



**DOTTORATO DI RICERCA IN TECNOLOGIE  
BIOMEDICHE (XXIII CICLO)**

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI MILANO-BICOCCA**

(Coordinatrice: Prof.ssa Del Puppo Marina)

**RADIOSINTESI E PRELIMINARE VALUTAZIONE  
BIOLOGICA DEL [<sup>18</sup>F]VC701, ANTAGONISTA DEL  
RECETTORE PBR, POTENZIALMENTE APPLICABILE ALLO  
STUDIO DI PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE E  
STRATEGIE DI MARCATURA DI NANOPARTICELLE  
POLIMERICHE CON PRELIMINARE VALUTAZIONE DEL  
LORO TARGETING IN VIVO**

**Relatore: Dott. Mario Matarrese**

**Dottoranda: Dott.ssa Cristina Monterisi**

**Anno Accademico 2009/2010**

## INDICE

	<b>PAG.</b>
1. Imaging molecolare	3
2. Fasi di produzione di un radiofarmaco fino all'analisi PET	4
3. La PET	5
4. Il Ciclotrone	8
5. I radioisotopi	10
6. Caratteristiche di un radiofarmaco	12
6.1 Studi in vitro	15
6.2 Studi nell'animale	15
6.3 Studi nell'uomo	15
7. Fluoro-18	17
7.1 Reazioni elettrofile	20
7.2 Reazioni nucleofile	20
8. TSPO	21
9. Scopo della ricerca	25
10. Neuroinfiammazione	26
11. Traccianti usati nello studio del TSPO	27
12. Risultati	28
12.1 Parte chimica	28
12.2 Parte radiochimica	28
12.3 Parte preclinica	31
12.4 Studi PET	34
13. Discussione	36
14. Parte sperimentale chimica	38
15. Parte sperimentale radiochimica	38
16. Caratterizzazione mediante spettrometria di massa	53
17. Parte sperimentale studi di biodistribuzione e inibizione	55
18. Parte sperimentale studi PET	56
19. Conclusioni	56
20. Nanoparticelle	57
21. Poly-VC626	59
21.1 Parte sperimentale chimica	59
21.2 Parte sperimentale radiochimica	60
22. Conclusioni	64
23. Norme di Buona Preparazione (NBP)	65
24. Procedure Operative Standard (SOP)	66
25. Sterilità e ambienti dedicati e classificati	67
26. Convalide di processo	68
27. Convalide dei metodi analitici	72
28. Conclusioni	74
 Bibliografia	 79

## 1. IMAGING MOLECOLARE

Negli ultimi anni il campo della ricerca biomedica è stato caratterizzato dallo sviluppo di nuove tecniche di diagnosi particolarmente avanzate, raggruppate sotto il nome di Imaging Molecolare, che si propongono di identificare e quantificare *in vivo* processi biologici e biochimici a livello cellulare e subcellulare.<sup>1</sup> Uno dei punti di forza dell'Imaging Molecolare rispetto alle tecniche convenzionali più conosciute (Risonanza Magnetica, Tomografia Computerizzata, Ecografia, ecc.), consiste nella tempestività di indagine delle patologie in esame, in particolare i tumori, poiché permette di effettuare una diagnosi precoce della malattia e di valutare l'efficacia di un trattamento farmacologico o radioterapico in tempi brevi. Inoltre, una interessante novità consiste nel poter indirizzare la terapia stessa ad un singolo paziente, poiché si arriva a disporre di informazioni molecolari specifiche per ciascun individuo e dunque a selezionare una cura più mirata ed efficace per ogni caso oggetto di studio.

Oggi, le tecniche che più di altre stanno prendendo piede nel campo dell'Imaging Molecolare, sono la Tomografia ad Emissione di Singoli Fotoni (SPECT) e la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET), impiegate con sempre maggior frequenza in ambito oncologico e, in minor misura, in campo cardiologico e neurologico.

Esse, infatti, permettono di effettuare uno studio delle alterazioni molecolari responsabili di molti tumori, in quanto consentono la misurazione del metabolismo, della sintesi di trasmettitori, di enzimi e di proteine, con il risultato di individuare la sede e l'entità delle alterazioni biochimiche nel paziente in esame.<sup>2</sup> I cosiddetti traccianti o, più correttamente, radiofarmaci, sono i protagonisti di queste tecniche all'avanguardia, in quanto, somministrati nel paziente, rappresentano i marcatori di questi processi biochimici e recettoriali, consentendo di studiare i diversi meccanismi che possono essere alla base di un tumore.

Diversamente dalla Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) e dalla TAC (Tomografia Assiale Computerizzata), che danno immagini prevalentemente morfologiche e anatomiche, la PET fornisce informazioni di tipo funzionale, permettendo di evidenziare l'attività di un organo o di un apparato e quindi la presenza di uno stato patologico in seguito alla modificazione di tale funzione. Per questi motivi recentemente, più che il solo tomografo PET, è stato introdotto un sistema integrato PET/CT (Tomografia Computerizzata), in grado di fornire nello stesso momento le informazioni sia anatomiche sia funzionali necessarie per individuare e caratterizzare una o più sedi tumorali.<sup>3</sup> Come vedremo più avanti, il Fluorodesossiglucosio, anche noto con la sigla [<sup>18</sup>F]FDG, è il radiofarmaco oggi più utilizzato negli studi PET di vari tipi di tumore, in quanto consente una buona diagnosi della stadiazione e localizzazione degli stessi nell'organismo.<sup>4</sup>

E' soprattutto nelle analisi PET con questo radiofarmaco, tuttavia, che si registrano le maggiori difficoltà nell'interpretazione delle immagini, in particolare a livello addominale dove non sono presenti strutture anatomiche ben identificabili; è dunque fondamentale, proprio in questo caso,

l'integrazione del tomografo PET con la TAC, per consentire una identificazione più accurata delle strutture anatomiche coinvolte e sedi di eventuali tumori o metastasi.

Al di là del settore oncologico, la PET e la SPECT hanno anche contribuito allo studio e all'analisi di alcune importanti patologie neurodegenerative, quali il morbo di Parkinson, l'Alzheimer e altri disordini del Sistema Nervoso Centrale, in quanto molte di queste malattie sono correlate all'alterazione funzionale di sistemi di neurotrasmissione o a modificazioni della densità recettoriale cerebrale.<sup>1</sup> Anche in questo caso, dunque, PET e SPECT possono essere utilizzate per effettuare la diagnosi precoce di una di queste patologie, per valutare la progressione della malattia o l'efficacia nel paziente di una determinata strategia terapeutica.

## **2. FASI DI PRODUZIONE DI UN RADIOFARMACO FINO ALL'ANALISI PET**

Gli step coinvolti nella sintesi di un radiofarmaco PET, che viene poi somministrato nel paziente per l'esame, possono essere schematizzati secondo il seguente ordine:

- ✓ Produzione del radionuclide desiderato mediante Ciclotrone;
- ✓ Processo di radiosintesi e formulazione farmaceutica;
- ✓ Controlli di Qualità sul radiofarmaco finale;
- ✓ Somministrazione endovenosa nel paziente;
- ✓ Acquisizione delle immagini PET per circa 30-45 minuti;
- ✓ Ricostruzione delle immagini tomografiche acquisite.

### **3. LA PET**

La Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) rappresenta probabilmente la tecnica di elezione nell'ambito dell'Imaging Molecolare. Come precedentemente accennato, si basa sull'utilizzo dei radiofarmaci, molecole marcate con un radioisotopo a breve emivita, che vengono iniettate nel paziente o nell'animale per via endovenosa per eseguire l'analisi tomografica.<sup>5</sup> La PET ha assunto negli ultimi anni un ruolo di primo piano nella diagnostica clinica, in quanto, grazie ai traccianti marcati, permette di studiare in modo non invasivo e soprattutto *in vivo* i processi biochimici e fisiologici che avvengono nei tessuti e negli organi; tra l'altro, la recente diffusione di questa tecnica è da attribuire principalmente alla evoluzione dei tomografi utilizzati per l'esame, in grado di fornire in tempi relativamente brevi immagini total body con una risoluzione spaziale ottimale (anche di pochi millimetri).<sup>6</sup> Il campo di applicazione principale resta quello oncologico, anche se diversi traccianti trovano impiego nello studio di alterazioni cardiologiche e di patologie del Sistema Nervoso Centrale e Periferico.

Poiché il radiofarmaco, una volta somministrato, si distribuisce nel tessuto o nell'organo di interesse, con la PET è possibile misurare e valutare il grado di malignità o aggressività di un tumore e l'eventuale presenza di metastasi a distanza, tutto questo mediante analisi di immagini delle sezioni anatomiche coinvolte. In generale, la perfusione e il metabolismo tissutali, la neurotrasmissione e il binding recettoriale, l'espressione genica, la farmacocinetica e farmacodinamica dei farmaci sono alcuni tra i meccanismi che possono essere analizzati *in vivo* mediante PET.

E' bene ricordare che gli studi PET si basano essenzialmente su due differenti strategie:

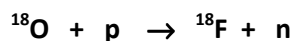
- valutazione dell'effetto dei farmaci su funzioni quali perfusione e metabolismo regionale;
- sviluppo di traccianti selettivi per determinati target molecolari, come recettori, enzimi, trasportatori di membrana da utilizzare come marcatori specifici.

Dal momento che la materia organica è formata in modo principale da idrogeno, carbonio, azoto ed ossigeno, i traccianti utilizzati nella PET sono comunemente marcati con radioisotopi naturali emittenti positroni, quali Carbonio-11, Azoto-13, Ossigeno-15 e Fluoro-18. Quest'ultimo è generalmente considerato un radioisotopo pseudo naturale, in quanto, pur non trovandosi come tale nelle molecole organiche, può tuttavia fungere da sostituito di atomi di idrogeno, ossidrili o altri gruppi funzionali all'interno delle molecole stesse.

Come vedremo più avanti, proprio il Fluoro-18 presenta requisiti ideali per le reazioni di radiosintesi, sia grazie alle sue caratteristiche fisiche, sia perché le immagini PET ottenute con traccianti marcati con Fluoro risultano caratterizzate da una migliore risoluzione spaziale.

I radioisotopi emittenti positroni vengono prodotti mediante opportune reazioni nucleari attraverso l'uso di un ciclotrone, bombardando specifici target di partenza. I nuclei atomici subiscono delle trasformazioni in seguito al bombardamento con particelle accelerate e caratterizzate da una

quantità di energia cinetica (milioni di elettronvolt) tale da vincere la forza di repulsione dei nuclei e rendere instabili i nuclei stessi. Un esempio interessante di reazione nucleare è proprio quella che conduce alla formazione del radioisotopo Fluoro-18, a partire da un target costituito da acqua arricchita con Ossigeno-18:



( $^{18}\text{O}$ = target o nuclide bombardato; p= particella incidente;  $^{18}\text{F}$ = nuclide prodotto; n= particella prodotta)

Quando un nucleo viene colpito in seguito al bombardamento, può rimettere una particella uguale a quella incidente (reazione di diffusione) o eventualmente emettere particelle e/o radiazioni elettromagnetiche dando luogo al cosiddetto decadimento radioattivo, che dà poi origine all'isotopo stabile.

I positroni emessi dai radioisotopi PET in seguito alla reazione nucleare, sono particelle  $\beta$  cariche positivamente, che si formano generalmente quando un protone è trasformato in un neutrone:



Poiché i positroni risultano particolarmente instabili, quando il radiofarmaco marcato viene somministrato nell'organismo per l'analisi PET, una volta emessi essi percorrono pochi millimetri all'interno del tessuto, diminuendo man mano la propria energia cinetica e interagendo con gli elettroni circostanti, che sono caratterizzati da stessa massa e carica opposta. Questa interazione fisica tra le due particelle, meglio nota con il termine di *annichilazione*, (Fig. 1) produce due raggi  $\gamma$  da 511 KeV (Kiloelettronvolt) con stessa direzione e verso diametralmente opposto (emissione back to back), in quanto particella e antiparticella si distruggono a vicenda emettendo energia;<sup>7</sup> i raggi  $\gamma$  così prodotti sono dunque captati in successione da una serie di rivelatori disposti circolarmente intorno al paziente, che trasformano questi impatti in opportuni segnali elettrici e permettono di rivelare l'evento e ricostruire le immagini in due o tre dimensioni degli organi o dei tessuti coinvolti nell'esame PET.

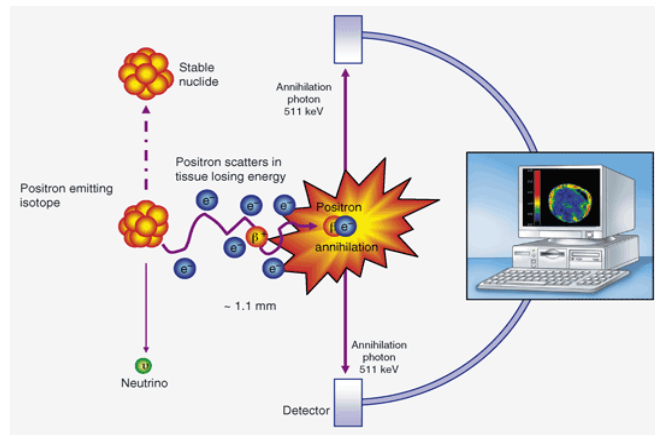


Fig.1: Annichilazione tra positrone emesso ed elettrone

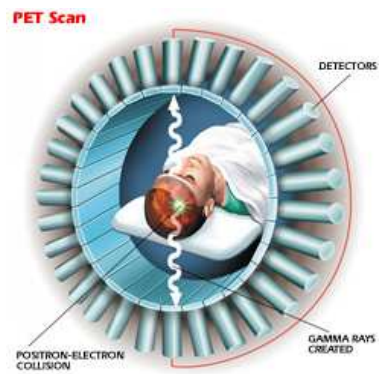


Fig.2: Detectors per la rivelazione dei fotoni



Fig.3: Modello di tomografo PET

#### **4. IL CICLOTRONE**

I radionuclidi o radioisotopi utilizzati per la marcatura dei radiofarmaci PET sono prodotti mediante bombardamento all'interno dei ciclotroni. Il ciclotrone è un acceleratore di particelle, sviluppato per la prima volta negli anni '30 dai due fisici americani Lawrence e Livingston, principalmente per ovviare ai limiti dei vecchi sistemi di accelerazione lineare usati in quel tempo. Dal punto di vista strutturale,<sup>8</sup> è composto da due o quattro elettrodi cavi con carica opposta (chiamati anche dees in virtù della loro forma a D), collocati tra i poli di un grosso magnete e nei quali viene praticato il vuoto (almeno  $10^{-5}$  torr) mediante un'opportuna pompa. Particelle cariche, soprattutto protoni o deuteroni, generate all'interno dello strumento, vengono accelerate dal forte campo elettrico prodotto dagli elettrodi e, grazie all'azione del campo magnetico, perpendicolare al piano dei dees, ad esse viene impressa una traiettoria circolare nel corso dell'accelerazione. I due elettrodi sono a loro volta collegati ad una sorgente, in grado di generare un voltaggio alternato che porta ad un progressivo aumento di energia; in seguito a questo fenomeno, le particelle accelerate sono indotte a muoversi secondo traiettorie a raggio sempre maggiore e a velocità crescenti, fino a quando esse sono deviate dalla traiettoria circolare ed estratte per essere inviate al target.

La produzione vera e propria dei radioisotopi ha luogo nel momento in cui il fascio di particelle accelerate urta contro i nuclei bersaglio cedendo la propria energia e dando luogo alla reazione nucleare desiderata. Generalmente, questi bersagli (o target materials) sono contenuti in appositi contenitori chiamati target, che sono continuamente raffreddati con acqua o elio, per contrastare il calore prodotto dal fascio. Ricordiamo che il materiale di cui sono costituiti i target può variare dall'argento, all'alluminio, al niobio, ma in ogni caso tutti devono essere in grado di resistere a pressioni e temperature elevate e risultare chimicamente e fisicamente inerti.

Il target che funge da bersaglio della reazione nucleare può trovarsi in stati fisici differenti: solido, liquido o gassoso ed è costituito da un isotopo stabile in forma generalmente pura, principalmente per evitare reazioni nucleari collaterali dovute ad impurezze fredde o calde.

Oltre ai ciclotroni a ioni positivi, finora descritti, esistono modelli a ioni negativi,<sup>8</sup> nei quali, durante la fase di estrazione, gli ioni vengono fatti passare attraverso un sottile foglio di carbonio che rimuove i due elettroni lasciando libero il nucleo e trasformando lo ione in una particella carica positivamente. In realtà questi modelli presentano anche dei notevoli vantaggi rispetto ai ciclotroni descritti in precedenza, in quanto garantiscono una efficienza di estrazione pari al 100%, permettono di dividere il fascio di ioni negativi in due fasci di ioni positivi in grado di colpire due differenti target ed evitano l'attivazione delle superfici interne in fase di accelerazione, in quanto gli ioni negativi non generano reazioni nucleari. Un unico inconveniente può essere rappresentato



dal fatto che questi ciclotroni necessitano generalmente di un vuoto più spinto rispetto ai modelli a ioni positivi.

La velocità di formazione dei radionuclidi ( $dN/dt$ ) durante la fase di irraggiamento è data dalla differenza tra la velocità con cui essi vengono creati, che è proporzionale alla corrente del fascio di particelle cariche  $I$ , e quella con cui si trasformano per decadimento radioattivo in funzione della costante di decadimento  $\lambda$ .

L'equazione che definisce ciò è la seguente:

$$dN/dt = kI - \lambda N$$

Essa indica che ci sarà un punto in cui la velocità di formazione uguaglierà il decadimento radioattivo, per cui superato questo, è inutile continuare il bombardamento (si raggiunge, cioè, la saturazione).<sup>9</sup>

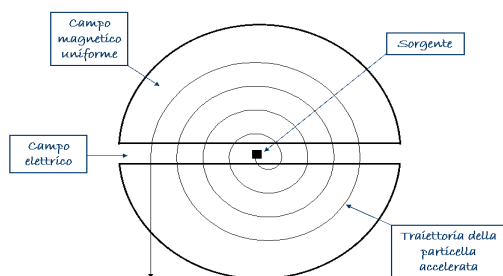


Fig.4: Accelerazione delle particelle nel ciclotrone



Fig.5: Modello di ciclotrone a 18 MeV  
(Cyclone 18/9 MeV, IBA)

## 5. I RADIOISOTOPI

I radioisotopi emittenti positroni generati mediante ciclotrone sono generalmente molto numerosi, ma solo alcuni di essi possono essere utilizzati per la marcatura dei radiofarmaci PET, in quanto pochi presentano i requisiti adatti all'utilizzo in campo medico e clinico. Sono richieste, infatti, alcune caratteristiche specifiche per l'utilizzo in PET:

- 1) Il tempo di emivita ( $t_{1/2}$ ) deve risultare adeguato al tipo di analisi eseguita;
- 2) Il radioisotopo deve essere prodotto in una forma chimica che ne permetta facilmente l'incorporazione in una molecola;
- 3) Il decadimento deve avvenire quasi interamente per positroni per garantire una buona qualità delle immagini PET registrate dai rivelatori nel corso dell'esame.

Come accennato precedentemente, Carbonio-11 ( $t_{1/2}=20\text{min}$ ), Azoto-13 ( $t_{1/2}=15\text{min}$ ), Ossigeno-15 ( $t_{1/2}=2\text{min}$ ) e Fluoro-18 ( $t_{1/2}=109.8\text{min}$ ) sono i più comuni radionuclidi utilizzati per la marcatura dei radiofarmaci PET (Tabella 1), anche se negli ultimi anni stanno trovando spazio nel campo dell'Imaging Molecolare altri radioisotopi quali il Rame-64, lo Iodio-124, il Bromo-76, il Gallio-68, ecc; tra tutti, comunque, il Fluoro-18 è indubbiamente la scelta più vantaggiosa per le reazioni di marcatura, in quanto si tratta di un radioisotopo dotato di requisiti ideali per la PET:

- 1) Innanzitutto il tempo di emivita, che garantisce studi a cinetica più lunga;
- 2) E' caratterizzato da una bassa energia del positrone emesso (0.693 MeV), che permette una migliore risoluzione delle immagini PET;
- 3) E' ideale per la marcatura di macromolecole bioattive caratterizzate da una farmacocinetica lenta;
- 4) Grazie a questi requisiti, consente di effettuare radiosintesi più complesse e costituite da più step successivi;
- 5) Permette di distribuire i radiofarmaci anche a centri PET sprovvisti di un ciclotrone e dunque non in grado di produrre Fluoro.

RADIOISOTOPO	REAZIONE NUCLEARE	PRODOTTO DEL DECADIMENTO	$t_{1/2}$	EMISSIONE $\beta^+$ (%)
$^{18}\text{F}$	$^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ $^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$	$^{18}\text{O}$	<b>109.8 min</b>	<b>96.9</b>
$^{11}\text{C}$	$^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ $^{11}\text{B}(p,n)^{11}\text{C}$ $^{10}\text{B}(d,n)^{11}\text{C}$	$^{11}\text{B}$	<b>20.4 min</b>	<b>99.8</b>
$^{13}\text{N}$	$^{12}\text{C}(d,n)^{13}\text{N}$ $^{13}\text{C}(p,n)^{13}\text{N}$ $^{10}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$	$^{13}\text{C}$	<b>9.96 min</b>	<b>100</b>
$^{15}\text{O}$	$^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$ $^{15}\text{N}(p,n)^{15}\text{O}$ $^{16}\text{O}(p,pn)^{15}\text{O}$	$^{14}\text{N}$	<b>2.03 min</b>	<b>99.9</b>

Tabella 1. Principali radionuclidi PET e loro caratteristiche fisiche.

Il tempo di dimezzamento così breve di questi radionuclidi richiede naturalmente che essi siano prodotti immediatamente prima del loro utilizzo. Quando viene messa a punto la strategia di sintesi di un radiofarmaco, uno dei fattori più importanti da considerare è proprio la scelta del radioisotopo da incorporare nella molecola, inoltre è utile prediligere all'interno della struttura una posizione che risulti stabile dal punto di vista del metabolismo e utilizzare una metodica che permetta di separare la molecola marcata da sottoprodotti della reazione o dal radionuclide stesso non reagito.

## **6. CARATTERISTICHE DI UN RADIOFARMACO**

Un radiofarmaco “ideale”, per essere utilizzato negli studi PET, deve presentare una serie di requisiti, in quanto, una volta somministrato nel paziente, la sua distribuzione nell’organismo o nell’organo di interesse dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche che lo contraddistinguono, dalla via di somministrazione, endovenosa o inalatoria e dalla sua capacità di attraversare le barriere biologiche. Dunque è importante che:

- 1) sia facilmente rilevabile nel corso dell’analisi;
- 2) non interferisca con i processi metabolici della sostanza in esame;
- 3) sia caratterizzato da una cinetica sovrapponibile a quella della sostanza marcata;
- 4) sia dotato di una buona permeabilità attraverso la barriera ematoencefalica (BEE).  
Ricordiamo, infatti, che il passaggio attraverso le barriere biologiche e, in particolare, attraverso la BEE, rappresenta senza dubbio uno degli step più critici soprattutto per quei radiofarmaci che devono raggiungere il cervello per effettuare studi a livello del Sistema Nervoso. Generalmente, il passaggio attraverso questa barriera può avere luogo con due modalità differenti:
  - per diffusione passiva, nel momento in cui il tracciante risulta sufficientemente lipofilo e quindi dotato di un coefficiente Log P compreso tra 1,5 e 2 o eventualmente neutro;
  - per trasporto attivo mediato da uno specifico trasportatore o carrier.
- 5) presenti una minima degradazione in sottoprodotti metabolici marcati, che potrebbero compromettere le immagini rivelate e dare falsi positivi nel corso dello studio PET. Eventuali metaboliti radioattivi si distribuiscono generalmente nell’organo di interesse in modo differente rispetto al radiofarmaco, con possibili errori nella fase di interpretazione delle immagini captate. La PET, infatti, misura la concentrazione locale di radioattività senza distinguere la forma chimica o l’ambiente in cui essa risiede, per cui è necessario che i metaboliti radiomarcanti non contribuiscano al legame specifico e non vengano trattenuti nell’area interessata. Allo stesso tempo, i radioligandi devono essere resistenti al rapido metabolismo lungo tutto il periodo dell’acquisizione dei dati.
- 6) abbia un’elevata affinità e selettività per il sito molecolare d’interesse, soprattutto se abbiamo a che fare con un enzima o un sottotipo recettoriale, in quanto la specificità di legame gioca un ruolo di primo piano nella fase di captazione (o uptake) del radiofarmaco e dunque nell’interpretazione delle immagini PET risultanti dallo studio. Per questi motivi, è sicuramente utile valutare preliminarmente queste caratteristiche mediante test di inibizione, spiazzamento e saturazione del sito di legame.

Un importante parametro da valutare soprattutto quando si ha a che fare con radiofarmaci recettoriali è la cosiddetta Attività o Radioattività Specifica,<sup>8</sup> definita come rapporto tra la quantità

di radioattività per massa di radiofarmaco ed espressa in Ci/ $\mu$ mole; generalmente, infatti, in una preparazione radiofarmaceutica è sempre presente una certa quantità di farmaco non marcato o cosiddetto “freddo”, che può avere origine dal materiale del target o da reagenti utilizzati nella sintesi; ad esempio, nel caso di marcature con Carbonio-11, la radiosintesi ha luogo a partire da [ $^{11}\text{C}$ ]CO<sub>2</sub> prodotta nel ciclotrone; la CO<sub>2</sub> ambientale, dunque, può facilmente infiltrarsi nel sistema di sintesi e competere con quella radioattiva, aumentando il prodotto freddo e diminuendo la resa della reazione di marcatura. Più l’attività specifica risulta elevata, quindi, minore sarà la quantità o massa fredda di tracciante iniettato, con una riduzione dei rischi di tossicità della sostanza nell’organismo e della saturazione del sito di legame di interesse.

Un ulteriore parametro da valutare in un processo di marcatura è la resa radiochimica,<sup>8</sup> che fa riferimento alla quantità di radioattività presente nel prodotto desiderato finale; il tempo di riferimento è rappresentato generalmente dal termine del bombardamento (EOB) o, eventualmente, dalla fine della sintesi del radiofarmaco (EOS).

La cosiddetta purezza radionuclidica<sup>8</sup> rappresenta, invece, la frazione di radioattività dovuta al radionuclide desiderato rispetto a quella totale e viene comunemente definita mediante spettroscopia a raggi  $\gamma$  e attraverso la determinazione del tempo di emivita del radioisotopo coinvolto. Lo strumento oggi maggiormente utilizzato per questo tipo di analisi l’ Analizzatore Multicanale, che può prevedere due diversi tipi di rivelatori: al Germanio, ampiamente adoperato per l’elevata risoluzione, e lo scintillatore a Ioduro di Sodio, preferito, talvolta, per la sua maggiore efficienza, nonostante la risoluzione decisamente inferiore.

Un radiofarmaco PET è valutato anche sulla base della sua purezza chimica e radiochimica;<sup>8</sup> la prima garantisce l’identità chimica della molecola marcata e l’assenza di altri prodotti chimici indesiderati, mentre la seconda, espressa in percentuale, rappresenta l’attività totale della sostanza attribuibile al prodotto marcato con il radionuclide prescelto nella posizione desiderata. Generalmente la purezza sia chimica che radiochimica finale di un qualsiasi tracciante non deve risultare inferiore al 95%.

E’ dunque fondamentale, prima di intraprendere un processo di radiosintesi, valutare attentamente l’isotopo da utilizzare e la posizione della molecola da marcare, tenendo conto della distribuzione del radiofarmaco nell’organismo e dei processi metabolici cui va incontro. Ricordiamo, a tal proposito, che i traccianti, una volta somministrati, subiscono delle trasformazioni chimiche *in vivo* analoghe a quelle che coinvolgono i farmaci tradizionali; generalmente il metabolismo avviene a livello epatico, ma in alcuni casi anche nel rene, nell’intestino o a livello polmonare. La dose e la via di somministrazione, le condizioni fisiologiche ed eventuali interazioni con altri farmaci sono i principali fattori in grado di influenzare il metabolismo dei radiofarmaci nell’organismo.

Quando il medico ha il compito di analizzare le immagini di un esame PET, ha la possibilità di scegliere fra tre metodiche differenti:

- metodo qualitativo: comporta la ricerca visiva della sede di accumulo del tracciante nelle sezioni tomografiche del sito di interesse;
- metodo semiquantitativo: l'accumulo di radiofarmaco nella cosiddetta ROI (Region Of Interest), viene valutato in rapporto al fondo e normalizzato rispetto al paziente e all'attività somministrata, servendosi di specifici programmi di analisi per questo tipo di valutazione. A tal proposito, la SUV (Standardized Uptake Value) è uno dei parametri presi in considerazione ed è data dal rapporto tra l'uptake del radiotracciante nelle zone di interesse e il peso del paziente moltiplicato per la dose somministrata;
- metodo quantitativo: con quest'ultima metodica lo scopo è valutare la cinetica di accumulo del radiofarmaco nell'organo o nel tessuto di interesse attraverso la cosiddetta PET dinamica, il campionamento ematico e l'utilizzo di opportuni programmi in grado di fornire parametri quantitativi della concentrazione di tracciante nella sede di accumulo.

Quando ci si approccia allo studio di un nuovo radiofarmaco, è possibile considerare tre differenti step di valutazione, che permettono di esaminare più fattori e stimare le potenzialità o la validità di un determinato tracciante nel corso di uno studio PET. Questi step sono descritti nei paragrafi successivi.

## **6.1 Studi in vitro**

Una fase importante e preliminare nella messa a punto di un radiofarmaco è rappresentata dagli **studi in vitro**<sup>8</sup>, che vengono eseguiti su opportune colture cellulari e permettono di identificare i fattori in grado di influenzare l'uptake della sostanza nella cellula ed eventuali trasformazioni metaboliche. Grazie a questo approccio, è possibile ottenere informazioni circa l'affinità della sostanza stessa per il sito di legame, la sua selettività, il numero e il tipo di metaboliti che si formano all'interno della cellula. Tuttavia, se pure questi studi forniscono risultati interessanti ai fini della messa a punto di un nuovo prodotto, non danno informazioni sulla farmacocinetica della sostanza *in vivo*.

## **6.2 Studi nell'animale**

Gli **studi nell'animale**<sup>8</sup> rappresentano dunque uno step fondamentale e necessario nella valutazione di un nuovo radiofarmaco. Generalmente, per questo tipo di studi, vengono utilizzati principalmente topi e ratti, anche se risultati interessanti sono stati ottenuti mediante osservazioni nei primati e nelle scimmie. Questa fase di analisi preclinica, dunque, permette di effettuare studi di biodistribuzione del radiofarmaco nel tempo e di valutare la presenza di metaboliti nel sangue o nei tessuti interessati.

Nel corso di questi esami, la somministrazione del tracciante nell'animale da esperimento avviene per via endovenosa e l'analisi viene effettuata mediante una microPET dedicata, a diversi intervalli di tempo. Per valutare i metaboliti tissutali, tuttavia, è necessario il sacrificio dell'animale, in modo da poter effettuare lo studio in seguito a prelievo degli organi coinvolti. Da questi ultimi, inoltre, è anche possibile ricavare sottili fette di tessuto da sottoporre ad autoradiografia, in modo da valutare la ripartizione del radiofarmaco nell'organismo.

Un ulteriore vantaggio degli studi *in vivo* nell'animale consiste nella determinazione della cosiddetta clearance, che rappresenta l'eliminazione dal plasma della radioattività.

## **6.3 Studi nell'uomo**

Una valutazione ancora più attendibile del comportamento del radiotracciante nell'organismo, è realizzata, tuttavia, attraverso gli **studi nell'uomo**<sup>8</sup>, grazie ai quali è possibile determinare la biodistribuzione dell'attività e la presenza di metaboliti nel sangue. Questa analisi viene eseguita effettuando più prelievi dopo la somministrazione del radiofarmaco e valutando la percentuale di tracciante integro, in modo da costruire successivamente curve di attività nel sangue vs tempo, che mostrano la scomparsa del radiofarmaco nel sangue stesso. Questi dati sono poi inseriti in appositi

modelli matematici e integrati con i dati delle immagini PET, al fine di ottenere un risultato quantitativo di accumulo del tracciante nel sito di interesse.



## 7. FLUORO-18

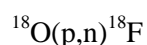
Il Fluoro-18, come descritto precedentemente, può essere considerato il radioisotopo di elezione in ambito PET, grazie ai numerosi vantaggi che lo contraddistinguono. Ha un tempo di dimezzamento pari a circa 110 minuti (il più lungo tra i vari radioisotopi convenzionali) ed è caratterizzato da un decadimento che avviene per il 97% per emissione positronica e per il restante 3% per cattura elettronica.

Chimicamente, essendo in grado di formare legami covalenti piuttosto forti con i composti del carbonio, può essere introdotto in un numero alquanto grande di molecole organiche, poichè, come già accennato, può fungere da sostituito di atomi di idrogeno o di gruppi ossidrilici OH, come avviene nel caso dell' $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ .

Infatti il Fluoro può sostituire l'Idrogeno grazie al fatto di possedere un raggio di Van der Waals del tutto simile e quindi la sostituzione non comporterebbe alcuna variazione di ingombro sterico nella molecola marcata. Tuttavia, potrebbero presentarsi problemi legati alla diversa elettronegatività tra i due atomi, poiché il F è più elettronegativo dell'H, che forniscono alla molecola proprietà biologiche diverse (es. diversa lipofilità). In questo caso, però, si è visto che l'atomo di F poteva sostituire un gruppo ossidrilico con facilità, in quanto non risultava che modificasse le caratteristiche della molecola finale in modo sostanziale.

Questo radionuclide può essere prodotto in vari modi, sfruttando reazioni nucleari differenti, anche se la reazione più comune, come già visto, è quella che parte dall'acqua arricchita con  $^{18}\text{O}$ , che risulta caratterizzata da una resa significativamente più elevata rispetto alle altre reazioni nucleari. Una volta ottenuto, il fluoruro viene generalmente separato dall'acqua arricchita usando colonne scambiatrici di anioni o mediante distillazione, in modo poi da utilizzare il fluoruro radioattivo nelle reazioni di marcatura. In alcuni casi, tuttavia, la separazione è superflua e il fluoruro viene utilizzato come tale in soluzione.

Con la reazione nucleare sopra citata, è dunque possibile ottenere Fluoro-18 nella forma di ione fluoruro  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ , che viene utilizzato principalmente per le cosiddette reazioni di sostituzione nucleofila. Tuttavia, la marcatura delle molecole organiche può avere luogo anche mediante fluorurazioni elettrofile e, in questo caso, il fluoruro ottenuto nella forma molecolare  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  viene prodotto mediante la seguente reazione nucleare:



che utilizza un target gassoso costituito da ossigeno-18. Recentemente, tra l'altro, è stata messa a punto una strategia di marcatura che fa uso contemporaneamente di fluoruro nucleofilo in presenza di un reagente elettrofilo, combinando entrambe le reazioni di sostituzione.

Tra i radiofarmaci marcati con Fluoro-18, il 2-deossi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucosio (FDG) è indubbiamente il più diffuso nel settore PET ed è uno dei pochi a trovare un ottimo riscontro nella pratica clinica, principalmente in ambito oncologico.

L' [<sup>18</sup>F]FDG è considerato un tracciante metabolico, in quanto dal punto di vista strutturale rappresenta un analogo della molecola di glucosio, in cui un gruppo ossidrilico OH in posizione C<sub>2</sub> è sostituito da un atomo di fluoro. Per questa ragione, una volta somministrato nell'organismo per lo studio PET, subisce la stessa via metabolica dello zucchero corrispondente e, superata la membrana cellulare, viene fosforilato dall'enzima esochinasi a [<sup>18</sup>F]FDG-6fosfato.

Mentre il glucosio, dopo questo passaggio, viene ulteriormente metabolizzato dagli altri enzimi della catena glicolitica, l' [<sup>18</sup>F]FDG-6fosfato non può subire successive trasformazioni, in quanto manca dell'ossidrile in posizione 2; di conseguenza, viene captato come tale nelle cellule dei tessuti e degli organi e continua ad accumularsi nel tempo. A tal proposito, è bene ricordare che la sua velocità di accumulo è direttamente proporzionale alla velocità di fosforilazione del glucosio e al suo utilizzo da parte del tessuto coinvolto; poiché organi come il cuore e il cervello e i tessuti tumorali sono caratterizzati da un'attività glicolitica particolarmente intensa, è chiaro che a questi livelli l'accumulo di tracciante risulterà senza dubbio elevata. Del resto, il tumore, essendo caratterizzato da una proliferazione cellulare superiore alla norma, è sicuramente sede di una richiesta di energia molto più alta rispetto ad un tessuto o ad un organo sani.

Oggi il metodo di sintesi più diffuso per la produzione di [<sup>18</sup>F]FDG è rappresentato da una semplice reazione di sostituzione nucleofila, in cui il fluoruro prodotto dalla reazione nucleare va a sostituire il gruppo OH a livello del Carbonio in posizione 2. Questo metodo è anche noto come *Sintesi di Hamacher*,<sup>10</sup> (Fig. 6) il primo a descrivere questa procedura, anche se nel tempo essa ha subito modifiche progressive con lo scopo di accorciarne i tempi e migliorarne la resa finale.

Nell'immagine di seguito riportata, è descritta la reazione di fluorurazione mediante il processo di sostituzione nucleofila e la successiva idrolisi, che può essere acida o basica, per liberare i gruppi acetilati.

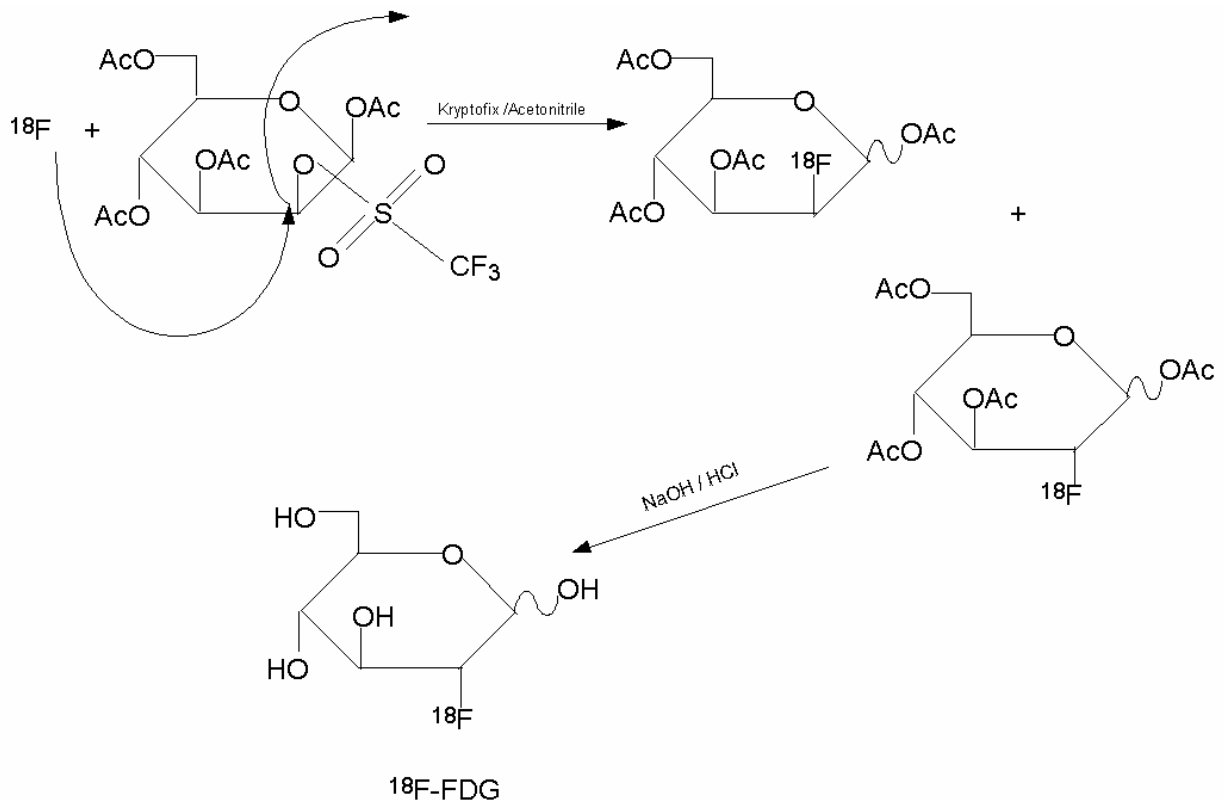


Fig. 6. Sintesi del [ $^{18}\text{F}$ ]FDG mediante sostituzione nucleofila. Il precursore della reazione è caratterizzato da un triflato che funge da gruppo uscente per lasciar posto al Fluoro-18. (Yu, S., Biomed. Imaging and Interv. J., 2006, 2(4)).

Nonostante l' [ $^{18}\text{F}$ ]FDG trovi impiego per una buona parte nel campo cardiologico e neurologico, il settore oncologico resta quello di elezione negli studi PET. Infatti, esso rappresenta un marker tumorale particolarmente efficace, che consente, grazie all'analisi tomografica, di rilevare e localizzare i tumori primari, di distinguere i tessuti maligni da quelli benigni, di monitorare la risposta dell'organismo a una determinata strategia terapeutica. L' [ $^{18}\text{F}$ ]FDG si è rivelato particolarmente indicato nello studio di alcuni tipi di tumore; tra questi, il cancro ai polmoni, il tumore al tratto colon-rettale, il linfoma, il melanoma, il tumore testa-collo e il cancro alla mammella.<sup>4</sup> Grazie a questa varietà di applicazioni, questo radiofarmaco sta diventando sempre più diffuso nella pratica clinica.

Come sopra accennato, la marcatura dell'FDG avviene mediante reazione di sostituzione nucleofila, anche se la marcatura con Fluoro-18 può aver luogo anche tramite fluorurazioni elettrofile. Naturalmente le due modalità presentano delle differenze sostanziali.

## **7.1 Reazioni elettrofile**

Reazioni di sostituzione elettrofila: il reagente utilizzato in questi tipi di sintesi è il fluoro sotto forma di  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ , cioè fluoro gassoso, che, nonostante abbia una reattività molto alta, dall'altro lato ha lo svantaggio di risultare abbastanza distruttivo. Attualmente esso viene utilizzato soltanto per le marcature di radiofarmaci che non necessitano di un'attività specifica particolarmente elevata, in quanto la resa è generalmente non troppo alta e non supera il 50%, questo perché solo uno dei due atomi di fluoro viene incorporato nel prodotto finale marcato.

## **7.2 Reazioni nucleofile**

In questo caso l'agente utilizzato per le marcature è il fluoro sotto forma di fluoruro  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ , in soluzione acquosa, ed è ottenuto nella maggior parte dei casi mediante reazione nucleare a partire da acqua arricchita con Ossigeno-18. A differenza del fluoro gassoso, l' $\text{F}^-$  è caratterizzato da una reattività più bassa, ma nel corso degli anni si è cercato di migliorare questo requisito per ottimizzare le reazioni di marcatura con questo agente. Quando il target viene irradiato durante il bombardamento nel ciclotrone, il fluoruro prodotto è accompagnato da un controione con carica positiva; tuttavia, questi controioni non servono ad accentuare la sua reattività; per questo motivo, nel corso delle reazioni di marcatura, vengono volutamente aggiunti dei controioni prima della fase di evaporazione dell'acqua, in particolare potassio, cesio o rubidio, quindi ioni metallici che vengono complessati con degli agenti criptandi quali il Kryptofix 2.2.2., un etere corona che funge da catalizzatore di trasferimento di fase per trasportare il fluoruro radioattivo nella fase organica dove avviene la reazione di sostituzione. Oggi la strategia più seguita in questi tipi di sintesi è l'uso della miscela  $\text{K}^+/\text{Kryptofix}$ , accompagnata dall'aggiunta di un anione come l'idrossido o il carbonato, che non competono con il fluoruro nella reazione di sostituzione nucleofila. Attualmente questa via è quella prescelta per le marcature con fluoro, in quanto è possibile ottenere rese più elevate e un'attività specifica molto buona, anche maggiore di  $2 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$ .

## 8. TSPO

Il Recettore Benzodiazepinico Periferico (PBR), rinominato recentemente Translocator Protein (TSPO)<sup>11</sup> o proteina di translocazione, è, dal punto di vista strutturale, un grosso complesso proteico transmembrana; esso, infatti, è localizzato principalmente a livello della membrana cellulare mitocondriale esterna e, in buona parte, nei siti di contatto tra le due membrane interna ed esterna.<sup>12</sup> Trattandosi di un complesso multimerico, è costituita da tre differenti subunità, ciascuna con una propria funzione: 1) la subunità IBP (Isochinolin carbossamide Binding Protein), da 18 KDa, che può essere identificata con lo stesso recettore PBR; 2) la subunità VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), da 32 KDa, che risulta fondamentale per il legame delle benzodiazepine; 3) la subunità ANT (Adenine Nucleotide Translocase), da 30 KDa, il cui ruolo non è stato, in realtà, ancora ben identificato e chiarito.<sup>13</sup>

Questo complesso recettoriale è assolutamente distinto dal Recettore Benzodiazepinico Centrale (CBR), sia per quanto riguarda la struttura e le funzioni fisiologiche e farmacologiche, sia per la localizzazione a livello subcellulare. Il CBR, infatti, come ci suggerisce il nome, è localizzato esclusivamente nel Sistema Nervoso Centrale ed è associato al complesso recettoriale del GABA<sub>A</sub>.<sup>14</sup> (Fig. 7).

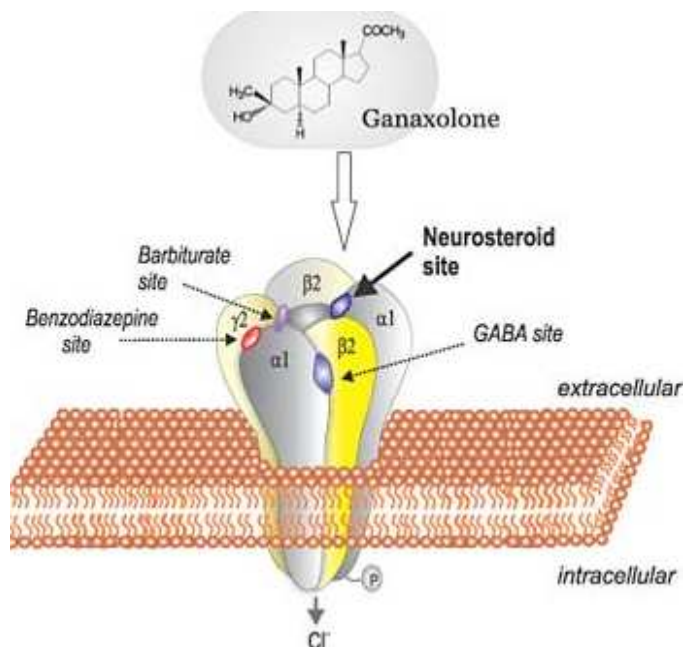


Fig.7. Complesso recettoriale del GABA<sub>A</sub> con le subunità a cui si legano le diverse classi farmacologiche.

Da qualche anno, è stata proposta una nuova nomenclatura per il PBR, nonostante questa denominazione sia sempre stata accettata e diffusa dalla comunità scientifica; tuttavia, per una serie di ragioni, oggi si preferisce definire questo recettore proteina di translocazione (TSPO). Infatti, Papadopoulos et al.<sup>11</sup> hanno definito l'aggettivo benzodiazepinico sostanzialmente inappropriato, per il semplice fatto che numerose molecole, con struttura molto diversa da quella delle benzodiazepine, sono in grado di legare questa subunità recettoriale; d'altro canto, invece, sono note diverse benzodiazepine che non si legano al PBR stesso. In seconda istanza, il termine periferico non riflette la corretta collocazione del recettore, in quanto esso non è distribuito solo a livello degli organi periferici ma è in parte espresso nelle cellule gliali ed endoteliali, localizzate a livello del Sistema Nervoso Centrale. In ultimo, il PBR di per sé non è da considerarsi un recettore nel senso più comune e tradizionale del termine. Generalmente, ma non sempre, esso è localizzato a livello mitocondriale; nonostante alcuni dati indichino che una localizzazione extra-mitocondriale potrebbe risultare da alcune mutazioni, non ci sono elementi che denotano le funzioni delle frazioni nucleare e mitocondriale.

La denominazione TSPO, proposta da Papadopoulos, si riferisce solo ed esclusivamente alla subunità da 18 KDa del complesso recettoriale, che rappresenta la minima unità funzionale, cioè il sito di legame della maggiorparte dei ligandi del PBR attualmente noti.

Nel corso degli anni, numerosi studi hanno permesso di identificare il TSPO in particolar modo nelle cellule gliali, che appartengono al Sistema Nervoso, e nei tessuti steroidogenici, deputati alla sintesi di tutti gli ormoni steroidei. Inoltre, è stata identificata un'espressione elevata del recettore in numerosi tessuti e organi periferici, quali il rene, il polmone, il cuore, la milza e le ghiandole adrenergiche,<sup>15</sup> mentre un livello abbastanza basso è stato riscontrato nel parenchima ed endoteliale cerebrale e nei neuroni olfattivi.<sup>16</sup> Ad oggi, il ruolo fisiologico del TSPO non è stato ancora ben definito, tuttavia sono state ipotizzate una serie di funzioni nelle quali questo recettore sembra essere coinvolto, data anche la sua collocazione a livello mitocondriale.

Potenzialmente, il TSPO, è implicato in differenti condizioni sia normali che patologiche nel nostro organismo; la sintesi degli steroidi e del colesterolo, la respirazione e la proliferazione cellulare,<sup>17</sup> la regolazione del metabolismo mitocondriale, il flusso di calcio e l'apoptosi, cioè la morte cellulare programmata, sono alcune delle più importanti condizioni in cui il recettore risulta normalmente implicato e, la regolazione delle quali, rappresenta una potenziale applicazione clinica dei ligandi del recettore stesso.<sup>18</sup>

Per quanto riguarda le funzioni patologiche, il TSPO sembra interpretare un ruolo di rilievo nei disordini psichiatrici, nelle patologie neurodegenerative, nell'epilessia, nel cancro e nelle neuropatie periferiche.

Comunque, alcuni studi hanno messo in luce una sua sovraespressione nei macrofagi attivati, cellule che si accumulano principalmente intorno ad un sito infiammatorio, e nella microglia, un tipo di cellule della glia che si occupano della principale difesa immunitaria a livello del Sistema

Nervoso Centrale. Infatti, nonostante il cervello contenga livelli di TSPO relativamente bassi, si è notato che la densità recettoriale aumenta in maniera drammatica dopo vari tipi di danno a livello cerebrale. Questa caratteristica fa sì che il recettore possa essere utilizzato negli studi di imaging *in vivo* dei processi neurodegenerativi e neuroinfiammatori che caratterizzano numerose patologie cerebrali, in particolare la Sclerosi Multipla,<sup>19</sup> il Morbo di Alzheimer,<sup>20</sup> la Malattia di Huntington<sup>21</sup> e il Morbo di Parkinson.<sup>22</sup> Inoltre, una grande varietà di tumori, quali il carcinoma alla mammella,<sup>23</sup> il cancro colon-rettale<sup>24</sup> e i tumori cerebrale<sup>25</sup> ed epatico,<sup>26</sup> sembra sovraesprimere questo recettore in accordo con il grado di malignità del tumore stesso, con la conseguenza che il TSPO potrebbe risultare di potenziale interesse anche nel settore oncologico.

La sintesi degli steroidi è, con grande probabilità, la funzione più ampiamente studiata di questo recettore. Il complesso recettoriale del DBI (mitochondrial Diazepam-Binding Inhibitor) e i suoi prodotti proteolitici sono in grado di interagire con il TSPO per stimolare la sintesi steroidea a livello mitocondriale. È stato verificato che moltissimi ligandi del recettore stimolano, sia *in vitro* che *in vivo*, la steroidogenesi e la neurosteroidogenesi e agiscono facilitando il rilascio di colesterolo nei mitocondri, cioè promuovono la sua translocazione dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna. Anche a questo, naturalmente, si deve il nome di proteina di translocazione.<sup>11</sup>

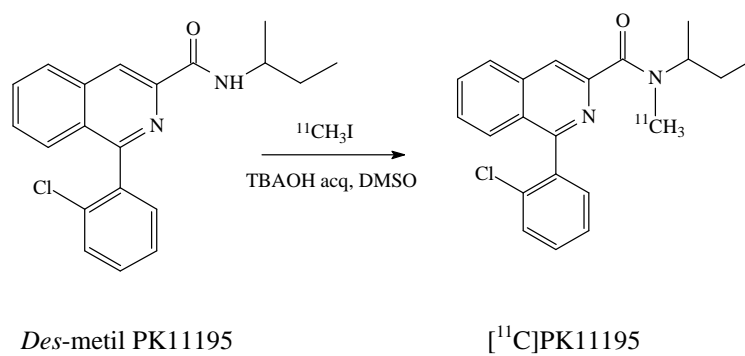
L'ampio spettro di applicazione del TSPO per gli studi di imaging *in vivo* di differenti condizioni patologiche nel cervello e in periferia, ha determinato un sempre maggior interesse nello sviluppo di radiofarmaci usati proprio nell'imaging di questo recettore mediante PET o SPECT.

Attualmente, uno dei radiofarmaci più rappresentativi per lo studio del TSPO mediante PET è il PK11195 (1-(2-Chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide), un composto a struttura isochinolincarbosammidica caratterizzato da una buona affinità nei confronti del recettore. Esso è considerato il primo ligando a struttura non benzodiazepinica in grado di legare il TSPO con affinità nanomolare.<sup>27</sup>

Questo radiofarmaco è marcato con il radioisotopo Carbonio-11 (Schema 1) e viene oggi utilizzato principalmente nello studio dei tumori cerebrali, del morbo di Parkinson, della Sclerosi Multipla e nelle anomalie dei canali del calcio che caratterizzano alcune patologie cardiache.

Il [<sup>11</sup>C]PK11195 è comunque considerato un farmaco sperimentale e, come tale, necessita attualmente di specifiche autorizzazioni per il suo utilizzo nei protocolli clinici. Come vedremo in seguito, infatti, essendo un radiofarmaco sprovvisto di una monografia ufficiale nella Farmacopea Europea, è richiesto un dossier completo comprendente tutte le fasi della produzione e dei controlli di qualità del tracciante, da sottoporre all'autorità competente per ottenere l'autorizzazione all'uso clinico.

Ricordiamo che il PK11195 è sintetizzato mediante una reazione di N-metilazione a partire dal precursore *des*-metilato, secondo lo schema di seguito riportato:



Schema 1. Reazione di metilazione del PK11195 marcato con Carbonio-11.

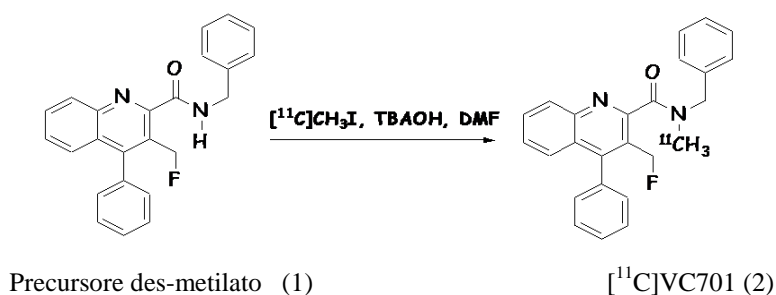
Tuttavia, è stato dimostrato che questo tracciante è caratterizzato da una serie di limitazioni, a causa della sua bassa affinità in vitro, del suo rapporto segnale-rumore e della sua elevata lipofilia.<sup>28, 29</sup>



## 9. SCOPO DELLA RICERCA

Scopo della ricerca è stata la radiosintesi e la valutazione biologica preliminare del nuovo tracciante [ $^{18}\text{F}$ ]VC701, un antagonista del recettore TSPO, potenzialmente utile nello studio di patologie neurodegenerative mediante PET.

Dal punto di vista strutturale, il VC701 è considerato un analogo del PK11195, in quanto si tratta di un composto 3-alometil-2-chinolin-carbossammidico, caratterizzato, dunque, da elevata specificità e affinità per il TSPO. Qualche anno fa, il gruppo di ricerca dell'Ospedale San Raffaele, dove svolgo la mia attività, ha effettuato la marcatura di questa molecola con il radioisotopo Carbonio-11, partendo dal precursore *des*-metilato corrispondente; anche in questo caso è stata eseguita una reazione di *N*-metilazione utilizzando [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>I (Ioduro di metile) come agente metilante, in presenza di tetrabuttilammonio idrossido (TBAOH) a 80°C per circa 4 minuti.<sup>30, 31, 32</sup>



Schema 2. Reazione di metilazione del VC701 marcato con Carbonio-11.

Naturalmente, il radiofarmaco marcato è stato sottoposto ad una serie di studi preclinici nell'animale da esperimento, per valutare la validità di questo tracciante nella PET. Come ci si aspettava, è stato osservato un maggiore accumulo di radioattività nei tessuti che risultano ricchi in TSPO, in particolare cuore, polmoni, rene e milza; inoltre, gli studi di binding e gli esperimenti cinetici hanno permesso di valutare l'affinità nei confronti del recettore, le relazioni struttura-attività e la biodistribuzione nell'animale sottoposto ad esame.

E' risultato che tutti i derivati a struttura 3-alometil-2-chinolin-carbossammidica sono caratterizzati da un'affinità nanomolare verso il TSPO; inoltre, la presenza di un atomo di alogeno nella molecola sembra avere un effetto positivo sull'affinità recettoriale stessa.<sup>32</sup>

Naturalmente, il grosso svantaggio nell'utilizzo di questo tracciante risiede nel breve tempo di dimezzamento che caratterizza il Carbonio-11, in quanto, con soli 20.4 minuti di emivita, non ha permesso di effettuare studi preclinici *in vivo* a cinetica più lunga. E' per questo motivo che

l'attività di ricerca è stata orientata verso la marcatura dello stesso VC701 con il radioisotopo a più lunga emivita Fluoro-18.

## **10. NEUROINFIAMMAZIONE**

Il processo infiammatorio<sup>33</sup> rappresenta in generale una risposta fisiologica dell'organismo ad uno o più danni a livello tissutale; esso dà luogo ad una cascata di eventi antiinfiammatori che consistono in una serie di reazioni chimiche e cellulari, di cui sono protagoniste, ad esempio, le cosiddette citochine, molecole proteiche responsabili dei meccanismi di differenziazione cellulare. Tutti gli eventi della cascata infiammatoria portano, generalmente, alla formazione di una cicatrice della parte lesa, che risulta così isolata dal tessuto circostante sano.

Se consideriamo l'ambito cerebrale, il sistema nervoso centrale non presenta una elevata capacità di rigenerare i propri tessuti, di conseguenza un processo infiammatorio acuto derivante da episodi come un trauma cerebrale o un ictus, può comportare la formazione di una lesione abbastanza estesa e una perdita neuronale importante; un evento infiammatorio di tipo cronico, inoltre, è probabilmente responsabile della perdita neuronale in numerose patologie del sistema nervoso, in particolare alcune malattie autoimmuni quali il Parkinson, l'Alzheimer, la Sclerosi Multipla e altre patologie neurodegenerative.

Generalmente, nel corso dei fenomeni neuroinfiammatori, vengono attivate una serie di cellule, tra le quali la microglia, i monociti e i macrofagi svolgono un ruolo fondamentale.

I primi studi condotti con ligandi del recettore benzodiazepinico mostrarono che alcuni di essi erano in grado di legarsi in misura maggiore contestualmente all'attivazione della microglia, per cui il binding di queste molecole al recettore divenne un indice indiretto di un danno importante a livello neuronale.

Come precedentemente accennato, ci si rese conto che questi ligandi andavano a legare una porzione specifica del recettore, quella oggi denominata TSPO, e, poiché il legame risultava minimo in condizioni normali e di gran lunga aumentato in seguito all'attivazione della microglia o dei macrofagi, esso è considerato oggi come un marker significativo della infiammazione e neuroinfiammazione e, di conseguenza, dei processi neurodegenerativi.

## **11. TRACCIANTI USATI NELLO STUDIO DEL TSPO**

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi radiofarmaci per lo studio del recettore TSPO mediante imaging *in vivo*.

Chaveau et al., in una esaustiva review del 2008,<sup>33</sup> hanno descritto in modo dettagliato le diverse e numerose classi di ligandi del TSPO, utilizzate negli studi imaging della neuroinfiammazione mediante PET o che risultano promettenti in questo tipo di settore. Si tratta, in tutti i casi, di analoghi o derivati del più noto [<sup>11</sup>C]PK11195, e sono suddivisi dagli autori in sette classi fondamentali: benzodiazepine, chinolin-carbossammidi, indolacetammidi, alcaloidi della vinca, ossididropurine, fenossiarilacetammidi e imidazopiridine. Tra le benzodiazepine, degno di nota perché capostipite storico dei ligandi recettoriali è il [<sup>11</sup>C]Ro5-4864, la prima molecola in grado di discriminare il recettore benzodiazepinico periferico da quello centrale; tuttavia, gli studi compiuti con questo ligando sono risultati a lungo andare discordanti, anche perché il suo legame risultava differente in base alla specie coinvolta.

Dopo l'arrivo del [<sup>11</sup>C]PK11195, negli anni sono stati messi a punto nuovi ligandi marcati sia con Carbonio-11 che con Fluoro-18. Di particolare interesse risultano il [<sup>11</sup>C]DAA1106<sup>34</sup> e il suo metil-derivato marcato con Fluoro-18, sperimentati nel cervello dei primati mediante studi PET, mentre l'etil-derivato [<sup>11</sup>C]FEDAA1106 e il corrispondente [<sup>18</sup>F]FEDAA1106<sup>35</sup>, sono stati proposti per evidenziare l'espressione del recettore non solo a livello cerebrale ma anche in vari tipi di tumore.

Un altro radiofarmaco di recente sviluppo è il DPA-714<sup>36</sup>, marcato con Fluoro-18, una struttura pirazolo pirimidinica che è stata sperimentata per valutare il ruolo del TSPO nei processi neuroinfiammatori.

Nella classe delle fenossiarilacetammidi, invece, possiamo ricordare il [<sup>18</sup>F]PBR06<sup>37</sup>, sviluppato per uno studio di quantificazione del recettore nel cervello umano sano; esso ha mostrato una buona potenzialità come tracciante PET, manifestando un ruolo promettente quale biomarker dell'infiammazione a livello cerebrale.

## **12. RISULTATI**

### **12.1 Parte chimica**

Il precursore per la radiosintesi, denominato VC622, è stato fornito dal Prof. Andrea Cappelli del Dipartimento Farmaco-Chimico dell'Università di Siena, con cui il gruppo del San Raffaele collabora da qualche anno.

L'*N*-benzil-3-clorometil-*N*-metil-4-fenil-2-chinolincarbossammide è stato preparato seguendo la procedura descritta da Cappelli et al. nel 2003,<sup>38</sup> mentre lo standard freddo corrispondente alla molecola marcata, ovvero l'*N*-benzil-3-fluorometil-*N*-metil-4-fenil-2-chinolincarbossammide, è stato sintetizzato mediante sostituzione nucleofila dell'atomo di cloro del precursore con un atomo di fluoro, in presenza dell'etere corona 18-crown-6 (1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecane), che funge da catalizzatore del processo di trasferimento di fase.<sup>39</sup>

### **12.2 Parte radiochimica**

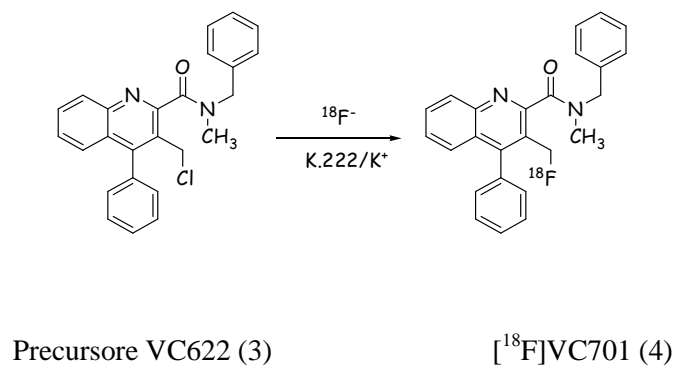
Il radiofarmaco [<sup>18</sup>F]VC701 è stato sintetizzato mediante reazione di sostituzione nucleofila, nella quale l'atomo di Cloro del precursore, che funge da buon gruppo uscente, è sostituito dal radioisotopo Fluoro-18, prodotto attraverso la reazione nucleare <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F. Il processo di radiosintesi è stato effettuato utilizzando il modulo di sintesi automatico TracerLab<sub>FX-FN</sub>, della GE Healthcare.



Fig. 8. Modulo automatico TracerLab<sub>FX-FN</sub> per la marcatura con Fluoro-18 mediante sostituzione nucleofila.

La reazione di sintesi è stata condotta utilizzando 2 mg di precursore disciolti in 1 ml di DMSO anidro, a 140°C per circa 20 minuti di tempo. L'intero processo di radiosintesi, inclusi la fluorurazione, la purificazione in colonna HPLC semipreparativa e la formulazione farmaceutica per la somministrazione per via endovenosa, è risultato completo dopo circa 80 minuti dalla fine del bombardamento con ciclotrone.

Di seguito è riportato lo schema di reazione della radiosintesi, mediante marcatura del precursore con Fluoro-18.



Schema 3. Reazione di fluorurazione del [<sup>18</sup>F]VC701 mediante sostituzione nucleofila.

La resa radiochimica della reazione (non corretta per il decadimento) è risultata essere di circa il 10-15%, inoltre sono state ottenute una purezza chimica e radiochimica superiori al 95% e un'attività specifica finale superiore a 1Ci/μmol al termine della sintesi. In un tipico esempio di sintesi, partendo da circa 500-600 mCi (19-22 GBq) di [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>, sono stati ottenuti circa 100 mCi (3,7 GBq) di prodotto finale marcato.

L'identità del radiofarmaco così prodotto è stata ulteriormente confermata attraverso un controllo mediante HPLC analitica, coiniettando l' [<sup>18</sup>F]VC701 con il suo standard freddo corrispondente. Inoltre, è stata anche effettuata un'analisi di Spettrometria di Massa del prodotto marcato decaduto.

Ricordiamo che la reazione chimica che avviene nel corso della fluorurazione è una Sostituzione Nucleofila alifatica di tipo SN<sub>2</sub>, anche detta bimolecolare; questo tipo di meccanismo coinvolge un nucleofilo (Nu:<sup>-</sup>), caratterizzato da una coppia di elettroni non condivisi, che reagisce con un substrato in cui un atomo è sostituito da un altro atomo. Naturalmente questo substrato, per essere considerato idoneo a questo tipo di reazione, deve possedere nella sua molecola un buon gruppo uscente, in grado di cedere facilmente il posto al nuovo atomo o al nuovo gruppo atomico. La rottura di questo legame covalente dà quindi origine a degli ioni. Generalmente, nel meccanismo SN<sub>2</sub>, la rottura del legame e la formazione del nuovo composto avvengono simultaneamente. In queste reazioni, i gruppi uscenti sono rappresentati fondamentalmente da alogeni o esteri solfonati o da strutture cicliche. Naturalmente, quando si sceglie il gruppo uscente per la reazione di radiosintesi, è necessario tener conto della stabilità del precursore e della semplicità di separazione del prodotto fluorurato dal precursore o da altri reagenti della reazione.

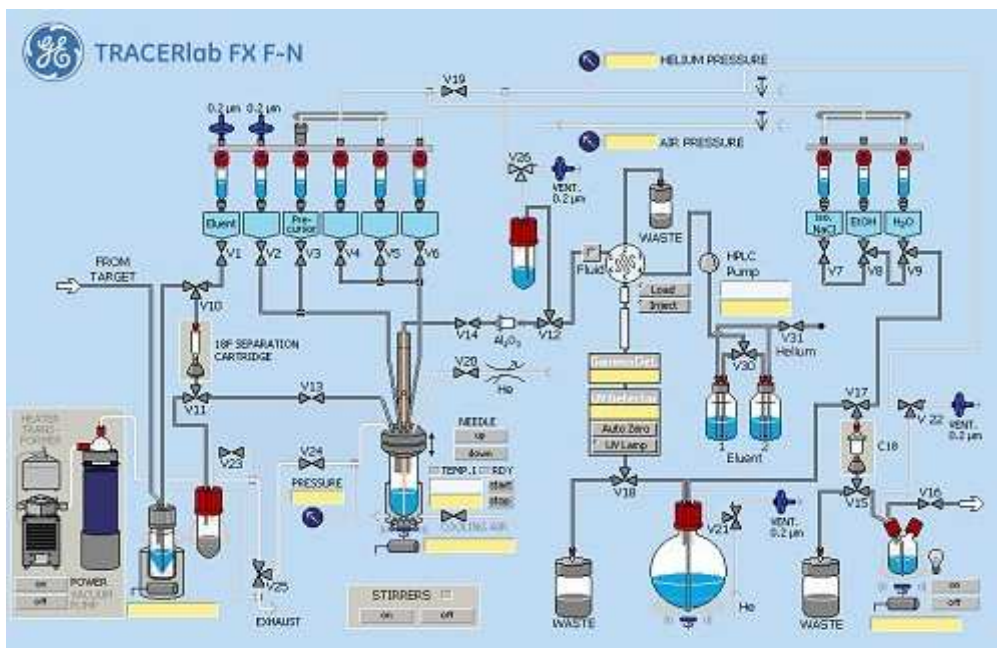


Figura 9. Sinottico del modulo di sintesi TracerLab<sub>FXFN</sub> per le reazioni di sostituzione nucleofila.

### 12.3 Parte preclinica

Anche sul [ $^{18}\text{F}$ ]VC701, così come sull'analogo marcato con Carbonio-11, sono stati condotti una serie di studi preclinici nell'animale da esperimento, per valutare il comportamento del radiofarmaco *in vivo* dopo somministrazione endovenosa. Essi sono stati condotti dal gruppo coordinato dalla Dott.ssa Rosamaria Moresco presso i laboratori di preclinica dell'unità di Medicina Nucleare dell'Ospedale San Raffaele. Gli studi di biodistribuzione hanno messo in luce, come ci si aspettava, un maggior accumulo di radiofarmaco negli organi particolarmente ricchi di recettore; infatti, è stato registrato un elevato uptake di tracciante nel polmone, nel cuore, nella milza e nel rene e un uptake abbastanza ridotto in organi quali la corteccia, il cervelletto, il fegato e le ossa. E' interessante soffermarsi su questi ultimi due dati; la scarsa biodistribuzione del tracciante nel fegato mostra che evidentemente il radiofarmaco subisce un metabolismo epatico piuttosto limitato, mentre la bassa concentrazione a livello osseo è indice del fatto che non ha luogo il processo di defluorurazione della molecola marcata, in quanto il fluoro libero ha appunto una forte tendenza ad accumularsi a livello osseo. In seguito a somministrazione del radiofarmaco nel ratto sano per via endovenosa, è stato osservato il massimo uptake a circa 60 minuti e la biodistribuzione negli organi sopra citati è risultata stabile per quasi quattro ore di tempo. Il grafico sotto riportato mostra, appunto, l'andamento della distribuzione di radiofarmaco nel tempo, negli organi di maggiore interesse.

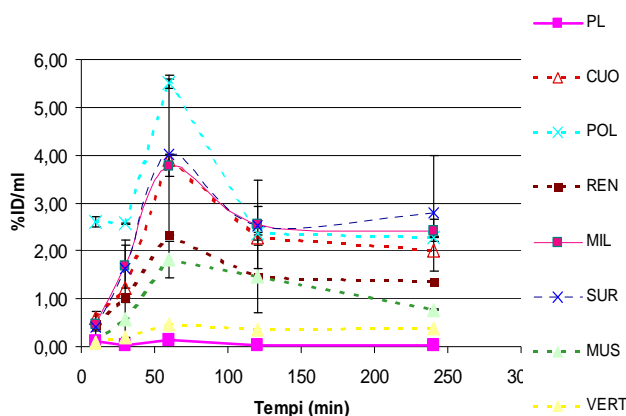


Fig. 10. Biodistribuzione del [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 nei ratti sani di tipo CD. La concentrazione di radioattività è espressa come % di dose iniettata per grammo di tessuto.

<b>ORGANO</b>	<b>%I.D./g (10 min)</b>	<b>%I.D./g (30 min)</b>	<b>%I.D./g (60 min)</b>	<b>%I.D./g (120 min)</b>	<b>%I.D./g (240 min)</b>
<b>Sangue</b>	0.31±0.04	0.11±0.01	0.12±0.01	0.06±0.03	0.04±0.01
<b>Cuore</b>	0.61±0.09	1.23±0.23	3.90±0.79	2.28±0.75	2.02±0.07
<b>Polmone</b>	2.14±0.66	2.57±0.62	4.33±2.18	2.37±0.66	2.29±0.29
<b>Fegato</b>	0.28±0.02	0.48±0.13	0.58±0.10	0.32±0.17	0.37±0.16
<b>Rene</b>	0.45±0.09	1.04±0.22	2.33±0.40	1.44±0.46	1.35±0.23
<b>Ghiandole adrenergiche</b>	0.39±0.08	1.63±0.60	4.01±1.67	2.52±0.41	2.79±1.21
<b>Milza</b>	0.46±0.28	1.68±0.45	3.78±0.23	2.56±0.92	2.43±0.24
<b>Cervelletto</b>	0.12±0.01	0.14±0.02	0.20±0.02	0.10±0.04	0.06±0.00
<b>Corteccia</b>	0.12±0.00	0.12±0.02	0.16±0.01	0.07±0.02	0.05±0.01

Tabella 2. Concentrazione di radioattività espressa come % di dose iniettata per grammo di tessuto. I valori sono espressi come deviazione standard su tre ratti per ogni intervallo di tempo.

Successivamente agli studi di biodistribuzione sono stati condotti studi di inibizione per valutare la specificità del radiofarmaco nei confronti del recettore. E' stato effettuato un confronto tra la distribuzione del [<sup>18</sup>F]VC701 nei ratti basali e la stessa distribuzione dopo somministrazione nei ratti trattati con PK11195; poiché quest'ultimo è un tracciante altamente specifico per il TSPO, una volta somministrato nell'animale ha la capacità di occupare la stragrande maggioranza dei siti recettoriali; è stato verificato che l' [<sup>18</sup>F]VC701 presenta una biodistribuzione molto più ridotta nei ratti pre-trattati con PK11195, indice del fatto che la quantità di recettori disponibili è decisamente più bassa. Questo dimostra un'alta specificità di legame del tracciante nei confronti dei siti recettoriali desiderati. Il dato, inoltre, conferma i risultati precedentemente ottenuti dagli studi condotti con l'analogo <sup>11</sup>C-marcato.

L'istogramma sottostante mostra il confronto tra i due tipi di ratti diversamente trattati; come si può notare, soprattutto in organi come il cuore, il polmone e il rene, dopo somministrazione del PK11195 il legame al recettore risulta significativamente più basso. Addirittura, l'uptake di radioattività risulta ridotto dell'80% circa.



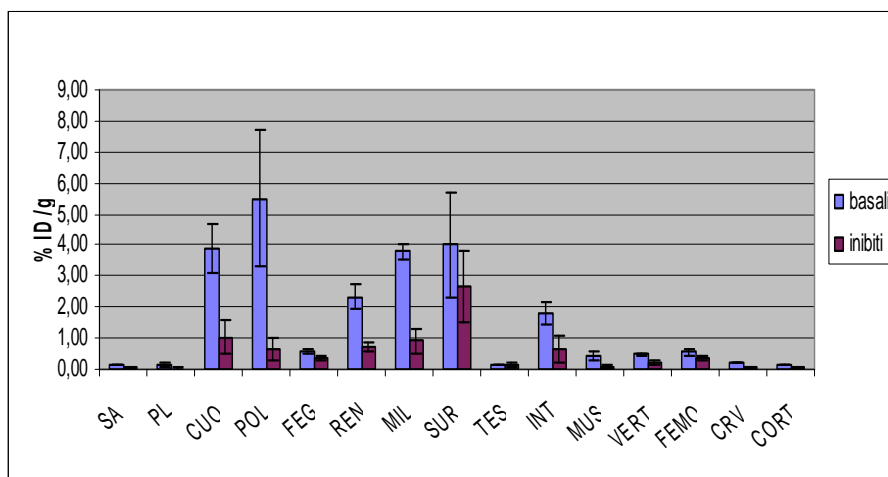


Fig. 11. Biodistribuzione del [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 nei ratti basali e nei ratti inibiti con PK11195.

## 12.4 Studi PET

Sono stati, inoltre, condotti studi PET *in vivo* nell'animale, utilizzando una micro animal PET dedicata e verificando, attraverso l'analisi delle immagini ottenute, la distribuzione del tracciante nell'organismo. Sono stati utilizzati per questo scopo dei ratti appartenenti al ceppo CD, sani. Le immagini transassiali e coronali del corpo intero ottenute dall'esame PET hanno ulteriormente confermato i dati appena descritti, mostrando un'ampia distribuzione del [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 nel polmone, nel cuore, nella milza e nel rene.

Anche gli studi *in vivo* confermano l'assenza del processo di defluorurazione, in quanto le immagini non mostrano accumulo di radiofarmaco a livello osseo.

Gli studi nell'animale sano sono stati effettuati anche dopo coiniezione del tracciante con lo standard freddo del PK11195, per verificare la specificità di legame al recettore TSPO.

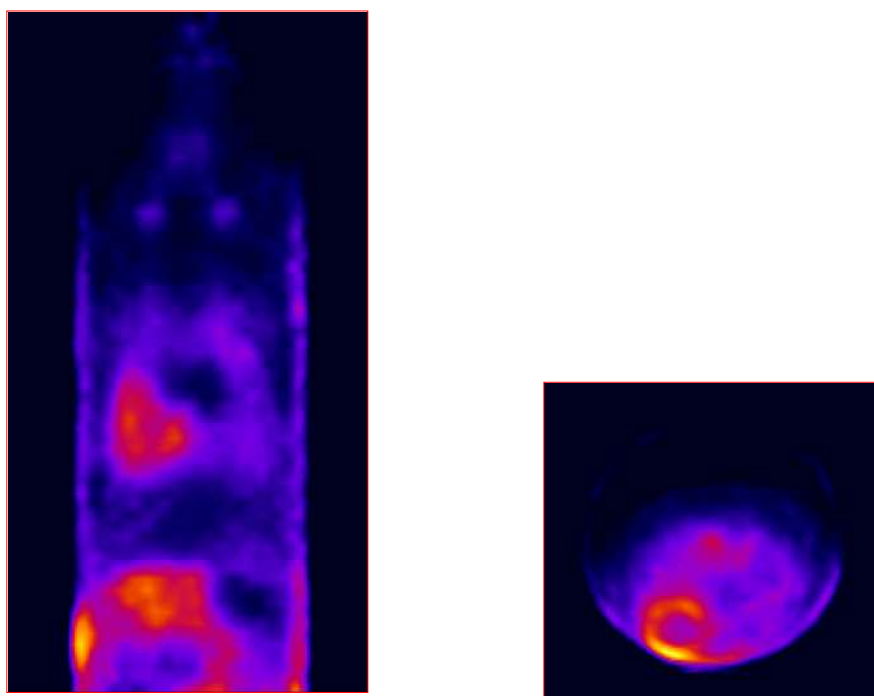


Fig. 12 e 13. Immagini transassiale e coronale di un ratto del tipo CD iniettato con il radiofarmaco [ $^{18}\text{F}$ ]VC701. L'acquisizione è stata effettuata dopo 30' dall'iniezione. Gli organi in rosso rappresentano polmone, cuore, rene e milza, ovvero gli organi in cui è evidente un uptake maggiore di tracciante.

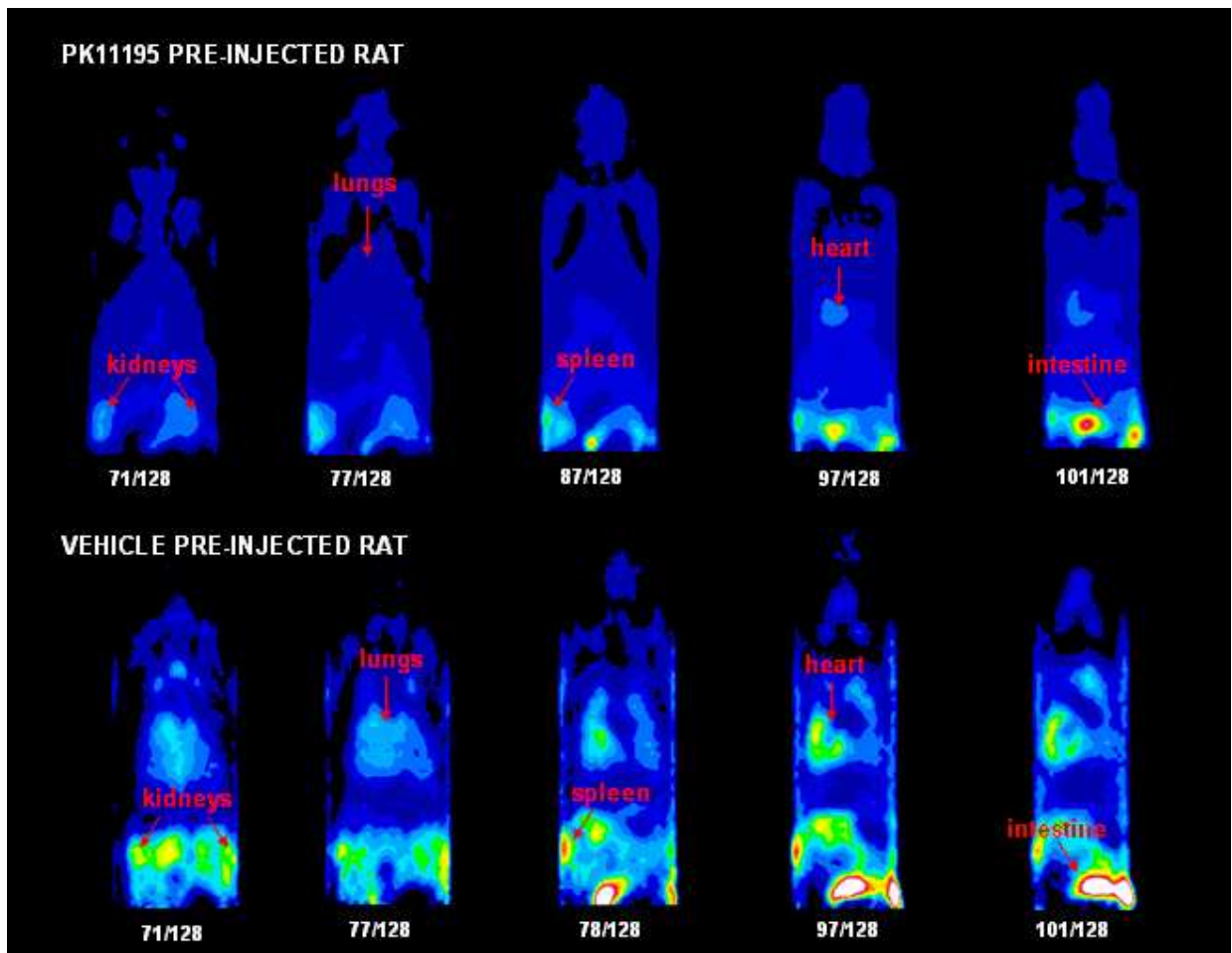


Fig. 14 Immagini PET in sequenza di un ratto pretrattato con PK11195 freddo e dello stesso iniettato con il radiofarmaco di interesse. Il minor uptake dopo somministrazione del PK11195, indica che il legame del [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 ai siti recettoriali è altamente specifico.

### **13. DISCUSSIONE**

Lo scopo principale del lavoro è stato, dunque, lo sviluppo e la valutazione biologica preliminare di un nuovo tracciante fluorurato potenzialmente utile per la PET, da utilizzare negli studi imaging del recettore TSPO.

Le relazioni struttura-attività dei composti (1) e (2) sviluppati precedentemente e descritti in altri lavori hanno mostrato come dato interessante l'effetto positivo di un atomo di alogeno a livello del carbonio metilenico in posizione 3 del nucleo chinolinico. Nel caso specifico del composto marcato con Carbonio-11, gli studi effettuati con questo radiofarmaco hanno mostrato che esso possiede caratteristiche favorevoli per la visualizzazione *in vivo* del TSPO mediante PET. D'altro canto, le proprietà favorevoli del radioisotopo Fluoro-18 e i suoi vantaggi rispetto al Carbonio-11, ci hanno incoraggiato a marcare il precursore anche con questo radioisotopo. Il nuovo radiofarmaco [<sup>18</sup>F]VC701 è stato dunque sintetizzato ottenendo una buona resa di reazione ed elevate purezza chimica e radiochimica. Anche gli studi *in vivo* ed *ex vivo* effettuati nell'animale da esperimento hanno dato risultati soddisfacenti relativamente all'uptake e alla biodistribuzione del radiofarmaco negli organi di maggior interesse, mostrando anche una buona specificità di legame al recettore. Inoltre, il lungo tempo di emivita del Fluoro-18 ha permesso di effettuare studi a cinetica più lunga e di verificare la stabilità nel tempo del tracciante nell'organismo.

Negli ultimi anni, come già accennato, sono stati sviluppati altri ligandi del recettore TSPO da utilizzare come radiofarmaci per l'imaging mediante PET, marcati sia con Carbonio-11 che con Fluoro-18.

A differenza di altri analoghi fluorurati quali l' [<sup>18</sup>F]FMDAA1106 (*N*-(5-fluoro-2-fenossifenil)-*N*-(2-(2-[<sup>18</sup>F]fluorometoxy)-5-metossibenzi)acetamide), l' [<sup>18</sup>F]VC701 non subisce il processo metabolico di defluorurazione, come indicato dalla mancata distribuzione del tracciante a livello osseo. Gli studi condotti sul radiofarmaco hanno invece mostrato una maggiore distribuzione dello stesso negli organi che risultano particolarmente ricchi di recettore, soprattutto il cuore, i polmoni, la milza e il rene. L'uptake massimo di radiofarmaco nel corso dello studio è stato registrato a un tempo di circa 60 minuti ed è risultato stabile per quasi 4 ore. Un'analoga distribuzione negli organi periferici sopra citati è stata osservata anche con un altro tracciante marcato con Fluoro-18, l' [<sup>18</sup>F]DPA-714, un radiofarmaco somministrato nei ratti con lesioni da Acido Chinolinico; gli studi hanno mostrato alti livelli di uptake non solo nel cuore e nelle ghiandole adrenergiche ma anche a livello della corteccia e dello striato; inoltre, il tracciante è risultato in grado di attraversare la barriera ematoencefalica dei ratti per legarsi in modo specifico al recettore TSPO a livello delle neuroinfiammazioni. L' [<sup>18</sup>F]VC701, a tal proposito, deve essere ancora indagato relativamente al legame recettoriale in ambito cerebrale, tuttavia sono previsti studi preclinici nei ratti lesionati, per valutare l'efficacia e la specificità del nostro tracciante in presenza di lesioni neuroinfiammatorie;

un dato incoraggiante, tuttavia, è dato dal fatto che è stato notato un aumento di uptake del radiofarmaco nel cervelletto, una regione cerebrale in grado di esprimere il recettore TSPO.

Anche l' $[^{18}\text{F}]\text{FMDAA1106}$  e l'analogo  $[^{18}\text{F}]\text{FEDAA1106}$  hanno mostrato un accumulo importante a livello di organi periferici quali cuore, rene e milza, tuttavia il primo ha il grosso svantaggio di subire anch'esso una reazione di defluorurazione dopo somministrazione, mentre il secondo ha l'inconveniente di una reazione di sintesi a due step, differentemente dal nostro prodotto che si ottiene con una semplice sostituzione nucleofila a singolo step.

La specificità del tracciante nei confronti del recettore TSPO è stata ampiamente dimostrata attraverso studi di inibizione utilizzando l'analogo PK11195 freddo, così come descritto nella parte dei risultati e nella sezione sperimentale seguente.

Di particolare rilievo sono, inoltre, le immagini PET della distribuzione di tracciante negli organi di interesse. L'elevato rateo dovuto alla marcatura con Fluoro-18 e la bassa clearance dai siti bersaglio hanno permesso di ottenere una visualizzazione molto chiara e precisa degli organi che esprimono il recettore, confrontandoli con le restanti parti del corpo. Questo potrebbe risultare di grande interesse e importanza nella visualizzazione delle infiammazioni periferiche in organi come i polmoni, nei vasi o nei muscoli.

Dunque, la marcatura con un radioisotopo come il Fluoro-18 presenta, senza dubbio, numerosi vantaggi rispetto al Carbonio-11, determinando un incrementato interesse nei confronti dei ligandi per TSPO fluorurati.

I risultati preliminari finora ottenuti con questo tracciante, sia chimici che biologici, suggeriscono che il VC701 è un promettente candidato come radiofarmaco PET per l'imaging *in vivo* del recettore TSPO.

#### **14. PARTE SPERIMENTALE CHIMICA**

Tutti i reagenti utilizzati per la produzione del precursore e dello standard freddo sono di grado farmaceutico. Le procedure di sintesi sono descritte da Cappelli et al.<sup>38, 39</sup>

#### **15. PARTE SPERIMENTALE RADIOCHIMICA**

Prima di arrivare alle condizioni di radiosintesi già descritte per questo tracciante, sono state effettuate delle prove preliminari con lo scopo di mettere a punto il metodo più adeguato sia nell'ambito della produzione che nell'ambito del controllo di qualità.

Nelle prove iniziali di sintesi del radiofarmaco, per diluire il prodotto marcato, è stato utilizzato 1 ml di fase mobile semipreparativa CH<sub>3</sub>CN/Fosf. 0,05M : 60/40; tuttavia, nel corso della prima prova di radiosintesi, partendo da 50-60 mCi (~2 GBq) iniziali di Fluoruro, ottenuti dopo il bombardamento, sono stati recuperati solo 10 mCi (0,37 GBq) di prodotto finale marcato, indice del fatto che circa 42 mCi (1,6 GBq) di Fluoruro risultavano non reagiti o non trasferiti nella vial finale; questo ha spinto ad utilizzare nelle prove successive un volume di fase mobile superiore (2-3 ml).

Inizialmente, inoltre, per la purificazione del tracciante mediante HPLC semipreparativa, è stata utilizzata una colonna X-Terra RP18 (Waters); tuttavia, nello step di iniezione, il cromatogramma UV ha mostrato la presenza di altri sottoprodotti, oltre al prodotto finale desiderato, attribuibili a impurezze o prodotti secondari (Figura 15).

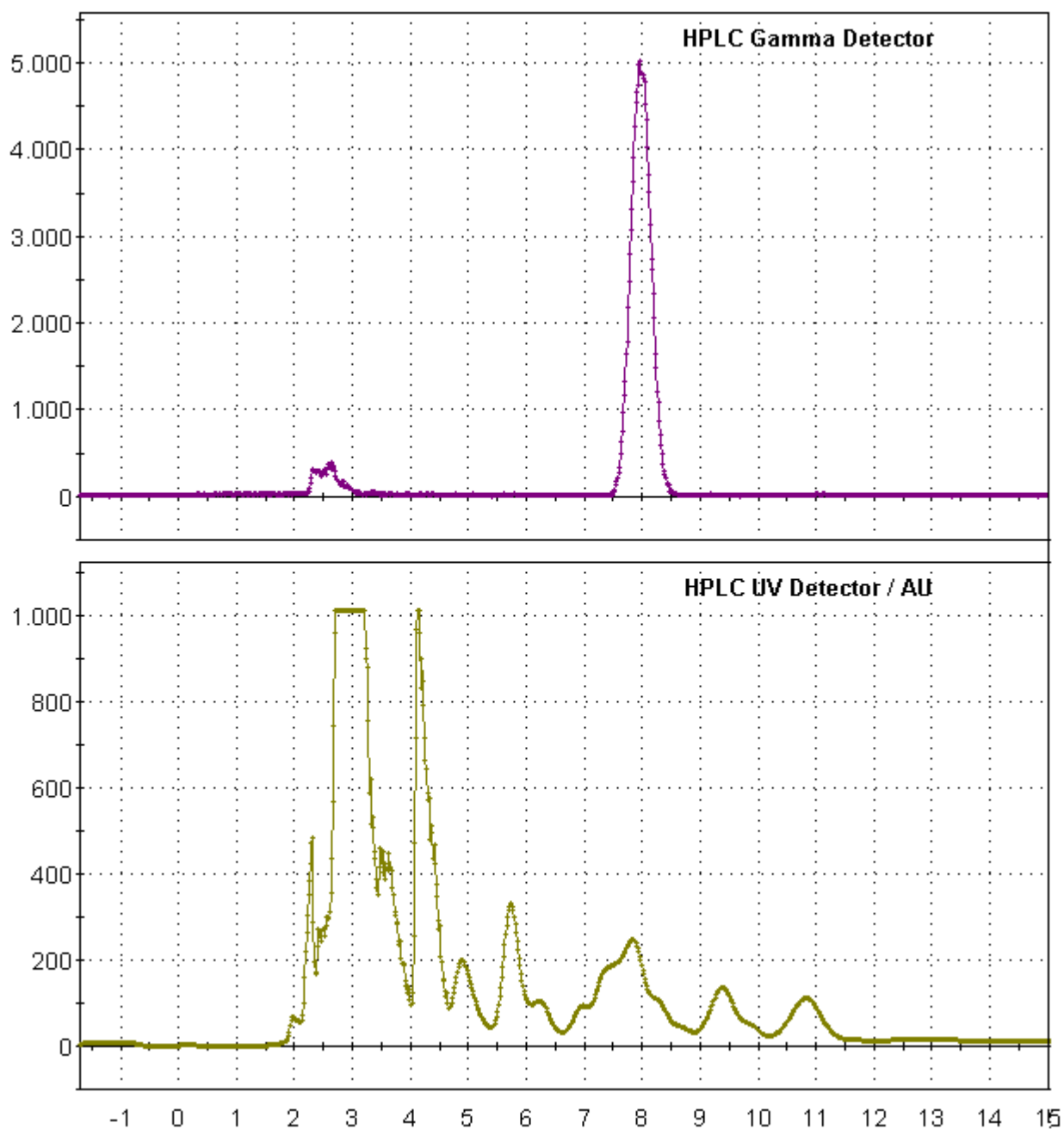


Fig. 15. Cromatogramma radiochimico ed UV dell'iniezione di [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 utilizzando una colonna semipreparativa X-Terra RP18, con fase mobile  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Fosf. } 0,05\text{M} : 60/40$ . Mentre il picco radiochimico è unico, all'UV il picco del prodotto non può essere identificato con precisione.

E' stata, quindi, effettuata una variazione della composizione di fase mobile , passando da un rapporto CH<sub>3</sub>CN/Fosf. 0,05M 60:40 ad un rapporto 55:45, per verificare se ciò avrebbe comportato una migliore separazione e purificazione del composto da prodotti secondari.

In realtà, anche la variazione di fase mobile, non ha migliorato in modo significativo il cromatogramma finale, per cui anche nelle prove di sintesi successive, sotto il picco UV del VC701, sono comparsi picchi secondari da attribuire a sottoprodotti o impurezze (Fig. 16).

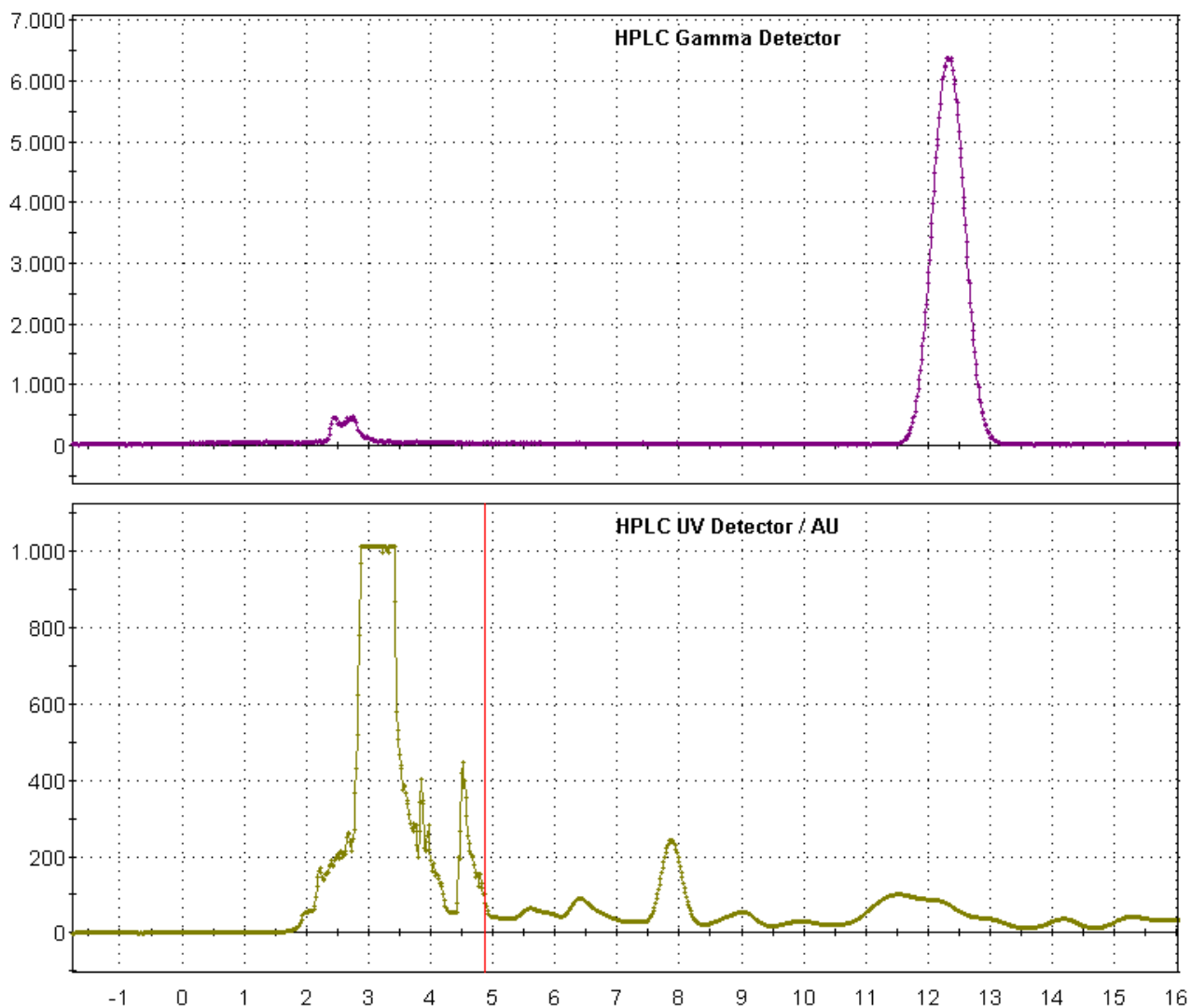


Fig. 16. Cromatogramma radiochimico ed UV dell'iniezione di [<sup>18</sup>F]VC701 utilizzando una colonna semipreparativa X-Terra RP18, con fase mobile CH<sub>3</sub>CN/Fosf. 0,05M : 55/45.

Per migliorare le condizioni cromatografiche della sintesi, nella prova seguente è stata nuovamente modificata la percentuale di solventi della fase mobile, passando ad un rapporto 50:50; inoltre, si è ritenuto utile ridurre il flusso dell'HPLC semipreparativa da 5 ml/min a 4 ml/min, in modo da



verificare se un rallentamento dell'uscita del picco potesse avere un effetto positivo sulla purificazione.

Come si denota dai cromatogrammi seguenti, è stato ritardato il tempo di ritenzione del picco, tuttavia anche queste variazioni non hanno determinato un netto miglioramento della risoluzione dei picchi stessi (Fig. 17).

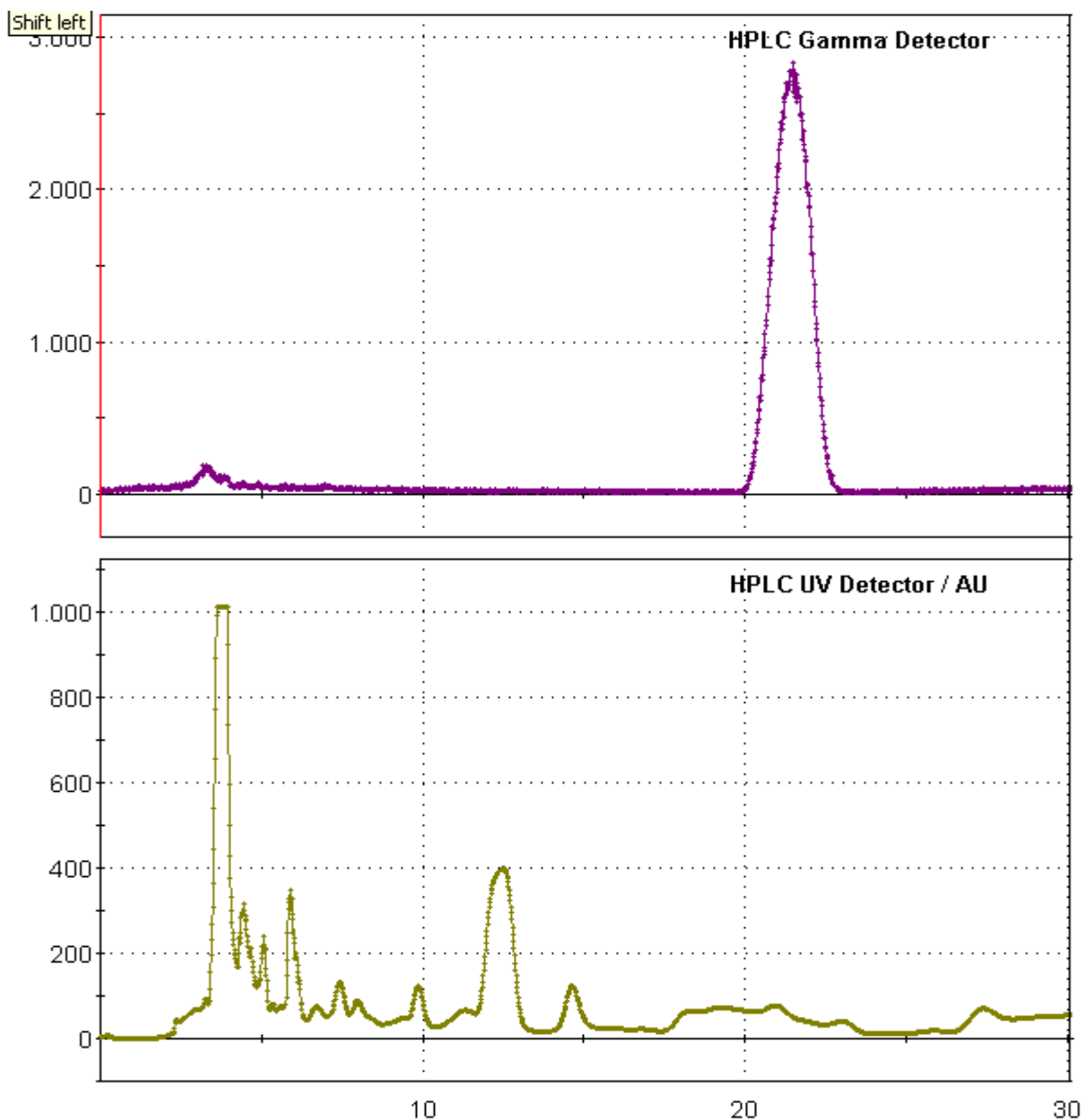


Fig. 17. Cromatogramma radiochimico ed UV dell'iniezione di [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 utilizzando una colonna semipreparativa X-Terra RP18, con fase mobile  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Fosf. } 0,05\text{M} : 50/50$ , passando ad un flusso di 4 ml/min.

Con queste condizioni, è stato, inoltre, effettuato un tentativo di sintesi utilizzando un filtro sterile Acrodisc Pall (Waters) da  $0,22 \mu\text{m}$  per la filtrazione del prodotto finale; in realtà, al termine della

produzione, partendo da circa 300 mCi (11 GBq) di attività iniziale, è stata determinata al Capintec solo un'attività di prodotto finale pari a circa 1 mCi (0.037 GBq); la misura del filtro ha permesso di capire che l'attività era rimasta quasi completamente intrappolata sul filtro stesso (circa 30 mCi o 1,11 GBq).

Per confermare tale risultato ed effettuare una valutazione del problema, sono state eseguite contemporaneamente delle prove di filtrazione e solubilità del prodotto a freddo. Per questi esperimenti sono state utilizzate diverse tipologie di filtro e diverse miscele per solubilizzare il prodotto (Tabella 3).

1 prova: lo standard del VC701 è stato solubilizzato in una miscela di fisiologica ed etanolo (soluzione al 5% costituita da 9,5 ml NaCl e 0,5 ml EtOH); è stata quindi effettuata una filtrazione della soluzione con filtro Acrodisc e il filtrato è stato successivamente sottoposto ad iniezione in HPLC analitica: il cromatogramma UV non ha mostrato il picco del VC701, che era stato evidentemente trattenuto dal filtro stesso nel corso della fase di filtrazione; quindi l'analisi non ha fornito alcun risultato;

2 prova: filtrazione della stessa miscela con filtro Millex-GP Millipore 0,22 µm (Polyethersulfone) e iniezione in HPLC: anche in questo caso il prodotto è stato trattenuto dal filtro e nel cromatogramma UV non sono stati registrati picchi significativi;

3 prova: filtrazione con filtro Millex-GS Millipore 0,22 µm (Mixed cellulose esters) e iniezione in HPLC: prodotto ancora una volta trattenuto dal filtro e cromatogramma UV privo di picchi significativi;

4 prova: filtrazione con filtro Millex-GV Millipore 0,22 µm (PVDF o Polivinildenfluoruro) e iniezione in HPLC: prodotto trattenuto dal filtro ma in misura minore rispetto ai filtri sperimentati nelle prove precedenti; infatti nel cromatogramma è stato possibile individuare un piccolo picco di standard VC701.

	Prova 1	Prova 2	Prova 3	Prova 4
<b>Soluzione</b>	soluzione al 5% (9,5 ml NaCl e 0,5 ml EtOH)			
<b>Tipo filtro</b>	Acrodisc Pall	Millex-GP Millipore	Millex-GS Millipore	Millex-GV Millipore
<b>Risultato</b>	Prodotto trattenuto sul filtro	Prodotto trattenuto sul filtro	Prodotto trattenuto sul filtro	Prodotto parzialmente trattenuto

Tabella 3 : Prove di filtrazione di VC701 con filtri sterili da 0.22 µm utilizzando una soluzione di fisiologica al 5% di EtOH.

Dal momento che la presenza di prodotto sul filtro è associata anche ad una scarsa solubilità dello stesso nella miscela finale, sono state effettuate anche ulteriori prove aumentando la % di Etanolo nella formulazione, con lo scopo di incrementare la solubilità del composto stesso (Tabella 4).

**Prove con soluzione al 20% di Etanolo** (soluzione standard di partenza + 1,5 ml di EtOH):

- Soluzione non filtrata e iniettata come tale in HPLC: il prodotto è risultato più solubile, mostrando un intenso picco UV nel cromatogramma; esso è stato quantificato con la retta di calibrazione ed è stata calcolata una concentrazione di 4,65 nmol/ml di prodotto;
- Soluzione filtrata su filtro Acrodisc: calcolata una concentrazione di 1,9nmol/ml di prodotto (circa 40% della concentrazione iniziale).

**Prove con soluzione al 35% di Etanolo** (soluzione standard di partenza + 4,5 ml di EtOH):

- Soluzione non filtrata e iniettata in HPLC: concentrazione del picco pari a 2,95 nmol/ml;
- Soluzione filtrata su filtro Acrodisc: concentrazione del picco pari a 2,6 nmol/ml (circa 90% della concentrazione iniziale).

A questo punto sono state effettuate delle prove di solubilità utilizzando un filtro Millex-GV:

- Soluzione al 10% di Etanolo (soluzione standard + 0,5 ml di EtOH): dopo filtrazione e iniezione in HPLC sono stati calcolati 4,53 nmol/ml di concentrazione (circa 33% della concentrazione iniziale);
- Soluzione al 20% di Etanolo: concentrazione pari a 3,15 nmol/ml (circa 70% della concentrazione iniziale).

Dunque, con una % di etanolo più bassa, il filtro Millex-Gv ha dimostrato di trattenere in minor misura il prodotto rispetto al filtro Acrodisc.

	Filtro Acrodisc				Filtro Millex GV			
	Prova 1		Prova 2		Prova 1		Prova 2	
<b>Soluzione</b>	20% etanolo		35% etanolo		10% etanolo		20% etanolo	
<b>Concentrazione</b>	Soluzione non filtrata	Soluzione filtrata	Soluzione non filtrata	Soluzione filtrata	Soluzione non filtrata	Soluzione filtrata	Soluzione non filtrata	Soluzione filtrata
<b>Risultato (nmol/ml)</b>	4,65	1,9	2,95	2,6	13,7	4,53	4,5	3,15

Tabella 4: Prove di filtrazione di VC701 con filtri sterili da 0.22 µm utilizzando una soluzione di fisiologica con % variabile di EtOH.

Nella radiosintesi successiva, infatti, utilizzando il filtro Millex-Gv in presenza di un volume pari a 2 ml di Etanolo, non si sono verificati problemi di filtrazione e il prodotto marcato è stato completamente recuperato nella vial finale. Nel cromatogramma UV, inoltre, anche il picco del radiofarmaco è risultato più pulito e meglio separato da altre impurezze.

Quando è stata utilizzata una quantità inferiore di Etanolo (1 ml), sono stati riscontrati nuovamente problemi di solubilità del prodotto, che è rimasto in parte trattenuto sul filtro. Pertanto sarà

necessario aumentare la solubilizzazione del [<sup>18</sup>F]VC701, per evitare questo inconveniente e recuperare in modo completo il radiofarmaco alla fine della sintesi. Sappiamo, infatti, che, nonostante l'etanolo nel nostro caso si comporti da eccipiente per il recupero del radiofarmaco, la quantità di solvente residua presente nel prodotto finale presenta un limite di 5 g sul prodotto totale ai fini della somministrazione endovenosa, per cui sarà indispensabile valutare con attenzione la tipologia di filtro da adottare e l'adeguato volume di etanolo da utilizzare nella produzione. Nelle prove successive non è stato ritenuto necessario continuare ad utilizzare il filtro sterile, dovendo effettuare temporaneamente solo studi di tipo preclinico nel ratto.

Nel corso degli esperimenti, sono state effettuate anche delle prove utilizzando due differenti colonne cromatografiche, con lo scopo di migliorare la separazione e la purificazione del prodotto marcato; come accennato precedentemente, la prima colonna semipreparativa ad essere utilizzata nella sintesi è stata una X-Terra RP18 (Waters) (Fig. 18) ; anche nel corrispondente controllo di qualità, inizialmente è stata adoperata una colonna analitica X-Terra RP18 (Waters) (Fig. 19 e 20).

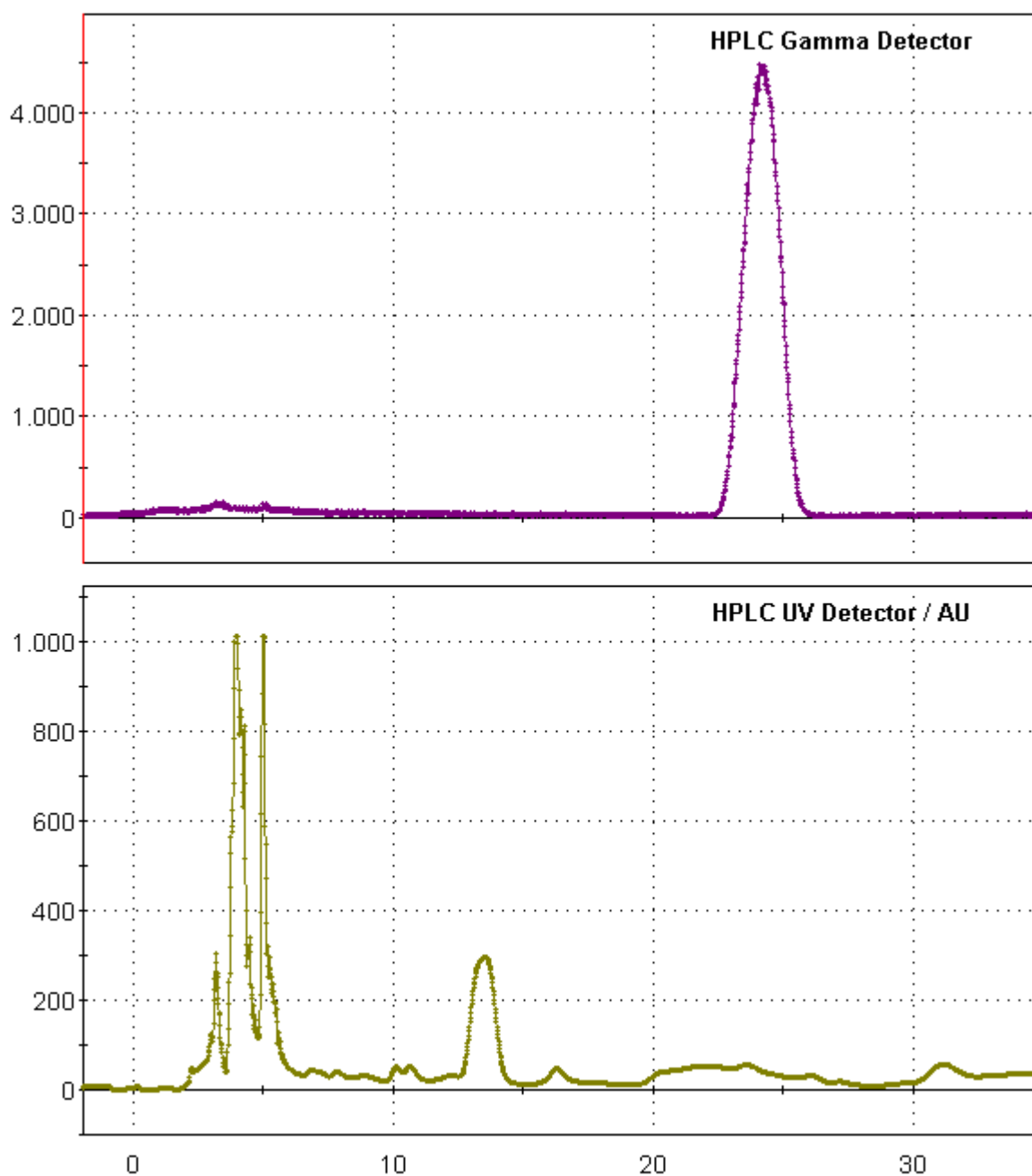
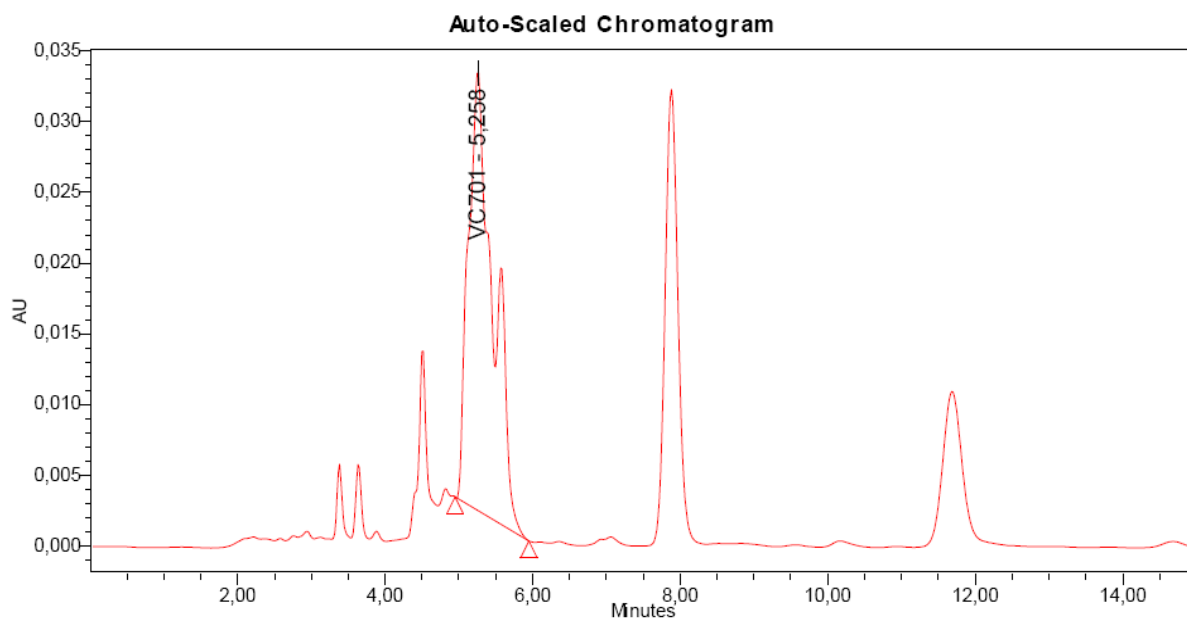


Fig. 18. Cromatogramma radiochimico e UV del  $[^{18}\text{F}]\text{VC701}$  ottenuto mediante purificazione con colonna semipreparativa X-Terra RP18(Waters).

Tuttavia, i cromatogrammi hanno quasi sempre mostrato una separazione non ottimale del prodotto principale da altre impurezze e, infatti, anche nei controlli di qualità corrispondenti è stato notato un doppio picco relativo al  $[^{18}\text{F}]\text{VC701}$ , indice di una insufficiente purezza chimica del composto.

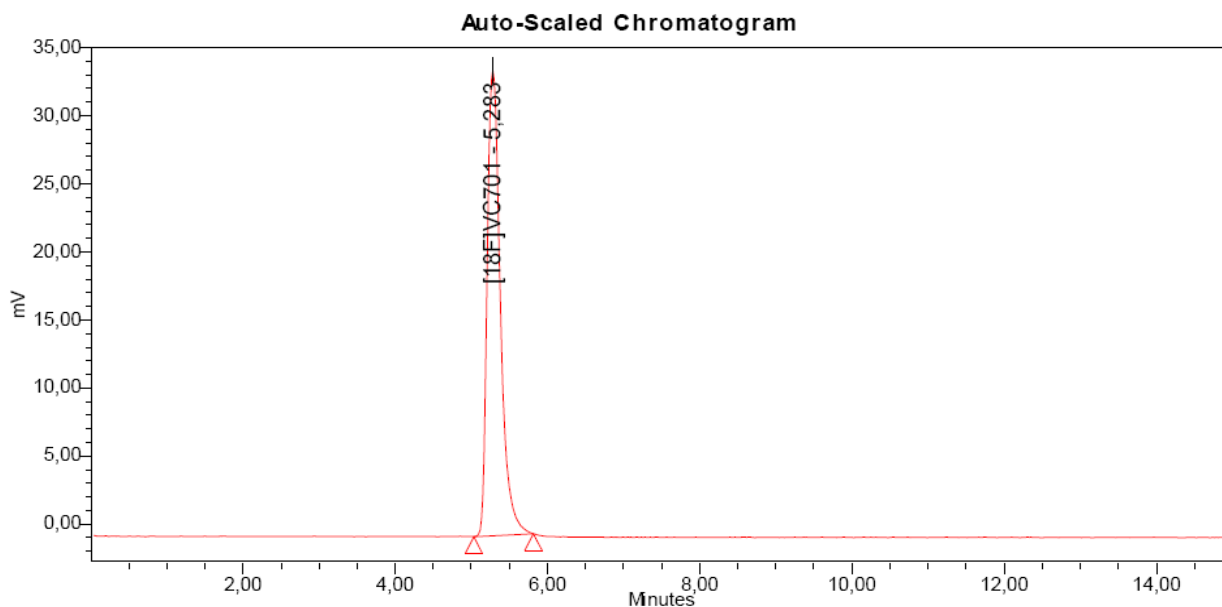
Come si può notare dai due cromatogrammi sotto riportati, mentre il picco radiochimico corrispondente al prodotto marcato risulta unico, nel cromatogramma UV la separazione del picco da altri sottoprodotti non è ottimale, in quanto sono evidenti picchi relativi a numerose impurezze.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	VC701	5,258	723433	31005	93,525	nmol/ml

Fig. 19. Cromatogramma UV del controllo di qualità di una prova di sintesi del  $[^{18}\text{F}]\text{VC701}$  utilizzando la colonna analitica X-Terra RP18.

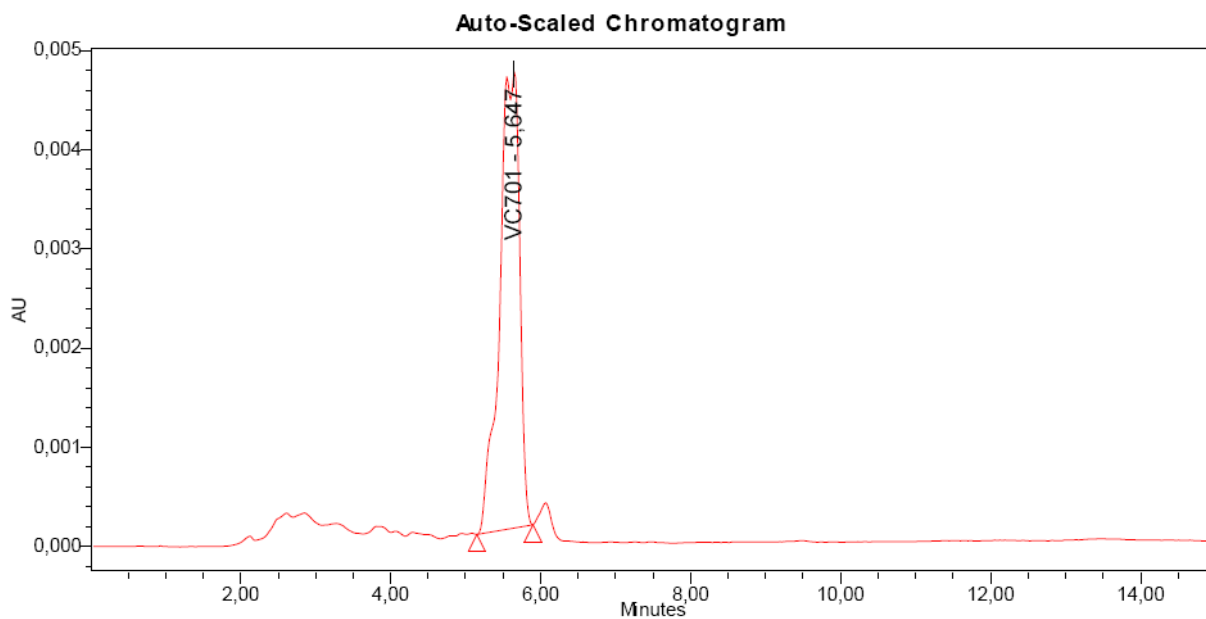


**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	[18F]VC701	5,283	412835	34203		

Fig. 20. Cromatogramma radiochimico corrispondente della stessa prova di sintesi. In questo caso la purezza radiochimica è del 100%.

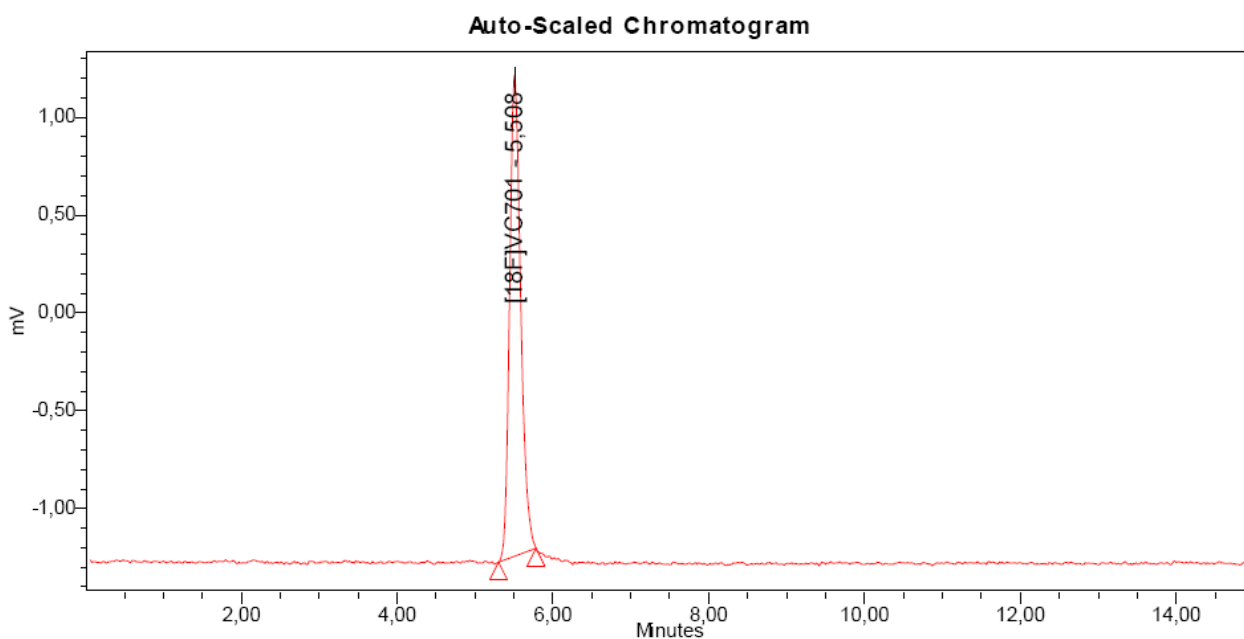
Per migliorare la risoluzione del picco di interesse, sono state inizialmente apportate due modifiche: l'utilizzo di una nuova colonna semipreparativa X-Terra e, come accennato precedentemente, l'abbassamento del flusso della fase mobile da 5 a 4 ml/min, in modo da favorire una separazione maggiore tra prodotto marcato, precursore e altri sottoprodotti. Come si può notare dai cromatogrammi di seguito riportati, il controllo di qualità ha dato risultati più soddisfacenti per quanto riguarda l'UV (Fig. 21 e 22):



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	VC701	5,647	85740	4596	11,112	nmol/ml

Fig. 21. Cromatogramma UV del controllo di qualità di una produzione effettuata con una nuova colonna semipreparativa e un flusso HPLC più basso.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	[18F]VC701	5,508	24280	2459		

Fig. 22. Cromatogramma radiochimico corrispondente.

Tuttavia, dal momento che al di sotto del picco UV era comunque possibile notare un piccolo picco relativo a una impurezza, è stata adoperata una colonna semipreparativa differente, ovvero una ACE 5 C18 (CPS); nel cromatogramma della radiosintesi, in effetti, è stata notata una buona separazione tra prodotto marcato e precursore (figura 23); anche nel controllo di qualità, per migliorare la risoluzione dei picchi, è stata introdotta una colonna analitica ACE C18 (CPS) e, come previsto, oltre ad un tempo di ritenzione leggermente ritardato, la separazione è risultata più soddisfacente, in quanto è stato identificato un picco unico con una purezza chimica ottimale superiore al 95%. (Fig. 24 e 25).



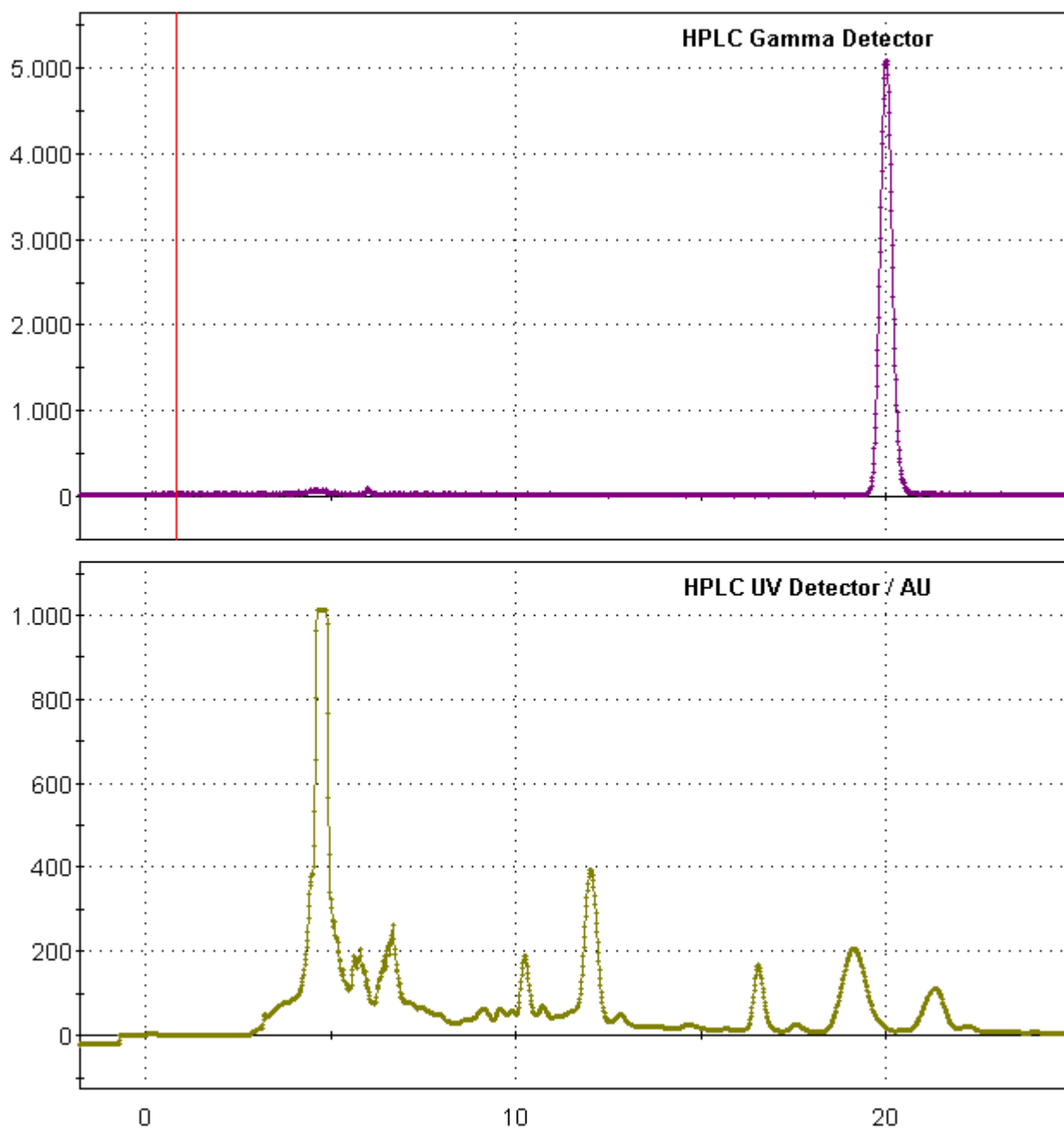
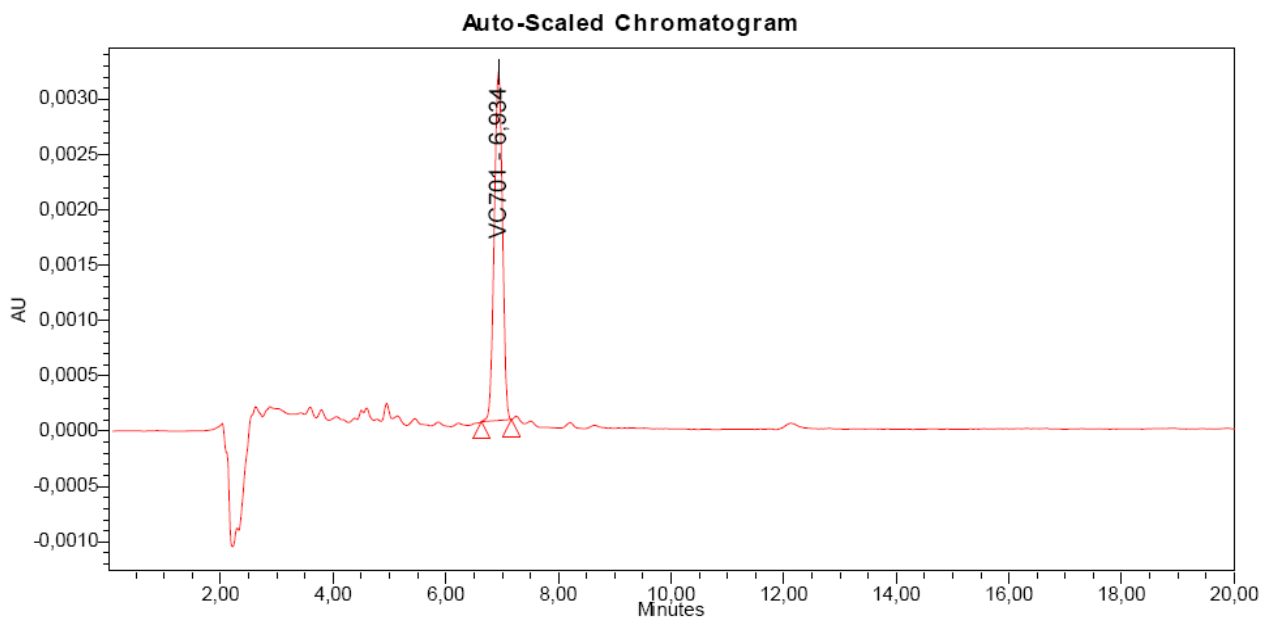


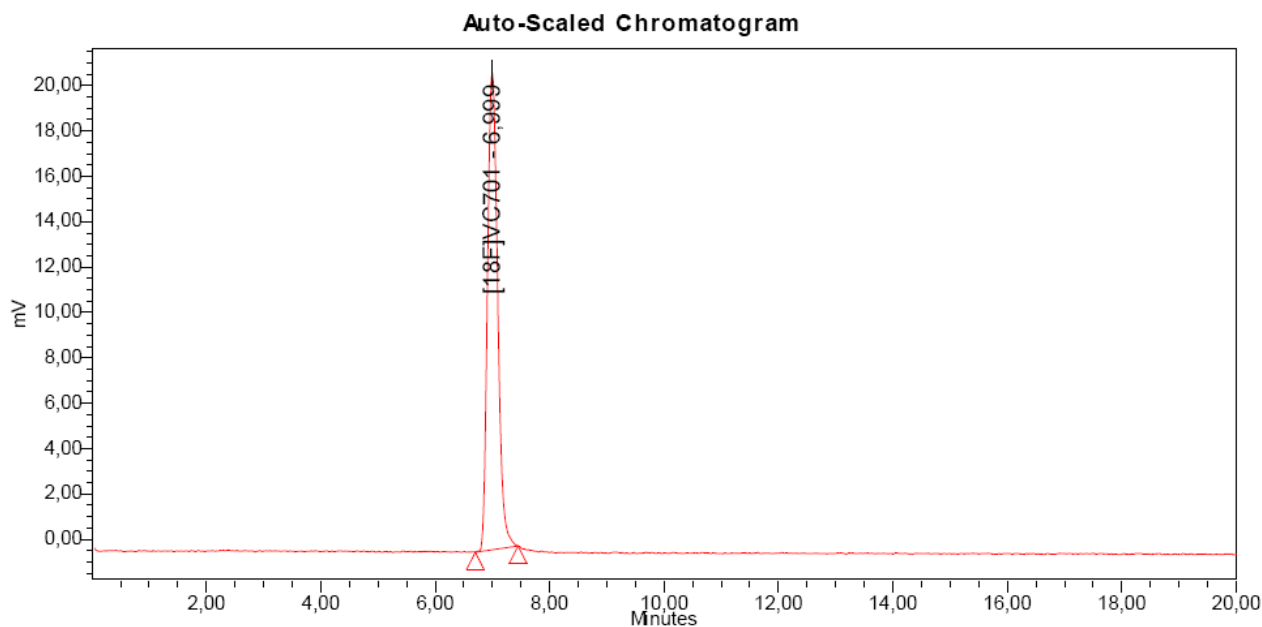
Fig. 23. Cromatogramma radiochimico e UV del [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 dopo purificazione mediante colonna semipreparativa ACE 5C18.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	VC701	6,934	31958	3148	4,132	nmol/ml

Fig. 24. Cromatogramma UV del [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 utilizzando una colonna analitica ACE C18. Il tempo di ritenzione è leggermente ritardato ma comunque ottimale, trattandosi di un radioisotopo a lunga emivita.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	[18F]VC701	6,999	257635	21067		

Fig. 25. Cromatogramma radiochimico corrispondente. La purezza radiochimica è, anche in questo caso, pari al 100%.

Una volta messe a punto queste condizioni, il processo di radiosintesi è stato ripetuto numerose volte per confermare i risultati e cercare di standardizzare il metodo quanto più possibile.

Tutti i reagenti e i solventi utilizzati nel processo di radiosintesi sono stati prodotti da Sigma-Aldrich Italia S.p.A. (Milano, Italy) e da ABX (Radeberg, Germany) e risultano di grado HPLC o ACS.

La radiosintesi è stata condotta utilizzando il modulo automatico Tracerlab<sub>FXFN</sub> della GE Healthcare, mentre il radioisotopo Fluoro-18 adoperato per la marcatura è stato ottenuto mediante reazione nucleare  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ , in seguito ad irraggiamento del target acquoso arricchito con Ossigeno-18 (2 ml), usando il ciclotrone IBA da 18 MeV Cyclone 18/9.

Il processo di radiosintesi è strutturato nel modo seguente: il Fluoro-18 originato dal target sotto forma di Fluoruro  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{F}^-$ , una volta arrivato al modulo di sintesi viene separato dall' $\text{H}_2^{18}\text{O}$  mediante una cartuccia preattivata a scambio anionico (QMA cartridge, ABX). L'acqua arricchita viene raccolta in un'apposita vial, mentre il Fluoruro trattenuto sulla cartuccia è recuperato ed eluito nel reattore di reazione utilizzando una miscela costituita da Kryptofix 2.2.2. (15-20 mg in 1 ml di  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3 mg in 0.5 ml di acqua sterile). La miscela così composta è quindi sottoposta ad uno step di anidificazione sotto vuoto e sotto flusso di elio, ad una temperatura di  $60^\circ\text{C}$  per i primi 5 minuti e successivamente a  $120^\circ\text{C}$  per ulteriori 5 minuti; questa fase è fondamentale per permettere il completo allontanamento dalla soluzione dei residui di acqua che potrebbero interferire con la reazione di sostituzione nucleofila e per garantire l'evaporazione dell'acetonitrile. Dopo questo step, ha luogo la reazione di marcatura vera e propria mediante aggiunta nel reattore di 2 mg di precursore VC622 disciolti in 1 ml di DMSO anidro (Sigma-Aldrich); la radiosintesi viene condotta a  $140^\circ\text{C}$  per circa 20 minuti. Successivamente, il tutto viene diluito con 3 ml di fase mobile semipreparativa costituita da  $\text{CH}_3\text{CN}$ /Fosfato 0.05M, 60/40 (v/v), a  $35^\circ\text{C}$ , quindi la miscela di reazione viene trasferita mediante gas ad un bocchettino per l'iniezione in HPLC preparativa, in modo da effettuare lo step di purificazione del prodotto marcato da altri sottoprodotti secondari o impurezze indesiderate.

Il picco del  $[\text{}^{18}\text{F}]\text{VC701}$  viene eluito dalla colonna cromatografica a circa 20 minuti ed è quindi recuperato in un pallone di raccolta contenente 30 ml di acqua sterile per preparazioni iniettabili; a questo punto la frazione con il prodotto di interesse viene trasferita su una cartuccia Sep-Pak tC18 plus (Waters) per l'estrazione in fase solida, in quanto essa è in grado di trattenere il radiofarmaco marcato. Dopo lavaggio della cartuccia stessa con 10 ml di acqua sterile, il prodotto viene recuperato utilizzando 0.7 ml di Etanolo e 10 ml di soluzione fisiologica per la formulazione finale.

La purificazione in HPLC semipreparativa è stata condotta utilizzando una colonna ACE C18 ( $5\mu\text{m}$ ,  $250\times 10\text{mm}$ , CPS) e un sistema di monitoraggio costituito da un detector UV K-2001 (Knauer) settato a 254 nm, una pompa HPLC Sykam e un detector radiochimico Centronic, ad un

flusso di 4 ml/min. I tempi di ritenzione sono risultati essere di 12 minuti per il precursore e di 19 minuti per il radiofarmaco marcato, ad indicare che i due composti risultano ben separati e risolti. Sul prodotto finale è stato effettuato un controllo di qualità mediante HPLC analitica, utilizzando una colonna cromatografica ACE C18 (5 $\mu$ m, 250x4.6mm, CPS) e un sistema composto da una pompa isocratica Waters 1515, un detector UV (Waters 2487) settato a 254 nm e un detector radiochimico ( $\beta^+$  Bioscan Flow count), con una fase mobile CH<sub>3</sub>CN/Fosfato 0.025M, 75/25 (v/v), ad un flusso di 1 ml/min. I tempi di ritenzione del prodotto marcato e del precursore sono risultati essere rispettivamente di 7 e 9.5 min. Inoltre, l'identificazione del prodotto finale è stata ulteriormente confermata mediante coiniezione del [<sup>18</sup>F]VC701 con lo standard freddo corrispondente. (Figura 26).

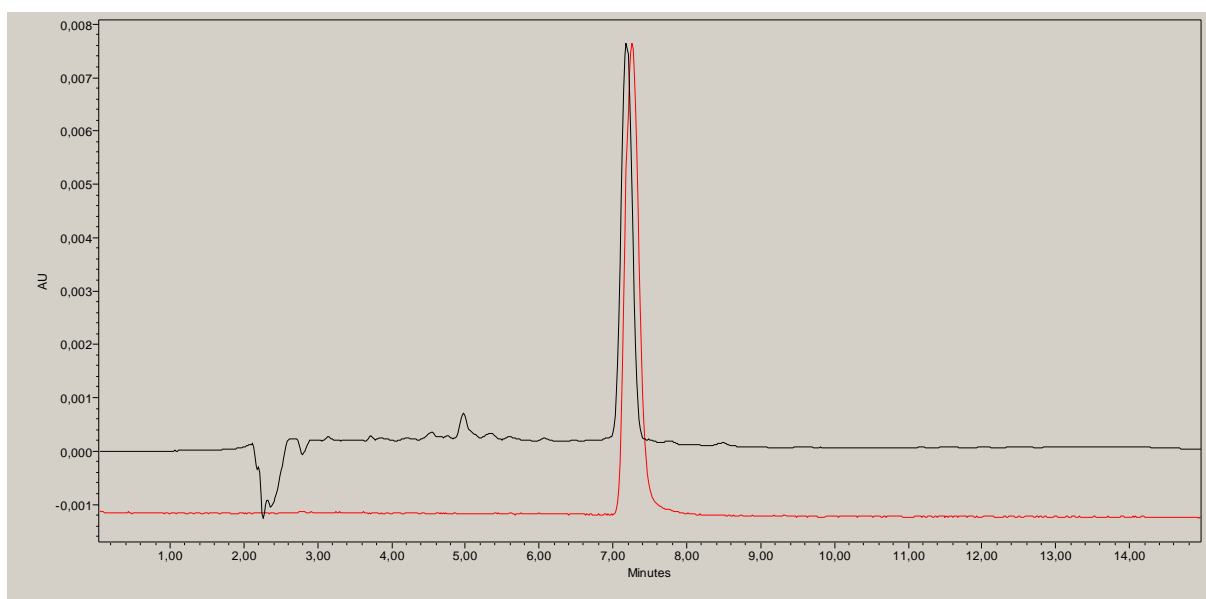


Fig 26. Cromatogrammi UV sovrapposti del [<sup>18</sup>F]VC701 e della coiniezione del radiofarmaco con il suo standard freddo VC701. In rosso è evidenziato il cromatogramma della coiniezione, in cui si può notare un aumento di intensità del picco rispetto al cromatogramma in nero (se non si considera l'autoscale tra i due cromatogrammi).

## 16. CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA

Il radiofarmaco finale [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 è stato, inoltre, caratterizzato mediante analisi di spettrometria di massa, per avere un'ulteriore conferma dell'identità del tracciante di interesse. La sintesi è stata condotta come descritto precedentemente, tuttavia, dopo trasferimento della frazione di radiofarmaco sulla cartuccia Sep-Pak tC18, il [ $^{18}\text{F}$ ]VC701 è stato recuperato mediante eluizione con 2 ml di etanolo e inviato alla vial finale sterile.

Per l'analisi spettrometrica, è stato utilizzato uno strumento API QStar Pulsar (Applied Biosystem), collegato ad una sorgente di ionizzazione ESI-MS off-line nano spray e ad un analizzatore a quadrupolo +TOF. L'analisi è stata effettuata presso i laboratori di Spettrometria di Massa per le proteine del dipartimento DIBIT dell'Ospedale San Raffaele, grazie alla collaborazione della Dott.ssa Angela Cattaneo.

Gli spettri di massa così ottenuti (Fig. 27 e 28) hanno mostrato un picco relativamente piccolo con m/z 385, corrispondente allo ione molecolare protonato ( $\text{MH}^+$ ), il quale ha così confermato la presenza del radiofarmaco di interesse; inoltre, è stato ottenuto uno spettro massa/massa, in cui è stato possibile individuare un picco particolarmente intenso a m/z 365, corrispondente alla perdita di acido fluoridrico (HF) durante la frammentazione dello ione parente, e un secondo picco altrettanto intenso a m/z 91, che fa riferimento al cosiddetto ione tropilio risultante dalla scissione benzilica.

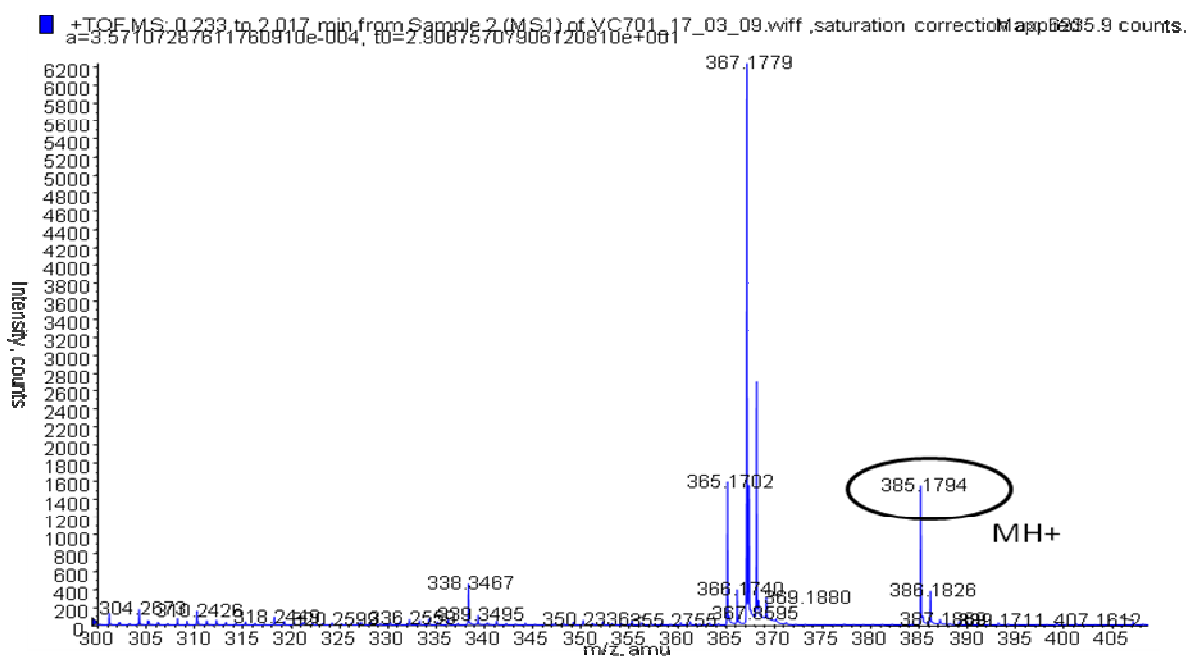


Fig. 27. Spettro di massa di un campione di [ $^{18}\text{F}$ ]VC701.

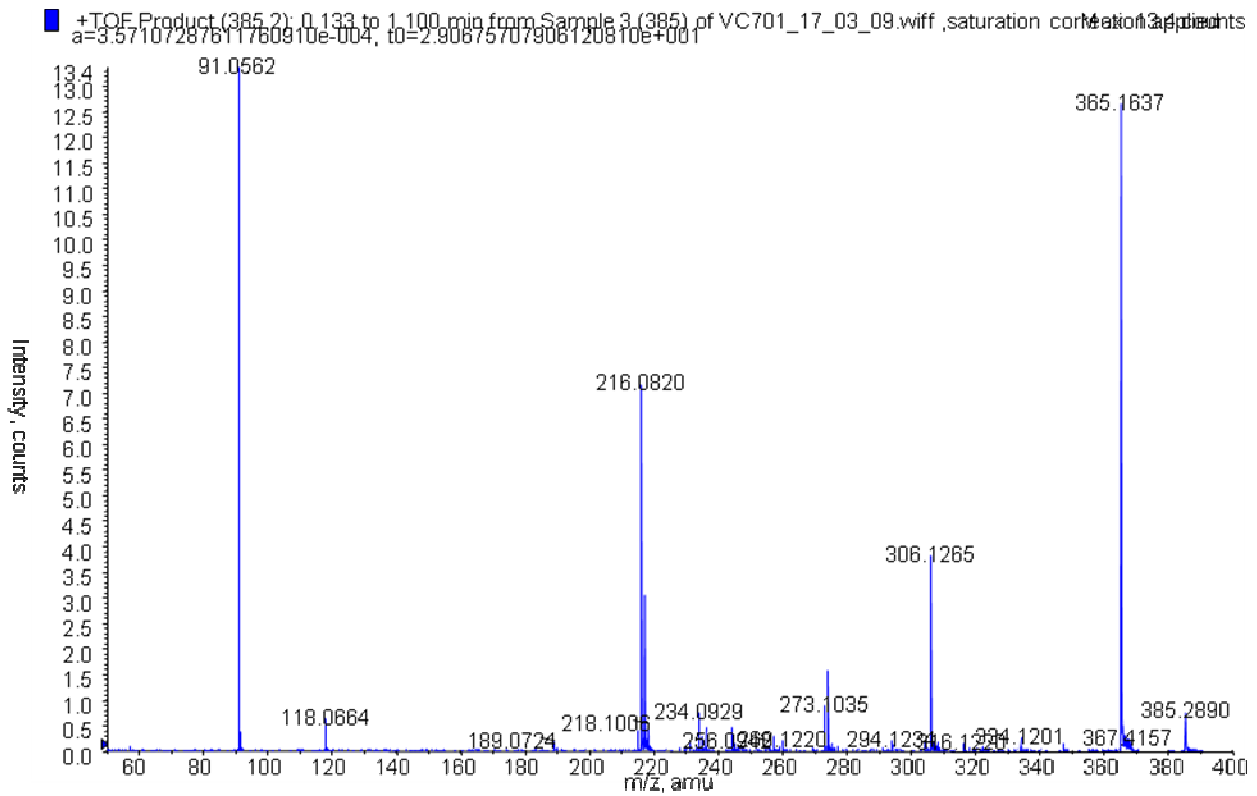


Fig. 28. Spettro massa/massa del campione.

## **17. PARTE SPERIMENTALE STUDI DI BIODISTRIBUZIONE E INIBIZIONE**

Gli studi di biodistribuzione nei ratti sono stati condotti in conformità con le richieste espresse dalla Commissione Etica Animali da Laboratorio (IACUC) dell'Istituto Scientifico San Raffaele di Milano. Sono stati adoperati animali maschi albini appartenenti al ceppo CD, con peso 225-250g, forniti dalla ditta Charles River (Italia). Essi sono stati iniettati nella vena della coda con circa  $2.76 \pm 0.47$  MBq (range 2.11-3.19) di [ $^{18}\text{F}$ ]VC701, corrispondenti a  $87.3 \pm 14.8$  picomoli (range 66.8-100.8). Al tempo 10, 30, 60, 120 e 240 minuti, i ratti sono stati sacrificati mediante decapitazione a gruppi di tre animali per ogni intervallo di tempo, e il plasma è stato raccolto all'interno di un tubo eparinizzato. Il plasma è stato quindi separato mediante centrifugazione e circa 100  $\mu\text{l}$  di sangue e plasma sono stati sottoposti a conteggio utilizzando uno strumento LKB Compugamma CS 1282.

Immediatamente dopo il sacrificio dell'animale, il cervello è stato rimosso dal ratto, suddiviso in cervelletto e corteccia e contato. Diversi organi periferici, in particolare il cuore, il polmone, il fegato, il rene, le ghiandole adrenergiche, la milza, l'intestino, il testicolo, il muscolo, il femore e il midollo spinale sono stati campionati e sottoposti a lavaggio con soluzione salina fredda. I vari tessuti sono stati, quindi, collocati in appositi tubi pre-pesati, e successivamente contati in un gamma-counter. Dopo questo step, i campioni sono stati pesati ed è stato calcolato l'uptake di radioattività nei vari tessuti e organi come percentuale della dose iniettata per grammo di tessuto (% I.D./g di tessuto).

Gli studi di inibizione sono stati condotti in un gruppo separato di ratti. Cinque animali per ogni gruppo sono stati pre-iniettati con 5 mg/Kg di PK11195 freddo, disciolto in 50  $\mu\text{l}$  di Etanolo, 50  $\mu\text{l}$  di DMSO e 900  $\mu\text{l}$  di soluzione salina, un minuto prima della somministrazione del radiofarmaco marcato [ $^{18}\text{F}$ ]VC701.

## **18. PARTE SPERIMENTALE STUDI PET**

Gli studi PET sull'animale sono stati condotti utilizzando uno YAP-(S)PET scanner dedicato (ISE, Pisa, Italia). Lo scanner presenta un campo di vista (FOV) pari a 4x4 cm di diametro e fornisce un set di 20 slices di 2 mm di spessore. Nella modalità PET, il volume di risoluzione è al di sotto di 8 mm<sup>3</sup>; la massima sensibilità assoluta misurata al centro del FOV è stata dell'1.9% (19 cps/KBq) per 50-850 KeV come finestra di energia.

Sono stati valutati due differenti ratti: il primo animale è stato pre-iniettato con il veicolo (5% di etanolo), mentre il secondo ratto è stato pre-iniettato con 5 mg/Kg di PK11195 freddo. In entrambi i casi, gli animali sono stati poi iniettati per via endovenosa con il radiofarmaco [<sup>18</sup>F]VC701 (8.6 e 12.1 MBq in 350 µl rispettivamente), un minuto dopo la somministrazione del veicolo o del PK11195 freddo.

## **19. CONCLUSIONI**

Il radiofarmaco [<sup>18</sup>F]VC701, descritto in questo lavoro, è attualmente in fase di sviluppo preclinico, ma, grazie alle sue favorevoli proprietà quali la sua potenza in vitro (IC<sub>50</sub>=0.11 nM), la sua semplice preparazione mediante radiosintesi a singolo step, l'elevata purezza chimica e radiochimica, la buona attività specifica e l'elevata specificità recettoriale, può essere considerato un promettente e valido radiofarmaco per la visualizzazione *in vivo* del recettore TSPO mediante PET imaging. La cinetica di questo tracciante, le altre proprietà biologiche e il comportamento a livello di lesioni neuroinfiammatorie saranno successivamente indagate e analizzate in adeguati modelli preclinici di disordini sia centrali che periferici.



## **20. NANOPARTICELLE**

Le nanoparticelle<sup>40</sup>, come del resto suggerisce il nome, sono piccole particelle generalmente sferiche con dimensioni comprese tra i 10 e i 1000 nm, costituite prevalentemente da polimeri biodegradabili o non biodegradabili. Negli ultimi anni stanno prendendo sempre più il sopravvento come nuove forme di rilascio del farmaco, in quanto consentono di modificare e soprattutto di migliorare le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche di numerose sostanze farmaceutiche, facilitando il loro arrivo al target o bersaglio tissutale. In base alla modalità con cui esse vengono preparate, possono essere distinte in nanocapsule o nanosfere; infatti, nel primo caso il sistema è costituito da una cavità circondata da un polimero, che contiene al suo interno il farmaco da somministrare; nel secondo caso, invece, il farmaco è disperso in modo omogeneo all'interno di una vera e propria matrice polimerica.

A livello del tumore, il meccanismo di accumulo delle nanoparticelle iniettate per via endovenosa si basa sulla diffusione passiva o sulla convezione attraverso il sistema vascolare tumorale. Una volta raggiunto il bersaglio, il farmaco viene rilasciato dalla particella e ha la possibilità di agire in maniera selettiva sul tessuto o sulla cellula specifica. Recentemente, si stanno rivelando di grande interesse le nanoparticelle costituite da polimeri biodegradabili quali i Polietilenglicoli (PEG), che, grazie alle loro caratteristiche, hanno la capacità di circolare nell'organismo per un periodo di tempo molto lungo all'interno di un organo target specifico.

Gli studi condotti con le nanoparticelle hanno, inoltre, dimostrato i vantaggi che questi sistemi presentano rispetto ai più conosciuti liposomi, utilizzati anch'essi negli ultimi anni come trasportatori o carrier di farmaci nell'organismo ai diversi siti d'azione; tuttavia, nonostante essi risultino efficaci nel proteggere il farmaco inglobato al loro interno da una veloce degradazione e nel ridurre la tossicità della sostanza, possono presentare una bassa efficienza di incapsulazione e ridotta stabilità. Le nanoparticelle polimeriche, grazie alle caratteristiche strutturali e alle ridottissime dimensioni, possono essere manipolate con grande facilità per favorire sia il targeting attivo che quello passivo dei farmaci; inoltre, un grosso vantaggio consiste nel poter regolare sia nel corso del trasporto che nel sito d'azione il rilascio della sostanza di interesse, favorendo in tal modo l'aumento dell'effetto terapeutico del farmaco e riducendone gli effetti collaterali. Il raggiungimento di un sito d'azione specifico da parte della nanoparticella può, inoltre, essere incrementato andando a legare alla superficie della stessa specifici ligandi diretti al target d'interesse.

In virtù di queste caratteristiche, le nanoparticelle sono sempre più oggetto di studio e indagine, per via delle potenziali applicazioni in settori quali l'oncologia e la genetica. La ragione del loro utilizzo nel targeting tumorale, ad esempio, risiede indubbiamente nella loro capacità di rilasciare una dose concentrata di farmaco nelle vicinanze dei bersagli del tumore, riducendo contemporaneamente l'esposizione dei tessuti sani all'effetto del farmaco antitumorale. Un altro risvolto interessante nell'utilizzo delle nanoparticelle polimeriche riguarda il passaggio attraverso

la barriera ematoencefalica, comunemente nota per la facoltà di rappresentare un evidente ostacolo fisico all'azione di molti farmaci a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC); ricordiamo, infatti, che essa è costituita prevalentemente da cellule endoteliali impermeabili, in grado di bloccare il passaggio di sostanze idrosolubili, per cui permette esclusivamente un trasporto selettivo di sostanze indispensabili per il funzionamento cerebrale. Le nanoparticelle, tuttavia, devono la loro abilità nel raggiungere il SNC alla interazione con specifici sistemi di trasporto recettore-mediati presenti nella stessa barriera ematoencefalica.

Le nanotecnologie mostrano, dunque, un futuro promettente nell'ambito dei cosiddetti drug delivery systems e la ricerca sta facendo grossi passi avanti per migliorare il settore farmacologico. Tra le nanoparticelle, le cosiddette particelle colloidali convenzionali (con superfici non modificate e più idrofobiche) possono essere fagocitate dal fegato, dalla milza, dai polmoni e dal midollo osseo, mentre le nanoparticelle a lunga circolazione (caratterizzate da una emivita prolungata nel compartimento vascolare e più idrofiliche) possono avere una localizzazione nel sangue o nel sistema linfatico.<sup>41</sup> Di conseguenza, essendo tutti questi organi possibili siti per lo sviluppo del tumore e raggiungibili da tali sistemi colloidali, essi potrebbero risultare utili nella diagnosi tumorale. Alcuni esempi di questi sistemi fino ad oggi realizzati sono i colloidi marcati con <sup>99m</sup>Tc e i colloidi solforati. In un altro studio sono state utilizzate nanoparticelle di policianoacrilato in presenza di uno spacer quale l'acido dietiltriainminopentaacetico (DTPA) per chelare i radioisotopi <sup>111</sup>In o <sup>99m</sup>Tc.

Di grande interesse risulta, dunque, la marcatura delle nanoparticelle con gli isotopi radioattivi convenzionali, in particolare con il Fluoro-18, in quanto esse potrebbero rivestire un ruolo fondamentale come agenti radiodiagnostici anche nell'Imaging con la PET permettendo la visualizzazione delle aree tumorali grazie al loro targeting diretto e, in futuro, potrebbero rivelarsi utili anche in ambito terapeutico.

## 21. POLY-VC626

Una parte del lavoro di ricerca ha riguardato lo studio del Poly-VC626 (Figura 29); si tratta di un polimero ad elevato peso molecolare, derivato del benzofulvene e considerato promettente per la preparazione di nanosfere e microsfere destinate a varie applicazioni biologiche e biotecnologiche.<sup>42</sup>

### 21.1 Parte sperimentale chimica

Lo standard e il precursore sono stati prodotti e forniti dal Prof. Andrea Cappelli e dal suo gruppo, operativi presso il dipartimento Farmaco-Chimico Tecnologico dell'Università di Siena.

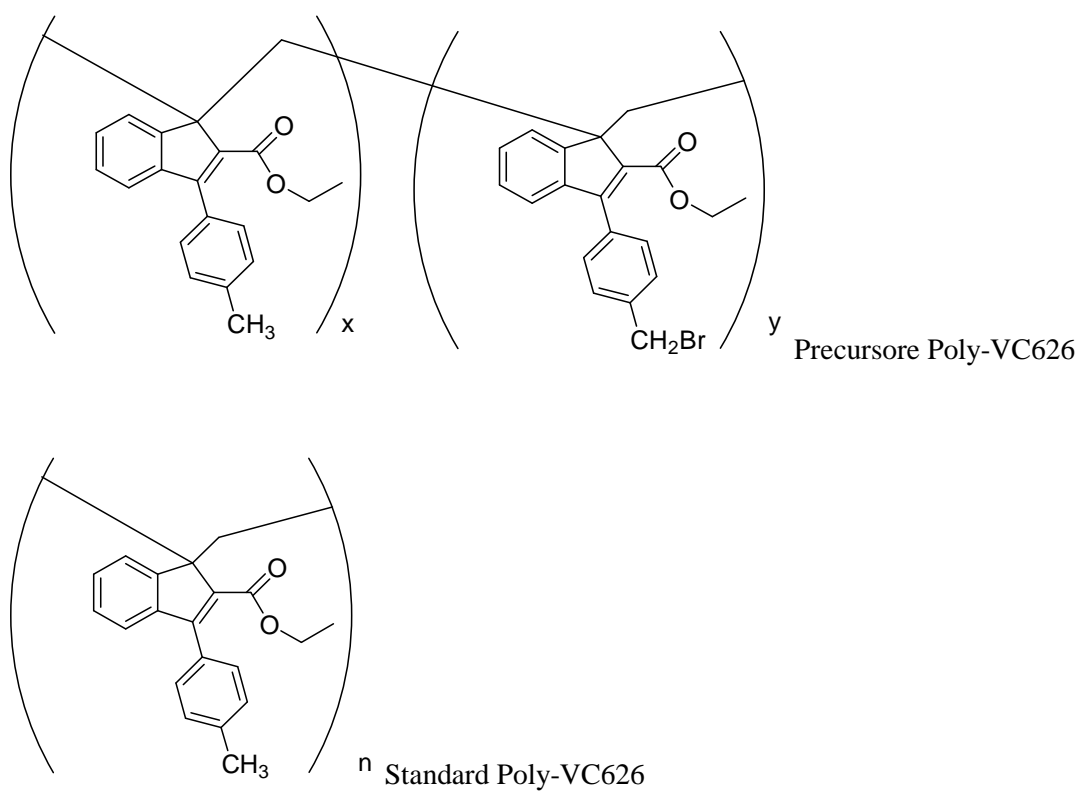


Fig. 29. Standard e precursore del Poly-VC626

## 21.2 Parte sperimentale radiochimica

Nel corso delle prove, è stato in buona parte predisposto il metodo analitico per la scelta della colonna cromatografica e della fase mobile analitica, con lo scopo di individuare i tempi di ritenzione dello standard e del precursore del polimero.

A tal fine, è stata utilizzata come primo tentativo una colonna analitica ACE C18 (CPS), adoperando una fase mobile per HPLC con seguente composizione: CH<sub>3</sub>CN/MeOH/H<sub>2</sub>O:45/45/10; sia lo standard che il precursore sono stati pesati e disciolti in 2 ml di DMSO anidro (Sigma-Aldrich), quindi iniettati in HPLC analitica. E' stato utilizzato un sistema composto da una pompa isocratica Waters 1515, un detector UV (Waters 2487) settato a 254 nm e un detector radiochimico ( $\beta^+$  Bioscan Flow count), ad un flusso di 1 ml/min.

Con un tempo di corsa iniziale di 20 minuti, dopo l'iniezione dello standard, nel cromatogramma sono stati notati un primo picco a 3 minuti, attribuibile al solvente, e un secondo picco a 7 minuti, corrispondente evidentemente al polimero (Fig. 30). Tuttavia, iniettando il precursore alle stesse condizioni, sono stati confermati gli stessi risultati dello standard.

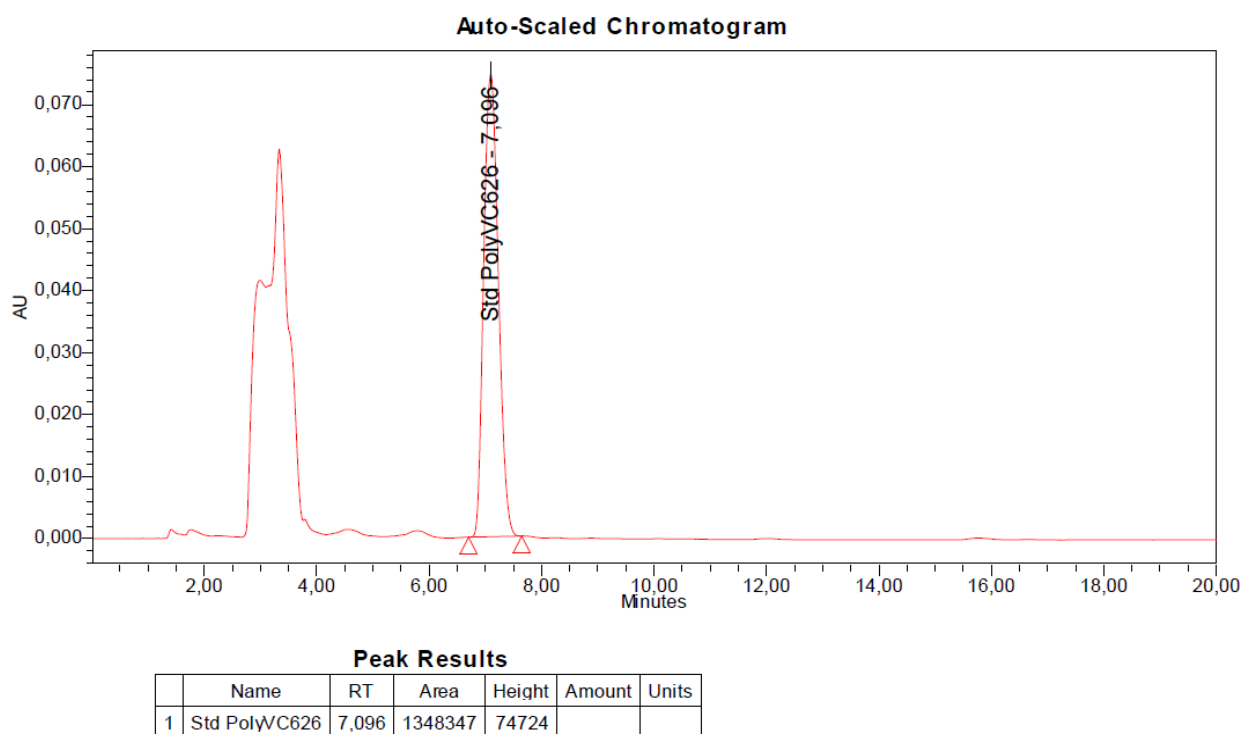
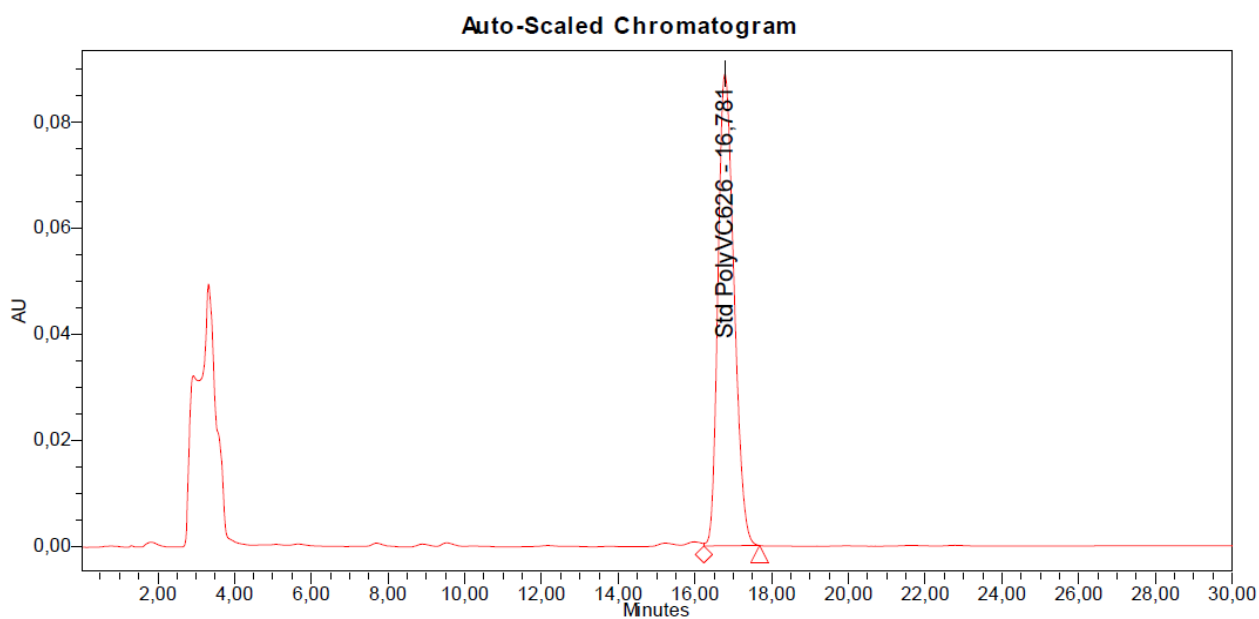


Fig. 30. Cromatogramma UV dello standard del Poly-VC626; iniettando il precursore non sono state notate differenze nel tempo di ritenzione.

Anche allungando la corsa cromatografica, non sono comparsi ulteriori picchi oltre a quelli già descritti, portando a pensare che il precursore potesse essere nascosto sotto il picco del DMSO.

E' stata quindi modificata leggermente la percentuale di solventi della fase mobile, utilizzando CH<sub>3</sub>CN/MeOH/H<sub>2</sub>O:35/45/20, in modo da ritardare l'uscita dei picchi aumentando l'acetonitrile; provando a iniettare nuovamente entrambi i composti, in realtà, sia standard che precursore hanno mostrato un tempo di ritenzione di circa 16,8 minuti (Fig. 31). Questo ha indotto a pensare che la colonna cromatografica utilizzata non fosse in grado di discriminare i due prodotti, forse perché caratterizzati da un peso molecolare molto elevato e simile tra loro.

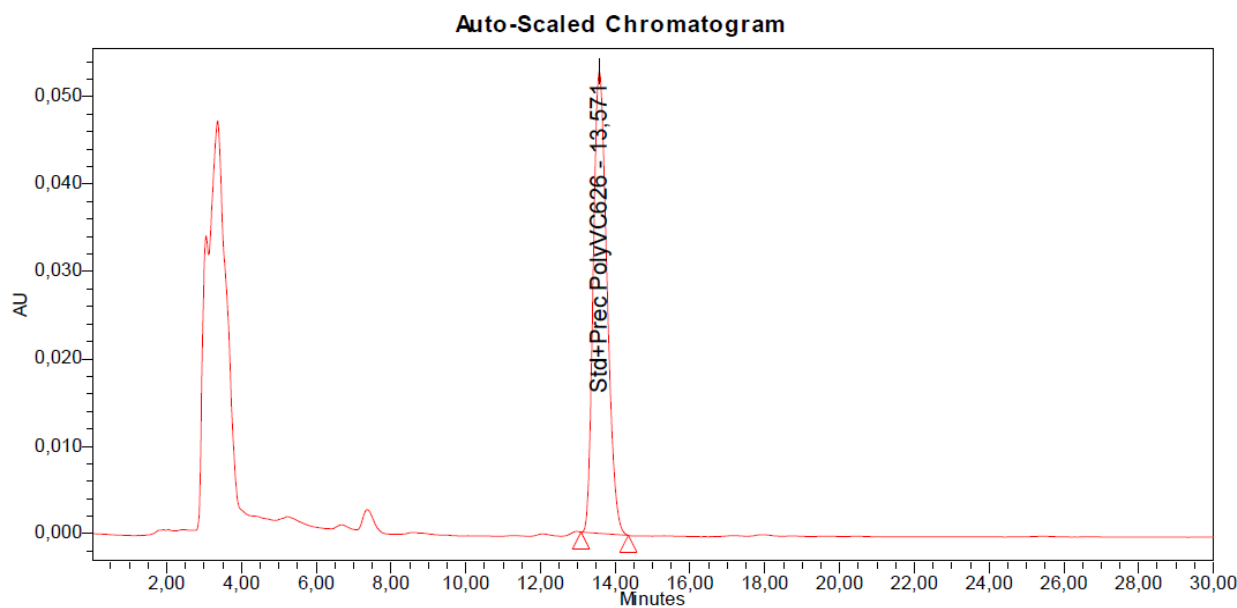


**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Std PolyVC626	16,781	2573869	88990		

Fig. 31. Cromatogramma UV dello standard del Poly-VC626 modificando la fase mobile analitica. Il precursore ha dato lo stesso risultato anche in questo caso.

Sono state, dunque, effettuate delle prove con altre due colonne differenti: una PLRP-S della Polymer Laboratories e una BDS Hypersil C18 (CPS); nel primo caso, sia con la fase mobile precedentemente utilizzata, sia con le fasi mobili CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O:50/50 e 20/80, per lo standard è stato osservato un tempo di ritenzione di soli 1,2 minuti, mostrando una scarsa capacità di trattenere il prodotto. Con la terza colonna, tornando alla fase mobile CH<sub>3</sub>CN/MeOH/H<sub>2</sub>O:35/45/20, sia standard che precursore hanno nuovamente mostrato un tempo di ritenzione analogo, pari a 13,6 minuti (Fig. 32). Questi dati hanno, dunque, confermato che i due prodotti, avendo un grosso peso molecolare e differenziandosi solo per la presenza di un atomo di Bromo, sono difficilmente separabili mediante HPLC.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Std+Prec PolyVC626	13,571	1344992	52874		

Fig. 32. Cromatogramma UV della coiniezione di standard e precursore del Poly-VC626 utilizzando una colonna analitica BDS Hypersil C18. Il tempo di ritenzione per i due prodotti è il medesimo.

Nello step successivo è stata comunque effettuata una prova di marcatura del precursore per mettere a punto le condizioni di radiosintesi e ottenere il prodotto fluorurato desiderato.

Per la prova, è stato pesato 1 mg di precursore e disciolto in 1 ml di DMSO anidro; il modulo di sintesi TracerLab<sub>FXFN</sub> è stato settato per la fluorurazione, utilizzando una miscela Kryptofix/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> per il recupero del Fluoro, 3 ml di fase mobile CH<sub>3</sub>CN/MeOH/H<sub>2</sub>O:35/45/20 per diluire il prodotto marcato, una cartuccia QMA preattivata per trattenere il Fluoruro radioattivo proveniente dal target e una cartuccia di Allumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Waters) per trattenere il Fluoruro non reagito durante la radiosintesi; è stata effettuata una reazione di marcatura con le seguenti condizioni: 110°C di temperatura per 15 min di tempo. Non è stata utilizzata una colonna semipreparativa per la purificazione, in quanto in questa prima fase l'obiettivo era verificare che la marcatura del precursore andasse a buon fine.

In realtà, con un'attività iniziale a fine bombardamento pari a circa 480 mCi (17,8 GBq), al termine della sintesi sono stati raccolti solo 4 mCi (0,15 GBq) di prodotto; il controllo di qualità con HPLC analitica, tuttavia, ha mostrato all'UV solo un piccolo picco, potenzialmente attribuibile al precursore, mentre non è stato osservato nessun picco di tipo radiochimico. Sono stati effettuati, quindi, altri tentativi di sintesi eliminando la cartuccia di Allumina, ipotizzando che essa potesse trattenere il prodotto marcato, ed utilizzando un volume maggiore (5 ml) di fase mobile per la diluizione; inoltre, è stata impostata una temperatura di reazione di 120°C per 20 minuti.

Nonostante nella vial finale sia stata recuperata una quantità di radioattività elevata, paragonabile alla quantità iniziale di Fluoruro, anche nelle prove successive il controllo di qualità all'HPLC non ha mostrato picchi significativi né all'UV né al radiochimico, inducendo a pensare che con un polimero di tali dimensioni risulti complessa la reazione di marcatura.

## 22. CONCLUSIONI

Il polimero Poly-VC626 è un interessante derivato del benzofulvene (etil-1-metilene-3-(4-metilfenil)-1H-indene-2-carbossilato), in grado di subire una polimerizzazione spontanea per dare origine al polimero corrispondente, caratterizzato da una struttura vinilica stabilizzata da interazioni aromatiche e considerato promettente per la formazione di nanoparticelle adibite ad uso diagnostico. Gli studi condotti sul polimero hanno, infatti, dimostrato che presenta la tendenza ad aggregarsi in nanosfere e microsfe, sistemi che risultano di particolare interesse nel rilascio controllato dei farmaci nell'organismo. Il polimero è stato sottoposto ad analisi cromatografica e a reazione di marcatura con Fluoro-18 mediante sostituzione nucleofila. Tuttavia, le prove finora effettuate non hanno fornito i risultati sperati, in quanto la radiosintesi, seppur semplice chimicamente, non ha portato ad un prodotto marcato finale. Il poco tempo a disposizione per i test, a causa del rinnovo dei laboratori di radiochimica, non ha consentito di effettuare nell'ultimo periodo nuove prove; tuttavia, il Prof. Cappelli, con cui collaboriamo, sta attualmente lavorando alla sintesi di nuovi polimeri PEGilati sui quali sperimentare una reazione di marcatura, nella speranza che le caratteristiche di questi nuovi composti possano essere più favorevoli per le marcature con differenti radioisotopi.

L'uso delle nanoparticelle marcate con i radioisotopi convenzionali è un campo molto promettente, dati i vantaggi di questi sistemi. Esse, infatti, potrebbero rivestire un ruolo fondamentale come agenti radiodiagnostici anche nell'Imaging con la PET permettendo la visualizzazione delle aree tumorali grazie al loro targeting diretto e, in futuro, potrebbero rivelarsi utili anche in ambito terapeutico.

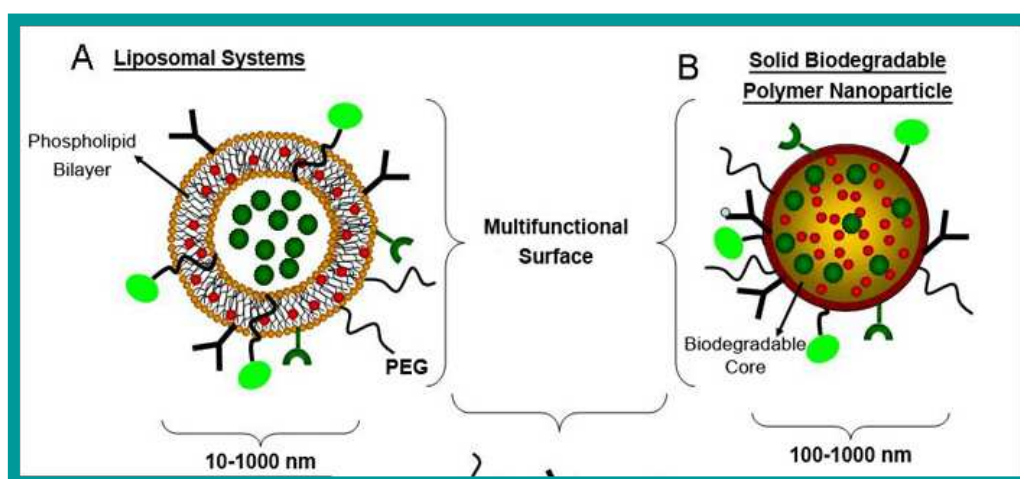


Fig. 33: Liposomi e Nanoparticelle



### **23. NORME DI BUONA PREPARAZIONE (NBP)**

Negli ultimi mesi del mio Dottorato di ricerca, la mia attività si è concentrata principalmente sulla messa a punto di sintesi di radiofarmaci e convalide di metodi analitici sulla base delle Norme di Buona Preparazione (NBP).

Questo è nato dalla necessità di rinnovare i laboratori di radiochimica per garantire l'adeguamento a tali norme, per cui ciò ha portato ad interrompere per un certo periodo di tempo l'attività di ricerca sperimentale.

Le NBP, ben note nel settore dell'industria farmaceutica da diversi anni, stanno prendendo piede recentemente anche nel settore dei radiofarmaci e dell'intera Medicina Nucleare. In generale, esse rappresentano un complesso di norme che tendono ad uniformare le condizioni di preparazione di un farmaco o di un medicamento in modo da garantire l'efficacia, la sicurezza e la qualità del prodotto finale, che ha naturalmente come destinatario ultimo il paziente.<sup>43</sup>

In seguito al Decreto Ministeriale del 30 marzo 2005, Gazzetta Ufficiale nr 168 21/07/05, i radiofarmaci sono stati equiparati ai farmaci a tutti gli effetti e dunque si è stabilito di sottoporre anche questi prodotti, sia con valenza terapeutica che diagnostica, a norme ben precise, in grado di stabilire i parametri da seguire nella loro preparazione, al fine di garantirne la qualità e la sicurezza. Non dimentichiamo, infatti, che il radiofarmaco è somministrato nel paziente per via endovenosa e, come tale, deve soddisfare requisiti di sterilità e apirogenicità al pari dei farmaci iniettabili tradizionali.

Sia l' [<sup>18</sup>F]FDG e i traccianti inseriti nella Farmacopea Europea, sia i radiofarmaci sperimentali e di ricerca sprovvisti di una monografia ufficiale, devono disporre di un adeguato sistema di documentazione che permetta di seguire le varie fasi di preparazione del radiofarmaco, a partire dalla prescrizione medica fino alla somministrazione nel paziente finale. In sostanza, per tutte le preparazioni radiofarmaceutiche, deve essere garantita la tracciabilità, sia del processo di produzione che dei controlli di qualità finali. Questo può essere fatto andando man mano a registrare ed archiviare tutte le informazioni che consentono di verificare a posteriori, anche dopo molto tempo, che le operazioni di preparazione del radiofarmaco siano state eseguite in maniera corretta e che i risultati siano stati conformi alle specifiche richieste.

## **24. PROCEDURE OPERATIVE STANDARD (SOP)**

Sulla base di queste premesse, nel corso di questi mesi mi sono occupata, insieme ai miei colleghi, innanzitutto di redigere una serie di procedure operative standard (SOP), che rappresentano un supporto fondamentale per la messa in opera delle norme di buone preparazione. Le SOP, infatti, documentano e descrivono in modo dettagliato tutte le operazioni da effettuare nel corso di un processo o di una qualsiasi attività all'interno del laboratorio e non solo. Sono state messe a punto procedure operative per le fasi di produzione dei radiofarmaci, per i controlli di qualità, per l'utilizzo di tutta la strumentazione dei laboratori, per la gestione delle materie prime, della documentazione necessaria, della formazione del personale e quant'altro.<sup>44</sup> Tutte le procedure, così redatte, sono state quindi numerate, catalogate e suddivise sulla base delle attività di routine o di ricerca. E' importante che ciascun membro del personale di lavoro abbia una buona conoscenza di tutte le procedure operative, per poter svolgere al meglio e correttamente l'attività lavorativa stessa.

Possiamo suddividere le SOP in tre categorie fondamentali, in base alla loro funzione e alle informazioni che esse contengono:

- ✓ SOP di Assicurazione della Qualità: stabiliscono i criteri con cui gestire la documentazione cartacea necessaria per ogni preparato radiofarmaceutico, i dati informatici e il personale addetto ai lavori;
- ✓ SOP di Produzione: contengono le istruzioni relative a tutte le fasi dei processi di produzione di ogni radiofarmaco e dunque informazioni sull'utilizzo, la manutenzione e la calibrazione delle apparecchiature utilizzate;
- ✓ SOP di Controllo Qualità: sono relative a tutte le operazioni che rientrano nel controllo dei prodotti finali, e comprendono le procedure dei controlli di qualità chimici, radiochimici, radionuclidici e biologici.

## **25. STERILITA' E AMBIENTI DEDICATI E CLASSIFICATI**

Come già accennato, un requisito indispensabile richiesto per i radiofarmaci è rappresentato dalla sterilità, in quanto si tratta di preparazioni parenterali che vengono somministrate per via endovenosa ai fini dell'analisi PET. Naturalmente, per ottenere questa caratteristica, è necessario osservare alcuni parametri ben precisi, non ultimo lavorare in ambienti dedicati che garantiscano questa qualità.

La normativa prevede la presenza di strutture adeguate alla preparazione dei radiofarmaci e, infatti, anche nel reparto di Medicina Nucleare dell'Ospedale San Raffaele, dove svolgo la mia attività, si è provveduto a questo tipo di cambiamento. Sono stati, quindi, messi a punto negli ultimi mesi, nuovi laboratori dotati dei requisiti richiesti; è importante che soprattutto gli ambienti destinati alla produzione siano progettati in modo tale da garantire un flusso logico che minimizzi le possibilità di contaminazione crociata; inoltre, la zona destinata alla preparazione vera e propria del radiofarmaco deve essere separata dal resto degli ambienti.<sup>44</sup>

Trattandosi di locali dedicati e con rischio di contaminazioni, io e i miei colleghi siamo stati ulteriormente formati sulle modalità di vestizione nei suddetti ambienti e, non meno importante, sulle procedure di pulizia della strumentazione e delle apparecchiature. Tutti gli ambienti sono locali classificati: si parte dalla classe D, dove il personale lascia i propri indumenti per procedere a un primo step di vestizione e si arriva alla classe C, di livello più alto, dove viene completata la procedura di vestizione indossando, oltre a tuta non traspirante e sovrascarpe, anche cuffia, doppi guanti e mascherine. Il frazionatore adiacente alla cella di sintesi, in cui arriva il radiofarmaco finale da frazionare, è stato invece progettato in Classe A, per garantire ulteriormente la sterilità del prodotto da iniettare. A tal proposito, un'analisi aggiuntiva che sarà effettuata nel corso dei controlli di qualità per lo sblocco del lotto, è il cosiddetto test del punto di bolla del filtro sterile, che ha come scopo ultimo la valutazione dell'integrità del filtro utilizzato per filtrare il radiofarmaco finale. Naturalmente, la non integrità dello stesso, sarà indice di una mancata sterilità della soluzione appena filtrata.

Anche dal punto di vista strutturale, i locali di una Radiofarmacia devono presentare alcune caratteristiche ben definite, per cui le finiture di pavimenti, soffitti e pareti devono essere adeguate a quanto richiesto dalla normativa e levigate in modo da non consentire l'accumulo di polvere o sporcizia in grado di compromettere i requisiti di sterilità richiesti. Infine, gli ambienti sono stati tutti dotati di un sistema indipendente di condizionamento, ventilazione e filtrazione, anche mediante l'impianto di conta particellare dell'aria.<sup>44</sup>

Quanto alle procedure di pulizia, tutte le superfici interne ai locali dedicati e, quindi, piani di lavoro, moduli di radiosintesi e celle piombate per il collocamento dei moduli stessi, devono essere costantemente sottoposti ad operazioni di sanitizzazione e disinfezione utilizzando prodotti

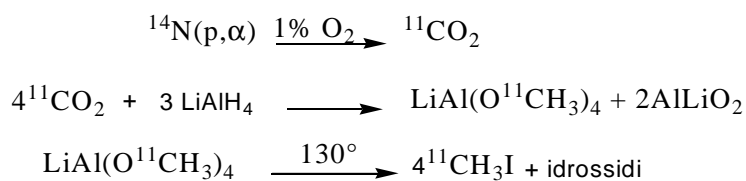
adeguati, non solo detergenti idonei alla pulizia ma anche panni in materiale specifico, in grado di rilasciare un numero limitato di particelle contaminanti.

## 26. CONVALIDE DI PROCESSO

Nell'ultimo periodo, lo spostamento dei laboratori di produzione e dei moduli adoperati per le sintesi, ha reso necessario rivedere la radiosintesi di alcuni radiofarmaci per effettuare una riconvalida dei processi di produzione.

A questo riguardo mi sono occupata, insieme ad alcuni colleghi, di rimettere a punto la produzione di Ioduro di Metile marcato con Carbonio-11 ( $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ ), step fondamentale nelle sintesi di molti radiofarmaci marcati con questo radionuclide. Abbiamo, quindi, lavorato per ottimizzarne la produzione utilizzando il modulo di sintesi Nuclear Interface PET Tracer Synthesizer per  $[^{11}\text{C}]$ metilazioni, associato al nuovo sistema operativo TracerLab. Il primo passaggio nella sintesi di  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  consiste nella produzione di  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  che viene ottenuta all'interno del target mediante una reazione nucleare tipo  $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ , irraggiando con fascio protonico una miscela gassosa composta da  $^{14}\text{N}_2$  ed una piccola percentuale di  $\text{O}_2$  (1%).

Dopo 50-60 minuti di bombardamento, la  $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$  viene convogliata nel modulo di sintesi attraverso flusso di gas (argon), intrappolata a  $-150^\circ\text{C}$  in un loop di acciaio e poi trasferita, a temperatura ambiente, in un reattore di vetro contenente  $\text{LiAlH}_4$  0.1 M in tetraidrofurano (THF) anidro. Il THF viene evaporato a  $130^\circ\text{C}$ , al residuo viene aggiunto HI in soluzione acquosa (55%) e si riscalda a  $150^\circ\text{C}$  per accelerare la formazione dello ioduro di metile. A questo punto il  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  viene distillato sotto flusso di argon in un secondo reattore contenente  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1-1,5 ml) tenuto a circa  $10-15^\circ\text{C}$ . I risultati, dopo diverse prove, sono stati abbastanza soddisfacenti, in quanto hanno permesso di ottenere una resa radiochimica di circa il 50% al termine del bombardamento (EOS) e un'attività specifica finale compresa tra 1 e 2 Ci/ $\mu\text{mol}$ .



Schema 4. Produzione dello Ioduro di Metile  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$

La formazione di  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  è un passaggio fondamentale e necessario nella radiosintesi di molti traccianti marcati con Carbonio-11; nell'ultimo periodo abbiamo lavorato anche per ottimizzare la produzione del radiofarmaco  $[^{11}\text{C}]\text{Colina}$ , già utilizzato nella routine clinica per lo studio del tumore prostatico mediante PET. Nonostante ci sia un analogo modulo di sintesi che soddisfa le

richieste di questo tracciante per i pazienti della routine, tuttavia sono state effettuate numerose produzioni per ottenere anche con questo secondo modulo, una buona resa di reazione, per far sì che esso possa fungere da backup per quello attualmente utilizzato.

Attualmente la mia attività è indirizzata alla riconvalida di un altro radiofarmaco marcato con Carbonio-11, il PK11195, un tracciante utilizzato per lo studio *in vivo* mediante PET delle neuroinfiammazioni. La produzione di questo radiofarmaco prevede la marcatura con [ $^{11}\text{C}$ ]CH $_3$ I del corrispondente precursore des-metilato e una successiva purificazione su colonna cromatografica semipreparativa, per separare il prodotto desiderato marcato da altre impurezze o prodotti secondari. La sintesi è già stata messa a punto dai colleghi del gruppo di ricerca, ma dovrà essere nuovamente convalidata effettuando almeno tre sintesi successive, in modo da ottenere una certa riproducibilità dei risultati finali.

Nonostante negli anni passati il [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 sia già stato somministrato nell'uomo per lo studio delle neuroinfiammazioni, è considerato un radiofarmaco sperimentale e, come tale, attualmente la normativa richiede che sia redatto un dossier completo comprendente tutte le fasi di produzione, i controlli di qualità effettuati, le materie prime utilizzate, e così via. Dunque, con i miei colleghi, si sta provvedendo anche a stilare un IMPD (Investigational Medicinal Product Dossier) del suddetto radiofarmaco, che contenga tutte le informazioni necessarie, in modo da poterne richiedere all'autorità competente l'autorizzazione all'uso nei protocolli clinici.

E' in corso, inoltre, una riconvalida del processo di produzione dell' [ $^{18}\text{F}$ ]FAZA, un radiofarmaco marcato con il radioisotopo Fluoro-18 e utilizzato nello studio dell'ipossia tumorale. In questo caso la sintesi viene condotta mediante modulo di sintesi TracerLab<sub>FX-FN</sub>, adatto alle reazioni di sostituzione nucleofila. Anch'esso è stato trasferito nei nuovi locali della Radiofarmacia e dunque sarà necessario effettuare una nuova convalida della sintesi su almeno tre produzioni successive. Finora gli studi con [ $^{18}\text{F}$ ]FAZA sono stati condotti nell'animale (ratti e topi) per valutarne la biodistribuzione e la captazione a livello delle regioni ipossiche, tuttavia il passo successivo sarà effettuare gli studi nell'uomo, per cui anche in questo caso si sta completando il dossier investigativo per autorizzarne l'uso nei protocolli clinici.

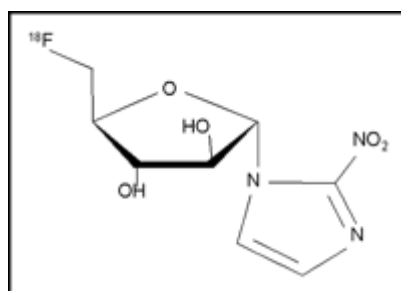


Fig. 33. Struttura della molecola di [ $^{18}\text{F}$ ]FAZA (1-(5'- [ $^{18}\text{F}$ ]Fluoro-5'-deossi- $\alpha$ -D-arabinofuranosil)-2-nitroimidazolo).

Le convalide di processo che ci accingiamo ad effettuare prevederanno una serie di prove che saranno effettuate sia a caldo, quindi con l'uso del radioattivo, che a freddo.

Per quanto riguarda le convalide a freddo sono previste:

- tre produzioni, simulando la sintesi a caldo, nelle quali si andranno a recuperare le tre frazioni finali di prodotto per verificarne il peso; le tre vial adoperate per le sintesi saranno pesate prima (per il calcolo della tara) e dopo la raccolta del volume di radiofarmaco. I dati finali dovranno risultare, naturalmente, riproducibili;
- prove di frazionamento utilizzando il nuovo sistema QCHC in classe A: saranno scelti tre livelli differenti di volume (es. 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml) e si effettuerà tre volte per ciascun volume il frazionamento a partire dalla vial finale, per poi pesare le vial con le diverse frazioni raccolte. Naturalmente, anche in questo caso, il peso in volume delle tre frazioni dovrà risultare riproducibile;
- nel caso specifico del radiofarmaco [<sup>18</sup>F]FAZA, saranno effettuate delle prove di raccolta del picco cromatografico scegliendo tre tempi di raccolta differenti. Questo tracciante, infatti, a differenza di altri, non presenta una formulazione farmaceutica finale al termine della radiosintesi, in quanto la fase mobile semipreparativa per la purificazione in HPLC presenta una composizione idonea alla somministrazione endovenosa (H<sub>2</sub>O:EtOH/98:2). Di conseguenza, il picco di interesse, una volta eluito dalla colonna, viene raccolto in un pallone e come tale inviato alla vial finale passando per il filtro sterile. Questo rende il volume finale soggetto a una certa variabilità, che dipende dal tempo di raccolta durante l'eluizione e che viene calcolato moltiplicando questo tempo per il flusso HPLC della pompa (4 ml/min). Scegliendo tre differenti tempi (es. 1', 2', 3'), si raccoglieranno le frazioni corrispondenti e si peseranno le vial finali, per verificare se il risultato può essere considerato riproducibile;
- tre radiosintesi complete del radiofarmaco senza utilizzo del filtro sterilizzante sulla vial finale; lo scopo di questa prova è effettuare il cosiddetto bioburden, ovvero un test di determinazione della carica microbica contaminante il prodotto, prima dell'utilizzo del filtro sterile.

Per quanto riguarda le convalide a caldo sono previste:

- produzione di Carbonio-11 (per il radiofarmaco [<sup>11</sup>C]PK11195) mediante Ciclotroni IBA e CTI ed effettuando tre bombardamenti per ciascun target. La [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>, intrappolata con ascarite nel frazionatore, sarà fatta decadere e successivamente esaminata con un Multicanale al sodio per verificarne la purezza radionuclidica e il tempo di emivita;
- produzione di Fluoro-18 (per il radiofarmaco [<sup>18</sup>F]FAZA) utilizzando i 3 target a disposizione (2 in argento e 1 in niobio) dei due ciclotroni IBA e CTI, con passaggio del

Fluoruro [ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$  prodotto attraverso una cartuccia QMA preattivata e successivo recupero mediante miscela K2.2.2./K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Anche in questo caso l'eluato sarà analizzato per determinarne la purezza radionuclidica e saranno effettuati ulteriori controlli di qualità sul Fluoruro sulla base di quanto stabilito nella monografia della Farmacopea Ufficiale;

- tre radiosintesi complete del radiofarmaco per valutare la resa finale del processo e stabilire il cosiddetto cut-off, ovvero il limite minimo di resa della produzione; al di sotto di questo valore, infatti, secondo quanto stabilito dalla normativa, il prodotto diventa non iniettabile;
- tre radiosintesi complete del radiofarmaco utilizzando il frazionatore ed effettuando successivamente un Controllo di Qualità completo delle frazioni raccolte (HPLC analitica per la purezza chimica e radiochimica, multicanale per la purezza radionuclidica e il tempo di emivita, LAL test per la ricerca dei pirogeni, pH della soluzione finale, Gascromatografo per la ricerca dei solventi residui. La sterilità sarà affidata come di consueto ad una ditta esterna).

## **27. CONVALIDE DEI METODI ANALITICI**

Una fase che si è resa necessaria per uniformarsi alla normativa vigente è stata caratterizzata dalla convalida delle procedure e dei metodi analitici utilizzati per i controlli di qualità dei radiofarmaci. A tal proposito, esiste un documento ufficiale messo a punto dall'ICH (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use), indicato con la sigla Q2(R1), che stabilisce una serie di linee guida da applicare alla validazione di procedure analitiche usate per i controlli di qualità delle preparazioni farmaceutiche per uso umano. Nel presente documento sono descritti diversi tipi di procedure, relative a test di identificazione e quantificazione del principio attivo e delle impurezze, con l'obiettivo di dimostrare che il piano di validazione risulti appropriato e idoneo allo scopo che si vuole raggiungere.<sup>45</sup>

Nel nostro nuovo laboratorio di Controllo Qualità, è in corso il completamento della convalida dei metodi secondo quanto richiesto dai documenti ufficiali, ed in particolare dei radiofarmaci [<sup>18</sup>F]FAZA e [<sup>11</sup>C]PK11195.

I parametri fondamentali che è stato necessario valutare per ogni radiofarmaco sono i seguenti:

- Specificità: indica la capacità di identificare in modo inequivocabile l'analita in presenza di altri componenti, quali impurezze o degradanti.
- Accuratezza: esprime la concordanza tra il valore convenzionalmente considerato come valore vero e il valore trovato (cioè determinato o calcolato sperimentalmente). Per i nostri scopi, abbiamo stabilito un range di accettabilità compreso tra 98 e 102% per il principio attivo e tra 95 e 105% per il precursore o altre impurezze.
- Precisione: esprime la concordanza tra una serie di misure ottenute da un campionamento multiplo dello stesso campione omogeneo alle condizioni prescritte. E' anche espressa come varianza, deviazione standard o coefficiente di variazione di una serie di misure. Per le nostre convalide abbiamo scelto un valore di accettabilità  $\leq 2\%$  per il principio attivo e  $\leq 5\%$  per impurezze e prodotti secondari. Nell'ambito della precisione, si distinguono, poi, tre livelli differenti:
  - Precisione intermedia
  - Ripetibilità
  - Riproducibilità
- Linearità: rappresenta la capacità di ottenere risultati direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita all'interno del campione. Abbiamo stabilito per le nostre rette di calibrazione un valore di  $R^2$  pari ad almeno 0,99.
- Range: indica l'intervallo tra le concentrazioni più alta e più bassa di analita nel campione per le quali è stato dimostrato un adeguato livello di precisione e accuratezza.



- Limite di quantificazione: indica la più bassa concentrazione di analita in un campione che può essere quantificata con adeguate precisione e accuratezza.
- Limite di rilevabilità: rappresenta la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata in un campione senza essere necessariamente quantificata.
- Robustezza: è una misura della capacità di una procedura analitica a rimanere inalterata anche a seguito di piccoli cambiamenti effettuati deliberatamente tra i parametri del metodo. Nel nostro caso sono state prese in considerazione variazioni relative alla fase di eluizione della colonna cromatografica, al pH della stessa fase mobile e al flusso.

I risultati finora ottenuti con l' [<sup>18</sup>F]FAZA si sono rivelati conformi alle specifiche richieste, per cui il metodo di analisi per questo radiofarmaco è stato convalidato raggiungendo un buon livello di precisione, accuratezza, linearità, riproducibilità e ripetibilità. Lo stesso lavoro, volto al raggiungimento dei risultati adeguati, verrà applicato anche al [<sup>11</sup>C]PK11195.

Come già detto, la convalida del processo di produzione di ciascun radiofarmaco comporterà una ripetizione ad intervalli di tempo regolari dei controlli di qualità richiesti. Di conseguenza, per ogni radiosintesi, sarà effettuata la determinazione della purezza chimica e radiochimica del prodotto, della purezza radionuclidica e dell'emivita, del pH della soluzione finale e dei solventi residui, in modo da valutare anche la stabilità del prodotto marcato nel tempo.

Naturalmente, le convalide di processo e la validazione dei metodi analitici, saranno applicate anche all' [<sup>18</sup>F]VC701, utilizzato per il momento solo nell'animale.

## **28. CONCLUSIONI**

Le Norme di Buona Preparazione, già note da tempo ai vari settori dell'industria farmaceutica, sono state estese recentemente anche alla categoria dei radiofarmaci e contano di entrare in vigore nelle Medicine Nucleari italiane in data 1 Luglio 2011. Questo provvedimento, diventato ormai decreto ministeriale, ha dato vita alla necessità di adeguare tutti gli ambienti dedicati alla produzione e al controllo di qualità dei radiofarmaci alla normativa citata, determinando uno stravolgimento del metodo di lavoro finora considerato idoneo. Ricordiamo, infatti, che la sterilità del prodotto finale, somministrato al paziente per via endovenosa, deve essere garantita al 100%, lavorando in ambienti adeguati, con materiale certificato, al pari dei farmaci iniettabili convenzionali prodotti dalle industrie farmaceutiche.

La Medicina Nucleare dell'Ospedale San Raffaele di Milano ha recentemente completato i lavori di messa a punto dei nuovi laboratori, sia per quanto riguarda la cosiddetta Camera Calda, dove sono prodotti i Tecnezati per le scintigrafie, sia per quanto riguarda le Radiochimiche destinate alla routine (per [ $^{18}\text{F}$ ]FDG e [ $^{11}\text{C}$ ]Colina) e ai traccianti di ricerca.

In questo periodo ci stiamo, dunque, adoperando per effettuare nuovamente le convalide di processo dei diversi radiofarmaci, lavorando a regime negli ambienti classificati e adoperando il frazionatore in classe A per l'arrivo del prodotto finale; parallelamente viene effettuato un lavoro di convalida dei metodi analitici per quanto riguarda i controlli di qualità finali del prodotto di sintesi.

L'obiettivo, inoltre, completate le convalide già descritte, sarà quello di ottimizzare la produzione stessa dei radiofarmaci coinvolti, in modo particolare [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 e [ $^{18}\text{F}$ ]FAZA, per i quali sono previsti a breve protocolli clinici per lo studio nell'uomo.



Fig. 34. Nuova Radiofarmacia – Unità di Medicina Nucleare Ospedale San Raffaele, Milano-  
Accesso dagli ambienti di classe D agli ambienti di classe C.



Fig. 35. Nuova Radiofarmacia- Corridoio della classe C con accesso ai laboratori di sintesi.



Fig. 36. Nuova Radiofarmacia- Interno del laboratorio di sintesi dei traccianti di ricerca marcati con Carbonio-11. Si individuano due celle di sintesi con, al loro interno, i moduli, e, sulla sinistra, il frazionatore di dose per l'arrivo del radiofarmaco, classificato in classe A.



Fig. 37. Nuova Radiofarmacia - Sistema di monitoraggio ELSE, per il controllo delle contaminazioni ambientali dei locali.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Salvatore M., Sansone V., Varrone A., *Imaging molecolare nelle malattie neurodegenerative*, Neurol Sci (2006) 27;
- 2) Lucignani G., *Imaging molecolare: vedere per curare*, Oncologia Europea, n 21, giugno 2005;
- 3) Gambhir S.S., *Molecular imaging of cancer with Positron Emission Tomography*, Nature Reviews, vol. 2, Sett 2002, 683-693;
- 4) Nabi H.A., Zubeldia, J.M., *Clinical applications of <sup>18</sup>F-FDG in oncology*, J. Nucl. Med. Technol., 2002, 30, 3-9;
- 5) Schyler D.J., *Annals Academy of Medicine* (Singapore), 2004, 146-154;
- 6) Derenzo S., et al., IEEE Nucl. Sci, 1977, 544-558;
- 7) Phelps M.E., et al., *Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography*, J. Nucl. Med., 1975, 210-224;
- 8) Pascali C. et al., *Concetti generali sulla produzione di radiofarmaci emettitori di positroni*, Aretrè, s.r.l., Milano;
- 9) Welch J.M., et al., *Handbook of Radiopharmaceuticals*;
- 10) Hamacher K., et al., *Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[<sup>18</sup>F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution*, J. Nucl. Med., 1986, 27, 235-238;
- 11) Papadopoulos V., et al., *Translocator protein (18 KDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function*, Trends in Pharmacological Sciences, 2006, vol 27, n 8, 403-409;
- 12) Verma A., et al., *Peripheral-type benzodiazepine receptors*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1989, 29, 307-322;
- 13) Casellas P., et al. *Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function*, Neurochem. Int., 2002, 40, 475-486;
- 14) Gavish M., et al *Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor* J. Neurochem., 1992, 58(5), 1589-1601;
- 15) Beurdeley-Thomas A., et al., *The peripheral benzodiazepine receptors: a review*. J. Neurooncol., 2000, 46(1), 45;
- 16) Gavish M., et al., *Enigma of the Peripheral Benzodiazepine Receptor*, Pharmacol. Rev., 1999, 51(4), 629-650;
- 17) Miettinen H., et al., *Expression of Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor and Diazepam Binding Inhibitor in Human Astrocytomas: Relationship to Cell Proliferation*, Cancer Res., 1995, 55(12), 2691;

- 18) Kozikowski A. P., et al., *Chemistry, binding affinities, and behavioral properties of a new class of "antineophobic" mitochondrial DBI receptor complex (mDRC) ligands*, *Med. Chem.*, 1993, 36(20), 2908-2920;
- 19) Vowinckel E., et al., *PK11195 binding to the peripheral benzodiazepine receptor as a marker of microglia activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*, *J. Neurosci. Res.*, 1997, 50, 345-353;
- 20) Diorio D., et al., *Peripheral benzodiazepine binding sites in Alzheimer's disease frontal and temporal cortex*, *Neurobiol. Aging*, 1991, 12(3), 255-258;
- 21) Shoemaker H., et al., *[<sup>3</sup>H]Ro5-4864 benzodiazepine binding in the kainate lesioned striatum and Huntington's diseased basal ganglia*, *Brain Res.*, 1982, 248(2), 396-401;
- 22) Benavides J., et al., *Imaging of human brain lesions with an  $\omega_3$  site radioligand*, *Ann. Neurol.*, 1988, 24(6), 708-712;
- 23) Hardwick M., et al., *Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor (PBR) in Human Breast Cancer*, *Cancer Res.*, 1999, 59(4), 831;
- 24) Maaser K., et al., *Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer*, *Clin. Cancer Res.*, 2002, 8(10), 3205;
- 25) Black K.L., et al., *Imaging of brain tumors using peripheral benzodiazepine receptor ligands*, *J. Neurosurg.*, 1989, 71(1), 113-118;
- 26) Venturini I., et al., *Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor in human tumors sited in the liver*, *Life Sci.*, 1999, 65(2), 2223-2231;
- 27) Pike V. W., et al., *Radioligands for PET studies of central benzodiazepine receptors and PK (peripheral benzodiazepine) binding sites—current status*, *Nucl. Med. Biol.* 1993, 20(4), 503-525;
- 28) Maeda J., et al., *Novel peripheral benzodiazepine receptor ligand [<sup>11</sup>C]DAA1106 for PET: An imaging tool for glial cells in the brain*, *Synapse* 2004, 52, 283-291;
- 29) Belloli S., et al., *Evaluation of three quinoline-carboxamide derivatives as potential radioligands for the in vivo pet imaging of neurodegeneration*, *Neurochem. Int.*, 2004, 44(6), 433;
- 30) Matarrese M., et al., *Synthesis of the Novel N-[<sup>11</sup>C]Labelled Quinoline Carboxamides: Analogues of PK11195 as Putative Radioligands for PET studies of Peripheral Type Benzodiazepine Receptors*. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 1999, 42, S397-S399;
- 31) Belloli S., et al., *Evaluation of Three Quinoline-2-carboxamide Derivatives as Potential Radioligands for the in vivo PET Imaging of Neurodegeneration*, *Neurochem. Int.* 2004, 44, 433-440;
- 32) Cappelli A., et al., *Synthesis, labelling, and biological evaluation of halogenated 2-quinolinecarboxamides as potential radioligands for the visualization of peripheral benzodiazepine receptors*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14, 4055-4066;
- 33) Chauveau F., et al., *Nuclear Imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [<sup>11</sup>C]PK11195 challengers*, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2008, 35, 2304-2319;
- 34) Zhang M. R., et al., *[<sup>11</sup>C]DAA1106: Radiosynthesis and in vivo Binding to Peripheral Benzodiazepine Receptors in Mouse Brain*, *Nucl. Med. Biol.* 2003, 30, 513-519;



- 35) Zhang M. R., et al., *Development of a New Radioligand, N-(5-Fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-[<sup>18</sup>F]Fluoroethyl-5-methoxybenzyl)acetamide, for PET Imaging of Peripheral Benzodiazepine Receptor in primate Brain*, J. Med. Chem. 2004, 47, 2228-2235;
- 36) James M. L., et al., *DPA-714, a new translocator protein-specific ligand: synthesis, radiofluorination, and pharmacologic characterization*, J. Nucl. Med. 2008, 49(5), 814;
- 37) Fujimura Y., et al., *Quantification of peripheral benzodiazepine (18 kDa) receptors in human brain with positron emission tomography and a novel radioligand, <sup>18</sup>F-PBR06*, J. Nucl. Med. 2009, 50(7), 1047;
- 38) Cappelli A., *Structure-Activity Relationships in Carboxamide Derivatives Based on the Targeted Delivery of Radionuclides and Boron Atoms by Means of Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligands*, J. Med. Chem. 2003, 46, 3568-3571;
- 39) More M. B., et al., *Intrinsic Affinities of Alkali Cations for 15-Crown-5 and 18-Crown-6: Bond Dissociation Energies of Gas-Phase M<sup>+</sup>-Crown Ether C*, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 417-423;
- 40) Mohanraj V.J., et al., *Nanoparticles-a review*, Trop. J. Pharm. Res., 2006, 5(1), 561-573;
- 41) Brigger I., et al., *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*, Advanced Drug Delivery Reviews. (2002) 54, 631-651;
- 42) Cappelli A., et al., *Anionic polymerization of a benzofulvene monomer leading to a thermoreversible  $\pi$ -stacked polymer. Studies in a macromolecular and aggregate structure*, Macromolecules 2008, 41, 2324-2334;
- 43) *Norme di Buona Preparazione dei Radiofarmaci per Medicina Nucleare*, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 21 Luglio 2005, Anno 146, n° 168;
- 44) *Le Norme di Buona Preparazione dei Radiofarmaci in Medicina Nucleare-Adeguamenti procedurali e strutturali alla nuova normativa*, Notiziario di Medicina Nucleare ed Imaging Molecolare, Anno II, n° 3, Giugno 2006, Supplemento speciale;
- 45) *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, ICH Harmonised Tripartite Guideline, International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.