

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

( YÜKSEK LİSANS TEZİ )

**<sup>68</sup>Ga-PSMA-11 ÜRETİMİNE VE RADYOKİMYASAL  
SAFLIK ANALİZİNE TASARIMLA KALİTE (QBD)  
PRENSİPLERİNE GÖRE KALİTE UYGULAMASI**

HÜSEYİN PEHLİVANOĞLU

DANIŞMAN  
DOÇ.DR. SENA ÇAĞLAR ANDAÇ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2019

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

( YÜKSEK LİSANS TEZİ )

**<sup>68</sup>Ga-PSMA-11 ÜRETİMİNE VE RADYOKİMYASAL  
SAFLIK ANALİZİNE TASARIMLA KALİTE (QBD)  
PRENSİPLERİNE GÖRE KALİTE UYGULAMASI**

HÜSEYİN PEHLİVANOĞLU

İKİNCİ DANIŞMAN  
DOÇ.DR. EMİNE MELTEM OCAK DEMİRCİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2019

## TEZ ONAYI

### YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi Hüseyin PEHLİVANOĞLU tarafından Doç. Dr. Sena ÇAĞLAR ANDAÇ'nın danışmanlığında hazırlanan "68GA-PSMA-11 ÜRETİMİNE VE RADYOKİMYASAL SAFLIK ANALİZİNE TASARIMLA KALİTE (QbD) PRENSİPLERİNE GÖRE KALİTE UYGULAMASI" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 25/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



**Jüri Başkanı**  
Doç. Dr. Hayati ÇELİK  
Yeditepe Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Anabilim Dalı



**Jüri-Danışman**  
Doç. Dr. Sena ÇAĞLAR ANDAÇ  
İstanbul Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi  
Analitik Kimya Anabilim Dalı



**Jüri**  
Dr. Öğr. Üyesi Emine KAHRAMAN  
İstanbul Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hüseyin PEHLİVANOĞLU



## İTHAF

*“Aileme ithaf ediyorum”*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde, yüksek lisans tezimin yönetilmesinde bilgi ve tecrübeleri ile desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Sena ÇAĞLAR ANDAÇ ile ikinci tez danışman hocam Doç. Dr. Meltem OCAK DEMİRCİ' ye çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım ve yüksek lisans eğitimim sırasında yardım ve desteklerini hiç esirgemeyen Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sıdıka TOKER ile tüm Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez pratik çalışmalarının büyük bir kısmını yürüttüğüm İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Kerim Sönmezoğlu'na göstermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana tüm kolaylıkları sağlayan ve desteklerini hiç esirgemeyen mesai arkadaşlarım Kim. Aslan AYGÜN ve Uzm. Biyolog Emre KARAYEL'na, tüm Nükleer Tıp Anabilim Dalı öğretim üyelerine, personeline teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33814

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	3
BEYAN.....	4
İTHAF.....	5
TEŞEKKÜR.....	6
İÇİNDEKİLER .....	7
TABLolar LİSTESİ.....	10
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	11
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	13
ÖZET .....	15
ABSTRACT.....	16
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	17
2. GENEL BİLGİLER .....	20
2.1. Nükleer Tıp ve Moleküler Görüntüleme.....	20
2.2. Radyofarmasötik .....	21
2.3. Radyofarmasötiklerin Genel Özellikleri .....	21
2.4. Radyofarmasötlere Uygulanan Kalite Kontrol Yöntemleri .....	22
2.4.1. Görünüş.....	23
2.4.2. Radyonüklid Saflık .....	23
2.4.3. Kimyasal Saflık.....	23
2.4.4. Radyokimyasal Saflık .....	24
2.4.5. Radyoassay (Radyoaktivite Tayini) .....	24
2.4.6. Stabilite .....	24
2.4.7. Ozmolarite.....	25
2.4.8. Biyolojik Testler ve Sterilite .....	25
2.5. Nükleer Tıp Merkezlerinde Kullanılan PET Radyofarmasötikleri .....	26
2.6. Nükleer Tıpta Prostat Kanseri Görüntüleme.....	27
2.6.1. Prostat spesifik membran antijen (PSMA).....	27
2.6.2. <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga Jenaratörü.....	29
2.6.3. <sup>68</sup> Ga-PSMA-11 ( <sup>68</sup> Ga-PSMA-HBED-CC).....	31
2.7. <sup>68</sup> Ga-PSMA-11 Hazırlanması.....	32



2.7.1. <sup>68</sup> Ga-PSMA-11 Kalite Kontrolü.....	34
2.8. Tasarımla Kalite (Quality By Design: QbD) .....	35
2.8.1. Yanıt Yüzeyi Metodolojisi (RSM).....	36
2.8.2. Box-Behnken Tasarımı .....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. GEREÇ .....	42
3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Ekipmanlar, Malzemeler ve Kimyasallar .....	42
3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması .....	44
3.1.2.1. Sentez Çözeltileri .....	44
3.1.2.2. HPLC Çözeltileri.....	45
3.1.3. Kartuşların Hazırlanması .....	46
3.2. YÖNTEM .....	46
3.2.1. <sup>68</sup> Ga-PSMA-11 Hazırlık Basamakları .....	46
3.2.2. <sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga Jeneratöründen <sup>68</sup> Ga eldesi ve <sup>68</sup> Ga-PSMA-11 hazırlanması .....	48
3.2.3. QbD ile <sup>68</sup> Ga-PSMA-11 Hazırlanması.....	49
3.3. <sup>68</sup> Ga-PSMA-11 Deneysel Tasarım Cevaplarının Belirlenmesi .....	51
3.3.1. TLC Yöntemi .....	51
3.3.2. HPLC Yöntemi .....	52
3.4. <sup>68</sup> Ga-PSMA-11'in Radyokimyasal Saflık ve Diastereomer Oranı Belirlemek İçin Alternatif HPLC Yöntemi Geliştirme .....	53
3.4.1. Geliştirilen HPLC Yöntemi Koşulları.....	53
3.4.2. Geliştirilen HPLC-UV Metodunun Validasyonu.....	54
3.4.3. Radyometrik Dedektörlü HPLC Metodunun Validasyonu .....	55
4. BULGULAR.....	57
4.1. Analitik Validasyon Çalışmasına Ait Bulgular.....	57
4.1.1. Kromatografi Koşullarının Belirlenmesi .....	57
4.1.2. HPLC-UV Yöntem Bulguları .....	59
4.1.3. Radyometrik Dedektörlü HPLC Yöntem Bulguları.....	61
4.2. TLC Metoduna Ait Bulgular.....	62
4.3. Deneysel Tasarıma Ait Bulgular.....	64
4.4. Radyokimyasal Saflığın Modellenmesi .....	65
4.5. Diastereomer Yüzdesinin Modellenmesi .....	67
4.6. Model Yüzey Analizleri.....	70

4.6.1. Radyokimyasal Model Yüzey Analizleri .....	70
4.6.2. RR Konfigürasyon Oranı Model Yüzey Analizleri .....	72
4.7. <sup>68</sup> Ga-PSMA-11 Optimum Koşulların Belirlenmesi .....	73
5. TARTIŞMA .....	75
KAYNAKLAR .....	79
HAM VERİLER .....	84
FORMLAR .....	85
ETİK KURUL KARARI .....	86
PATENT HAKKI İZİNİ .....	87
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	88
ÖZGEÇMİŞ .....	89

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Nükleer Tıp Merkezlerinde Kullanılan PET Radyofarmasötikleri ve Kullanım Alanları .....	26
Tablo 2-2: $^{68}\text{Ge}$ / $^{68}\text{Ga}$ jeneratörünün elüsyon yöntemleri .....	33
Tablo 2-3: Üç değişkenli bir sistemin bir Box-Behnken tasarımı için kodlanmış faktör seviyeleri.....	41
Tablo 3-1: Tez kapsamında kullanılan ekipmanlar.....	42
Tablo 3-2: Tez kapsamında kullanılan malzemeler .....	43
Tablo 3-3: Tez kapsamında kullanılan kimyasallar .....	43
Tablo 3-4: Cevap-Proses Parametreleri ve değişim aralıkları .....	50
Tablo 3-5: Deneysel Tasarım Optimizasyonu .....	50
Tablo 3-6: Radyokimyasal Saflığı Belirmede Kullanılan TLC yöntemi .....	52
Tablo 3-7: Geliştirilen HPLC yöntemi koşulları .....	53
Tablo 4-1: Gradient program .....	57
Tablo 4-2: Standart Çözeltiler ve Absorbans Değerleri.....	59
Tablo 4-3: Kesinlik Bulguları .....	60
Tablo 4-4: Zamana bağlı aktivite-radyometrik dedektör sinyali .....	61
Tablo 4-5: Doğruluk Bulguları .....	62
Tablo 4-6: TLC Metodu Radyokimyasal Saflık Verileri.....	63
Tablo 4-7: Deneysel Tasarım Optimizasyonu Bulgular .....	64
Tablo 4-8: % RKS modelinin istatistiksel özeti.....	65
Tablo 4-9: Radyokimyasal Saflık Modellemesi ANOVA verileri .....	66
Tablo 4-10: % diastereomer modelinin istatistiksel özeti.....	68
Tablo 4-11: Diastereomer Yizdesi Modellemesi ANOVA verileri .....	68

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: FDG PET Görüntülemesi .....	20
Şekil 2-2: Prostat spesifik membran antijen (PSMA) yapısı ve PSMA'ya hedefli PET radyofarmasötikleri .....	28
Şekil 2-3: $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radyonüklit jeneratörü radyoaktif bozunum şeması .....	29
Şekil 2-4: (A) $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ jeneratörü ve $^{68}\text{Ge}$ 'in elde edildiği yüksek enerjili siklotron; (B) $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ jeneratör kesitinin şematik sunumu .....	30
Şekil 2-5: Ticari olarak bulunan $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ jeneratörleri ve genel özellikleri .....	30
Şekil 2-6: PSMA-11 kimyasal yapısı.....	31
Şekil 2-7: $^{68}\text{Ga}$ 'nın HBED-PSMA ile kompleksleşmesi sonucu oluşan izomerler .....	32
Şekil 2-8: $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 sentez sistemleri .....	33
Şekil 2-9: Yanıt Yüzeyi Metodolojisi Gösterimi .....	36
Şekil 2-10: (a) BBD için küp ve (b) üç birbirine geçen $2^2$ faktoring tasarımı .....	40
Şekil 3-1: $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 sentez ön hazırlık adımları basamakları .....	47
Şekil 3-2: A: sentez ünitesi resmi ve B:modüler sentez ekran görüntüsü .....	48
Şekil 3-3: Cyclone Plus depolama fosfor sistemi .....	52
Şekil 3-4: Radyometrik Dedektörlü HPLC sistemi .....	53
Şekil 4-1: Blank UV Kromatogramı .....	58
Şekil 4-2: $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 UV Kromatogramı (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) .....	58
Şekil 4-3: $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 Radyometrik Dedektör Kromatogramı.....	58
Şekil 4-5: PSMA-11 için elde edilen ölçü eğrisi grafiği.....	60
Şekil 4-6: Radyokimyasal Saflık Testi Kalibrasyon Eğrisi .....	61
Şekil 4-7: Cyclone Plus ile TLC şerit analizi .....	62
Şekil 4-8: Cyclone Plus ile radyokimyasal saflık % belirleme.....	63
Şekil 4-9: Deneysel olarak gözlenen (actual) ve modelden hesaplanan (predicted) % RKS grafiği .....	67
Şekil 4-10: Deneysel olarak gözlenen (actual) ve modelden hesaplanan (predicted) % Sİ grafiği.....	70
Şekil 4-11: Reaksiyon Sıcaklığı ve PSMA-11 miktarının RKS üzerine etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği .....	70
Şekil 4-12: PSMA-11 miktarı ve pH'ın RKS etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği .....	71

Şekil 4-13: Reaksiyon süresi ve pH'ın RKS etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği .....	71
Şekil 4-14: Reaksiyon sıcaklığı ve PSMA-11 miktarı RR Konfigürasyon oranına etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği .....	72
Şekil 4-15: PSMA-11 miktarı ve pH'ın RKS etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği .....	72
Şekil 4-16: Reaksiyon süresi ve pH'ın RR konfigürasyon oranına etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği.....	73
Şekil 4-17: Optimum koşul kriterleri.....	74
Şekil 4-18: Grafikselleştirilmiş optimizasyon sonuçları.....	74



**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

QbD: Tasarımla Kalite

DoE : Deney Tasarımı

QC : Kalite Kontrol

CQA : Kritik Proses Parametreleri

RSM : Yanıt Yüzeyi Metodolojisi

ICH : Uluslararası İnsan Kullanımına Yönelik İlaç İhtiyacı Tekniklerinin Uyumlaştırılması Konseyi

SPECT: Tek Foton Bilgisayarlı Tomografi

BT: Bilgisayarlı Tomografi

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

MR: Magnetik Rezonans

MDP: Metilendifosfonik asit

Tc: Teknesyum

Ga: Galyum

PCa : Prostat Kanseri

PSMA: Prostat Spesifik Membran Antijeni

FDG: Florodeoksiglikoz

LAF: Laminar Air Flow

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

TAEK: Türkiye Atom Enerjisi Kurumu

keV: Kilo elektron volt

Mo: Molibden

HPLC: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

TLC: İnce Tabaka Kromatografisi

iTLC : Hızlı İnce Tabaka Kromatografisi

GC: Gaz Kromatografisi

Bq: Becquerel

Ci: Curie

mCi: Mili curie

SA: Spesifik Aktivite

USP: Amerikan Farmakopesi

Ph.Eur. : Avrupa Farmakopesi

GCPII: Glutamat karboksipeptidaz II

$\beta^-$  : Beta ışıması

$\beta^+$  : Pozitron Işıması

$\alpha$  : Alfa Işıması

$\gamma$  : Gama Işıması

RKS : Radyokimyasal saflık

LAL : Limulus amebosit lisatına

SCD : Soya fasulyesi-kazein özü

FTM : Sıvı tiyoglikollat ortamı

NaF : Sodyum florür

FLT : Florotimidin

HBED-CC : N, N'-bis- [2-hidroksi-5- (karboksietil) benzil] etilendiamin-N, N'-diasetikasit

DOTA : 1,4,7,10-tetrazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik asit

NOTA : 1,4,7-triazasiklononan-N, N', N' '- triasetik asit

HEPES : 4- (2-Hidroksietil) piperazin-1-etansülfonik asit

SD : Standart Sapma

RSD : Bağlı Standart Sapma

$\mu$ g: Mikrogram

$\mu$ L: Mikrolitre

mL: Mililitre

M: Molarite

s: Saniye

dk: Dakika

## ÖZET

Pehlivanoglu H. <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 Üretimine ve Radyokimyasal Saflık Analizine Tasarımla Kalite (QbD) Prensiplerine Göre Kalite Uygulaması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya A.D. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019

<sup>68</sup>Ga-PSMA-11 Nükleer Tıp'ta prostat kanseri tanı ve metastazlarının görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan Pozitron Emisyon Tomografisi radyofarmasötikleri arasındadır. Hazırlık basamaklarını genel olarak <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga jeneratöründen <sup>68</sup>Ga radyonüklitinin eldesi ve bilgisayar kontrollü otomatik sentez ünitelerinde <sup>68</sup>Ga'in PSMA molekülü ile bağlanması oluşturmaktadır. Hazırlık koşulları, radyo etiketleme kalitesini ve in vivo davranışı etkileyebilir ve kalite kontrol için standart bir prosedür mevcut değildir.

Bu çalışmada, <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentezinin kritik proses parametrelerinin Tasarımla Kalite (QbD) yaklaşımı ile belirlenmesi ve deneysel tasarım programları ile değişken cevapların analiz edilerek <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentezinin optimizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca <sup>68</sup>Ga-PSMA-11'nin kalite kontrolü için bir farmakope monografi bulunmaması nedeniyle hazırlanan radyofarmasötiğin klinik uygulamalarda etkin ve güvenilir şekilde uygulanabilmesi için basit ve tekrarlanabilir radyometrik dedeksiyona dayanan bir HPLC metodu geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır.

Yaptığımız literatür çalışmaları sonucu, <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentezi optimizasyonu için kritik proses parametreleri (CQA) ve deney tasarımı (DoE) belirlenmiştir. DoE, Design Expert 10.0.0 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak tasarlanmıştır. Bağımsız faktörler ve CQA'lar arasındaki ilişkiyi tahmin etmek için yanıt yüzey modellemesi (RSM) uygulanmıştır. <sup>68</sup>Ga -PSMA-11'nin kimyasal ve radyokimyasal saflığının belirlenmesi için geliştirilen analitik yöntemin validasyonu, ICH Q2 (R1) kurallarına göre yapılmıştır.

Design Expert 10.0.0 programı kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışması sonucu reaksiyon sıcaklığı 95<sup>0</sup>C, süresi 220 s, pH 4,40 ve PSMA-11 miktarı 10 µg/mL olarak bulunmuştur. Geliştirilen HPLC metodunda analiz Acclaim C18 (4,6×150 mm, 3 µm) analitik kolonunda, 20 mM orto-fosforik asit-asetonitril mobil faz karışımının gradiyent elüsyonu ile 1 mL akış hızında gerçekleştirilmiştir. <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 için doğrusallık aralığı 0,5-15 µg/mL, kalibrasyon eğrileri için R<sup>2</sup> değeri 0,9995'dir. Kesinlik % RSD değerleri kriterlere uygun olarak < % 2 bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: <sup>68</sup>Ga-PSMA-11, Tasarımla Kalite, Optimizasyon, HPLC, Radyofarmasötik

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33814



## ABSTRACT

Pehlivanoglu H.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 Preparation and Radiochemical Purity Analysis via Quality by Design (QbD) Principles. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. M.S. Thesis. İstanbul, 2019

$^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 radiopharmaceuticals have been widely used in recent years for PET/CT imaging of prostate cancer recurrence and metastases. Synthesis conditions may affect radiolabeling quality and in vivo behavior and no standard procedure for the quality control (QC) is available.

In this study, it is aimed to determine the critical process parameters of  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 synthesis via QbD approach, and to optimize  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 synthesis via experimental design programs. In addition, since European Pharmacopoeia have no respective guidelines on the QC of  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11, it is aimed to develop and validate analytical method for determination of radiochemical and chemical purity.

Critical process parameters (CQA) and experimental design (DoE) for  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 synthesis optimization were identified based on literature review. DoE was statistically designed using Design Expert software version 10.0. Response surface modelling (RSM) was applied to estimate the relationship between the independent factors and CQAs. Validation of the analytical method for the determination of chemical and radiochemical purity of  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 was carried out according to ICH Q2 (R1) guidelines.

As a result a new selective and sensitive high-performance liquid chromatography method for chemical and radiochemical purity testing of  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 has been developed and validated. The linearity between 0.5-15  $\mu\text{g} / \text{mL}$  was found  $R^2 \geq 0.99$  and % RSD value was found  $<2$ . As a result of the optimization study carried out by using Design Expert 10.0.0 software, the reaction temperature was 95 °C, the reaction time was 220 sec, reaction pH 4.40 and the amount of PSMA-11 was 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

Key Words:  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11, Quality by Design, Optimization, Radiopharmaceutical

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2019-33814

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Radyofarmasötikler; nükleer tıp tanı ve tetkiklerinde kullanılan radyoaktif ilaçlardır. Radyofarmasötikler radyonüklit ve farmasötik kısım olmak üzere iki önemli bileşenden oluşurlar. Radyonüklit kısım, radyoaktif ışımaya yayan radyoaktif elementten oluşur. Farmasötik kısım ise radyonüklitin bağlı olduğu kimyasal moleküldür. Radyofarmasötikler, bağlı oldukları farmasötik kısmın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre belli organlarda veya dokularda birikim gösterirler ve beraberinde taşıdıkları radyonüklitin yaydığı ışınlar sayesinde organ fonksiyonları görüntülenebilir veya hastalıklar tedavi edilebilir. Radyonüklidin yaydığı ışın özelliğine bağlı olarak tanı ikiye ayrılırlar. Alfa ( $\alpha$ ) veya Beta ( $\beta^-$ ) partiküler radyasyon yayan radyofarmasötikler tedavi, gama veya pozitron ( $\beta^+$ ) ışınması yapan radyofarmasötikler tanı amacı ile kullanılırlar [1,2,3].

Moleküler görüntüleme, biyolojik proseslerin canlı bir sistemde moleküler ve hücresele seviyelerde görselleştirilmesi, karakterizasyonu ve ölçümüdür. Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografisi (SPECT) gibi radyonüklit bazlı moleküler görüntüleme teknikleri patoloji ile ilişkili fonksiyonel veya fenotipik değişiklikleri yakalar. Hastaya özgü ve hastalığa özgü moleküler bilgileri geleneksel anatomik veya yapısal görüntüleme okumaları ile bütünleştirmeyi amaçlayan bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile birleştirilmiş SPECT/BT, PET/BT, PET/MR gibi hibrit görüntüleme sistemlerinin son yıllarda geliştirilmesi ve geliştirilen yeni radyofarmasötiklerle görüntüleme tekniklerinin duyarlılığı ve özgüllüğü de artmaktadır. Bu sistemler uygulanan radyofarmasötikler yardımı ile görüntülenmek istenen bölgenin anatomik yapısının yanı sıra fonksiyonu hakkında da bilgi verir ve bu özellikleriyle tanıyı koymada önemli rol oynarlar [4-6,13].

Nükleer tıp uygulamalarında prostat kanseri (PCa) tanı ve metastazlarının görüntülenmesi, prostat spesifik membran antijeni (PSMA) ekspresyonuna hedefli radyofarmasötiklerin kullanılarak PET/BT veya PET/MR ile gerçekleşmektedir. Nükleer tıp uygulamalarında prostat kanseri tanısı ve metastazlarının görüntülenmesi amacı ile en sık kullanılan radyofarmasötikler;  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP,  $^{18}\text{F}$ -NaF,  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-I&T,  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-617,  $^{18}\text{F}$ -Choline,  $^{18}\text{F}$ -PSMA'dir. Tutulum

mekanizmalarındaki farklılıklar nedeniyle bu tetkikler tek başlarına uygulanabildiği gibi spesifikite ve sensitiviteyi arttırabilmek adına kombin şeklinde de uygulanabilirler [14,16].

Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA), PCa hücrelerinde ve sınırlı sayıda normal dokuda eksprese edilen ve PCa için iyi bir tümör belirteci olan prostatik epitelyum tarafından eksprese edilen folat hidrolaz (FOLH) aktivitesine sahip, glutamat karboksipeptidaz 2 (GCPII) veya N-asetil- L-aspartil-L-glutamat peptidaz olarak bilinen, 750 aminoasitten oluşan bir tip II transmembran proteindir [15,16]. Prostatın hemen hemen bütün adenokarsinomları primer ve metastatik lezyonların çoğunda PSMA ekspresyonunu gösterir [17,18]. İmmünohistokimyasal çalışmalar, PSMA ekspresyonunun farklılaşmış, metastatik veya hormon refrakter hastalığında arttığını ve ekspresyon seviyesinin hastalık sonucu için önemli bir prognostik olduğunu göstermiştir [19].  $^{68}\text{Ga}^{+3}$ 'ün basit koordinasyon kimyası, asiklik şelatörü HBED-CC (N, N'-bis- [2-hidroksi-5- (karboksietil) benzil] etilendiamin-N, N'-diasetik asit) ile birlikte DOTA (1,4,7,10-tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik asit) ve NOTA (1,4,7-triazasiklononan-N, N', N' - triasetik asit) gibi şelatörler ile termodinamik olarak stabil  $^{68}\text{Ga}$  komplekslerinin oluşumunu desteklemektedir. Eder ve ark. yaptıkları klinik öncesi bir çalışmada, HBED-CC'nin DOTA şelatörü ile değiştirilmesinin, daha önce görüntüleyemeyen bir tümörün görüntülenmesini sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 ( $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-HBED-CC) radyofarmasötiği ile gerçekleştirilen PET/BT veya PET/MR görüntülemesi, sahip olduğu yüksek spesifikite ve sensitivite ile prostat kanseri tanı ve metastazlarının görüntülemelerinde son yıllarda oldukça sık tercih edilen bir görüntüleme yöntemidir [16,20].

$^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 içerdiği radyonüklitin yarı-ömrünün ( $t_{1/2} = 68$  dk) kısalığından dolayı Nükleer Tıp departmanlarında bulunan radyofarmasi laboratuvarlarında  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  jeneratöründen  $^{68}\text{Ga}$  radyonüklitinin eldesi ve bilgisayar kontrollü otomatik sentez ünitelerinde  $^{68}\text{Ga}$ 'in PSMA-11 (enzim inhibitörü) molekülü ile kimyasal reaksiyonu sonucu majistral ilaç kapsamında hazırlanmaktadır. Ayrıca Eder ve ark. yaptığı çalışmada HBED-CC galyum kompleksi sırasında NMR ile ayırt edilen üç diastereomer (RR, RS ve SS konfigürasyonları) oluştururken, RR konfigürasyonu termodinamik olarak daha stabil olduğunu göstermiştir [20,22]. Diastereomerlerin oluşumunda sıcaklığın etkisinin yanı sıra, pH ve konsantrasyona bağlı olduğu

bildirilmiştir [19,20]. Bu nedenle kimyasal reaksiyonun optimum koşullarda gerçekleşmesini sağlamak radyofarmasötik verimi ve kalitesi için önemlidir [25,27].

İlaç endüstrisi, ürün kalitesi, güvenliği ve verimliliği üzerine uzun yıllardır odaklanmıştır. Bunun sonucunda QbD (Quality by Design) gibi bilimsel araçlar uygulanarak ürün kalitesi arttırılmaktadır. QbD araçları, verimliliği ve kaliteyi artırarak riski en aza indirmektedir. Düzenleyici makamlar her zaman ICH (Uluslararası İnsan Kullanımına Yönelik İlaç İhtiyacı Tekniklerinin Uyumlaştırılması Konseyi) kalite kılavuzlarının Q8 ile Q11 arasındaki uygulamalarını önermektedir [38,40].

Geleneksel olarak, analitik kimyadaki optimizasyon, bir seferde bir faktörün deneysel bir yanıt üzerindeki etkisinin izlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda, daha düşük reaktif tüketimi ve çok daha az laboratuvar çalışmasıyla sonuçlanan, yapılması gereken deney sayısındaki bir azalma gibi avantajları göz önüne alınarak, Tasarımla Kalite (QbD) prensiplerine bağlı optimizasyon sık sık uygulanmıştır [41,43,47].

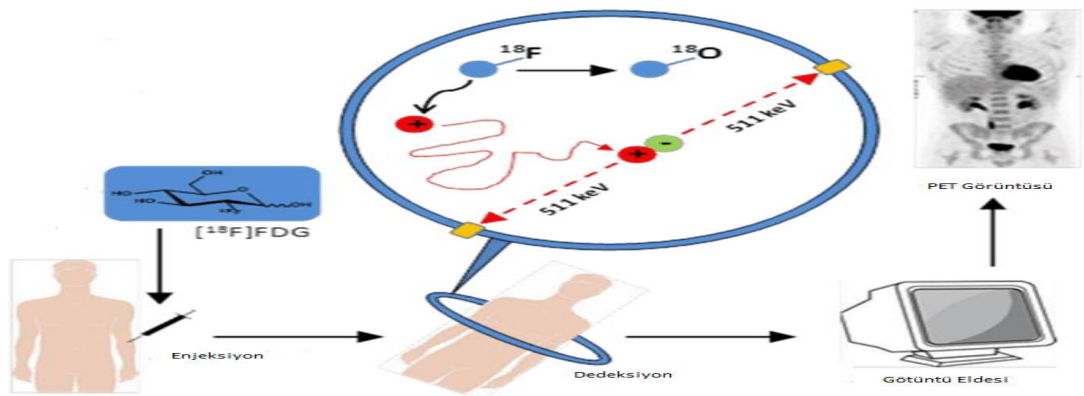
Çalışmamızda;  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 hazırlanmasına etki eden kritik proses parametreleri belirlenmiş, bunların senteze olan etkilerini incelemek için yapılacak deney sayılarının azaltılması ve deney maliyetlerinin düşürülmesi için tasarımla kalite yaklaşımı denenmiştir. Tasarımla kalite yaklaşımı ile  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in hazırlanmasında kullanılan parametrelerin radyofarmasötiğin radyokimyasal saflığına olası etkileri değerlendirilmiştir.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in hazırlanmasının Design Expert 10.0.0 programı üzerinde incelenmesi ile; sıcaklık, reaksiyon süresi, PSMA-11 konsantrasyonu ve pH gibi işlem değişkenlerinin radyokimyasal saflık (RKS) üzerindeki etkilerinin araştırılması; radyokimyasal saflık ve izomer oranı işlem değişkenlerinin fonksiyonu olarak modellenmesi ve elde edilen bu modelden radyokimyasal saflık ve RR konfigürasyon oranının maksimum, aktivite kaybı ve harcanan PSMA-11 miktarının minimum seviyede tutulacağı optimum işlem koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca Avrupa Farmakopesi'nde  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in hazırlanması ve kalite kontrolünde kullanılabilecek herhangi bir monograf bulunmamaktadır. Bu nedenle üretilen radyofarmasötiğin klinik ortamda kullanılabilmesi ve analiz edilmesi için basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir sıvı kromatografik metot geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nükleer Tıp ve Moleküler Görüntüleme

Hastalıkların tedavisinde erken teşhis ve doğru tanı en önemli kısmı oluşturmaktadır. Bu durum kanser tedavisinde daha da önem arz etmektedir. Modern kanser tedavileri kesin konumsal bilgi gerektirmektedir. Tümör nerede bulunur? Ne kadar büyük? Lokal mi yoksa lenf bezlerine mi yayıldı? Tedavi stratejisini değiştirebilecek herhangi bir kritik anatomik yapı içerir mi? Bu sorulara Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve hibrit görüntüleme sistemleri SPECT/BT, PET/BT ve PET/MR gibi moleküler görüntüleme yöntemlerinin kullanılması ile cevap bulunabilmektedir. SPECT görüntülemesi için kamera tarafından tespit edilebilen gama ( $\gamma$ ) ışını yayan, PET için pozitron ışıması ( $\beta^+$ ) yayan radyofarmasötikler kullanılmaktadır. İlacın verilmesi sonrası radyofarmasötüğün ilgili dokuya lokalize olması ve buradan yayılan radyasyon dozunun kamera sistemleri tarafından algılanması esasına dayanır [1-3].

Nükleer tıp uygulamalarında kullanılan görüntüleme sistemleri birçok malignite için kanser evrelemesi ve yeniden evrelemesinde temel oluşturacak şekilde ortaya çıkmıştır. Nükleer tıp uygulamalarında en sık kullanılan PET radyofarmasötüğü [ $^{18}\text{F}$ ] florodeoksiglikozdur ( $^{18}\text{F}$ -FDG) (tüm kansere bağlı taramaların % 90'ı), malignanın ayırt edici bir özelliği olan, yüksek oranda glikoz metabolizmasına sahip hücreler tarafından seçici olarak alınan bir glikoz analogudur. Şekil 2.1'de  $^{18}\text{F}$ -FDG PET görüntüleme mekanizması belirtilmektedir [4-6].



Şekil 2-1: FDG PET Görüntülemesi

## 2.2. Radyofarmasötik

Radyofarmasötik, Nükleer Tıp uygulamalarında hastalıkların teşhis ve tedavisinde hastalara uygulanan radyoaktif ilaçlardır. Radyofarmasötikler genel olarak, yaydığı radyoaktif ışınla hedef bölgenin görüntülenmesini ya da tedavi edilmesini sağlayan bir radyonüklit (radyoizotop) ve bu radyonükliti hedef bölgeye ulaştıran bir biyoaktif (farmasötik) kısım olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Radyofarmasötik geliştirme çalışmaları sırasında görüntüleme yapılacak yada tedavi edilecek organda lokalize olabilen yada fizyolojik fonksiyonunda yer alan farmasötik kısım ve bu farmasötik kısım ile bağlanabilen uygun bir radyoizotop seçilir. Bu iki kısmın kimyasal olarak bağlanması işlemlerine *radyoişaretleme* denir [3,7].

Radyofarmasötiklerin etkinliği, amaçlanan uygulamaya göre hızlı ve spesifik olarak lokalize olması, iyi bir görüntüleme ve tedavi için uygun yarı ömre, spesifik aktiviteye ve enerjiye sahip olması ile ölçülür. Tanı radyofarmasötikler eser miktarda uygulanır ve tipik olarak hastalarda herhangi bir fizyolojik yanıt veya farmakolojik etki yaratmaz [3,4,7].

Radyofarmasötiklerin kalite kontrollerinde; fizikokimyasal testler ve biyolojik testler kullanılmaktadır. Fizikokimyasal testler radyofarmasötüğün kalitesini organoleptik, kimyasal ve radyokimyasal olarak tanımlarken, biyolojik testler ise biyolojik (sterilite, pirojenite, biyodağılım vs) açıdan tanımlar. Uygulanan testler Amerikan Farmakopesi (USP) ve Avrupa Farmakopesi (Ph. Eur.) kriterlerine uygun olmalıdır [7,8].

## 2.3. Radyofarmasötiklerin Genel Özellikleri

Teşhis veya tedavi amaçlı kullanılacak ideal bir radyofarmasötüğün sahip olması gereken özellikleri arasında elde edilme kolaylığı, efektif yarı ömür, radyasyon tipi ve enerjisi, biyodağılım ve radyasyon güvenliği gibi özellikler sayılabilir [1,3].

**Elde Edilme Kolaylığı:** İdeal bir radyofarmasötüğün hazırlanmasında kullanılan radyonüklit kolay elde edilebilir olmalı, elde edilebilme yöntemleri ucuz olmalıdır [1, 3].

**Efektif Yarı Ömür:** Radyofarmasötiklerin vücuttaki başlangıç miktarları hem radyoaktif bozunma (fiziksel yarı ömür) hem de biyolojik yarılanma ile azalır. Bu iki şekilde radyofarmasötüğün vücutta yarıya inmesine efektif yarı ömür denir. Tedavi radyofarmasötikleri için bu sürenin günler olması istenirken, tanı radyofarmasötikleri

için ideal efektif yarı ömür radyasyon dozunu hastaya sınırlayacak kadar kısa ancak görüntüleme sırasında iyi sinyale izin verecek kadar uzun olmalıdır. [3,4,7].

**Radyasyon Tipi ve Enerjisi:** Radyasyon tipi ve enerjisi tanı ve tedavi radyofarmasötiklerinde farklılık göstermektedir. Tanı radyofarmasötiklerinin hazırlanmasında kullanılan radyonüklitlerden yayılan radyasyon görüntüleme amacıyla hasta vücudunun dışından tespit edilebilmelidir. Tanı amaçlı kullanılacak radyonüklitlerin enerjisi gama kameralar için 100-200 keV ve PET için 511 keV olmalıdır. Farklı olarak çok yüksek bir enerji, radyasyon ışınının görüntüleme cihazının detektörüne durdurulmadan ve dolayısıyla kaydedilmeden girmesine neden olacaktır.

Tedavi radyofarmasötiklerinin hazırlanmasında saf beta ( $\beta^-$ ) veya alfa ( $\alpha$ ) partiküler radyasyon yayan ve eğer mümkünse ek olarak gama radyasyon yayan radyonüklitlerin kullanılması idealdir. Bu radyonüklitler sahip oldukları parçacık radyasyon enerjisi ile tümör dışına çıkmadan tedavi özelliği gösterirken, gama emisyonu ile görüntü alınarak tedavi etkinliği değerlendirilebilmesine olanak sağlar [5,7,9].

**Biyodağılım:** Tanı yada tedavi amaçlı vücuda verilecek olan radyofarmasötiklerin tamamının hedef organda iyi şekilde lokalize olaması istenir. Bunun için yüksek membran geçirgenliği ve hücre içi tutunma gereklidir. Ayrıca ideal bir radyofarmasötüğün kandan atılımı hızlı olmalıdır [4,7,9].

**Spesifik Aktivite (SA):** Bir radyofarmasötüğün spesifik aktivitesi ( $C_i / \mu\text{mol}^{-1}$ ), PET ve SPECT'e dayalı moleküler görüntüleme ve tedavi çalışmaları için çok önemlidir. SA, belirli bir radyofarmasötüğün kütlesinde radyoaktif sinyal verebilen farmasötik moleküllerinin sayısının bir ölçüsüdür. Belirli bir radyofarmasötik için ihtiyaç duyulan SA yüksekliği, hedef hücrede veya dokuda bulunan hedef moleküllerin (reseptörler, antijenlerin enzimleri) konsantrasyonuna bağlıdır [3,7,11].

#### 2.4. Radyofarmasötlere Uygulanan Kalite Kontrol Yöntemleri

Radyofarmasötlere fizikokimyasal kalite kontrol testlerine bağlı olarak sıklıkla görünüş, radyonüklit saflık, radyokimyasal saflık, radyoassay, stabilite, pH testleri yapılmaktadır. Biyolojik testler olarak ise sterilite, bakteriyel endotoksin testi, biyodağılım gibi kalite kontrol testleri yapılmaktadır [7-9].

### 2.4.1. Görünüş

Radyofarmasötikler aksi belirtilmediği sürece herhangi bir partikül içermemeli, renksiz, kokusuz olmalıdır. Genel olarak partiküler madde varlığı ve rengi görsel olarak incelenir [8,11].

### 2.4.2. Radyonüklid Safılık

Radyonüklidik saflık, radyofarmasötiğin hazırlanmasında kullanılması gereken asıl radyonüklit aktivitesinin mevcut toplam radyoaktiviteye oranı olarak tanımlanabilir. Radyonüklidik safsızlıklar radyofarmasötik hazırlanmasında kullanılması gereken radyonüklitin diğer radyoizotopları veya farklı elementlerin diğer radyoizotoplarının da bulunmasından kaynaklı olabilir.  $^{123}\text{I}$ -radyofarmasötiklerinde,  $^{125}\text{I}$  ve  $^{124}\text{I}$  varlığı, radyonüklidik safsızlıklar olarak kabul edilir. Radyonüklidik safsızlıklar hem görüntülerde sorunlar meydana getirmeleri hem de hastaya gereksiz radyasyon dozuna maruz bırakmaları nedeniyle istenmezler [7,8].

Radyonüklidik safsızlıklar, çok kanallı bir analizöre bağlı NaI (TI) detektörü veya Ge (Li) detektörü bazlı  $\gamma$ -ışını spektrometresi ile kolayca tespit edilebilmektedir. PET radyonüklidlerinde bulunabilecek safsızlıklar veya radyonüklitin kimliği bir doz kalibratörü kullanılarak yarı ömür tayini ile belirlenebilmektedir.. Beta emisyonu yapan radyonüklitler ise bir  $\beta$  spektrometresi kullanılarak sıvı sintilasyon sayacı ile ölçülebilmektedir [7,11].

### 2.4.3. Kimyasal Safılık

Bir radyofarmasötikin kimyasal saflığı, son formülasyon istenmeyen kimyasalların varlığı veya yokluğu şeklinde tanımlanabilir. Kimyasal saflık testi, son formülasyonda istenmeyen kimyasal bileşiklerin miktarlarının (kütlelerinin) tespitine yönelik yapılmaktadır. Kimyasal safsızlıklar radyofarmasötik hazırlanma öncesi, sonrası veya sırasında reaksiyon karışımındaki bir öncülün veya diğer kimyasalların parçalanmasından kaynaklanabilir. Kimyasal safsızlıklar, istenen kimyasal formun kütlesinden önemli ölçüde fazla olabilir ve radyofarmasötiğin spesifik etkileşimine müdahale edebilir veya istenmeyen farmakolojik yan etkilere neden olabilir [3,7,11,12].

Radyofarmasötikler de bulunabilecek kimyasal safsızlık tespitinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), gibi kantitatif ve yarı kantitatif yöntemler kullanılabilir. Radyoışaretlemeler sırasında kullanılan



etanol, asetonitril gibi kimyasal safsızlıkların tayinleri için ise Gaz Kromatografisi (GC) en sık kullanılan yöntemler arasındadır [7,9,12].

#### 2.4.4. Radyokimyasal Safılık

Bir radyofarmasötikin radyokimyasal saflığı (RKS), son radyofarmasötik formülasyonunda istenen radyokimyasal formda bulunan radyoaktivitenin toplam radyoaktiviteye oranı olarak tanımlanabilir. RKS, radyofarmasötik hazırlama sırasında olması gereken radyonüklitin farmasötik forma dahil edilme yüzdesinin bir ölçüsü olan radyo-işaretleme verimi ile karıştırılmamalıdır. Radyokimyasal safsızlıkları, genel olarak serbest veya kolloidal formdaki radyonüklitler veya ara ürünler ile radyo-işaretle kimyasal yapılar oluşturabilmektedir. Radyokimyasal safsızlıklar istenmeyen *in vivo* dağılım göstermesi nedeniyle düşük kaliteli görüntüler elde edilmesine ve hastanın gereksiz yere radyasyon almasına sebep olacaktır [6,7,9].

Radyokimyasal saflık analizlerinde sıklıkla radyometrik dedektör içeren HPLC ve TLC sistemleri kullanılmaktadır. Radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflık analitik analizlerinde en sık kullanılan HPLC sistemlerine radyasyon sinyallerini (yüksek hassasiyetli  $\gamma$  veya  $\beta^+$ ) tanımlayan detektörler eklenmiştir. Hızlı TLC (iTLC) yönteminde ise analiz sonrasında kağıt kromatogramlarında bulunan radyoaktivite gama sayıcı ve otoradyografi yardımı ile iTLC kağıdının taranmasıyla tespit edilmektedir [8,11].

#### 2.4.5. Radyoassay (Radyoaktivite Tayini)

Radyofarmasötikler genellikle parenteral ve oral çözelti formlarında bulunmaktadır. Radyofarmasötiklerin radyoaktivite konsantrasyonu sıvı formda ise mCi/mL veya GBq/mL olarak, katı formda ise mCi/mg (mCi/kapsül) veya GBq/mg (GBq/kapsül) şeklinde ifade edilmektedir. Radyofarmasötüğün sahip olduğu toplam radyoaktivite miktarı yada hastaya enjeksiyon yapılacak doz miktarı doz kalibratörü kullanılarak ölçülmektedir [3,7,10].

#### 2.4.6. Stabilité

Stabilité, bir ilacın özelliklerini tanımlanan sınırlar içinde bütünlüğünü koruduğu süre şeklinde tanımlanabilir. Radyofarmasötikler hazırlandıktan sonra hastaya uygulanıncaya kadar ve uygulandıktan sonra vücut içerisinde *in vitro/in vivo* olarak stabil kalmalıdır. Radyofarmasötik uygulanıncaya kadar saklama koşullarında

stabilitesini sağlamak ve belgelendirmek için uygun parametreler değerlendirilmelidir. Radyofarmasötiklerin stabilitesi, sıcaklık, nem, ışık ve aktif maddelerin fiziksel ve kimyasal özellikler ile, yardımcı maddelerin, farmasötik formun, paketleme işlemlerinin üretim prosesi, türü ve özellikleri gibi bir çok faktöre bağlıdır. Radyofarmasötiklerin stabilitesini belirlemede radyokimyasal saflık, görünüm, pH ve SA parametleri rol oynamaktadır. Stabilite belirleme amaçlı yapılan radyokimyasal saflık analizlerinde en sık HPLC ve TLC yöntemleri kullanılmaktadır [3,7,11].

Radyofarmasötiklerin stabilite testleri önerilen en yüksek radyoaktif konsantrasyonda gerçekleştirilmektedir. Stabilite verilerine dayanarak, radyofarmasötüğün son kullanma tarihi/süresi belirlenmektedir [3,7,11].

#### **2.4.7. Ozmolarite**

Parenteral olarak kullanılacak radyofarmasötikler izotonik olmalıdır, yani ilaç formülasyonunun iyonik mukavemeti, kanla aynı veya benzer olmalıdır. Çoğu radyofarmasötik preparat, hastalara uygulanmadan önce genellikle fizyolojik % 0.9 NaCl çözeltisi kullanılarak formüle edilir [7,8,11].

Osmolalite (iyon gücü, izotoniklik), bir Osmometre kullanılarak donma noktası tekniği ile ölçülebilir. Herhangi bir parti için ozmolalite, 285-356 mOsm Kg<sup>-1</sup> aralığında olabilir [7,8,11].

#### **2.4.8. Biyolojik Testler ve Sterilite**

Parenteral yol ile uygulanan radyofarmasötiklerin steril ve apirojen olmalıdır. Bir radyofarmasötüğün sterilitesinin ve bakteriyel endotoksin (pirojen) konsantrasyonunun kabul edilebilir sınırlar içinde olup olmadığı test edilmelidir.

Pirojenler, ateş üreten materyallerdir - çoğunlukla gram negatif bakteriyel hücre duvarlarından kaynaklanır ve Limulus amebosit lisatına (LAL) dayalı bir jel pıhtı tekniği ile kolayca saptanır. Son ilaç ürününün sterilitesini sağlamak için çoğu radyofarmasötik, hazırlık aşamasının son işleminde 0.22 µ membran filtre (Millipore gibi) kullanılarak filtre edilir. Kabarcık noktası testi ile filtre test edilir. Kabarcık noktası testi küçük filtre kusurlarını ve boyut dışı gözenekleri tespit eder ve bakteri geçiş testi ile bağıntılıdır. Sterilite testleri, çözeltilerdeki mezofilik bakteri ve mantarların varlığını belirlemek için tasarlanmıştır. Standart USP sterilite testi, hem

soya fasulyesi-kazein özü (SCD) hem de sıvı tiyoglikolat ortamı (FTM) kullanılarak yapılır [3,7,8,11].

## 2.5. Nükleer Tıp Merkezlerinde Kullanılan PET Radyofarmasötikleri

Radyofarmasötikler nükleer tıp merkezlerinde, tanı veya tedavi amacıyla intravenöz ya da oral yollarla hastalara uygulanırlar. Yapılacak tetkike ve kullanılacak cihaza (gama kamera, PET, SPECT) göre uygulanan radyofarmasötiklerde farklılıklar bulunmaktadır [3]. Tez konumun içeriğinde de bulunan <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 PET radyofarmasötiği ile birlikte nükleer tıp merkezlerinde sıklıkla kullanılan PET radyofarmasötikleri ve kullanım alanları Tablo 2.1’de özetlenmiştir. PET, onkolojik hastalıklarda tanı, evreleme, tedaviye yanıt değerlendirme ve yeniden evreleme endikasyonları ile yapılan moleküler bir nükleer tıp görüntülemesidir. Bu yöntem ile glikoz metabolizması, yağ asidi metabolizması, aminoasit metabolizması, hücre proliferasyonu, hücre zarı metabolizması ve reseptör ekspresyonları gibi birçok hücrel bilgi görünür hale gelir. Görüntülemenin temelinde uygun bir radyoizotopun görüntülenmesi istenen organ, doku veya hücreye yönlendirilmesini sağlayan bir molekülle bağlanarak elde edilen radyofarmasötiklerin vücuda verilmesi yatar [5,7].

**Tablo 2-1: Nükleer Tıp Merkezlerinde Kullanılan PET Radyofarmasötikleri ve Kullanım Alanları**

<b>Nükleer Tıp Merkezlerinde Kullanılan PET Radyofarmasötikleri</b>	
<b>Radyofarmasötik</b>	<b>Kullanım Alanları</b>
<b><sup>18</sup>F-NaF</b>	Prostat, meme ve akciğer kanserlerinin kemiklerdeki metastazlarının teşhisinde ve lokalizasyonunda kullanılır.
<b><sup>18</sup>F-FLT</b>	Yalnızca tanı amacıyla, malign hücrelerin mitotik aktivitesini belirlemek için kanser teşhisinde kullanılan bir radyofarmasötiktir. Pozitron emisyon tomografisi kullanılarak bu hücrelerin topografik teşhisi yapılabilir.
<b><sup>18</sup>F-FDG</b>	Kanser tanısında, benign/malign ayrımında, kanser evrelemesinde, tedavi yanıtının değerlendirilmesinde ve yeniden evrelemede kardiyolojide; kalbin fonksiyonel ve metabolik aktivitesinin belirlenmesinde kullanılır.
	Nörolojide; demans, epilepsi, Alzheimer, demans ve

	Alzheimer ayrımı, epileptojenik odakların glukoz hipometabolizmasının gösterilmesi yoluyla belirlenmesinde kullanılır.
<b><sup>68</sup>Ga-PSMA- Ligandları</b>	Prostat kanseri tanı ve metastazlarının görüntülenmesinde kullanılır.
<b><sup>68</sup>Ga-Somatostatin analogları</b>	Nöroendokrin tümörlerin görüntülenmesinde kullanılır.

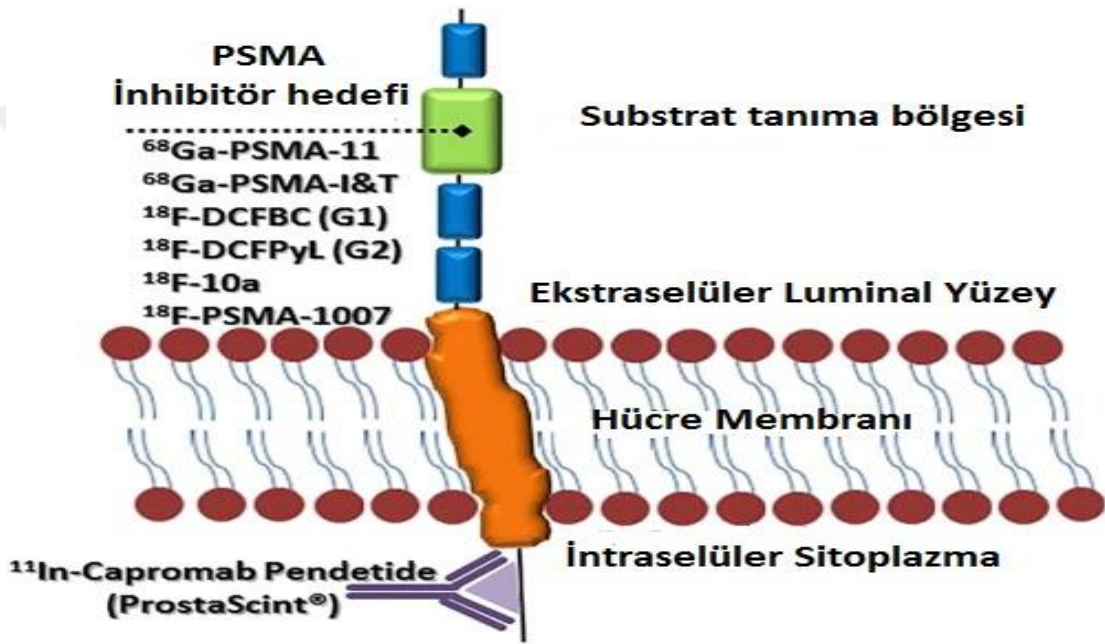
## 2.6. Nükleer Tıpta Prostat Kanseri Görüntüleme

PCa erkeklerde cilt kaynaklı kanserler dışında en sık görülen kanser tipi olup kansere bağlı ölüm sebepleri arasında akciğer kanserinden sonra 2. sırada yer almaktadır. Erken tespit edildikten sonra, prostatektomi ve / veya radyasyon en umut verici terapötik yaklaşımdır ve hastaların % 80'i 7 yıl boyunca nüksüz kalmaktadır. Bununla birlikte, tanı anında hastaların % 12'sinde lenf düğümlerine veya diğer organlara metastatik yayılım vardır ve bu tür hastalarda daha kısa süreli sağkalım göstermektedir. . Bu nedenle metastatik ve tekrarlayan lezyonları erken zamanda saptayabilen ve ek olarak bu hastalara etkili tedavi seçeneği sunabilen bir araca sahip olmak önemlidir. Son yıllarda nükleer tıp uygulamalarında prostat kanserinin teşhis ve tedavisinde hastalığa spesifik olarak geliştirilen radyofarmasötiklerin (prostat spesifik membran antijeni (PSMA) ve gastrin salgılayan peptid reseptörüne hedefli geliştirilen radyofarmasötikler) kullanımının yaygınlaştığını görmekteyiz (Şekil 2.2). Daha önceleri yaygın olarak kullanılan radyofarmasötikler (<sup>153</sup>Sm-EDTMP, <sup>89</sup>SrCl<sub>2</sub>, <sup>223</sup>RaCl<sub>2</sub> vb) uzun süre ağırlı kemik metastazlarının palyatif tedavisinde önemli bir rol oynamışlardır [14-16].

### 2.6.1. Prostat spesifik membran antijen (PSMA)

Prostat Spesifik Membran Antijeni (PSMA), PCa hücrelerinde ve sınırlı sayıda normal dokuda eksprese edilen folat hidrolaz (FOLH) aktivitesine sahip, glutamat karboksipeptidaz 2 (GCPII) veya N-asetil- L-aspartil-L-glutamat peptidaz olarak bilinen, 750 aminoasitten oluşan bir tip II transmembran proteindir. PSMA, normal prostat hücrelerinde düşük derecede eksprese olurken veya hiç eksprese olmazken, prostat kanserinde yüksek derece eksprese olmaktadır. PSMA sistemik dolaşıma karışmaz ve radyofarmasötik bağlandıktan sonra endositoz yoluyla hücre içine alınır.

Bu özellikleri nedeniyle PSMA, nükleer tıp uygulamaları bakımından hem prostat kanserinin görüntülenmesi hem de tedavisi için ideal nitelikte bir moleküler hedeftir. PSMA'ya hedefli radyofarmasötikler hedef alanlar (PCa) dışında tükürük bezleri, ince barsak, böbrek, karaciğerde de tutulum göstermektedir. PSMA ekspresyon derecesi kötü differansiye, metastatik ve androjen tedavisine dirençli karsinomlarda daha yüksektir. Hem primer prostat kanseri lezyonunda hem de metastatik lezyonlarda hastalığın her evresinde yüksek derecede radyofarmasötik tutulumu gözlenir [16-18].



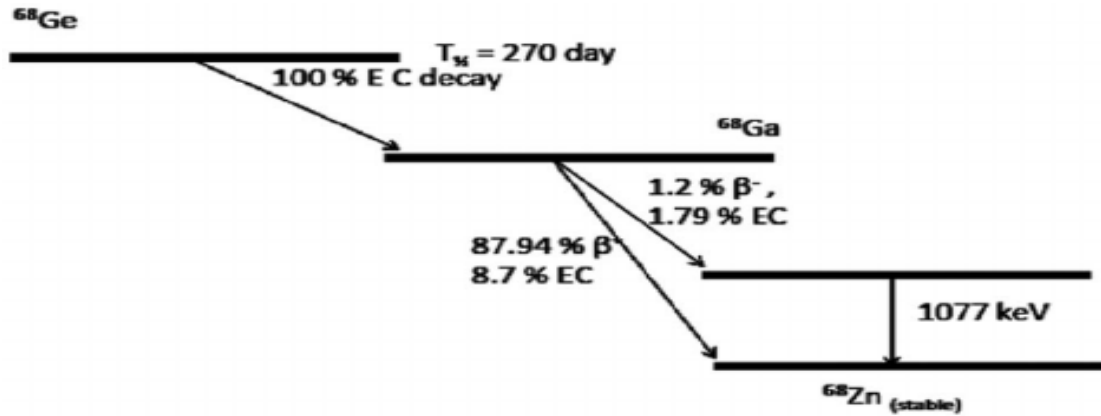
**Şekil 2-2: Prostat spesifik membran antijen (PSMA) yapısı ve PSMA'ya hedefli PET radyofarmasötikleri**

Son yıllarda PSMA ekspresyonunun prostat kanserinin ilerlemesi durumunda daha artması sebebiyle tekrarlayan, metastatik prostat kanserlerinde geleneksel yöntemler ile saptanamayan küçük lezyonların görüntülenmesinde nükleer tıp PSMA PET görüntüleme çalışmalarının yaygınlaşmaya başladığını görmekteyiz. Kullanılan radyofarmasötikler arasında  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-ligandlarının yaygın olarak kullanıldığını görmekteyiz (Şekil 2.2) [14,16].  $^{68}\text{Ga}$  işaretli PSMA ligandları, ilk olarak Johns Hopkins Üniversitesi'nde sentezlendi ve prelinik modellerde doğrulandı. Daha sonra,  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11, Heidelberg grubu (Eder ve ark.) tarafından klinik uygulamalarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir ve üre temelli PSMA inhibitörü olan Glu-NH-CONH-Lys (Ahx) peptidi HBED-CC şelatör molekülü kullanılarak PET radyonüklidi olan

$^{68}\text{Ga}$  ile işaretlenebilmektedir [16]. Ayrıca aynı molekülün DOTA şelatı ile konjuge edilmiş halinin  $^{177}\text{Lu}$  radyonükliti ile işaretlenmiş formu nükleer tıp prostat kanseri tedavilerinde de kullanılmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda bir siklotron ürünü olan  $^{18}\text{F}$  PET radyonükliti ile  $^{18}\text{F}$ -PSMA radyofarmasötiklerinin de geliştirme çalışmalarının ve kullanımının yaygınlaştığını da görmekteyiz Şekil 2.2’de günümüz nükleer tıp klinik uygulamalarında yaygın olarak kullanılan  $^{68}\text{Ga}$  ve  $^{18}\text{F}$  ile radyoişaretli işaretli PSMA radyofarmasötiklerini ve PSMA proteinine bağlanma noktalarını görebilirsiniz [14,16].

### 2.6.2. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Jeneratörü

Nükleer tıp klinik uygulamalarında  $^{68}\text{Ga}$ ’in kullanımı 1960’lı yılların başlarına kadar uzanmaktadır.  $^{68}\text{Ga}$  yarı ömrü 68 dk olan % 89 pozitron yayımı (% 1.92 MeV maksimum enerji, ortalama 0.89 MeV) ile bozunan bir PET radyonüklitidir.  $^{68}\text{Ga}$ , yarı-ömrü ( $t_{1/2}$ ) 270.8 gün olan Germanyum-68 ( $^{68}\text{Ge}$ ) den  $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ga}$  radyonüklit jeneratörü vasıtası ile elde edilmektedir (Şekil 2-3, Şekil 2-4). Ana radyonüklit  $^{68}\text{Ge}$ ’in uzun fiziksel yarı ömrü, jeneratörün yaklaşık bir yıla kadar kullanımına izin vermektedir.  $^{68}\text{Ga}$ ’den yayılan pozitronun enerjisi, potansiyel olarak düşük çözünürlüğe yol açabilen ve yaygın olarak kullanılan PET izotopu  $^{18}\text{F}$ ’den (maksimum enerji = 0.63 MeV, ortalama = 0.25 MeV) daha yüksektir [24,25].

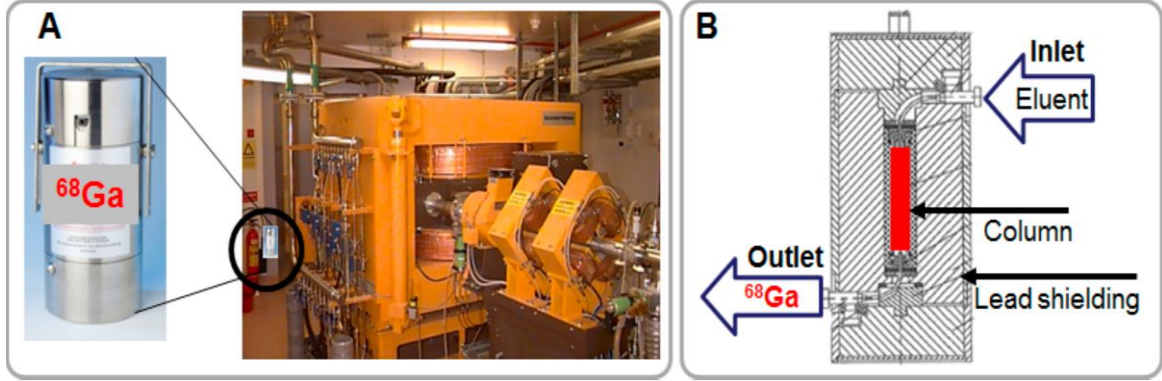


Şekil 2-3:  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  radyonüklit jeneratörü radyoaktif bozunum şeması

Radyonüklit jeneratörler genel olarak bir ana/kız radyonüklit karışımını dengede barındıran bağımsız sistemlerdir. Modern ticari radyonüklit jeneratörler, koruyucu bir kabın içine yerleştirilmiş ana radyonükliti içeren kromatografik kolon sisteminden oluşmaktadır.  $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ga}$  radyonüklit jeneratöründe ana radyonüklit  $^{68}\text{Ge}$  spesifik kolon dolgu maddelerine emdirilmiş halde bulunmaktadır.  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ge}$ ’in zaman içerisinde radyoaktif bozunmaya uğraması ile inorganik, organik veya karışık matris ile





doldurulmuş spesifik kolonlardan uygun çözeltiler kullanılarak ekstraksiyon mekanizması ile elde edilmektedir. (Şekil 2-4) [25,26].

$^{68}\text{Ge}$  ana radyonükliti ise jeneratör üretiminden önce yüksek enerjili siklotronlardan  $^{69}\text{Ga}$  ( $p, 2n$ )  $^{68}\text{Ge}$  reaksiyonu ile üretilmektedir [25,26].



Şekil 2-4: (A)  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$  jeneratörü ve  $^{68}\text{Ge}$ 'in elde edildiği yüksek enerjili siklotron; (B)  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  jeneratör kesitinin şematik sunumu

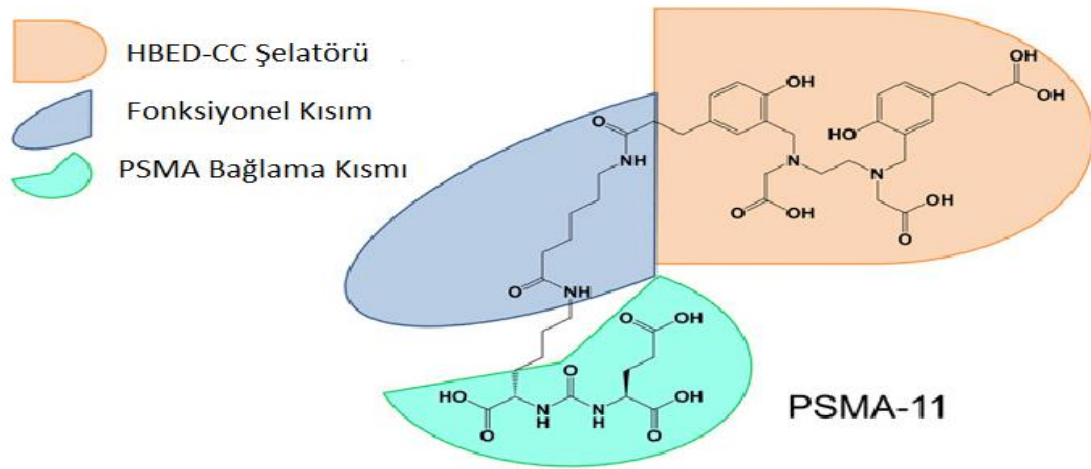
$^{68}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  jeneratörlerinin çoğundan (0.1-1.0N) güçlü konsantrasyonlarda hidroklorik asit çözeltileri ve iyon değiştirici reçinelerden katyonik  $^{68}\text{Ga}$  (III) desorpsiyonları ile edilmektedir.  $^{68}\text{Ga}$  (III)'in katyonik kimyasal formu çok yönlü ve doğrudan işaretleme için avantajlar sağlamaktadır. HCl elüentinin molaritesinde, metal katyon içeriğinde ve  $^{68}\text{Ge}$  içeriğinde değişkenlik gösteren çok sayıda ticari jeneratörler vardır (Şekil 2-5) [25,27,28].

	Eckert & Ziegler Cyclotron Co. Ltd.	Eckert & Ziegler IGG100 and IGG101 GMP; Pharm. Grade	I.D.B. Holland B.V.	Isotope Technologies Garching
				
Column matrix	TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>	SnO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub> /organic
Eluent	0.1 M HCl	0.1 M HCl	0.6 M HCl	0.05 M HCl
$^{68}\text{Ge}$ breakthrough	<0.005%	<0.001%	~0.001%	<0.005%
Eluate volume	5 mL	5 mL	6 mL	4 mL
Chemical impurity	Ga: <1 µg/mCl Ni < 1µg/mCl	Fe: <10 µg/GBq Zn: <10 µg/GBq	<10 ppm (Ga, Ge, Zn, Ti, Sn, Fe, Al, Cu)	Only Zn from decay
Weight	11.7 kg	10 kg    14 kg	26 kg	16 kg

Şekil 2-5: Ticari olarak bulunan  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$  jeneratörleri ve genel özellikleri

### 2.6.3. $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 ( $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-HBED-CC)

Üre bazlı PSMA inhibitörleri dolaşımdan hızla temizlenir ve beyin, böbrek, tükürük bezi ve ince bağırsak PSMA gibi birkaç organda sadece düşük seviyelerde fizyolojik PSMA ekspresyonu tespit edildiğinden, yüksek kalitede prostat kanseri PET görüntülemesi için ideal bir biyolojik ajan olduğu ortaya konmuştur.  $^{68}\text{Ga}$ -etiketli PET radyofarmasötüğü  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 (Şekil 2-6) ile ilgili ilk klinik deneyimler, bu yeni molekülün  $^{18}\text{F}$ -kolin ile karşılaştırıldığında PC nükslerini ve metastazları daha yüksek kontrastla tespit ettiği ortaya konmuştur [15,17-19].

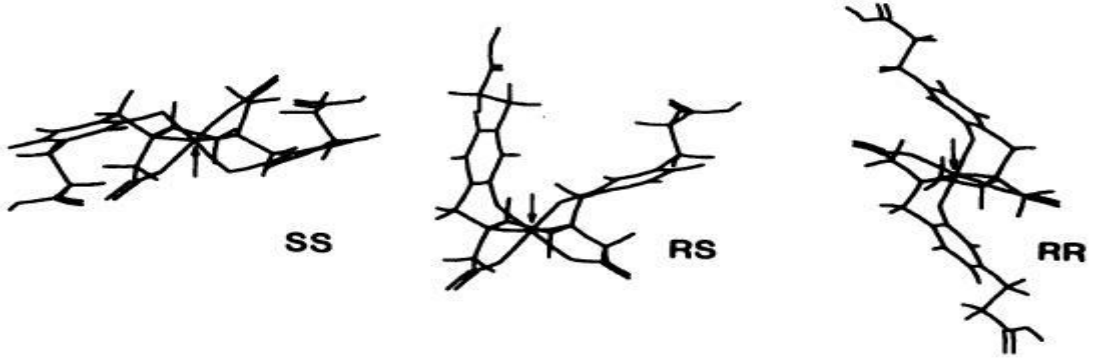


Şekil 2-6: PSMA-11 kimyasal yapısı

Şelatör HBED-CC (N, N'-bis- [2-hidroksi-5- (karboksietil) benzil] etilendiamin-N, N'-diasetikasit), özellikle oda sıcaklığında bile  $^{68}\text{Ga}$  ile etkili radyoaktif etiketleme sağlayan, şimdiye kadar nadiren kullanılan bir asiklik kompleks yapıcı maddedir. HBED-CC'yi PSMA inhibitörü Glu-üre-Lys ile birleştirerek, PSMA S1 bağlanma bölgesinin aksesuar hidrofobik cebiyle, radyoizleyiciye uygun PSMA reseptörü ile sürdürülebilir bir etkileşim için gerekli bir aromatik kısım oluşturulur. Eder ve ark. yaptıkları klinik öncesi bir çalışmada, HBED-CC'nin DOTA şelatörü ile değiştirilmesinin, daha önce görüntüleyemeyen bir tümörün görüntülenmesini sağladığı gösterilmiştir [19]. Yapılan çalışmalarda HBED ile Ga'nın kompleksleşmesi için termodinamik stabilite sabitinin  $> 10^{39}$  olduğu belirlenmiştir. Yapı asiklidir ve ortam sıcaklığında hızlı etiketlemeye olanak tanır. Ayrıca, Ga-HBED-CC kompleksinin fizyolojik pH'ta yüksek kinetik stabilitesi rapor edilmiştir, in vivo ve insan serumu içinde en az 72 saat stabil bir kompleks oluşturur [18-20].



HBED-CC galyum kompleksi sırasında NMR ile ayırt edilen üç diastereomer (RR, RS ve SS konfigürasyonları) oluştururken, RR konfigürasyonu termodinamik olarak daha stabildir (Şekil 2-7) [20,22]. Diastereomerlerin oluşumunda sıcaklığın etkisinin yanı sıra, pH ve konsantrasyona bağlı olduğu bildirilmiştir [19,20].

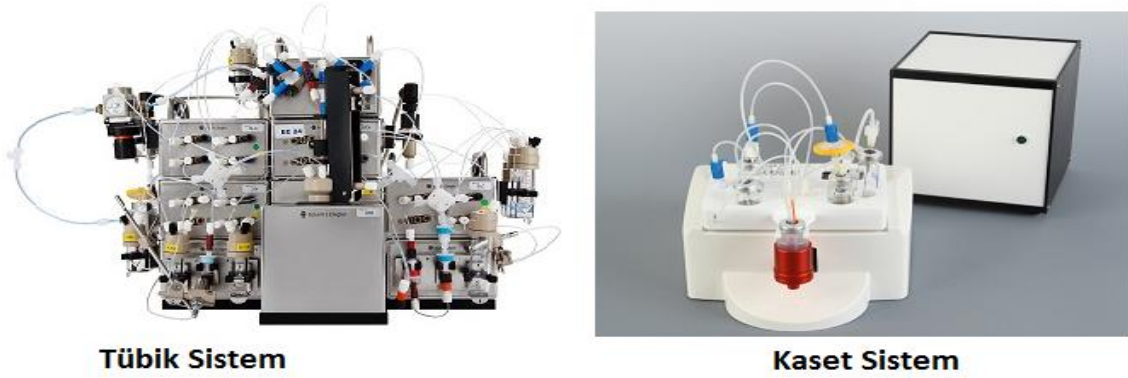


Şekil 2-7:  $^{68}\text{Ga}$ 'nın HBED-PSMA ile kompleksleşmesi sonucu oluşan izomerler

Ga-kompleksleşmesinden sonra farklı HBED-CC diastereomerlerinin bilinen oluşumunun neden olduğu hafif kimyasal farklılıklar, tüm molekülün bağlanma özelliklerini etkileyebildiği gösterilmiştir [20,21].

## 2.7. $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 Hazırlanması

Uygulama hedeflerine ve seçime bağlı olarak  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 hazırlanması için bir takım yöntemler geliştirilmiştir. Klinik kullanım için üretim üç gruba ayrılabilir: manuel iyi üretim uygulaması (GMP) üretimi; otomatik GMP üretimi; ve kit tipi hazırlama. Otomatik üretim için çeşitli sentez sistemler geliştirmiştir. Otomatik sistemler, teknik personelin radyasyona maruz kalma riskini azaltma ve tüm üretim süreci kontrolünü iyileştirerek operatör hatalarını azaltma gibi olanaklar sağlamaktadır. Bunlar Şekil 2.8'de gösterilen yarı-otomatik tübik sistemler ve otomatik kaset sistemleridir.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 sentezi,  $^{68}\text{Ga}$  eldesi, radyoişaretleme basamağı, pürfikasyon, son ürün eldesi ve kalite kontrol basamaklarından oluşmaktadır [23,29].



**Şekil 2-8:  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 sentez sistemleri**

Yaygın olarak jeneratörlerde  $^{68}\text{Ge}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$  veya organik polimerler içeren sütun matrislerine adsorbe edilir. Bu jeneratörlerden  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , 0.05 ila 1 M arasında değişen konsantrasyonlarda HCl peristaltik pompa yardımıyla jeneratörden geçirilme yoluyla elde edilir. Elde edilen elüsyon ya fraksiyonlama ile radyoışaretlemede kullanılır yada ön saflaştırma yapılır. Radyoışaretleme sentezinden önce ön-saflaştırma için Tablo 2.2'deki, anyon değiştirme kromatografisine, katyon değiştirme kromatografisine dayanan yöntemler geliştirilmiştir [25,30-32].

**Tablo 2-2:  $^{68}\text{Ge}$  /  $^{68}\text{Ga}$  jeneratörünün elüsyon yöntemleri**

Metot	Çözelti	Hacim	Katyon Kirliliği Azaltma	$^{68}\text{Ge}$ Eliminasyon
<b>Fraksiyonlama</b>	$\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$	1 ml	YOK	YOK
<b>Elüsyon Konsantrasyon ve Arıtma</b>				
<b>Anyonik Elüsyon</b>	$\text{H}_2\text{O}$	200 $\mu\text{l}$	Tek Adım: Al (>99%), In (>99%), Ti (90%)	VAR
<b>Katyonik Elüsyon</b>	Aseton/HCl	400 $\mu\text{l}$	2 Adım: Zn ( $\times 105$ ), Ti ( $\times 102$ ), Fe ( $\times 10$ )	
	NaCl/HCl	500 $\mu\text{l}$	Al, Ti ve Zn ( $\geq 99\%$ )	VAR
	Aseton/HCl	1000 $\mu\text{l}$	2 Adım: Ti (11%), Fe ( $\times 7$ )	

Hem fraksiyonlama hem de ön konsantrasyon yöntemlerinde kullanılan çözeltilerde hidroklorik asit ve kompleksleştirme için gerekli ortam pH'sının elde edilmesi için tampon çözeltiler kullanılır. Ayrıca, stabilize edici bir ajan olarak hareket etmek ve  $^{68}\text{Ga}$  (III) çökeltisini ve kolloid oluşumunu önlemek için zayıf tampon kompleksleşme kabiliyeti de gereklidir. Genel olarak HEPES ve asetat tamponlama sistemleri bunun için kullanılır. HEPES ve asetat tamponları biyolojik olarak uyumludur, toksisite sorunları yoktur, gerekli reaksiyon pH'ı sağlarlar ve stabilize edici ajanlar olarak işlev görürler [25,31,33].

Uygun tampon seçiminden sonra belirli konsantrasyonda PSMA peptidi ve tampon çözeltisi reaksiyon vialinde ( $^{68}\text{GaCl}_4$ )<sup>-</sup> ile belirli bir sürede reaksiyona sokulur ve işaretleme sağlanır [33,34]. Daha sonra işaretli ürün ve serbest  $^{68}\text{Ga}$  (III)'ü ayırmak için katı faz ekstraksiyon kartuşu (C18) kullanılarak saflaştırma işlemi yapılır. Son olarak ürün steril filtreden geçirilerek son ürün eldesi yapılır [33-35].

### 2.7.1. $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 Kalite Kontrolü

Avrupa farmakopesi  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in kalite kontrol (QC) hakkında herhangi bir kılavuz sunmamaktadır. Literatürde sentez sonucu yapılan kalite kontrol çalışmalarından söz edilmektedir. Bu çalışmalardaki kalite kontrol yöntemleri çoğunlukla, Galyum ( $^{68}\text{Ga}$ ) Edotreotid'i tarif eden Avrupa Farmakopesi (PhEur) monografına dayanmaktadır [10].  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 için standart QC testleri % radyokimyasal saflık, % kimyasal safsızlık ( $^{68}\text{Ga}^{+3}$ ) HPLC ve iTLC yöntemleri ile yapılır. HPLC literatür çalışmalarında radyokimyasal saflığı belirlemek için genellikle a) H<sub>2</sub>O (% 0,1 TFA'da) b) Asetonitril (% 0,1 TFA'da) sisteminden oluşan gradiyent HPLC metotları kullanılmaktadır. Kimyasal saflık testleri HPLC ve GC yöntemiyle ve radyonüklid safsızlık  $^{68}\text{Ge}$  içeriği  $^{68}\text{Ga}$  yarı ömür tayini yöntemiyle yapılmaktadır [10,30-32].

Limitler:

- Radyokimyasal saflık ( $^{68}\text{Ga}$ )-PSMA bileşiği: Galyum-68'e bağlı olarak toplam radyoaktivitenin en az yüzde 91'i.
- Radyonüklid saflık Galyum-68: toplam radyoaktivitenin en az yüzde 99.9'u.

## 2.8. Tasarımla Kalite (Quality By Design: QbD)

ICH'ye göre QbD, “Sağlam bilime ve kalite risk yönetimine dayanan, önceden tanımlanmış hedeflerle başlayan ürün, süreç anlayışını ve süreç kontrolünü vurgulayan, sistematik bir yaklaşım” olarak tanımlanmaktadır. Farmasötik ürün ve sistemlerin performans tutarlılığını sağlamak için son vurgu, yalnızca test etmekten ziyade “kalitenin” oluşturulmasına odaklanmıştır. Bu felsefe, Tasarımla Kalitenin (QbD) temelini oluşturur. QbD, uygun bir işlem tasarlama ve istenen ürün performansı için işlem performansını anlama ile ilgilidir. Genel şemadaki ana unsur, sürekli olarak süreç geliştirme sürecinde edinilen bilgilere dayanan iyileştirmedir. Kavram, bilimsel bilgi birikimi, üstün tasarım, performansın gösterilmesi, Kalite Risk Değerlendirmesi (QRM), Deneylerin Tasarımı (DoE), Süreç Analitik Teknolojisi (PAT) araçlarına odaklanan 'düzenleyici esneklik' ile işaretlenmiş 'istenen bir duruma' yönelir [37,38].

İlaç endüstrisi, ürün kalitesi, güvenliği ve verimliliği üzerine uzun yıllardır odaklanmıştır. Bunun sonucunda QbD (Design by Quality) ve PAT (Process Analytical Technology) gibi bilimsel araçlar uygulanarak ürün kalitesi arttırılmaktadır. QbD araçları, verimliliği ve kaliteyi artırarak riski en aza indirmektedir. Düzenleyici makamlar her zaman ICH kalite kılavuzlarının Q8 ile Q11 arasındaki uygulamalarını önermektedir [37,38].

Optimize etme, bundan maksimum faydayı elde etmek için bir sistemin, bir sürecin veya bir ürünün performansını iyileştirmek anlamına gelir. Optimizasyon terimi, analitik kimyada, mümkün olan en iyi yanıtı veren bir prosedürün uygulanacağı koşulların keşfedilmesinin bir aracı olarak yaygın şekilde kullanılmıştır [37,38].

Geleneksel olarak, analitik kimyadaki optimizasyon, bir seferde bir faktörün deneysel bir yanıt üzerindeki etkisinin izlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Sadece bir parametre değiştirilirken, diğerleri sabit bir seviyede tutulur. Bu optimizasyon tekniği tek faktörlü optimizasyondur. En büyük dezavantajı, çalışılan değişkenler arasındaki etkileşimli etkileri içermemesidir. Sonuç olarak, bu teknik parametrenin yanıt üzerindeki tam etkilerini göstermez. Tek faktörlü optimizasyonun diğer bir dezavantajı, araştırmayı yürütmek için gereken deney sayısındaki artıştır, bu da zaman ve harcamaların yanı sıra reaktif ve malzeme tüketiminde bir artışa yol açmasıdır [39,40].

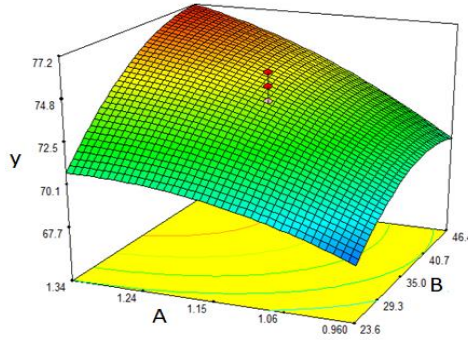
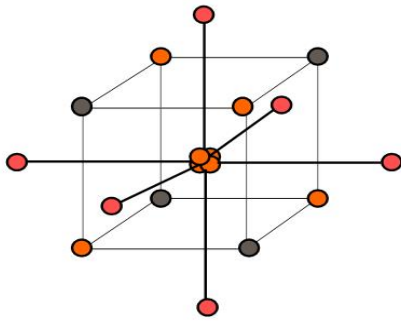
Son yıllarda, daha düşük reaktif tüketimi ve çok daha az laboratuvar çalışmasıyla sonuçlanan, yapılması gereken deney sayısındaki azalma gibi avantajları

göz önüne alınarak, analitik yöntemlerin optimizasyonuna sık sık kemometrik araçlar uygulanmıştır [41,42].

Tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik (descriptive and inference statistics), sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design), modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay akıl yöntemleri (Artificial intelligence methods), resim işleme (image processing), bilgi ve sistem kuramı (information and system theory) gibi konu başlıkları kemometrinin uygulama alanlarını oluşturmaktadır [43,44].

### 2.8.1. Yanıt Yüzeyi Metodolojisi (RSM)

Yanıt yüzeyi metodolojisi, 50'li yıllarda Box ve ortakları tarafından geliştirilmiştir. Bu terim, matematiksel modelin uygunluğundan sonra oluşturulan grafiksel bakış açısıyla ortaya çıkmıştır ve kullanımı, kemometri ile ilgili metinlerde yaygın olarak kabul edilmiştir. RSM, deneysel tasarımla ilgili olarak elde edilen deneysel verilere ampirik modellerin uygunluğuna dayanan bir grup matematiksel ve istatistiksel teknikten oluşur [45-46].



**Şekil 2-9: Yanıt Yüzeyi Metodolojisi Gösterimi**

Tepki yüzeyi metodolojisi, deneysel verilere bir polinom denkleminin sığdırılmasına dayanan matematiksel ve istatistiksel tekniklerden oluşan bir koleksiyondur ve istatistiksel engellemeler yapmak amacıyla bir veri kümesinin davranışını tanımlamalıdır (Şekil 2-9). Bir cevap veya bir dizi ilgi yanıtı birkaç değişkenden etkilendiğinde iyi uygulanabilir. Amaç, en iyi sistem performansını elde etmek için bu değişkenlerin seviyelerini eşzamanlı olarak optimize etmektir [45-46].

RSM uygulamasının bir optimizasyon tekniği olarak uygulanmasındaki bazı aşamalar şunlardır: (1) tarama çalışmaları ve deneysel bölgenin sınırlandırılması, çalışmanın amacına ve deneyime göre sistem üzerinde ana etkilerin bağımsız değişkenlerinin seçimi; (2) deney tasarımının seçimi ve seçilen deney matrisine göre deneylerin yapılması; (3) elde edilen deneysel verilerin bir polinom fonksiyonuna uygun olarak matematiksel - istatistiksel muamelesi; (4) modelin uygunluğunun değerlendirilmesi; (5) optimal bölgeye doğru bir yer değiştirme gerçekleştirme gerekliliğinin ve olasılığının doğrulanması; ve (6) çalışılan her değişken için optimum değerlerin elde edilmesi [41,43,46].

### **Değişkenlerin taranması**

Çok sayıda değişken, çalışılan sistemin tepkisini etkileyebilir ve her birinin küçük katkılarını tanımlamak ve kontrol etmek neredeyse imkansızdır. Bu nedenle, ana etkileri olan bu değişkenleri seçmek gerekir. Birkaç deneysel değişkenden hangisinin ve etkileşimlerinin hangilerinin daha önemli etkiler sunduğunu belirlemek için tarama tasarımları yapılmalıdır. Tam veya kesirli iki seviyeli faktoring tasarımları, temel olarak verimli ve ekonomik olmaları nedeniyle bu amaç için kullanılabilir [46-48].

### **Deneysel tasarım seçimi**

RSM'de kullanılacak en basit model doğrusal bir işleve dayanır. Uygulaması için, elde edilen cevapların aşağıdaki denklemle iyi şekilde uyması gerekir (2-1):

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon, \quad (2-1)$$

burada k değişkenlerin sayısı,  $\beta_0$  sabit terim,  $\beta_f$  doğrusal parametrelerin katsayılarını,  $x_f$  değişkenleri ve  $\varepsilon$ , deneylerle ilişkili artıkları ifade eder [46-48].

Bu nedenle, cevaplar herhangi bir eğrilik göstermemelidir. Eğriliği değerlendirmek için ikinci dereceden bir model kullanılmalıdır. İki seviyeli faktoring tasarımları, birinci dereceden etkilerin tahmininde kullanılır, ancak ikinci dereceden efektler gibi ek etkiler önemli olduğunda başarısız olurlar. Bu nedenle, iki seviyeli faktoring tasarımlarında merkezi bir nokta, eğriliği değerlendirmek için kullanılabilir. Polinom modelinin bir sonraki seviyesi, farklı deney değişkenleri arasındaki etkileşimi tanımlayan ek terimler içermelidir. Bu şekilde, ikinci dereceden bir etkileşim için bir model aşağıdaki terimleri sunar (2-2):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2-2)$$

$\beta_{ij}$ , etkileşim parametrelerinin katsayılarını temsil eder [46-48].

Kritik bir noktayı (maksimum, minimum veya eyer) belirlemek için, polinom fonksiyonunun aşağıda sunulan denkleme göre ikinci dereceden terimler içermesi gerekir (2-3):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2-3)$$

burada  $\beta_{ii}$ , kuadratik parametrenin katsayılarını temsil eder [46-48].

3'üncü eşitlikteki parametreleri tahmin etmek için, deneysel tasarım çalışılan tüm değişkenlerin en az üç faktör seviyesinde yapılmasını sağlamalıdır. Böylece iki modelleme, simetrik tepki yüzeyi tasarımı mevcuttur. Bilinen ikincil simetrik tasarımlar arasında üç seviyeli faktoring tasarımı, Box-Behnken tasarımı, merkezi kompozit tasarım ve Doehlert tasarımı bulunmaktadır. Bu simetrik tasarımlar, deney noktaları, değişkenler için seviye sayısı ve koşu sayısı ve blok sayısı bakımından birbirlerinden farklılık gösterir [46,47].

### **Verilerin matematiksel-istatistiksel olarak işlenmesi**

Seçilen bir tasarımın her bir deneysel noktası ile ilgili verileri aldıktan sonra, yanıtın davranışını çalışılan değerlerin seviyelerine göre tanımlamak için matematiksel denkleme uymak gerekir. Başka bir deyişle, Denklemlerin b parametrelerinin tahminleri yapılmalıdır [46,49].

Bu nedenle, matris notasyonunda denklem olarak temsil edilebilir (2-4).

$$y_{m \times 1} = X_{m \times n} b_{n \times 1} + e_{m \times 1}, \quad (2-4)$$

y, yanıt vektörü, X, seçilen deney tasarımının matrisi, b, model parametreleri tarafından oluşturulan vektör, e, artık ve m ve n, sırasıyla matrislerden gelen satır ve sütunların sayısını temsil eder [46-48].

### **Model Uygunluğunun değerlendirilmesi**

İşlevin verilere uygun hale getirilmesinden sonra bulunan matematiksel model, bazen çalışılan deneysel alanı tatmin edici bir şekilde tanımlayamaz. Takılan modelin

kalitesini değerlendirmek için daha güvenilir olan varyans analizi (ANOVA) uygulamasıdır. ANOVA'nın ana fikri, işlemde kaynaklanan değişimi (değişken seviyelerin kombinasyonundaki değişiklik), üretilen yanıtların ölçümlerine özgü rastgele hatalardan kaynaklanan değişikliklerle karşılaştırmaktır. Bu karşılaştırmadan itibaren, deneysel varyans kaynaklarını göz önüne alarak yanıtları öngörmek için kullanılan regresyonun önemini değerlendirmek mümkündür [46,49].

ANOVA'da, veri seti varyasyonunun değerlendirilmesi, dağılımını inceleyerek yapılır. Her bir gözlemin ( $y_i$ ) veya onun yinelenmelerinin ( $y_{ij}$ ) temalı ( $\bar{y}$ ) ile ilişkili olarak, veya daha kesin olarak, bu sapmanın karesiyle ilgili sapma ( $d_i$ ) değerlendirmesi denklem'de sunulmuştur (2-5) [46-48].

$$d_i^2 = (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (2-5)$$

### Optimal koşulların belirlenmesi

Doğrusal modeller tarafından oluşturulan yüzeyler, optimum koşullara ulaşmak için orijinal tasarımın yer değiştirmesi gereken yönü belirtmek için kullanılabilir. Bununla birlikte, deney bölgesi fiziksel veya araçsal nedenlerle yerinden edilemezse, araştırmacı, incelenen deneysel durum içindeki en iyi çalışma koşulunu görsel inceleme ile bulmalıdır [46-48].

Kuadratik modeller için kritik nokta maksimum, minimum veya eyer olarak tanımlanabilir. Kritik noktanın koordinatlarını, matematiksel fonksiyonun ilk türevi ile hesaplamak, yanıt yüzeyini tanımlayan ve onu sıfıra eşitlemek mümkündür. Aşağıda açıklanan iki değişken için elde edilen ikinci dereceden fonksiyon, örneği göstermek için kullanılır (2-6) [46,49].

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (2-6)$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = b_1 + 2b_{11}x_1 + b_{12}x_2 = 0 \quad (2-7)$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_2} = b_2 + 2b_{22}x_2 + b_{12}x_1 = 0 \quad (2-8)$$

Bu nedenle, kritik noktanın koordinatını hesaplamak için, denklemlerin oluşturduğu birinci sınıf sistemi çözmek gerekir. (2-7) ve (2-8) ve  $x_1$  ve  $x_2$  değerlerini bulmak gerekir [46-48].

Tahmini model denkleminin görselleştirilmesi, yüzey yanıt grafiği ile elde edilebilir. Bu grafiksel gösteriliş,  $(n + 1)$  boyutlu uzaydaki  $n$  boyutlu bir yüzeydir



(Şekil2-8). Genellikle, üç boyutlu bir çizimin iki boyutlu bir gösterimi çizilebilir. Dolayısıyla, üç veya daha fazla değişken varsa, arsa görselleştirmesi yalnızca bir veya daha fazla değişken sabit bir değere ayarlandığında mümkündür [46-48].

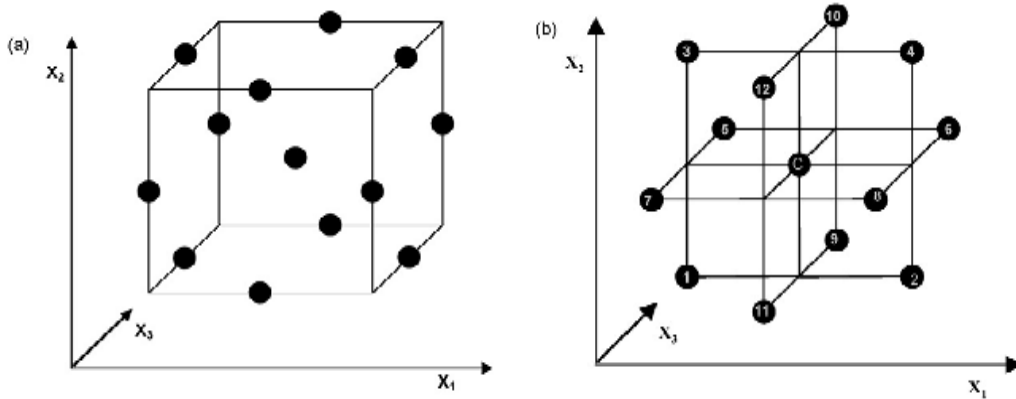
Bununlarla birlikte, doğrusal fonksiyonlarla tanımlanamayan deneysel verilere bir cevap fonksiyonunu yaklaştırmak için, üç faktörlü faktoring, Box-Behnken, merkezi kompozit ve Doehlert tasarımları gibi kuadratik yanıt yüzeyleri için deneysel tasarımlar kullanılmalıdır [46-48].

### 2.8.2. Box-Behnken Tasarımı

Box-Behnken tasarımları (BBD), üç seviyeli eksik faktoring tasarımlarına dayanan, dönebilen veya neredeyse dönebilen ikinci dereceden tasarımların bir sınıfıdır [50-52]. Üç faktör için grafiksel gösterimi iki biçimde görülebilir:

1a. Şekil 2.10a'da görülebileceği gibi merkez nokta ve kenarların orta noktalarından oluşan bir küp.

1b. Şekil 2.10b'de gösterildiği gibi üç birbirine geçen  $2^2$  faktörlü tasarımın bir rakamı ve bir merkezi nokta.



**Şekil 2-10: (a) BBD için küp ve (b) üç birbirine geçen  $2^2$  faktoring tasarımı**

BBD'nin gelişimi için gereken deney sayısı (N), denklem 2-9'da tanımlanır.

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (2-9)$$

Burada k, faktörlerin sayısı ve  $C_0$ , merkezi noktaların sayısıdır. Karşılaştırma için, merkezi bir kompozit tasarım için deney sayısı  $N = 2k + 2k + C_0$ 'dir. Tablo 2-3'de BBD için üç faktör seviyesi kodlanmış değerlerini gösterir [50-52].

**Tablo 2-3: Üç değişkenli bir sistemin bir Box-Behnken tasarımı için kodlanmış faktör seviyeleri**

Deney	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
C	0	0	0
C	0	0	0
C	0	0	0

Box-Behnken tasarımları genellikle merkezi kompozit tasarımlardan daha az tasarım noktasına sahiptir, bu nedenle aynı sayıda faktörle çalışması daha ucuzdur. Birinci ve ikinci dereceden katsayıları verimli bir şekilde tahmin edebilirler; Bununla birlikte, bir faktör deneyinden elde edilen çalışmaları içeremezler [50-52].

Box-Behnken tasarımları, 5'e kadar olan merkezi kompozit tasarımların aksine, her zaman faktör başına 3 seviyeye sahiptir. Ayrıca, merkezi kompozit tasarımların aksine, Box-Behnken tasarımları, tüm düşük faktörlerin tümü gibi tüm faktörlerin uç ayarlarında olduğu çalışmaları içermez [50-52].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Ekipmanlar, Malzemeler ve Kimyasallar

Tez çalışması kapsamında yer alan laboratuvar çalışmaları Ocak – Haziran 2019 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Radyofarmasi Laboratuvarında yapılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan ekipmanlar, malzemeler ve kimyasallar sırası ile Tablo 3-1, Tablo 3-2, Tablo 3-3’de verilmiştir.

**Tablo 3-1: Tez kapsamında kullanılan ekipmanlar**

<b>Ekipmanlar</b>	<b>Markası</b>
Sentez Cihazı	Eckert & Ziegler Modular-Lab Standard
Doz Kalibratörü	Capintec CRC-25W
	Shimadzu LC 20AT , LC solution yazılımı
	SIL-20 AT Otomatik numune örnekleyici
HPLC Cihazı	DGU- 20A5 Vakumlu gaz giderici
	CTO-10 AS Kolon fırını
	SPD-20A UV-Vis Dedektör
Otoradyografi Fosfor Görüntüleyici	Cyclone Plus PerkinElmer
Radyometrik-HPLC Dedektör	BioScan B-FC-3200
Otoradyografi cihazı	Perkin Elmer Cyclon Plus
pH Metre	Milwaukee MW102
Hasas Terazi	Precisa XB220A
LAF Kabini	Nuaire

**Tablo 3-2: Tez kapsamında kullanılan malzemeler**

<b>Malzemeler</b>	<b>Markası</b>
Acclaim C-18 3µm 120A 4,6×150 mm	Thermo Fisher Scientific
SCX SPE Kartuş	Bond Elut Agilent
Sep-Pak Lite C-18 Kartuş	Merck
Enjektör (1mL, 5mL, 10mL)	Beybi
Steril Vial 15mL	Huayi
Steril Filtre 22µm PVDF	Millex-GV
Otomatik Pipet	Eppendorf
Pipet Ucu ( 20 µL-1000 µL)	Eppendorf
ITLC-SG Kromatografi Kağıdı	Agilent

**Tablo 3-3: Tez kapsamında kullanılan kimyasallar**

<b>Kimyasallar</b>	<b>Markası</b>
<sup>68</sup> Ge/ <sup>68</sup> Ga Jeneratörü	Isotopen Technologies Garching GmbH
DKFZ-PSMA-11	ABX pharmaceuticals
Hidroklorik Asit ( %30 HCl)	Merck
Sodyum asetat trihidrat	Merck
Sodyum Klorür	Sigma Aldrich

---

Amonyum Asetat	Sigma Aldrich
Sodyum Sitrat	Sigma Aldrich
Glasiyel Asetik Asit (CH <sub>3</sub> COOH)	Sigma Aldrich
Etanol	Merck
Metanol	Merck
Serum Fizyolojik (%0,9 NaCl)	MSpharma
Su	Polifarma
Azot Gazı	HABAŞ

---

### 3.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması

#### 3.1.2.1. Sentez Çözeltileri

##### DKFZ-PSMA-11 Çözeltisi

Katı haldeki 1 mg PSMA-11 1000 mL de-iyonize suda çözülmüş, 250 mL'lik mikro tüplerde porsiyonlara ayrılmış ve -20 °C'de saklanmıştır.

##### 0,05 M HCl Jeneratör Sağım Çözeltisi

% 30 HCl stok çözeltisinden 5,064 mL alınarak 250 mL suya eklenmiş, son hacim 1000 mL'ye su ile tamamlanmıştır.

##### Sodyum Asetat Çözeltisi

6,80 g sodyum asetat trihidrat hassas terazide tartılarak 50 mL lik balonjojeye aktarılmıştır. Su ile hacmine tamamlandıktan sonra başka bir kaptaki 1 mL % 30 HCl çözeltisinden eklendikten sonra 3 farklı tampon çözelti pH 4,00-4,50 ve 5,50 olacak şekilde glasiyel asetik asit çözeltisi eklenerek pH metre yardımı ile hazırlanmıştır. Eklenmesi gereken glasiyel asetik asit miktarları pH 4,00-4,50 ve 5,00 için sırasıyla 3 mL- 2,2 mL- 500 µL'dir.

### **1M Amonyum Asetat Çözeltisi**

19,27 g amonyum asetat hassas terazide tartılarak 250 mL lik balonjojede su ile çözülüp hacmine tamamlanmıştır.

### **SCX Kartuşu Sağım Çözeltisi**

10 mL lik balonjojeye % 30 HCl çözeltisinden 5,83 mL aktarılmış ve su ile hacmine tamamlanarak 5,5 M HCl çözeltisi hazırlanmıştır. Hassas terazide 14,61 g NaCl tartılarak 50 mL lik balonjojeye aktarılmış ve su ile hacmine tamamlanarak 5 M NaCl çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan 5 M NaCl çözeltisine 1,25 mL 5,5 M HCl çözeltisi eklenerek sağım çözeltisi elde edilmiştir.

### **3.1.2.2. HPLC Çözeltileri**

HPLC metod validasyonu için farklı konsantrasyonda bir seri PSMA-11 çözeltisi hazırlanmıştır.

#### **Blank Çözeltisi**

10 ml Asetonitril / Su (1:1) çözeltisi blank olarak kullanılmıştır.

#### **Standart Stok Çözelti:**

1 g PSMA-11 standardı 1 mL suda çözülmüştür (1 mg/mL). Bu stoktan 40 µL çözelti alınarak 1 mL'ye blank çözeltisi ile tamamlanmıştır (40 µg /mL).

#### **Çalışma Çözeltileri:**

**15 µg/ mL:** Stok çözeltiden 375 µL alınmış ve hacmi 1 mL'ye blank çözeltisi ile tamamlanmıştır.

**10 µg / mL:** Stok çözeltiden 250 µL alınmış ve hacmi 1 mL'ye blank çözeltisi ile tamamlanmıştır.

**5 µg / mL:** Stok çözeltiden 125 µL alınmış ve hacmi 1 mL'ye blank çözeltisi ile tamamlanmıştır.

**2,5 µg / mL:** 5 µg/ mL çözeltiden 500 µL alınmış ve hacmi 1 mL'ye blank çözeltisi ile tamamlanmıştır.

**1,25 µg / mL:** 2,5 µg / mL çözeltiden 500 µL alınmış ve hacmi 1 mL'ye blank çözeltisi ile tamamlanmıştır.

**0,5 µg / mL:** 5 µg / mL çözeltiden 100 µL alınmış ve hacmi 1 mL'ye blank çözeltisi ile tamamlanmıştır.

### 3.1.3. Kartuşların Hazırlanması

#### C-18 Sep-Pak Lite Kartuşun Şartlandırılması

C-18 Sep- Pak Lite katı faz ekstraksiyon kartuşu sırasıyla 5 mL etanol ve 5 mL serum fizyolojik çözeltisi geçirilerek şartlandırılmıştır.

#### Bond Elut SCX Kartuşun Şartlandırılması

Bond Elut SCX katı faz ekstraksiyon kartuşu sırasıyla 1 mL 5,5 M HCl çözeltisi ve 10 mL de-iyonize su geçirilerek şartlandırılmıştır.

## 3.2. YÖNTEM

Tez çalışması iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

İlk aşamada, QbD ile <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 hazırlama kritik parametreleri tespit edilmiş ve bu değişkenlere bağlı olarak optimum sentez koşulları belirlenmiştir.

İkinci aşamada ise QbD ile belirlenen optimum sentez koşullarında hazırlanan <sup>68</sup>Ga-PSMA-11'in hastaya uygulanmadan önce rutin kalite kontrollerinde kullanılmak üzere yeni bir HPLC metodu geliştirilmiş ve validasyonu gerçekleştirilmiştir.

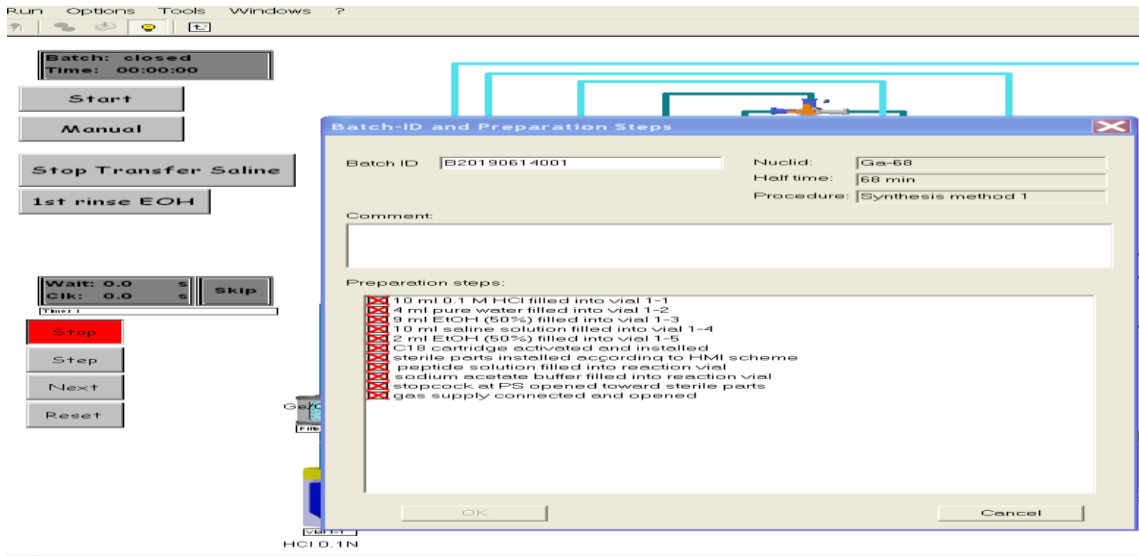
Tez çalışması kapsamında kimyasal, radyokimyasal saflık ve RR konfigürasyon oranı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) ve İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) yöntemleri ile tayin edildikten sonra <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentezinin kritik proses parametreleri belirlenmiş ve bu değişkenlere bağlı olarak sayısal optimizasyon uygulaması yapılmıştır.

### 3.2.1. <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 Hazırlık Basamakları

Yöntem 3.2.2 de genel olarak belirtilen <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentez işlemine başlamadan önce otomatik sentez ünitesi sisteminden gelen ön hazırlık adımları tek tek D sınıfı içerisinde bulunan LAF kabini içerisinde yapıldı. Şekil 3-1'de gösterilen Ön hazırlık adımları aşağıda özetlenmiştir;

- 1- Son ürün için steril filtre alındı ve ucuna uzun sarı iğne bağlandı.

- 2- Hazırlanan steril filtre-iğne 15 mL'lik steril son ürün vialine batırılarak son ürün viali hazırlandı.
- 3- 1ml'lik şırınga alınarak içerisine 800 ul SCX elüsyon çözeltisi çekildi. Bu işlem sırasında metal iğne kullanıldı.
- 4- Buzdolabından PSMA-11 mikro tüpü alınarak içerisindeki PSMA-11 çözeltisi eritildi.
- 5- Reaksiyon viali alınarak içerisine otomatik pipet kullanılarak Tablo 3-5'de yapılacak deney sırasında kullanılacak daha önce hazırlanan tampon çözeltilerden ( pH 4,00-pH 4,50 veya pH 5,00) 400 µL koyuldu.
- 6- Daha sonra reaksiyon vialine yapılacak deney sırasına uygun miktarda ( 5 µL, 10 µL veya 15 µL) otomatik pipet ile eriyen PSMA-11 çözeltisi eklendi.
- 7- 10 mL'lik şırınga alındı ve içerisine 10 mL serum fizyolojik çekildi.
- 8- Sentez ünitesinin kontrolünün sağlandığı bilgisayar açıldı. Bilgisayar ile sentez ünitesi arasında bağlantı sağlayan Elektrik Kabini üzerinde bulunan güç düğmesini ON pozisyonuna çevirerek açıldı. Daha sonra bilgisayar üzerinden Modular- Lab programı çalıştırıldı. Kullanıcı adı ve şifre bilgileri girildi. Açılan arayüzden Project kısmından PSMA sentez programı seçildi ve çalıştırıldı.
- 9- 3 ve 7 numaralı basamaklarda hazırlanan çözeltiler sentez ünitesindeki uygun viallere boşaltıldı.



Şekil 3-1: <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentez ön hazırlık adımları basamakları





### 3.2.3. QbD ile <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 Hazırlanması

Tez kapsamında deneysel sonuçlardan yararlanılarak bir matematiksel model oluşturulması ve seçilen kriterlere göre optimum sentez koşullarının belirlenmesi için Design Expert programı kullanılmıştır.

Deneylerin ilk aşamasında, <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentezinde bağımsız proses parametreleri ve bunları bağlı değişkenler belirlenmiştir. Proses parametresi olarak literatür taramaları sonucu senteze etki eden *pH*, *peptid konsantrasyonu*, *reaksiyon sıcaklığı* ve *süresi* bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Bunlara bağlı cevap olarak *radyo kimyasal saflık* ve *diastereomer yapısı* seçilmiştir. Her bir bağımsız değişken için belirlenen sınır değerleri Design Expert programına girilmiştir. Programın belirlediği deneyler belirlenen koşullarda yapılmış ve buna göre optimizasyon prosedürü gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar belirlenirken Design-Expert 10.0.0 programı sürümü altındaki Tepki-Yüzeyi Metodolojisi (RSM) içindeki Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır.

Program üzerinde deney tasarımı yapılırken ve proses parametreleri belirlenirken aşağıda verilen temel kriterler uygulanmıştır.

- 1- Deney tasarımında sentezi etkilediği düşünülen parametreler seçilirken literatür taraması yapılmış ve bu doğrultuda sentezi etkileyen kritik parametreler belirlenmiştir.
- 2- Deney tasarımında her bağımsız değişkene karşı sistemin cevabının net olarak ölçülebilmesi göz önünde bulundurularak cevap yüzeyleri belirlenmiştir.
- 3- Bağımsız değişkenler için değişim aralığı -1, 0, +1 olarak kodlanan değerler literatür çalışması sonucu birbirlerine eşit uzaklıkta seçilmiş ve tasarım oluşturulurken alt (-1) ve üst limit (+1) değerleri belirlenmiştir.

Tablo 3-4'de Design Expert programında kullanılan cevap ve sentez parametreleri ile değişim aralıkları belirtilmiştir.

**Tablo 3-4: Cevap-Proses Parametreleri ve değişim aralıkları**

Bağımsız Değişken	Değişim Aralığı			Cevap
	-1	0	+1	
pH	3,00	3,75	4,50	
Reaksiyon Sıcaklığı	85 °C	95 °C	105 °C	% Radyokimyasal Saflık
Reaksiyon Süresi	120 s	210 s	300 s	% RR
PSMA-11 Miktarı	5 µg	10 µg	15 µg	

Tez çalışmasında, maksimum radyokimyasal saflık (RKS) % ve RR konfigürasyon oranı (RR %) değerlerini verecek sentez parametreleri Tablo 3-5’de yer alan deneyler ile yapılan optimizasyon çalışması sonucu belirlenmiştir.

**Tablo 3-5: Deneysel Tasarım Optimizasyonu**

Std Run	A:PSMA-11		B:R.sıcaklığı	C:pH	D:R.süresi	RKS	% RR
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Response 1	Response 2	
	µg	°C	pH	s	%	%	
25	1	10	95	3,75	210		
13	2	10	85	3,00	210		
26	3	10	95	3,75	210		
11	4	5	95	3,75	300		
16	5	10	105	4,50	210		
4	6	15	105	3,75	210		
19	7	5	95	4,50	210		
18	8	15	95	3,00	210		
24	9	10	105	3,75	300		
20	10	15	95	4,50	210		
7	11	10	95	3,00	300		
14	12	10	105	3,00	210		
27	13	10	95	3,75	210		
2	14	15	85	3,75	210		
5	15	10	95	3,00	120		
8	16	10	95	4,50	300		
10	17	15	95	3,75	120		
17	18	5	95	3,00	210		
1	19	5	85	3,75	210		
21	20	10	85	3,75	120		
6	21	10	95	4,50	120		

22	22	10	105	3,75	120
9	23	5	95	3,75	120
23	24	10	85	3,75	300
3	25	5	105	3,75	210
12	26	15	95	3,75	300
15	27	10	85	4,50	210
28	28	10	95	3,75	210
29	29	10	95	3,75	210

\*RKS: Radyokimyasal saflık; R.S: reaksiyon sıcaklığı R.suresi: reaksiyon süresi

### 3.3. <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 Deneysel Tasarım Cevaplarının Belirlenmesi

Deney tasarımının <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 hazırlanmasına etkisi aşağıda belirtilen kriterlerin analiz verilerine göre belirlenmiştir.

- 1) Radyokimyasal saflığın belirlenmesi
- 2) Diastereomer yapısının belirlenmesi

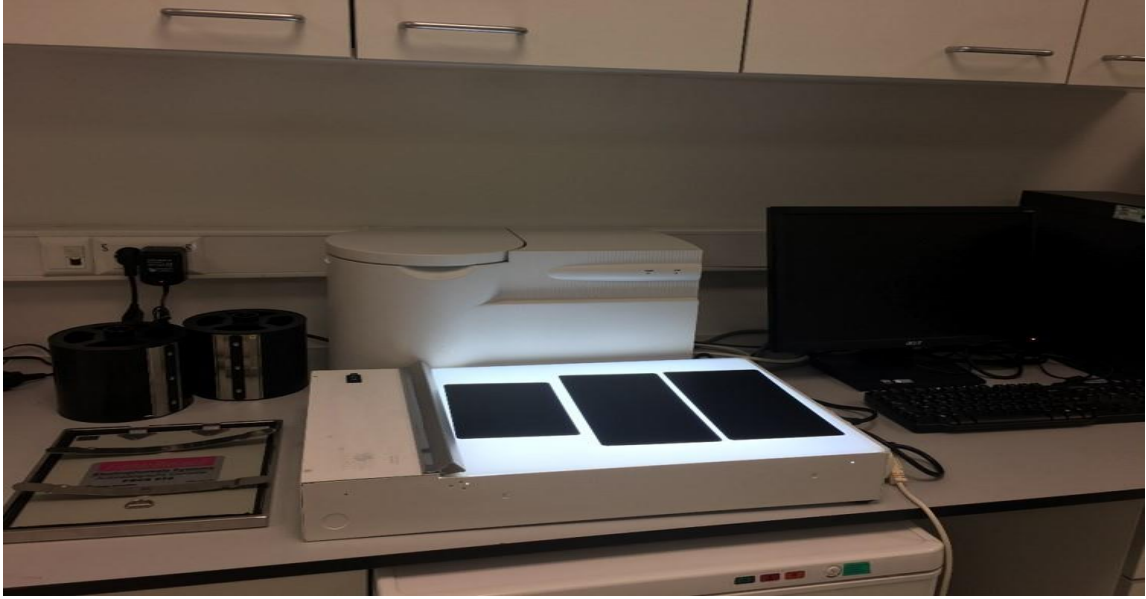
Radyokimyasal saflık HPLC ve TLC yöntemleri, diastereomer yapısı HPLC metodu kullanılarak belirlenmiştir.

#### 3.3.1. TLC Yöntemi

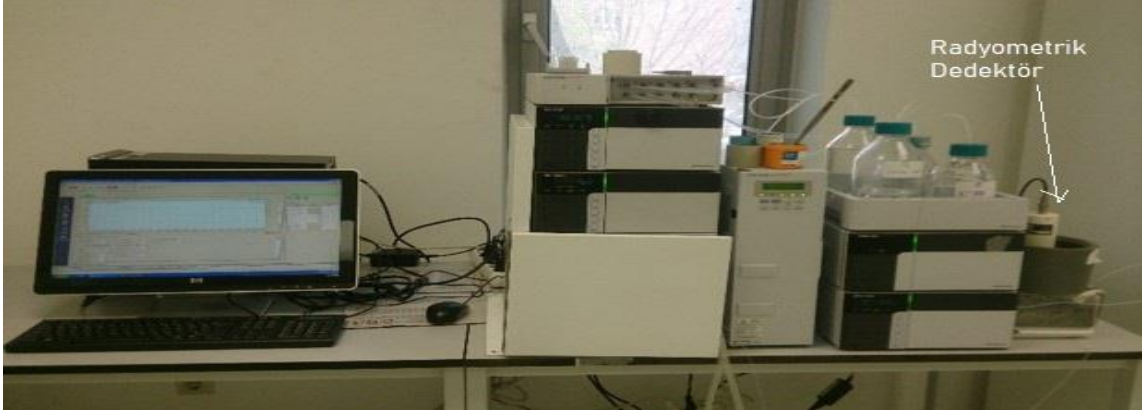
Yöntem 3.2.1’de belirtildiği gibi hazırlanan <sup>68</sup>Ga-PSMA-11’in radyokimyasal saflık analizi kağıt kromatografisi yöntemi kullanılarak yapılmıştır. iTLC ile radyokimyasal saflığın belirlenmesinde Tablo 3-6 kullanılmıştır. Son ürün vialinden alınan 300-1000 µCi aktiviteye sahip örnek, önceden 1x10 cm boyutlarında hazırlanmış olan iTLC-SG kromatografi kağıdının (silika jel (SG) emdirilmiş, bağlayıcı içermeyen, cam mikrofiber kromatografi kağıdı) orjin kısmına damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra kromatografi kağıdı, içerisinde Tablo 3-6’da belirtilen mobil faz bulunan behere orjin noktası mobil faz çözeltisi seviyesinin üzerinde kalacak şekilde yerleştirilerek numunenin kromatografi kağıdı üzerinde yürütülmesi sağlanmıştır. Yürüme işlemi tamamlandıktan sonra kromatografi kağıdı mobil fazdan çıkartılıp kurutulmuştur. Kromatografi kağıdı üzerindeki radyoaktivite dağılımı otoradyografi (Cyclone Plus, depolama fosfor sistemi) ile taranarak analiz edilmiştir ( Şekil 3-3) [34].

**Tablo 3-6: Radyokimyasal Saflığı Belirmede Kullanılan TLC yöntemi**

<b>Sabit Faz</b>	ITLC-SG kağıt (silika jel (SG) emdirilmiş, bağlayıcı içermeyen, cam mikrofiber kromatografi kağıdı)
<b>Mobil Faz</b>	1M Amonyum asetat/ metanol (1:1)

**Şekil 3-3: Cyclone Plus depolama fosfor sistemi****3.3.2. HPLC Yöntemi**

QbD ile  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 hazırlanması ve optimizasyon çalışmaları sırasındaki ( RKS % ve Sİ %) radyokimyasal saflık analizlerinde literatürdeki HPLC yöntemi kullanılmıştır [29,35,36]. Radyokimyasal saflık UV dedektörle görüntülenemediği için Şekil 3-4'de gösterilen radyometrik dedektörlü HPLC sistemi kullanılmıştır.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in hazırlanmasında optimum koşullar belirlendikten sonra optimum koşullarda yapılan sentez sonuçlarını kontrol etmek üzere alternatif yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır.



**Şekil 3-4: Radyometrik Dedektörlü HPLC sistemi**

### 3.4. <sup>68</sup>Ga-PSMA-11'in Radyokimyasal Safılık ve Diastereomer Oranı Belirlemek İçin Alternatif HPLC Yöntemi Geliştirme

<sup>68</sup>Ga-PSMA-11'in rutin kalite kontrolünde kullanılmak üzere alternatif bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve kolon boyu, akış hızı ve farklı mobil faz konsantrasyonlarının sonuca etkisi incelenmiştir.

#### 3.4.1. Geliştirilen HPLC Yöntemi Koşulları

Çalışma boyunca Radyokimyasal safılık ve diastereomer oranı belirlenmesi için radyometrik dedektör kullanılırken kimyasal safılık için UV dedektör kullanılmıştır, geri kalan analiz koşulları (mobil faz, kolon) her iki dedektör için de ortaktır. Radyoaktif dedektör ve UV dedektör arasındaki mesafe nedeniyle PSMA-11 ile <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 alıkonma süreleri farklıdır.

Analitin apolar yapısı nedeniyle ters faz kromatografi çalışılmış olup C18 yapılı İnertsil ODS-3: 5 µm 4,6 I.D. × 250 mm ve Acclaim 120: 3 µm 4,6 I.D. × 150 mm analitik kolonlar ve asetonitril, çeşitli konsantrasyonlarda o-fosforik asit çözeltisi, trifloroasetik asit çözeltisi ve metanol mobil faz kombinasyonları olarak denenmiştir. 0,6- 0,8- 1,0 mL olarak farklı akış hızları denendikten sonra ve 220, 254 ve 280 nm dalgaboylarında UV dedeksiyon ile çalışılmıştır.

Geliştirilen alternatif HPLC yöntemine ait koşullar Tablo 3-7'de verilmiştir.

**Tablo 3-7: Geliştirilen HPLC yöntemi koşulları**

Mobil Faz	A: 20mM orto-Fosforik Asit (Suda)
	B: 20mM orto-Fosforik Asi (Asetonitrilde)

---

	0-6 dk %10 B - %60 B
	6-7 dk %60 B - %80 B
Gradyent Program	7-8 dk %80 B
	8-11 dk %80 B - %10 B
Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Kolon	Acclaim C-18 3µm 120A 4,6×150 mm
Dedektör	UV Dedektör Radyometrik Dedektör
Sıcaklık	40 °C

---

### 3.4.2. Geliştirilen HPLC-UV Metodunun Validasyonu

<sup>68</sup>Ga-PSMA-11'nin kimyasal saflığının belirlenmesi için analitik yöntemin validasyonu, ICH Q2 (R1) yönergelerine göre yapılmıştır [36]. Yöntem seçicilik, doğrusallık ve kesinlik (tekrarlanabilirlik) parametreleri açısından valide edilmiştir.

**Seçicilik:** Seçicilik, bitmiş ürün <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 çözeltisinde bulunabilecek kritik bileşenleri içeren karışımın analiz edilmesi ve yöntemin sınırlı konsantrasyonda mevcut çeşitli bileşenleri, belirtilen standartlar için ayırt edebildiğini göstererek gerçekleştirilir. <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 için geliştirilen sentez yöntemi, serbest galyum-68 hariç kimyasal safsızlıklar içermemektedir. Analizler PSMA-11 içeren bir dizi çözelti kullanılarak yapılmıştır.

Kabul kriteri: Boş denemelerden gelebilecek pikler PSMA-11 ve serbest galyum-68 /<sup>68</sup>Ga-PSMA-11'in geldiği alıkonma zamanlarında pik vermemelidir.

**Doğrusallık:** <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 radyo-aktif madde olduğu ve analiz süresince yarılındığından doğrusallık PSMA-11 üzerinden çalışılmıştır. Bir analitik metodun

doğrusallığı, numune çözeltilerinde analiz edilen maddenin konsantrasyon değerlerine karşılık elde edilen analiz sonuçlarının belirli bir aralık dahilinde doğrusal olması olarak açıklanır. PSMA-11 'i 6 farklı konsantrasyonda (15,00-10,00-5,00-2,50-1,25 ve 0.50 µg / mL) içeren çözeltiler hazırlandıktan sonra geliştirilen metotla analiz edilmiş ve kromatogramlardan elde edilen PSMA-11 pik alanlarına karşılık konsantrasyona değerlerinin kullanıldığı doğrusallık grafikleri çizilmiştir. En küçük kareler yöntemi kullanılarak alan ortalama değerlerinden  $A = mC + b$  [ $m =$  eğim,  $b =$  kesim noktası,  $C =$  konsantrasyon] doğru denklemi elde edilmiş ve değişkenler ve korelasyon katsayıları ( $R$ ) hesaplanmıştır.

Kabul kriteri: Doğrusallık grafiğinin determinasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0,99 dan az olmamalıdır.

**Kesinlik (Tekrarlanabilirlik):** Yöntemin kesinliği, gün-içi ve günler arası (3 farklı gün) kesinlik olmak üzere yapılan analizler sonucu elde edilen değerlerin birbiriyle olan uyum ve yakınlığı olarak incelenmiştir. Çalışma aynı günde ve farklı günlerde, 15,00-5,00-1,25 µg/mL lik konsantrasyonlarda PSMA-11 analiziyle gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiği kullanılarak elde edilen analiz sonuçlarından konsantrasyonları hesaplanmış ve hesaplanan sonuçların ortalama, standart sapma (SD), % bağıl standart sapma (RSD) değerleri bulunmuştur.

Kabul kriteri: RSD değerleri % 2 den az olmalıdır.

### 3.4.3. Radyometrik Dedektörlü HPLC Metodunun Validasyonu

Radyoaktif bileşiklerin metot validasyonunda, radyoaktif maddenin yarılanması nedeniyle ICH kılavuzundaki parametrelerin bir kısmı uygulanamamaktadır.

**Doğrusallık:** Doğrusallık çalışması ile radyometrik dedektör sinyalinin  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değiştiği gösterilmiştir. Doğrusallığın incelenmesi için, (örneğin referans zamanına bağlı olarak) radyoaktif konsantrasyon değerinden, verilen zamana bağlı  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'nin radyoaktif konsantrasyonları hesaplandı. Aralıkta, farklı konsantrasyonlara sahip olan standartlar ölçümle değil, sırasıyla enjeksiyon zamanına bağlı konsantrasyonun hesaplanması ve radyokimyasal bozunmanın belirlenmesiyle belirlenmiştir. Doğru denklemi  $\ln A_0 = \ln A + \lambda t$  olarak verilmekte olup burada  $\lambda = 0,693 / t_{1/2}$ ,  $A_0 =$  düzeltilmiş tepe alanı,  $A =$



ölçülen tepe alanı,  $t =$  düşünülen enjeksiyon ile birincisi arasındaki zaman aralığı  $t_{1/2} =$  yarı ömürdür ( $^{68}\text{Ga} = 67.63$  dk).

**Kesinlik (Tekrarlanabilirlik):** Radyonüklid  $^{68}\text{Ga}$ 'nın bozunması nedeniyle radyoaktivite zaman içinde azalmaktadır. Tekrarlanabilirlik, tek bir  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 numunesinin tekrarlayan enjeksiyonları ile elde edilen HPLC sonuçlarında tepe alanı değerlerinin bozunma denklemi ile yeniden hesaplanması yoluyla değerlendirilmiştir.

**Doğruluk:** Bir analitik yöntemin doğruluğu, bu yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığıdır. HPLC sisteminde, numunenin sisteme verildiği enjektör ile radyoaktif ve UV detektörler arasındaki mesafelerin farklı olması nedeniyle alıkonma zamanları da farklılık göstermektedir.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'nin retansiyon zamanı (RR ve RS konfigürasyonları,  $R_t$  değerleri), referans standardı (PSMA-11) retansiyon zamanı ile aynı ( $\pm\% 10$ ) olmalıdır.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in  $R_t$  değeri, RR ve RS konfigürasyonlarının radyometrik dedektör  $R_t$  değerleri ortalaması alınarak belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Analitik Validasyon Çalışmasına Ait Bulgular

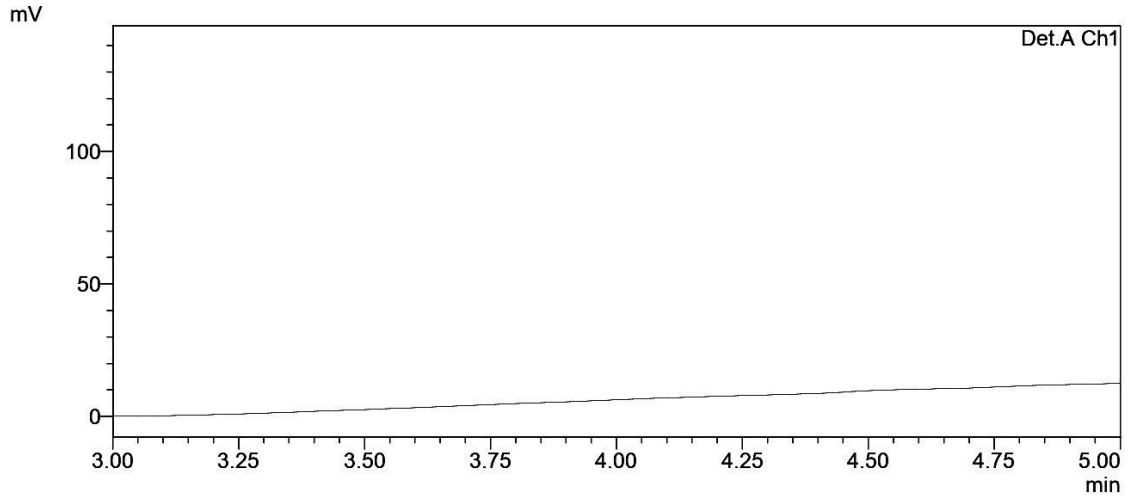
#### 4.1.1. Kromatografi Koşullarının Belirlenmesi

Yapılan ters faz sıvı kromatografik metot geliştirme çalışmaları sonucunda stasyonier faz olarak denenen iki farklı C18 kolondan Acclaim 120: 3  $\mu$ m 4,6 I.D.  $\times$  150 mm kolon diğerine kıyasla kısa ve küçük partikül çaplı oluşu nedeniyle tercih edilmiş, piklerde bant genişlemesi ve kuyruklanma gözlenmemiş, retansiyon zamanında literatürden daha kısa retansiyon elde edilmiştir. HPLC blank kromatogramı Şekil 4-1 elde edilmiştir.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in radyometrik dedektör retansiyon zamanları (Rt) RR konfigürasyonu- 4.367 dk, RS konfigürasyonu-4.595 dk bulunmuştur (Şekil 4-3) . UV dedektör Rt değerleri RR-4.154 dk, RS-4.285 dk bulunmuştur (Şekil 4-2).

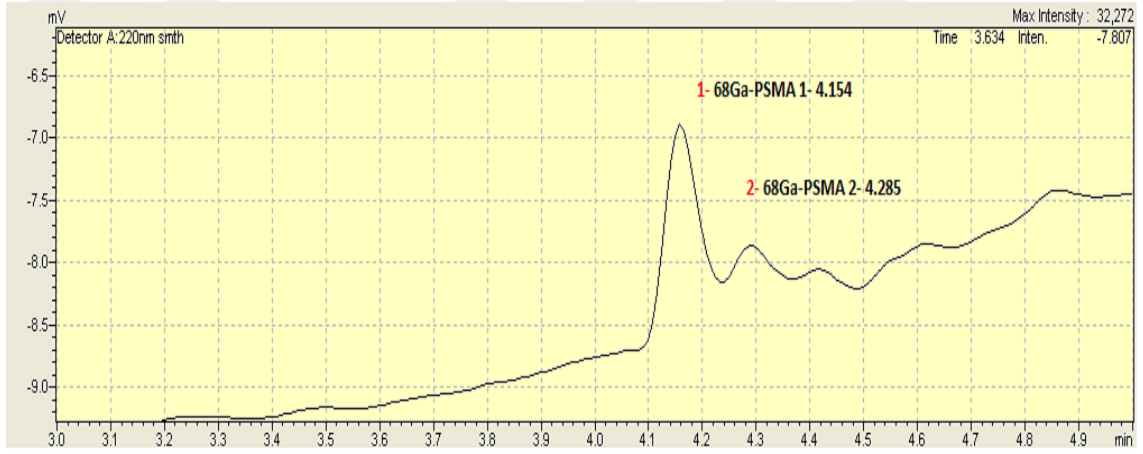
Mobil faz olarak orto-Fosforik asit çözeltisinin 10 ve 20mM olmak üzere 2 farklı konsantrasyonu asetonitril ve metanol kombinasyonları ile denenmiş, optimum rezolusyon 20mM orto-Fosforik asit çözeltisi ve asetonitril karışımının gradiyent elüsyonu ile elde edilmiştir. Çalışılan gradient program Tablo 4-1'de verilmiştir. Akış hızı olarak 0,6 ve 1 mL/dak denenmiş ve 1 mL/dak ile istenen retansiyon sağlanmıştır. Dedektör dalga boyu olarak 220 ve 280 nm denemelerinden sonra 220 nm ile daha hassas sonuçlar elde edilmiştir. Analiz boyunca kolon sıcaklığı 40°C ve enjeksiyon hacmi 20  $\mu$ L olarak ayarlanmıştır.

**Tablo 4-1: Gradient program**

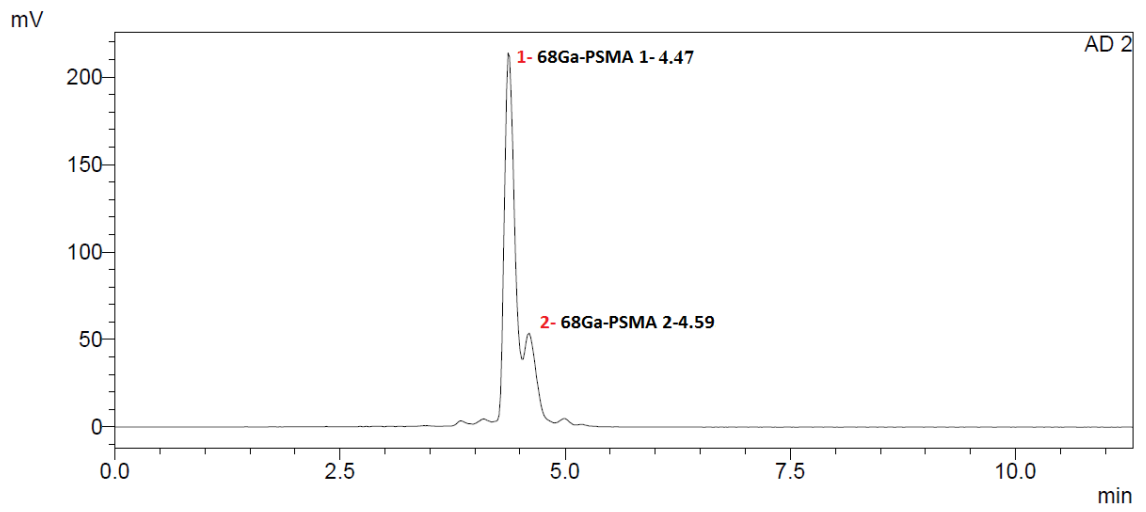
Zaman (dk)	% A: 20 mM orto-Fosforik Asit (Suda)	% B: 20 mM orto-Fosforik Asit (asetonitrilde)
0	90	10
6	40	60
7	20	80
8	20	80
11	90	10



Şekil 4-1: Blank UV Kromatogramı



Şekil 4-2:  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 UV Kromatogramı (0,5 µg/mL)



Şekil 4-3:  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 Radyometrik Dedektör Kromatogramı

#### 4.1.2. HPLC-UV Yöntem Bulguları

**Seçicilik:** Elde edilen blank ve madde çözelti kromatogramları karşılaştırıldığında PSMA-11 ve serbest galyum-68  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in geldiği alıkonma zamanlarında herhangi bir pik gözlenmemiştir.

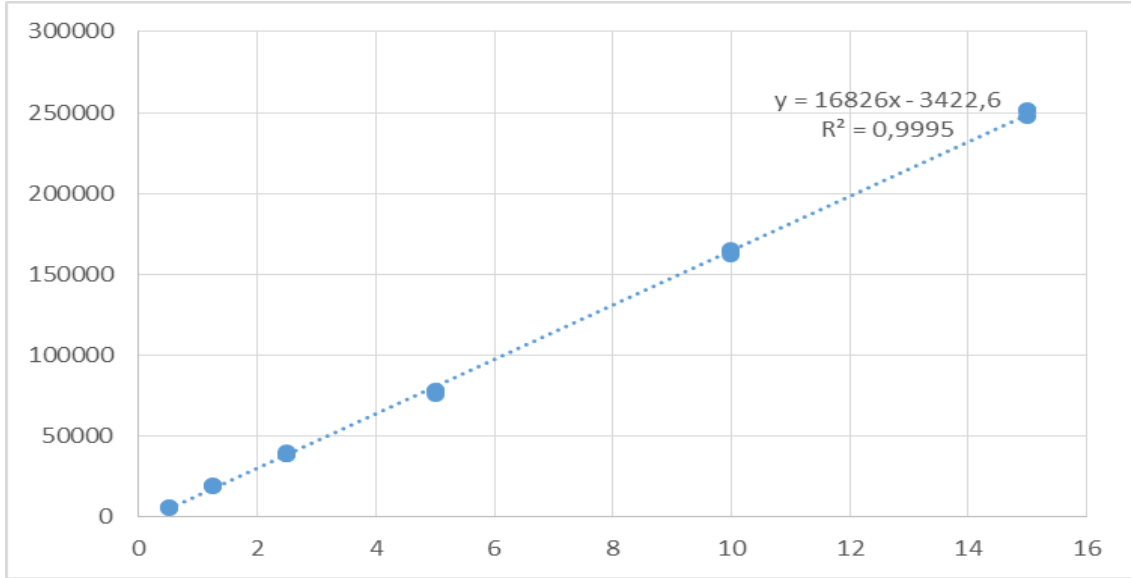
Şekil 4-1 Blank ve madde kromatogramları Şekil 4-2 ve Şekil 4-3.

#### Doğrusallık

Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi hazırlanan 220 nm dalga boyunda elde edilen  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 standart çözeltilerine ait alan değerleri Tablo 4-2 ve ölçü eğrisi grafiği Şekil 4-3'de verilmiştir. Doğrusallık aralığı 15,00–0,50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  olarak çalışılmıştır. Kalibrasyon eğrileri için korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) kabul kriterlerine uygun olarak 0.9995 olarak bulunmuştur (Şekil 4-3).

**Tablo 4-2: Standart Çözeltiler ve Absorbans Değerleri**

Konsantrasyon [ $\mu\text{g} / \text{mL}$ ]	Alan	Hesaplanan konsantrasyon [ $\mu\text{g} / \text{mL}$ ]	Hesaplanan ortalama konsantrasyon [ $\mu\text{g} / \text{mL}$ ]	SD	RSD %
15,00	244650	14,73			
15,00	245150	14,76	14,77	0,05	0,90
15,00	246150	14,82			
10,00	174592	10,55			
10,00	173769	10,50	10,46	0,11	0,91
10,00	170954	10,33			
5,00	79175	4,85			
5,00	79689	4,88	4,77	0,15	1,54
5,00	75003	4,60			
2,50	38378	2,41			
2,50	39763	2,49	2,44	0,04	1,37
2,50	38770	2,43			
1,25	19316	1,27			
1,25	19295	1,27	1,26	0,02	1,42
1,25	18841	1,24			
0,50	8086	0,60			
0,50	7968	0,59	0,59	0,00	1,86
0,50	7999	0,59			



**Şekil 4-4: PSMA-11 için elde edilen ölçü eğrisi grafiği**

#### **Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)**

Gün-içi ve günler arasında (3 farklı gün) düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda yapılan analizler sonucu elde edilen alan değerleri ölçü eğrisi denkleminde yerine konup SD ve % RSD değerleri hesaplanmış ve % RSD değerleri ise % 2'den küçük bulunmuştur (Tablo 4-3).

**Tablo 4-3: Kesinlik Bulguları**

Konsantrasyon [µg / mL]	Alan	Hesaplanan konsantrasyon [µg / mL]	Hesaplanan ortalama konsantrasyon [µg / mL]	SD	% RSD
1,25	19590	1,23			
1,25	20182	1,27	1,26	0,02	1,60
1,25	20172	1,27			
5,00	80396	4,88			
5,00	79812	4,84	4,84	0,03	0,79
5,00	79109	4,80			
15,00	232137	13,97			
15,00	234967	14,14	14,08	0,09	0,68
15,00	234896	14,13			

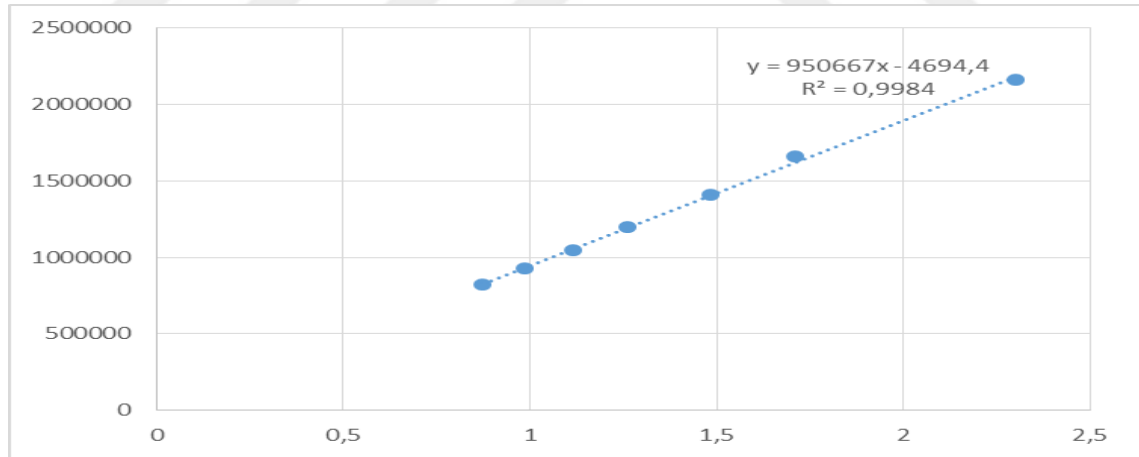
### 4.1.3. Radyometrik Dedektörlü HPLC Yöntem Bulguları

#### Doğrusallık

Bölüm 3.4.3’de anlatıldığı gibi 7 farklı zamanda ölçülen aktivite ve alan değerleri konsantrasyonla doğru orantılı olarak değişmiştir. Tablo 4-4’te alan ve aktivite değerleri Şekil 4-4’de ölçü eğrisi grafiği verilmiştir. Korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) kabul değerlerine uygun olarak 0,9984 bulunmuştur.

**Tablo 4-4: Zamana bağlı aktivite-radyometrik dedektör sinyali**

ZAMAN	AKTİVİTE (mci/mL)	ALAN
08:50:00	2,3	2159974
09:19:00	1,7	1660801
09:33:00	1,4	1407479
09:49:00	1,2	1195920
10:01:00	1,1	1047535
10:13:00	0,9	927223
10:25:00	0,8	820310



**Şekil 4-5: Radyokimyasal Sıfırlık Testi Kalibrasyon Eğrisi**

#### Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Bölüm 3.4.3’de anlatıldığı gibi tekrarlanan enjeksiyonlardan elde edilen sonuçlar Tablo 4-4’de verilmiştir.

## Doğruluk

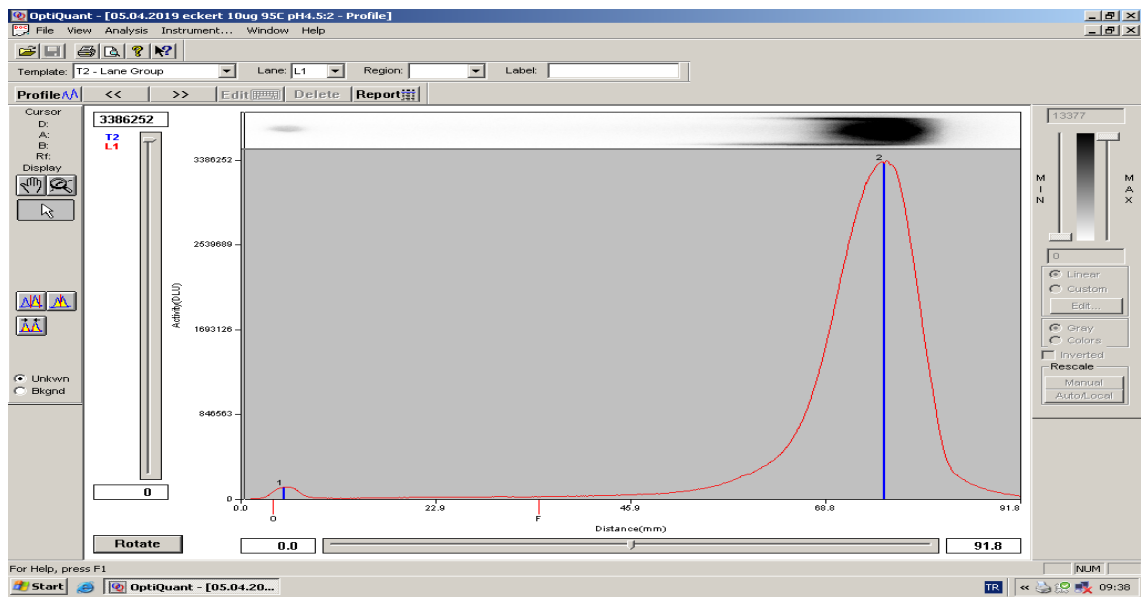
Bölüm 3.4.3' te anlatıldığı gibi PSMA-11 standardı ve  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'in Rt değerleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-4'te gösterilmektedir.  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'nin retansiyon zamanı, referans standardı (PSMA-11) için gözlenen tutma süresi ile kabul sınırlarına uygun olarak  $\pm\%$  10 olarak bulunmuştur.

**Tablo 4-5: Doğruluk Bulguları**

Rt PSMA-11 (dk)	Rt RR Kon. (dk)	RS Kon. (dk)	Rt $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 (dk)	Rt Sapma (dk)	Rt Ortalama Sapma (dk)
4,43	4,38	4,61	4,50	0,07	
4,43	4,44	4,65	4,55	0,12	
4,32	4,28	4,45	4,37	0,04	0,01
4,40	4,30	4,59	4,45	0,04	
4,41	4,99	4,66	4,83	0,42	

## 4.2. TLC Metoduna Ait Bulgular

Bölüm 3.3.7'de anlatıldığı gibi TLC metoduyla belirlenen radyokimyasal saflık verileri Tablo 4-4'de verilmiştir. TLC şerit taranarak analiz edilmiş ve Rf değerleri tanımlanmıştır.  $^{68}\text{Ga}^{+3}$  (serbest) ve  $^{68}\text{Ga}$  kolloidal (Rf = 0-0.1) ,  $^{68}\text{Ga}$  etiketli PSMA-11 (Rf = 0.8-1.0) (Şekil 4-6). Sentezin RKS %'si belirlenmiştir ( Şekil 4-7).



**Şekil 4-6: Cyclone Plus ile TLC şerit analizi**

OptiQuant - [Template Report - 05.04.2019 eckert 10ug 95C pH4.5:3]

File Edit Transform View Instrument... Window Help

Template: T1 - Region Group Lane: Region: 1-b Label

Copy Font Close

File: 05.04.2019 eckert 10ug 95C pH4.5 Acquired: 4/5/2019 1:23:21  
Owner: User1 Subject:

#T1 - Region Group  
Background Subtraction: Regions = 219.911 DLU /mm<sup>2</sup>

ID	Gross DLU	Background Subtract	Net DLU	Net % Sum
1 - Rect	510,571,593.2	269,273.0	510,302,320.2	97.3
2 - Rect	14,208,239.1	187,578.0	14,020,661.0	2.7
1-b	100,006.3			
Total	573,894,124.1	6,855,246.7	567,038,877.4	
UnRes	49,114,291.8	6,398,395.6	42,715,896.1	

#T2 - Lane Group  
Lane #1  
Background Subtraction: Regions = 0.000 DLU /mm<sup>2</sup>

ID	Gross DLU	Background Subtract	Net DLU	Net % Sum
1 - Prof	124,613.9	0.0	124,613.9	3.6
2 - Prof	3,371,140.1	0.0	3,371,140.1	96.4
Lane	522,503,982.9	0.0	522,503,982.9	
UnRes	519,008,229.0	0.0	519,008,229.0	

For Help, press F1

Start OptiQuant - [Templat...

NUM 09:47

Şekil 4-7: Cyclone Plus ile radyokimyasal saflık % belirleme

Tablo 4-6: TLC Metodu Radyokimyasal Saflık Verileri

Run	Factor 1 A:PSMA-11 µg	Factor 2 B:R.sicakligi °C	Factor 3 C:pH pH	Factor 4 D:R.suresi s	TLC Metodu RKS %
1	10	95	3,75	210	97,6
2	10	85	3,00	210	32,0
3	10	95	3,75	210	96,3
4	5	95	3,75	300	97,0
5	10	105	4,50	210	81,5
6	15	105	3,75	210	96,3
7	5	95	4,50	210	96,0
8	15	95	3,00	210	59,8
9	10	105	3,75	300	93,4
10	15	95	4,50	210	99,2
11	10	95	3,00	300	48,0
12	10	105	3,00	210	15,0
13	10	95	3,75	210	98,2
14	15	85	3,75	210	98,7
15	10	95	3,00	120	40,2
16	10	95	4,50	300	97,9
17	15	95	3,75	120	99,0
18	5	95	3,00	210	18,0
19	5	85	3,75	210	92,0



20	10	85	3,75	120	97,0
21	10	95	4,50	120	97,0
22	10	105	3,75	120	95,8
23	5	95	3,75	120	82,4
24	10	85	3,75	300	98,0
25	5	105	3,75	210	85,4
26	15	95	3,75	300	97,0
27	10	85	4,50	210	97,6
28	10	95	3,75	210	80,0
29	10	95	3,75	210	98,0

### 4.3. Deneysel Tasarıma Ait Bulgular

Bölüm 3.2.3'te belirtilen bağımsız proses parametreleri ve bunlara bağlı değişkenler ile yapılan deney tasarımı sonucunda deneyler gerçekleştirilmiş ve Tablo 4-7'de sistemden alınan cevaplar verilmiştir. Elde edilen deney sonuçlarında deney değişkenlerinin her bir yanıt üzerindeki etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir.

**Tablo 4-7: Deneysel Tasarım Optimizasyonu Bulgular**

Std	Run	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Response 1	Response 2
		A:PSMA-11	B:R.sicakligi	C:pH	D:R.suresi	RKS	RR
		µg	°C	pH	s	%	%
25	1	10	95	3,75	210	98,0	86,4
13	2	10	85	3,00	210	32,9	11,5
26	3	10	95	3,75	210	96,9	85,5
11	4	5	95	3,75	300	97,7	44,3
16	5	10	105	4,50	210	82,8	75,0
4	6	15	105	3,75	210	96,4	59,3
19	7	5	95	4,50	210	96,3	67,3
18	8	15	95	3,00	210	59,1	35,4
24	9	10	105	3,75	300	94,7	48,0
20	10	15	95	4,50	210	99,0	98,6
7	11	10	95	3,00	300	48,2	17,2
14	12	10	105	3,00	210	14,2	8,8
27	13	10	95	3,75	210	99,0	90,0

2	14	15	85	3,75	210	99,0	78,9
5	15	10	95	3,00	120	46,7	18,0
8	16	10	95	4,50	300	99,0	90,0
10	17	15	95	3,75	120	99,0	81,4
17	18	5	95	3,00	210	18,3	7,8
1	19	5	85	3,75	210	93,9	58,6
21	20	10	85	3,75	120	97,0	85,0
6	21	10	95	4,50	120	98,0	70,0
22	22	10	105	3,75	120	96,0	61,9
9	23	5	95	3,75	120	82,2	78,3
23	24	10	85	3,75	300	99,0	75,5
3	25	5	105	3,75	210	87,7	49,2
12	26	15	95	3,75	300	99,0	88,1
15	27	10	85	4,50	210	99,0	76,0
28	28	10	95	3,75	210	82,8	75,0
29	29	10	95	3,75	210	97,0	85,6

#### 4.4. Radyokimyasal Saflığın Modellenmesi

Design Expert 10.0.0 programı yardımı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda radyokimyasal saflık yüzdesini (RKS %) tanımlayan modelin quadratik model olduğuna karar verilmiştir. Bunun program tarafından seçilmesindeki etken Adj R-Squared ve Pred R-Squared değerleri arasındaki farkın diğer modellere göre birbirine daha yakın olmasıdır (Tablo 4-8).

0,05'den düşük  $P > F$  değerleri ise model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. Bu durumda A, C, AC,  $C^2$  önemli model terimleri olarak bulunmuştur. "Lack of Fit" F-değeri 1,56, uygunluk eksikliğinin saf hataya göre anlamlı olmadığını gösterir. Bu büyüklükteki gürültüden dolayı bu büyüklükte bir "Lack of Fit" F değeri bulunmaması ihtimali % 35,55'dir (Tablo 4-9).

**Tablo 4-8: % RKS modelinin istatistiksel özeti**

	Std.		Adjusted	Predicted	
Source	Dev.	R-Squared	R-Squared	R-Squared	PRESS
Linear	17,61	0,6004	0,5338	0,3967	11240,21

2FI	19,74	0,6235	0,4144	-0,1457	21347,41	
<u>Quadratic</u>	<u>7,95</u>	<u>0,9525</u>	<u>0,9049</u>	<u>0,7669</u>	<u>4342,82</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	8,76	0,9753	0,8846	-1,1770	40563,51	Aliased

**Tablo 4-9: Radyokimyasal Saflık Modellemesi ANOVA verileri**

ANOVA for Response Surface Quadratic model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	17746,68	14	1267,62	20,03	< 0.0001	significant
<i>A-psma-11</i>	473,76	1	473,76	7,49	0,0161	
<i>B-R.sicakligi</i>	200,08	1	200,08	3,16	0,0971	
<i>C-pH</i>	10484,34	1	10484,34	165,68	< 0.0001	
<i>D-R.suresi</i>	29,14	1	29,14	0,46	0,5085	
<i>AB</i>	3,24	1	3,24	0,051	0,8243	
<i>AC</i>	362,90	1	362,90	5,73	0,0312	
<i>AD</i>	60,06	1	60,06	0,95	0,3465	
<i>BC</i>	1,56	1	1,56	0,025	0,8774	
<i>BD</i>	2,72	1	2,72	0,043	0,8387	
<i>CD</i>	0,063	1	0,063	9,876E-004	0,9754	
<i>A<sup>2</sup></i>	1,32	1	1,32	0,021	0,8873	
<i>B<sup>2</sup></i>	99,89	1	99,89	1,58	0,2295	
<i>C<sup>2</sup></i>	5384,51	1	5384,51	85,09	< 0.0001	
<i>D<sup>2</sup></i>	107,10	1	107,10	1,69	0,2143	
Residual	885,94	14	63,28			
<i>Lack of Fit</i>	704,83	10	70,48	1,56	0,3555	not significant
<i>Pure Error</i>	181,11	4	45,28			
Cor Total	18632,63	28				

Analizler sonucunda % RKS için seçilen gerçek faktörler açısından nihai denklem 4.1'de gösterildiği gibi elde edilmiştir.

RCY =

+94,74

+6,28 × A

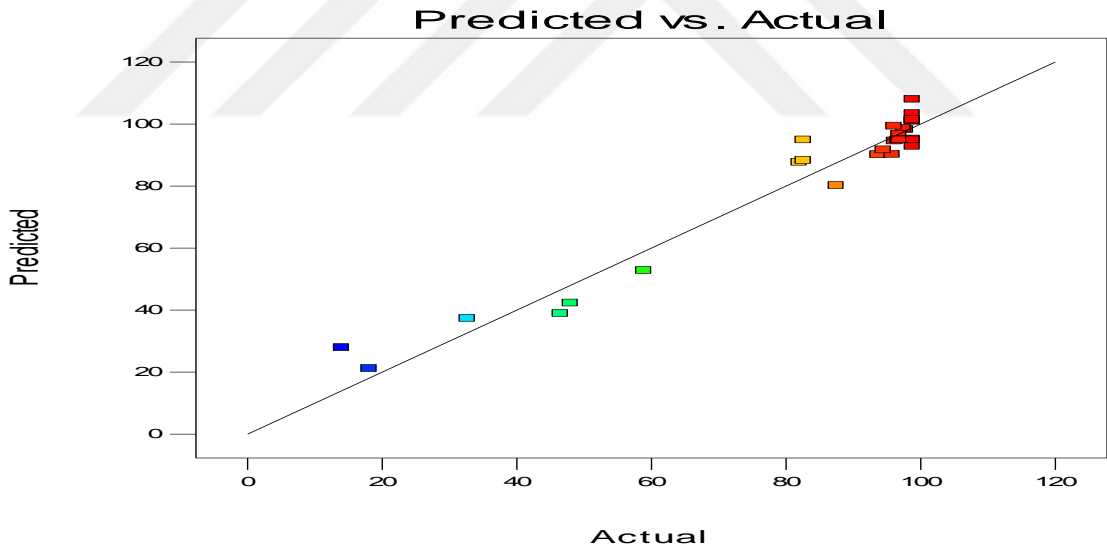
-4,08 × B

+29,56 × C

+1,56 × D

$$\begin{aligned}
&+0,90 \times AB \\
&-9,53 \times AC \\
&-3,87 \times AD \\
&+0,63 \times BC \\
&-0,82 \times BD \\
&-0,12 \times CD \\
&+0,45 \times A2 \\
&-3,92 \times B2 \\
&-28,81 \times C2 \\
&+4,06 \times D2
\end{aligned} \tag{4.1}$$

Şekil 4-8'de önerilen model ile deneysel olarak gözlenen % RKS verileri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik verilmiştir. Grafik üzerindeki, program tarafından otomatik olarak belirlenen renk kutucuklarının maviden kırmızıya doğru dönüşmesi, % RKS değerinin arttığını göstermektedir.



**Şekil 4-8: Deneysel olarak gözlenen (actual) ve modelden hesaplanan (predicted) % RKS grafiği**

#### 4.5. Diastereomer Yüzdesinin Modellenmesi

Design Expert 10.0.0 programı yardımı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda diastereomer yüzdesi (RR %) tanımlayan modelin quadratik model olduğu gösterilmiştir. Bunun program tarafından seçilmesindeki etken Adj R-Squared ve Pred

R-Squared değerleri arasındaki farkın birbirine diğer modellere göre daha yakın olmasıdır (Tablo 4-10).

0,05'den düşük "Prob> F" değerleri model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. Bu durumda A, B, C, AD, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> önemli model terimleri olarak bulunmuştur. "Lack of Fit" F-değeri 2,57, uygunluk eksikliğinin saf hataya göre anlamlı olmadığını gösterir. Gürültüden dolayı bu büyüklükte bir "Lack of Fit" değeri bulunmaması ihtimali % 18,79'dur (Tablo 4-11).

**Tablo 4-10: % diastereomer modelinin istatistiksel özeti**

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	17,19	0,6658	0,6101	0,5367	9827,20	
2FI	19,05	0,6920	0,5209	0,2521	15862,75	
<u>Quadratic</u>	<u>8,19</u>	<u>0,9557</u>	<u>0,9115</u>	<u>0,7701</u>	<u>4876,64</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	6,03	0,9897	0,9519	0,3654	13460,25	Aliased

**Tablo 4-11: Diastereomer Yizdesi Modellemesi ANOVA verileri**

**ANOVA for Response Surface Quadratic model**

**Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]**

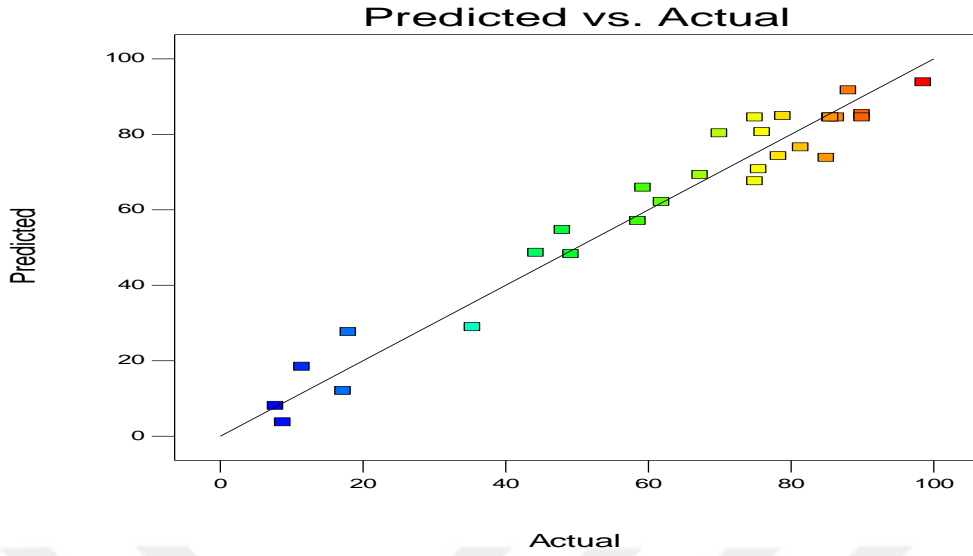
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Model	20271,51	14	1447,96	21,60	< 0.0001	significant
<i>A-psma-11</i>	1545,87	1	1545,87	23,06	0,0003	
<i>B-R.sicakligi</i>	578,24	1	578,24	8,62	0,0108	
<i>C-pH</i>	11915,19	1	11915,19	177,71	< 0.0001	
<i>D-R.suresi</i>	82,32	1	82,32	1,23	0,2865	
<i>AB</i>	26,01	1	26,01	0,39	0,5434	
<i>AC</i>	3,42	1	3,42	0,051	0,8245	
<i>AD</i>	414,12	1	414,12	6,18	0,0262	
<i>BC</i>	0,72	1	0,72	0,011	0,9188	

<i>BD</i>	4,84	1	4,84	0,072	0,7921	
<i>CD</i>	107,43	1	107,43	1,60	0,2262	
<i>A<sup>2</sup></i>	276,06	1	276,06	4,12	0,0619	
<i>B<sup>2</sup></i>	1264,32	1	1264,32	18,86	0,0007	
<i>C<sup>2</sup></i>	5072,70	1	5072,70	75,66	< 0.0001	
<i>D<sup>2</sup></i>	175,56	1	175,56	2,62	0,1279	
Residual	938,69	14	67,05			
<i>Lack of Fit</i>	812,37	10	81,24	2,57	0,1879	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	126,32	4	31,58			
Cor Total	21210,20	28				

Analizler sonucunda % RKS için seçilen gerçek faktörler açısından nihai denklem 4.2’de gösterildiği gibi elde edilmiştir.

$$\begin{aligned}
 \text{RR \%} = & \\
 & +84,50 \\
 & +11,35 \times A \\
 & -6,94 \times B \\
 & +31,51 \times C \\
 & -2,62 \times D \\
 & -2,55 \times AB \\
 & +0,93 \times AC \\
 & +10,17 \times AD \\
 & +0,42 \times BC \\
 & -1,10 \times BD \\
 & +5,18 \times CD \\
 & -6,52 \times A^2 \\
 & -13,96 \times B^2 \\
 & -27,96 \times C^2 \\
 & -5,20 \times D^2
 \end{aligned} \tag{4.2}$$

Şekil 4-9’da önerilen model ile deneysel olarak gözlenen % Sİ verileri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik verilmiştir.

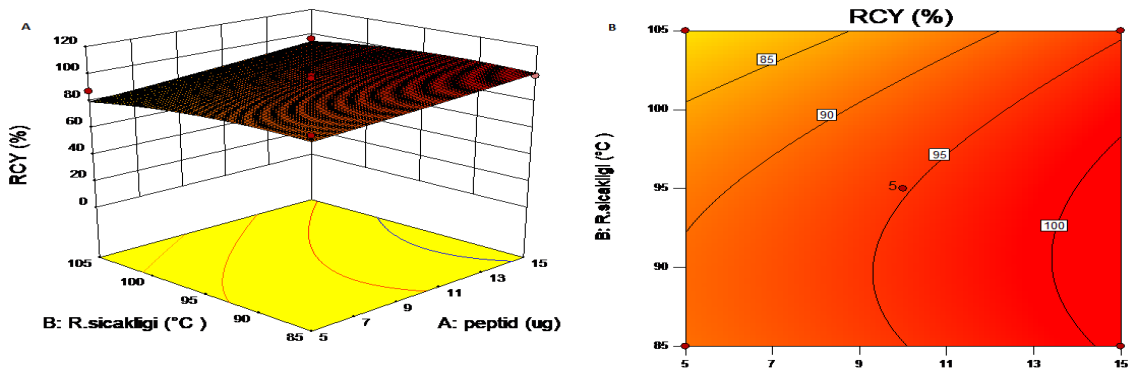


**Şekil 4-9: Deneysel olarak gözlenen (actual) ve modelden hesaplanan (predicted) % Sİ grafiği**

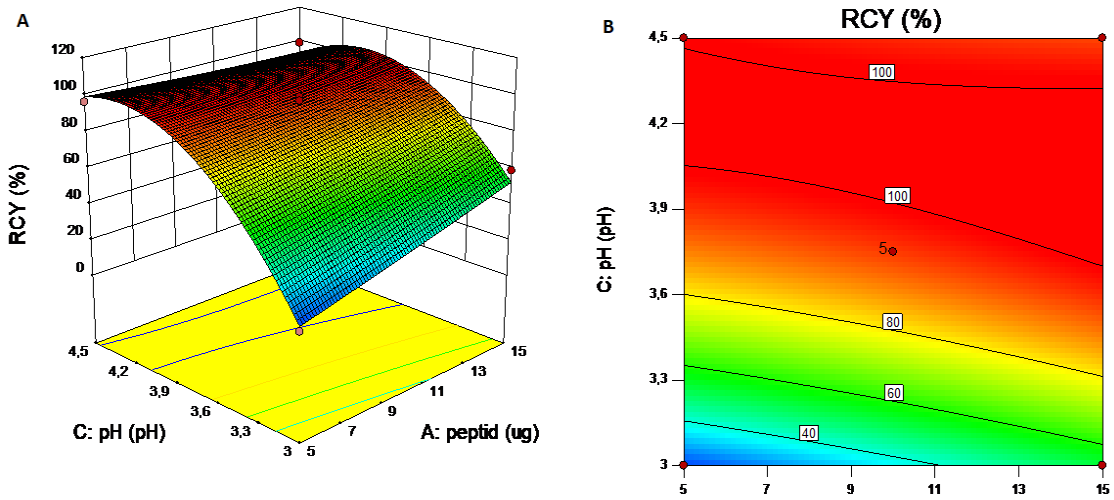
#### 4.6. Model Yüzey Analizleri

##### 4.6.1. Radyokimyasal Model Yüzey Analizleri

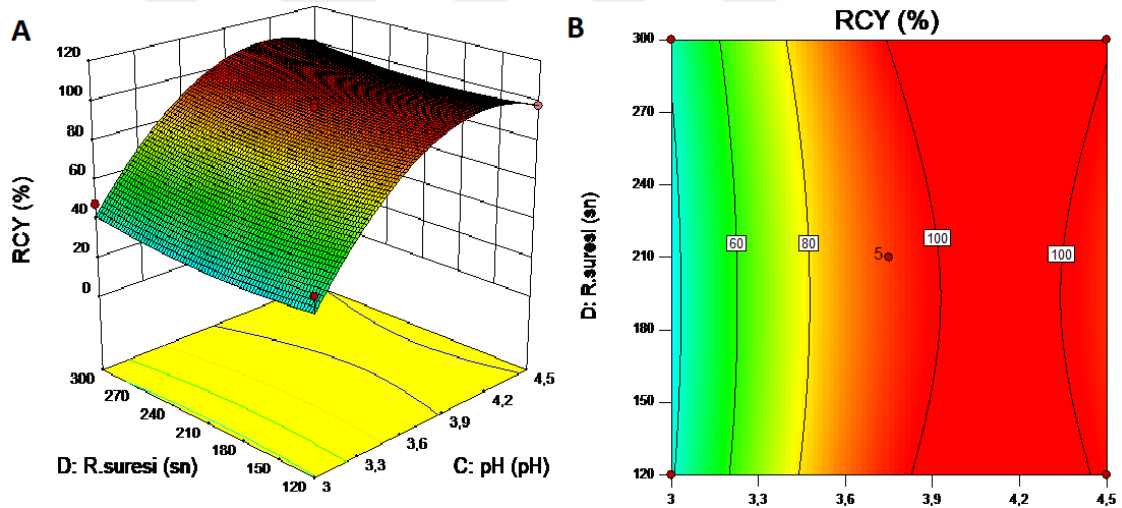
Radyokimyasal saflık ve bu dört faktör arasındaki ilişkiler, Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12 'de gösterilmiştir. Her yüzey, iki değişkenin çalışılan aralıkları içindeki etkilerini, diğer değişkeni de sıfır seviyesine sabitlenmiş şekilde göstermektedir. Tepki yüzeyi, her faktörün radyokimyasal saflığı etkileme eğilimini daha iyi gösterir. Kontur grafiğinin şekli, faktörler arasındaki etkileşimlerin niteliğini ve genişlemesini gösterir. Eliptik bir kontur grafiği belirgin bir etkileşimi gösterirken, ihmal edilebilir bir etki dairesel bir kontur grafiği olarak görülür.



**Şekil 4-10: Reaksiyon Sıcaklığı ve PSMA-11 miktarının RKS üzerine etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği**



Şekil 4-11: PSMA-11 miktarı ve pH'nın RKS etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği



Şekil 4-12: Reaksiyon süresi ve pH'nın RKS etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği

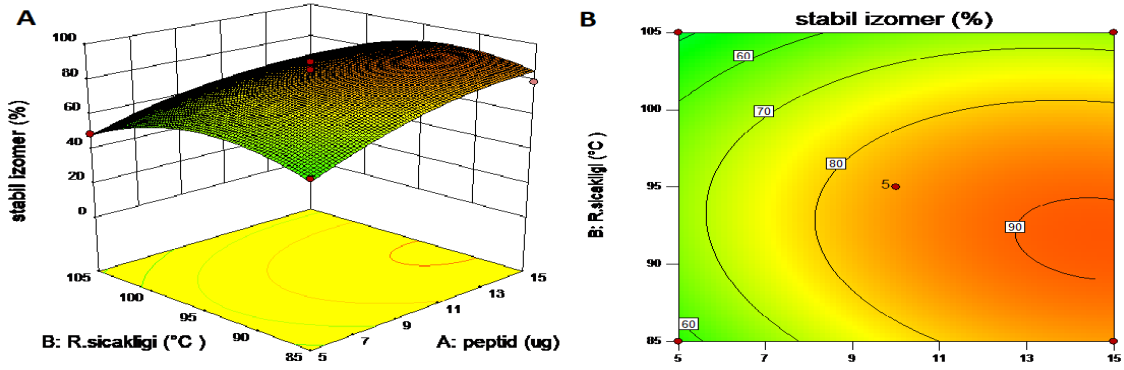
Model tasarımı ve yapılan deney çalışmalarının sonucu elde edilen tepki yüzeyi grafikleri incelendiğinde reaksiyon sıcaklığının  $> 100$  °C olması radyokimyasal saflığı etkilediği görülürken (Şekil 4-10) peptid miktarındaki azalma veya artma radyokimyasal saflığı etkilemediği gözlenmiştir.

Şekil 4-11 incelendiğinde düşük reaksiyon pH'larında ( $< \text{pH } 3,60$ ) radyokimyasal saflık oranı azalırken, belirlenen reaksiyon süresi değerleri yüksek reaksiyon pH değerlerinde ( $> \text{pH } 3,60$ ) radyokimyasal saflığa etki etmemektedir (Şekil 4-12).

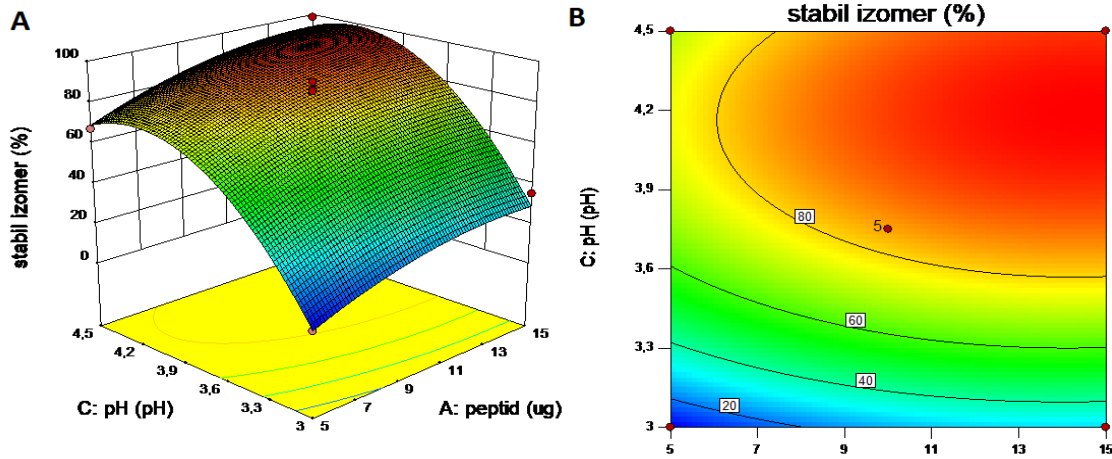


#### 4.6.2. RR Konfigürasyon Oranı Model Yüzey Analizleri

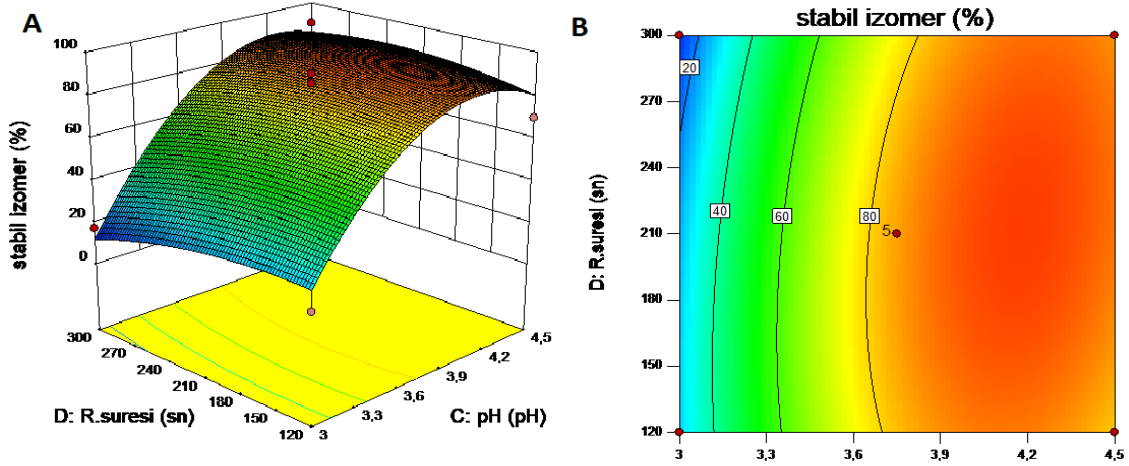
RR Konfigürasyon oranı ve bu dört faktör arasındaki ilişkiler, Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15 'de gösterilmiştir.



Şekil 4-13: Reaksiyon sıcaklığı ve PSMA-11 miktarı RR Konfigürasyon oranına etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği



Şekil 4-14: PSMA-11 miktarı ve pH'ın RKS etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği

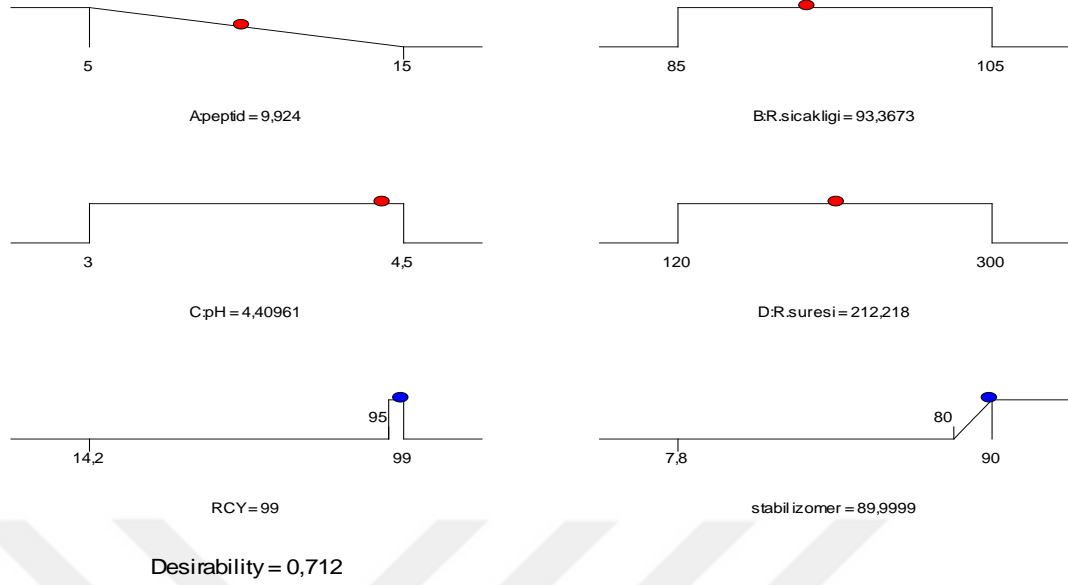


**Şekil 4-15: Reaksiyon süresi ve pH'ın RR konfigürasyon oranına etkisi (A) tepki yüzeyi ve (B) öngörülen RKS veriminin kontur grafiği**

Şekil 4-13 incelendiğinde reaksiyon sıcaklığındaki ve peptid miktarındaki artışın RR konfigürasyonu oranının artmasına neden olurken yüksek peptid miktarlarında sıcaklığın etkisi fazla olmamıştır. Bununla birlikte düşük reaksiyon pH değerlerinde ( $\text{pH} < 3,60$ ) RR konfigürasyonu oranı radyokimyasal saflık ile uyumlu şekilde azalmış, bu değerlerde peptid miktarının artırılması oranı arttırmamıştır (Şekil 4-14). Şekil 4-15 de reaksiyon  $\text{pH} > 3,60$  olduğunda düşük reaksiyon süresi RR konfigürasyonu oranında bir azalmaya sebep olmadığı görülmektedir.

#### 4.7. $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 Optimum Koşulların Belirlenmesi

Hastane ve küçük işletmelerde  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 sentezi için yapılacak işlemlerde göz önünde bulundurulması gereken başlıca faktörlerden biri de kullanılacak kimyasalların oluşturacağı maliyettir. Sentezde maliyeti oluşturan en büyük etken peptittir, bu nedenle koşullar tasarlanan model verilerini kullanarak optimum koşulları belirlerken minimum peptid miktarı ve maximum cevap kriteri göz önünde bulundurularak belirlenmiştir (Şekil 4-16). Diğer kriterlerin başlangıçta belirlenen aralıklarda olması ve sentez cevapları olan radyokimyasal saflığın  $\geq 95$  ve PSMA-11 RR konfigürasyonu oranının  $\geq \%80$  olması istenmiştir.



**Şekil 4-16: Optimum koşul kriterleri**

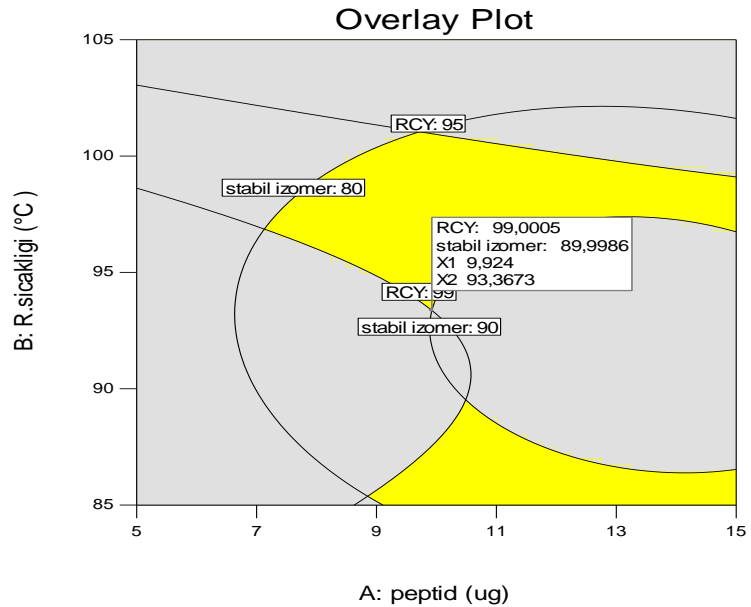
Sonuç olarak reaksiyon süresi 212 s, reaksiyon sıcaklığı 93 °C, pH 4,40 ve PSMA-11 miktarı 10 µg bulunmuştur ( Şekil 4-14).

Design-Expert® Software  
Factor Coding: Actual  
Overlay Plot

RCY  
stabil izomer

X1 = A: peptid  
X2 = B: R.sicakligi

Actual Factors  
C: pH = 4,40961  
D: R.suresi = 212,218



**Şekil 4-17: Grafiksel optimizasyon sonuçları**

## 5. TARTIŞMA

Prostat kanseri (PCa) tanı ve metastazlarının görüntülenmesi, prostat spesifik membran antijeni (PSMA) ekspresyonuna dayalı radyofarmasötikler kullanılarak nükleer tıp merkezlerinde PET/BT veya PET/MR yardımıyla gerçekleştirilen görüntüleme yöntemlerinden biridir. Prostat kanseri tanısı ve metastazlarının görüntülenmesi amacı ile nükleer tıp merkezlerinde  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 en sık kullanılan radyofarmasötiklerin başında gelmektedir [13-15].

Prostat spesifik membran antijen (PSMA), prostat kanseri hücresinde 750 amino asitten oluşan glutamat karboksipeptidaz tip 2 hücre membranı glikoproteinidir. PSMA, normal prostat hücrelerinde düşük derecede eksprese olurken veya hiç eksprese olmazken, prostat kanserinde yüksek derece eksprese olmaktadır.  $^{68}\text{Ga}$  etiketli PSMA ligandları, ilk olarak Johns Hopkins Üniversitesi'nde radyo-sentezlendi ve prelinik modellerde doğrulandı. Daha sonra,  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11, Heidelberg grubu (Eder ve ark.) tarafından geliştirilmiştir ve üre temelli PSMA inhibitörü olan Glu-NH-CONH-Lys (Ahx) peptidi HBED-CC şelatör molekülü kullanılarak PET radyonüklidi olan  $^{68}\text{Ga}$  ile işaretlenmiştir [15,16].

HBED-CC galyum kompleksi sırasında NMR ile ayırt edilen üç diastereomer (RR, RS ve SS konfigürasyonları) oluşturduğu, RR konfigürasyonu termodinamik olarak daha stabil olduğu Eder ve ark tarafından bulunmuştur. Diastereomerlerin oluşumunda sıcaklığın etkisinin yanı sıra, pH ve konsantrasyona bağlı olduğu bildirilmiştir [20].

$^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 içerdiği  $^{68}\text{Ga}$  radyonüklitin yarı-ömrünün (68 dk) kısalığından dolayı Nükleer Tıp departmanlarında bulunan radyofarmasi laboratuvarlarında majistral ilaç kapsamında hazırlanmaktadır. Hazırlık basamaklarını genel olarak  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  jeneratöründen  $^{68}\text{Ga}$  radyonüklitin eldesi ve bilgisayar kontrollü otomatik sentez ünitelerinde  $^{68}\text{Ga}$ 'in PSMA molekülü ile bağlanması oluşturmaktadır. Ticari olarak pek çok jeneratör ve otomatik sentez üniteleri bulunmaktadır. Bu çeşitliliğe bağlı olarak sentez parametreleri farklılıklar göstermekte elde edilen üründe safsızlıklar olabilmektedir [21,23].

Kalite kontrol (QC) işlemi, radyo-etiketleme prosedürünün emniyetini ve etkinliğini sağlamak için hayati öneme sahip olmakla birlikte Avrupa Farmakopesinde  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'nin QC'si hakkında herhangi bir kılavuz bulunmamaktadır.

Nükleer Tıp departmanlarında bu çeşitliliğe bağlı  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 sentezi çeşitli riskler içermektedir. Bu risklerin ele alınması ve prosesin optimize edilmesi gerekmektedir. Optimize etme, bundan maksimum faydayı elde etmek için bir sistemin, bir sürecin veya bir ürünün performansını iyileştirmek anlamına gelir. Bu yaklaşım, Tasarımla Kalitenin (QbD) temelini oluşturur. QbD, uygun bir işlem tasarlama ve istenen ürün performansı için işlem performansını anlama ile ilgilidir. Genel şemadaki ana unsur, sürekli olarak süreç geliştirme sürecinde edinilen bilgilere dayanan iyileştirme [34,38,39].

Tez çalışmamızda sentez ile elde edilen ürünlerdeki safsızlıkları  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11'den ayırabilen ve kısa bir sürede tanımlayabilen bir QC testine duyulan ihtiyacın karşılanması amacıyla  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 için uygun kalite özelliklerine sahip bir sentez prosesi QbD ile Deney tasarım programlarının yardımı ile tasarlanmış, ve  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 QC'si ile ilgili farmakope metodu bulunmaması nedeniyle literatürde yer alan metotlara alternatif ve onlardan avantajlı basit ve tekrarlanabilir bir HPLC metodu geliştirilmiştir. Aksu ve ark. 2019 yaptıkları alfuzosin tablet farmülasyon çalışmasında QbD tasarım prensiplerini kullanmışlardır [38].

Çalışmamızda,  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  jeneratöründen galyum-68 katyonik elüsyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Katyonik elüsyon yönetiminde kullanılan NaCl çözeltisi kimyasal safsızlık oluşturmadığı için tercih edilmiştir. Muller D ve ark. 2012 yaptıkları  $^{68}\text{Ga}$ -peptid işaretleme çalışmasında benzer şekilde NaCl temelli katyonik elüsyon metodu kullanmışlardır [29].

Çalışmamızda,  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 reaksiyon karışımı, bir C18 kartuşu kullanılarak saflaştırılmış ve reaksiyona girmemiş  $^{68}\text{Ga}$  sistemden uzaklaştırılmıştır. Amor-Coarasa ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada benzer saflaştırma tekniği uygulamışlardır [33].

Çalışmaya, kalite tasarımının ilk adımı olarak  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 sentezinin kritik kalite özellikleri (CQA) parametrelerinin belirlenmesiyle başlanmıştır. CQA parametresi olarak ürünün radyokimyasal saflığı ve RR konfigürasyonu oranı seçilmiştir. Kritik proses parametreleri (CPP) olarak sentezde kullanılacak peptid miktarı

(5 µg, 10 µg ve 15 µg) reaksiyon pH'ı (pH 3,00-pH 4,50 ve pH 5,00 ), sıcaklığı (85 °C, 95 °C ve 105 °C) ve süresi (120 s, 210 s ve 300 s) seçilmiştir. Belirlenen CPP'ler deney değişkenleri olarak belirlenirken CQA parametreleri bağlı değişkenler olarak seçilmiştir. Box-Behnken tasarım metodu ile yapılan optimizasyon çalışmasında sentez cevapları olan radyokimyasal saflığın  $\geq 95$  ve PSMA-11 RR konfigürasyonu oranının  $\geq \%80$  olması istenerek 29 deney yapılmış ve reaksiyon sıcaklığı 95°C, süresi 220 s, pH 4,40 ve peptid miktarı 10 µg/mL olarak bulunmuştur. Proses parametreleri ve değişim aralıkları gözönüne alındığında laboratuvar ortamında 3<sup>3</sup>x4 adet deney yapılması gerekirken deney tasarımı yapılarak 29 deney sonucunda optimum reaksiyon koşulları elde edilmiştir.

Anuar N. ve ark. 2013 yaptıkları optimizasyon çalışmasında benzer şekilde yüzey yanıt metodolojisi ve Design Expert yazılım programı kullanmışlardır [50].

Design Expert 10.0.0 programı yardımı ile gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda radyokimyasal saflık ve RR konfigürasyonu yüzdesi için quadratik bir model tanımlanmıştır. Oluşturulan modelin deneysel verilerinin ANOVA analizi ile 0,0500'den düşük " Prob> F " değerleri ile model terimlerinin anlamlı olduğu gösterilmiştir. "Lack of Fit" F-değeri %RKS için 1,56, % Sİ için 2,57 bulunarak uygunluk eksikliğinin saf hataya göre anlamlı olmadığı gösterilmiştir. Bu büyüklükteki gürültüden dolayı bu büyüklükte bir "Lack of Fit" F değeri bulunmaması ihtimali % RKS için % 35,55 ve % Sİ için % 18,79'dur.

Tepki yüzeyi grafikleri incelendiğinde reaksiyon sıcaklığının >100°C olması radyokimyasal saflığı etkilerken peptid miktarındaki azalma veya artma radyokimyasal saflığı etkilememiştir. Benzer şekilde düşük reaksiyon pH'larında (<pH 3,60) radyokimyasal saflık oranı azalırken, belirlenen reaksiyon süresi değerleri yüksek reaksiyon pH değerlerinde (>pH 3,60) radyokimyasal saflığa etki etmemektedir. Bununla birlikte reaksiyon sıcaklığındaki ve peptid miktarındaki artış RR konfigürasyonu oranının artmasına neden olurken yüksek peptid miktarlarında sıcaklığın etkisi fazla olmamıştır. Düşük reaksiyon pH değerlerinde (pH< 3,60) RR konfigürasyonu oranı radyokimyasal saflık ile uyumlu şekilde azalmış, bu değerlerde peptid miktarının artırılması oranı arttırmamıştır. Reaksiyon pH>3,60 olduğunda düşük reaksiyon süresi RR konfigürasyonu oranında bir azalmaya sebep olmadığı görülmektedir.

Sonuç olarak reaksiyon süresi 212 s, reaksiyon sıcaklığı 93 °C, pH 4,40 ve PSMA-11 miktarı 10 µg bulunmuştur. Eder ve ark. 2014 yaptıkları <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentezi ve optimum koşulları belirleme çalışmalarında benzer sonuçlar ortaya koymuşlardır.

Tez çalışması kapsamında optimum sentez parametrelerinin deneysel tasarımıyla belirlenmesinden sonra <sup>68</sup>Ga-PSMA-11'in kimyasal ve radyokimyasal saflık testi, RR konfigürasyonu oranı analizlerinde kullanılabilen yeni bir ters faz HPLC metodu geliştirilmiş ve doğrusalılık, seçicilik ve kesinlik parametreleri açısından valide edilmiştir.

Geliştirilen yöntemde sabit faz olarak 40°C sıcaklıkta C18 kolon (Acclaim 4,6 x 150 mm; 3 µm), kısa ve küçük partikül çaplı oluşu nedeniyle tercih edilmiş, piklerde bant genişlemesi ve kuyruklanma gözlenmemiştir. Literatürde kullanılan mobil fazlardan farklı olarak a) 20 mM orto-Fosforik asit (suda) b) 20 mM orto-Fosforik asit (asetonitrilde) çözücü karışımı ilk kez denenmiş ve uygun rezolüsyon sağlanmıştır [35]. PSMA-11 retansiyon süresi 4,40 dk iken, <sup>68</sup>Ga-PSMA-11'in birinci ve ikinci diastereoizomerlerinin ortalama retansiyon süreleri, sırasıyla 4,47 ve 4,59 dakika olarak bulunmuştur.

Migliari S. ve ark. 2017'de yaptıkları <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 için HPLC metodu geliştirilmesi ve validasyonu çalışmasında mobil faz bileşimi olarak orto-Fosforik asit yerine trifloroasetik asit (TFA) kullanmışlardır [36].

Kimyasal saflık analizinde PSMA-11 için doğrusalılık aralığı 0,5-15 µg/mL olarak belirlenmiş  $R^2 \geq 0,9995$  olarak hesaplanmıştır. Yöntemin kesinlik çalışmalarında % RSD değerleri <2' olarak kriterlere uygun bulunmuştur. Radyokimyasal saflık analiz sonuçlarında ise maddenin yarılanma süresi gözüne alındığında aktivite değerine karşılık alan değerlerinin doğrusal olarak azaldığı regresyon analizi ile gösterilmiştir, buna ait doğru denklemi  $y=950667x-4694,4$  iken  $R^2$  değeri 0,9984 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak deneysel tasarım kullanılarak <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 sentezi için optimum koşullar ilk kez belirlenmiş, bu koşullar kullanılarak yapılan sentez sonucu elde edilen bitmiş ürün ilk kez geliştirilen HPLC yöntemi ile analiz edilmiş ve geliştirilen yöntem analiz edilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Demir M. *Nükleer Tıp Fiziği ve Klinik Uygulamaları (4. Baskı)*. İstanbul, Bayrak Matbaası, 2014
2. Bayhan H. *Radyoaktivite ile Yüzyıl*. Ankara, GATA Basımevi; 1998
3. Önsel Ç. (editör) *Nükleer Tıp Ders Kitabı*. İstanbul, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 2009
4. Gopal BS. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy Fifth Edition*. New York Springer, 2004. ISBN 978-0-387-21702-4
5. Ocak M. PET Radyofarmasötikleri. *Toraks Cerrahisi Bülteni* 2015; **6**: 154-160
6. Patching SG. Roles of facilitative glucose transporter GLUT1 in [18F]FDG positron emission tomography (PET) imaging of human diseases. *Journal of Diagnostic Imaging in Therapy*. 2015; 2(1): 30-102
7. Vallabhajosula S. *Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2009. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-76735-0>
8. IAEA. Quality Control in the Production of Radiopharmaceuticals, 2018 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, IAEA-TECDOC-1856, Vienna 2018.
9. Stelmach HA, Quinn JL. Radiopharmaceutical quality control, *Seminars in Nuclear Medicine* 1974, Volume 4, Issue 3, Pages 295-303, ISSN 0001-2998, [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(74\)80016-4](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(74)80016-4).
10. The European Pharmacopoeia, 9.2. European Directorate for the Quality of the Medicines (EDQM); Strasbourg, France: 2017.
11. Zolle I. *Technetium-99m Pharmaceuticals Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*. Department of Medicinal/Pharmaceutical Chemistry University of Vienna Althanstraße, Vienna, Austria 2007
12. Clanton J, Sandler MP. *Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. *Journal of Nuclear Medicine* 2010. 51. 660-661. [10.2967/jnumed.109.072645](https://doi.org/10.2967/jnumed.109.072645).
13. Nurilli F, Vural GU, Aras Ö. Teranostik Platformlarda Moleküler Görüntüleme Yöntemleri. *Nuclear Medicine Seminars / Nükleer Tıp Seminerleri* 2015;2:120-7



14. Evans JD, Jethwa KR, Ost P, Williams S, Kwon ED, Lowe VJ ve ark. Prostate cancer-specific PET radiotracers: A review on the clinical utility in recurrent disease. *Practical Radiation Oncology*, Volume 8, Issue 1, 2018, Pages 28-39, ISSN 1879-8500. <https://doi.org/10.1016/j.prro.2017.07.011>.
15. Jadvar H. PSMA PET in Prostate Cancer. *J Nucl Med* 2015 56:1131-1132
16. Fendler W, Eiber M, Beheshti M, Bomanji J, Ceci F, Cho S ve ark. <sup>68</sup>Ga-PSMA PET/CT: Joint EANM and SNMMI procedure guideline for prostate cancer imaging: version 1.0. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2017. 44. 10.1007/s00259-017-3670-z.
17. Eder M, Eisenhut M, Babich J, Haberkorn U. PSMA as a target for radiolabelled small molecules. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2013. 40. 10.1007/s00259-013-2374-2.
18. Bouchelouche K, Choyke PL, Capala J. Prostate specific membrane antigen- a target for imaging and therapy with radionuclides. *Discov Med.* 2010;9(44):55–61.
19. Ghosh A, Heston WD. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* [01 Feb 2004, 91(3):528-539]. DOI: 10.1002/jcb.10661
20. Eder M, Neels O, Müller M, Bauder-Wüst U, Remde Y, Schäfer M ve ark. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals.* 2014; 7(7):779-796.
21. Eder M, Schafer M, Bauder-Wust U, Hull W.E, Wangler C, Mier, W ve ark. <sup>68</sup>Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Biocon. Chem.* 2012, 23, 688–697.
22. Asti M. GALLIUM-68 LABELLED PSMA INHIBITORS. Erişim 05.02.2019, [http://www.radiustech.it/upld/repository/File/2.%20Asti-PSMA%20inhibitors.ppt%20\[modalit%C3%A0%20compatibilit%C3%A0\].pdf](http://www.radiustech.it/upld/repository/File/2.%20Asti-PSMA%20inhibitors.ppt%20[modalit%C3%A0%20compatibilit%C3%A0].pdf)
23. Erişim 06.05.2019. <https://www.ezag.com/home/products/radiopharma/>
24. Dash A, Knapp R, Mra P. Industrial radionuclide generators: A potential step towards accelerating radiotracer investigations in industry. *RSC Advances*, 2013, 3, 14890. DOI: 10.1039/c3ra41639a

25. Velikyan I.  $^{68}\text{Ga}$ -Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. *Molecules* 2015.20. 12913-43. 10.3390/molecules200712913.
26. Rösch F. Past, present and future of  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generators. *Applied Radiation and Isotopes*, Volume 76, 2013, Pages 24-30. ISSN 0969-8043. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.10.012>.
27. Velikyan I. Prospective of  $^{68}\text{Ga}$ -radiopharmaceutical development. *Theranostics*. 2013;4(1):47–80. Published 2013 Dec 10. doi:10.7150/thno.7447
28. Martin R, Jüttler S, Müller M, Wester HJ. Cationic eluate pretreatment for automated synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ ]CPC4.2. *Nuclear Medicine and Biology*, Volume 41, Issue 1, 2014, Pages 84-89. ISSN 0969-8051
29. Mueller D, Klette I, Baum RP, Gottschaldt M, Schultz MK, Breeman WAP. Simplified NaCl Based  $^{68}\text{Ga}$  Concentration and Labeling Procedure for Rapid Synthesis of  $^{68}\text{Ga}$  Radiopharmaceuticals in High Radiochemical Purity. *Bioconjugate Chemistry* 2012 23 (8), 1712-1717. DOI: 10.1021/bc300103t
30. Schultz MK , Mueller D, Baum RP, Watkins GL, Breeman WAP. A new automated NaCl based robust method for routine production of gallium-68 labeled peptides, *Applied Radiation and Isotopes*, Volume 76, 2013, Pages 46-54. ISSN 0969-8043
31. Ebenhan T, Vorster M, Painter BM, Wagener J, Suthiram J, Modiselle M ve ark. Development of a Single Vial Kit Solution for Radiolabeling of  $^{68}\text{Ga}$ -DKFZ-PSMA-11 and Its Performance in Prostate Cancer Patients. *Molecules* 2015, 20(8), 14860-14878; <https://doi.org/10.3390/molecules200814860>
32. Patrascu I, Niculae D, Lungu V, Ursu I. The purification and the quality control of  $^{68}\text{Ga}$  eluates from  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator. *Romanian Reports in Physics* 2011. 63. 988-996.
33. Amor-Coarasa A, Schoendorf M, Meckel M, Vallabhajosula S, Babich JW. Comprehensive Quality Control of the ITG  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Generator and Synthesis of  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC and  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-HBED-CC for Clinical Imaging. *J Nucl Med*. 2016 Sep;57(9):1402-5. doi: 10.2967/jnumed.115.171249.
34. Eppard E, Homann T, de la Fuente A, Essler M, Rösch F. Optimization of Labeling PSMA<sup>HBED</sup> with Ethanol-Postprocessed  $^{68}\text{Ga}$  and Its Quality Control Systems. *J Nucl Med*. 2017 Mar;58(3):432-437. doi: 10.2967/jnumed.116.177634.

35. Szydło M, Pogoda D, Kowalski T, Pocięgiel M, Jadwiński M. ve ark. Synthesis and Quality Control of <sup>68</sup>Ga-PSMA PET/CT Tracer used in Prostate Cancer Imaging and Comparison with <sup>18</sup>F-Fluorocholine as a Reference Point. *J Pharm Sci Emerg Drugs* 2018 6:1. doi:10.4172/2380-9477.1000126
36. Migliari S, Sammartano A, Maura S, Giulio S, Caterina G, Carla C ve ark. Development and Validation of a High-Pressure Liquid Chromatography Method for the Determination of Chemical Purity and Radiochemical Purity of a [<sup>68</sup>Ga]-Labeled Glu-Urea-Lys(Ahx)-HBED-CC (Positron Emission Tomography) Tracer. *ACS Omega* 2017. 2, 7120-7126. 10.1021/acsomega.7b00677.
37. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK ve ark. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *AAPS J.* 2014 Jul; 16(4): 771–783. Published online 2014 May 23. doi: 10.1208/s12248-014-9598-3.PMCID: PMC4070262
38. Aksu B, Mesut B, Ozsoy Y. Developing alfuzosin tablet formulation based on quality by design (QbD) approach by using artificial neural network. *Latin American Journal of Pharmacy* 2019. 38. 668-676.
39. Yu LX. Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control. *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 4, April 2008. DOI: 10.1007/s11095-007-9511-1
40. Nanduri R, Reddy MU, Reddy BH. Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance Manufacturing. *Journal of Chemistry* 2015. 10.1155/2015/435129.
41. Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira C, Saviano AM, Lourenço FR. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Braz. J. Pharm. Sci.* 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006>
42. Peraman R, Bhadraya K, Padmanabha RY. Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015. 1-9. 10.1155/2015/868727
43. Bhutani H, Kurmi M, Beg S, Singh S, Singh B. Quality by Design (QbD) in Analytical Sciences: An Overview. *Pharma Times* 2014. 46. 71-75.

44. Dinç, Erdal. (2007). Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi. Cilt 27 / Sayı 1 / Ocak 2007 / ss. 61-92
45. <http://learning.chem21.eu/process-design/-/design-of-experiments/experimental-designs-response-surface-design/>
46. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, Volume 76, Issue 5, 2008, Pages 965-977, ISSN 0039-9140, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>.
47. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, 2016.
48. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics 2010. doi:10.1002/wics.73
49. Baş D, Boyacı İH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, Volume 78, Issue 3, 2007, Pages 836-845. ISSN 0260-8774. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>.
50. Anuar N, Adnan AF, Saat N, Aziz N, Taha RM. Optimization of Extraction Parameters by Using Response Surface Methodology, Purification, and Identification of Anthocyanin Pigments in Melastoma malabathricum Fruit. *The Scientific World Journal*, vol. 2013, Article ID 810547, 10 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/810547>.
51. Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC ve ark. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica Chimica Acta*, Volume 597, Issue 2, 2007, Pages 179-186, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.
52. Stamenković O, Kostić M, Radosavljević D, Veljković V. Comparison of Box-Behnken, Face Central Composite and Full Factorial Designs in Optimization of Hempseed Oil Extraction by n-Hexane: a Case Study. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*. 62, 3 (2018), 359-367. DOI: <https://doi.org/10.3311/PPch.11448>.

## HAM VERİLER



**FORMLAR**

## ETİK KURUL KARARI



**PATENT HAKKI İZİNİ**





## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### 68GA-PSMA-11 ÜRETİMİNE VE RADYOKİMYASAL SAFLIK ANALİZİNE TASARIMLA KALİTE (QBD) PRENSİPLERİNE GÖRE KALİTE UYGULAMASI

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>6</b>	% <b>4</b>	% <b>2</b>	% <b>2</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://acikarsiv.ankara.edu.tr">acikarsiv.ankara.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>2</b>	<a href="http://nukleertipseminerleri.org">nukleertipseminerleri.org</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	ÖZKAN, Gülay, ÖZKAN, Göksel, İNCE, Esra and BİLDİ, Özge. "Amonyak boran varlığında gözenekli stiren divinil benzen kopolimer küreciklerin optimum sentez koşullarının belirlenmesi", Gazi Üniversitesi, 2017. Yayın	<% <b>1</b>
<b>4</b>	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>5</b>	Submitted to Karabük Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% <b>1</b>
<b>6</b>	Silvia Migliari, Antonino Sammartano, Maura Scarlattei, Giulio Serreli et al. " Development and Validation of a High-Pressure Liquid	<% <b>1</b>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Hüseyin	<b>Soyadı</b>	Pehlivanoglu
<b>Doğ.Yeri</b>	Kotel. Bulgaristan	<b>Doğ.Tar.</b>	04.07.1987
<b>Email</b>	pehlivanoglu.hsyn@gmail.com	<b>Uyruğu</b>	T.C.

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	Selçuk Üniversitesi, Kimya Mühendisliği	2013
<b>Lise</b>	Bahçeşehir Atatürk Lisesi YDA	2006

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Laborant	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	2015-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	58,75	73,75

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	76,58	76,09	68,81
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

### Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Trekking, Sinema