

RADIOFARMAKI V TERANOSTIKI

THERANOSTIC RADIOPHARMACEUTICALS

AVTORJI / AUTHORS:

doc. dr. Petra Kolenc, mag. farm., spec.^{1,2}

asist. dr. Doroteja Novak, mag. farm.^{1,2}

asist. dr. Marko Krošelj, mag. farm., spec.^{1,2}

¹ Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Klinika za nuklearno medicino,
Zaloška 7, 1000 Ljubljana

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: petra.kolenc@kclj.si

1 RADIOFARMAKI

Radiofarmaki so radioaktivna zdravila. Poenostavljeno lahko rečemo, da so sestavljeni iz dveh delov. Prvi del predstavlja vektorski del oz. ligand, ki je odgovoren za vezavo radiofarmaka na specifično makromolekulsko tarčo, npr. receptor na membrani tumorske celice. Drugi del radiofarmaka predstavlja radioaktivna komponenta – radionuklid (radioaktivni izotop). Vektorski del v principu služi kot transportni sistem za dostavo radionuklida na tarčno mesto. Množina vektorja je tipično v subterapevtskem območju, farmakološki učinek pa je praviloma posledica delovanja radioaktivne komponente. Glede na namen uporabe oz. tip sevanja delimo radiofarmake na **radiodiagnostike**, ki jih uporabljamo pri opredeljevanju bolezni, in **radioterapevtike**, ki jih uporabljamo v procesu zdravljenja (slika 1). Vektorski del molekule lahko predstavlja majhna organska ali anorganska molekula, peptid, protein, vključno s proti-

POVZETEK

Radiofarmaki so radioaktivna zdravila, ki jih glede na namen uporabe oz. tip sevanja delimo na radiodiagnostike, ki jih uporabljamo pri opredeljevanju bolezni, in radioterapevtike, za uporabo v procesu zdravljenja. Izraz teranostika izhaja iz združitve besed »terapija« in »diagnostika«. Na področju nuklearne medicine koncept teranostike implementiramo s povezovanjem slikovne diagnostike in ciljanega radionuklidnega zdravljenja. V prispevku se bomo seznanili s primeri povečane izraženosti molekularnih tarč na tumorskih celicah in radiofarmaki, ki se selektivno vežejo nanje. Kot primere predstavljamo uveljavljene teranostične pare radiofarmakov, ki jih uporabljamo pri obravnavi bolnikov z raki, ki imajo na površini celic izražene somatostatinske receptorje ali prostatični specifični membranski antigen. Pogledali si bomo primer transla- cijske raziskave razvoja potencialnih radiofarmakov, ki se selektivno vežejo na holecistokinin-2/gastrinski receptor. V zadnjem delu se bomo seznanili še s primerom z aktualnega področja, kjer je tarča za eventualno vezavo radiofarmaka, prisotna v tumorskem mikrookolju in ne na sami rakavi celici, tj. fibroblaste aktivirajoči protein.

KLJUČNE BESEDE:

ciljano radionuklidno zdravljenje, nuklearna medicina, radioaktivnost, radiofarmaki, teranostika

ABSTRACT

Radiopharmaceuticals are radioactive drugs that, based on their intended use or type of radiation, are categorized into radiodiagnostics, used in disease identification, and radiotherapeutics, employed in the treatment process. The term "theranostics" stems from the combination of the words "therapy" and "diagnostics." In the field of nuclear medicine, the concept of theranostics is implemented by integrating molecular imaging technique and targeted radionuclide therapy. In the present work, we describe examples of overexpression of molecular targets on tumour cells and radiopharmaceuticals that selectively target them. We present established theranostic pairs of radiopharmaceuticals used in the treatment of patients with tumours expressing somatostatin receptors or prostate-specific membrane



antigen on cell surfaces. In the following we present a translational study employing potential radiopharmaceuticals that selectively target the cholecystokinin-2/gastrin receptor. In the final part, we will shift from molecular targets overexpressed on cell surface to the target expressed in the tumour microenvironment, namely fibroblast-activating protein.

KEY WORDS:

nuclear medicine, radioactivity, radiopharmaceuticals, targeted radionuclide therapy, theranostic

telesi in fragmenti protiteles, ali nanodelci. Radionuklid je nanj vezan kovalentno, če gre za radioaktivne nekovine (npr. fluor-18 (^{18}F), jod-123 (^{123}I)), v primeru radioaktivnih izotopov kovinskih elementov (npr. indij-111 (^{111}In), galij-68 (^{68}Ga) ali tehneций-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)) pa vektorsko molekulo ustrezno modificiramo z dodatkom bifunkcionalnega kelatorja oz. BFC (*bifunctional chelator*), ki ga kovalentno vezemo na vektorsko molekulo. V zadnjem koraku priprave radiofarmaka – v procesu radiooznačevanja – pa BFC veže radioaktivni izotop (slika 2, zgoraj levo).

1.1 RADIONUKLIDI

Radioaktivni razpad je proces, pri katerem pride z oddajanjem delcev in/ali fotonov do transformiranja nestabilnega jedra v stabilnejše jedro. V samem procesu razpada prihaja do sproščanja energije. V osnovi je radioaktivni razpad jedrski (nuklearni) proces, ki ga povzroča nestabilnost jedra. Pri prehodu sevanja (v obliki delcev ali elektromagnetnega valovanja) skozi snov prihaja do prenosa energije. Osnovna mehanizma prenosa energije sta ionizacija in vzbujanje atomov ter molekul v snovi. Večina energije se v končni fazi pretvori v toploto. Ker pa ima ionizacijski efekt ostale pomembne posledice, imenujemo sevanje, ki se sprošča pri radioaktivnem razpadu, ionizirajoče sevanje.

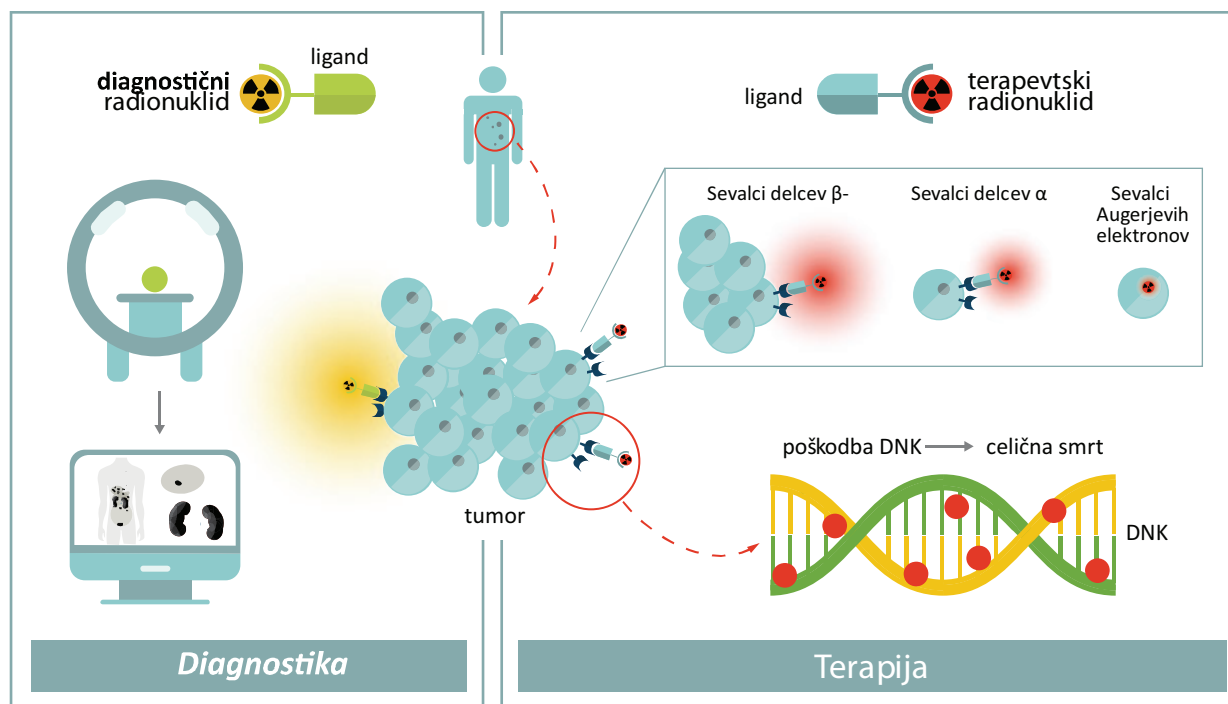
Namen uporabe **diagnostičnih radionuklidov** je slikovni prikaz porazdelitve radioaktivnosti v telesu, do katere pride po aplikaciji radiofarmaka. Sevanje zaznavamo zunaj telesa, zato za diagnostične namene uporabljamo radionuklide, ki pri radioaktivnem razpadu izsevajo prodorne žarke gama, ali pa ti nastanejo v sekundarnem procesu po razpadu jedra (slika 1, levo). Takšna razpada sta razpad gama in razpad β^+ , pri katerem se v prvi stopnji izseva pozitron. Takšen pozitron tvori skupaj z elektronom pozitronij, ki ima življenjsko dobo nekaj milisekund, nato pa anihilira, pri če-

mer se pod kotom 180° izsevata dva fotona z energijo 511 keV. Vrsta radioaktivnega razpada diagnostičnega radionuklida določa tudi način zaznavanja in prikaza porazdelitve radioaktivnosti v telesu. Radiofarmake, označene s sevalci žarkov gama, uporabljamo pri enofotonski izsevni tomografiji oz. SPECT (*single photon emission computed tomography*). Zaznavanje sevanja β^+ pa temelji na hkratnem zaznavanju obeh žarkov gama, ki nastaneta pri anihilaciji in ju zaznamo z obročem detektorjev v snemalniku pozitronske izsevne tomografije oz. PET (*positron emission tomography*).

Radionuklide, namenjene zdravljenju, delimo v tri skupine: i) sevalci delcev β^- , ki so elektroni, izsevani iz jedra, ii) sevalci delcev α , ki sestojijo iz dveh nevtronov in dveh protonov, in iii) sevalci Augerjevih elektronov (sekundarni elektron). Njihova uporaba temelji na bioloških učinkih, ki so posledica velikega števila ionizacij, ki jih na svoji poti povzročijo izsevani delci. Visoka gostota poškodb v molekulah, ki so kritične za celično preživetje, vodi v celično okvaro in/ali smrt celice. Predvsem kritične so enojne ali dvojne prekinitve vijačnice DNK, ki so lahko posledica neposrednega učinka na nukleinske kisline ali pa gre za posredne učinke sevanja zaradi tvorbe radikalov, npr. hidroksilnega radikala (OH^\bullet) ob interakciji z molekulami vode, ki nadalje reagirajo z DNK. Ključna je torej uporaba radionuklidov, ki pri radioaktivnem razpadu izsevajo delce z visokim linearnim prenosom energije (LET, *linear energy transfer*),

ALI STE VEDELI?

- Izraz »teranostika« združuje »terapijo« in »diagnostiko«, kar v nuklearni medicini predstavlja revolucionaren pristop, ki omogoča hkratno diagnostiko in zdravljenje rakavih bolezni.
- Translacijske raziskave so raziskovalni pristopi, ki pretvarjajo znanstvena spoznanja, pridobljena na predkliničnem nivoju, v nove metode za preprečevanje, diagnozo in zdravljenje bolezni. Cilj translacijskih raziskav je torej »prevesti« osnovne znanstvene raziskave v konkretne, uporabne zdravstvene rešitve za paciente.
- Fibroblaste aktivirajoči protein (FAP), ki se prekomerno izraža pri več kot 90 % epitelijskih tumorjev, kot so rak dojke, debelega črevesa in trebušne slinavke, je ključna tarča za slikovno diagnostiko in ciljno terapijo raka. Zaradi omejene izraženosti FAP v normalnih tkivih je bil prepoznan kot »pan-tumorska« tarča za molekularno slikanje in ciljno terapijo raka.



Slika 1: Glede na izbrani radionuklid uporabljamo radiofarmak za diagnostične (uporaba sevalcev žarkov gama in delcev β^+) ali terapevtske namene (uporaba sevalcev delcev β^- , delcev α ali Augerjevih elektronov). Prodorno sevanje diagnostičnih radionuklidov v končni fazi zaznavamo zunaj telesa z uporabo različnih nuklearno-medicinskih modalitet (levo), kot sta enofotonska izsevna tomografija (SPECT, single photon emission computed tomography) ali pozitronska izsevna tomografija (PET, positron emission tomography). Učinek radioterapevtikov temelji na neposrednih ali posrednih učinkih ionizirajočega sevanja, ki povzroča nepopravljive poškodbe DNK v tumorskih celicah, kar lahko v končni fazi privede do celične smrti. Gostota poškodb in njihov doseg pa sta neposredno povezana z naravo in energijo sevanja, pri čemer imajo sevalci delcev β^- najdaljši, Augerjevi elektroni pa najkrajši doseg.

Figure 1: Depending on the radionuclide radiopharmaceuticals can be used either for diagnostic (use of gamma and β^+ emitters) or therapeutic purposes (use of β^- , α -particle, or Auger electron emitters). Penetrating radiation of diagnostic radionuclides is in the final stage detected outside the body using various nuclear medicine modalities (left), e.g. SPECT (single photon emission computed tomography) or PET (positron emission tomography). On the other hand, the effect of radiotherapeutics is based on the direct or indirect effects of ionizing radiation, which causes irreversible DNA damage in tumor cells, that can ultimately lead to cell death. The extent of damage and its range are directly related to the nature and energy of the radiation, with β^- particle emitters having the longest and Auger electrons the shortest range.

ki zagotavljajo lokalno omejeno delovanje v obolelem organu ali tumorju ter v čim manjšem obsegu poškodujejo netačna tkiva (slika 1, desno).

V preglednici 1 so navedeni najpogostejši radionuklidi, ki jih kot radioaktivno komponento uporabimo bodisi pri radiofarmakih za diagnostiko bodisi pri radiofarmakih, ki jih uporabljamo pri zdravljenju.

1.2 RADIOFARMAKI V DIAGNOSTIKI

Radiofarmake v več kot 95 % uporabljamo v diagnostične namene. Za pripravo **radiodiagnostikov** so zaradi visoke prodornosti in majhne obremenitve z radioaktivnim seva-

njem za preiskovanja primerni sevalci žarkov gama in pozitronski sevalci. Po aplikaciji radiodiagnostika se le-ta porazdeli po telesu. Fotone, ki pridejo iz preiskovančevega telesa, zaznavamo z ustreznimi detektorskimi sistemi, SPECT in PET, kot opisano zgoraj in prikazano na sliki 1. V diagnostične namene uporabljamo različne radioaktivne izotope. V klasični nuklearno-medicinski diagnostiki je daleč najpogosteje uporabljen izotop tehnečij-99m (^{99m}Tc). ^{99m}Tc pridobimo iz molibden-99 (^{99}Mo)/ ^{99m}Tc radionuklidnega generatorja. Takšen generator imamo ves čas na voljo v radiofarmaceutski lekarni, tako da je ^{99m}Tc ves čas dostopen in priprava radiofarmakov, označenih s ^{99m}Tc , lahko poteka praktično kadarkoli. Razpadni razpolovni čas ^{99m}Tc je 6 ur,



Preglednica 1: Primeri radionuklidov, ki jih v nuklearni medicini najpogosteje uporabljamo za namene diagnostike ali terapevtske namene oz. zdravljenje.

Table 1: Examples of radionuclides most commonly used in nuclear medicine for diagnostic or therapeutic purposes.

	Radionuklid	$t_{1/2}$	Tip sevanja	Pridobivanje
Diagnostika	jod-123 (^{123}I)	13,2 h	γ	ciklotron
	fluor-18 (^{18}F)	110 min	β^+ (97 %)	ciklotron
	tehnecij-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)	6,0 h	γ	generator
	indij-111 (^{111}In)	67,9 h	γ	ciklotron
	galij-68 (^{68}Ga)	67,6 min	β^+ (89 %)	generator
Terapija	jod-131 (^{131}I)	8 dni	β^-	fisija
	lutecij-177 (^{177}Lu)	6,71 dni	β^-	reaktor
	itrij-90 (^{90}Y)	64,0 h	β^-	generator
	astat-211 (^{211}At)	7,2 h	α	ciklotron

kar nam omogoča enostavno pripravo radiofarmaka, izvedbo kontrole kakovosti, aplikacijo radiofarmaka preiskovancu in zajem podatkov za slikovno preiskavo ter hkrati nizko sevalno obremenitev.

Po drugi strani pozitronske sevalce najpogosteje pridobivamo v ciklotronih, tako da proizvodnja radiofarmakov, označenih z različnimi pozitronskimi sevalci, kot so fluor-18 (^{18}F), ogljik-11 (^{11}C), dušik-13 (^{13}N), in kisik-15 (^{15}O) poteka v PET centrih v neposredni bližini ciklotrona. Izjema je galij-68 (^{68}Ga), ki ga podobno kot $^{99\text{m}}\text{Tc}$, pridobimo iz radionuklidnega germanij-68 (^{68}Ge)/ ^{68}Ga generatorja, kar nam omogoča pripravo radiofarmakov označenih z ^{68}Ga v okviru radiofarmaceutске lekarnе. Kot radioaktivno komponento radiofarmakov za PET diagnostiko sicer največ uporabljamo ^{18}F (razpolovni čas 108 min), saj imajo ^{11}C , ^{13}N in ^{15}O prekratko razpolovno dobo (20 min, 10 min in 3 min), da bi bili primerni za uporabo na nuklearno-medicinskih oddelkih, kjer nimajo/mo lastnega ciklotrona in PET centra.

1.3 RADIOFARMAKI V TERAPIJI

Radiofarmake za uporabo v terapiji imenujemo radioterapevtiki. V ta namen uporabljamo predvsem sevalce delcev β^- . V dnevni klinični praksi kot radioaktivno komponento radioterapevtikov najpogosteje uporabljamo jod-131 (^{131}I), lutecij-177 (^{177}Lu) in itrij-90 (^{90}Y). V zadnjih letih poteka veliko predkliničnih in kliničnih raziskav z radiofarmaki, označenimi s sevalci delcev alfa, npr. astatom-211 (^{211}At) in aktinijem-225 (^{225}Ac).

Zaradi visoke gostote poškodb (visokega LET-a) je pri slednjih pomembna dobra opredelitev ne samo kopičenja ra-

dioaktivnosti v tarčnem tkivu ampak tudi porazdelitev radioaktivnosti v netarčnih področjih. Tako poleg systemske, intravenske aplikacije, uporabljamo tudi principe lokalne in lokoregionalne aplikacije radiofarmakov.

Najpogosteje uporabljan radioterapevtik je [^{131}I]-natrijev jodid, ki se aktivno kopiči v celicah ščitnice. Zdravljenje z [^{131}I]-natrijevim jodidom je bilo prvič izvedeno že v 40-ih letih prejšnjega stoletja, ko je Saul Hertz na ta način zdravil hipertiroidizem, kasneje pa tudi rak ščitnice. To je bilo tudi prvo radioaktivno zdravilo, ki je s strani FDA prejelo dovoljenje za promet (1).

2 TERANOSTIKA V NUKLEARNI MEDICINI

Teranostika se nanaša na področje medicine, ki združuje terapevtske in diagnostične tehnike. Izraz izhaja iz združitve besed »terapija« in »diagnostika«. Glavni cilj teranostike je razvijanje personaliziranih in usmerjenih pristopov k zdravljenju z integracijo diagnostičnih orodij s terapevtskimi posegi. Termin teranostika je sicer prvi uporabil John Funkhouser leta 1998 (2), vendar sami principi teranostike segajo v čas uvedbe diagnostike in terapije z ^{131}I (glej zgoraj).

Pri teranostiki diagnostične metode uporabljamo za oceno individualnih značilnosti pacientovega stanja, kot je npr. prisotnost specifičnih makromolekularnih tarč na celicah tumorja. Te informacije nato izkoristimo za oblikovanje personalizirane strategije zdravljenja. Ideja je optimizirati učinkovitost



zdravljenja, hkrati pa zmanjšati neželene učinke s prilagajanjem terapije na osnovi značilnosti posameznega pacienta. Eno izmed osrednjih vlog pri takšnem načinu obravnave pacienta ima tudi nuklearna medicina, ki je personalizirano medicino implementirala s povezovanjem slikovne diagnostike (SPECT in PET) in ciljanega radionuklidnega zdravljenja. Ta v splošnem vključuje diagnostične metode, namenjene sprva napovedi odziva posameznika na terapijo, nato pa tudi oceni učinkovitosti zdravljenja. V ožjem smislu koncept teranostike v nuklearni medicini, t. i. radioteranostika, zajema uporabo iste ali zelo podobne vektorske molekule tako za diagnostiko kot tudi terapijo ter tako omogoča, da pred ciljanim radionuklidnim zdravljenjem natančno opredelimo mesto delovanja terapevtskega radionuklida ter prejet odmerok sevanja v tumorskem tkivu in tudi netarčnih tkivih in organih. V idealnem primeru se radiofarmaka za diagnostiko in terapijo razlikujeta zgolj po radioaktivni komponenti. Za radiooznačevanje lahko uporabimo radioaktivne

izotope istega kemijskega elementa (npr. jod-123 ali jod-124 (^{123,124}I)/jod-131 (¹³¹I)), ali pa uporabimo tako imenovane teranostične pare radionuklidov, kot so galij-68 (⁶⁸Ga)/lutecij-177 (¹⁷⁷Lu), galij-68 (⁶⁸Ga)/itrij-90 (⁹⁰Y) ali indij-111 (¹¹¹In)/lutecij-177 (¹⁷⁷Lu), ki zaradi podobnih kemijskih lastnosti minimalno spreminjajo strukturo uporabljene bifunkcionalnega kelatorja in posledično biološke lastnosti celotne molekule (3–5).

Med najuspešnejše primere uporabe teranostičnega koncepta v nuklearni medicini spadata scintigrafija peptidnih receptorjev in peptidno-receptorska radionuklidna terapija (PRRT) za diagnostiko in zdravljenje nevroendokrinih tumorjev v poznih 80. letih in zgodnjih 90. letih 20. stoletja. Osnova takšnega principa je povečano izražanje molekularne tarče na rakavih celicah in hkrati minimalno izražanje na zdravih celicah. V optimalnem primeru je takšna tarča enostavno dostopna na celični membrani oz. ima zunajcelično enoto. Med takšne molekularne tarče spadajo npr.

Preglednica 2: Izbrani primeri tarčnih tumorskih proteinov – receptorskih sistemov (SSTR 1–5, CCK₂R in PSMA) ali proteinov, izraženih v tumorskem mikrookolju (FAP), skupaj s spojino vodnico, izraženo pri najpogostejših rakavih obolenjih in pripadajočim primerom teranostičnim parom radiofarmakov (8–10).

Table 2: Selected examples of target tumor proteins – receptor systems (SSTR 1–5, CCK₂R and PSMA) or proteins expressed in the tumor microenvironment (FAP), together with the lead compound, expression in the most common cancers and the example of corresponding theranostic pair of radiopharmaceuticals (8–10).

Tarča	Spojina vodnica	Tumorji (incidenca)	Teranostični par
SSTR 1–5 (<i>somatostatin receptors</i>) Somatostatinski receptorji podtipov 1–5	somatostatin-14	nevroendokrini tumorji (NET), gastroenteropankreatični tumorji (> 50 %), ne-Hodgkingov limfom, paragangliom (85 %), melanom (83 %), drobnocelični rak pljuč (71 %) ^a	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTATATE/[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTATATE
PSMA (<i>prostate-specific membrane antigen</i>) Prostatični specifični membranski antigen	spojine z motivom glutamat-sečninilizin	rak prostate (>80 %)	[⁶⁸ Ga]Ga-PSMA11/[¹⁷⁷ Lu]Lu-PSMA I&T
CCK₂R (<i>cholecystokinin/gastrin-2 receptor</i>) Receptor za holecistokinin 2	CCK/(mini)gastrin	medularni karcinom ščitnice (92 %), drobnocelični rak pljuč (57 oz. 89 %), astrocitom (65 %), stromalni rak jajčnikov (100 %)	[¹¹¹ In]In-CP04/[¹⁷⁷ Lu]Lu-PP-F11N
FAP (<i>fibroblast activation protein</i>) Fibroblaste aktivirajoči protein	zaviralci FAP z N-(4-kinolinoil)-Gly-(2-cianopirolidin)skim ogrodjem	karcinomi (> 90 %): rak dojke, kolorektalni rak, rak pankreasa, rak pljuč, rak mehurja, rak jajčnikov	[⁶⁸ Ga]-FAPI-04/[⁹⁰ Y]-FAPI-46

^a Incidenca se nanaša na izraženo podtipa 2 (SSTR₂R)

antigenski transmembranski glikoproteini in receptorji, ki so izraženi na celični površini (6). V zadnjih dveh desetletjih se je naše razumevanje biologije raka znatno izboljšalo, tako da pristopamo k zdravljenju raka kot k izrazito heterogeni patologiji, z intra- in inter-tumorskimi razlikami. Dojemanje raka se je torej spremenilo iz celično osredotočenega pogleda, kjer so tumorji sestavljeni le iz malignih celic, v bolj celovit, tkivno usmerjen pogled, ki vključuje tudi celice strome in sestavo zunajceličnega matriksa, ki predstavlja več kot 90 % mase tumorja in tvori t. i. tumorsko mikrookolje (TME) (7). V nadaljevanju prispevka se bomo seznanili s tremi primeri izražanja tarč na tumorskih celicah – somatostatinski receptor (SSTR), prostatični specifični membranski antigen (PSMA) in receptor za holecistokinin-2 (CCK₂R), dotaknili pa se bomo tudi zelo aktualnega področja, ki počasi prehaja v klinično okolje, kjer pa je tarča vezana na TME in ne na samo rakavo celico, tj. fibroblaste aktivirajoči protein (FAP) (preglednica 2).

2.1 SOMATOSTATINSKI RECEPTOR (SSTR)

Somatostatin (SSA) je regulatorni peptidni hormon neuroendokrinega sistema z obsežno vlogo pri regulaciji različnih fizioloških procesov, kot so izločanje hormonov, proliferacija in rast celic. Svoje učinke poseduje preko vezave in aktivacije 5 različnih tipov somatostatinskih receptorjev (SSTR) (SSTR 1–5), ki se sicer fiziološko izražajo na celicah neuroendokrinega sistema, pogosto pa so (prekomerno) izraženi tudi na celicah neuroendokrinih tumorjev (NEN), adenoma hipofize in nekaterih drugih rakih, npr. hepatocelularni karcinom, limfomi, drobnocelični rak pljuč itd. (preglednica 2, slika 3). Četudi gre za heterogeno skupino rakavih obolenj, prav izražanje SSTR predstavlja dobro osnovo za razvoj radiooznačenih analogov SSA, ki se specifično vežejo na te receptorje, kar lahko izkoristimo tako pri diagnozi kot tudi v terapiji teh tumorjev (11, 12).

V farmakološkem zdravljenju lokalno napredovale ali metastatske bolezni tako uporabljamo dolgodelujoče analoge SSA, kot sta denimo oktreotid in lanreotid, ki zavreta rast tumorjev in omilita simptome, pomembno vlogo pri obravnavi bolnikov z gastroenteropankreatičnimi NEN pa predstavljajo tudi radioaktivno označeni analogi SSA. Z indijem-111 (¹¹¹In) radiooznačen oktreotid (¹¹¹In-pentetreotid) je bil prvi registriran diagnostični radiofarmak za planarno scintigrafijo ali SPECT/CT SSTR, ki pa mu je zaradi slabih sevalnih lastnosti indija-111 (¹¹¹In) in posledično suboptimalnih kakovosti slik, omejene dostopnosti in relativno visokih učinkovitih doz, sledil razvoj s tehnecijem-99m (^{99m}Tc) označenih analogov, npr.

[^{99m}Tc]Tc-EDDA/HYNIC-TOC (^{99m}Tc-etilendiamin-N,N'-diacetna kislina/hidrazinonikotinamid-Tyr³-oktreotid). Razvoj makrocikličnih kelatorskih sistemov, ki tvorijo stabilne komplekse z mnogimi kovinskimi ioni v oksidacijskem stanju +2 ali +3, kot je denimo DOTA (1,4,7,10-tetraazaciklododekan-1,4,7,10-tetraacetna kislina), je nadalje omogočil radiooznačevanje analogov SSA s sevalci PET in posledično izvedbo PET/CT, ki trenutno predstavlja funkcijsko molekularno slikovno modaliteto izbire v diagnostiki NEN. V klinični uporabi trenutno prevladujejo z galijem-68 označeni analogi SSA [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Tyr³-oktreotid [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Tyr³-oktreotid ([⁶⁸Ga]Ga-DOTATOC), [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-Tyr³-oktreotid ([⁶⁸Ga]Ga-DOTATATE) (slika 2) in [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-1-Nal³-oktreotid ([⁶⁸Ga]Ga-DOTANOC) (11–14).

Z uvedbo ¹¹¹In-pentetreotida se je začel tudi hkraten razvoj terapevtskih radiooznačenih analogov SSA, ki je temeljil na visokem privzemu in zadrževanju v tumorskih tkivih in celicah. Že uporaba indija-111 (¹¹¹In) – sevalca Augerjevih elektronov – je imela spodbudne učinke na omilitev kliničnih simptomov, izločanje hormonov in velikost tumorjev, a je bil omejujoč dejavnik pri doseganju izboljšanih kliničnih rezultatov omejen doseg Augerjevih elektronov. Druga generacija terapevtskih analogov SSA je tako temeljila na ⁹⁰Y ([⁹⁰Y]Y-DOTA-Tyr³-Oktreotid ([⁹⁰Y]Y-DOTATOC)), sevalcu delcev β⁻, ki zaradi večjega dosega posredno in neposredno poškodujejo tarčne celične organele, predvsem jedro in jedro DNK. Zaradi potencialne nefrotoksičnosti pri uporabi z ⁹⁰Y označenih analogov SSA, je bila tretja generacija razvita na osnovi ¹⁷⁷Lu, ki izkazuje ugodnejše sevalne lastnosti – predvsem nekoliko nižjo energijo delcev β⁻ in delež sevanja žarkov gama, ki omogoča simultano izvedbo dozimetrije. [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTATATE (slika 2) pripravljamo kot magistrarno zdravilo v radiofarmaceutki lekarni, na trg pa prihaja registrirano zdravilo, namenjeno za uporabo pri visoko diferenciranih, neoperabilnih ali metastatskih, napredovalih NET (15, 16).

Trenuten razvoj radiooznačenih spojin, ki se specifično vežejo na SSTR, je sicer usmerjen v področje antagonistov SSTR. Prehod z analogov SSA na antagoniste SSTR je osnovan na opažanju, da imajo antagonisti SSTR na voljo več vezavnih mest na receptorju, kar ima za posledico večji privzem v tumor. Trenutno najobetavnejši teranostični par antagonistov SSTR v razvoju je [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA-JR11/[¹⁷⁷Lu]Lu-NODAGA-JR11 (17).

2.2 PROSTATIČNI SPECIFIČNI MEMBRANSKI ANTIGEN (PSMA)

Rak prostate je najpogostejši rak pri moških v Evropi in tudi v Sloveniji (preglednica 2, slika 3). V Sloveniji je bilo

leta 2020 na novo odkritih 1.460 bolnikov z rakom prostate. Za leto 2020 je bila ocenjena povprečna starostno standardizirana incidenčna stopnja v Evropi 103 zboleli na 100.000 prebivalcev. Rak prostate spada med bolezni z dobrim preživetjem, pri čemer je najpomembnejši prognostični dejavnik stadij ob odkritju bolezni. Petletno čisto preživetje bolnikov z omejenim stadijem je več kot 95 %, pri tistih z razsejano boleznijo pa komaj 29 % (18).

V zadnjih letih v klinični obravnavi raka prostate vse bolj v ospredje vstopajo možnosti, ki jih ponuja nuklearna medicina, tako pri slikovni diagnostiki kot ciljanem radionuklidnem zdravljenju. Pri tem pristopu uporabljamo radiofarmake, ki se vežejo na prostatični specifični membranski antigen (PSMA). PSMA je antigenski transmembranski glikoprotein z veliko zunajcelično komponento. Zaradi prekomerne izraženosti na celicah raka prostate ter relativno nizke izraženosti v netarčnih tkivih, je PSMA ustrezna tarča za radiofarmake. Večina danes najpogosteje uporabljenih radiofarmakov, npr. ^{68}Ga]Ga-PSMA-11 (slika 2), v klinični obravnavi raka prostate so derivati sečnine, ki jih lahko radiooznačimo bodisi s sevalci žarkov gama ali β^+ za slikovno diagnostiko (^{68}Ga , ^{18}F ter $^{99\text{m}}\text{Tc}$) ali s sevalci delcev β^- (^{177}Lu , ^{90}Y) oz. sevalci delcev alfa (^{225}Ac , ^{213}At) za ciljano radionuklidno zdravljenje. Dva najpogosteje uporabljana radiofarmaka za ciljano radionuklidno terapijo bolnikov z rakom prostate sta ^{177}Lu]Lu-PSMA-I&T (slika 2) ter ^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (19).

^{177}Lu]Lu-PSMA-I&T (slika 2) v Sloveniji v klinični praksi pripravljamo kot magistralno zdravilo v radiofarmacevtski lekarni, ^{177}Lu]Lu-PSMA-617 pa ima dovoljenje za promet z zdravilom ter bo dostopno na tržišču.

2.3 HOLECISTOKININ-2/GASTRINSKI RECEPTOR (CCK₂/GASTRINSKI RECEPTOR)

Kot naslednji primer tarčnega sistema, ki se izraža na sami celici, si pogledjmo sistem, kjer kot tarčo ponovno definiramo s proteinom G sklopljeni receptor, in sicer holecistokinin-2/gastrinski receptor (CCK₂R). CCK₂R izkazuje visoko izražanje in incidenco pri različnih rakih, vključno z medularnim rakom ščitnice (preglednica 2, slika 3).

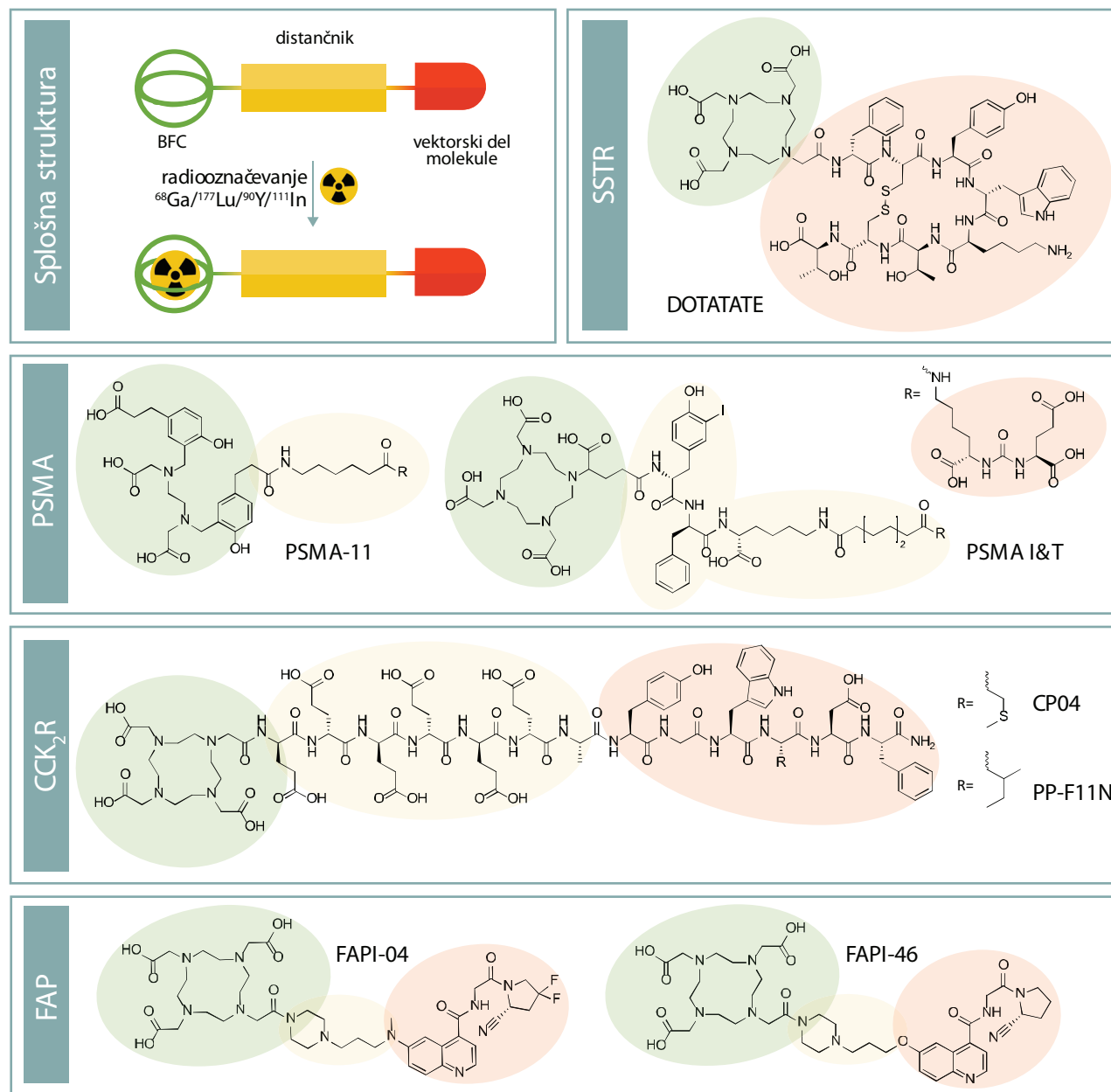
Radiofarmaki za ta tarčni sistem (še) niso na voljo v redni klinični praksi. Smo pa kot del raziskovalnega konzorcija povečano izražanje receptorjev izkoristili v okviru translacijske raziskave, kjer smo za selektivno ciljanje tarče/receptorja v okviru t. i. COST akcije Targeted Radionuclide Therapy (ciljana radionuklidna terapija), zasnovali razvoj novih, iz-

boljšanih analogov (mini)gastrina. V primerjalni raziskavi, kjer smo sodelovali različnih evropski laboratoriji, smo na osnovi predkliničnih *in vitro* ter *in vivo* testiranja izbrali najprimernejšo spojino, kandidatko za nadaljnji razvoj in translacijo v kliniko. Predklinična testiranja so v prvi fazi zajemala *in vitro* preverjanja jakosti vezave, obsega internalizacije v izbranih celičnih linijah AR4-2J in/ali A431-CCK₂R ter raziskavo *in vivo* optimalne biodistribucije na živalskem modelu miši BALB/c s subkutanim tumorjem, induciranim z inokulacijo celične linije A431-CCK₂R. Na osnovi rezultatov testiranja smo kot najobetavnejši analog minigastrina izbrali radiopeptid [^{111}In]In-CP04 (CP04 = PP-F11 = DOTA-(DGLu)₆-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) (slika 2). V nadaljevanju smo v okviru projekta »Prva faza klinične študije z uporabo **novega radiooznačenega peptida za lociranje CCK₂/gastrinskih receptorjev z namenom individualne diagnostike in terapije pri bolnikih s progresivnim ali metastatskim medularnim karcinomom ščitnice**« z izbranim radiopeptidom izvedli razširjeno raziskavo biodistribucije za namen ocene dozimetrije. S samo nosilno molekulo (CP04) smo v skladu s smernicami ICH M3 (R2) začrtali raziskavo toksičnosti na podganah. Na osnovi dobljenih rezultatov (NOAEL, *no observed adverse effect level*) in dozimetrične ocene smo zasnovali in razvili ustrezno formulacijo, primerno za uporabo v klinični raziskavi (20, 21). Rezultati vseh predkliničnih testiranja, vključno s podatki, vezanimi na razvoj formulacije, so nam služili za pripravo dosega o zdravilu (IMPD). Ključni dokumenti, kot so klinični protokol, IMPD, pozitivna ocena etičnosti raziskave posameznih držav, članic konzorcija, obrazec pisne privolitve preizkušanca in nekatere drugi, so nam omogočili prijavo klinične raziskave na posamezne nacionalne agencije za zdravila, pod skupno EudraCT številko 2015-000805-38 (22). Po odobritvi raziskave in iniciaciji posameznih kliničnih centrov, smo akademsko klinično raziskavo faze I izvedli na Poljskem, v Avstriji, na Nizozemskem in v Sloveniji in tako prispevali k razvoju področja nuklearno-medicinske teranostike (23). Trenutno poteka klinično preskušanje z naraščajočimi odmerki radioaktivnosti [^{177}Lu]Lu-PP-F11N (pod imenom Lumed), kjer ugotavljajo varnost in učinkovitost radionuklidnega zdravljenja z izbranim analogom minigastrina (24)

2.4 FIBROBLASTE AKTIVIRAJOČI PROTEIN (FAP)

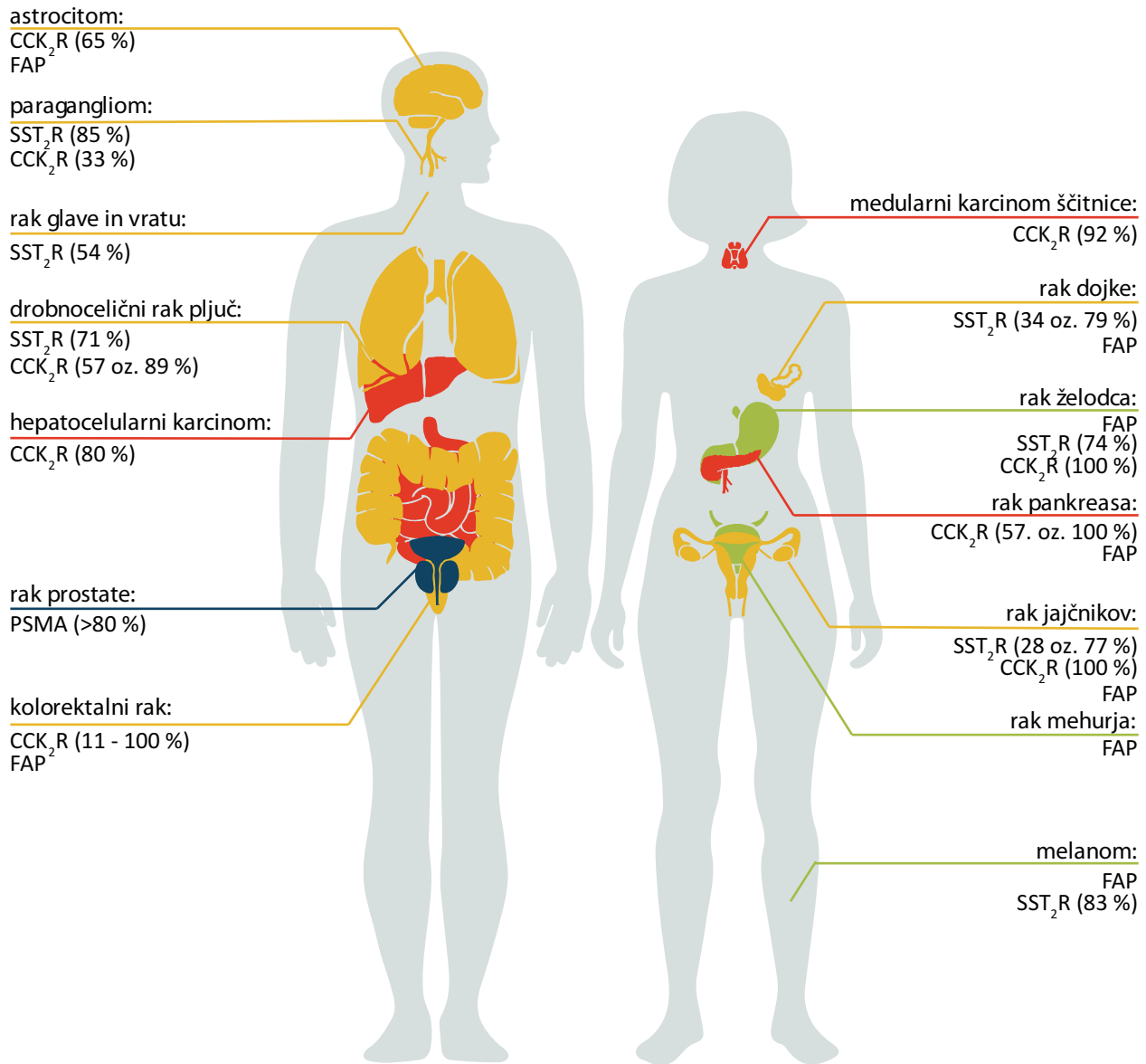
Kot zadnji primer si pogledjmo tarčo, katere izraženost ni vezana na rakavo celico, ampak na tumorsko mikrookolje. Fibroblasti se v zdravem tkivu nahajajo po celotnem telesu in so na splošno biološko neaktivni. Aktivirajo se pri celjenju





Slika 2: Shematski prikaz klasične strukture radiofarmaka in procesa radiooznačevanja (zgoraj, levo), ki navadno predstavlja zadnjo stopnjo v pripravi radiofarmakov. Na sliki so predstavljene strukturne formule neoznačenih molekul teranostičnih parov za izbrane tumorske tarče (somatostatinski receptor (SSTR), prostatični specifični membranski antigen (PSMA), holecistokinin-2/gastrinski receptor (CCK_{2R}) in fibroblaste aktivirajoči protein (FAP)). Kot prikazano skrajno levo zgoraj, v procesu radiooznačevanja spojine označimo z ustreznimi radionuklidi: galijem-68 (⁶⁸Ga), indijem-111 (¹¹¹In), lutecijem-177 (¹⁷⁷Lu) ali itrijem-90 (⁹⁰Y).

Figure 2: Schematic representation of the typical structure of a radiopharmaceutical and the radiolabeling process (above, left), which usually represents the last step in the preparation of radiopharmaceuticals. The figure shows the structural formulas of unlabeled molecules of the theranostic pairs for the selected tumor targets (somatostatin receptor (SSTR), prostate-specific membrane antigen (PSMA), cholecystokinin-2/gastrin receptor (CCK_{2R}) and fibroblast-activating protein (FAP)). As shown in the top left, in the radiolabeling process, the compound is labeled with the appropriate radionuclides: gallium-68 (⁶⁸Ga), indium-111 (¹¹¹In), lutetium-177 (¹⁷⁷Lu) or yttrium-90 (⁹⁰Y).



Slika 3: Shematski prikaz prisotnosti opisanih tarčnih proteinov pri posameznih tumorjih . Za opisane receptorske sisteme – somatostatinski receptor (SST₂R), prostatični specifični membranski antigen (PSMA) in receptor za holecistokinin-2 (CCK₂R) je podana tudi pogostost izražanja oz. izraženosti tarče (8–10).

Figure 3: Schematic representation of the presence of the described target proteins in different tumors. The incidence of expression is also given for the described receptor systems (SST₂R, PSMA and CCK₂R) (8–10).

ran, vnetjih in tkivni fibrozi. Aktivirani fibroblasti izločajo izvenocelični matriks (kolagenska, retikulinska in elastična vlakna ter proteoglikane) in spodbujajo celično proliferacijo. Prav tako pa se fibroblasti aktivirajo pri kancerogenezi, saj rast tumorskih celic predstavlja »ponavljajočo« poškodbo tkiva. Ti, s tumorskimi celicami povezani aktivirani fibroblasti, so poznani tudi pod kratico CAF (*cancer-associated fibroblast*) in so najpogostejše celice tumorskega mikrookolja pri zelo različnih vrstah tumorjev (preglednica 2, slika 3). Prav njihova številčnost v primerjavi z normalnim tkivom je z vidika razvoja novih radiofarmakov zelo zanimiva (8).

Fibroblaste aktivirajoči protein (FAP oz. FAP alfa) je serinska proteaza, ki se nahaja na membrani CAF. Je ena trenutno

najbolj zanimivih tarč za razvoj novih učinkovin, saj je povišano izražena pri 90 % vseh človeških vrstah rakov (npr. rak jajčnikov, dojk, pankreasa, kolorektalnem itd.). Uporabnost zaviralcev FAP, radiooznačenih z ^{68}Ga (^{68}Ga]-FAPi-04) (slika 2), so raziskovalci prikazali kar pri 28 različnih vrstah raka (25). V primerjavi z zgoraj omenjenimi radiofarmaki, ki specifično ciljajo določen receptor/encim, imajo zaviralci FAP potencial, da postanejo prvi široko uporabljeni teranostični radiofarmaki za različne vrste rakov. Posledično je v zadnjih letih narastlo tudi število predkliničnih in kliničnih preskušanj, s katerimi raziskovalci preiskujejo možnosti uporabe teh radiofarmakov. V zgodnjih kliničnih preskušanjih so za ciljano radionuklidno zdravljenje uporabili zaviralce FAP, radiooznačene z ^{90}Y ter ^{177}Lu (^{90}Y]-FAPi-46, ^{177}Lu]-FAPi-46) (slika 2), vendar zaenkrat še ni optimalnega radiofarmaka, saj so rezultati kliničnih preskušanj še nejasni (19).

Z napredkom pri razumevanju delovanja tumorskega mikrookolja, bioloških značilnosti aktiviranih fibroblastov in optimizacijo radiofarmakov lahko v prihodnosti nedvomno pričakujemo klinično uporabo radiofarmakov, ki ciljajo te proteine, tako v slikovni diagnostiki kot ciljanem radionuklidnem zdravljenju (26).

3 SKLEP

V članku smo predstavili hitro razvijajoče se področje nuklearno-medicinske teranostike, ki povezuje slikovno diagnostiko in ciljano radionuklidno zdravljenje različnih vrst rakov z uporabo radiofarmakov. Molekularno osnovo uporabe radiofarmakov predstavlja (prekomerna) izraženost tarč na površini rakavih celic ali v tumorskem mikrookolju, kamor se radioaktivno označene spojine vežejo ter nam tako omogočijo diagnostično opredelitev stanja posameznika z namenom optimalnega izbora nadaljnje terapije. Področje teranostike predstavlja inovativno ter personalizirano orodje v boju proti raku. To potrjuje tudi aktualen hiter razvoj tega področja, kar omogoča poglobitev razumevanja molekularnih mehanizmov rakavih obolenj, izboljšanje in razširitev tako diagnostičnih kot tudi terapevtskih možnosti. Prenos znanja in prehod novih radiofarmakov iz predkliničnega okolja v klinično prakso v okviru translacijskih raziskav predstavlja ključni proces za učinkovito uporabo teranostike v korist bolnikov. Prav nenehno raziskovanje in sodelovanje med različnimi strokovnjaki bosta bistvenega

pomena tudi za nadaljnji napredek in uresničevanje polnega potenciala (radio)teranostike v klinični praksi.

4 LITERATURA

- Hertz B. A tribute to Dr. Saul Hertz: The discovery of the medical uses of radioiodine. *World J Nucl Med.* 2019;18(1):8-12.
- Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjugate Chem.* 2011;22(10):1879-903.
- Mikolajczak R, van der Meulen NP, Lapi SE. Radiometals for imaging and theranostics, current production, and future perspectives. *J Label Compd Radiopharm.* 2019;62(10):615-34.
- Fani M, Peiti PK, Velikyan I. Current Status of Radiopharmaceuticals for the Theranostics of Neuroendocrine Neoplasms. *Pharmaceuticals-Base.* 2017;10(1).
- Müller C, van der Meulen NP, Benesová M, Schibli R. Therapeutic Radiometals Beyond ^{177}Lu and ^{90}Y : Production and Application of Promising α -Particle, β -Particle, and Auger Electron Emitters. *J Nucl Med.* 2017;58:91s-6s.
- Boonstra MC, de Geus SW, Prevoo HA, Hawinkels LJ, van de Velde CJ, Kuppen PJ, et al. Selecting Targets for Tumor Imaging: An Overview of Cancer-Associated Membrane Proteins. *Biomark Cancer.* 2016;8:119-33.
- Henke E, Nandigama R, Ergun S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci.* 2019;6:160.
- Kelly T, Huang Y, Simms AE, Mazur A. Fibroblast activation protein-alpha: a key modulator of the microenvironment in multiple pathologies. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;297:83-116.
- Roy J, Putt KS, Coppola D, Leon ME, Khalil FK, Centeno BA, et al. Assessment of cholecystokinin 2 receptor (CCK2R) in neoplastic tissue. *Oncotarget.* 2016;7(12):14605-15.
- Priyadarshini S, Allison DB, Chauhan A. Comprehensive Assessment of Somatostatin Receptors in Various Neoplasms: A Systematic Review. *Pharmaceutics.* 2022;14(7).
- Ambrosini V, Zannoni L, Filice A, Lamberti G, Argalia G, Fortunati E, et al. Radiolabeled Somatostatin Analogues for Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumors. *Cancers.* 2022;14(4).
- Fani M, Mansi R, Nicolas GP, Wild D. Radiolabeled Somatostatin Analogs-A Continuously Evolving Class of Radiopharmaceuticals. *Cancers (Basel).* 2022;14(5).
- Chin RI, Wu FS, Menda Y, Kim H. Radiopharmaceuticals for Neuroendocrine Tumors. *Semin Radiat Oncol.* 2021;31(1):60-70.
- Del Olmo-Garcia MI, Prado-Wohlwend S, Andres A, Soriano JM, Bello P, Merino-Torres JF. Somatostatin and Somatostatin Receptors: From Signaling to Clinical Applications in Neuroendocrine Neoplasms. *Biomedicines.* 2021;9(12).
- Park S, Parihar AS, Bodei L, Hope TA, Mallak N, Millo C, et al. Somatostatin Receptor Imaging and Theranostics: Current Practice and Future Prospects. *J Nucl Med.* 2021;62(10):1323-9.
- Ahmadi Bidakhvidi N, Goffin K, Dekervel J, Baete K, Nackaerts K, Clement P, et al. Peptide Receptor Radionuclide Therapy Targeting the Somatostatin Receptor: Basic Principles, Clinical Applications and Optimization Strategies. *Cancers.* 2021;14(1).
- Imperiale A, Jha A, Meuter L, Nicolas GP, Taieb D, Pacak K. The Emergence of Somatostatin Antagonist-Based Theranostics:

- Paving the Road Toward Another Success? J Nucl Med.* 2023;64(5):682-4.
18. Mencinger M, Bokal U, Kovač A. Šola raka prostate:[strokovno srečanje]: Sekcija za internistično onkologijo SZD, Onkološki inštitut; 2023.
 19. Lepareur N, Ramée B, Mougín-Degraef M, Bourgeois M. *Clinical Advances and Perspectives in Targeted Radionuclide Therapy. Pharmaceuticals.* 2023;15(6):1733.
 20. Maina T, Konijnenberg MW, Kolenc Peitl P, Garnuszek P, Nock BA, Kaloudi A, et al. Preclinical pharmacokinetics, biodistribution, radiation dosimetry and toxicity studies required for regulatory approval of a phase I clinical trial with (111)In-CP04 in medullary thyroid carcinoma patients. *Eur J Pharm Sci.* 2016;91:236-42.
 21. Pawlak D, Rangger C, Kolenc Peitl P, Garnuszek P, Maurin M, Ihli L, et al. From preclinical development to clinical application: Kit formulation for radiolabelling the minigastrin analogue CP04 with In-111 for a first-in-human clinical trial. *Eur J Pharm Sci.* 2016;85:1-9.
 22. Kolenc Peitl P, Rangger C, Garnuszek P, Mikolajczak R, Hubalewska-Dydejczyk A, Maina T, et al. Clinical translation of theranostic radiopharmaceuticals: Current regulatory status and recent examples. *J Label Compd Radiopharm.* 2019;62(10):673-83.
 23. Lezaic L, Erba PA, Decristoforo C, Zaletel K, Mikolajczak R, Maecke H, et al. [111In]In-CP04 as a novel cholecystokinin-2 receptor ligand with theranostic potential in patients with progressive or metastatic medullary thyroid cancer: final results of a GRAN-T-MTC Phase I clinical trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2023;50(3):892-907.
 24. Rottenburger C, Nicolas G, McDougall L, Fürstner M, Hentschel M, Kaul F, et al. The CCK-2 receptor agonist Lu-177-PP-F11N for PRRT of medullary thyroid cancer – Recent results of the phase 1 “LUMED” Study. *Nuklearmedizin.* 2021;60(02):L15.
 25. Kratochwil C, Flechsig P, Lindner T, Abderrahim L, Altmann A, Mier W, et al. 68Ga-FAPI PET/CT: tracer uptake in 28 different kinds of cancer. *J Nucl Med.* 2019;60(6):801-5.
 26. Chakravarty R, Song W, Chakraborty S, Cai W. Fibroblast activation protein (FAP)-targeted radionuclide therapy: which ligand is the best? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2023;50(10):2935-9.

