



Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

PSMA-DOXA-RM2

ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΜΕ ^{68}Ga - ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων
Φαρμακευτικών Ενώσεων – Ειδίκευση: Ραδιοφαρμακευτική Χημεία

Μπουζιώτη Δανάη

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αθήνα, 2023

Τριμελής εξεταστική Επιτροπή:

Πιρμεττής Ι.

Ερευνητής Α΄

Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Τσοτίνης Α.

Καθηγητής

Τμήμα Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α.

Χιωτέλλης Α.

Ερευνητής Γ΄

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Επιβλέπων:

Πιρμεττής Ι.

Ερευνητής Α΄

Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του προστάτη είναι ο πιο συχνός καρκίνος στους άνδρες παγκοσμίως και ο 5^{ος} όσον αφορά την θνησιμότητα. Είναι ιδιαίτερα συχνός στις ανεπτυγμένες χώρες και ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και τη φυλή/εθνικότητα. Ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών είναι ηλικίας άνω των 60 ετών, ενώ μικρότερος αριθμός περιπτώσεων αφορά νέους άνδρες.

Τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη μπορεί να παρουσιάσουν υπερέκφραση του PSMA (Prostate- Specific Membrane Antigen, Ειδικό Προστατικό Μεμβρανικό Αντιγόνο) και/ή GRPr (Gastrin-releasing Peptide Receptor, Πεπτιδικός Υποδοχέας Απελευθέρωσης Γαστρίνης). Αυτοί οι δύο βιολογικοί δείκτες (biomarkers) μπορεί να σχετίζονται με διαφορετικό επίπεδο έκφρασης στην επιφάνεια του κυττάρου. Η ετερογένεια του όγκου-στόχου μπορεί να περιορίσει την δυνατότητα διάγνωσης ή / και θεραπείας του καρκίνου. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια η έρευνα προσανατολίζεται σε μόρια που στοχεύουν σε δύο σημεία.

Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε αξιολόγηση του ετεροδιμερούς PSMA-DOTA-RM2, του οποίου η δομή εμπεριέχει τα δύο μονομερή PSMA-617 και DOTA-RM2, επιτρέποντας τη σύνδεση σε PSMA και GRPr, αντίστοιχα. Η in vitro συμπεριφορά του PSMA-DOTA-RM2 συγκρίθηκε με τα δύο μονομερή από τα οποία αποτελείται (ενώσεις αναφοράς). Όλα τα μόρια ήταν επισημασμένα με διαγνωστικό ραδιοϊσότοπο ⁶⁸Ga. Το DOTA χρησιμοποιήθηκε ως χηλικός παράγοντας, καθώς εφαρμόζεται κατά κόρον για τη συμπλοκοποίηση των τρισθενών μετάλλων.

Αξιολογήθηκε η σταθερότητα του μορίου στον ορό του αίματος, η ικανότητα εσωτερικοποίησης του μορίου, και τέλος έγιναν μελέτες βιοκατανομής σε ζώα με όγκους. Για την μελέτη εσωτερικοποίησης καθώς και για την μελέτη βιοκατανομής, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη: LNCaP (θετικό για PSMA) και PC3 (θετικό για GRPr). Αυτά τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για να μιμηθούν τις συνθήκες του ανθρώπινου σώματος, και να προσομοιάσουν την ετερογενή έκφραση των βιολογικών δεικτών στους καρκινικούς ιστούς.

Όλες οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν δείχνουν καλή αποτελεσματικότητα ραδιοεπισήμανσης και με το ⁶⁸Ga. Το PSMA-DOTA-RM2 έδειξε μια πολλά υποσχόμενη ικανότητα ραδιοεπισήμανσης και θα μπορούσε να αποτελέσει ένα παράδειγμα διαγνωστικής-θεραπευτικής ένωσης (theranostic), αν επισημανθεί και με κάποιο θεραπευτικό ισότοπο, όπως το ¹⁷⁷Lu, μελέτη η οποία έγινε στο German Cancer Research Center της Χαϊδελβέργης και φάνηκε να δίνει θετικά αποτελέσματα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, το PSMA-DOTA-RM2 φαίνεται να έχει καλή ικανότητα εσωτερίκευσης και υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τον στόχο. Το ετεροδιμερές είναι χρήσιμο για την εξειδικευμένη ανίχνευση όγκων ή/και μεταστάσεων (η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ετερογένεια στην έκφραση βιολογικών δεικτών). Αυτό υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα των μελετών βιοκατανομής.

Το συγκεκριμένο ετεροδιμερές θα μπορούσε να θεωρηθεί μία πολλά υποσχόμενη ένωση διειδικής στόχευσης, ικανή να ανιχνεύσει ετερογενείς όγκους και μεταστάσεις. Η δυνατότητα δέσμευσης περισσότερων του ενός στόχων ταυτόχρονα είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς οι ασθενείς υποβάλλονται σε χορήγηση μικρότερης ποσότητας φαρμάκου και έτσι επιτυγχάνεται χαμηλότερη έκθεση σε ακτινοβολία. Μελλοντικοί στόχοι είναι η μελέτη την συμπεριφοράς του ετεροδιμερούς ύστερα από επισήμανση με ^{177}Lu , καθώς και η λήψη απεικόνισης PET για τη σταδιοποίηση της νόσου και την αξιολόγηση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

ABSTRACT

Prostate cancer is the most common cancer in men worldwide and the 5th in terms of mortality. It is especially common in developed countries, and varies substantially according to geographic region and race/ethnicity. A major percentage of patients is older than 60 years, smaller number of cases involve young men.

Prostate cancer cells can show an overexpression of PSMA (prostate specific membrane antigen) and/or GRPr (gastrin-releasing peptide receptor). These two biomarkers can be associated with different level of expression on cell's surface. Heterogeneity of tumor target can represent a limit in cancer diagnosis and/or therapy. For this reason, in recent years research has been oriented towards molecules that target two points.

In this master thesis the focus was on the evaluation of heterodimer PSMA-DOTA-RM2, whose structure combine the two monomers PSMA-617 and DOTA-RM2, enabling binding to PSMA and GRPr, respectively. The in vitro evaluation of PSMA-DOTA-RM2 was performed by a comparison with the two monomers (reference compounds). All molecules were radiolabeled with diagnostic radionuclide ^{68}Ga . DOTA was used as chelator, as it is predominantly applicable for the complexation of trivalent metals.

Serum stability of the molecule, internalization capacity of the molecule, and finally biodistribution studies were performed in animals with tumors. For the internalization study as well as for the biodistribution study, two different prostate cancer cell lines were used: LNCaP (positive for PSMA) and PC3 (positive for GRPr). These cells were used to mimic the conditions of the human body, and simulate the heterogeneous expression of biomarkers in cancerous tissues.

All the compounds tested show good radiolabeling efficacy with ^{68}Ga . PSMA-DOTA-RM2 showed a promising radiolabeling capability and could be an example of a diagnostic-therapeutic compound (theranostic) if it is also labelled with a therapeutic isotope, such as ^{177}Lu .

According to the results of our study, PSMA-DOTA-RM2 appears to have good internalization capacity and high target selectivity. Heterodimer is useful for the specialized detection of tumors and / or metastases (which is characterized by high heterogeneity in the expression of biological markers). This is also supported from the results of biodistribution studies.

This heterodimer could be considered a promising binary targeting compound, capable of detecting heterogeneous tumors and metastases. The ability to bind to more than one target at the same time is an advantage, as patients are subjected to less drug administration and lower radiation exposure. Future objectives are to study the behaviour of the heterodimer after ^{177}Lu labelling, as well as to obtain PET imaging for initial disease staging and assessment of therapeutic response.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά τη διάρκεια των ετών 2019–2023 στο Εργαστήριο Ραδιοχημικών Μελετών του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) “Δημόκριτος”, υπό την επίβλεψη της Δρος Πηνελόπης Μπουζιώτη, Διευθύντριας Ερευνών, σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Δρ. Πηνελόπη Μπουζιώτη για την στήριξη, την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου προσέφερε απλόχερα στην διάρκεια όλης της διαδικασίας. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, Δρ. Ι. Πιρμεττή, Δρ. Α. Τσοτίνη και Δρ. Χιωτέλλη Α. για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους αλλά και την βοήθεια που μου παρείχαν καθ’ όλη τη διάρκεια.

Επίσης δε θα μπορούσα να παραλείψω όλη την ομάδα του εργαστηρίου και πιο συγκεκριμένα την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία-Αλεξάνδρα Σαλβάνου και την Δρ. Μαρία-Αργυρώ Καραγεώργου, για την πολύτιμη καθοδήγηση τους. Επίσης, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον εξωτερικό συνεργάτη του Εργαστηρίου Ραδιοχημικών Μελετών τον Δρ. Χρήστο Λιόλιο για την επιλογή του θέματος αλλά και την παραχώρηση των μορίων, τον κ. Σταύρο Ξανθόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του στις βιοκατανομές και τον κ. Φώτη Καπίρη για την προετοιμασία των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια μου και τους φίλους μου για την στήριξη και την πίστη τους σε εμένα όλο αυτό το διάστημα.

Αθήνα, Ιανουάριος 2023

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κατάλογος συντομογραφιών	10
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
1. Καρκίνος.....	11
2. Καρκίνος του προστάτη.....	16
3. Διαγνωστικά ισότοπα – Ραδιοφάρμακα.....	20
3.1 Γάλλιο.....	23
4. Θεραπευτικά ισότοπα – Ραδιοφάρμακα.....	25
5. Theranostics (Θεραπογνωστική).....	27
6. PSMA.....	28
7. GRPr.....	31
8. Διειδική στόχευση με ετεροδιμερή (Bispecific targeting).....	32
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	34
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	36
9. Επισήμανση με ⁶⁸ Ga.....	36
9.1 Υλικά και Αντιδραστήρια.....	36
9.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός και λογισμικά.....	36
9.3 Έκλυση ⁶⁸ Ga.....	37
9.4 Διαδικασία επισήμανσης του ετεροδιμερούς PSMA-DOTA-RM2 με ⁶⁸ Ga.....	38
9.5 Διαδικασία αξιολόγησης επισήμανσης του ετεροδιμερούς PSMA-DOTA-RM2 με ⁶⁸ Ga.....	38
9.5.1. Έλεγχος ραδιοεπισήμανσης με RP-HPLC.....	38
9.5.2. Έλεγχος ραδιοεπισήμανσης με radio-TLC.....	39
10. Μελέτη σταθερότητας στον ορό του αίματος (Serum stability study).....	41
10.1 Αντιδραστήρια.....	41
10.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	41
11. Μελέτη εσωτερικοποίησης (Internalization study).....	42
11.1 Υλικά και αντιδραστήρια.....	42
11.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	42
12. Ex vivo Μελέτη βιοκατανομής (Ex vivo Biodistribution Study).....	44
12.1 Υλικά και Αντιδραστήρια.....	44
12.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	44
13. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	46
14. Συμπεράσματα.....	55
15. Βιβλιογραφία.....	56

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

PSMA: Prostate-Specific Membrane Antigen, Ειδικό Προστατικό Μεμβρανικό Αντιγόνο

GRPr: Gastrin-Releasing Peptide receptor, Πεπτιδικός υποδοχέας απελευθέρωσης γαστρίνης

ITH: Intra-Tumoral Heterogeneity, Ενδοκαρκινική ετερογένεια

PCa: Prostate Cancer, Καρκίνος του προστάτη

BPH: Benign Prostatic Hyperplasia, Καλοήθης υπερπλασία του προστάτη

PSA: Prostate Specific Antigen, Ειδικό προστατικό αντιγόνο

TURP: TransUrethral Resection of Prostate, Διουρηθρική εκτομή του προστάτη

PET: Positron Emission Tomography, Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων

SPECT: Single Photon Emission Tomography, Υπολογιστική τομογραφία εκπομπής φωτονίου

CT: Computed tomography, Αξονική τομογραφία

MRI: Magnetic Resonance Imaging, Μαγνητική τομογραφία

RPT: RadioPharmaceutical Therapy, Ραδιοφαρμακευτική θεραπεία

AR: Androgen Receptor, Υποδοχέας ανδρογόνου

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

TLC: Thin Layer Chromatography, Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Καρκίνος

Ο καρκίνος αναμένεται να καταταχθεί ως η κύρια αιτία θανάτου και το σημαντικότερο εμπόδιο για την αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε κάθε χώρα του κόσμου τον 21ο αιώνα. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) το 2015, ο καρκίνος είναι η πρώτη ή η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου πριν από την ηλικία των 70 ετών σε 91 από τις 172 χώρες και κατατάσσεται τρίτος ή τέταρτος σε επιπλέον 22 χώρες. [1]

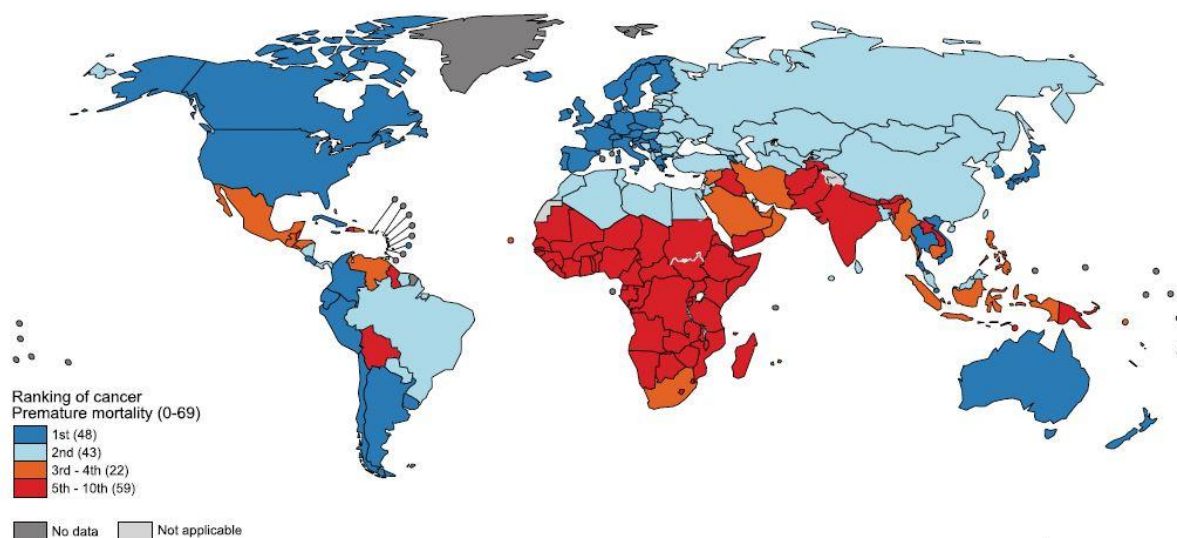


Figure 1 Παγκόσμιος χάρτης που απεικονίζει την κατάταξη του καρκίνου ανά χώρα ως αιτία θανάτου για ηλικίες <50. Πηγή: World Health Organization

Η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητα του καρκίνου αυξάνονται ραγδαία. Οι λόγοι είναι σύνθετοι, αλλά αντικατοπτρίζουν τόσο τη γήρανση όσο και την αύξηση του πληθυσμού, καθώς και τις αλλαγές στην κατανομή των κύριων παραγόντων κινδύνου του καρκίνου, αρκετοί από τους οποίους σχετίζονται με την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη. [2],[3] Η εμφάνιση και τα αποτελέσματα του καρκίνου ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ φυλετικών και εθνικών ομάδων, κυρίως λόγω των ανισοτήτων στον πλούτο που οδηγούν σε διαφορές στην έκθεση σε παράγοντες κινδύνου και εμπόδια στην υψηλής ποιότητας πρόληψη του καρκίνου, έγκαιρη ανίχνευση και θεραπεία. [4],[5]

Ο καρκίνος, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί μια σημαντική αιτία ανθρώπινης θνησιμότητας παγκοσμίως, και μάλιστα προβλέπεται ότι τα περιστατικά καρκίνου θα αυξηθούν σε 22 εκατομμύρια ετησίως το 2032 (το 2012 ήταν 14 εκατομμύρια) [6]. Το 2020, η διάγνωση

και η θεραπεία του καρκίνου “παρεμποδίστηκε” από την πανδημία της νόσου του κορονοϊού 2019 (COVID-19). Βάσει έρευνας εκτιμήθηκε ότι 608.570 Αμερικανοί πέθαναν από καρκίνο το 2021 που αντιστοιχούν σε περισσότερους από 1600 θανάτους την ημέρα. Ο μεγαλύτερος αριθμός θανάτων είναι από καρκίνους του πνεύμονα, του προστάτη και του παχέος εντέρου στους άνδρες και καρκίνους του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου στις γυναίκες.

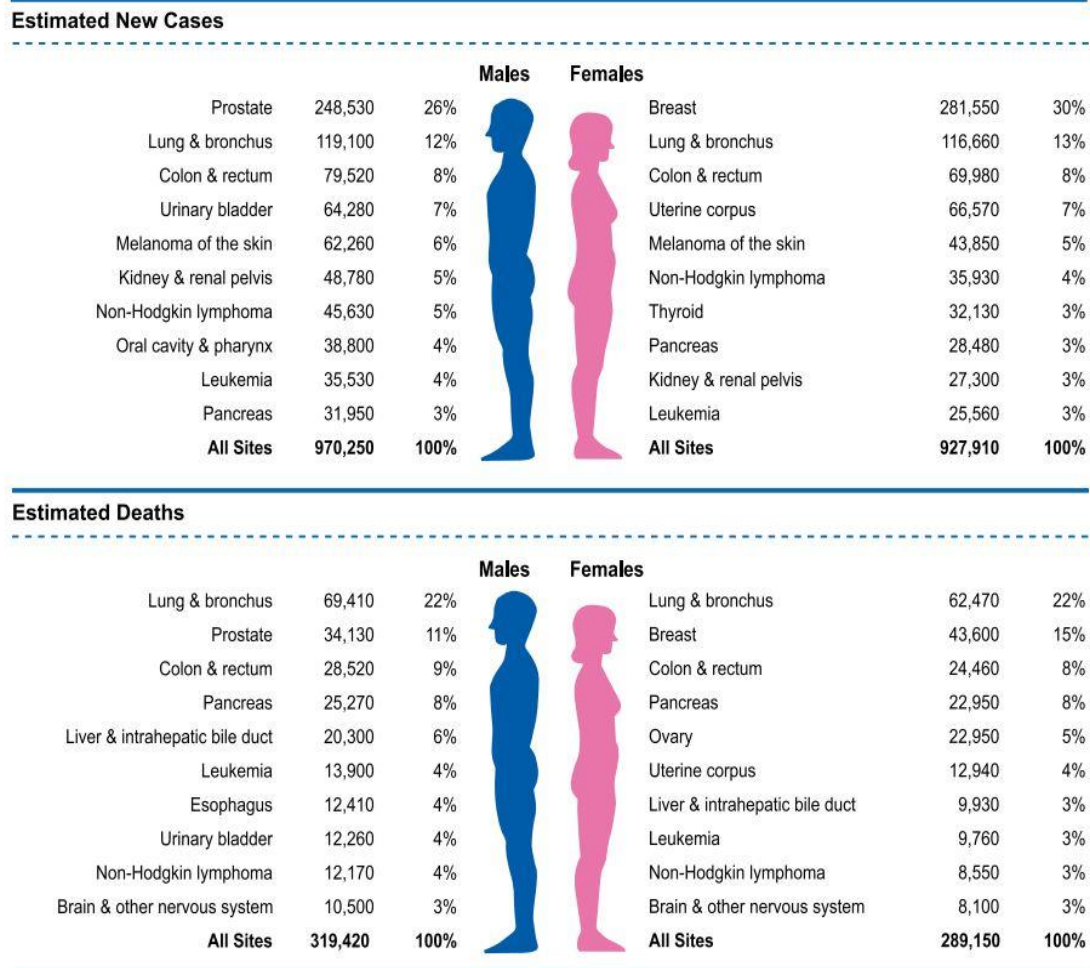


Figure 2. Οι 10 πιο συχνοί τύποι καρκίνου ανά φύλο στις ΗΠΑ, 2021. Πηγή: [7]

Η μειωμένη πρόσβαση στην υγειονομική περίθαλψη λόγω της αδυναμίας πρόσβασης σε αυτήν είχε ως αποτέλεσμα την καθυστερημένη διάγνωση και τελικά την αύξηση της θνησιμότητας. Ωστόσο, αυτή η δευτερεύουσα συνέπεια της πανδημίας θα χρειαστεί αρκετά

χρόνια για να ποσοτικοποιηθεί λόγω της υστέρησης στη διάδοση των δεδομένων επιτήρησης με βάση τον πληθυσμό. [7]

Ειδικότερα για τον καρκίνο, υπάρχουν πολλοί τύποι όγκων, περισσότερες από 200 διαφορετικές μορφές και πάνω από 60 όργανα του σώματος όπου μπορεί να εμφανιστεί στον άνθρωπο [8], που σχετίζονται με διαφορετικά συμπτώματα και εξέλιξη και διαφορετικό προσδόκιμο ζωής [9],[10]. Οι συχνότεροι διαγνωσμένοι καρκίνοι είναι του δέρματος, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού (στις γυναίκες) και του προστάτη (στους άνδρες) [11],[12].

Η ανάπτυξη του καρκίνου αποτελείται από τρία βασικά στάδια [10]:

- Την έναρξη
- Την προώθηση και
- Την εξέλιξη

Συνήθως προκύπτει από ένα κύτταρο στην αλληλουχία του DNA που μεταβάλλεται (από παράγοντες που ονομάζονται καρκινογόνοι παράγοντες) ή προκαλεί μετάλλαξη του DNA (από παράγοντες ονομάζονται μεταλλαξιογόνοι παράγοντες ή που προκύπτουν αυθόρμητα) [8], [13]. Στη συνέχεια το κύτταρο αρχίζει να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα σχηματίζοντας μια συγκεκριμένη μάζα (πρωτογενής όγκος) [14]. Τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και έχουν την δυνατότητα να εισβάλλουν και να διασκορπιστούν σε άλλες θέσεις μακριά από το σημείο προέλευσης. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται μετάσταση [6],[9],[14].

Τα κύρια χαρακτηριστικά των όγκων είναι τα εξής: διαταραχή της ρύθμισης των κυττάρων και ελλιπής κυτταρική ανάπτυξη [6],[9],[14],[15], αυτόνομος και απεριόριστος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, απώλεια μηχανισμού ελέγχου, αποφυγή ανασταλτικού σήματος και αγγειογένεση (νέα σύνθεση αιμοφόρων αγγείων) [14].

Οι όγκοι χωρίζονται ανάλογα με τον βαθμό επιθετικής ανάπτυξης και διεισδυτικότητας σε δύο κατηγορίες: καλοήθεις και κακοήθεις [10],[15]. Οι καλοήθεις όγκοι περιγράφονται ως μη επεμβατικοί: αναπτύσσονται αργά, είναι εντοπισμένοι και δεν εισβάλλουν στους παρακείμενους ιστούς [15]. Είναι επικίνδυνοι μόνο όταν γίνονται μεγάλοι σε μέγεθος και προκαλούν πίεση στα γύρω όργανα [13]. Οι κακοήθεις καρκίνοι είναι οι πιο επικίνδυνοι, καθώς μπορούν να εισβάλλουν στο λεμφικό σύστημα ή/και στην κυκλοφορία του αίματος, όπου είναι σε θέση να δημιουργήσουν μεταστάσεις [13], οι οποίες είναι η κύρια αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο [6]. Επιπλέον, δεν παραμένουν ενθλακωμένοι (encapsulated) για μεγάλες χρονικές

περιόδους [15]. Οι καλοήθεις όγκοι χαρακτηρίζονται συνήθως από κυτταρική διαφοροποίηση ενώ οι κακοήθεις όγκοι συχνά δεν διαφοροποιούνται [10],[16].

Οι όγκοι ταξινομούνται επίσης ανάλογα με την προέλευση του τύπου ιστού τους. Ο καρκίνος των επιθηλιακών κυττάρων ανήκει στο καρκίνωμα και χωρίζεται σε δύο ομάδες: αδενοκαρκίνωμα και ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα [15],[17]. Και οι δύο προκύπτουν από επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν την επιφάνεια του σώματος ή τα εσωτερικά όργανα και την κοιλότητα. Τα αδενοκαρκινώματα περιλαμβάνουν αδενικό ιστό και εκκριτικά κύτταρα, π.χ. καρκινώματα προστάτη, μαστού, πνεύμονα, μήτρας και τραχήλου [15],[17],[18]. Τα ακανθοκυτταρικά καρκινώματα περιλαμβάνουν καρκίνο του δέρματος, του λαιμού και των οισοφάγων. Οι μη επιθηλιακές μορφές καρκίνου είναι τα σαρκώματα (που προέρχονται από μεσοδερμικά κύτταρα), οι αιμοποιητικοί καρκίνοι (από κύτταρα του αίματος), τα λεμφώματα και τα μυελώματα (από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος) και τα γλοιώματα (καρκίνος του νευρικού ιστού) [10],[15],[18]. Υπάρχουν επίσης όγκοι που δεν ανήκουν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες, όπως τα μελανώματα (προέρχονται από το δέρμα, από χρωστικά κύτταρα: μελανοκύτταρα) και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Small-Cell Lung Cancers, SCLCs) [15],[18].

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου [19]. Παρά το γεγονός ότι η γήρανση είναι ο πιο θεμελιώδης παράγοντας, λόγω της έλλειψης μηχανισμού κυτταρικής επιδιόρθωσης [20], οι κύριοι παράγοντες κινδύνου σχετίζονται με τον τρόπο ζωής (π.χ. ανθυγιεινή διατροφή, παχυσαρκία, λιγότερη δραστηριότητα, κατανάλωση αλκοόλ), την προσωπική συμπεριφορά (π.χ. κάπνισμα, σεξουαλική συμπεριφορά, υπερέκθεση του ηλιακού φωτός), την επαγγελματική και περιβαλλοντική έκθεση [6],[14],[15]. Η ανάλυση του κινδύνου καρκίνου περιλαμβάνει επίσης καρκινογόνους παράγοντες (ουσία ικανή να προάγει την εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου), διαχωρισμένους σε φυσικούς (συμπεριλαμβανομένου του υπεριώδους φωτός (UV) και της ιονίζουσας ακτινοβολίας) [21], χημικούς (όπως η Ν-νιτροσοονοτιίνη [22], αφλατοξίνες, αρσενικό και αμίαντο [21] και βιολογικούς καρκινογόνους παράγοντες (περιλαμβάνουν ιούς [23], βακτήρια [24] και παράσιτα [25])[15],[26]. Το οικογενειακό ιστορικό και η γενετική προδιάθεση παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου [10],[15].

Ο καρκίνος μπορεί να αντιμετωπιστεί με διαφορετικές προσεγγίσεις, όπως χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και θεραπεία πρωτονίων. Η επιλογή της θεραπείας

εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου, τον βαθμό του όγκου και την επιθετικότητα, την ηλικία και την κατάσταση του ασθενούς.

Μια ιδιομορφία του καρκίνου είναι η ετερογένεια που παρουσιάζει. Δηλαδή, διαφορετικά καρκινικά κύτταρα μπορούν να εμφανίζουν διαφορετικά μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής μορφολογίας, των μοριακών και κυτταρικών προφίλ και των γενετικών χαρακτηριστικών [27]. Αυτή η ετερογένεια οφείλεται στη δυναμική του καρκίνου. Μπορεί να χωριστεί σε εξωκαρκινική και ενδοκαρκινική ετερογένεια (Intra-Tumoral Heterogeneity, ITH) [28]. Ο πρώτος είναι μεταξύ διαφορετικών ασθενών που πάσχουν από τον ίδιο τύπο όγκου. Η δεύτερη αναφέρεται στην ετερογένεια σε έναν μόνο ασθενή [28]. Η ετερογένεια μπορεί επίσης να διαπιστωθεί μεταξύ ιστών και οργάνων [29]. Μία από τις σημαντικότερες διαφορές είναι μεταξύ του πρωτογενούς καρκίνου και της μετάστασης. Η ετερογένεια εντός του όγκου (ITH) χαρακτηρίζεται από μεταβλητότητα στην παρουσίαση, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, τη συμπεριφορά και την ανταπόκριση στη θεραπεία [30]. Διακρίνεται σε χωρική ετερογένεια και χρονική ετερογένεια. Η πρώτη αντιπροσωπεύεται από γενετικά διαφορετικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε διαφορετικές ανατομικές περιοχές. Η δεύτερη αναφέρεται στην κυτταρική διαφοροποίηση με την πάροδο του χρόνου [28]. Η ITH σχετίζεται με την εξέλιξη του καρκίνου και θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για τον περιορισμό της δυνατότητας ανίχνευσης καρκίνου [31], της αποτυχίας της στοχευμένης θεραπείας και της αντοχής στα φάρμακα [27],[30], ιδίως όταν τα φάρμακα δεσμεύουν συγκεκριμένους στόχους (όπως υποδοχείς, πρωτεΐνες και μοριακούς μηχανισμούς). Από την άλλη, έχει σημαντικό αντίκτυπο στην κλινική εφαρμογή, ιδίως για την προσωπική θεραπεία [29],[31]. Για ορισμένες μορφές καρκίνου, η ετερογένεια είναι χρήσιμη για την ταξινόμηση. Η ITH μπορεί να εμφανιστεί σε μορφολογικό, ιστοπαθολογικό και μοριακό επίπεδο [30]. Για το μορφολογικό έχουμε δύο κύριες ομάδες: η κλωνική και η μη κλωνική ετερογένεια. Οι κλωνικοί μηχανισμοί μεταδίδονται στα θυγατρικά κύτταρα και συνήθως βασίζονται σε μεταλλάξεις του DNA ή μεταβολές στον αριθμό. Οι μη κλωνικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν παρακρινή και αυτοκρινή αλληλεπίδραση [32],[33]. Φαίνεται ότι και κάθε κύτταρο μπορεί να εκφράσει τη δική του μορφολογία [30]. Διαφορετικά ιστολογικά μοτίβα, που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά επίπεδα διαφοροποίησης μπορεί να υπάρχουν στον καρκίνο. Στον ίδιο όγκο ο βαθμός των άτυπων κυττάρων μπορεί να μετρηθεί και να κατηγοριοποιηθεί, όπως παρατηρείται και για τον καρκίνο του προστάτη: η βαθμολογία Gleason (Gleason score) μετρά τα διαφορετικά επίπεδα διαφοροποίησης στον όγκο, δίνοντας στη συνέχεια τον συγκεκριμένο βαθμό όγκου [34].

Διάφοροι μηχανισμοί εμπλέκονται στην αύξηση της ετερογένειας. Αυτοί οι μηχανισμοί είναι κυρίως κυτταρικά αυτόνομοι, επειδή είναι τα αποτελέσματα σφαλμάτων κατά την αντιγραφή του DNA. Ένα σφάλμα κατά την αντιγραφή του DNA μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση συγκεκριμένων μεταλλάξεων και τροποποιημένων φαινοτύπων [29] ή ανωμαλία στην κυτταρική ιεραρχία, που κανονικά διέπεται από βλαστοκύτταρα. Το μικροπεριβάλλον διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο, η κατάσταση της υποξίας ή της φυσιολογικής οξυγόνωσης μπορεί να μεταβάλει τους κυτταρικούς φαινοτύπους, η αλληλεπίδραση μεταξύ κλώνων και διαφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί επίσης να προκαλέσει διαφορές [27]. Για τους παραπάνω λόγους, έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές προσεγγίσεις τα τελευταία χρόνια, όπως θεραπεία με μόρια που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν περισσότερους βιολογικούς στόχους ταυτόχρονα. [27]

2. Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον 2^ο πιο συχνό καρκίνο στους άντρες [35] και είναι η 5^η σε σειρά αιτία θανάτου [36]. Είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος μεταξύ των ανδρών σε περισσότερες από τις μισές (105 από τις 185) χώρες του κόσμου [6],[36],[37], ιδίως στους Αμερικανούς, τη Βόρεια και Δυτική Ευρώπη, την Αυστραλία / Νέα Ζηλανδία και μεγάλο μέρος της Υποσαχάριας Αφρικής. Είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο μεταξύ των ανδρών σε 46 χώρες, ιδίως στην υποσαχάρια Αφρική και την Καραϊβική [1]. Τα ποσοστά είναι υψηλότερα μεταξύ των ανδρών αφρικανικής καταγωγής στις ΗΠΑ και την Καραϊβική, αντανακλώντας την εθνική(ethnic) και γενετική προδιάθεση [38], αλλά υπάρχουν λίγοι πρόσθετοι παράγοντες κινδύνου για προχωρημένο καρκίνο του προστάτη εκτός από το σωματικό λίπος, για τον οποίο υπάρχουν πειστικά στοιχεία συσχέτισης [39]. Η μέση ηλικία εκτιμάται ότι είναι περίπου 66 ετών [40], ενώ στους νεότερους είναι λιγότερο συχνή [9], μόνο το 1% είναι κάτω των 50 ετών [35]. Σύμφωνα με την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία περίπου 164.690 νέες περιπτώσεις υπολογίζονται το 2018 [9].

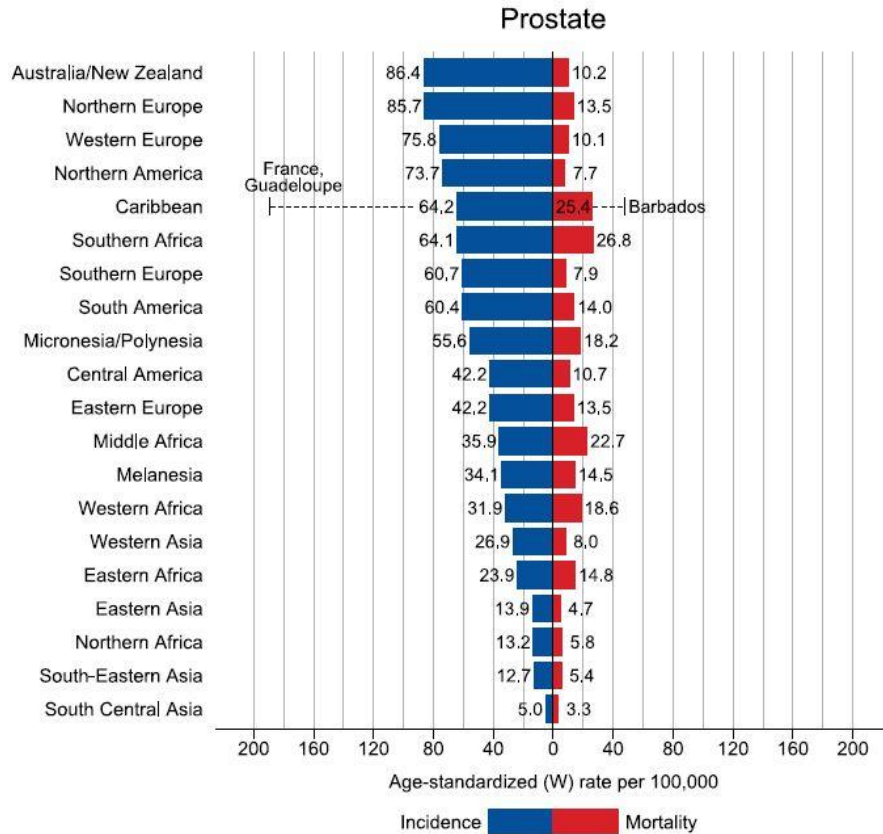


Figure 3. Διάγραμμα συχνότητας εμφάνισης ανά περιοχή και ποσοτών θνησιμότητας ανά ηλικία για καρκίνους του προστάτη το 2018. Πηγή: [1]

Ο καρκίνος του προστάτη (PCa) είναι αδενοκαρκίνωμα, ένας κακοήθης όγκος που προέρχεται κυρίως από αδένες και περιλαμβάνει επιθηλιακό ιστό [9]. Ο προστάτης είναι ένας αδένας που βρίσκεται στην πυελική κοιλότητα, κάτω από την ουροδόχο κύστη και το εσωτερικό στόμιο της ουρήθρας και μπροστά από το ορθό [41]. Αντιπροσωπεύει έναν από τους σημαντικότερους αδένες στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα [41],[42]. Τα ανδρογόνα εμπλέκονται στην ανάπτυξη του προστάτη, αλλά ο καρκίνος του προστάτη και η συσχέτιση ορμονών δεν είναι πλέον σαφής [43].

Φαίνεται ότι η αυξημένη παραγωγή τεστοστερόνης μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη [44]. Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η γήρανση, η φυλή, το οικογενειακό ιστορικό (το 25% των ασθενών με καρκίνο του προστάτη έχουν οικογενειακό ιστορικό αυτού του όγκου στο υπόβαθρό τους και οι άνδρες με προσβεβλημένους συγγενείς έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη), οι ιοί και οι λοιμώξεις (π.χ. η λοίμωξη από *Trichomonas vaginalis* σχετίζεται με επιθετική νόσο) και η έκθεση στο κάδμιο

(π.χ. με κάπνισμα) [6]. Διαπιστώθηκε ότι ορισμένες ουσίες που υπάρχουν στα ψάρια (ωμέγα-3 λιπαρά οξέα), σόγια (ισοφλαβόνες) και ντομάτες (λυκοπένιο), μπορούν να είναι χρήσιμες για την πρόληψη του καρκίνου του προστάτη, καθώς και η κατανάλωση χυμού ροδιού [9], παρά το γεγονός ότι μια ανθυγιεινή διατροφή θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό κίνδυνο [6]. Ο καρκίνος του προστάτη δεν συνδέεται πάντα με το θάνατο, στην πραγματικότητα συνήθως αναπτύσσεται αργά (προκαλείται από τις μεγάλες ηλικίες και τον γηρασμένο μεταβολισμό του ασθενούς). Μελέτες νεκροψίας δείχνουν ότι πολλοί ηλικιωμένοι άνδρες που είχαν καρκίνο του προστάτη, πέθαναν από διαφορετικές αιτίες [9]. Κυρίως οι περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη είναι ασυμπτωματικές στο αρχικό τους στάδιο (συχνά παραμένουν απαρατήρητες) [6]. Εάν ο καρκίνος του προστάτη προκαλεί συμπτώματα, αυτά είναι παρόμοια με άλλα μη καρκινικά νοσήματα, όπως η καλοήθης υπερπλασία του προστάτη (BPH). Αυτά τα συμπτώματα περιλαμβάνουν συχνή ούρηση, ιδιαίτερα νυκτουρία (αυξημένη ούρηση κατά τη διάρκεια της νύχτας), αδύναμη ή διακεκομμένη ροή των ούρων, αιματουρία (αίμα στα ούρα), πόνο στη μέση και μερικές φορές επίσης αίσθημα καψίματος κατά την ούρηση ή την εκσπερμάτιση [45].

Ειδικά στους νέους άνδρες, ο καρκίνος του προστάτη μπορεί να είναι επιθετικός και θα μπορούσε, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και του λεμφικού ιστού, να φτάσει σε άλλα όργανα, αναπτύσσοντας μεταστάσεις, οι οποίες εντοπίζονται στα σπερματοδόχα κυστίδια, στον πυελικό λεμφαδένα, στα οστά και στους πνεύμονες [6].

Έτσι ο προσυμπτωματικός έλεγχος του καρκίνου του προστάτη κρίνεται απαραίτητος. Ο έλεγχος αυτός βασίζεται στη μέτρηση της συγκέντρωσης του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) στο αίμα [46]. Παρατηρήθηκε ότι κανονικά ένα επίπεδο $> 4 \text{ ng/mL}$ σχετίζεται με κακοήθεια, ακόμη και αν ορισμένοι όγκοι με PSA 0 έως 4 ng/mL αντιπροσωπεύουν μια επιθετική μορφή [47]. Ωστόσο, η «κανονική τιμή της συγκέντρωσης PSA» είναι αμφιλεγόμενη, γενικά είναι μικρότερη από 4 ng/mL , αλλά δεν είναι ακριβής δείκτης. Η ταχύτητα αύξησης της τιμής του PSA αξιολογείται επίσης για την κατανόηση της επιθετικότητας του όγκου και της εξάπλωσης του όγκου, συνήθως εάν είναι $> 0,75 \text{ ng / ml / έτος}$ θεωρείται υψηλή [48]. Το τεστ αυτό δεν μπορεί να είναι το μόνο που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση [46]. Κανονικά θα είναι ο πρώτος έλεγχος, τον οποίο θα ακολουθεί ψηφιακή ορθική εξέταση (digital rectal examination, DRE) και διορθικό υπερηχογράφημα (transrectal ultrasonography, TRUS). Η δεύτερη είναι πολύ επεμβατική και μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές όπως λοίμωξη, αιμορραγία και σηψαιμία [49]. Για την επιβεβαίωση της διάγνωσης, χρησιμοποιείται το TURP (Transurethral Resection of Prostate), το οποίο είναι μια εξέταση και για άνδρες που έχουν καλοήγη υπερπλασία του προστάτη (benign

prostatic hyperplasia, BPH). Αυτή η μέθοδος θεωρείται ως το πρότυπο στη θεραπεία της BPH καθώς μπορεί να διακρίνει μεταξύ καλοήθους υπερπλασίας και κακοήθειας και δεν έχει αρνητικές επιπτώσεις στα αποτελέσματα της ριζικής προστατεκτομής [49].

Πρόσφατα, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) ήταν αποτελεσματική για τη διάγνωση του καρκίνου του προστάτη και σε πρώιμα στάδια [48],[50],[51]. Το λεγόμενο σύστημα TNM χρησιμοποιείται περισσότερο για τον χαρακτηρισμό του καρκίνου του προστάτη. Βασίζεται σε πέντε πτυχές: την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου (Tumor, T), τον αριθμό των λεμφαδένων που εμπλέκονται, εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί (Number, N), την απουσία ή την παρουσία μετάστασης (Metastasis, M), το επίπεδο PSA και την ομάδα βαθμού (αυτό βασίζεται στη βαθμολογία Gleason και μετρά την εξάπλωση και την ανάπτυξη του καρκίνου)[9].

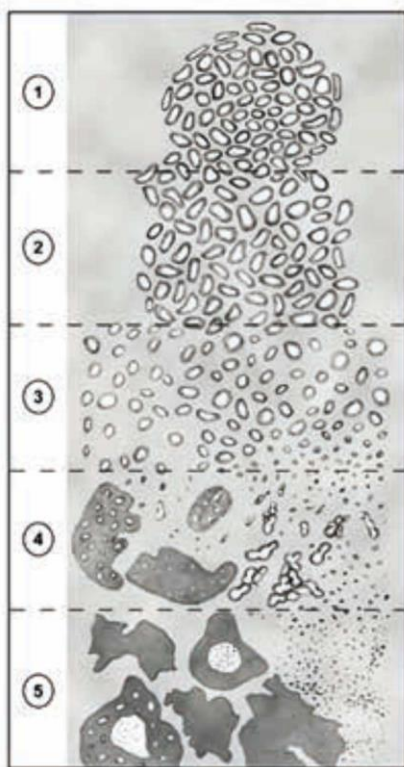


Figure 4. Διάγραμμα βαθμών Gleason (Από το χαμηλότερο σκορ (1), στο υψηλότερο σκορ, πιο επιθετική μορφή (5)).
Πηγή: [6]

Αυτά τα γράμματα ακολουθούνται πάντα από έναν αριθμό (από I έως IV), ο οποίος χαρακτηρίζει το επίπεδο της εξέλιξης του καρκίνου. Για τον χαρακτηρισμό του πρωτογενούς όγκου (T) υπάρχουν επίσης δύο άλλες κατηγορίες: Κλινική T, εκτιμώμενη με φυσική εξέταση και βιοψία, και Παθολογική T, που προσδιορίζεται μετά την αφαίρεση του προστάτη [9]. Τα κλινικά

δεδομένα είναι χρήσιμα ειδικά για τη λήψη αποφάσεων θεραπείας. Η αξιολόγηση βασίζεται καλύτερα σε ιστοπαθολογικά δεδομένα.

Ο καρκίνος του προστάτη μπορεί να αντιμετωπιστεί με χειρουργική επέμβαση [52], θεραπεία στέρησης ορμονών (hormone deprivation therapy) [53],[54], ακτινοθεραπεία [55], χημειοθεραπεία (π.χ. με docetaxel) [56], κρυοθεραπεία [57] και εστιασμένη υπερηχογραφική θεραπεία υψηλής έντασης (high intensity focused ultrasound, HIFU) [55]. Χρησιμοποιείται επίσης ανοσοθεραπεία, ειδικά ορισμένα εμβόλια έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα, και φάρμακα στοχευμένης θεραπείας, που θα ήταν τα μελλοντικά φάρμακα, που χρησιμοποιούνται κατά της ανάπτυξης αγγειογένεσης [9]. Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται από την ηλικία, την έκταση και τη βαρύτητα του ασθενούς.

Οι διαθέσιμες μέθοδοι απεικόνισης του PCa είναι οι ακόλουθες:

- 1) Μαγνητική Τομογραφία (MRI)
- 2) Αξονική Τομογραφία (CT)
- 3) PET/CT (FDG, NaF, Χολίνη, Φλουτσκοβίνη, PSMA, FDHT(18F-16b-φθορο-5α-διυδροτεστοστερόνη))
- 4) PET/MRI. [11]

3. Διαγνωστικά ισότοπα – ραδιοφάρμακα

Τα ραδιοφαρμακευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στη διαγνωστική πυρηνική ιατρική εκπέμπουν γενικά είτε ακτινοβολία γάμμα είτε ποζιτρόνια και ο χρόνος ημιζωής των ραδιοϊσοτόπων για απεικονιστικές εφαρμογές κυμαίνεται γενικά από λεπτά έως αρκετές ώρες. Ο Πίνακας 1 παρέχει μια περίληψη των ραδιοϊσοτόπων που χρησιμοποιούνται συνήθως για διαγνωστικά ραδιοφαρμακευτικά προϊόντα. [58]

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ισωτόπων που χρησιμοποιούνται για διάγνωση στην πυρηνική ιατρική

Radionuclide	Half-life	Emission
¹⁵ O	2.1 min	Positron
¹¹ C	20.4 min	Positron
⁶⁸ Ga	60 min	Positron
¹⁸ F	109.8 min	Positron
^{99m} Tc	6 h	Gamma
¹¹¹ In	2.8 d	Gamma
¹²³ I	13.2 h	Gamma

Τα ραδιοφαρμακευτικά προϊόντα χορηγούνται σε ασθενείς και στη συνέχεια διαχέονται με βάση καθιερωμένες φυσιολογικές αρχές που εξαρτώνται από τις ειδικές ιδιότητες του παράγοντα στόχευσης. Όλα τα ραδιοφάρμακα είναι προσεκτικά σχεδιασμένα και έχουν σαφώς καθορισμένες ιδιότητες που διέπουν την προσρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απέκκριση (ADME). Η απεικόνιση των ραδιοφαρμάκων διεξάγεται σε καθορισμένα χρονικά σημεία τα οποία εξελίσσονται ως πρωτόκολλα απεικόνισης [59]. Συνήθως η απεικόνιση αρχίζει μετά την εκκαθάριση της ακτινοβολίας από την κυκλοφορία του αίματος.[58]

Τα ραδιοϊσότοπα PET είναι ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν ποζιτρόνιο [60], [61]. Ένα ιδανικό ραδιοϊσότοπο PET θα πρέπει να παρουσιάζει συγκεκριμένες ιδιότητες που συνοψίζονται παρακάτω. Ο χρόνος ημιζωής του ραδιοϊσοτόπου, ο οποίος συνδέεται με το μόριο του βιολογικού φορέα, θα πρέπει να ταιριάζει με τη φαρμακοκινητική του ιχνηθέτη [62] και να είναι κατάλληλος για εξέταση (ίση με τη διάρκεια της μέτρησης αλλά ταυτόχρονα όχι πολύ μεγάλη, ώστε να αποφεύγεται η περιττή έκθεση του ασθενούς σε ακτινοβολία) [62],[63],[64],[65]. Επιπλέον, ο χρόνος ημίσειας ζωής πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος για τη χημική σύνθεση και τον ποιοτικό έλεγχο. Τα ραδιοϊσότοπα θα πρέπει να μπορούν να παράγονται σε μεγάλες ποσότητες [62],[63], [64],[65]. Ένα καλό ισότοπο PET χαρακτηρίζεται από τη χαμηλή πιθανότητα εκπομπής γ στην περιοχή των 400-800 MeV, γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει τη λεγόμενη ψευδή σύμπτωση [62],[63],[64],[65]. Επίσης, δεν πρέπει να σχετίζονται με ρυθμό φωτονίων υψηλής ενέργειας, επειδή το φαινόμενο Compton διασκορπίζει τα φωτόνια. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται πρέπει να είναι εξαιρετικά ειδική, η περιττή ακτινοβολία μπορεί να επιβαρύνει τους ασθενείς. Η χαμηλή τελική ενέργεια του ποζιτρονίου είναι επιθυμητή, επειδή η κύρια ενέργεια σχετίζεται με χαμηλή ανάλυση εικόνων PET [62]. Επιπλέον, απαιτείται υψηλή αναλογία για τη διάσπαση β+ σε σύγκριση με τη δέσμευση ηλεκτρονίων [62].

Οι κυριότερες μέθοδοι πυρηνικής απεικόνισης είναι: η υπολογιστική τομογραφία εκπομπής ενός φωτονίου (SPECT) και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), η οποία σχετίζεται με εικόνες υψηλότερης ανάλυσης [58]. Η αρχή στην οποία βασίζεται η PET απεικόνιση είναι η λήψη εικόνων από πολλαπλές γωνίες γύρω από έναν ασθενή [67], η οποία περιγράφει την κατανομή της ραδιενέργειας [68]. Βασίζεται στην εκπομπή ποζιτρονίων [67]. Οι κάμερες PET, οι οποίες ανιχνεύουν φωτόνια που προέρχονται από εξαϋλωση (annihilation) ποζιτρονίων και ηλεκτρονίων [67],[68], είναι πολλαπλοί ανιχνευτές που συνδέονται με κύκλωμα σύμπτωσης (coincidence) γύρω από τον ασθενή [65],[67]. Τα ραδιοφαρμακευτικά προϊόντα χορηγούνται σε ασθενείς, ενδοφλεβίως, και εντοπίζονται σε συγκεκριμένο σημείο του σώματος [58]. Τα

ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιούνται για το PET είναι εκπομποί ποζιτρονίων, με βραχεία ημιζωή, ραδιοϊσότοπα όπως τα Φθόριο-18 (Fluorine-18, ^{18}F), Άνθρακας-11 (Carbon-11, ^{11}C) και Γάλλιο-68 (Gallium-68, ^{68}Ga) [60],[61]. Το αποτέλεσμα είναι μια 3D εικόνα, πολύ συγκεκριμένη και χαρτογραφημένη, η οποία αντιπροσωπεύει τη χωρική ανακατασκευή των ιχνηθετών κατά τη στιγμή της απεικόνισης [48]. Η ποσότητα των ιχνηθετών είναι ευθέως ανάλογη με την ένταση του σήματος [48].

Η τεχνική αυτή παρέχει πολύ κρίσιμες πληροφορίες, όπως αποκάλυψη ορισμένων φυσιολογικών διεργασιών, οι οποίες δεν μπορούν να ληφθούν από άλλες συμβατικές τεχνικές απεικόνισης [48]. Είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές ελέγχου που χρησιμοποιούνται στην κλινική ογκολογία. Είναι σε θέση να ανιχνεύσει μια ποικιλία καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, όγκων του πνεύμονα, όγκων κεφαλής και τραχήλου, καρκίνου του προστάτη, καρκίνου των ωθηκών, καρκινώματος του μαστού, λεμφώματος, μελανώματος και άλλων καρκίνων μαλακών μορίων [69],[70]. Η δυνατότητά του δεν είναι μόνο να παρέχει ένα μέσο για τη διάγνωση του καρκίνου, αλλά και να χρησιμεύσει ως εργαλείο για την παρακολούθηση των επιπτώσεων της θεραπείας στο μεταβολισμό των ιστών [70]. Το PET μπορεί να συνδυαστεί με CT (PET/CT), το οποίο χαρακτηρίζεται από καλύτερη απόδοση και ακρίβεια [69] και με MRI (PET/MRI).

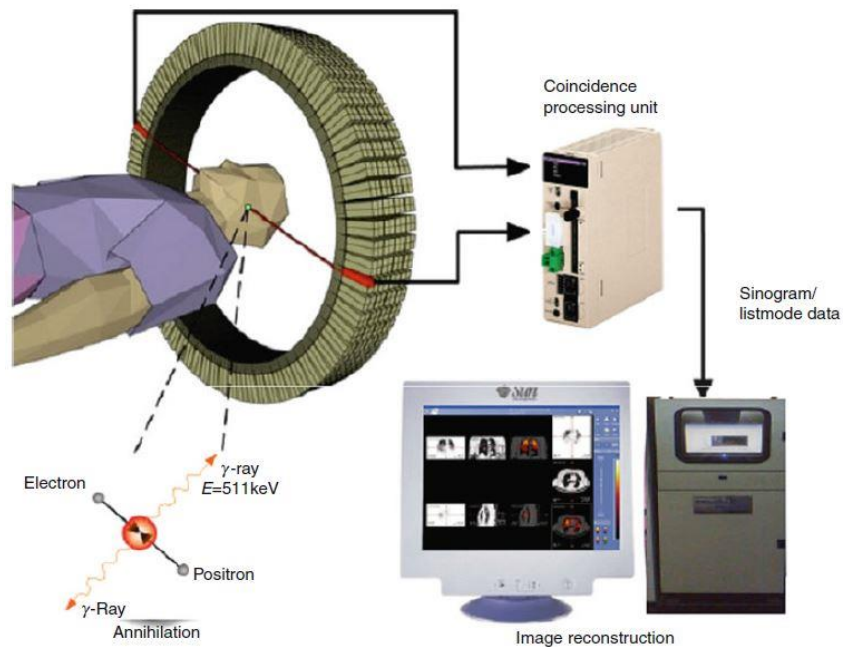


Figure 5. Σχηματική αναπαράσταση PET συστήματος. Πηγή: [58]

3.1 Γάλλιο

Το Γάλλιο έχει παρόμοιες χημικές ιδιότητες με τα στοιχεία της ομάδας του περιοδικού πίνακα στην οποία ανήκει (Ομάδα 13), ειδικά με το Αργίλιο (Al) και το Ίνδιο (In). Υπάρχουν 30 ισότοπα Γαλλίου, 2 φυσικά σταθερά (^{69}Ga και ^{71}Ga) και 28 ραδιενεργά, που παράγονται τεχνητά.

The image shows a periodic table with Gallium (Ga) highlighted in blue. Callouts point to the following information for Gallium:

- atomic number: 31
- symbol: Ga
- name: Gallium
- electrons per shell: 2-8-18-3
- p-block

1	atomic number																18								
1	H																	2	He						
2	Li	Be											13	B	14	C	15	N	16	O	17	F	18	Ne	
11	Na	Mg	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	31	Ga	32	Ge	33	As	34	Se	35	Br	36	Kr	
19	K	Ca	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	49	In	50	Sn	51	Sb	52	Te	53	I	54	Xe	
37	Rb	Sr	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	81	Tl	82	Pb	83	Bi	84	Po	85	At	86	Rn	
55	Cs	Ba	89-103	72	73	74	75	76	77	78	80	80	Hg	81	Tl	82	Pb	83	Bi	84	Po	85	At	86	Rn
87	Fr	Ra	Actinides	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	118	Og					
			57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71								
			La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu								
			89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103								
			Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lw								

Figure 6. Το Γάλλιο στον περιοδικό πίνακα των στοιχείων. Πηγή: <https://priyamstudycenter.com/2021/06/gallium-metal-element.html>

Το Γάλλιο, λόγω του χαμηλού αναγωγικού δυναμικού του σε υδατικά διαλύματα, βρίσκεται συνήθως στην οξειδωτική κατάσταση +3. Το ελεύθερο εφυδατωμένο κατιόν $[\text{Ga}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ είναι σταθερό μόνο σε ισχυρά όξινες συνθήκες. Σε pH 4-7, απουσία κατάλληλων χηλικών υποκαταστατών (chelators), σχηματίζει άμορφα, αδιάλυτα υδροξείδια $\text{Ga}(\text{OH})_3$ τα οποία θα μπορούσαν να αποτελέσουν πρόβλημα κατά την παραγωγή ραδιοφαρμάκων ^{68}Ga . Ο σχηματισμός υδροξειδίων μπορεί να αποφευχθεί με την παρουσία ασθενών υποκαταστατών όπως τα οξικά ιόντα, τα οποία σταθεροποιούν το κατιόν. Το μεταλλοκατιόν $\text{Ga}(\text{III})$ χαρακτηρίζεται ως ισχυρό οξύ κατά Pearson, ιδιότητα που οφείλεται στο υψηλό φορτίο σε συνδυασμό με τη μικρή ιοντική του ακτίνα. Ως ισχυρό οξύ (pKa 2.6), το $\text{Ga}(\text{III})$ μπορεί να συνδεθεί με βάσεις κατά

Lewis, δηλαδή ενώσεις που περιέχουν άτομα-δότες ηλεκτρονίων όπως το οξυγόνο και το άζωτο. Έτσι, συνδέεται με υποκαταστάτες που περιέχουν άτομα με ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σύμπλοκες ενώσεις [115].

Κατά τον σχεδιασμό ραδιοφαρμάκων Γαλλίου πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ικανότητα δέσμησης του Ga(III) σε βιολογικά μόρια. Σε ραδιοφαρμακευτικές εφαρμογές, το Γάλλιο χορηγείται υπό μορφή συμπλόκου, το οποίο θα πρέπει να είναι θερμοδυναμικά σταθερό in vivo, ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αποδέσμησης του ραδιοϊσοτόπου και η μετέπειτα συμπλοκοποίηση αυτού με πρωτεΐνες του αίματος, όπως είναι η τρανσφερρίνη. Το Ga(III) σχηματίζει σύμπλοκες ενώσεις με πολυσχιδείς υποκαταστάτες που περιέχουν ομάδες με ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων. Συνεπώς, υποκαταστάτες που περιέχουν ισχυρούς δότες ηλεκτρονίων όπως αμινομάδες, καρβοξυλομάδες, φωσφονικές ομάδες αλλά και ασθενέστερους δότες όπως φαινολικές ομάδες ή ομάδες θείου, μπορούν να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα με το Ga(III). Εκτός από τη φύση των ομάδων, σημαντικό ρόλο παίζει και ο αριθμός σύνταξης. Ο κορεσμός της σφαίρας συντάξεως του γαλλίου προσδίδει μεγαλύτερη σταθερότητα στο σύμπλοκο, ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα υδρόλυσης ή αντικατάστασης. Έτσι, ο συνηθέστερος αριθμός σύνταξης των συμπλόκων Γαλλίου είναι 6, και το σύμπλοκο που προκύπτει είναι οκταεδρικής γεωμετρίας [115].

Οι δύο μεγάλες κατηγορίες υποκαταστατών που χρησιμοποιούνται στην ραδιοφαρμακευτική χημεία είναι οι γραμμικοί (linear chelators) και οι μακροκυκλικοί (macrocyclic chelators). Από τους πιο σημαντικούς γραμμικούς υποκαταστάτες είναι το διαιθυλενοτριάμινο-πενταοξικό οξύ (DTPA, diethylenetriaminopentaacetic acid). Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι μακροκυκλικοί υποκαταστάτες είναι το 1,4,7,10-τετρααζακυκλοδωδεκάνιο-1,4,7,10-τετραοξικό οξύ (DOTA, 1,4,7,10-tetraaza-cyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), το 1,4,7-τριαζα-κύκλοεννάνιο-1,4,7-τριοξικό οξύ (NOTA, 1,4,7-triaza-cyclononane-1,4,7-triacetic acid) και τα παράγωγά τους. Τα μόρια αυτά είναι εξέχουσας σημασίας γιατί σχηματίζουν θερμοδυναμικά σταθερά σύμπλοκα με το Ga(III).

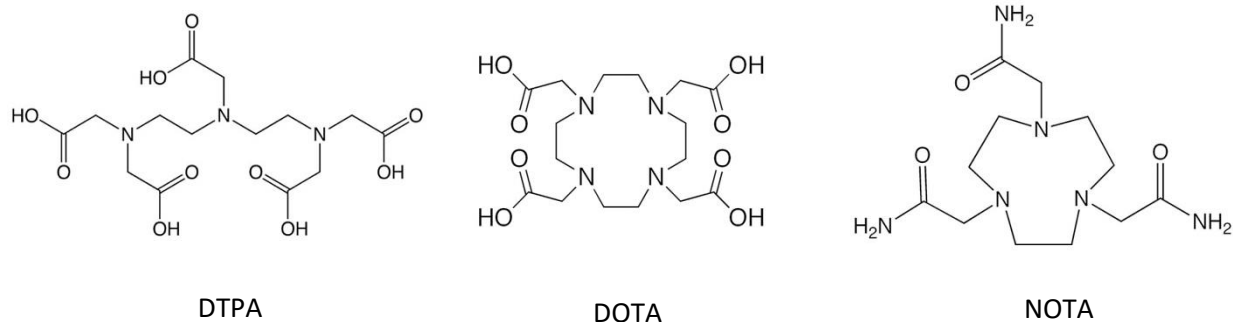


Figure 7. Οι χηλικοί υποκαταστάτες DTPA, DOTA ΚΑΙ NOTA

οφείλεται στο μικρό μέγεθος του Ga(III) που εφαρμόζει καλύτερα στην κοιλότητα του εννεαμελούς δακτυλίου το NOTA.[115]

Το ^{68}Ga είναι ένα από τα κατεξοχήν χρησιμοποιούμενα ισότοπα για διάγνωση με PET. Πρόκειται για ένα ραδιοϊσότοπο εκπομπής ποζιτρονίων με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (68 λεπτά). Η αύξηση της κλινικής χρήσης του ^{68}Ga φαίνεται εξασφαλισμένη, καθοδηγούμενη τόσο από τη διαθεσιμότητα του ισότοπου (μέσω κυκλότρων και μεθόδων παραγωγής που βασίζονται σε γεννήτριες) όσο και από την ανάπτυξη γρήγορων, εύχρηστων μεθόδων ραδιοεπισήμανσης που μπορούν να εκτελεστούν επί τόπου χωρίς δαπανηρές υποδομές. Το ^{68}Ga μετασχηματίζεται σε σταθερό ψευδάργυρο-68 (^{68}Zn) με εκπομπή ποζιτρονίων (89%) και δέσμευση ηλεκτρονίων [71]. Σήμερα το ^{68}Ga χρησιμοποιείται σε ραδιοφάρμακα σε κλινική χρήση στην ογκολογία, και η ανάπτυξη νέων ραδιοφαρμάκων ^{68}Ga γνωρίζει μεγάλη άνθηση.

4. Θεραπευτικά ισότοπα – ραδιοφάρμακα

Η ραδιοφαρμακευτική θεραπεία (Radiopharmaceutical Therapy, RPT) ορίζεται από την καθοδήγηση ραδιενεργών ατόμων σε στόχους που σχετίζονται με όγκους. Σε αντίθεση με την ακτινοθεραπεία, η ακτινοβολία δεν χορηγείται από το εξωτερικό του σώματος, αλλά αντίθετα χορηγείται συστηματικά ή τοπικά, παρόμοια με τη χημειοθεραπεία ή τη βιολογικά στοχευμένη θεραπεία. Η RPT εξαρτάται πολύ λιγότερο από την κατανόηση των οδών σηματοδότησης και από τον εντοπισμό παραγόντων που διακόπτουν το υποτιθέμενο μονοπάτι (ή μονοπάτια) οδήγησης φαινοτύπου καρκίνου. Η RPT έχει δείξει αποτελεσματικότητα με ελάχιστη τοξικότητα (3). Επιπλέον, σε αντίθεση με τη χημειοθεραπεία, η ανταπόκριση στη θεραπεία με παράγοντες RPT συνήθως δεν απαιτεί πολλούς μήνες (ή κύκλους) θεραπείας και συχνά παρατηρείται μετά από μία ή το πολύ πέντε ενέσεις. Επιπροσθέτως, ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως η αλωπεκία ή η

περιφερική νευροπάθεια είναι γενικά λιγότερο σοβαρές από αυτές με τη χημειοθεραπεία, εάν παρατηρηθούν. [66]

Σε αντίθεση με το στόχο του περιορισμού της δόσης ακτινοβολίας ιστού για διαγνωστικές εφαρμογές, η θεραπεία με την χρήση πυρηνικής ιατρικής έχει σχεδιαστεί για να παρέχει θεραπευτικές δόσεις ιονίζουσας ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα σημεία για θεραπεία, έλεγχο/περιορισμό ασθενειών ή ανακούφιση του πόνου. Η ιονίζουσα ακτινοβολία προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη στο πυρηνικό DNA με επαγωγή θραύσεων της διπλής έλικας, αναστέλλοντας έτσι τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων.

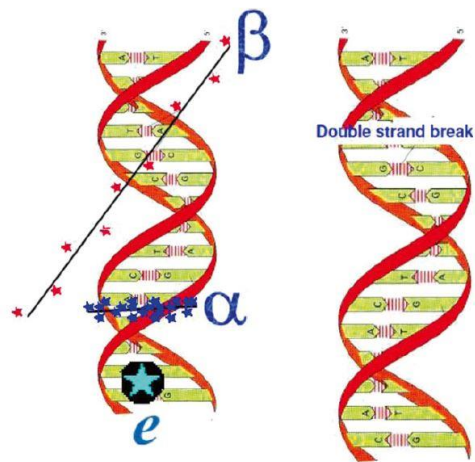


Figure 8. Σχηματική αναπαράσταση θραύσης της διπλής έλικας DNA με την επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας. Πηγή: [58]

Στη θεραπεία με ραδιοϊσότοπα, το βιολογικό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται με ενέργεια που απορροφάται από την ακτινοβολία που εκπέμπεται από το ραδιοϊσότοπο. Ως εκ τούτου, ένα ραδιοϊσότοπο που χρησιμοποιείται για στοχευμένη θεραπεία πρέπει να εκπέμπει σωματιδιακές ακτινοβολίες που έχουν σχετικά μικρά μήκη διαδρομής, εναποθέτοντας έτσι την ενέργεια ακτινοβολίας σε μικρό όγκο κυττάρων για να γλιτώσει τους μη στοχευόμενους/υγιείς ιστούς.

Ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιούνται για στοχευμένη θεραπεία εκπέμπουν ηλεκτρόνια άλφα, βήτα ή Auger [58],[72],[73],[74],[75],[76]. Δεν πρέπει να εκπέμπουν πρόσθετες γραμμές γάμμα, επειδή καλό θα ήταν να μην προκαλέσουν στοχευμένη επιβάρυνση ακτινοβολίας. Τα β-σωματίδια που εκπέμπονται μπορούν να διεισδύσουν στους ιστούς και να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη [58], όπως κυτταρική βλάβη του DNA [74]. Ωστόσο, δεν είναι τοξικά για άλλους ιστούς, λόγω του μικρού εύρους εναπόθεσης ενέργειας (της τάξης των 1-5mm) [66],[72]. Οι εκπομποί β-σωματιδίων Σαμάριο-153 (Samarium-153, ^{153}Sm), Λουτέσιο-177 (Lutetium-177, ^{177}Lu), Ύτριο-90 (Yttrium-90, ^{90}Y) και Ιώδιο-131 (Iodine-131, ^{131}I) έχουν εισαχθεί και

χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία 40 χρόνια. Το πιο γνωστό και συχνά χρησιμοποιούμενο από αυτά είναι το ^{131}I , το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς. [66]

Τα σωματίδια α , ανάλογα με την ενέργεια εκπομπής τους, μπορούν να ταξιδέψουν 50-100 μm στον ιστό. Η ποσότητα ενέργειας που εναποτίθεται ανά μήκος διαδρομής που διανύεται από σωματίδια α είναι περίπου 400 φορές μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονίων. [66] Αυτό οδηγεί σε σημαντικά μεγαλύτερη ζημιά κατά μήκος της διαδρομής τους από αυτή που προκαλείται από ηλεκτρόνια (β -εκπομπούς). Μια τροχιά σωματιδίων α οδηγεί σε υπεροχή πολύπλοκων και σε μεγάλο βαθμό ανεπανόρθωτων θραύσεων της διπλής έλικας του DNA [78],[79]. Οι εκπομποί σωματιδίων α που εισήχθησαν και χρησιμοποιήθηκαν για RPT τα τελευταία 40 χρόνια περιλαμβάνουν Αστάτιο-211 (Astatine-211, ^{211}At), Βισμούθιο-212 (Bismuth-212, ^{212}Bi), Μόλυβδο-212 (Lead-212, ^{212}Pb), Βισμούθιο-213 (Bismuth-213, ^{213}Bi), Ακτίνιο-225 (Actinium-225, ^{225}Ac), Ράδιο-223 (Radium-223, ^{223}Ra) και θόριο-227 (Thorium-227, ^{227}Th). Το διχλωριούχο ^{223}Ra (Xofigo) είναι ένα θεραπευτικό ραδιοφάρμακο που εγκρίθηκε από τον FDA τον Μάιο του 2013. [66]

Ο χρόνος ημιζωής του ισότοπου, όπως και στη διάγνωση, θα πρέπει να είναι παρόμοιος με τη φαρμακοκινητική του φορέα [72]. Για θεραπευτικό σκοπό, το ιδανικό ραδιοϊσότοπο θα πρέπει να είναι εύκολο να παραχθεί [58]. Η επιλογή του θεραπευτικού ραδιοϊσοτόπου εξαρτάται ιδιαίτερα από το μέγεθος του όγκου [72]. Θα πρέπει επίσης να συνδέεται με μη επιβλαβή θυγατρικά ισότοπα στο σώμα. Χαρακτηριστικά ραδιοϊσότοπα που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς περιλαμβάνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2 Χαρακτηριστικά παραδείγματα ισωτόπων που χρησιμοποιούνται για θεραπεία στην πυρηνική ιατρική

Radionuclide	Half-life	Emission
^{225}Ac	10.0 d	Alpha
^{131}I	8 d	Beta-
^{177}Lu	6.6 d	Beta-
^{153}Sm	46.5 h	Beta-
^{90}Y	64.1 h	Beta-
$^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$	10.6 h / 1 h	Beta-/Alpha
^{223}Ra	11.4 d	Alpha
^{211}At	7.2 h	Alpha

5. Theranostics (Θεραπογνωστική)

Ο όρος "Theranostic" επινοήθηκε από τον Funkhouser [77] και ορίζεται ως ένα υλικό που συνδυάζει τις μεθόδους θεραπείας και διαγνωστικής απεικόνισης. Έτσι, τα theranostics παρέχουν θεραπευτικά φάρμακα και διαγνωστικούς απεικονιστικούς παράγοντες ταυτόχρονα εντός της ίδιας δόσης. Πριν από την έναρξη της θεραπείας διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί διαγνωστική απεικόνιση για να κατανοηθεί ο κυτταρικός φαινότυπος και η ετερογένεια του όγκου [80],[81],[82]. Σε αντίθεση με την ανάπτυξη και τη χρήση ξεχωριστών υλικών για αυτούς τους δύο στόχους, η λογική του theranostic συνδυάζει αυτά τα χαρακτηριστικά σε ένα «πακέτο», το οποίο έχει τη δυνατότητα να ξεπεράσει ανεπιθύμητες διαφορές στη βιοκατανομή και την εκλεκτικότητα που υπάρχουν σήμερα μεταξύ ξεχωριστών απεικονιστικών και θεραπευτικών παραγόντων. Ο απώτερος στόχος του theranostic πεδίου είναι να αποκτήσει την ικανότητα να απεικονίζει και να παρακολουθεί τον άρρωστο ιστό, την κινητική ως τον στόχο και την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. [83]

Στο πλαίσιο της πυρηνικής ιατρικής, αναφέρεται στη χρήση φορέων μοριακής στόχευσης (π.χ. πεπτίδια) επισημασμένων είτε με διαγνωστικά ραδιοϊσότοπα (π.χ. ^{68}Ga), είτε με θεραπευτικά ραδιοϊσότοπα (π.χ. ^{177}Lu) για τη διάγνωση και τη θεραπεία αντίστοιχα μιας συγκεκριμένης νόσου, που στοχεύουν ειδικά σε μοριακό επίπεδο. Επομένως, η μοριακή απεικόνιση και διάγνωση της ασθένειας μπορεί να ακολουθηθεί αποτελεσματικά από εξατομικευμένη θεραπεία χρησιμοποιώντας ΑΚΡΙΒΩΣ τους ίδιους φορείς μοριακής απεικόνισης. Ένα από τα κλασσικά παραδείγματα theranostics είναι η χρήση ιχνηλατών με Ga-68, όπου η διάγνωση χρησιμοποιώντας το ραδιοϊσότοπο που προέρχεται από γεννήτρια μπορεί να ακολουθηθεί αποτελεσματικά από τη θεραπεία χρησιμοποιώντας θεραπευτικά ραδιοϊσότοπα όπως Lu-177 και Y-90 επισημασμένα με τον ίδιο ιχνηθέτη για εξατομικευμένη θεραπεία με ραδιοϊσότοπα. Η προσθήκη δύο σημαντικών πτυχών, δηλαδή της εξατομικευμένης δοσιμετρίας ασθενούς με προ- ή μετα-θεραπευτική απεικόνιση, και η αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία με τη χρήση ποσοτικής απεικόνισης με ^{68}Ga PET/CT ολοκληρώνει τις δυνατότητες της εξατομικευμένης ιατρικής. [84]

6. PSMA

Το PSMA, επίσης γνωστό ως υδρολάση φυλλικού οξέος I ή γλουταμινική καρβοξυπεπτιδάση II, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη τύπου II που αποτελείται από 750 αμινοξέα (100-120 kDa), και η οποία είναι ενσωματωμένη στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων του προστάτη[85],[102]. Το PSMA εκφράζεται στο κυτοσόλιο του φυσιολογικού προστατικού

ιστού και υπερεκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στη μεμβράνη των κυττάρων PCa [85]. Η έκταση της μεμβρανώδους έκφρασης του PSMA συσχετίζεται θετικά με τον βαθμό του όγκου και αυξάνεται υπό στέρωση ανδρογόνων και σε μεταστατικό και ανθεκτικό στον ευνουχισμό καρκίνο, καθιστώντας τον έτσι ιδανικό στόχο για απεικόνιση και θεραπεία [85]. Το PSMA φαίνεται να είναι ένας ιδανικός στόχος λόγω πολλών παραγόντων:

- προνομιακή, έντονη υπερέκφραση από την πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων του προστάτη (υπερεκφράζεται στο 90-100% των περιπτώσεων καρκίνου του προστάτη) [86],[87]
- θετική συσχέτιση της έκφρασής του με τον βαθμό του όγκου και το στάδιο της νόσου[86],[87] (καθώς υψηλή έκφραση του PSMA παρατηρείται στις μεταστάσεις και στους ορμονοανθεκτικούς (hormone-resistant) όγκους [91],[92],[93])
- χαμηλή παρουσία στην κυκλοφορία του αίματος λόγω του διαμεμβρανικού εντοπισμού του και της εσωτερίκευσης και κατακράτησης (retention) στα καρκινικά κύτταρα μετά τη σύνδεση με τον συνδέτη (linker) του [86].

Γενικά, τα μικρά μόρια - αναστολείς που στοχεύουν στο PSMA αποτελούνται από μια περιοχή δέσμευσης PSMA, έναν συνδέτη και ένα κομμάτι στο οποίο μπορούν να επισημανθούν ραδιοϊσότοπα, όπως ο χηλικός υποκαταστάτης DOTA ή DOTAGA. Τα μικρά μόρια - αναστολείς που στοχεύουν στο PSMA μπορούν να χωριστούν σε τρεις τύπους: 1) με βάση την ουρία, 2) τον φώσφορο και 3) τη θειόλη. Οι ενώσεις με βάση την ουρία έχουν δείξει ανώτερη συγγένεια σύνδεσης για το PSMA σε σύγκριση με τους άλλους δύο τύπους [87]. Τα μοτίβα πρόσδεσης στο PSMA με βάση την ουρία υπάρχουν σε τρεις μορφές: γλουταμινικό -ουρία- λυσίνη (glu-urea-lys), γλουταμινικό-ουρία-γλουταμινικό (glu-urea-glu) ή γλουταμινικό-ουρία- κυστεΐνη (glu-urea-cys) [95].

Τα μόρια που στοχεύουν το PSMA φαίνεται να κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος στην αγορά. Το ⁶⁸Ga-PSMA-11 (gozetotide) [117],[118],[119],[120] και το [¹⁸F]DCFpYL (riflufolostat) [121],[122],[123],[124] ως διαγνωστικοί απεικονιστικοί παράγοντες έχουν ήδη εγκριθεί στις ΗΠΑ από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) την 1η Δεκεμβρίου 2020 [125],[126] και την 27 Μαΐου 2021 [127],[128], αντίστοιχα, ενώ το [¹⁸F]PSMA-1007 (35-38) αναμένει κανονιστική έγκριση στις ευρωπαϊκές χώρες μετά την ολοκλήρωση κλινικής μελέτης φάσης 3 (NCT04102553). Το ^{99m}Tc-MIP-1404 (trofolostat) επίσης φαίνεται να είναι ένας πολλά υποσχόμενος παράγοντας SPECT [116]. Μονογραφίες έχουν

δημοσιευθεί από την Ευρωπαϊκή Διεύθυνση για την Ποιότητα των Φαρμάκων (EDQM) για το [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 (Ph. Eur. Monograph 3044) και [¹⁸F]PSMA-1007 (Ph. Eur. Monograph 3116) που τέθηκαν σε ισχύ την 01^η Απριλίου 2021 και την 01^η Ιουλίου 2021, αντίστοιχα [129].

Τα πιο σημαντικά μόρια που χρησιμοποιούνται για ενδοακτινοθεραπεία στοχευμένη στο PSMA με εκπομπούς βήτα και άλφα είναι τα PSMA I&T [130] και PSMA-617 (nivintotide tetraxetan) [131],[132],[133], με το τελευταίο να αναμένεται να λάβει άδεια κυκλοφορίας σε αρκετές χώρες μετά την επιτυχή ολοκλήρωση μιας κλινικής μελέτης φάσης 3 χρησιμοποιώντας [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 (NCT03511664) [133]. Μια πολύ ευρύτερη αποδοχή και εφαρμογή των PSMA Theranostics μπορεί να αναμένεται όταν η διάγνωση και η θεραπεία του καρκίνου του προστάτη αρχίσουν να καλύπτονται από τα ταμεία υγείας.

Μεταξύ των προαναφερθέντων ραδιοφαρμάκων, αρκετοί άλλοι ραδιοσυνδέτες (radioligands) που στοχεύουν στο PSMA βρίσκονται υπό κλινική διερεύνηση ή έκαναν το βήμα σε κλινικό περιβάλλον (Πίνακας 3) [134]. Ο συνδυασμός της ραδιοϊσοτοπικής θεραπείας με άλλες στρατηγικές θεραπείας θα μπορούσε να προσφέρει νέες ευκαιρίες για την φροντίδα των ασθενών [116].

Πίνακας 33. Ραδιοφαρμακευτικά προϊόντα που στοχεύουν στο PSMA και κυκλοφορούν στην αγορά, βρίσκονται υπό κλινική έρευνα ή σε κλινικό περιβάλλον. Πηγή: [116]

Radiopharmaceutical	Brand name	Radionuclide	Number of clinical trials 1 (completed, ongoing)
DCFpyL	PYLARIFY	¹⁸ F	14, 51
PSMA-11	Illuccix 3 / isoPROtrace-11	⁶⁸ Ga	24, 89
	-	¹⁸ F	2, -
PSMA-1007	-	¹⁸ F	2, 13
PSMA-617	-	⁴⁴ Sc	-, -
		⁶⁴ Cu	-, -
		⁶⁸ Ga	1, 3
		¹¹¹ In	-, -
		¹⁵² Tb	-, -
		¹⁷⁷ Lu	1, 17
PSMA I&T	-	²²⁵ Ac	-, 2
		⁶⁸ Ga	-, -
		¹¹¹ In	-, 1
		¹⁷⁷ Lu	-, 5
PSMA I&S	-	²²⁵ Ac	-, -
		^{99m} Tc	-, 3

MIP-1404	-	^{99m} Tc	6, -
rhPSMA-7.3	-	¹⁸ F	1, 3
		¹⁷⁷ Lu	-, -
JK-PSMA-7	-	¹⁸ F	-, -
THP-PSMA	GalliProst	⁶⁸ Ga	1, 1
PSMA-R2	-	⁶⁸ Ga	1, 1
		¹⁷⁷ Lu	-, 1

Προκειμένου να αυξηθεί η συγγένεια σύνδεσης των ειδικών ιχνηλατών PSMA, ορισμένες ομάδες έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη ομο-πολυμερών ιχνηλατών, οι οποίοι περιέχουν περισσότερα από ένα πεδία δέσμευσης PSMA [96],[97],[98]. Αυτοί οι πολυδύναμοι (multivalent) ιχνηθέτες ειδικά για το PSMA έχουν δείξει ελπιδοφόρα αποτελέσματα *in vitro*, αυξημένη συγγένεια σύνδεσης και, *in vivo*, αυξημένη κατακράτηση όγκου [87].

Ωστόσο, το PSMA εκφράζεται επίσης σε υγιή όργανα όπως οι σιελογόνοι και δακρυϊκοί αδένες, το λεπτό έντερο, το κεντρικό νευρικό σύστημα και τα εγγύς νεφρικά σωληνάκια (proximal renal tubules) [88],[89],[90]. Αυτά τα όργανα που εκφράζουν το PSMA, εμφανίζουν πρόσληψη σχεδόν όλων των ραδιο-ιχνηθετών που στοχεύουν στο PSMA, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα. Ειδικά όταν χρησιμοποιείται ραδιοϊσότοπο που εκπέμπει σωματίδια άλφα (π.χ. ακτίνιο-225), μπορεί να εμφανιστεί σοβαρή ξηροστομία, η οποία μπορεί να έχει τεράστιο αρνητικό αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ασθενών [94].

7. GRPr

Ένας άλλος σχετικός στόχος PCa είναι ο πεπτιδικός υποδοχέας απελευθέρωσης γαστρίνης (GRPr). Ο GRPr είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνη, ο οποίος υπερεκφράζεται στο 84% των περιπτώσεων PCa, καθώς και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα [99],[100]. Εκτός από την έκφραση στον ιστό του όγκου, το GRPr εκφράζεται σε διάφορους υγιείς ιστούς, όπως το πάγκρεας, ο μαστός, ο προστάτης και ο πνεύμονας [101].

Αρκετοί ραδιοσημασμένοι αγωνιστές και ανταγωνιστές μομπεσίνης έχουν περιγραφεί τα τελευταία χρόνια όπου έχουν μελετηθεί εκτενώς πολυάριθμες αλληλουχίες πεπτιδίων και χηλικοί υποκαταστάτες. Τα περισσότερα από τα παράγωγα βασίζονται στην πεπτιδική αλληλουχία της συντμημένης (truncated) μομπεσίνης, της μομπεσίνης (7-14) (BN(7-14): Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂), που διατηρεί υψηλή δραστηριότητα για το GRPr [103]. Οι ανταγωνιστές των υποδοχέων της μομπεσίνης φαίνεται να είναι ανώτεροι από τους αγωνιστές

όσον αφορά την υψηλότερη συσσώρευση στον όγκο, τη μεγαλύτερη κατακράτηση του στον όγκο και την καλύτερη αναλογία όγκου προς ιστό [104],[105],[106]. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα παράγωγα μπομπεσίνης είναι αγωνιστές. Οι αγωνιστές εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου αφού προσδεθούν στον υποδοχέα. Για αυτό το λόγο, πολλοί ερευνητές θεωρούσαν για χρόνια ότι η πρόσληψη των αγωνιστών είναι υψηλότερη από αυτή των ανταγωνιστών, γιατί η ενεργότητα “παγιδεύεται” στο κύτταρο. Όμως, το γεγονός αυτό διαψεύδεται λόγω της ισχυρής επιφανειακής δέσμευσης των ανταγωνιστών στους υποδοχείς που οδηγεί σε σημαντική συσσώρευση στον όγκο, όπως προαναφέρθηκε. [109]

Επί του παρόντος, διαφορετικά ανάλογα μπομπεσίνης έχουν επισημανθεί με ραδιοϊσότοπα που εκπέμπουν γάμμα ακτινοβολία και ποζιτρόνια, όπως τα ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{68}Ga , ^{18}F και ^{64}Cu για την απεικόνιση όγκων που εκφράζουν GRPr, καθώς και κυτταροτοξικά ισότοπα που εκπέμπουν σωματίδια άλφα και β- όπως τα ^{90}Y , ^{177}Lu και $^{212/213}\text{Bi}$ για στοχευμένη ραδιοϊσοτοπική θεραπεία. [31]

Ένα ανάλογο μπομπεσίνης το οποίο έχει μελετηθεί και σε ανθρώπους είναι το RM2. Ύστερα από μελέτες του ^{68}Ga -RM2 PET σε ασθενείς, η υψηλή πρόσληψη σε πολλαπλές περιοχές συμβατές με καρκινικές βλάβες υποδηλώνει ότι το ^{68}Ga -RM2 είναι ένα πολλά υποσχόμενο ραδιοφάρμακο PET για τον εντοπισμό της νόσου σε ασθενείς με PCa βιοχημικής υποτροπής (biochemical recurrence) και χωρίς δυνατότητα διάγνωσης από MRI ή CT [140]. Μια άλλη μελέτη σε ανθρώπους, είχε σκοπό την αξιολόγηση του [^{177}Lu]Lu-RM2 ως μέθοδο θεραπείας σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη ανθεκτικό στον ευνουχισμό (metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer, mCRPC). Η θεραπεία ήταν καλά ανεκτή από όλους τους ασθενείς και δεν παρατηρήθηκαν παρενέργειες. Η εφαρμογή του ανταγωνιστή GRPr [^{177}Lu]Lu-RM2 είναι κατάλληλη για στοχευμένη ραδιοθεραπεία του mCRPC, καθώς παρουσιάζει υψηλή πρόσληψη από τον όγκο και ταχεία κάθαρση από τα φυσιολογικά όργανα. Οι απορροφούμενες δόσεις είναι θεραπευτικά σημαντικές. Το κρίσιμο όργανο που έλαβε την υψηλότερη απορροφούμενη δόση ήταν το πάγκρεας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενεργότητα που χορηγείται για κάθε κύκλο θα μπορούσε να αυξηθεί για να μεγιστοποιηθεί η απορροφούμενη δόση στους όγκους και στις μεταστάσεις αυτών [141].

8. Διειδική στόχευση με ετεροδιμερή (Bispecific targeting)

Ενώ η έκφραση του PSMA αυξάνεται καθώς εξελίσσεται η νόσος, το GRPr είναι ήδη υπερεκφραζόμενο σε υψηλά επίπεδα στα αρχικά στάδια PCa [100]. Επίσης, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα λόγω της ετερογένειας των όγκων θα μπορούσαν να ληφθούν εικόνες με ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, η συνδυασμένη στόχευση τόσο του PSMA όσο και του GRPr θα μπορούσε να οδηγήσει σε υψηλή πρόσληψη όγκου σε όλα τα στάδια της νόσου [87]. Πολλές ομάδες, με μία από αυτές αυτή της Χαϊδελβέργης [110], [111], αλλά και αρκετές άλλες [112], [113], [114] προχώρησαν στη σύνθεση και μελέτη ετεροδιμερών που αποτελούνταν από κάποιο μόριο PSMA και κάποιο ανάλογο μομπεσίνης. Μάλιστα από τις μελέτες τους φαίνεται ότι μπορεί να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της εκλεκτικότητας ως προς το στόχο, αλλά και ισχυρότερη πρόσδεση, αυξάνοντας έτσι την συσσώρευση (accumulation) αλλά και την κατακράτηση σε αυτόν. Το πεδίο της διειδικής στόχευσης φαίνεται να μπορεί να προσφέρει μία βελτιωμένη εικόνα στη διάγνωση αλλά και πιθανώς μία περισσότερο στοχευμένη και αποτελεσματική θεραπεία. Πέραν όμως αυτών, θα μπορούσε να ανοίξει ένα καινούργιο δρόμο στο κομμάτι των Theranostics.

Ένας περιορισμένος αριθμός ασθενών έχει ελεγχθεί με έναν παράγοντα απεικόνισης στόχευσης PSMA (^{68}Ga]Ga-PSMA-11 ή ^{18}F]DCFPyL) και τον ανταγωνιστή GRPr ^{68}Ga]Ga-RM2 [135],[136],[137],[138],[139] με αποτέλεσμα μάλλον μια συμπληρωματική παρά μια ανταγωνιστική προσέγγιση της απεικόνισης PSMA έναντι GRPr [137],[100]. Για να ξεπεραστεί ο περιορισμός που περιγράφηκε παραπάνω και να αυξηθεί η ειδικότητα και η ευαισθησία της απεικονιστικής μεθόδου, η προσέγγιση των ετεροδιμερών έχει περιγραφεί για έναν συνδυασμό διαφόρων στόχων, συμπεριλαμβανομένων των PSMA/GRPr, και έχει αναθεωρηθεί από τους Liolios et al. [111]. Το πρώτο αναφερόμενο ετεροδιμερές που στόχευε τόσο το PSMA όσο και το GRPr αποτελούνταν από το μοτίβο δέσμευσης Glu-urea-Lys PSMA και τον αγωνιστή GRPr H2N-PEG2-[D-Tyr(6),beta- Ala(11),Thi(13),Nle(14)]BN(6-14) συνδεδεμένο με τον γραμμικό χηλικό υποκατάστατη HBED-CC [113]. Η προσέγγιση αυτή βελτιώθηκε για τη μείωση της πρόσληψης από τα νεφρά με την προσθήκη των λεγόμενων διαχωριστικών αμινοξέων (HE)η μεταξύ του χηλικού παράγοντα HBED-CC και του φαρμακοφόρου PSMA [110]. Το μειονέκτημα της ετεροδιμερούς προσέγγισης είναι ότι εκτός από τα transfected κύτταρα (πχ, PC-3 PIP), μέχρι τώρα δεν έχει περιγραφεί κανένα μοντέλο PCa που να εκφράζει επαρκώς τόσο το PSMA όσο και το GRPr [111].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως προαναφέρθηκε, πολλά από τα ραδιοφάρμακα που κυκλοφορούν στην αγορά και χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση, αλλά και τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, δεν έχουν την εκλεκτικότητα που απαιτεί η ετερογένεια που χαρακτηρίζει τον καρκίνο του προστάτη. Ειδικότερα, ενώ η έκφραση του PSMA αυξάνεται με την ανάπτυξη του όγκου, υπάρχουν και μέρη του όγκου που δεν εκφράζουν καθόλου το PSMA (PSMA negative, PSMA-). Αντιστοίχως, παρά την σημαντική έκφραση του GRPr από τα αρχικά στάδια, υπάρχουν και μέρη του όγκου που είναι GRPr αρνητικά (GRPR negative, GRPr-). Επιπροσθέτως, ένα ακόμα πρόβλημα που αντιμετωπίζεται κατά την διάγνωση και την θεραπεία με την χρήση διαφορετικών συνδετών (linkers), είναι οι διαφορετικές εκλεκτικότητες των διαφορετικών μορίων.

Έτσι, για να επιτευχθεί καλύτερη εκλεκτικότητα και να αποφευχθούν τα αρνητικά σφάλματα κατά τη διάγνωση ή η ανεπαρκής στόχευση κατά τη θεραπεία, η έρευνα έχει πλέον στραφεί στην σύνθεση και μελέτη ετεροδιμερών που στόχος του είναι και οι δύο τύποι υποδοχέων. Επίσης, μελετάται εκτενώς η χρήση μορίων που μπορούν να επισημανθούν με διαγνωστικό αλλά και με θεραπευτικό ισότοπο ώστε να επιτυγχάνονται παρόμοια ποσοστά κατακράτησης από τον όγκο και εσωτερικοποίησης σε αυτόν.

Ένα τέτοιο ετεροδιμερές είναι και αυτό που χρησιμοποιήσαμε στην μελέτη αυτή. Το ετεροδιμερές αυτό συντέθηκε στο Γερμανικό Ερευνητικό Κέντρο Καρκίνου (German Cancer Research Center, DKFZ) της Χαϊδελβέργης και πρόκειται για ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τα εξής μονομερή: PSMA-617 και DOTA-RM2. Η δομή του παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.

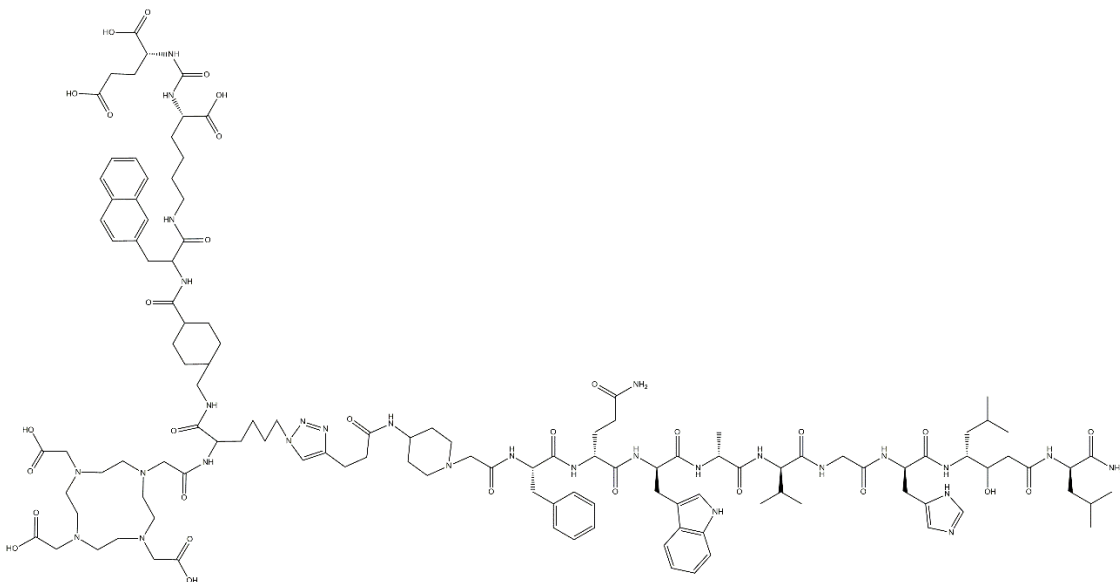


Figure 99. Δομή PSMA-DOTA-RM2

Σκοπός της παρούσας εργασίας, λοιπόν, είναι η μελέτη της εκλεκτικότητας του συγκεκριμένου ετεροδιμερούς ως προς τους υποδοχείς-στόχους, PSMA και GRPr αφού πρώτα επισημανθεί με το διαγνωστικό ισότοπο ^{68}Ga που χρησιμοποιείται για PET απεικόνιση και μελετηθεί η σταθερότητά του στον ορό του αίματος. Για αυτό το σκοπό έγιναν πειράματα σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη PC-3 (PSMA-, GRPr+) και LNCaP (PSMA+, GRPr-) αλλά και ex vivo βιοκατανομές σε πειραματόζωα που έφεραν όγκους PC-3 και LNCaP ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά του ετεροδιμερούς.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. Επισήμανση με ^{68}Ga

9.1. Υλικά και αντιδραστήρια

Λόγω χρήσης ραδιενεργού ^{68}Ga , το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής γίνεται σε ειδικά αδειοδοτημένα εργαστήρια, με τις κατάλληλες προφυλάξεις έναντι της ακτινοβολίας, σύμφωνα με ειδικά πρωτόκολλα ακτινοπροστασίας και διαχείρισης αποβλήτων χαμηλής ραδιενέργειας.

- Dimethyl sulfoxide – DMSO (Aldrich Chemical, France)
- Acetonitrile – CH_3CN (Carlo Erba, France)
- Trifluoroacetic acid – TFA (Alfa Aesar, United Kingdom)
- Human Serum (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Phosphate Buffered Saline Tablets – PBS (Fischer, Belgium)
- Χαρτί ινών υάλου ITLC Agilent ITLC SGI001 (Agilent Technologies)
- Ethanol Absolute – EtOH (Carlo Erba, Milano)
- HEPES (Sigma Aldrich)
- Sodium citrate (PANREAC QUIMICA S.A.)
- Ammonium acetate (Sigma Aldrich)
- Methanol (Acros Organics B.V.B.A.)
- NaOH salt (Sigma Aldrich)
- HCl 30% (Merck)
- Glycine (Sigma Aldrich)

9.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός και λογισμικά

- Ισοτοπική γεννήτρια $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, ITG- Isotopen Technologien Garching AG
- Βαθμονομητής ραδιοϊσοτοπικών δόσεων, Dose Calibrator, CRC-15R, Capintec Inc
- Συσκευή ανάδευσης, Vortex Genie Model K550 Ge, Scientific Industries Inc
- Σύστημα παραγωγής υπερκάρθρου ύδατος, EASYpure UV, Barnstead, ThermoFisher Scientific Inc
- Συσκευή θέρμανσης, ISOLAB GmbH

- Ζυγαριά AG285, Mettler Toledo
- Αυτόματο ραδιομετρικό σύστημα Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδος, Scan-RAM Radio-TLC Detector, LabLogic Systems Limited
- Λογισμικό Laura, έκδοση 5.0.4.29
- Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελούμενο από:
 - Αντλία τύπου 600 (Waters)
 - Σύστημα εισαγωγής δείγματος στη χρωματογραφική στήλη (injector UK6) με υποδοχέα δειγμάτων 500 μL
 - Ανιχνευτή UV 996 Photodiode Array detector (Waters)
 - Ηλεκτρονικό υπολογιστή
 - Ανιχνευτή ακτινοβολίας γ -RAM για την ανίχνευση ραδιενεργών συστατικών
 - Στήλη C18 Reverse Phase



Figure 10. Βαθμονομητής ραδιοϊσοτοπικών δόσεων, Dose Calibrator, CRC-15R. Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικά διαμορφωμένη αποσπώμενη πλαστική υποδοχή, η οποία εισέρχεται στον κύλινδρο. Έτσι, η θέση του δείγματος είναι πάντα σταθερή.

9.3. Έκλυση ^{68}Ga

Το ^{68}Ga (Χρόνος ημιζωής = 67.81 min, $\beta^+ = 89\%$, $E_{\text{max}} = 1.9 \text{ eV}$) εκλύστηκε από γεννήτρια $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ που αποτελείται από μια κατιονανταλλακτική στήλη συμπολυμερούς ρητίνης πυρογαλόλης-φορμαλδεΐδης. Η διαδικασία της έκλυσης είναι η εξής:

- 1) Παραλαβή του ^{68}Ga από τη γεννήτρια με διαβίβαση 7ml HCl 0.1 M, με ρυθμό περίπου 1 ml/min. Το ^{68}Ga κατακρατείται στην κατιονανταλλακτική στήλη
- 2) Απομάκρυνση πιθανών προσμίξεων (όπως ^{68}Zn , ^{68}Ge και άλλων ιόντων) από τη στήλη με διαβίβαση 1 ml διαλύματος 80% ακετόνη/20% HCl 0.15 M
- 3) Αποδέσμευση του ^{68}Ga από τη στήλη με περίπου 0.2 ml διαλύματος 97.5% ακετόνη/2.5% HCl 0.1 M. Το επιθυμητό έκλουσμα παραλαμβάνεται, ως διάλυμα χλωριούχου γαλλίου ($^{68}\text{GaCl}_3$), σε πλαστικό σωληνάριο με πώμα τοποθετημένο εντός κυλινδρικής θωράκισης μολύβδου. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση του εκλούσματος και μέτρηση της ενεργότητάς του στον βαθμονομητή ισοτοπικών δόσεων Capintec.
- 4) Αναγέννηση της στήλης με διαβίβαση περίπου 1 ml HCl 4 M και ξέπλυμα με ίδια ποσότητα υπερκάρθου ύδατος.

9.4. Διαδικασία επισήμανσης του ετεροδιμερούς PSMA-DOTA-RM2 με ^{68}Ga

Η γενική διαδικασία για την επισήμανση των PSMA-DOTA RM2, PSMA-617 και DOTA-RM2 με ^{68}Ga είναι η εξής:

A) 50 μL [^{68}Ga]GaCl₃ προστέθηκαν σε 50 μL HEPES 2,1M. Όποτε ήταν απαραίτητο, γινόταν ρύθμιση του pH ώστε η τελική τιμή αυτού να είναι 3,8-4,2. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20nmol PSMA-DOTA-RM2 και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 95 °C.

B) 50 μL [^{68}Ga]GaCl₃ προστέθηκαν σε 350 μL ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου pH 4 (ammonium acetate buffer). Στη συνέχεια προστέθηκαν 20nmol PSMA-DOTA-RM2 και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 95 °C.

9.5. Διαδικασία αξιολόγησης επισήμανσης του ετεροδιμερούς PSMA-DOTA-RM2 με ^{68}Ga

9.5.1. Έλεγχος ραδιοεπισήμανσης με RP-HPLC

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με γραμμικά μεταβαλλόμενο σύστημα διαλυτών, όπου ως κινητή φάση A χρησιμοποιείται H₂O/0.1% TFA και ως κινητή φάση B ACN/0.1% TFA. Το gradient μεταβάλλεται γραμμικά από 0% B έως 100% B για 25 min, με ρυθμό ροής 1 mL/min. Οι διαλύτες έκλουσης έχουν υποστεί διήθηση υπό κενό μέσω ειδικών φίλτρων

(στείρα φίλτρα διαμέτρου 0.22 mm, Millipore) και απαέρωση με διαβίβαση He υψηλής καθαρότητας (Air Liquide Hellas). Η ποσότητα του δείγματος που ενίεται κάθε φορά εξαρτάται από την ραδιενέργεια του δείγματος. Κατά τη δίοδο από τη χρωματογραφική στήλη, οι ενώσεις που διαχωρίζονται διέρχονται από δύο ανιχνευτικές διατάξεις, έναν ανιχνευτή υπεριώδους φωτός (UV) και έναν ανιχνευτή ραδιενέργειας (κρύσταλλος NaI). Οι διατάξεις αυτές είναι συνδεδεμένες με ηλεκτρονικό υπολογιστή, με σκοπό την επεξεργασία των μετρήσεων. Καταγράφονται έτσι οι εξής παράμετροι: ο ρυθμός μεταβολής των κρούσεων του ^{68}Ga και η μεταβολή απορρόφησης στα 220 nm.



Figure ~~1144~~. Γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

9.5.2. Έλεγχος ραδιοεπισήμανσης με radio-TLC

Για τον έλεγχο στο radio-TLC χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα ανάπτυξης-κινητές φάσεις: Κιτρικό νάτριο 0.1M pH 5 (Sodium citrate) και μίγμα Οξικού αμμωνίου – Μεθανόλης (Ammonium Acetate-Methanol) σε αναλογία 1:1. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη:

Περίπου 2 μl εναιωρήματος εφαρμόζονται σε ταινία χρωματογραφίας ITLC-SG (στατική φάση) μήκους 12 cm, σε απόσταση 1 cm από την κάτω άκρη (αφετηρία). Μετά την παρέλευση

επαρκούς χρόνου ώστε να στεγνώσει, η ταινία αναρτάται από άγκιστρο καλύμματος γυάλινου θαλάμου, ο οποίος περιέχει μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος κινητής φάσης. Το ύψος της ταινίας ρυθμίζεται προσεκτικά, με τέτοιο τρόπο ώστε η κάτω άκρη της να αγγίξει οριακά το διαλύτη. Ο διαλύτης αφήνεται να αναπτυχθεί μέχρις ότου το μέτωπο φτάσει σε ύψος 1.5 cm από το άνω άκρο της ταινίας, οπότε αυτή απομακρύνεται και αφήνεται να στεγνώσει. Στη συνέχεια οι ταινίες τοποθετούνται στην τράπεζα του αυτόματου ραδιομετρικού συστήματος Radio-TLC Detector και σαρώνονται από τον ανιχνευτή σε όλο το μήκος τους (εικόνα παρακάτω). Η αξιολόγηση των μετρήσεων γίνεται με το λογισμικό Laura που υποστηρίζεται από το σύστημα.

Σύστημα ITLC 1:

Στατική φάση: Χαρτί ινών υάλου ITLC προτεμαχισμένο σε ταινίες 1 cm x 12 cm

Κινητή φάση: κιτρικό νάτριο 0,1 M (pH 5) σε νερό

Οι προδιαγραφές του παράγοντα κατακράτησης (Rf) είναι οι εξής:

- Κολλοειδή ^{68}Ga ($^{68}\text{Ga}(\text{OH})_2$) και ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2: 0 έως 0,1
- Μη συμπλεγμένο (ελεύθερο) ^{68}Ga : 0,8 έως 1

Σύστημα ITLC 2:

- Στατική φάση: Χαρτί ινών υάλου ITLC προτεμαχισμένο σε ταινίες 1 cm x 12 cm
- Κινητή φάση: 77 g/l διάλυμα οξικού αμμωνίου σε νερό /μεθανόλη 50:50 V/V

Οι προδιαγραφές του παράγοντα κατακράτησης (Rf) είναι οι εξής:

- Κολλοειδή ^{68}Ga ($^{68}\text{Ga}(\text{OH})_2$): 0 έως 0,1
- ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 και μη συμπλεγμένο (ελεύθερο) ^{68}Ga : 0,8 έως 1

Το ποσοστό των κολλοειδών $^{68}\text{Ga}(\text{OH})_2$ πρέπει να είναι $\leq 3\%$.

Η ραδιοχημική καθαρότητα (PXK) του τελικού προϊόντος ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 πρέπει να είναι $>92\%$, για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε προκλινικές μελέτες σε πειραματόζωα είτε σε κλινικές μελέτες σε ασθενείς.



Figure 1212. Το αυτόματο ραδιομετρικό σύστημα σάρωσης χρωματογραφημάτων Scan-RAM Radio-TLC Detector αποτελείται από έναν κινητό ανιχνευτή, ο οποίος σαρώνει την ταινία χρωματογραφίας που τοποθετείται οριζοντίως στην τράπεζα. Η ανίχνευση της ακτινοβολίας γίνεται με πλαστικό σπινθηριστή NaI.

10. Μελέτη σταθερότητας στον ορό του αίματος (Serum Stability study)

10.1 Αντιδραστήρια

- Ετεροδιμερές PSMA-DOTA-RM2 επισημασμένο με ^{68}Ga
- Ανθρώπινος ορός αίματος, Human serum from male AB plasma, Sigma – Aldrich

10.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Φυγόκεντρος Z 326 K, HERMLE Labortechnik GmbH
- Ο υπόλοιπος εξοπλισμός είναι όμοιος με αυτόν που περιγράφεται στην παράγραφο §9.2.

Σε 50μL του $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-DOTA-RM2}$ προστέθηκαν 450μL ανθρώπινου ορού (human serum), αναδεύτηκαν και το διάλυμα (A) επώαστηκε στους 37°C. Ανά διαφορετικά χρονικά διαστήματα (στην περίπτωση μας 30, 60 και 120 λεπτά) ελήφθησαν 100μL από το διάλυμα (A).

Σε αυτά προστέθηκαν 200μL αιθανόλης για να καταβυθισθούν οι πρωτεΐνες του ορού και, ύστερα από ανάδευση, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2000 rpm (rounds per minute, στροφές το λεπτό) για 10 λεπτά στους 4°C ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός των πρωτεϊνών και να ληφθεί το υπερκείμενο υγρό. Στο υπερκείμενο ακολούθησε έλεγχος με RP-HPLC.

11. Μελέτη Εσωτερικοποίησης (Internalisation Study)

11.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

- Η καρκινικές κυτταρικές σειρές PC-3 και LNCaP που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη προήλθαν από την κυτταρική τράπεζα του εργαστηρίου Ραδιοβιολογίας (ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)
- Πλήρες θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose, BioSera
- Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS)
- Αντιβιοτικά: Πενικιλίνη 100U/ml, Στρεπτομυκίνη 0,1mg/ml
- Διάλυμα θρυψίνης 10%
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) pH 7.4

11.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Επωαστικός κλίβανος
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Οπτικό μικροσκόπιο Olympus CK40
- Φυγόκεντρος

Τα δείγματα για τις μελέτες εσωτερικοποίησης μετρήθηκαν σε έναν Packard COBRA II Auto-Gamma Counter (Canberra, USA)

Η ικανότητα πρόσδεσης και εσωτερικοποίησης του διμερούς μελετήθηκε στις κυτταρικές σειρές PC3 (PSMA-, GRPr+) και LNCaP (PSMA+, GRPr-).

Η κυτταρική σειρά PC3 (Prostate Cancer 3) προέρχεται από οστική μετάσταση προστατικού αδενοκαρκινώματος. Τα κύτταρα αυτά έχουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και δεν εκφράζουν το γονίδιο p53. Έχουν πάντα ενεργοποιημένο το μονοπάτι της κινάσης 3-φωσφορικής ινοσιτόλης, το οποίο σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση, το μεταβολισμό και την κυτταρική ανάπτυξη. Διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα προστατικά κύτταρα, καθώς είναι πλήρως ανεξάρτητα από την επίδραση των ανδρογόνων, γλυκοκορτικοειδών, επιδερμικών αυξητικών

παραγόντων και αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών. Επίσης παρουσιάζουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και έχουν μετάλλαξη στο γονίδιο K-ras που είναι απαραίτητο για τη σωστή μετάδοση του σήματος στους φυσιολογικούς ιστούς. Η κυτταρική σειρά PC3 αποτελεί χρήσιμο μοντέλο για τη διερεύνηση των βιοχημικών αλλαγών σε κύτταρα προχωρημένου καρκίνου του προστάτη και στην αξιολόγηση της απόκρισής τους σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.[107]

Η LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε από μία μεταστατική βλάβη σε ένα ανθρώπινο λεμφαδένα του προστατικού αδενοκαρκινώματος. Τα LNCaP κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα ανδρογόνων (Androgen Receptor, AR). Ο AR, ένας ανδρογόνο-ενεργοποιημένος παράγοντας μεταγραφής, ανήκει στην στεροειδή οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Η ανάπτυξη του προστάτη εξαρτάται από ανδρογόνα σηματοδότηση μεσολαβούμενη από τον AR, και ο AR είναι επίσης σημαντικός κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου του προστάτη. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων LNCaP είναι ανδρογόνο-εξαρτώμενος, σε αντίθεση με των PC-3. Αύξηση της έκφρασης του AR συχνά παρατηρείται σε ασθενείς με προχωρημένους όγκους του προστάτη. [108]

Τα κύτταρα στρώθηκαν 24 ώρες πριν από κάθε πείραμα σε 6-well plates και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία περίπου 37°C, ενώ η ατμόσφαιρα του χώρου καλλιέργειας περιείχε σταθερό ποσοστό οξυγόνου (συνήθως 95%) και διοξειδίου του άνθρακα (συνήθως 5%). Ο πληθυσμός των κυττάρων ήταν $\sim 1 \cdot 10^6$ /well κάθε φορά.

Η μελέτη εσωτερικοποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο. Την ημέρα του πειράματος, αφαιρέθηκε το μέσο (medium) από τα κύτταρα, έγινε έκπλυση με θερμό PBS (33°C) (2 x 1,0 mL) και προστέθηκε φρέσκο μέσο (1,0 mL, DMEM, 1 % BSA). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν με το ραδιοεπισημασμένο ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 (τελική συγκέντρωση 30 nM) για 45 λεπτά στους 37°C και στους 4°C. Στη συνέχεια, το μέσο αφαιρέθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν με παγωμένο PBS (2 x 0,5 mL). Για να απομακρυνθεί η επιφανειακά δεσμευμένη ραδιενέργεια, τα κύτταρα επώαστηκαν δύο φορές (2 x 0,5 mL, 5 min) με ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-υδροχλωρικού οξέος σε PBS (50 mM, pH= 2,8). Ακολούθως, τα κύτταρα πλύθηκαν ξανά με παγωμένο PBS (1 x 1,0 mL) και λύθηκαν χρησιμοποιώντας NaOH 1M (1 x 1,0 mL, 10 min). Τα αδέσμευτα, τα επιφανειακά δεσμευμένα και εσωτερικευμένα κλάσματα μετρήθηκαν σε έναν μετρητή γάμμα.

Η ειδικότητα προσδιορίστηκε από τον έλεγχο: ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 και με την προσθήκη ενός παράγοντα αποκλεισμού (C = 30 μM , 2-PMPA για PSMA και πεπτίδιο μπομπεσίνης για GRPr). Η ίδια μελέτη έγινε και για τα επισημασμένα μονομερή ^{68}Ga -PSMA-617

και ^{68}Ga -RM2 σε κυτταρικές σειρές LNCaP και PC-3 αντίστοιχα. Τα δεδομένα είναι αντιπροσωπευτικά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που εκτελούνται εις τριπλούν για κάθε δείγμα και εκφράζονται ως μέσος όρος \pm SD.

12. Ex vivo Μελέτη Βιοκατανομής (Ex vivo Biodistribution Study)

12.1. Υλικά και Αντιδραστήρια

- Η καρκινικές κυτταρικές σειρές PC-3 και LNCaP που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη προήλθαν από την κυτταρική τράπεζα του εργαστηρίου Ραδιοβιολογίας (ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»)
- Ενέσιμο διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0.9%, στείρο, ελεύθερο βακτηριακής ενδοτοξίνης
- Αποστειρωμένες σύριγγες, ελεύθερες πυρετογόνων, Artsana S.p.A.
- Πειραματόζωα: Ανοσοκατασταλμένοι θηλυκοί μύες τύπου SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency mice) 6-8 εβδομάδων, βάρους 15-25g, Εκτροφείο Πειραματόζωων, Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

12.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Βαθμονομητής ραδιοϊσοτοπικών δόσεων, Dose Calibrator, CRC-15R, Capintec Inc.
- Ζυγαριά ακριβείας, KERN & SOHN
- Τα δείγματα από τις μελέτες βιοκατανομής μετρήθηκαν σε έναν Packard COBRA II Auto-Gamma Counter (Canberra, USA).

Τα πειραματόζωα εκτρέφονται σε κλωβούς ομαδικής στέγασης (Individually Ventilated Cages, IVC) υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, με εναλλασσόμενους κύκλους φωτός-σκότους δώδεκα ωρών. Η πρόσβαση των ζώων σε τροφή και νερό είναι ελεύθερη. Οι μύες τύπου SCID στεγάζονται σε ειδικά διαμορφωμένους στείρους χώρους και λαμβάνουν αποστειρωμένη τροφή και νερό. Τα πειράματα σε ζώα διεξάγονται σύμφωνα με την Εθνική και Ευρωπαϊκή Νομοθεσία και είναι εγκεκριμένα από την Επιτροπή Ηθικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Η φροντίδα των πειραματόζωων και οι διαδικασίες που ακολουθούνται είναι

σύμφωνες με τις θεσμικές οδηγίες και άδειες που εκδίδονται από τη Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Αττικής.

Η ανάπτυξη πειραματικού καρκινικού μοντέλου περιλαμβάνει την εμφύτευση 1×10^7 καρκινικών κυττάρων PC-3 και LNCaP υποδόρια, στην περιοχή του πρόσθιου αριστερού άκρου μυών τύπου SCID. Τα πειράματα βιοκατανομής έλαβαν χώρα 12-14 ημέρες μετά την εμφύτευση, διάστημα στο οποίο το μέγεθος του όγκου είναι περίπου 300mm^3 . Η βιολογική συμπεριφορά του ραδιοεπισημασμένου διμερούς αξιολογήθηκε σε θηλυκά ποντίκια CFW, ηλικίας 6-8 εβδομάδων, βάρους 20-30 g, με όγκους PC-3 και LNCaP ($n = 3$ ζώα ανά χρονικό σημείο). Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο, η δραστηριότητα ~ 70 μL ραδιοεπισημασμένου διμερούς μετρήθηκε σε βαθμονομητή δόσης Capintec, αραιώθηκε σε τελικό όγκο 1600 μL με διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9% (sodium chloride 0.9% solution) και χορηγήθηκε ενδοφλεβίως μέσω της φλέβας στην ουρά.



Figure 13. Ενδοφλέβια χορήγηση ισότονου διαλύματος ^{68}Ga -PSMA-DOXA-RM2 σε πειραματόζωο.

Μετά την παρέλευση του προκαθορισμένου για κάθε πειραματόζωο χρόνου από τη χορήγηση, τα ζώα υποβλήθηκαν σε ευθανασία σε θάλαμο κορεσμένο με ατμούς ισοφλουορανίου και έγινε η λήψη των δειγμάτων (όργανα και δείγματα ιστών) και η τοποθέτηση αυτών σε προζυγισμένα σωληνάρια. Συγκεκριμένα, λαμβάνονται η καρδιά, οι πνεύμονες, το ήπαρ, ο σπλήνας, οι νεφροί, το πάγκρεας, το στομάχι, τα έντερα, ο όγκος (στους παθολογικούς μύες), δείγματα από οστά, μύες, αίμα, όπως επίσης η ουρά και τα ούρα (χωρίς ζύγιση). Τα σωληνάρια που περιέχουν τα δείγματα, το πρότυπο διάλυμα και άδεια σωληνάρια (3 στον

αριθμό, για τη μέτρηση της ενεργότητας υποβάθρου) τοποθετούνται σε θήκες στήριξης (racks), και ακολουθεί μέτρηση στον αυτόματο μετρητή ακτινοβολίας γ. Όλες οι μετρήσεις διορθώθηκαν ως προς τη ραδιενέργεια υποβάθρου (background activity) και τον ραδιοϊσοτοπικό υποδιπλασιασμό (radioactive decay). Τέλος, η συσσώρευση του ραδιοεπισημασμένου διμερούς σε όργανα και ιστούς σε κάθε χρονικό σημείο εκφράστηκε ως το μέσο ποσοστό της ενέσιμης δραστηριότητας ανά γραμμάριο \pm τυπική απόκλιση (injected activity per gram \pm standard deviation, % IA/g \pm SD), χρησιμοποιώντας κατάλληλο δείγμα ως πρότυπο. Η ίδια συγκέντρωση ραδιοεπισημασμένου διμερούς χορηγήθηκε στα ποντίκια για όλα τα πειράματα βιοκατανομής.



Figure 1414. Φωτογραφίες από τα πειράματα βιοκατανομής που πραγματοποιήθηκαν. Μετά την αναισθητοποίηση του, το πειραματόζωο ζυγίζεται, τα δείγματα ενδιαφέροντος αφαιρούνται, ζυγίζονται και τοποθετούνται σε σωληνάρια μέσα σε θήκες στήριξης προς μέτρηση στον αυτόματο μετρητή ακτινοβολίας γ.

13. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Το ετεροδιμερές PSMA-DOTA-RM2 επισημάνθηκε επιτυχώς με ^{68}Ga σε υψηλές ραδιοχημικές αποδόσεις, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται καθαρισμός του τελικού προϊόντος ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 πριν από τη χρήση του στις in vitro και ex vivo μελέτες που διενεργήθηκαν στο πλαίσιο αξιολόγησης του νέου ραδιοφαρμάκου. Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα στην

περίπτωση επισήμανσης μορίων με ^{68}Ga , λόγω του μικρού χρόνου υποδιπλασιασμού αυτού. Πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές επισήμανσης μέχρι να επιτευχθεί ένα σταθερό ποσοστό ραδιοχημικής καθαρότητας του ^{68}Ga -PSMA-DOA-RM2 >95%. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα από τις δοκιμές παρουσιάζεται παρακάτω στην εικόνα 15.

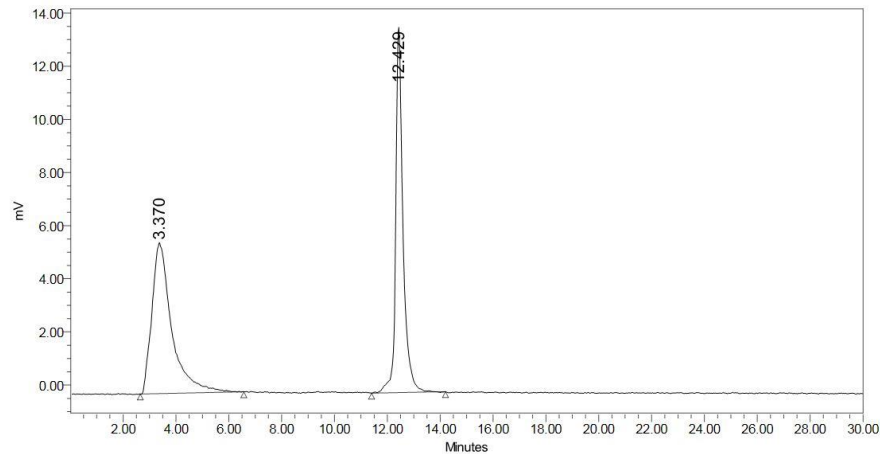


Figure 1545. Ενδεικτικό παράδειγμα δοκιμών επισήμανσης. Ποσοστό επισήμανσης 47.13%

Στον πίνακα 4 βλέπουμε κάποιες από τις δοκιμές και τα ποσοστά επισήμανσης που έδωσαν αυτές.

Πίνακας 4. Δοκιμές επισήμανσης του ετεροδιμερούς PSMA-DOA-RM2

$^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ (μL)	ammonium acetate buffer pH4 (μL)	HEPES buffer (μL)	PSMA-DOA- RM2 (nmol)	Ποσοστό επισήμανσης (%)
40	350	/	10	45.15
	/	40	10	77.7
	/	40	15	92.97
	/	40	20	96.44
50	350	/	5	15.84
	350	/	10	49.46
	350	/	15	45.51
	350	/	20	96.72
	/	50	20	97.44
100	350	/	10	49.62
	500	/	10	19.86
	350	/	20	89.29
	500	/	20	46.82

Όπως παρατηρούμε με τη χρήση και των δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων (buffers) τα ποσοστά επισήμανσης ήταν παρόμοια όταν συγκρίνονται ίδιες αναλογίες στα υπόλοιπα υλικά. Επίσης, παρατηρείται ότι η βέλτιστη αναλογία είναι 50μL $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ και 20nmol του ετεροδιμερούς (Εικόνες 16,17).

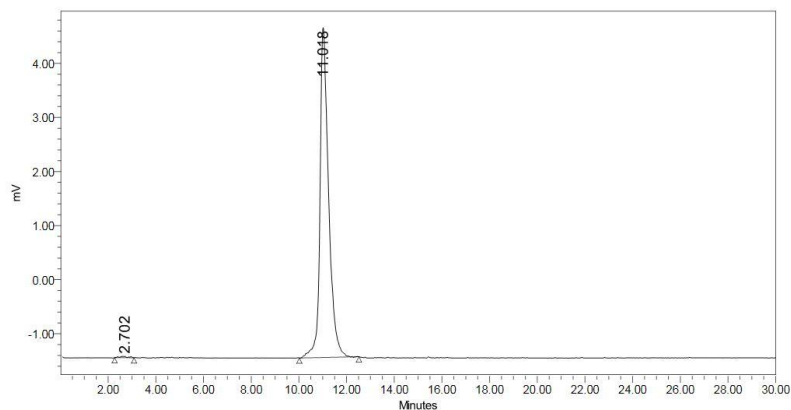


Figure 16. Έλεγχος επισήμανσης του ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 με RP-HPLC

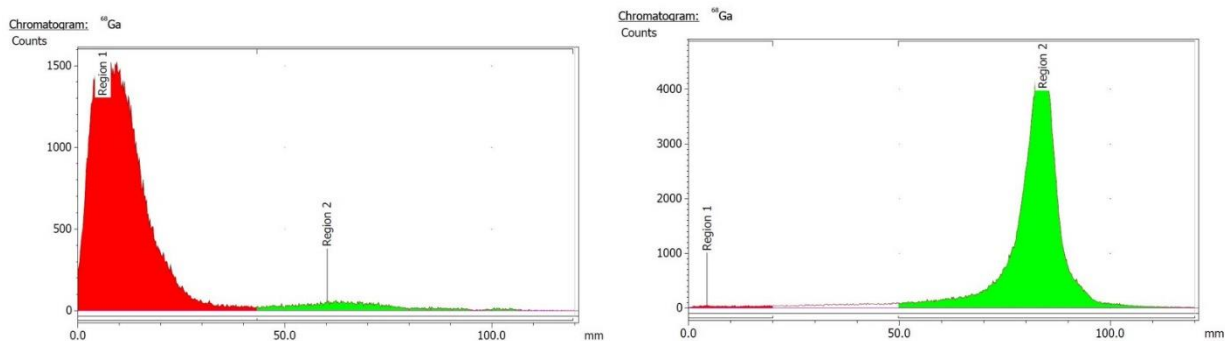


Figure 17. Έλεγχος επισήμανσης και ύπαρξης κολλοειδίων του ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 με radio-TLC. Δεξιά έχει προηγηθεί ανάπτυξη στο σύστημα ITLC 1 και αριστερά στο σύστημα ITLC 2

Η ίδια αναλογία φάνηκε να δίνει ποσοστά >95% και για τα δύο μονομερή (Εικόνες 18,19,20,21).

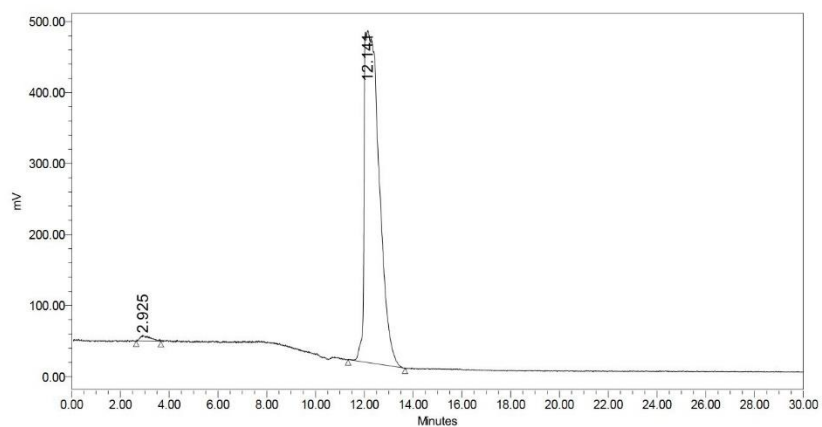


Figure 1818. Έλεγχος επισήμανσης του ^{68}Ga -PSMA-617 με RP-HPLC

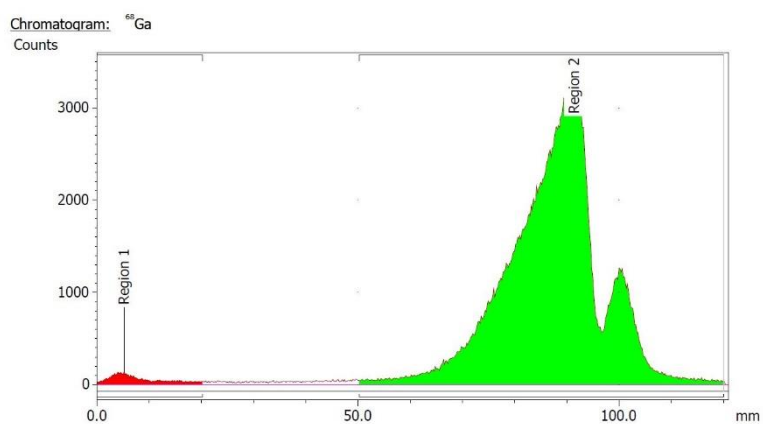


Figure 1919. Έλεγχος επισήμανσης του ^{68}Ga -PSMA-617 με radio-TLC. Έχει προηγηθεί ανάπτυξη στο σύστημα ITLC 1

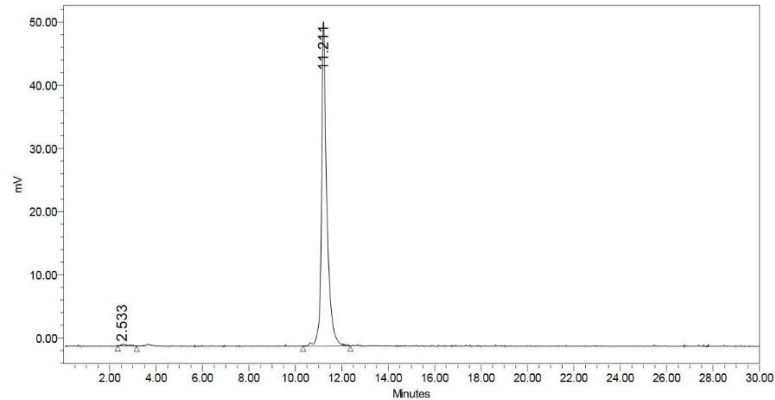


Figure 2029. Έλεγχος επισήμανσης του ^{68}Ga -RM2 με RP-HPLC

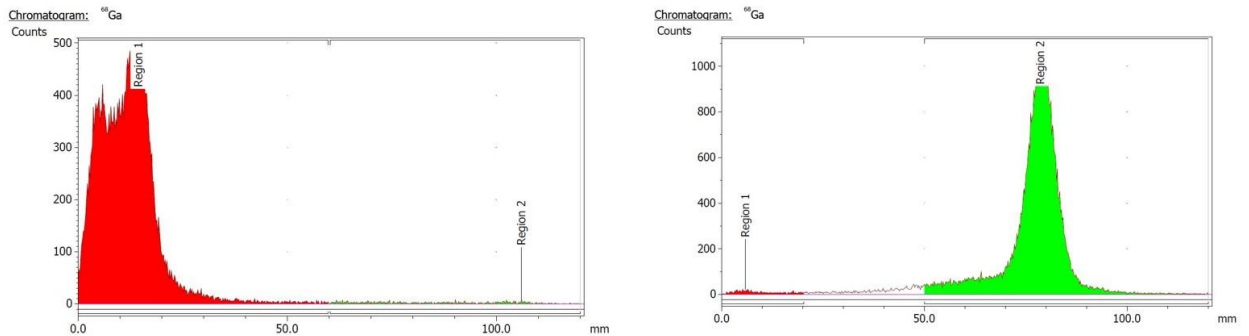


Figure 2124. Έλεγχος επισήμανσης και ύπαρξης κολλοειδών του ^{68}Ga -RM2 με radio-TLC. Δεξιά έχει προηγηθεί ανάπτυξη στο ITLC 1 και αριστερά στο ITLC 2

Προσπάθειες καθαρισμού έγιναν και με τη χρήση φίλτρων C18, το οποίο φάνηκε όχι μόνο να μην βελτιώνει σημαντικά την ραδιοχημική καθαρότητα του προϊόντος, αλλά και να έχει μεγάλη επίδραση στην τελική ενεργότητα και λόγω την κατακράτησης ποσοστού στο φίλτρο αλλά και λόγω σημαντικής παράδοσης του χρόνου σε σχέση με το χρόνο ημιζωής του ισότοπου.

Τα αποτελέσματα σταθερότητας στον ορό του αίματος έδειξε πως η ραδιοχημική καθαρότητα του ετεροδιμερούς δεν επηρεάστηκε ακόμα και μετά από σχεδόν δύο χρόνους ημιζωής (120min). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 22.

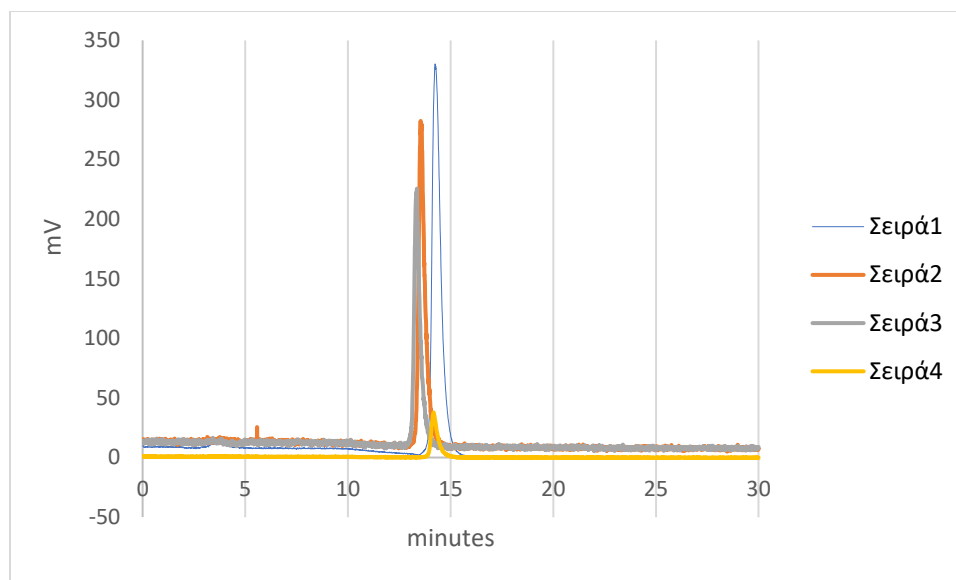


Figure 2222. Σταθερότητα στον ορό του αίματος μετά από 0 λεπτά (Σειρά 1), 30 λεπτά (Σειρά 2), 60 λεπτά (Σειρά 3) και 120 λεπτά (Σειρά 4)

Οι μελέτες εσωτερικοποίησης στα PC-3 κύτταρα έδειξαν μεγαλύτερα ποσοστά εσωτερικοποίησης και επιφανειακής πρόσδεσης για το ετεροδιμερές παρά για το ανάλογο μιομπεσίνης. Επίσης, τα επίπεδα εσωτερικοποίησης ήταν υψηλότερα στους 37°C από ότι στους 4°C. Τέλος, τα ποσοστά επιφανειακής πρόσδεσης ήταν μεγαλύτερα από αυτά της εσωτερικοποίησης. (Εικόνα 23)

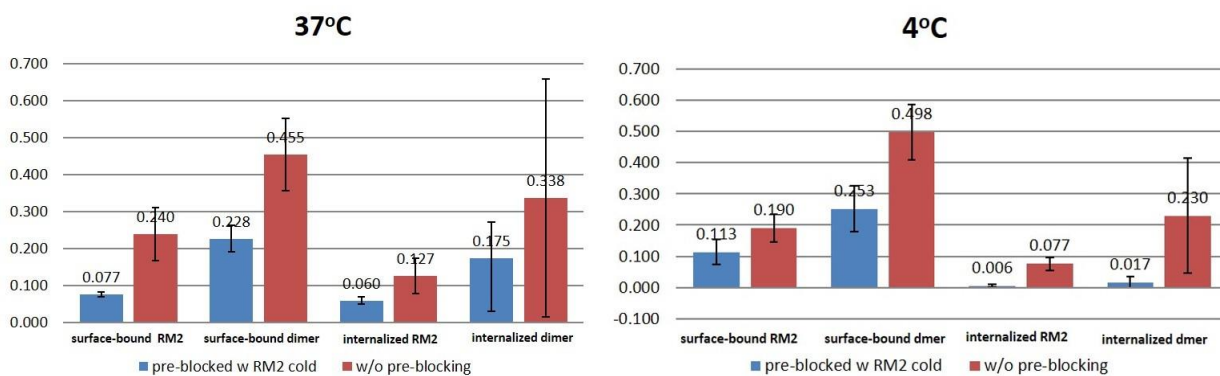


Figure 2323. Αποτελέσματα συγκριτικής μελέτης εσωτερικοποίησης των ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 και ^{68}Ga -DOTA-RM2 σε κύτταρα PC-3 στους 37°C (αριστερά) και στους 4°C (δεξιά)

Όσον αφορά τη μελέτη στα LNCaP κύτταρα το PSMA-617 φαίνεται να έχει καλύτερη ικανότητα επιφανειακής δέσμευσης και εσωτερικοποίησης από το ετεροδιμερές, αλλά παρόλα αυτά, τα ποσοστά του ετεροδιμερούς στα LNCaP είναι υψηλότερα από ότι στα PC-3. Αυτό πιθανώς να συμβαίνει καθώς οι PSMA υποδοχείς είναι 4 φορές περισσότεροι από τους GRPr. (Εικόνα 24)

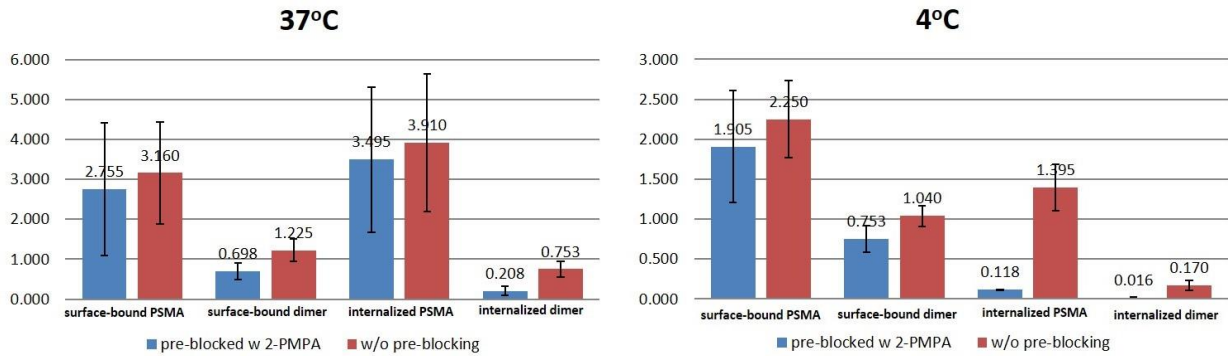


Figure 2424. Αποτελέσματα συγκριτικής μελέτης εσωτερικοποίησης των ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 και ^{68}Ga -PSMA-617 σε κύτταρα LNCaP στους 37°C (αριστερά) και στους 4°C (δεξιά)

Η βιοκατανομή του ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 μελετήθηκε σε δύο ομάδες άθυμων ποντικών τύπου SCID που έφεραν όγκους PC3 (Ομάδα Α) και LNCaP (Ομάδα Β). Και στις δύο ομάδες παρατηρήθηκε γρήγορη αιματική κάθαρση, ενώ η απέκκριση ήταν κατά κύριο λόγο νεφρική. Υψηλή εντόπιση ενεργότητας μορίων που στοχεύουν το PSMA είναι επίσης αναμενόμενη στα νεφρά, λόγω της ενδογενούς έκφρασης PSMA στα proximal tubes των φυσιολογικών νεφρών. Η παρατηρούμενη ηπατική ενεργότητα ήταν επίσης χαμηλή. Τέλος, ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα καθώς φάνηκε να υπάρχει σημαντικό ποσοστό ακτινοβολίας συσσωρευμένο στον όγκο. (Εικόνες 25, 26).

Πιο αναλυτικά, στα πειραματόζωα της Ομάδας Α που έφεραν όγκους PC-3 παρατηρήθηκε αρχικά μεγάλο ποσοστό ($40,72\% \pm 4,85$) στα νεφρά, το οποίο όμως ύστερα από δύο ώρες φαίνεται να έχει μειωθεί στο $15,86\% \pm 2,06$, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει ταχεία απέκκριση του φαρμάκου μέσω των ούρων. Επίσης παρατηρήθηκε αυξημένη εντόπιση ραδιενέργειας στα όργανα που εκφράζουν υποδοχείς μομπεσίνης GRPr, όπως το πάγκρεας ($12,77 \pm 7,55$ στα 30 λεπτά που μειώθηκε στο $5,87 \pm 0,87$ στα 120 λεπτά), σε αντίθεση με την εντόπιση στα όργανα που εκφράζουν PSMA όπως η σπλήνα ($3,31 \pm 1,66$ στα 30 λεπτά που μειώθηκε στο $1,36 \pm 0,17$ στα 120 λεπτά). Το ποσοστό στον όγκο στα 30 λεπτά είναι $5,58\% \pm 1,16$

ενώ στα 60 λεπτά και στα 120 λεπτά είναι $3,96\% \pm 0,63$ και $3,75\% \pm 0,97$ αντίστοιχα. (Εικόνα 18) Τα δεδομένα αυτά, δείχνουν μία σταθερότητα στο ποσοστό από τη μία ώρα μέχρι τις δύο ώρες, γεγονός που υποδεικνύει μία σταθερή κατακράτηση του φαρμάκου στον όγκο και ότι το ποσοστό αυτό δεν οφείλεται στην αιμάτωση του όγκου, αφού το ποσοστό στο αίμα μειώνεται από $2,43 \pm 0,33$ στα 60 λεπτά μετά τη χορήγηση σε $1,82 \pm 1,01$ στα 120 λεπτά μετά τη χορήγηση. Αυτό το συμπέρασμα έρχεται να ενισχύσει η αυξανόμενη τιμή του λόγου του ποσοστού του όγκου ως προς το ποσοστό στο αίμα (tumor to blood ratio) από $1,12 \pm 0,05$ στα 30 λεπτά στο $2,06 \pm 1,49$ ύστερα από 2 ώρες. Η αναλογία ποσοστού όγκου προς μύες (tumor to muscle) από $6,60 \pm 0,87$ που μετρήθηκε στα 30 λεπτά, μετά από δύο ώρες υπολογίστηκε να είναι $12,07 \pm 6,84$, γεγονός που υποδεικνύει την παρατεταμένη εντόπιση του ραδιοφαρμάκου στον όγκο και την απομάκρυνσή του από τους μύες, που θα έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ραδιενέργειας υποβάθρου κατά την απεικόνιση, κατά συνέπεια τη λήψη «ευκρινών» εικόνων.

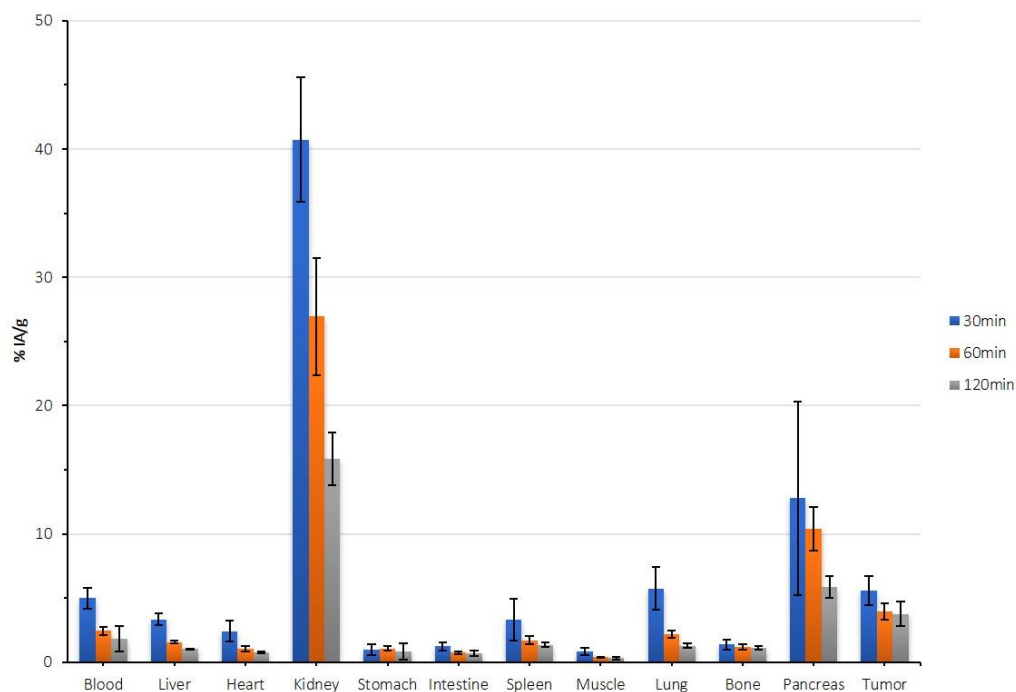


Figure 2525. Αποτελέσματα μελέτης βιοκατανομής στην Ομάδα Α (άθυμα ποντίκια τύπου SCID που φέρουν όγκους PC-3)

Στα πειραματόζωα της Ομάδας Β που έφεραν LNCaP όγκους παρατηρήθηκε και πάλι ταχεία απέκκριση από τα νεφρά (το ποσοστό στα νεφρά από $30,57\% \pm 5,31$ στα 30 λεπτά έπεσε

στο 18,13% \pm 3,35 ύστερα από δύο ώρες). Η πρόσληψη ραδιενέργειας στον όγκο ήταν υψηλότερη από αυτήν στους υπόλοιπους φυσιολογικούς ιστούς, με εξαίρεση τα νεφρά. Τα ποσοστά στους όγκους, ακόμα και μετά από δύο ώρες παραμένουν υψηλότερα κατά τέσσερις φορές (17,38% \pm 2,69) σε σχέση με τους PC-3 όγκους (3,75 \pm 0,97). Αυτό εξηγείται και από το γεγονός ότι τα LNCaP κύτταρα έχουν τέσσερις φορές περισσότερους υποδοχείς PSMA από ότι τα PC-3 GRPr, όπως προαναφέρθηκε. Παρόλα αυτά τα δεδομένα δείχνουν πολύ καλή εκλεκτικότητα του φαρμάκου. Η κάθαρση της ενεργότητας από αυτούς τους ιστούς ήταν ταχύτερη από την παρατηρούμενη κάθαρση από τον όγκο, με αποτέλεσμα την αύξηση των λόγων όγκου:ιστό στα 120 λεπτά. Για παράδειγμα, η αναλογία του ποσοστού του όγκου ως προς αυτό του αίματος είναι αυξάνεται σημαντικά από τα 30 λεπτά (2,38) στις δύο ώρες (5,47) υποδεικνύοντας και πάλι ότι η ενεργότητα που μετρήθηκε στον όγκο δεν οφείλεται στην αιμάτωση του αλλά στην εκλεκτική πρόσδεση του φαρμάκου στους υποδοχείς του όγκου. Η αναλογία όγκου προς μύες (tumor:muscle ratio) επίσης αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου (από 12,05 στα 30 λεπτά σε 31,86 ύστερα από δύο ώρες). Στο πάγκρεας παρατηρούνται παρόμοια ποσοστά και μεταβολή τους με το χρόνο όπως και στα πειραματόζωα με όγκους PC-3. Υψηλά ποσοστά παρατηρούνται και στη σπλήνα (14,43% \pm 6,12 στα 30 λεπτά, 8,80 \pm 1,72 στα 60 λεπτά και τέλος 6,99 \pm 1,94 στα 120 λεπτά), γεγονός που οφείλεται στην υπερέκφραση υποδοχέων PSMA στο όργανο αυτό (Εικόνα 26).

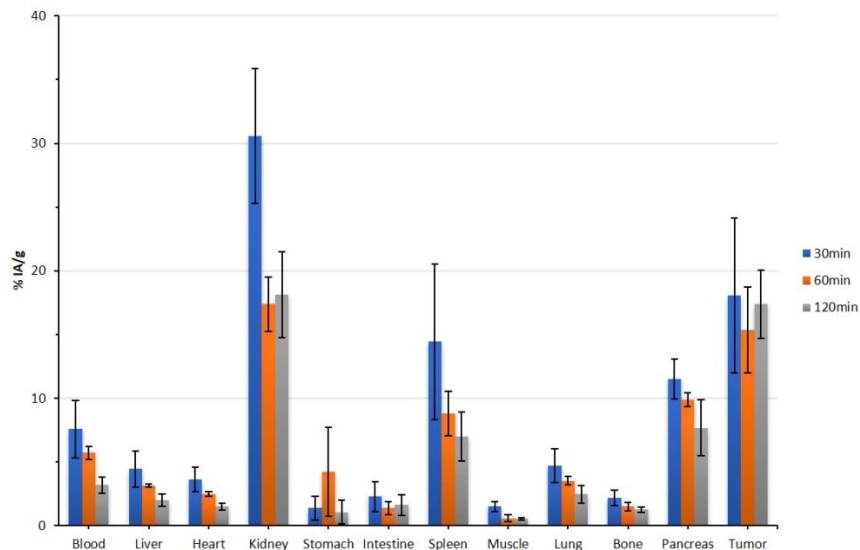


Figure 2626. Αποτελέσματα μελέτης βιοκατανομής στην Ομάδα Β (άθυμα ποντίκια τύπου SCID που φέρουν όγκους LNCaP)

14. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία επισημάνθηκε τον ετεροδιμερές PSMA-DOTA-RM2, καθώς και τα μονομερή από τα οποία αποτελείται, PSMA-617 και RM2, με ^{68}Ga .

Μελέτες σταθερότητας σε ανθρώπινο ορό έδειξαν ικανοποιητική *in vitro* σταθερότητα του ετεροδιμερούς για τουλάχιστον 120min, ενισχύοντας τη δυνατότητα του για χρήση ως παράγοντα PET. Επίσης, στη μελέτη εσωτερικοποίησης τα αποτελέσματα ήταν ελπιδοφόρα καθώς η εκλεκτικότητα του ετεροδιμερούς σε σχέση με το ανάλογο μοπομπεσίνης φάνηκε να είναι καλύτερη, χωρίς να συμβαίνει όμως το ίδιο σε σχέση με το PSMA-617 στις LNCaP κυτταρικές σειρές.

Τέλος, στις μελέτες βιοκατανομής σε ζώα που έφεραν όγκους PC-3 και LNCaP έδειξαν σημαντική εκλεκτικότητα του φαρμάκου ^{68}Ga -PSMA-DOTA-RM2 και προς τους δύο στόχους, αλλά και σημαντική ικανότητα πρόσδεσης καθώς και ταχύτατη απέκκριση της μη δεσμευμένης ακτινοβολίας μέσω των ούρων. Όλα αυτά τα στοιχεία αποτελούν οiwονούς για καλές απεικονίσεις PET. Μελλοντικές μελέτες για το συγκεκριμένο διμερές περιλαμβάνουν μελέτες βιοκατανομής σε πειραματόζωα που φέρουν και τα δύο είδη όγκων (LNCaP και PC-3) καθώς και απεικόνιση του παθολογικού πειραματικού μοντέλου σε PET κάμερα.

15. Βιβλιογραφία

- [1] Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, Freddie Bray, BSc, MSc, PhD¹; Jacques Ferlay, ME²; Isabelle Soerjomataram, MD, MSc, PhD³; Rebecca L. Siegel, MPH⁴; Lindsey A. Torre, MSPH⁵; Ahmedin Jemal, PhD, DVM⁶, CA CANCER J CLIN 2018;68:394–424
- [2] Omran AR. The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q.* 1971;49:509-538.
- [3] Gersten O, Wilmoth JR. The cancer transition in Japan since 1951. *Demogr Res.*2002;7:271-306.
- [4] Ward E, Jemal A, Cokkinides V, et al. Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status. *CA Cancer J Clin.* 2004;54:78-93
- [5] Bach PB, Schrag D, Brawley OW, Galaznik A, Yakren S, Begg CB. Survival of Blacks and Whites after a cancer diagnosis. *JAMA.* 2002;287:2106-2113
- [6] World Cancer Report 2014. World Health Organisation (WHO). from: <http://de.scrib.com/doc/249125578/World-Cancer-Report-2014#scrib>.
- [7] Cancer Statistics, 2021 Rebecca L. Siegel, MPH ; Kimberly D. Miller, MPH ; Hannah E. Fuchs, BS; Ahmedin Jemal, DVM, PhD, CA CANCER J CLIN 2021;71:7–33
- [8] De Vita V. T. Hellman S., Rosenberg S. A. Cancer Principles and Practice of Oncology, 5th edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, 1997

- [9] American Cancer Society. What is Cancer? from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>.
- [10] Kumar V., Abbas A. K., Aster J. C. Robbins – Fundamentals of Pathology and Physiopathology. Edra Masson, 2013.
- [11] Multimodality Imaging of Prostate Cancer Soleen Ghafoor, Irene A. Burger, and Alberto H. Vargas, The Journal of Nuclear Medicine, Vol. 60, No. 10, October 2019
- [12] Miller B. F., Keane C. B. Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing and Allied Health, 7th Edition. Saunders Company, Philadelphia, PA, 2003
- [13] Longe J. L. The Gale Encyclopedia of cancer, a guide to cancer and its treatment, 2nd edition. The Gale Group, Farmington Hills, MI, 2005.
- [14] Pecorino L. Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics. Oxford University Press, Oxford, 2012
- [15] Weinberg R. A. The Biology of Cancer, Second Edition. Taylor & Francis Group, New York, 2014
- [16] Alison M. R. The cancer Handbook, 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2007
- [17] Mendelsohn J., Howley P. M., Israel M. A., Gray J. W., Thompson C. B., The Molecular Basis of Cancer, 4th edition. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, PA, 2014.
- [18] CancerResearch UK. from: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/whatis-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>.
- [19] National Cancer Institute. About Cancer; Causes and Prevention: Risk Factors. from <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>
- [20] Ukraintseva S. V., Yahin A. I. *Individual Aging and Cancer Risk: How Are They Related?* Demogr. Res. 2003; 9:163-196.
- [21] National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services. 13th Report on Carcinogens (RoC). from: <http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/roc/roc13/index.html>.
- [22] Siminszky B., Gavilano L., Bowen S. W., Dewey R. E. *Conversion of nicotine to nor nicotine in Nicotiana tabacum is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(41): 14919–14924
- [23] Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., Bosch F. X., Kummer J. A., Shah K. V., Snijders P. J., Peto J., Meijer C. J., Muñoz N. *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.* J Pathol. 1999; 189(1):12-9

- [24] Hatakeyama M., Higashi H. *Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis*. Cancer Sci. 2005; 96(12):835-43
- [25] Rustagi T., Dasanu C. A. *Risk factors for gallbladder cancer and cholangiocarcinoma: similarities, differences and updates*. J Gastrointest Cancer. 2012;43(2):137-47
- [26] International Agency for Research on Cancer (IARC). Agents Classified by the IARC Monographs, Volume 1-113. from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
- [27] Mannweiler S., Amersdorfer P., Trajanoski S., Terrett J. A., King D., Mehes G., *Heterogeneity of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate carcinoma with distant metastasis*. Pathol Oncol Res. 2009; 15(2):167-72
- [28] Dagogo-Jack I., Shaw A. T. *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*. Nature Reviews Clinical Oncology. 2018; (15): 81–94
- [29] Kopka K., Benesova M., Barinka C., Haberkorn U., Babich J., *Glu-Ureido-Based Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen: Lessons Learned During the Development of a Novel Class of Low-Molecular-Weight Theranostic Radiotracers*. J.Nucl Med. 2017; 58(2):17S-26S
- [30] Stanta G. and Bonin S., *Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity*. Front Med (Lausanne). 2018; 5: 85
- [31] Baratto L., Jadvar H., Iagaru A. *Prostate Cancer Theranostics Targeting Gastrin-Releasing Peptide Receptors*. Mol Imaging Biol. 2017; Vols. 10.1007/s11307-017-1151-1
- [32] Stanta G. *Tissue Heterogeneity as a pre-analytical source of variability. Recent Results*. Cancer Res Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer. 2015; 199:35-43.10.1007/978-3-319-13957-9_4 .
- [33] Stanta G., Bonin S. *A practical approach to tumor heterogeneity in clinical research and diagnostics*. Pathobiology. 2017; 10.1159/000477813
- [34] Epstein J. I., Egevad L., Amin M. B., Delahunt B., Srigley J. R., Humphrey P. A. and Grading Committee., *The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System*. Am J Surg Pathol. 2016;40(2):244-52
- [35] Miller K. D., Siegel R. L., Lin C. C., Mariotto A. B., Kramer J. L., Rowland J. H., Stein K. D., Alteri R., Jemal A. *Cancer treatment and survivorship statistics, 2016*. CA Cancer J Clin. 2016; 66(4):271-89.
- [36] Pakzad R., Mohammadian-Hafshejani A., Ghoncheh M., Pakzad I., Salehiniya H., *The incidence and mortality of prostate cancer and its relationship with development in Asia*. Prostate Int. 2015; 3(4): 135-140.

- [37] Torre L. A., Bray F., Siegel R. L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin. 2015; 65(2):87-108
- [38] Rebbeck TR, Devesa SS, Chang BL, et al. Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of African descent. *Prostate Cancer*. 2013;2013:560857
- [39] Bray F, Kiemeny L. Epidemiology of prostate cancer in Europe: patterns, trends and determinants. In: Bolla M, van Poppel H, eds. *Management of Prostate Cancer: A Multidisciplinary Approach*. Berlin: Springer-Verlag; 2017:1-11.
- [40] Schröder F. H. et. al. *The European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer – Prostate Cancer Mortality at 13 Years of Follow-up*. Lancet. 2014;384(9959): 2027–2035.
- [41] *The PROSTATE*. from: <http://www.bartleby.com/107/263.html>
- [42] Raychaudhuri B., Cahill D. *Pelvic fasciae in urology*. Ann.R.Coll Surg Engl. 2008; 90:633-637
- [43] Chan Y. X., Yeap B. B. *Dihydrotestosterone and cancer risk*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2018; Vol. 10.1097
- [44] Bosland M. C. *The Role of Steroid Hormones in Prostate Carcinogenesis*. Natl. Cancer Inst. Monogr. 2000; 27:39-66
- [45] Miller D. C., Hafez K. S., Stewart A., Montie J. E., Wei J. T. *Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update form the National Cancer Data Base*. Cancer. 2003; 98(6):1169-78
- [46] Catalona W. J., Smith D. S., Ratliff T. L., Dodds K. M., Coplen D. E., Yuan J. J., Petros J. A., Andriole G.L., *Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer*. N Engl J Med. 1991; 324(17):1156-61
- [47] Schröder F. H., van der Crujisen-Koeter I., de Koning H. J., Vis A. N., Hoedemaeker R.F., Kranse R. *Prostate cancer detection at low prostate specific antigen*. J Urol. 2000; 163(3):806-12
- [48] Ravizzini G., Turkbey B., Kurdziel K., Choyke P. L. *New horizons in prostate cancer imaging*. Eur J Radiol. 2009; 70(2):212-26
- [49] Kim D. K., Kim S. J., Moon H. S., Park S. Y., Kim Y. T., Choi H. Y., Lee T. Y., Park H. Y. *The Role of TURP in the Detection of Prostate Cancer in BPH Patients with Previously Negative Prostate Biopsy*. Korean J Urol. 2010; 51(5):313-7
- [50] Apolo A. B., Pandit-Taskar N.,and Morris M. J. *Novel Tracers and Their Development for the Imaging of Metastatic Prostate Cancer*. J Nucl Med. 2008; 49(12):2031–2041.
- [51] Reske S. N., Blumstein N. M., Neumaier B., Gottfried H. W., Finsterbusch F., Kocot D., Möller P., Glatting G., Perner S. *Imaging prostate cancer with 11C-choline PET/CT*. J Nucl Med. 2006; 47(8):1249-54

- [52] D'Amico A. V., Moul J., Carroll P. R., Sun L., Lubeck D., Chen M. H. *Cancerspecific mortality after surgery or radiation for patients with clinically localized prostate cancer managed during the prostate-specific antigen era*. J Clin Oncol. 2003;21(11):2163-72.
- [53] Brawer M. K. *Hormonal Therapy for Prostate Cancer*. Rev Urol. 2006; 8(2): S35–S47
- [54] Hellerstedt B. A., Pienta K. J. *The current state of hormonal therapy for prostate cancer*. CA Cancer J Clin. 2002; 52(3):154-79.
- [55] Blana A., Walter B., Rogenhofer S., Wieland W. F. *High-intensity focused ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: 5-year experience*. Urology. 2004; 63(2):297-300
- [56] Shelley M., Harrison C., Coles B., Staffurth J., Wilt T. J., Mason M. D. *Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer*. Cochrane Database Syst Rev. 2006; (4):CD005247.
- [57] Rodríguez S. A., Arias Fúnez F., Bueno Bravo C., Rodríguez-Patrón Rodríguez R., Sanz Mayayo E., Palacios V. H., Burgos Revilla F. J. *Cryotherapy for Primary Treatment of Prostate Cancer: Intermediate Term Results of a Prospective Study from a Single Institution Prostate Cancer*. 2014; 2014: 571576
- [58] Knapp F. F. (Russ), Dash A. *Radiopharmaceuticals for Therapy*. Springer, India, 2016. DOI:10.1007/978-81-322-2607-9
- [59] Zanzonico P. *Principles of nuclear medicine imaging: planar, SPECT, PET, multi-modality, and autoradiography systems*. Radiat Res. 2012;177(4):349-64
- [60] Ametamey S. M., Honer M., Schubiger P. A. *Molecular imaging with PET*. Chem.Rev. 2008; 108(5):1501-16
- [61] Vértes A., Nagy S., Klencsár Z., Lovas R. G., Rösch F. *Handbook of Nuclear Chemistry*, 2nd edition. Springer Science, New York, 2011.
- [62] Welch M. J., Redvanly C. S. *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2003
- [63] Perkins A., Frier M. *Nuclear Medicine in Pharmaceutical Research*. Taylor & Francis Ltd., London, 1999
- [64] Saha G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 6th edition. Springer Science and Business Media, New York, 2010
- [65] Sharp P. F., Gemmel H. G., Murray A. D. *Practical Nuclear Medicine*, 3rd edition. Springer-Verlag, London Limited, 2005
- [66] George Sgouros, Lisa Bodei, Michael R McDevitt, Jessie R Nedrow, *Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges*, Nat Rev Drug Discov. 2020 Sep;19(9):589-608. DOI:10.1038/s41573-020-0073-9

- [67] Biersack H. J., Freeman L. M. *Clinical Nuclear Medicine*. Springer Science & Business Media, Heidelberg, 2008.
- [68] Rich D. A. *A brief history of positron emission tomography*. *J Nucl Med Technol*. 1997; 25(1):4-11.
- [69] Zimmermann R. *Nuclear Medicine: Radioactivity for diagnosis and therapy*. EDP Sciences, France, 2007
- [70] Strauss L. G., Conti P. S. *The applications of PET in clinical oncology*. *J Nucl Med*.1991; 32(4):623-48
- [71] Lewis S.J., Windhorst D.A., Zeglis M.B., *Radiopharmaceutical Chemistry*, Springer, Switzerland,2019
DOI: 10.1007/978-3-319-98947-1
- [72] Eary J. F., Brenner W. *Nuclear Medicine Therapy*. Informa Healthcare USA, Inc., New York, 2007
- [73] IAEA International Atomic Energy Agency. Technical Editors: Qaim S. M., Tárkányi F., Capote R. Nuclear Data for the Production of Therapeutic Radionuclides from: https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/trs473_web.pdf.
- [74] Committee on State of the Science of Nuclear Medicine. *Advancing Nuclear Medicine Through Innovation*. National Academies Press, Washington DC, 2007
- [75] Stöcklin G., Qaim S. M., Rösch F. *The Impact of Radioactivity on Medicine Metallic*. *Radiochimica Acta*. 2013; Vols. 70-71.
- [76] Biersack H. J., Freeman L. M. *Clinical Nuclear Medicine*. Springer Science & Business Media, Heidelberg, 2008
- [77] Funkhouser, J., *Reintroducing pharma: Theranostic revolution*. *Curr. Drug Discovery* 2., 2002
- [78] Sgouros, G. et al. *MIRD Monograph: Radiobiology and Dosimetry for Radiopharmaceutical Therapy with Alpha-Particle Emitters* (ed. Sgouros, G.). (SNMMI, 2015). Comprehensive review of radiobiology and dosimetry for α -emitter RPT.
- [79] Sgouros G, et al. *MIRD pamphlet no. 22 (abridged): radiobiology and dosimetry of alpha-particle emitters for targeted radionuclide therapy*. *J. Nucl. Med*. 2010;51:311–328. - [PMC](#) - [PubMed](#)
- [80] McCarthy, J. R. (2009) *The future of theranostic nanoagents*. *Nanomed. (London, England)* 4, 693–695
- [81] McCarthy, J. R. (2010) *Multifunctional agents for concurrent imaging and therapy in cardiovascular disease*. *Adv. Drug Delivery Rev.*62, 1023–1030
- [82] Sumer, B., and Gao, J. (2008) *Theranostic nanomedicine for cancer*. *Nanomed. (London, England)* 3, 137–140
- [83] *Theranostics: Combining Imaging and Therapy*, Sneha S. Kelkar, Theresa M. Reineke, 2011, *Bioconjugate Chem*. 2011, 22, 1879–1903, [dx.doi.org/10.1021/bc200151q](https://doi.org/10.1021/bc200151q)

- [84] Theranostics: From molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to Personalized radionuclide therapy – The Bad Berka experience, Baum P.R., Kulkarni R.H., 2012;2(5):437-447
- [85] Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer*. 1998;82:2256–2261
- [86] Oh SW, Cheon GJ. Prostate-specific membrane antigen PET imaging in prostate cancer: opportunities and challenges. *Korean J Radiol*. 2018;19:819–831
- [87] The Future of PSMA-Targeted Radionuclide Therapy: An Overview of Recent Preclinical Research
Eline A M Ruigrok, Wytske M van Weerden, Julie Nonnekens, Marion de Jong, *Pharmaceutics* 2019 Oct 29;11(11):560
- [88] Bouchelouche K., Choyke P.L., Capala J. Prostate specific membrane antigen—A target for imaging and therapy with radionuclides. *Discov. Med*. 2010;9:55–61
- [89] Wright G.L., Jr., Haley C., Beckett M.L., Schellhammer P.F. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urol. Oncol*. 1995;1:18–28
- [90] Backhaus P., Noto B., Avramovic N., Grubert L.S., Huss S., Bogemann M., Stegger L., Weckesser M., Schafers M., Rahbar K. Targeting PSMA by radioligands in non-prostate disease-current status and future perspectives. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2018;45:860–877. doi: 10.1007/s00259-017-3922-y
- [91] Kawakami M., Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. *Cancer Res*. 1997;57:2321–2324
- [92] Bostwick D.G., Pacelli A., Blute M., Roche P., Murphy G.P. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A study of 184 cases. *Cancer*. 1998;82:2256–2261. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19980601)82:11<2256::AID-CNCR22>3.0.CO;2-S
- [93] Silver D.A., Pellicer I., Fair W.R., Heston W.D., Cordon-Cardo C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin. Cancer Res*. 1997;3:81–85
- [94] Kratochwil C., Bruchertseifer F., Rathke H., Bronzel M., Apostolidis C., Weichert W., Haberkorn U., Giesel F.L., Morgenstern A. Targeted α -therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with 225Ac-PSMA-617: Dosimetry Estimate and empiric dose finding. *J. Nucl. Med*. 2017;58:1624–1631. doi: 10.2967/jnumed.117.191395
- [95] Kratochwil C., Bruchertseifer F., Rathke H., Bronzel M., Apostolidis C., Weichert W., Haberkorn U., Giesel F.L., Morgenstern A. Targeted α -therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with

225Ac-PSMA-617: Dosimetry Estimate and empiric dose finding. *J. Nucl. Med.* 2017;58:1624–1631. doi: 10.2967/jnumed.117.191395

[96] Wurzer A., Seidl C., Morgenstern A., Bruchertseifer F., Schwaiger M., Wester H.J., Notni J. Dual-nuclide Radiopharmaceuticals for positron emission tomography based dosimetry in radiotherapy. *Chemistry.* 2018;24:547–550. DOI: 10.1002/chem.201702335

[97] Lim J., Guan B., Nham K., Hao G., Sun X., Simanek E.E. Tumor uptake of triazine dendrimers decorated with four, sixteen, and sixty-four PSMA-targeted ligands: Passive versus active tumor targeting. *Biomolecules.* 2019;9:421. doi: 10.3390/biom9090421

[98] Schafer M., Bauder-Wust U., Leotta K., Zoller F., Mier W., Haberkorn U., Eisenhut M., Eder M. A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for 68Ga-PET imaging of prostate cancer. *EJNMMI Res.* 2012;2:23. doi: 10.1186/2191-219X-2-23

[99] Escudero-Castellanos A., Ocampo-Garcia B., Ferro-Flores G., Santos-Cuevas C., Morales-Avila E., Luna-Gutierrez M., Isaac-Olive K. Synthesis and preclinical evaluation of the 177Lu-DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys3-bombesin heterodimer designed as a radiotheranostic probe for prostate cancer. *Nucl. Med. Commun.* 2019;40:278–286

[100] Iagaru A. Will GRPR compete with PSMA as a target in prostate cancer? *J. Nucl. Med.* 2017;58:1883–1884. doi: 10.2967/jnumed.117.198192

[101] Ananias H.J., van den Heuvel M.C., Helfrich W., de Jong I.J. Expression of the gastrin-releasing peptide receptor, the prostate stem cell antigen and the prostate-specific membrane antigen in lymph node and bone metastases of prostate cancer. *Prostate.* 2009;69:1101–1108

[102] PSMA Theranostics: Current Status and Future Directions, Rahbar K, Afshar-Oromieh A., Jadvar H., Ahmadzadehfar H., *Mol. Imag. Vol.17:1-9, 2018*

[103] Broccardo M, Falconieri Erspamer G, Melchiorri P, Negri L, de Castiglione R. Relative potency of bombesin-like peptides. *Br J Pharmacol.* 1975;55(2):221–7. doi: 10.1111/j.1476-5381.1975.tb07631.x.

[104] Cescato R, Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Charalambidis D, Piccand V, et al. Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. *J Nucl Med.* 2008;49(2):318–26

[105] Liu Y, Hu X, Liu H, Bu L, Ma X, Cheng K, et al. A comparative study of radiolabeled bombesin analogs for the PET imaging of prostate cancer. *J Nucl Med.* 2013;54(12):2132–8

[106] Mansi R, Wang X, Forrer F, Kneifel S, Tamma ML, Waser B, et al. Evaluation of a 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-conjugated bombesin-based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, and therapeutic radionuclides. *Clin Cancer Res.* 2009;15(16):5240–9

- [107] Kaighn, M., et al., Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Inv. Ur.*, 1979. 17(1): p. 16-23
- [108] Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP, LNCaP model of human prostatic carcinoma”, *Cancer Res.* 43(4): 1809-18,1983
- [109] H.J.K. Ananias, I.J. de Jong, R.A. Dierckx, C. Van der Wiele, W. Helfrich, P.H. Elsinga, Nuclear Imaging of prostate cancer with Gastrin-Releasing-Peptide-Receptor Targeted Radiopharmaceuticals, *Current Pharmaceutical Design*, 2008, 14, 3033-3047
- [110] C.Liolios, M. Schafer, U.Haberkorn, M.Eder, K.Kopka, Novel bispecific PSMA/GRPr targeting radioligands with optimized pharmacokinetics for improved PET imaging of Prostate cancer, *Bioconjugate Chem.*2016, 27, 737-751
- [111] C.Liolios, C.Sachpekidis, M.Schafer, K.Kopka, Bispecific radioligands targeting prostate-specific membrane antigen and gastrin-releasing peptide receptors on the surface of prostate cancer cells, *J. Label Comp. Radiopharm.* 2019; 62:510-522
- [112] B.Mitran, Z.Varasteh, A.Abouzayed, S.S.Rinne, E.Puuvuori, M. De Rosa, M.Larhed, V.Tolmachev, A.Orlova, U.Rosenstrom, Bispecific GRPR-Antagonistic Anti-PSMA/GRPR Heterodimer for PET and SPECT diagnostic imaging of prostate cancer, *Cancers* 2019, 11, 1371
- [113] M.Eder, M.Schafer, U.bauder-wust, U.Haberkorn, M.Eisenhut, K.Kopka, Preclinical evaluation of a Bi-specific Low-Molecular Heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer, *The prostate* 74:659-668, 2014
- [114] F.Lundmark, A.Abouzayed, B.Mitran, S.S.Rinne, Z.Varasteh, M.Larhed, V.Tolmachev, U.Rosenstrom, A.Orlova, Heterodimeric Radiotracer targeting PSMA and GRPR for imaging of prostate cancer – Optimization of the affinity towards PSMA by Linker modification in murine model, *Pharmaceutics*, 2020, 12,614
- [115] Mark D. Bartholomä, Anika S. Louie, John F. Valliant, and Jon Zubieta, “Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era” *Chemical Reviews* 2010 110 (5), 2903-2920. DOI: 10.1021/cr1000755
- [116] Oliver C. Neels, Klaus Kopka, Christos Liolios and Ali Afshar-Oromieh, Radiolabeled PSMA Inhibitors, *Cancers* 2021.
- [117] Eder M, Schafer M, Bauder-Wust U, Hull WE, Wangler C, Mier W, et al. 68Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug Chem.* 2012;23(4):688-97.

- [118]** Afshar-Oromieh A, da Cunha ML, Wagner J, Haberkorn U, Debus N, Weber W, et al. Performance of [(68)Ga]Ga-PSMA-11 PET/CT in patients with recurrent prostate cancer after prostatectomy—a multi-center evaluation of 2533 patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021;48(9):2925-34.
- [119]** Abghari-Gerst M, Armstrong WR, Nguyen K, Calais J, Czernin J, Lin D, et al. A comprehensive assessment of (68)Ga-PSMA-11 PET in biochemically recurrent prostate cancer: Results from a prospective multi-center study in 2005 patients. *J Nucl Med*. 2021.
- [120]** Ferdinandus J, Fendler WP, Farolfi A, Washington S, Mohamad O, Pampaloni MH, et al. PSMA PET validates higher rates of metastatic disease for European Association of Urology Biochemical Recurrence Risk Groups: an international multicenter study. *J Nucl Med*. 2021.
- [121]** Chen Y, Pullambhatla M, Foss CA, Byun Y, Nimmagadda S, Senthamizhchelvan S, et al. 2-(3-(1-Carboxy-5-[(6-[18F]fluoro-pyridine-3-carbonyl)-amino]-pentyl)-ureido)-pentanedioic acid, [18F]DCFPyL, a PSMA-based PET imaging agent for prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7645-53.
- [122]** Morris MJ, Rowe SP, Gorin MA, Saperstein L, Pouliot F, Josephson D, et al. Diagnostic Performance of (18)F-DCFPyL-PET/CT in Men with Biochemically Recurrent Prostate Cancer: Results from the CONDOR Phase III, Multicenter Study. *Clin Cancer Res*. 2021;27(13):3674-82.
- [123]** Pienta KJ, Gorin MA, Rowe SP, Carroll PR, Pouliot F, Probst S, et al. A Phase 2/3 Prospective Multicenter Study of the Diagnostic Accuracy of Prostate Specific Membrane Antigen PET/CT with (18)F-DCFPyL in Prostate Cancer Patients (OSPNEY). *J Urol*. 2021;206(1):52-61.
- [124]** Bodar YJL, Zwezerijnen B, van der Voorn PJ, Jansen BHE, Smit RS, Kol SQ, et al. Prospective analysis of clinically significant prostate cancer detection with [(18)F]DCFPyL PET/MRI compared to multiparametric MRI: a comparison with the histopathology in the radical prostatectomy specimen, the ProStaPET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021.
- [125]** FDA. FDA Approves First PSMA-Targeted PET Imaging Drug for Men with Prostate Cancer. 2020.
- [126]** Carlucci G, Ippisch R, Slavik R, Mishoe A, Blecha J, Zhu S. (68)Ga-PSMA-11 NDA Approval: A Novel and Successful Academic Partnership. *J Nucl Med*. 2021;62(2):149-55.
- [127]** FDA. FDA approves second PSMA-targeted PET imaging drug for men with prostate cancer. 2021.
- [128]** Song H, Iagaru A, Rowe SP. (18)F DCFPyL PET Acquisition, Interpretation and Reporting: Suggestions Post Food and Drug Administration Approval. *J Nucl Med*. 2021.
- [129]** EDQM. European Pharmacopoeia 10th Edition. 2021.
- [130]** Prive BM, Janssen MJR, van Oort IM, Muselaers CHJ, Jonker MA, de Groot M, et al. Lutetium-177-PSMA-I&T as metastases directed therapy in oligometastatic hormone sensitive prostate cancer, a randomized controlled trial. *BMC Cancer*. 2020;20(1):884.

- [131]** Kratochwil C, Bruchertseifer F, Rathke H, Hohenfellner M, Giesel FL, Haberkorn U, et al. Targeted alpha-Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with (225)Ac-PSMA-617: Swimmer-Plot Analysis Suggests Efficacy Regarding Duration of Tumor Control. *J Nucl Med.* 2018;59(5):795-802.
- [132]** Khreish F, Ghazal Z, Marlowe RJ, Rosar F, Sabet A, Maus S, et al. 177 Lu-PSMA-617 radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: Initial 254-patient results from a prospective registry (REALITY Study). *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2021.
- [133]** Morris MJ, De Bono JS, Chi KN, Fizazi K, Herrmann K, Rahbar K, et al. Phase III study of lutetium-177-PSMA-617 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (VISION). *Journal of Clinical Oncology.* 2021;39(18):LBA4-LBA.
- [134]** Zippel C, Ronski SC, Bohnet-Joschko S, Giesel FL, Kopka K. Current Status of PSMA-Radiotracers for Prostate Cancer: Data Analysis of Prospective Trials Listed on ClinicalTrials.gov. *Pharmaceuticals (Basel).* 2020;13(1).
- [135]** Minamimoto R, Hancock S, Schneider B, Chin FT, Jamali M, Loening A, et al. Pilot Comparison of (6)(8)Ga-RM2 PET and (6)(8)Ga-PSMA-11 PET in Patients with Biochemically Recurrent Prostate Cancer. *J Nucl Med.* 2016;57(4):557-62.
- [136]** Hoberuck S, Michler E, Wunderlich G, Lock S, Holscher T, Froehner M, et al. 68Ga-RM2 PET in PSMA- positive and -negative prostate cancer patients. *Nuklearmedizin.* 2019;58(5):352-62.
- [137]** Fassbender TF, Schiller F, Zamboglou C, Drendel V, Kiefer S, Jilg CA, et al. Voxel-based comparison of [(68)Ga]Ga-RM2- PET/CT and [(68)Ga]Ga-PSMA-11-PET/CT with histopathology for diagnosis of primary prostate cancer. *EJNMMI Res.* 2020;10(1):62.
- [138]** Baratto L, Song H, Duan H, Hatami N, Bagshaw HP, Buyyounouski M, et al. PSMA- and GRPR-Targeted PET: Results from 50 Patients with Biochemically Recurrent Prostate Cancer. *J Nucl Med.* 2021;62(11):1545-9.
- [139]** Mapelli P, Ghezzi S, Gajate AMS, Preza E, Brembilla G, Cucchiara V, et al. 68Ga-PSMA and 68Ga-DOTA-RM2 PET/MRI in Staging of Highrisk Prostate Cancer Patients: a Prospective Pilot Trial. 2021.
- [140]** Ryogo Minamimoto¹, Ida Sonni, Steven Hancock, Shreyas Vasanawala, Andreas Loening, Sanjiv S. Gambhir, Andrei Iagaru, Prospective Evaluation of 68Ga-RM2 PET/MRI in Patients with Biochemical Recurrence of Prostate Cancer and Negative Conventional Imaging, NYU Med Ctr Lib - Periodicals Dept on November 2, 2017
- [141]** Jens Kurth¹ & Bernd Joachim Krause & Sarah M. Schwarzenböck & Carina Bergner & Oliver W. Hakenberg & Martin Heuschkel, First-in-human dosimetry of gastrin-releasing peptide receptor

antagonist [¹⁷⁷Lu]Lu-RM2: a radiopharmaceutical for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04504-3>