sacharidové zložky sú pripájané enzýmovými kotranslačnými a posttranslačnými reakciami, u eukaryot v endoplazmatickom retikulu a Golgiho aparáte. Transmembránový proteín je trvalo integrovaný do lipidovej dvojvrstvy bunkovej membrány a plní zásadnú funkciu membránového transportu. [1, 2, 5]



Obr. 1: Štruktúra PSMA

Typ II transmembránových proteínov je charakterizovaný tým, že membránou prechádza iba raz a N-koniec ($-NH_2$) proteínu sa nachádza na vnútornej strane membrány. Receptor PSMA umožňuje endocytózu naviazaných molekúl rádiofarmaka na bunkovom povrchu do endozomálneho kompartmentu. Hustota expresie tohto transmembránového receptora na bunkách rakoviny prostaty sa ďalej zvyšuje v závislosti od miery agresivity karcinómu prostaty, čo z neho robí ideálny cieľ pre rádionuklidovú terapiu. Prostatický špecifický membránový antigén je charakterizovaný tromi hlavnými segmentami: krátkym N-koncovým intracelulárnym úsekom, transmembránovou doménou a veľkým extracelulárnym úsekom (C- koniec). Extracelulárny segment je najdôležitejší z hľadiska enzymatickej funkcie tohto glykoproteínu, pretože obsahuje katalytickú doménu a väzbové miesto substrátu obsahujúce zinok schopné interakcie so špecifickými inhibítormi. V aktívnom centre inhibítory PSMA tesne interagujú s iónmi zinku a nabitými aminokyselinami. Zlúčeniny, ktoré dobre interagujú s aktívnym centrom, vykazujú potenciál internalizácie po naviazaní. Ukazuje sa, že inhibítory sa uvoľňujú v cytoplazme, zatiaľ čo sa receptor sa vracia na povrch bunky. Internalizovaná molekula sa akumuluje vo vnútri nádorovej bunky a žiarenie charakteristické pre použitý rádionuklid umožňuje zobrazenie alebo terapiu nádoru. Molekuly, ktoré sa špecificky viažu na PSMA a slúžia ako nosiče rádionuklidov, sú dostupné ako PSMA-617, PSMA-11 a PSMA- I&T. Tieto nosiče pozostávajú z inhibítora glutamát-urea-lyzínu, ktorý má vysokú afinitu a špecificitu k PSMA, chelátoru DOTA a linkeru. Či pôjde o diagnostické rádiofarmakum slúžiace na zobrazovanie nádoru prostaty (PSMA-11) alebo terapeutické (PSMA-617 a PSMA-I&T), záleží na tom, ktorý rádionuklid bude do farmaka inkorporovaný. [5-7]

Transportným procesom, akým sa rádiofarmakum dostáva do prostredia bunky, je endocytóza sprostredkovaná receptorom, pričom ako receptor slúži PSMA. Po naviazaní rádiofarmaka [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 na receptor PSMA (1) sa komplex internalizuje do nádorovej bunky (2). Rádiofarmakum naviazané na receptor je transportované cez bunku prostredníctvom endozómov (3), ktoré splývajú s lyzozómami (4). Receptor PSMA sa regeneruje na plazmatickej membráne (5) alebo dochádza k jeho lyzozomálnej degradácii (6). Následne sa rádiofarmakum uvoľní do intracelulárneho priestoru (7) alebo môže difundovať do extracelulárneho priestoru (8). Napriek tomu, že internalizácia rádiofarmaka nie je pre zahubenie nádorovej bunky potrebná (rádionuklidy emitujú žiarenie s priemerným dosahom v mäkkých tkanivách presahujúcim priemer bunky), umožňuje zničenie okolitých rakovinových buniek efektom krížovej paľby. [15, 16]



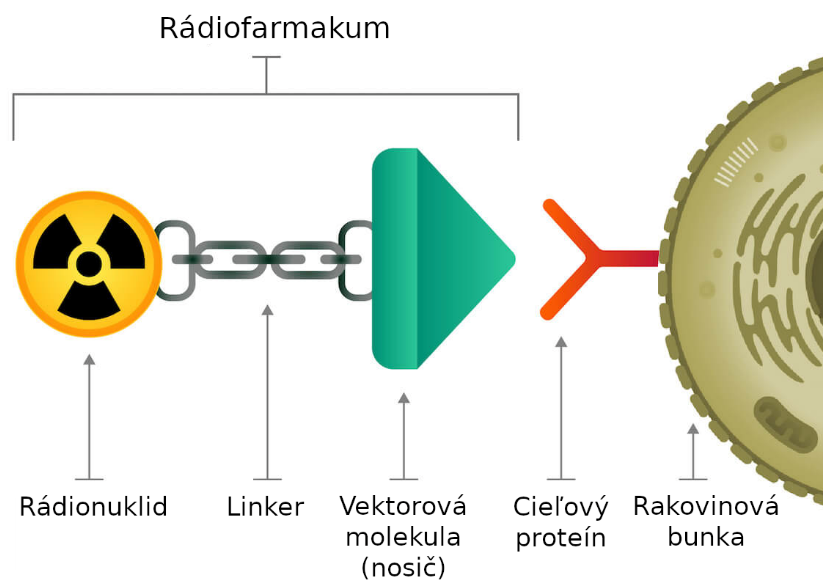
Obr. 2: Endocytóza rádiofarmaka [¹⁷⁷Lu]-PSMA-617 sprostredkovaná PSMA

2.1.1 Prostatický špecifický antigén

Prostatický špecifický antigén je enzým produkovaný bunkami prostaty, ktorý spôsobuje skvapalnenie semena, pričom len jeho malé množstvo sa dostane do krvného obehu. Pokiaľ dôjde k porušeniu vnútornej štruktúry prostatickej žľazy, množstvo PSA, ktoré prestúpi do krvi, sa zväčšuje. Koncentrácia PSA v krvnom sére je jedným z ukazovateľov rakoviny prostaty, teda ide o nádorový marker. Podľa definície sú nádorové markery laboratórne preukázateľné biochemické látky, prítomné v organizme v dôsledku vzniku a vývoja malígneho procesu. Vyššia koncentrácia PSA v krvi však nemusí nutne znamenať prítomnosť karcinómu. Jeho hladina sa zvyšuje aj pri zápaloch prostaty, benígnej hyperplázii prostaty (nezhubné zväčšenie) a pod. Preto je pri zisťovaní prítomnosti nádoru potreba podstúpiť ešte ďalšie vyšetrenia. [40-43]

2.2 Cílená rádionuklidová terapia

Rádiofarmaká sú špeciálnou skupinou liečiv, v ktorých sa rádionuklid naviazaný na nosič podáva inhaláciou, perorálnou, intravenóznou alebo intersticiálnou cestou za účelom diagnostiky alebo terapie pacienta. Rádionuklid sa vyberá na základe typu žiarenia, ktoré emituje. Zlúčeniny používané na diagnostické účely zvyčajne emitujú β^+ alebo γ žiarenie, zatiaľ čo zlúčeniny, ktoré emitujú β^- častice, Meitner-Augerove elektróny alebo α častice, sú vo všeobecnosti používané na terapeutické účely. Rádiofarmakum sa skladá z nosiča a rádionuklidu, ktoré sú spojené linkerom. (Obr. 3) Nosič transportuje rádionuklid do špecifických orgánov, tkanív alebo buniek a môže sa jednať o rôzne typy molekúl – od jednoduchých anorganických zlúčenín, cez zložitejšie organické látky, až po veľmi zložité mAb. Pri navrhovaní rádiofarmaka sa na základe jeho preferenčnej lokalizácie v danom orgáne ako prvý volí nosič a následne sa na molekulu naviaže vhodný rádionuklid. Terapeutické rádiofarmaká sa v súčasnosti používajú na kuratívnu aj paliatívnu liečbu absorpciou žiarenia a následnou deštrukciou nádorových buniek, pričom by sa mali koncentrovať v mieste nádoru a viesť k minimálnemu poškodeniu okolitých buniek. V ideálnom prípade by rádiofarmaká mali selektívne uprednostňovať nádorové tkanivo v porovnaní s normálnym zdravým tkanivom. Medzi významné aplikácie terapeutických rádiofarmák patria liečba rakoviny štítnej žľazy, liečba neuroendokrinných tumorov a paliatívna terapia bolesti z kostných metastáz. [8, 34, 36, 37]



Obr. 3: Štruktúra rádiofarmaka

Cielená rádionuklidová terapia teda využíva rádionuklidy s vysokým LET, ktoré sú konjugované s ligandami zameranými na nadmerne exprimované markery v rakovinovom tkanive, čím selektívne odstraňujú nádory a zároveň šetria zdravé tkanivo. Rádiofarmakum je dodávané do rakovinových buniek alebo do ich mikroprostredia buď priamo, alebo preferovanejšie prostredníctvom nosičov, ktoré sa buď špecificky viažu na endogénne receptory, alebo sa akumulujú širokou škálou fyziologických mechanizmov, čo umožňuje cieleň terapeutický účinok. V porovnaní s takmer všetkými ostatnými možnosťami systémovej liečby rakoviny preukázala cieleň rádionuklidová terapia vysokú účinnosť s minimálnou toxicitou. Vzhľadom k svojim fyzikálnym, chemickým a biologickým špecifikám tvorí samostatnú rádioterapeutickú kategóriu a vykonáva sa na pracoviskách nukleárnej medicíny. Pre dosiahnutie patričného účinku rádionuklidovej terapie je nutné zabezpečiť synergiu dvoch základných faktorov – fyzikálnych a biologických, resp. rádiobiologických. K fyzikálnym faktorom patrí druh emitovaného žiarenia, energia a polčas rozpadu príslušného rádionuklidu. K biologickým, resp. rádiobiologickým faktorom sa radí rádiosenzitivita patologických buniek v porovnaní s bunkami zdravých tkanív a farmakokinetika terapeutických rádiofarmák – ich vychytávanie v cieľových a ostatných tkanivách. [6, 9, 38, 39]

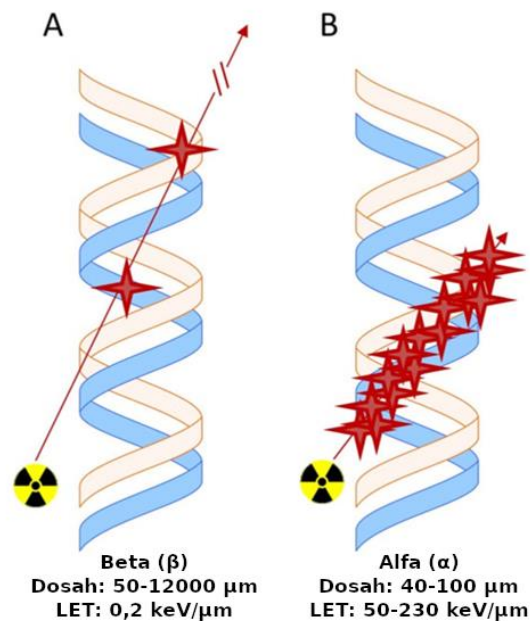
Pre terapiu otvorenými žiaričmi je vhodné iba žiarenie s malou prenikavosťou – krátkym doletom. Najvyužívanejšie je žiarenie β^- , menej využívané je žiarenie α alebo Meitner-Augerove elektróny. Krátky dolet tohto žiarenia v tkanive zabezpečuje, že sa prakticky všetka energia deponuje v cieľovom objeme a účinok je tak lokalizovaný na orgán či oblasť tkaniva, v ktorom sa rádioaktívna látka vychytala, s minimálnym poškodením okolitých zdravých tkanív. K radiačnej záťaži ďalších tkanív a orgánov pacienta môže dochádzať vplyvom čiastočného nežiadúceho vychytávania použitého rádiofarmaka v týchto tkanivách a pri metabolickom spracovaní a clearanci rádiofarmaka. Terapeutické β a α rádionuklidy by mali spĺňať niekoľko kritérií. Rádionuklid by mal mať vysoký podiel korpuskulárnej emisie β či α s nízkou zložkou γ . Žiarenie γ nemá terapeutický účinok. U zmiešaných žiaričov α - γ a β - γ však žiarenie γ môže byť využité na scintigrafické zobrazenie distribúcie rádiofarmaka v organizme. Polčas rozpadu rádionuklidu by mal odpovedať biologickej kinetike cieľového ligandu. Efektívny polčas rozpadu rádiofarmaka, ktorý je výsledkom fyzikálneho polčasu nuklidu a polčasu biologickej eliminácie ligandu, potom určuje dobu terapie. Pokiaľ je dcérsky nuklid tiež rádioaktívny, rozpadá sa premenovou radou. Rozpadový reťazec by nemal obsahovať medziprodukty s dlhým polčasom rozpadu, ktoré by sa mohli uvoľňovať z cieľovej

lézie a spôsobovať radiačnú záťaž zdravých tkanív. Atómy rádionuklidu by mali byť schopné tvoriť stabilné zlúčeniny či konjugáty s potrebnými biomolekulami – rádioligandy. [8, 9]

Pre objemné a heterogénne lézie je vhodné použiť rádionuklid žiarenia β^- s vysokým LET pre efekt tzv. krížovej paľby. Vďaka tomuto efektu dochádza k zničeniu aj tých nádorových buniek, ktoré nie sú v priamom kontakte s naviazaným rádiofarmakom – bunky, ktoré nemajú príslušné receptory alebo k nim rádiofarmakum vo vnútri nádoru neprenikne. Tieto bunky sa dostanú do krížovej paľby žiarenia β^- z internalizovaného rádionuklidu. Pre zničenie nádorových ložísk menších rozmerov, alebo pre nádory infiltrujúce do normálnych tkanív v rozptýlenej forme, by však tento efekt mohol spôsobovať zvýšenú radiačnú záťaž okolitých zdravých buniek. V tomto prípade sú naopak vhodnejšie rádionuklidy žiarenia β^- s nižším LET alebo rádionuklidy žiarenia α . Pre nádorové ochorenia zahrňujúce väčšie a menšie tumory sa skúša tzv. tandemová terapia. Ide o následne podané rádiofarmaká značené α a β^- rádionuklidom alebo dvoma β^- rádionuklidmi, ktoré sa svojimi biologickými účinkami dopĺňajú. Husto ionizujúce žiarenie α môže byť účinné aj voči mikrometastázam či dokonca osamoteným nádorovým bunkám. [11, 12]

Porovnaním α a β^- emitujúcich rádionuklidov z hľadiska použitia pre biologicky cieleňú terapiu možno zdôrazniť nasledujúce rozdiely. Hmotnosť α častíc je približne 7000-krát väčšia ako β^- častíc. Energia α častíc je približne 10-30-krát väčšia než β^- častíc. Elektrický náboj α častíc je v absolútnej hodnote 2-krát väčší než β^- častíc. Hustota ionizácie α častíc je približne 100-krát väčšia než β^- častíc. Efektívny dosah α častíc je podstatne kratší ako β^- častíc. U α častíc je dolet približne 2-5 bunkových priemerov, zatiaľ čo u β^- častíc sú to stovky bunkových priemerov. Z tohto porovnania vyplýva, že α rádionuklidy majú lokálne vyššiu rádiobiologickú účinnosť než β^- rádionuklidy, avšak vzhľadom ku krátkemu dosahu sa u α žiarenia prakticky neuplatňuje efekt krížovej paľby. Častice α s vysokou hustotou ionizácie vyvolávajú v DNA dvojité zlomy, ktoré spravidla vyúsťujú v smrť bunky apoptózou (Obr. 4 B). Elektróny β^- s nízkou hustotou ionizácie spôsobujú v DNA prevažne jednoduché zlomy, ktoré si bunka dokáže opraviť (Obr. 4 A). Pre vyvolanie apoptózy je potreba väčší počet jednoduchých zlomov. K vlastnostiam α žiarenia patrí aj účinok odrazených jadier, kedy pri emisii α častíc dochádza vplyvom akcie a reakcie k spätnému odrazu dcériných jadier. Takto odrazené jadrá sa v tkanive veľmi rýchlo zabrzdia, pričom pozdĺž dráhy spôsobujú hustú ionizáciu látky. Vo vnútri bunky môže v dôsledku odrazu jadier dôjsť k dvojitému zlomu DNA alebo k poškodeniu mitochondrií,

čo môže spustiť apoptózu. Odrazené jadrá tak prispievajú k rádiobiologickej účinnosti α žiarenia a ich účinok je lokalizovaný na veľmi blízke okolie miesta α rozpadu. [9, 10]

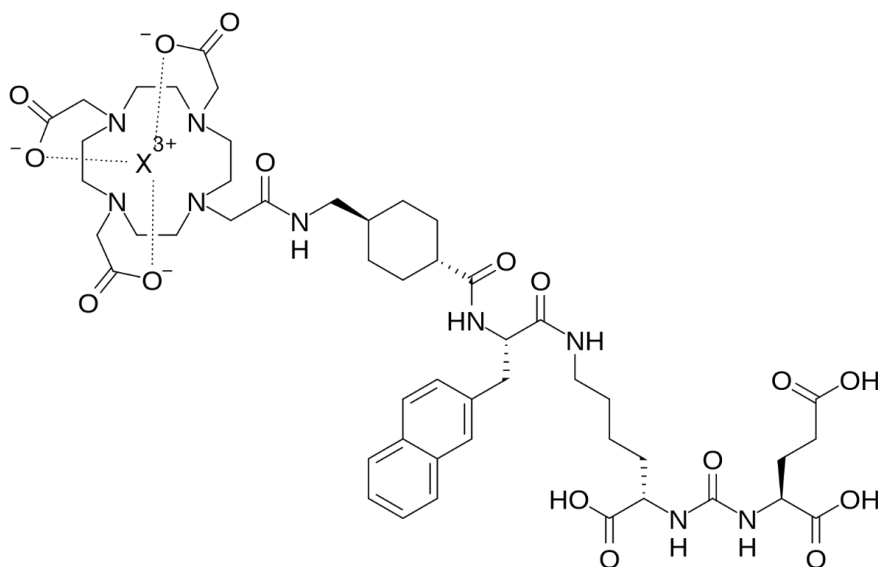


Obr. 4: Poškodenie DNA na základe použitého žiariča

Väčšina α rádionuklidov používaných v nukleárnej medicíne sa premieňa celou rozpadovou radou a po ich aplikácii do organizmu sa chovajú ako *in vivo* rádionuklidové generátory. Výhodou je emisia niekoľkých α častíc s vysokým LET, čo vedie k vysokej rádiobiologickej účinnosti. Určitým problémom u *in vivo* generátorov je redistribúcia dcérskych rádionuklidov, pričom ide o uvoľňovanie dcérskych atómov z chemickej väzby v molekulách rádiofarmaka v dôsledku rozdielnosti chemických vlastností dcérskeho atómu a spätného odrazu jadier pri emisii α častice. Už pri prvej premene α je koordinačná väzba rádionuklidu s ligandom narušená chemickou transformáciou pôvodného atómu a spätným odrazom jadra, a teda nasledujúce α -emitujúce dcérine atómy sú voľné. Pokiaľ k tomu dôjde na povrchu bunky, môže lymfatický a krvný obeh prenášať takto uvoľnenú rádioaktivitu do zdravých tkanív. V prípade, kedy dcérsky atóm počas svojej premeny uniká z cieľového tkaniva, účinnosť terapie sa znižuje o niekoľko nasledujúcich energetických α častíc z rozpadovej rady. Tieto rádionuklidy potom môžu migrovať a vychytávať sa v iných tkanivách kde spôsobujú nežiaducu radiačnú záťaž. Tento efekt môže byť zmiernený, pokiaľ rádioaktívne značený ligand je dostatočne rýchlo internalizovaný. Následne nascentné nabité dcérine atómy, ktoré sú veľmi rádioaktívne, môžu zostávať naviazané v cytoplazme vo vnútri buniek dostatočne dlho na to, aby sa tam opakovane rozpadli a predali svoju radiačnú energiu. Táto internalizácia *in vivo* rádionuklidových generátorov môže obmedziť či zabrániť nežiadúcej redistribúcii

rádionuklidov mimo nádorové tkanivo. Z týchto dôvodov je tiež vhodné, aby rozpadový reťazec použitého rádionuklidu neobsahoval dcérske medziprodukty s dlhším polčasom rozpadu, ktoré by sa mohli uvoľňovať z cieľovej lézie a spôsobovať radiačnú záťaž zdravých tkanív. Potenciálnou ďalšou výhodou α žiarenia je výraznejší abskopálny efekt v porovnaní s β žiarením v predklinických štúdiách. Abskopálny efekt predstavuje regresiu nádoru mimo liečené oblasti. [5, 9]

Okrem žiarenia α , β a γ emitujú niektoré rádionuklidy konverzné a Meitner-Augerove elektróny, ktoré vznikajú vnútornou konverziou fotónov žiarenia γ a charakteristického röntgenového žiarenia vo vnútri atómového obalu, pričom majú podstatne nižšie LET než β žiarenie. Na rozdiel od spojitého spektra elektrónov žiarenia β majú konverzné a Meitner-Augerove elektróny diskrétno spektrum tvorené niekoľkými monoenergetickými líniami. U Meitner-Augerových žiaričov je emitovaných niekoľko elektrónov na jeden rozpad s veľmi krátkym dosahom a v bezprostrednom okolí rádionuklidu tak vzniká lokálne vysoká dávka. Z toho vyplýva, že Meitner-Augerove žiariče majú vysokú rádiobiologickú účinnosť, ktorá sa však môže uplatniť len vtedy, pokiaľ sa rádionuklid rozpadá priamo vo vnútri molekuly DNA danej bunky, kde spôsobujú jej priame a nepriame poškodenie prostredníctvom rádiolýzy vody. Intenzívnymi zdrojmi Meitner-Augerových elektrónov sú hlavne rádionuklidy rozpadajúce sa elektrónovým záchytnom. [10, 12]



Obr. 5: Molekula PSMA-617 viažuca rádionuklid X v trojmocnom stave, kde X je súhrnné označenie pre rádionuklidy ^{177}Lu , ^{225}Ac a ^{161}Tb

2.3 Terapeutické rádionuklidy

2.3.1 Lutécium-177

Atóm lutécia má 71 elektrónov rozdelených do rôznych energetických úrovní, pričom za jeho chemickú reaktivitu sú zodpovedné elektróny, ktoré zaberajú najvyššie a najvzdialenejšie energetické hladiny. Elektróny sú usporiadané v konfigurácii $[\text{Xe}]4f^{14}5d^16s^2$. Po vstupe do chemickej reakcie lutécium zvyčajne stratí svoje dva krajné 6s-elektróny a jeden 5d-elektrón. To ponecháva 14 elektrónov na úrovni f a poskytuje výsledný trojmocný kation. Hladina f so 14 elektrónmi tvorí úplný elektrónový obal, čím tvorí takmer sférickú vrstvu elektrónov obklopujúcu jadro. Vrstva elektrónov je silno priťahovaná vysokým kladným nábojom jadra, ktorý núti elektróny pohybovať sa rýchlosťou blízkou rýchlosti svetla. V súlade s princípmi teórie relativity, objekt, ktorý sa pohybuje rýchlejšie, súčasne zvyšuje svoju hmotnosť, a preto sú elektróny vo vonkajšom obale iónu Lu^{3+} (a vo všeobecnosti v celom rade lantanoidov) masívnejšie ako v iných sériách periodickej tabuľky. Nárast hmoty prináša výrazný pokles energie elektrónov a následne ďalšiu stabilizáciu vonkajších f elektrónov, ktoré sú menej náchylné na vytváranie chemických väzieb s inými prvkami. Tento relativistický efekt spôsobuje dramatické zmenšovanie atómového polomeru - lantanoidovú kontrakciu. V dôsledku toho má lutécium z lantanoidov najkratší atómový polomer. Krátky atómový polomer v kombinácii s kladným nábojom 3+ generuje silné lokálne elektrické pole. Z toho vyplýva, že v chémii Lu^{3+} do značnej miery dominujú iónové interakcie a jeho komplexy sú zvyčajne iónového charakteru, teda tvorené ligandami so silnými donormi, ako sú záporne nabitý kyslík, dusík alebo halogenidy, za tvorby koordinačnej väzby. [59, 60]

Vysoké elektrické pole iónu Lu^{3+} bude silne priťahovať dipolárne molekuly vody, ktoré ho obklopujú zo strany kyslíka a vysoká elektrostatická príťažlivosť môže spôsobiť odstránenie jedného protónu z molekuly vody za zisku hydroxylového aniónu. Pokiaľ sa v okolí iónu Lu^{3+} nachádzajú tri OH^- skupiny, môže sa vyvrázať neutrálny agregát $\text{Lu}(\text{OH})_3$ v podobe drobného pevného prášku, ktorý vo vode zvyčajne nadobúda formu koloidných častíc. V dôsledku vysokého elektrického poľa môže dôjsť k zrážaniu koloidného hydroxidu aj v silne kyslých podmienkach, kde je zvyčajne deprotonácia vody menej pravdepodobná. Pozdĺž série lantanoidov je ión Lu^{3+} najviac ovplyvnený tvorbou koloidu, pretože začiatok zrážania hydroxidu nastáva pri najnižšej hodnote $\text{pH} \sim 3$ v porovnaní s ostatnými lantanoidmi. V prípade Tb^{3+} dochádza k tvorbe hydroxidov pri $\text{pH} > 6,5$. Z tohto dôvodu je potrebné vodné roztoky Lu^{3+} skladovať vo veľmi kyslých podmienkach ($\text{pH} < 3$), aby sa zabránilo koloidnej formácii.

Lutécium-177 je terapeutický rádionuklid emitujúci častice β^- o strednej energii 450 keV za premeny na ^{177}Hf . Pri deexcitácii vzbuđených jadier ^{177}Hf sú emitované fotóny žiarenia γ . Zatiaľ čo β^- žiarenie z rozpadu ^{177}Lu sa používa na usmrtenie nádorových buniek, γ žiarenie sa používa na zobrazovanie tumorov a dozimetrické štúdie. Iónový polomer ^{177}Lu je 86 pm. Tento rádionuklid sa pripravuje ožarovaním neutrónmi v jadrovom reaktore dvoma spôsobmi. Priamy spôsob spočíva v ožarovaní ^{176}Lu neutrónmi v reakcii $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$. Vďaka vysokému účinnému prierezu tejto reakcie je možné získať rádionuklid o pomerne vysokej špecifickej aktivite. Určitou nevýhodou tohto postupu je súčasne prebiehajúca reakcia $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177\text{m}}\text{Lu}$, pri ktorej vzniká jadrový izomér $^{177\text{m}}\text{Lu}$ s polčasom 160 dní. Tento nevítaný kontaminant z 22% deexcituje postupnými izomérnymi prechodmi na základný stav ^{177}Lu a z 88% sa premieňa rádioaktívnou premenou β^- na pomerne vysokoexcitovaný stav (1315 keV) dcérskeho ^{177}Hf . Rádionuklid $^{177\text{m}}\text{Lu}$ emituje rad energií γ , z ktorých niektoré sú rovnaké ako pri ^{177}Lu , avšak sú zastúpené aj vyššie energie. Žiarenie kontaminantu $^{177\text{m}}\text{Lu}$ teda dlhodobo zvyšuje radiačnú záťaž a zhoršuje kvalitu scintigrafických obrazov. Nepriamy spôsob prípravy spočíva v kombinácii neutrónového ožarovania ^{176}Yb neutrónmi v reakcii $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}$ a následnej β^- premeny na výsledné ^{177}Lu , pričom pri tomto spôsobe nevzniká rušivé $^{177\text{m}}\text{Lu}$. [5, 44]

Rádiofarmakum [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 sa skladá z nosiča, ktorým je PSMA-617, organická molekula s chelátorom DOTA schopným viazať ióny rádiokovov, ktoré transportuje do nádorovej bunky, a rádionuklidu ^{177}Lu . Vhodní pacienti pre liečbu pomocou [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 sa vyberajú na základe nadmernej expresie PSA po diagnostike pomocou napr. [^{68}Ga]Ga-PSMA-11. Zohľadňujú sa aj akékoľvek kontraindikácie, medzi ktoré patria supresia kostnej drene alebo porucha funkcie obličiek. V súčasnosti sa terapia rádiofarmakom [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 vykonáva na základe retrospektívnych dôkazov, podľa rozhodnutia lekára alebo v prípadoch, kedy je konvenčná liečba nedostačujúca. V dôsledku distribúcie žiarenia v tele počas rádionuklidovej terapie sú zasiahnuté kritické orgány citlivé na žiarenie, ako sú obličky, slinné žľazy, kostná dreň a pečeň. Vychytávanie žiarenia v kritických orgánoch je jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich počet ošetrení. Aby sa zabránilo vychytávaniu rádiofarmaka v slinných žľazách zabezpečí sa ich podchladenie, avšak špecifické a nešpecifické vychytávanie ligandov zacielených na PSMA v tejto žľaze predstavuje stále problém. Na sledovanie nežiaducich účinkov je u pacientov sledovaný kompletný krvný obraz, hladina sérového kreatinínu, alanínaminotransferázy, hladiny aspartátaminotransferázy pred a po aplikácii liečby [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. Hodnotenie odpovede na liečbu sa vykonáva monitorovaním sérovej alkalickéj fosfatázy a sérovej hladiny PSA. [5, 7, 27-29, 43]

Príprava rádiofarmaka [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 spočíva v označení ligandu PSMA-617 pomocou ^{177}Lu za optimálnych reakčných podmienok. Benešová et. al. [65] značili PSMA-617 lutéciom-177 pri špecifických aktivitách v rozmedzí 5 až 50 MBq/nmol v zmesi octanu sodného (0,5 M, pH 8) a kyseliny chlorovodíkovej (0,05 M). Lutécium-177 bolo rozpustené v 0,05 M kyseline chlorovodíkovej. Reakčnú zmes (pH 4) zahrievali po dobu 10 min pri teplote 95 °C. Pripravené rádiofarmakum vykazovalo vysokú rádiochemickú čistotu >98 % stanovenú metódou HPLC okamžite po jeho príprave. Tento postup značenia použili Müller et. al. na prípravu [^{161}Tb]Tb-PSMA-617 v publikácii [19] za zisku rádiochemického výťažku >99 %.

V roku 2015 vedci z Nemeckého centra pre výskum rakoviny aplikovali [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 v prvej štúdií na ľuďoch. Vzhľadom na vynikajúce ciele vlastnosti a farmakokinetický profil tohto rádiofarmaka podávanie aktivity 7,4 GBq (2 frakcie) [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 jednému pacientovi s mCRPC ukázalo pozitívne výsledky a hladiny PSA klesli z 38,0 na 4,6 ng/ml. Vo všeobecnosti klinické štúdie zaoberajúce sa liečbou karcinómu prostaty pomocou [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 ukazujú, že približne 75 % pacientov vykazuje pokles hladiny PSA. Okrem toho sa u približne 55 % liečených mužov pozorovalo zníženie PSA o viac ako 50 %. Napriek tomu sú údaje z klinických štúdií značne heterogénne, zahŕňajú rôzne liečebné režimy, pokiaľ ide o podanú dávku (v rozmedzí od 3,5 do 8,0 GBq na injekciu [^{177}Lu]Lu-PSMA-617), ako aj o počet dávok podaných (rozsahy od jednej injekcie až po 4–6 injekcií s odstupom 6 týždňov). To pre nás sťažuje interpretáciu účinnosti liečby. Vo výsledku zohrávajú dôležitú úlohu východiskový bod liečby, štádium ochorenia a lokalizácia lézií. Ďalším faktorom, ktorý treba zväžiť pri hodnotení účinnosti liečby, je aplikovaná dávka a počet cyklov, ktoré boli tiež heterogénne v rámci hlásených štúdií. Okrem toho je liečba dobre tolerovaná, pretože nebola pozorovaná toxicita v životne dôležitých orgánoch a závažná hematotoxicita bola hlásená len vo veľmi malom počte prípadov. Publikované údaje klinickej štúdie VISION s 831 pacientmi naznačujú, že [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 významne zlepšuje celkové prežitie u mužov s mCRPC, znižuje riziko úmrtia o 38 % a redukuje progresiu ochorenia o 60 %. V roku 2022 bolo rádiofarmakum schválené Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA). [6, 62-64]

2.3.2 Aktínium-225

Aktínium-225 patrí medzi aktinoidy a najčastejšie sa vyskytuje v trojmocnom stave. Atóm aktínia má 89 elektrónov a iónový polomer Ac^{3+} je 112 pm. Oxidačný stav 3 vyplýva z jeho elektrónovej konfigurácie $[\text{Rn}]6d^17s^2$ s tromi valenčnými elektrónmi, ktoré sa ľahko odštepujú, aby poskytli stabilnú uzavretú štruktúru vzácneho plynu radónu. Kation Ac^{3+} je najväčší zo všetkých známych trojmocných kationov, s čím je spojená problematika s identifikáciou takého chelatačného činidla, ktoré by rýchlo a nevratne viazalo ^{225}Ac s vysokým výťažkom. Využitie ^{225}Ac pre cieleú rádionuklidovú terapiu bolo spoiatku obmedzené práve z dôvodu ťažkostí pri výbere vhodného chelatačného činidla. Koordinačná väzba medzi atómom kovu a molekulou chelátoru nebola dostatočne silná, dochádzalo k uvoľneniu atómu kovu, čo následne viedlo k renálnej toxicite vyvolanej prítomnosťou ^{213}Bi s dlhšou životnosťou. Problém retencie v kritických orgánoch citlivých na žiarenie je spôsobený aj efektom spätného odrazu jadra, kedy celkové množstvo energie uvoľnenej pri α rozpade v dôsledku spätného odrazu dcérskeho jadra presahuje 10 000 chemických väzieb. Vo vývoji chelátorov, ktoré tvoria termodynamicky stabilné a kineticky inertné komplexy s ^{225}Ac , nastal významný posun. Efekt spätného odrazu však zostáva neprekonateľnou výzvou vzhľadom na konvenčné chelatačné stratégie. [45, 46, 61]

Vysoká hodnota konštanty hydrolyzy Ac^{3+} ($\sim 9,4$) naznačuje, že hydrolyza nenastane, kým pH nie je vyššie ako 9. Na porovnanie lantanoidy Lu^{3+} a Tb^{3+} majú nižšiu hodnotu konštanty hydrolyzy, teda ku koordinácii vody dochádza pri kyslejšom pH. Z hľadiska značenia pomocou ^{225}Ac poskytujú zásadité roztoky vysoké rádiochemické výťažky, pretože dochádza k malej tvorbe AcOH_2 . Aktínium-225 sa premieňa na ^{221}Fr a ďalšie rádioaktívne premeny ^{221}Fr potom pokračujú celým rozpadovým radom až na ^{209}Bi . Rozpadový reťazec ^{225}Ac funguje ako *in vivo* rádionuklidový generátor, pričom neobsahuje dlhodobější dcérske rádionuklidy, ktoré by zvyšovali riziko predčasného úniku rádionuklidu z cieľového tkaniva. Pri jednej úplnej rádioaktívnej premene jadra ^{225}Ac v celom rozpadovom rade až na stabilný ^{209}Bi sa uvoľní celková energia 31 MeV (stredná energia 6,9 MeV), ktorá je z asi 95% odnášaná štyrmi α časticami, z 3% elektrónmi a z asi 1% fotónmi γ a röntgenovým žiarením, čo spolu s dlhým polčasom 9,918 dní spôsobuje významný cytotoxický účinok. Vysoké LET spolu s krátkym stredným dosahom žiarenia α v ľudskom tkanive vedie k viacnásobným zlomom dvojvláknovej DNA, ktoré sú do značnej miery nezávislé od bunkového cyklu a stavu ich okysličovania, pričom okolité nepostihnuté tkanivá zostávajú relatívne nepoškodené. Aktínium-225 ponúka alternatívnu formu terapie, kedy konvenčné terapie (ako je chemoterapia alebo externé

ožarovanie) vyústili k rezistencii buniek, ďalej v prípadoch, kedy pacient má zničenú kostnú dreň, u rezistentnej formy karcinómu alebo v prípade neuspokojujúcich výsledkov terapie pomocou β^- žiaričov. Rádionuklid ^{225}Ac možno získať ako produkt rádioaktívnej premeny $^{229}\text{Th}(\alpha, T_{1/2} = 7340 \text{ rokov}) \rightarrow ^{225}\text{Ra}(\beta^-, T_{1/2} = 14,8 \text{ dní}) \rightarrow ^{225}\text{Ac}$. Tórium-229 je získavané α premenou ^{233}U , ktorého zásoby sú však veľmi obmedzené. Iný spôsob prípravy ^{225}Ac predstavuje ožarovanie ^{225}Ra v cyklotróne protónmi reakciou $^{225}\text{Ra}(p,n)^{225}\text{Ac}$. Niektoré centrá uprednostňujú liečbu pacientov s postihnutím prevažne mäkkých tkanív pomocou ^{177}Lu a pacientov s rozsiahlym postihnutím skeletu (s postihnutím alebo bez postihnutia mäkkých tkanív) vyhradzuje na liečbu pomocou ^{225}Ac . Voľba by samozrejme bola ďalej usmerňovaná tým, aké sú odporúčania lekárov a čo je k dispozícii. [5-7, 18, 30-33, 47]

Shukurov et. al. [67] pripravili [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 v pufri zloženom z askorbanu sodného a kyseliny askorbovej o výslednom pH 7,5. Aktínium-225 bolo rozpustené v 0,1 M kyseline chlorovodíkovej. Reakčnú zmes zahrievali po dobu 25 min pri teplote 90 °C. Po vychladnutí bola reakčná zmes prevedená cez kondicionú patrónu C18, pričom bolo vymyté voľné ^{225}Ac . Reakčná zmes bola z patróny vymytá 70 % etanolom a následne prevedená do fyziologického roztoku s DTPA. Pripravené rádiofarmakum vykazovalo vysokú rádiochemickú čistotu >99 % stanovenú metódou TLC. Ako mobilná fáza bol použitý 0,1 M octan amonný a metanol v pomere 1:1 alebo 0,1 M citrát sodný.

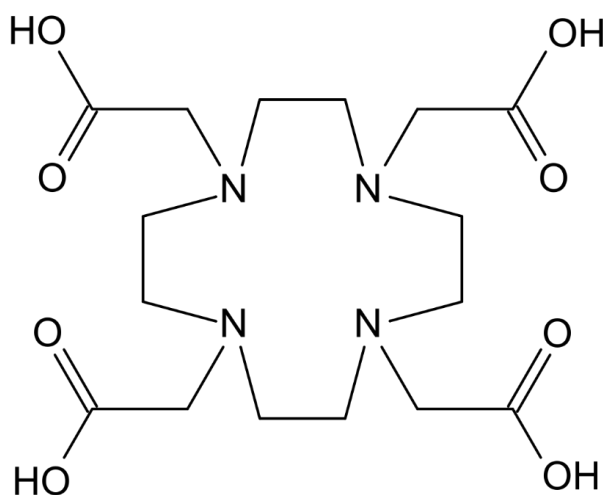
Prvá štúdia cielenej rádionuklidovej terapie karcinómu prostaty u ľudí bola publikovaná v roku 2016. Dvomi pacientom s mCRPC so štandardnou premedikáciou bolo podaných 100 kBq/kg [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 v dvojmesačných intervaloch po potvrdení prítomnosti PSA pomocou [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 PET/CT. Prvý pacient nebol na liečbu vhodný kvôli difúznej infiltrácii červenej kostnej drene a druhého sa prejavovala rezistencia voči [^{177}Lu]Lu-PSMA-617. U oboch pacientov klesla hodnota PSA pod merateľnú hladinu, no zároveň došlo k prejavom xerostómie. Druhá štúdia so 14 pacientmi s mCRPC zistila, že liečebná aktivita 100 kBq/kg [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 na cyklus každých 8 týždňov bola najoptimálnejšia. Tento štandardizovaný liečebný protokol pre [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 sa rutinne používa ako záchranná terapia pre pacientov v konečnom štádiu v iných štúdiách. V ďalšej štúdiu bola hodnotená účinnosť [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 u 40 pacientov s mCRPC, ktorá preukázala pokles PSA o viac ako 50 % u 63 % pacientov s mediánom trvania kontroly nádoru 9 mesiacov. Medián celkového prežívania bol viac ako 12 mesiacov. Väčšina pacientov s mCRPC bola pred liečbou pomocou [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 intenzívne pred liečená chemoterapiou, rádioterapiou a androgénovou depriváčnou terapiou. Liečba pomocou

[²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 preukázala významnú regresiu mozgových metastáz, pretože rádiofarmakum prechádza hematoencefalickou bariérou a akumuluje sa v nich. Z toho možno usúdiť, že rádiofarmakum [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 má významný terapeutický potenciál pre pacientov s rakovinou prostaty s metastázami v mozgu. [47-52]

Xerostómia predstavuje častý vedľajší účinok terapie pomocou [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617, ktorý spôsobuje, že časť pacientov (10–25 %) liečbu ukončí. Preto je potrebné xerostómii predchádzať napr. znížením podanej aktivity [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 alebo zmenou počtu cyklov. Očakávalo sa, že externé chladenie slinnej žľazy pomocou ľadových vrecúšok od 30 minút pred infúziou do 2 hodín po infúzii rádiofarmák zníži vychytávanie rádioligandov PSMA v dôsledku vazokonstrikcie. Relatívny príspevok chladenia slinných žliaz a zníženej aktivity [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 však zostáva nejasný. Kvôli fyziologickej expresii PSMA v obličkách a prevažne renálnej exkrécii [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 existuje obava z možnej radiačnej toxicity pre obličky, ktorá môže spôsobiť akútne a dlhodobé účinky. Ďalším prístupom k zníženiu toxicity v slinných žľazách a obličkách je použitie protilátok (napr. J591) namiesto molekuly PSMA. Protilátka J591 sa viaže na iné miesto PSMA v porovnaní s ligandami PSMA a má oveľa nižšiu distribúciu v slinných žľazách a obličkách. Ak rádiofarmakum na povrchu rakovinových buniek nie je po naviazaní dostatočne internalizované, [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 s viacerými nestabilnými dcérskymi rádionuklidmi môže mať na organizmus toxický účinok a jeho terapeutický potenciál sa podstatne zníži. Na vyhodnotenie stability, retenčných časov a intracelulárnej lokalizácie [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 v rakovinových bunkách a obličkách sú potrebné ďalšie štúdie. Obmedzená dostupnosť ²²⁵Ac je hlavnou výzvou pre jeho klinické použitie. Mnohé výskumné centrá skúmajú možnosť priemyselnej výroby ²²⁵Ac. V budúcnosti by sa mohla zvýšená výroba ²²⁵Ac dosiahnuť použitím vysokoprúdového cyklotrónového alebo elektrónového lineárneho urýchľovača. [47-49, 53-58]

2.3.3 Terbium-161

Terbium-161 má podobné vlastnosti a terapeutické využitie ako už úspešne používané ^{177}Lu , pričom oproti nemu sa očakáva zvýšená terapeutická účinnosť, spôsobená väčším zastúpením konverzných a Meitner-Augerových elektrónov na 1 rozpad. Najčastejšie vyskytuje ako trojmocný kation Tb^{3+} , ktorého iónový polomer je 92 pm (len o 7% väčší ako iónový polomer Lu^{3+}). Z toho dôvodu chelátory vhodné pre ^{177}Lu možno priamo použiť aj pre ^{161}Tb , najmä DOTA, ale aj iné.



Obr. 6: Makrocyclický ligand 1,4,7,10-tetra-azacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina (DOTA) je jedným z najdôležitejších chelátorov pre prípravu rádiofarmák. DOTA je 12-členný oktaedentátový makrocyclus. Tento ligand sa široko používa na stabilnú cheláciu rádiokovov v trojmocnom stave, ako sú ^{68}Ga , ^{177}Lu , ^{161}Tb a ^{225}Ac .

Terbium-161 je umelo pripravovaný rádionuklid patriaci medzi lantanoidy, ktorý sa s polčasom 6,953 dní rozpadá premenou β^- o strednej energii 154 keV na ^{161}Dy . Jeho polčas rozpadu 6,647 dní (o 7,344 hodín dlhší ako polčas ^{177}Lu). Okrem β^- emisie vykazuje emisiu konverzných a Meitner-Augerových elektrónov, čím celkovo vyžaruje asi 2,27 elektrónov s energiami nad 3 keV na jeden rozpad. Pri deexcitácii vzбудených jadier ^{161}Dy sú emitované fotóny žiarenia γ o veľkosti 74,6 keV umožňujúce vznik scintigrafického zobrazenia tkanív a orgánov, kam terapeutický preparát prenikol. Na týchto scintigrafických obrazoch môžeme posudzovať vizuálne aj kvantitatívne mieru žiaduceho vychytávania rádiofarmaka v nádorových ložiskách a nežiaduce akumulácie v zdravých tkanivách a kritických orgánoch. [19-22, 26]

Rádionuklid ^{161}Tb sa pripravuje v jadrovom reaktore neutrónovým ožarovaním gadolína vysoko obohateného izotopom ^{160}Gd reakciou $^{160}\text{Gd}(n,\gamma)^{161}\text{Gd}(\beta^-, T_{1/2} 3,6 \text{ min.}) \rightarrow ^{161}\text{Tb}$. Prírodné gadolínium pozostáva iba z 21,66 % cieľového izotopu ^{160}Gd . Z toho dôvodu je potrebné materiál pred ožarovaním vysoko obohatiť. Prítomnosť stabilného izotopu ^{158}Gd (24,84 %) v ^{160}Gd vedie k akumulácii stabilného ^{159}Tb počas ožarovania prostredníctvom reakcie $^{158}\text{Gd}(n,\gamma)^{159}\text{Gd} \rightarrow ^{159}\text{Tb}$ (stabilné), ktorá znižuje dosiahnuteľnú špecifickú aktivitu ^{161}Tb . Výsledky štúdie ukazujú, že ^{161}Tb poskytuje dvakrát až trikrát vyšší prenos energie v malých objemoch (10–100 μm) ako ^{177}Lu v dôsledku vysokej zložky konverzných a Meitner-Augerových elektrónov. Dá sa teda očakávať, že zlúčeniny značené ^{161}Tb môžu mať vyššiu protinádorovú účinnosť, najmä pri liečbe malých zhlukov nádorových buniek alebo dokonca pri cielení na jednotlivé bunky. Výsledky teoretických výpočtov vykonaných v ďalšej štúdií tiež naznačujú, že ^{161}Tb prekonáva iné klinicky používané (^{177}Lu , ^{90}Y) a neštandardné terapeutické rádionuklidy (^{47}Sc , ^{67}Cu) s ohľadom na dodávanie rádiofarmaka do malých lézií.

[22-25]

3 Experimentálna časť

3.1 Použité chemikálie

Na značenie a následnú analýzu boli použité chemikálie: kyselina chlorovodíková, p.a. (VWR Chemicals), kyselina octová, p.a. (VWR Chemicals), kyselina trifluóroctová (Sigma- Aldrich), acetonitril, p.a. (VWR Chemicals), metanol, p.a. (VWR Chemicals), kyselina dietyléntriámín-pentaoctová, p.a. (Sigma-Aldrich), octan sodný bezvodný, p.a. (Sigma- Aldrich), octan amónny, p.a. (Sigma-Aldrich), dimetylsulfoxid, p.a. (Lach-Ner). Ultračistá voda (18 M Ω ·cm pri 25 °C) bola získavaná z prístroja Direct-Q (Merck Milipore). Na zaistenie inertnej atmosféry boli použité plyny argón, metán a izobután (Linde Gas) o čistote 99,99 %. Diagnostický ligand PSMA-11 pochádzal od spoločnosti ABX. Terapeutický ligand PSMA- 617 pochádzal od Dr. M. Benešovej.

Gálium-68 bolo získané elúciou $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru (Eckert & Ziegler) pomocou 0,1 M HCl a následne zakoncentrované na extrakčnej kolóne Chromafix SA (Macherey-Nagel). Táto kolóna sa používa na extrakciu pomocou tuhej fázy pri malom objeme vzoriek, pričom ide o silne kyslý katex na báze silikagélu s modifikáciou kyseliny benzénsulfónovej. Zásobný roztok [^{161}Tb]TbCl₃ bol pripravený na Katedre jadrovej chémie Fakulty jadrového a fyzikálneho inžinierstva Českého vysokého učenia technického v Prahe doc. RNDr. Jánom Kozempelom, PhD., Ing. Mariou Skálovou, Ing. Terezou Janskou a Bc. Matějom Štíbrm.

3.2 Použité prístroje

Aktivita rádionuklidov bola meraná na ionizačnej komore Curiementor 3 (PTW). Na analýzu značenia ligandu PSMA-11 pomocou ^{68}Ga a ligandu PSMA-617 pomocou ^{161}Tb boli použité ako stacionárna fáza iTLC-SG dosky (12x1 cm, Agilent Technologies) a ako mobilná fáza bol použitý 0,1 octan amónny a metanol v pomere 1:1. Vyhodnotenie dosiek bolo vykonané pomocou elektronickej autorádiografie na prístroji Bioscan AR-2000 Imaging Scanner (Canberra Packard). Ako nosný plyn bol použitý argón, metán a izobután a meranie bolo vyhodnotené v programe WinScan. Ďalšia metóda, ktorá bola použitá na analýzu značenia bola HPLC. Kvapalinový chromatograf pozostával z dvoch vysokotlakových čerpadiel (SDS 020 a SDS 030, Watrex), autosampleru (Spectra Physics), UV-VIS detektoru (UltiMate 3000, Thermno Scientific), rádiometrického detektoru (Ramona, Elysia Raytest), kvartérnych púmp s odplyňovačom (DG 3014, ECOM), zmiešavaču mobilných fáz (SunChrom), monolitckej

kolóny s reverznou fázou (Reprosil 100 C18, 5 μm , 3x250 mm, Watrex) a uzatvárateľných vialiek so septom pre nástrek vzorky (VWR). K chromatografu bol pripojený počítač s programom Clarity na vyhodnotenie dát. Mobilná fáza pozostávala z 0,1 % kyseliny trifluóroctovej v ultračistej vode (A) a acetonitrilu (B) s použitím lineárneho gradientu rozpúšťadla A (95–20 % po dobu 15 minút) v rozpúšťadle B pri prietokovej rýchlosti 0,6 ml/min. Zmes pufru a ligandu bola pred pridaním rádionuklidu premiešaná na vortexe (TTS 2, Yellow Line). Reakčná zmes bola zahrievaná a miešaná na inkubovanej miešačke (Biosan).

3.3 Značenie PSMA-11 gáliom-68

Zásobný roztok [^{68}Ga]GaCl₃ bol získaný elúciou $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru pomocou 0,1 M HCl o objeme 5 ml. Extrakčná kolóna Chromafix SA pred samotným značením kondicionovaná prepláchnutím 1 M HCl o objeme 1 ml. Gálium-68 bolo na kolóne zakoncentrované a následne vymyté pomocou 300 μl 1 M HCl. Značenie prebiehalo podľa návodu uvedeného v publikácii [66]. Do 1,5 ml scintilačnej vialky bolo pridaných 450 μl 1 M acetátového pufru a 30 μl 1 mM PSMA-11. Po premiešaní na vortexe bolo k zmesi pridaných 300 μl zásobného roztoku [^{68}Ga]GaCl₃ v 1 M HCl o aktivite ~ 58 MBq. Reakčná zmes o pH 4 bola zahrievaná po dobu 10 min pri teplote 95°C na miešačke.

3.4 Značenie PSMA-617 terbiom-161

Značenie PSMA-617 ^{161}Tb bolo vykonané podľa publikácie [19] pre pH 4,5 pri špecifických aktivitách $a \leq 71,2$ MBq/nmol, pričom bolo zistené, že pri pomere ligandu a kovu 33:1 dochádza k znižovaniu výťažku z pôvodných >99 % na ~ 95 % (Tab. 3). Táto oblasť bola preskúmaná pre rozmedzie pH 3-6 (Tab. 4-7). Na prípravu reakčnej zmesi boli použité chemikálie 0,05 M HCl a 0,5 M CH₃COONa, pričom použité objemy na zaistenie vhodného pH reakčnej zmesi sú uvedené v Tab 2. Ďalej bolo použité PSMA-617 o koncentráciách 0,05; 1 a 10 mM a zásobný roztok [^{161}Tb]TbCl₃ pripravený rozpustením ^{161}Tb v 0,05 M HCl. Zásobný roztok PSMA-617 o danej koncentrácii bol pripravený navážením a následným rozpustením príslušného množstva PSMA-617 v rozpúšťadle DMSO (Tab. 1) a bol uchovávaný v mrazničke. Reakčná zmes bola zahrievaná a trepaná po dobu 10 min pri teplote 95 °C na miešačke.

Tab. 1: Hmotnosť (m) PSMA-617 a objem (V) DMSO použité na prípravu roztoku PSMA-617 o danej koncentrácii (c)

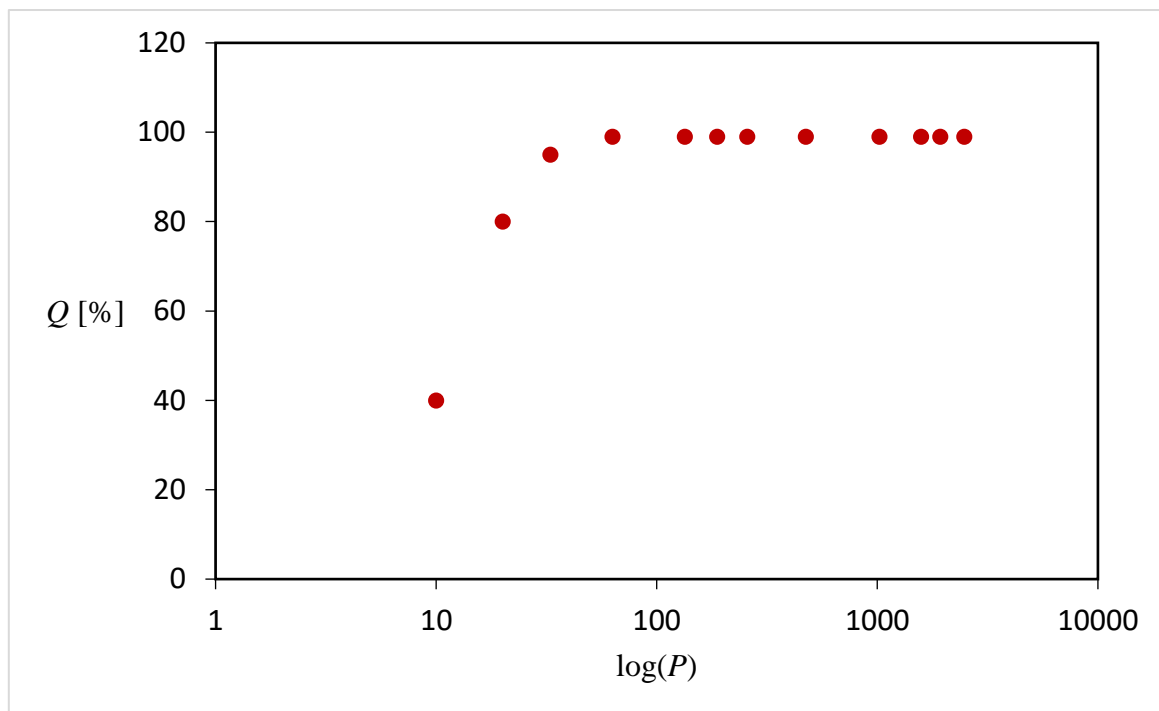
$c(\text{PSMA-617})$ [mM]	$m(\text{PSMA-617})$ [mg]	$V(\text{DMSO})$ [ml]
0,05	0,4	7,754
1,00	1,6	1,536
10,00	1,6	0,154

Tab. 2: Objemy (V) kyseliny chlorovodíkovej o koncentrácii 0,05 M a octanu sodného o koncentrácii 0,5 M použité na získanie daného pH reakčnej zmesi

pH	$V(\text{HCl})$ [μl]	$V(\text{CH}_3\text{COONa})$ [μl]
3,0	100	10
4,5	100	20
5,5	100	70
6,0	40	70

Tab. 3: Pomer (P) ligandu (L) a kovu (K), špecifická aktivita (a) a výťažok značenia (Q) pre pH 4,5 pri použitých množstvách PSMA-617 a [^{161}Tb]TbCl₃

Číslo vzorky	PSMA-617 (L)			[^{161}Tb]TbCl ₃ (K)		$P(L/K)$	a [MBq/ nmol]	Q [%]
	V [μl]	c [mM]	n [nmol]	A [MBq]	n [nmol]			
1	2,5	10	0,25	7,0	0,010	2482:1	0,28	>99
2	2,5	10	0,25	9,0	0,013	1930:1	0,36	>99
3	2,5	10	0,25	11,0	0,016	1579:1	0,44	>99
4	2,5	1	2,50	1,7	0,003	1022:1	0,68	>99
5	1,5	10	0,15	22,0	0,032	474:1	1,47	>99
6	2,0	1	2,00	5,4	0,008	257:1	2,70	>99
7	1,0	10	0,10	37,0	0,053	188:1	3,70	>99
8	2,5	1	2,50	13,0	0,019	134:1	5,20	>99
9	0,5	10	0,05	55,0	0,079	63:1	11,00	>99
10	2,5	1	2,50	52,0	0,075	33:1	20,80	~95
11	1,5	1	1,50	52,0	0,075	20:1	34,67	~80
11	0,5	1	0,50	35,6	0,051	10:1	71,20	~40



Obr. 7: Závislosť výťažku značenia (Q) na logaritme pomeru (P) látkových množstiev použitého PSMA-617 a $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$

Tab. 4: Pomer (P) ligandu (L) a kovu (K), špecifická aktivita (a) a výťažok značenia (Q) pre pH 3 pri použitých množstvách PSMA-617 a $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$

Číslo vzorky	PSMA-617 (L)			$[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ (K)		$P(L/K)$	a [MBq/ nmol]	Q [%]
	V [μl]	c [mM]	n [nmol]	A [MBq]	n [nmol]			
1	5	0,05	0,25	4,9	0,071	36:1	20	<1
2	3	0,05	0,15	4,8	0,069	22:1	32	<1
3	2	0,05	0,10	5,6	0,081	12:1	56	<1

Tab. 5: Pomer (P) ligandu (L) a kovu (K), špecifická aktivita (a) a výťažok značenia (Q) pre pH 4,5 pri použitých množstvách PSMA-617 a $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$

Číslo vzorky	PSMA-617 (L)			$[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ (K)		$P(L/K)$	a [MBq/ nmol]	Q [%]
	V [μl]	c [mM]	n [nmol]	A [MBq]	n [nmol]			
1	5	0,05	0,25	4,8	0,069	36:1	19	>99
2	3	0,05	0,15	4,8	0,069	22:1	32	~80
3	2	0,05	0,10	5,2	0,075	13:1	52	~50

Tab. 6: Pomer (P) ligandu (L) a kovu (K), špecifická aktivita (a) a výťažok značenia (Q) pre pH 5,5 pri použitých množstvách PSMA-617 a $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$

Číslo vzorky	PSMA-617 (L)			$[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ (K)		$P(L/K)$	a [MBq/ nmol]	Q [%]
	V [μl]	c [mM]	n [nmol]	A [MBq]	n [nmol]			
1	5	0,05	0,25	5,5	0,079	32:1	22	~27
2	3	0,05	0,15	5,2	0,075	20:1	35	~18
3	2	0,05	0,10	5,4	0,078	13:1	52	~9

Tab. 7: Pomer (P) ligandu (L) a kovu (K), špecifická aktivita (a) a výťažok značenia (Q) pre pH 6 pri použitých množstvách PSMA-617 a $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$

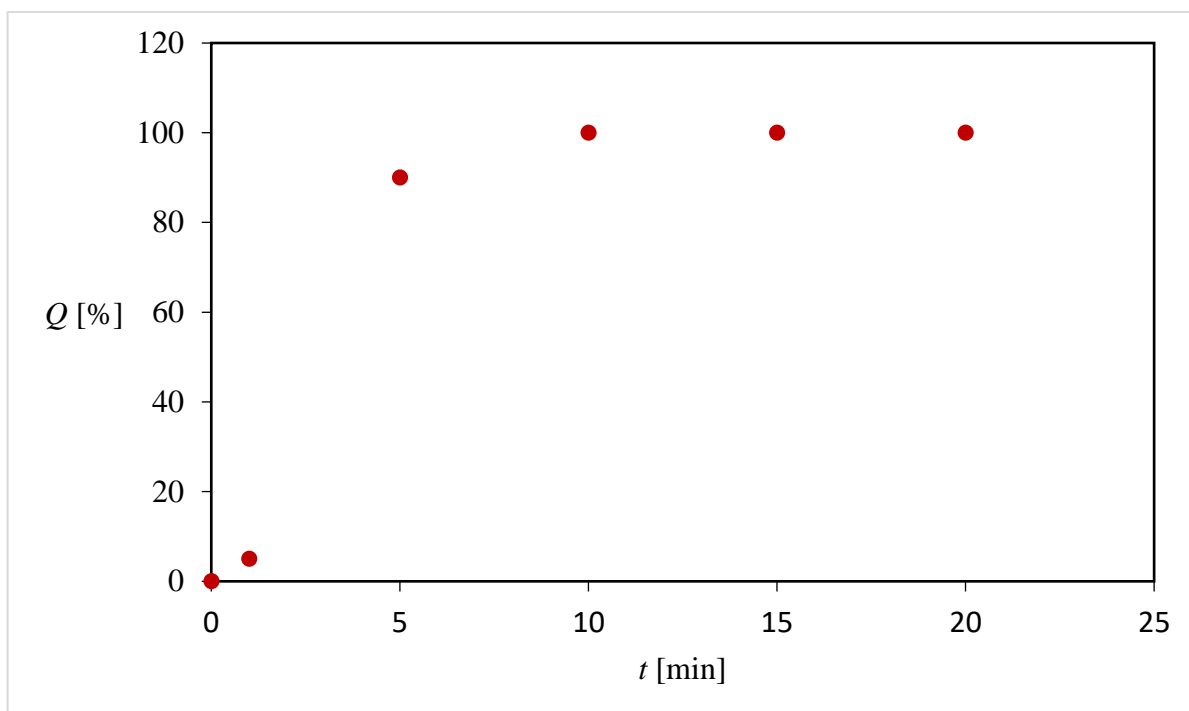
Číslo vzorky	PSMA-617 (L)			$[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ (K)		$P(L/K)$	a [MBq/ nmol]	Q [%]
	V [μl]	c [mM]	n [nmol]	A [MBq]	n [nmol]			
1	5	0,05	0,25	5,4	0,078	32:1	22	~12
2	3	0,05	0,15	4,7	0,068	22:1	31	~7
3	2	0,05	0,1	5,0	0,072	14:1	50	<1

3.4.1 Kinetika značenia

Bola sledovaná kinetika značenia pre rôzne dlhú dobu zahrievania reakčnej zmesi pri teplote 95°C . Na štúdium kinetiky bola zvolená vzorka č. 1 v Tab. 5 s najvyšším výťažkom značenia. Výsledky sú uvedené v Tab. 6 a znázornené na Obr. 8.

Tab. 8: Doba zahrievania reakčnej zmesi (t) a výťažok značenia (Q)

t [min]	Q [%]
0	<1
1	~5
5	~90
10	>99
15	>99
20	>99



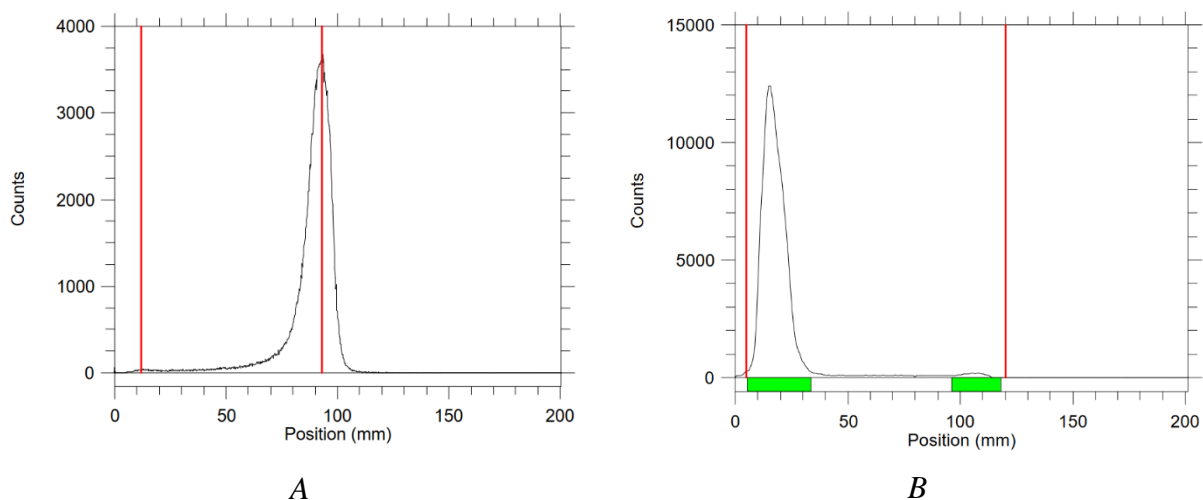
Obr. 8: Závislosť výťažku značenia (Q) na dobe zahrievania reakčnej zmesi (t)

3.5 Kontrola rádiochemickej čistoty rádiofarmák

3.5.1 Stanovenie rádiochemickej čistoty pomocou TLC

Rádiochemická čistota rádiofarmák bola stanovená pomocou TLC a meraná ihneď po rádioaktívnom značení ligandov príslušným rádionuklidom. Po ubehnutí reakčnej doby bolo malé množstvo reakčnej zmesi (1-3 μ l) prevedené na iTLC-SG dosku do vzdialenosti cca 1 cm od okraja. Doska (stacionárna fáza) bola následne ponechaná vyvíjať v mobilnej fáze po dráhe ~10 cm pokým nedosiahla fronty.

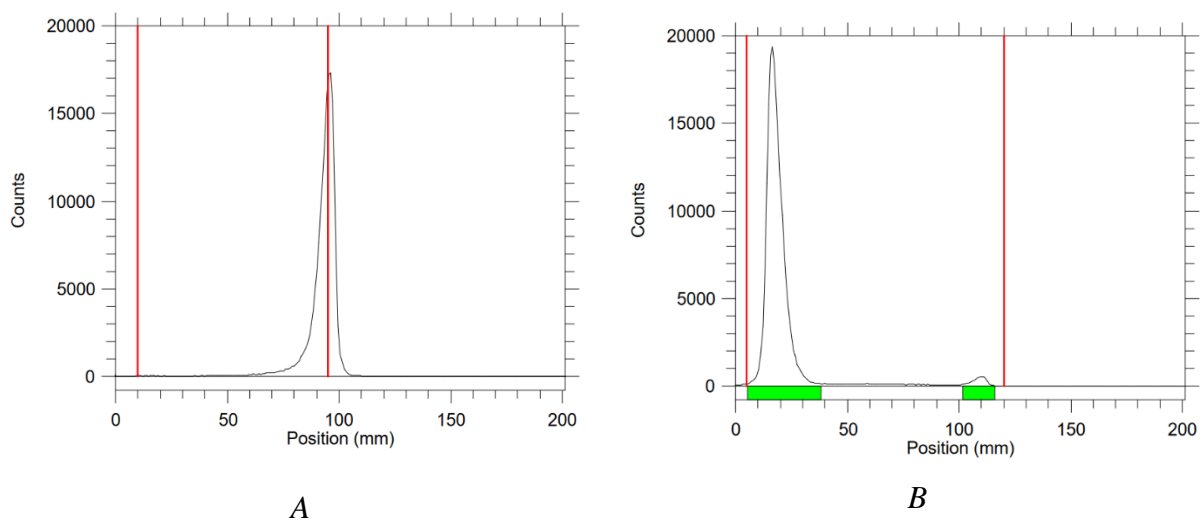
V prípade [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 náležal intenzívny pík na konci cieľovej línie (fronty) s $R_F=0,775$ označenému ligandu, pričom pík nenaviazaného ^{68}Ga nebol pozorovaný (Obr. 9 A). Chromatogram roztoku [^{68}Ga]GaCl₃ je uvedený na Obr. 9 B, kde intenzívny pík na počiatku štartovnej línie s $R_F=0,130$ patril voľnému ^{68}Ga .



Obr. 9: Rádiochromatogram ^{68}Ga značenej vzorky $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ (A).

Rádiochromatogram $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ (B).

V prípade $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-PSMA-617}$ náležal intenzívny pík na konci cieľovej línie (fronty) s $R_F=0,873$ označenému ligandu, pričom pík nenaviazaného ^{161}Tb nebol pozorovaný (Obr. 10 A). Chromatogram roztoku $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ je uvedený na Obr. 10, kde intenzívny pík na počiatku štartovnej línie s $R_F=0,128$ patril voľnému ^{161}Tb .



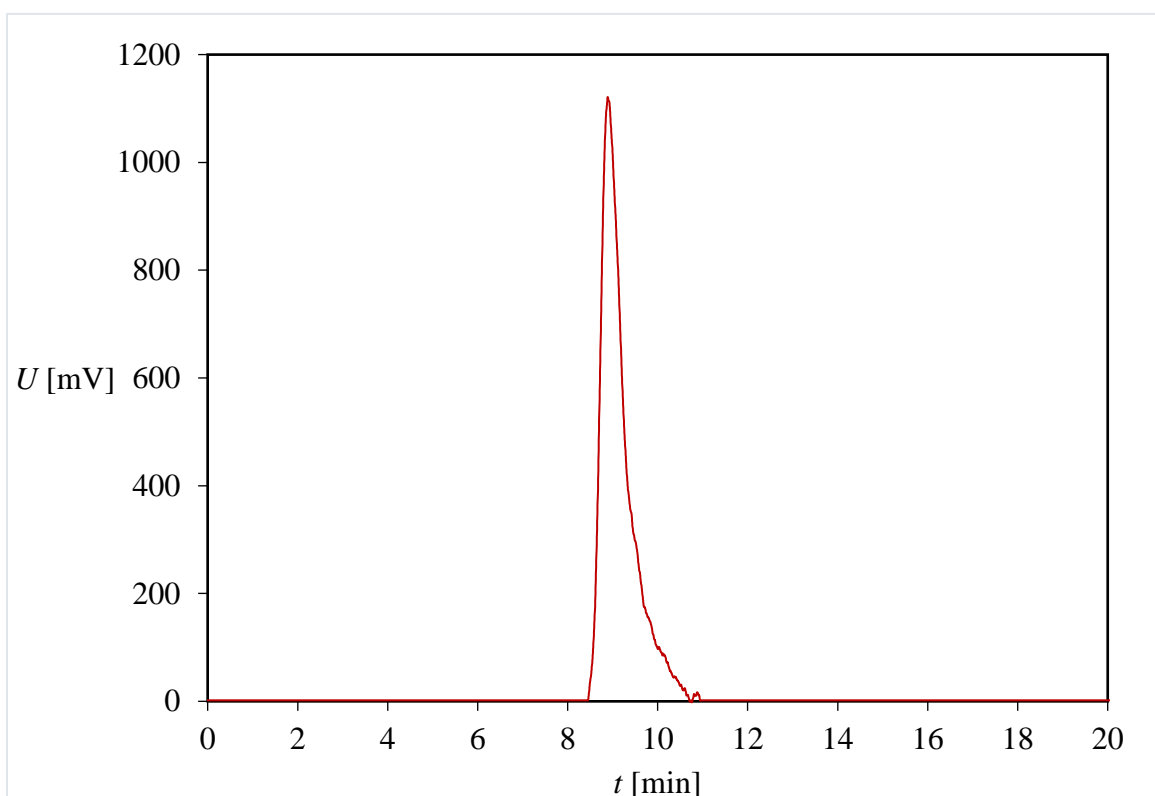
Obr. 10: Rádiochromatogram ^{161}Tb značenej vzorky $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-PSMA-617}$ (A).

Rádiochromatogram $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ (B).

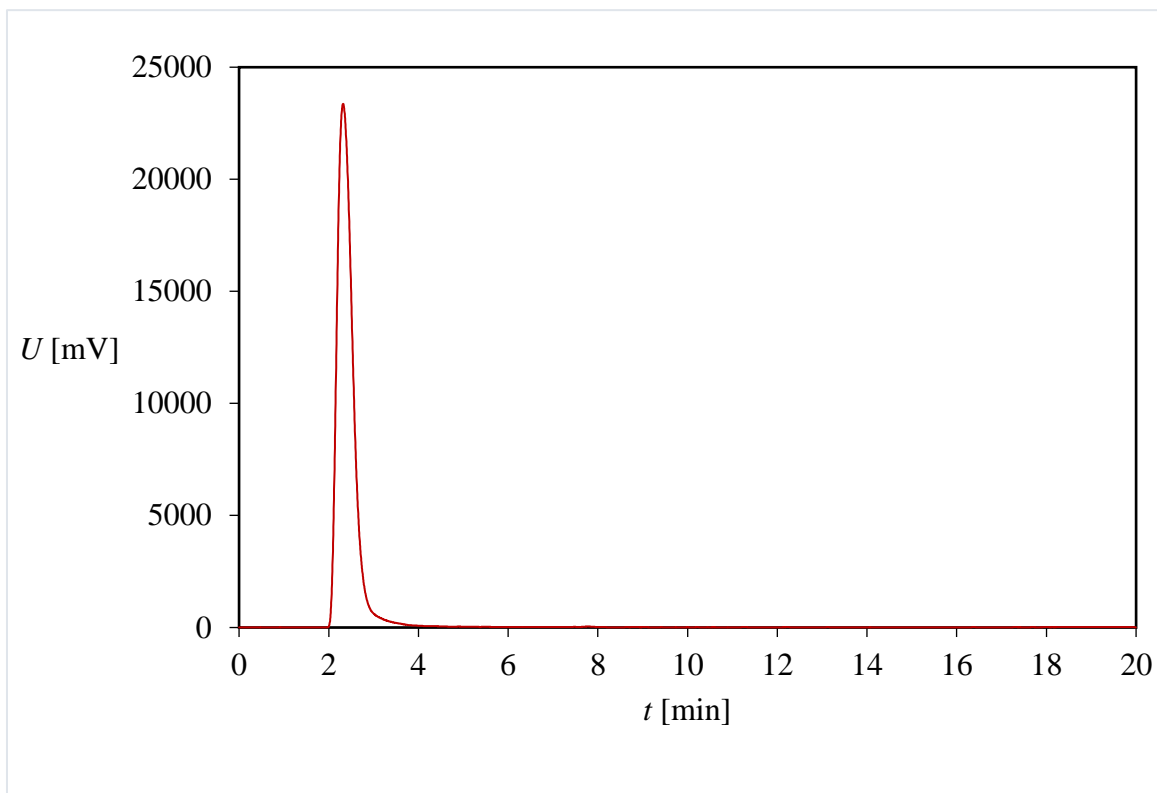
3.5.2 Stanovenie rádiochemickej čistoty rádiofarmaka pomocou HPLC

Čistota bola overená pomocou HPLC ihneď po rádioaktívnom značení ligandov príslušným rádionuklidom. Po ubehnutí reakčnej doby bolo do uzatvárateľnej vialky s mikroinzertom a septom pre nástrek vzorky napipetovaných 90 μl ultračistej vody s DTPA ($c=50 \mu\text{M}$) a 10 μl reakčnej zmesi. Zmes bola následne nanosená na kolónu.

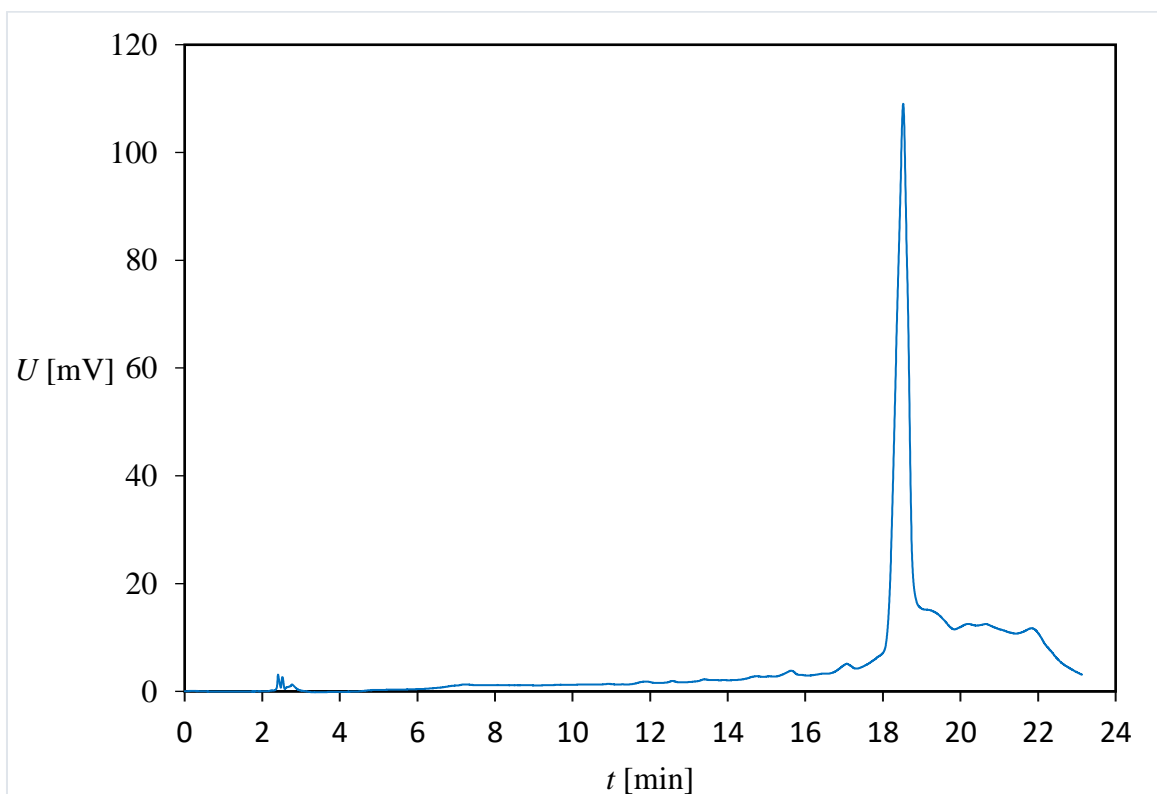
Na Obr. 11-13 sú znázornené modelové chromatogramy stanovenia rádiochemickej čistoty rádiofarmaka [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 a sledovania prítomnosti nenaviazaného ^{68}Ga pomocou rádiometrického a UV-VIS detektoru. Značený ligand eluuje okolo 8,9. minúty, čo potvrdzuje rádiometrický záznam (Obr. 11). Na Obr. 12 je znázornený chromatogram voľného [^{68}Ga]GaCl₃ s $t_{\text{R}}=2,3$. min. Na Obr. 13 je znázornený chromatogram [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 z UV- VIS detektoru, pričom pík s $t_{\text{R}}=18,1$ min patril voľnému PSMA-11. Pomocou UV-VIS detektoru sme neboli schopní kvantifikovať prítomnosť označeného ligandu [^{68}Ga]Ga- PSMA- 11.



Obr. 11: Rádiochromatogram ^{68}Ga značenej vzorky [^{68}Ga]Ga-PSMA-11

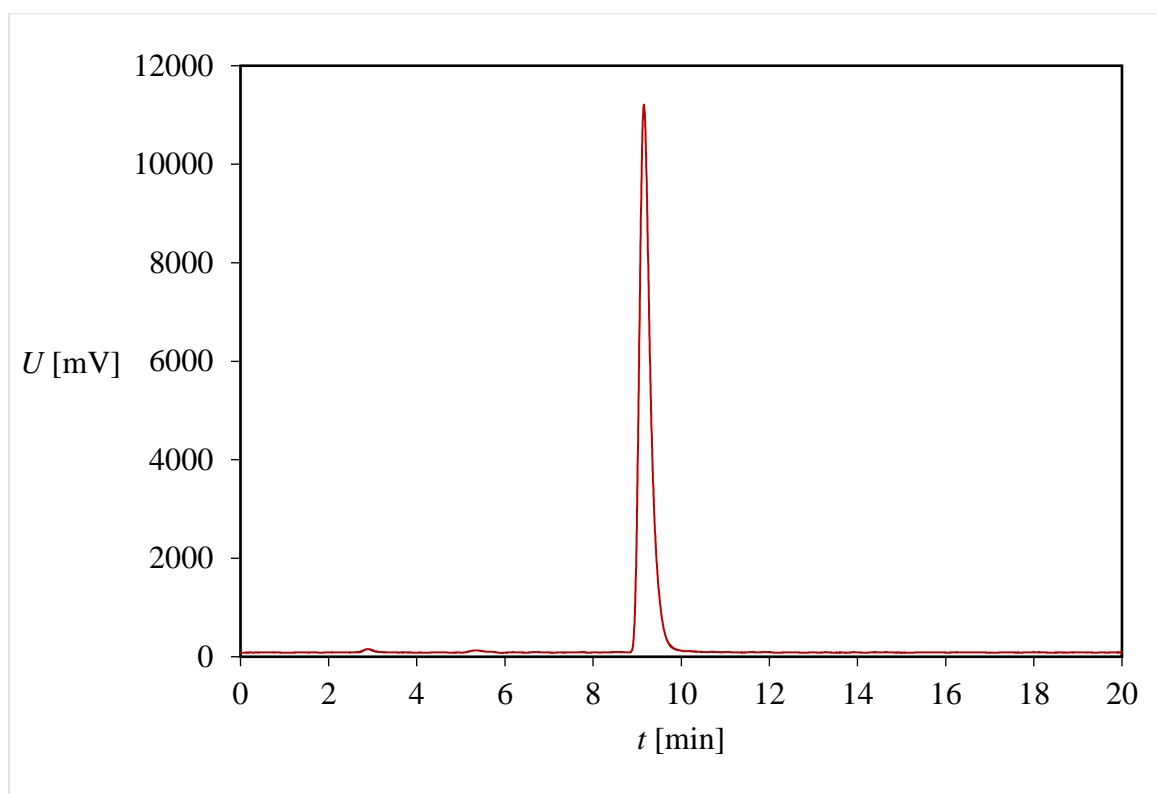


Obr. 12: Rádíochromatogram [^{68}Ga]GaCl₃

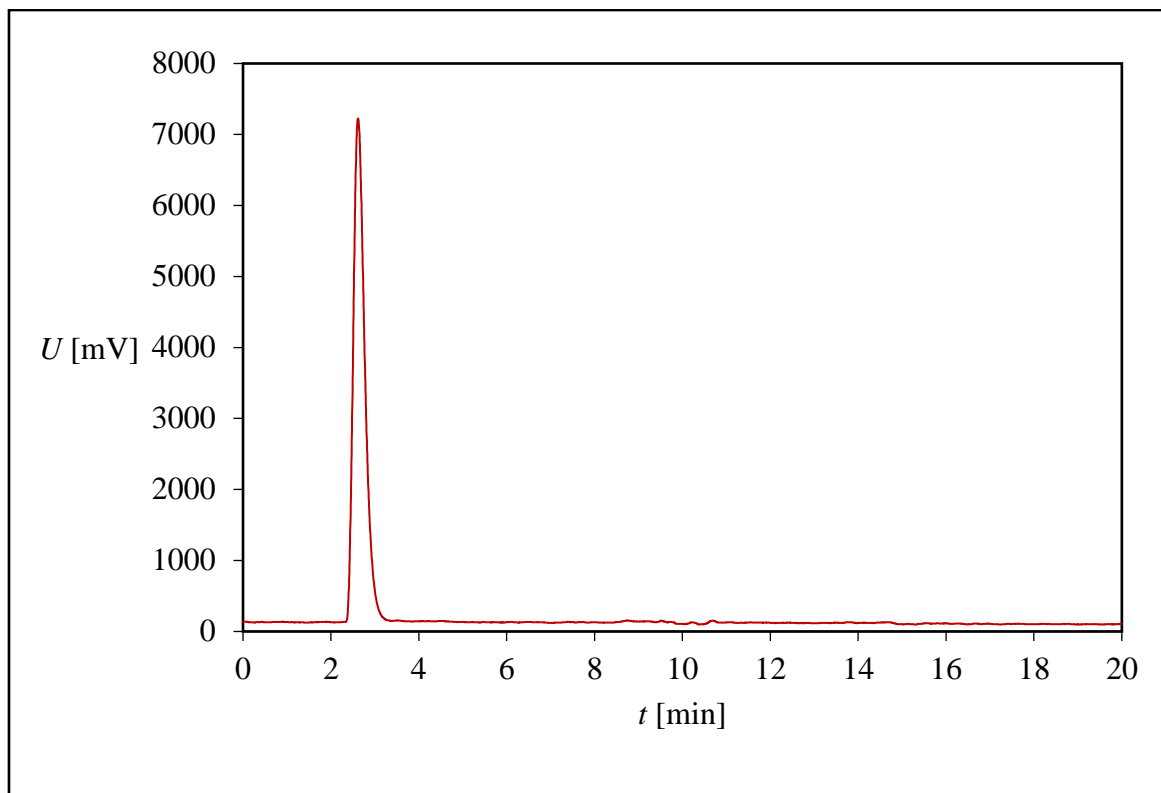


Obr. 13: UV-VIS chromatogram [^{68}Ga]Ga-PSMA-11

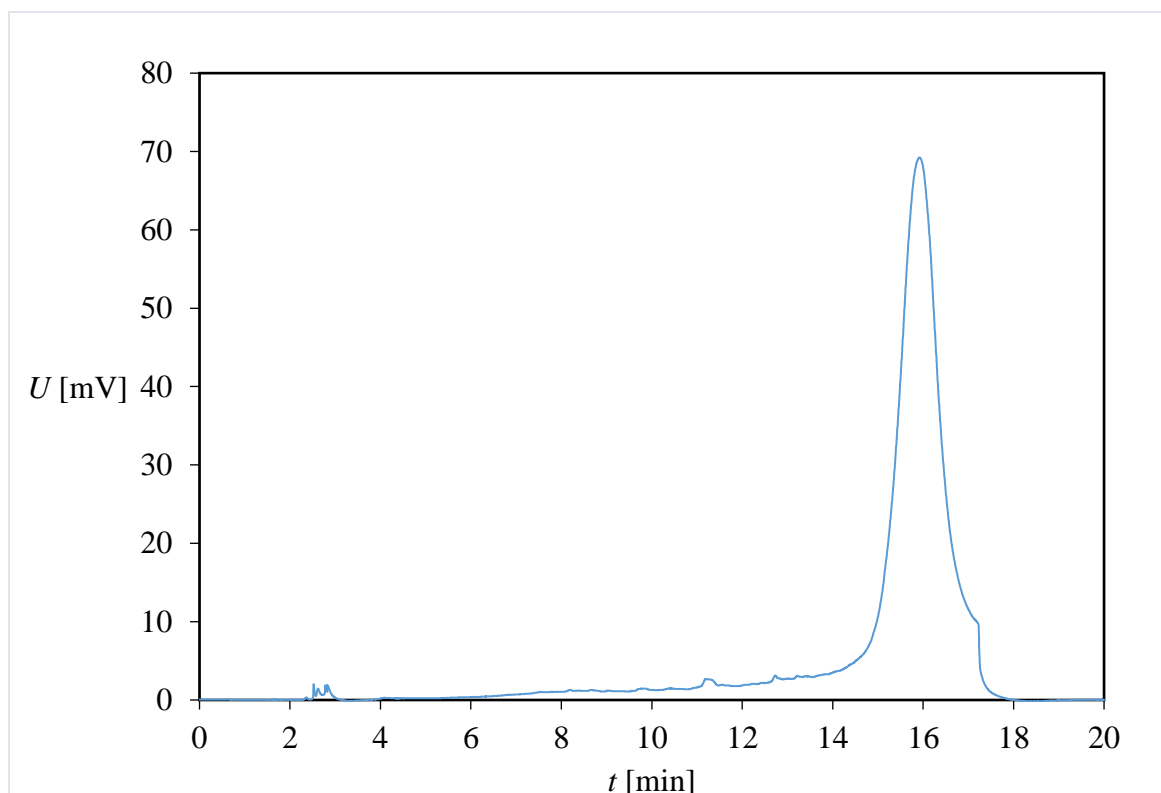
Na Obr. 14-16 sú znázornené modelové chromatogramy stanovenia rádiochemickej čistoty rádiofarmaka $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-PSMA-617}$ a sledovania prítomnosti nenašľaného ^{161}Tb pomocou rádiometrického detektoru a UV-VIS detektoru. Značený ligand eluuje okolo 9,2 minúty, čo potvrdzuje rádiometrický záznam (Obr. 14). Na Obr. 15 je znázornený chromatogram voľného $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ s $t_{\text{R}}=2,6$ min. Na Obr. 13 je znázornený chromatogram $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-PSMA-617}$ z UV-VIS detektoru, pričom pík s $t_{\text{R}}=18,1$ min patril voľnému PSMA-617. Pomocou UV-VIS detektoru sme neboli schopní kvantifikovať prítomnosť označeného ligandu $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-PSMA-617}$.



Obr. 14: Rádiochromatogram ^{161}Tb značenej vzorky $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-PSMA-617}$



Obr. 15: Rádíochromatogram [^{161}Tb]TbCl₃



Obr. 16: UV-VIS chromatogram [^{68}Ga]Ga-PSMA-11

4 Diskusia

Prvé pokusy značenia boli vykonané pomocou ^{68}Ga , ktoré bolo zvolené na základe jeho krátkeho polčasu premeny a zároveň jeho nožnej elúcie z $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru. Značenie PSMA-11 gáliom-68 bolo vykonané na základe informácií uvedených v publikácii [66]. Po značení bola overená rádiochemická čistota rádiofarmaka $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ pomocou TLC a HPLC. Chromatogramy získané metódou TLC sú uvedené na Obr. 9, v prípade metódy HPLC na Obr. 11-13. Metóda TLC je menej citlivá než HPLC z dôvodu nižšej separačnej schopnosti a slúži najmä na orientačné stanovenie čistoty pripraveného rádiofarmaka. Obe metódy potvrdili výtťažok značenia $>99\%$.

Následne bolo vykonané značenie PSMA-617 pomocou ^{161}Tb podľa publikácie [19]. Z dát uvedených v Tab. 3 a grafu na Obr. 7 možno pozorovať pokles výtťažku značenia pri pomere ligandu (PSMA-617) a kovu ($[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$) $P \leq 33:1$. Táto oblasť bola preskúmaná pre rozmedzie pH 3-6, pričom bolo zistené, že pri takto nízkom pomere ligandu a kovu vykazuje najvyššie výtťažky značenie pri pH 4,5. Výsledky sú uvedené v Tab. 4-7. Značenie by bolo možné uskutočniť v celom rozsahu pH 3-6, no znamenalo by to vyššiu spotrebu ligandu. Ďalej bola sledovaná kinetika značenia vzorky č. 1 v Tab. 5 pre rôzne dlhú dobu zahrievania reakčnej zmesi pri teplote 95°C . Výsledky sú uvedené v Tab. 8 a znázornené na Obr. 8. Optimálna doba zahrievania reakčnej zmesi pri teplote 95°C bola 10 min, pričom zahrievanie zmesi dlhšie ako 10 min nemalo výrazný vplyv na výtťažok značenia. Zahrievanie zmesi dlhšie než 20 min pri teplote 95°C by mohlo spôsobiť denaturáciu ligandu a následné znehodnotenie pripravovaného rádiofarmaka.

Najšetrnejší a teda optimálny spôsob prípravy rádiofarmaka $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-PSMA-617}$ bol pri pomere ligandu a kovu 36:1 pri pH reakčnej zmesi 4,5 a dobe zahrievania 10 min pri teplote 95°C . Rádiochemická čistota pripraveného rádiofarmaka bola najskôr orientačne stanovená pomocou metódy TLC. Chromatogramy sú znázornené na Obr. 10. Následne bola rádiochemická čistota overená presnejšou metódou HPLC. Chromatogramy sú znázornené na Obr. 14-16. Obe metódy potvrdili zanedbateľnú prítomnosť rádiochemickej nečistoty voľného rádionuklidu ^{161}Tb . Z dosiahnutých výsledkov bolo možné potvrdiť výtťažok značenia na $>99\%$.

5 Záver

V úvode tejto práce bol spracovaný rešeršný prehľad o PSMA a cielej rádionuklidovej terapii. Na toto téma potom nasledovala kapitola o terapeutických rádionuklidoch ^{177}Lu , ^{225}Ac a ^{161}Tb , ich chemických vlastnostiach, metodikách značenia a využitia pri liečbe karcinómu prostaty. V experimentálnej časti bolo pripravené rádiofarmakum [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 metódou značenia molekuly PSMA-11 rádionuklidom ^{68}Ga . Rádiochemická čistota pripraveného rádiofarmaka bola overená metódami TLC a HPLC za stanovenia výt'azku >99 %. Následne bolo pripravené rádiofarmakum [^{161}Tb]Tb-PSMA-617 metódou značenia molekuly PSMA-617 rádionuklidom ^{161}Tb . Značenie prebiehalo pri pH 4,5; pomere ligandu (PSMA-617) a kovu ($[\text{}^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$) $P \geq 10:1$ a špecifických aktivitách $a \leq 71 \text{ MBq/nmol}$. Bolo zistené, že pri pomere ligandu a kovu 33:1 dochádza k znižovaniu výt'azku z pôvodných >99 % na ~95 %. Táto oblasť bola preskúmaná pre rozmedzie pH 3-6. Najvyšší výt'azok (>99 %) vykazovalo rádiofarmakum pripravené pri pH 4,5 a pomere ligandu a kovu 36:1, pre ktoré bola následne vykonaná kinetika značenia. Optimálna doba zahrievania reakčnej zmesi pri teplote 95°C bola 10 min. Rádiochemická čistota [^{161}Tb]Tb-PSMA-617 pripraveného za optimálnych podmienok bola overená pomocou metód TLC a HPLC. Obe metódy potvrdili výt'azok značenia >99 %.

6 Literatúra

- [1] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK. Biochemie: chemický pohled na biologický svět. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2018. ISBN 978-80-7592-013-3.
- [2] MURRAY, Robert K. Harperova Biochemie. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.
- [3] ALBERTS, Bruce. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem: Espero, 1998. ISBN 80-902906-0-4.
- [4] SEDLÁČKOVÁ, H., DOLEJŠOVÁ, O., PITRA, et al. Možnosti využití ligandů prostatického specifického membránového antigenu (PSMA) v diagnostice a léčbě karcinomu prostaty. *Česká urologie* 2020, 24(4), 247-60. ISSN 2336-5692.
- [5] VORSTER, M. a M.-M. SATHEKGE. Theranostics in Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer. *Exon Publications: Prostate Cancer [Internet]*. 2021, 6. ISSN 978-0-6450017-5-4. Dostupné z: doi:10.36255/exonpublications.prostatecancer.theranostics.2021
- [6] EL FAKIRI, M., N. GEIS, N. AYADA, et al. PSMA-targeting radiopharmaceuticals for prostate cancer Therapy: recent developments and future perspectives. *Cancers*. 2021, 13(16), 3967. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13163967
- [7] SARTOR, O., DE BONO J. a CHI K.-N. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2021, 385(12), 1091-1103. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2107322
- [8] SAHA, G.-B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 7. Springer, 2017. ISBN 978-3-319-57580-3.
- [9] KOWALSKY, R.-J. a K.-D. WEATHERMAN. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*. 4. American Pharmacists Association, 2020. ISBN 1-58212-283-0.
- [10] MAJER, V. *Základy jaderné chemie*. 2. Státní nakladatelství technické literatury, 1981.
- [11] HABERKORN, U., F. GIESEL, A. MORGENSTERN, et al. The Future of Radioligand Therapy: α , β , or Both?. *Journal of Nuclear Medicine*. 2017, 58(7), 1017-1018. ISSN 2159-662X. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.117.190124

- [12] KU, A., V.J. FACCA a Z. CAI. Auger electrons for cancer therapy – a review. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. 2019, 4(27). ISSN 2365-421X. Dostupné z: doi:10.1186/s41181-019-0075-2
- [13] LIN, B., H. DU, J. FAN, et al. Radioimmunotherapy Combined With Low-Intensity Ultrasound and Microbubbles: A Potential Novel Strategy for Treatment of Solid Tumors. *Frontiers in Oncology*. 2021, (11). ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2021.750741
- [14] GONG, M.C., S.S. CHANG, M. SADELAIN, et al. Prostate-specific Membrane Antigen (PSMA)-specific Monoclonal Antibodies in the Treatment of Prostate and Other Cancers. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1999, 18, 483–490. ISSN 7995–8001. Dostupné z: doi:10.1023/A:1006308826967
- [15] HEESCH, A., J. MAURER, E. STICKELER., et al. Development of Radiotracers for Breast Cancer-The Tumor Microenvironment as an Emerging Target. *Cells*. 2020, 9(10), 2334. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9102334
- [16] GOODMAN, O.B. Jr, S.P. BARWE, B. RITTER, et al. Interaction of prostate specific membrane antigen with clathrin and the adaptor protein complex-2. *International journal of oncology*. 2007, 31(5), 1199-1203. Dostupné z: doi:10.3892/ijo.31.5.1199
- [17] JUZENIENE, A., V.Y. STENBERG, Ø.S. BRULAND, et al. Preclinical and Clinical Status of PSMA-Targeted Alpha Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers*. 2021, 13, 779. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13040779
- [18] KRATOCHWIL, C., U. HABERKORN a F.L. GIESEL. 225Ac-PSMA-617 for Therapy of Prostate Cancer. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2020, 50(2), 133-140. Dostupné z: doi:10.1053/j.semnuclmed.2020.02.004
- [19] MÜLLER, C., C.A. UMBRICH, N. GRACHEVA, et al. Terbium-161 for PSMA-targeted radionuclide therapy of prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2019, 46, 1919–1930. Dostupné z: doi:10.1007/s00259-019-04345-0
- [20] DE JONG, M., W.A.P. BREEMAN, B.F. BERNARD, et al. Evaluation in vitro and in rats of 161Tb-DTPA-octreotide, a somatostatin analogue with potential for intraoperative scanning and radiotherapy. *European Journal of Nuclear Medicine*. 1995, 22, 608–616. Dostupné z: doi:10.1007/BF01254561

- [21] NIZOU, G., C. FAVARETTO, F. BORGNA, et al. Expanding the Scope of Pyclyen-Picolinate Lanthanide Chelates to Potential Theranostic Applications. *Inorganic Chemistry*. 2020, 59(16), 11736-11748. Dostupné z: doi:10.1021/acs.inorgchem.0c01664
- [22] LEHENBERGER, S., C. BARKHAUSEN, S. COHRS, et al. The low-energy β^- and electron emitter ^{161}Tb as an alternative to ^{177}Lu for targeted radionuclide therapy. *Nuclear Medicine and Biology*. 2011, 38(6), 917-924. Dostupné z: doi:10.1016/j.nucmedbio.2011.02.007
- [23] GRACHEVA, N., C. MÜLLER, Z. TALIP, et al. Production and characterization of no-carrier-added ^{161}Tb as an alternative to the clinically-applied ^{177}Lu for radionuclide therapy. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. 2019, 4(12). Dostupné z: doi:10.1186/s41181-019-0063-6
- [24] UUSIJÄRVI, H., P. BERNHARDT, F. RÖSCH., et al. Electron- and positron-emitting radiolanthanides for therapy: aspects of dosimetry and production. *Journal of nuclear medicine*. 2006, 47(5), 807–814. ISSN 2159-662X.
- [25] HINDIÉ, E., P. ZANOTTI-FREGONARA, M. QUINTO, et al. Dose Deposits from ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{111}In , and ^{161}Tb in Micrometastases of Various Sizes: Implications for Radiopharmaceutical Therapy. *Journal of nuclear medicine*. 2016, 57(5), 759–764. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.115.170423
- [26] JUGET, F., Z. TALIP, T. BUCHILLIER, et al. Determination of the gamma and X-ray emission intensities of terbium-161. *Applied Radiation and Isotopes*. 2021, 174. Dostupné z: doi:10.1016/j.apradiso.2021.109770
- [27] AHMADZADEHFAR, H., M. ESSLER a M. SCHÄFERS. Radioligand therapy with ^{177}Lu -PSMA-617 of metastatic prostate cancer has already been arrived in clinical use. *Nuclear medicine and biology*. 2016, 43(12), 835. Dostupné z: doi:10.1016/j.nucmedbio.2016.08.003
- [28] DELKER, A., W.P. FENDLER, C. KRATOCHWIL, et al. Dosimetry for ^{177}Lu -DKFZ-PSMA-617: a new radiopharmaceutical for the treatment of metastatic prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2016, 43, 42–51. Dostupné z: doi:10.1007/s00259-015-3174-7

- [29] RAHBAR, K., M. SCHMIDT, A. HEINZEL, et al. Response and Tolerability of a Single Dose of ^{177}Lu -PSMA-617 in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Multicenter Retrospective Analysis. *Journal of Nuclear Medicine*. 2016, 57(9), 1334-1338. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.116.173757
- [30] KOSSERT, K., M.P. TAKÁCS a O. NÄHLE. Determination of the activity of ^{225}Ac and of the half-lives of ^{213}Po and ^{225}Ac . *Applied Radiation and Isotopes*. 2020, 156. Dostupné z: doi:10.1016/j.apradiso.2019.109020
- [31] ROBERTSON, A.K.H., C.F. RAMOGIDA a C. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ. Multi-isotope SPECT imaging of the ^{225}Ac decay chain: feasibility studies. *Physics in Medicine & Biology*. 2017, 62(11), 4406. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6560/aa6a99
- [32] MIEDERER, M., D.A. SCHEINBERG a M.R. MCDEVITT. Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2008, 60(12), 1371–1382. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2008.04.009
- [33] RADCHENKO, V., A. MORGENSTERN, A. JALILIAN, et al. Production and supply of alpha particles emitting radionuclides for Targeted Alpha Therapy (TAT). *Journal of Nuclear Medicine*. 2021, 62(11), 1495-1503. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.120.261016
- [34] ALSHAREF, S., M. ALANAZI, F. ALHARTHI, et al. Review about radiopharmaceuticals: Preparation, radioactivity, and applications. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2020, (12), 8-15. Dostupné z: doi:10.22159/ijap.2020v12i3.37150
- [35] FARZIN, L., S. SHEIBANI, M. E. MOASSESI, et al. An overview of nanoscale radionuclides and radiolabeled nanomaterials commonly used for nuclear molecular imaging and therapeutic functions. *Journal of biomedical materials research*. 2019, 107(1), 251–285. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.36550
- [36] BERTRAND, N., J. WU, X. XU, et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*. 2014, 66, 2–25. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2013.11.009
- [37] ERCAN, M.T. a M. CAGLAR. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Current pharmaceutical design*. 2000, 6(11), 1085–1121. Dostupné z: doi:10.2174/1381612003399833

- [38] GILL, M.R., N. FALZONE, Y. DU, et al. Targeted radionuclide therapy in combined-modality regimens. *The Lancet. Oncology*. 2017, 18(7), 414–423. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(17)30379-0
- [39] SGOUROS, G., L. BODEI, M.R. MCDEVITT, et al. Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2020, 19, 589–608. Dostupné z: doi:10.1038/s41573-020-0073-9
- [40] KOPECKÝ, J., J. POVOVÁ a V. JANOUT. Přínos (-2)proPSA a PHI pro diagnostiku karcinomu prostaty. *Urologie pro praxi*. 2015, 16(3), 106-108. ISSN 1803-5299.
- [41] RACEK, J. a et al. *Klinická biochemie*. 2. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
- [42] KLEČKA, J., L. HOLUBEC, M. PEŠTA, et al. Nádorové markery karcinomu prostaty. *Česká urologie*. 2008, 12(3), 173-185.
- [43] BENDERLI CIHAN, Y. Význam 177Lu-PSMA v léčbě kastročně-rezistentního karcinomu prostaty. *Klinická onkologie*. 2021, 34(2), 151-152. Dostupné z: doi:10.48095/ccko2021151
- [44] KUZNETSOV, R.A., K.S. BOBROVSKAYA, V.V. SVETUKHIN, et al. Production of Lutetium-177: Process Aspects. *Radiochemistry*. 2019, 61, 381–395. Dostupné z: doi:10.1134/S1066362219040015
- [45] KOZEMPEL, J., O. MOKHODOEVA a M. VLK. Progress in Targeted Alpha-Particle Therapy. What We Learned about Recoils Release from In Vivo Generators. *Molecules*. 2018, 23(3), 581. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23030581
- [46] CZERWIŃSKA, M., A. BILEWICZ, M. KRUSZEWSKI, et al. Targeted Radionuclide Therapy of Prostate Cancer—From Basic Research to Clinical Perspectives. *Molecules*. 2020, 25(7), 1743. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25071743
- [47] KRATOCHWIL, C., F. BRUCHERTSEIFER, F.L. GIESEL, et al. 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2016, 57(12), 1941-1944. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.116.178673

- [48] KRATOCHWIL, C., F. BRUCHERTSEIFER, H. RATHKE, et al. Targeted α -Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with ^{225}Ac -PSMA-617: Dosimetry Estimate and Empiric Dose Finding. *Journal of Nuclear Medicine*. 2017, 58(10), 1624-1631. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.117.191395
- [49] KRATOCHWIL, C., F. BRUCHERTSEIFER, H. RATHKE, et al. Targeted α -Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with ^{225}Ac -PSMA-617: Swimmer-Plot Analysis Suggests Efficacy Regarding Duration of Tumor Control. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018, 59(5), 795-802. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.117.203539
- [50] YADAV, M.P., S. BALLAL, R.K. SAHOO, et al. Efficacy and safety of ^{225}Ac -PSMA-617 targeted alpha therapy in metastatic castration-resistant Prostate Cancer patients. *Theranostics*. 2020, 10(20), 9364-9377. Dostupné z: doi:10.7150/thno.48107
- [51] PUTTEMANS, J., T. LAHOUTTE, M. D'HUYVETTER, et al. Beyond the Barrier: Targeted Radionuclide Therapy in Brain Tumors and Metastases. *Pharmaceutics*. 2019, 11(8), 376. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11080376
- [52] SATHEKGE, M.M., F. BRUCHERTSEIFER, I.O. LAWA, et al. Treatment of brain metastases of castration-resistant prostate cancer with ^{225}Ac -PSMA-617. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2019, 46, 1756–1757. Dostupné z: doi:10.1007/s00259-019-04354-z
- [53] LANGBEIN, T., G. CHAUSSÉ a R.P. BAUM. Salivary Gland Toxicity of PSMA Radioligand Therapy: Relevance and Preventive Strategies. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018, 59(8), 1172-1173. Dostupné z: doi:10.2967/jnumed.118.214379
- [54] MELVILLE, G. a B.J. ALLEN. Cyclotron and linac production of ^{225}Ac . *Applied Radiation and Isotopes*. 2009, 67(4), 549-555. Dostupné z: doi:10.1016/j.apradiso.2008.11.012
- [55] ROBERTSON, A.K.H., C.F. RAMOGIDA, P. SCHAFFER, et al. Development of ^{225}Ac Radiopharmaceuticals: TRIUMF Perspectives and Experiences. *Current Radiopharmaceuticals*. 2018, 11(3), 156-172. Dostupné z: doi:10.2174/1874471011666180416161908

- [56] TAGAWA, S.T., S. VALLABHAJOSULA, Y. JHANWAR, et al. Phase I dose-escalation study of 225Ac-J591 for progressive metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC). *Journal of Clinical Oncology*. 2018, 36(6), 399. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2018.36.6_suppl.TPS399
- [57] CHATALIC, K.L., S. HESKAMP, M. KONIJNENBERG, et al. Towards Personalized Treatment of Prostate Cancer: PSMA I&T, a Promising Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Theranostic Agent. *Theranostics*. 2016, 6(6), 849–861. Dostupné z: doi:10.7150/thno.14744
- [58] GALLYAMOV, M., D. MEYRICK, J. BARLEY, et al. Renal outcomes of radioligand therapy: experience of 177lutetium—prostate-specific membrane antigen ligand therapy in metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Clinical Kidney Journal*. 2020, 13(6), 1049–1055. Dostupné z: doi:10.1093/ckj/sfz101
- [59] PARUS, J.L., D. PAWLAK, R. MIKOLAJCZAK, et al. Chemistry and bifunctional chelating agents for binding (177)Lu. *Current radiopharmaceuticals*. 2015, 8(2), 86–94. Dostupné z: doi:10.2174/1874471008666150312160440
- [60] COTTON, F.A., G. WILKINSON, M. BOCHMANN, et al. *Advanced Inorganic Chemistry*. 5. Wiley-Interscience, 1988. ISBN 978-0471849971.
- [61] THIELE, N.A. a J.J. WILSON. Actinium-225 for Targeted α Therapy: Coordination Chemistry and Current Chelation Approaches. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2018, 33(8), 336–348. Dostupné z: doi:10.1089/cbr.2018.2494
- [62] KRATOCHWIL, C., F.L. GIESEL, M. EDER a et al. [177Lu]Lutetium-labelled PSMA ligand-induced remission in a patient with metastatic prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2015, 42, 987–988. Dostupné z: doi:10.1007/s00259-014-2978-1
- [63] SARTOR, O., J. DE BONO, K. N CHI a et at. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2021, 385(12), 1091-1103. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2107322
- [64] HENNRICH, U. a M. EDER. [177Lu]Lu-PSMA-617 (Pluvicto™): The First FDA-Approved Radiotherapeutical for Treatment of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 2022, 15(10), 1292. Dostupné z: doi:10.3390/ph15101292

- [65] BENEŠOVÁ, M., C.A. UMBRICH, R. SCHIBLI a et. al. Albumin-Binding PSMA Ligands: Optimization of the Tissue Distribution Profile. *Molecular Pharmaceutics*. 2018, 15(3), 934-946. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00877
- [66] HENNRICH, U. a M. EDER. The First FDA-Approved ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceutics*. 2021, 14(8), 713. Dostupné z: doi:10.3390/ph14080713
- [67] SHUKUROV, R., M. VELIYEV, Z. DADASHOV a et. al. Labeling process and quality control results of ²²⁵Ac-PSMA-617 for targeted alpha particle therapy for metastatic prostate cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. 2019, 60(1), 1611. ISSN 2159-662X.