

M. Caeran^b, M. Verona^b, M. Tosato^c, M. Ballan^a, S. Corradetti^a, V. Di Marco^c, G. Marzaro^b, A. Andrighetto^a, N. Realdon^b

^a INFN, Laboratori Nazionali di Legnaro, Viale dell'Università 2, 35020 Legnaro (PD), Italia
^b Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Via Marzolo 5, 35131 Padova, Italia
^c Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Scienze Chimiche, Via Marzolo 1, 35131 Padova, Italia

Introduzione

I radiofarmaci sono degli strumenti fondamentali aventi un altissimo potenziale nel campo della medicina nucleare. In base al nuclide impiegato, i radiofarmaci possono trovare impiego sia nella diagnosi che nella terapia di patologia di varia eziologia. Entrambi i processi sono possibili grazie alla coordinazione del radionuclide ad un ligando in grado di accumularsi selettivamente sul tessuto d'interesse. La ricerca di nuovi nuclidi e la progettazione dei ligandi, sono ad oggi parti fondamentali della ricerca nel settore radiofarmaceutico.

La recente cooperazione interdipartimentale tra i laboratori INFN-LNL (Istituto Nazionale di Fisica Nucleare – Laboratori Nazionali di Legnaro), il Dipartimento di Scienze del Farmaco e il dipartimento di Scienze Chimiche è nato il progetto ISOLPHARM [1], il quale si pone l'obiettivo di produrre nuclidi non carrier added, ad elevata purezza isotopica ed elevata attività specifica per l'allestimento di radiofarmaci innovativi.

Il progetto ISOLPHARM avrà la capacità di produrre un ampio set di n.c.a. radionuclidi per la ricerca nel settore radiofarmaceutico. I radionuclidi di tale purezza sono altamente richiesti per la radiomarcatura di ligandi per terapia e diagnosi e per la scoperta di nuovi radiofarmaci

Scopo

Tra i nuclidi studiati, di grande interesse è ¹¹¹Ag. Questo radionuclide è un candidato promettente per la radioterapia grazie alle sue proprietà di decadimento ($t_{1/2} = 7,45$ d, energia β media 360 keV, penetrazione media dei tessuti di 1,8 mm e bassa percentuale di emissione γ associata) [2]. Lo scopo del progetto ISOLPHARM Ag è quello di sviluppare una facility per la produzione di ¹¹¹Ag ad elevata purezza da poter impiegare in ambito farmaceutico.

Parallelamente a questo, il progetto ISOLPHARM prevede lo sviluppo di ligandi in grado di legare stabilmente il nuclide e trasportarlo attivamente su un tessuto target d'interesse.

Nel nostro studio è stato preso in considerazione come target il recettore per la colecistochinina CCK2, il quale risulta sovraespresso in diverse tipologie tumorali di natura neuroendocrina permettendo quindi una discriminazione tra tessuto sano e tessuto malato [3].

Parte sperimentale

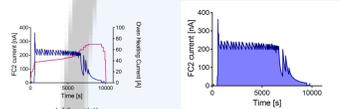
Produzione di ¹¹¹Ag con metodo ISOL

A Legnaro i radionuclidi verranno prodotti secondo la tecnica ISOL (Separation Isotope Separation On-Line), che garantisce la produzione di Rame radioattivi altamente puri (RiB). In breve, il metodo ISOL consente la ionizzazione di radioisotopi, prodotti all'interno di un bersaglio primario grazie a un fascio di protoni primario, che vengono successivamente accelerati e, grazie alla separazione di massa, purificati per produrre un fascio isobarico [4]. I fasci isobarici che contengono un radionuclide utile per la medicina nucleare possono essere sfruttati per la produzione di precursori radiofarmaceutici.

Una sorgente di plasma ionico è stata collegata al canale e l'argento è stato introdotto all'interno della FE sotto forma di nitrato mediante la tecnica del Mass Marker e ionizzato al suo stato +1



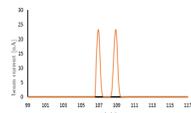
Grazie all'applicazione del vuoto (10^{-6} mbar), ad una temperatura elevata (~ 2000 °C) e una differenza di potenziale di 25 kV è stato prodotto un fascio di ioni argento. L'efficienza di ionizzazione è stata calcolata monitorando il passaggio di Ag⁺ nel tempo mediante una Faraday Cup



Test	Efficienza di ionizzazione [%]
Test 1	15,53
Test 2	14,83
Test 3	14,62

Efficienza media di ionizzazione: 15,03 ± 0,53 %

Target secondari di deposizione



I fasci di Ag⁺ così prodotti sono stati successivamente raccolti su idonei target secondari costituiti da dischi di NaNO₃. In seguito alla deposizione di Ag⁺, i target di NaNO₃ sono stati sciolti in HNO₃ 0,3 M e analizzati tramite GF-AAS.



Test	Ag ⁺ teorico depositato [µg]	Ag ⁺ effettivo depositato [µg]
Test 1	9,50	6,53
Test 2	10,22	7,05
Test 3	19,10	12,91

Efficienza media di deposizione: 68,44 ± 0,70 %

Purificazione di ¹¹¹Ag

Poiché la purezza di ¹¹¹Ag prodotto con il metodo ISOL è influenzata dalla presenza del suo contaminante isobarico ¹¹¹Cd, è stato studiato un metodo di purificazione. Basandosi sui dati presenti in letteratura, è stata funzionalizzata una silice mesoporosa con un dibenzo-18-crown-6 il quale, presentando una cavità interna di idonee dimensioni, è in grado di solvatare e sequestrare selettivamente l'Ag presente in soluzione.



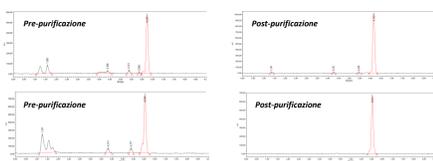
La silice così sintetizzata è stata sottoposta ad uno studio di uptake e rilascio a diverse condizioni per valutare la sua capacità di sequestrare l'argento in soluzione e rilasciarlo in un secondo momento per poterlo così separare dal suo contaminante isobarico ¹¹¹Cd

Test	Concentrazione di Ag residuo [mg/L]	Efficienza uptake [%]	Efficienza rilascio [%]
Test 1	0,064	99,68	4
Test 2	0,250	98,75	8,22
Test 3	0,032	99,02	1,17
Test 4	0,142	96,10	18,18

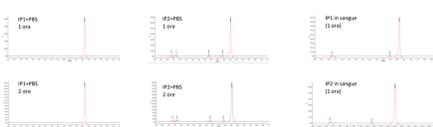
Gli studi eseguiti hanno evidenziato una grande efficienza di uptake da parte della resina ma allo stesso tempo una bassa efficienza di rilascio dell'argento. In seguito a questi risultati, sono state prese in considerazione delle resine di natura polimerica da impiegare nel processo di purificazione le quali sono ora oggetto di studio presso i nostri laboratori.

Radiomarcatura

Ad oggi la facility per la produzione di ¹¹¹Ag è ancora in fase di costruzione, per questo motivo è stato necessario eseguire i primi studi preliminari di radiomarcatura con il ⁶⁸Ga, nuclide già impiegato nella diagnostica e facilmente reperibile in commercio. Presso i nostri laboratori è stato ottimizzato il processo di radiomarcatura di entrambi i ligandi ottenendo un'efficienza finale di marcatura del 90% per entrambi i ligandi. Successivamente è stato ottimizzato il processo di purificazione eliminando così il ⁶⁸Ga non complessato ottenendo dei radioligandi altamente puri.



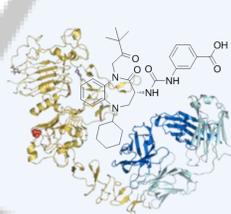
I ligandi radiomarcati sono stati infine sottoposti a dei test di stabilità in PBS e sangue per determinare la loro stabilità nel tempo. Tali studi hanno evidenziato una grandissima stabilità delle molecole radiomarcate.



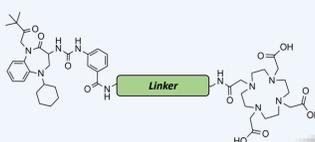
Sintesi ligandi

L'agente direzionante preso in considerazione nel nostro studio è Z-360, un derivato benzodiazepinico antagonista del CCK2R. Z-360 è stato sintetizzato secondo una procedura presente in letteratura, con

lievi modifiche per migliorare il processo complessivo. La via sintetica per l'ottenimento di Z-360 prevede prima la formazione del nucleo benzodiazepinico e successivamente la sua funzionalizzazione con gruppi specifici per l'ottenimento della molecola finale.

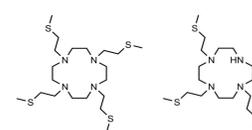


L'agente direzionante è stato funzionalizzato con due diversi linker ai quali è stato successivamente connesso il chelante DOTA, necessario per i primi test preliminari di radiomarcatura con ⁶⁸Ga. I due ligandi finali IP1 e IP2 sono stati infine purificati e caratterizzati.



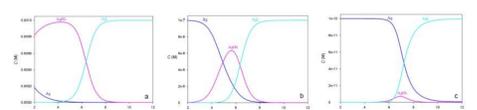
Chelanti per ¹¹¹Ag

L'impiego di ¹¹¹Ag in ambito medico è possibile coordinando il nuclide in questione con un chelante bifunzionale (BFC), coniugato con un linker a una molecola direzionante in grado di legarsi selettivamente al recettore target sovraespresso nelle cellule tumorali. Lo sviluppo di nuovi BFC per ¹¹¹Ag richiede molto lavoro in quanto l'argento (I) è noto come centro metallico altamente labile, quindi i processi di scambio possono verificarsi molto velocemente. Un piccola libreria di chelanti Cyclen derivati, idrosolubili e stabili in acqua sono stati sintetizzati nel nostro laboratorio e sono attualmente in fase di studio.



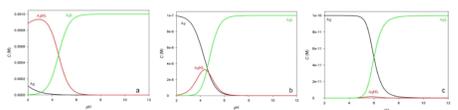
I chelanti sintetizzati sono stati sottoposti ai primi studi termodinamici per determinarne la stabilità in ambiente acquoso variando le condizioni sperimentali e per valutare la loro affinità verso lo ione Ag⁺ al variare del pH.

Complessi DOT3 – Ag(I) : risultati preliminari pH potenziometrici



Diagrammi di distribuzione dei complessi DOTETE-Ag(I) in soluzione acquosa di NaNO₃ 0,15 M a 25 °C
 1) [Ag]₀ = 10⁻¹⁰ M, [DOT3]₀ = 10⁻¹⁰ M (condizioni sperimentali)
 2) [Ag]₀ = 10⁻¹⁰ M, [DOT3]₀ = 10⁻¹⁰ M (condizioni di marcatura)
 3) [Ag]₀ = 10⁻¹⁰ M, [DOT3]₀ = 10⁻¹⁰ M (condizioni in sangue in seguito ad iniezione)

Complessi DOTETE – Ag(I) : risultati preliminari pH potenziometrici



Diagrammi di distribuzione dei complessi DOTETE-Ag(I) in soluzione acquosa di NaNO₃ 0,15 M a 25 °C
 1) [Ag]₀ = 10⁻¹⁰ M, [DOTETE]₀ = 10⁻¹⁰ M (condizioni sperimentali)
 2) [Ag]₀ = 10⁻¹⁰ M, [DOTETE]₀ = 10⁻¹⁰ M (condizioni di marcatura)
 3) [Ag]₀ = 10⁻¹⁰ M, [DOTETE]₀ = 10⁻¹⁰ M (condizioni in sangue in seguito ad iniezione)

Conclusioni

In questo studio abbiamo ottimizzato la produzione di argento mediante metodo ISOL intervenendo in particolare modo sul processo di ionizzazione e deposizione. Questo permetterà la produzione di ¹¹¹Ag in buone rese quando, presso i laboratori INFN-LNL, sarà possibile operare con fasci di ioni radioattivi. È stato anche valutato un processo di purificazione preliminare; ulteriori studi sono già in corso nei nostri laboratori per testare la selettività della resina verso l'argento, al fine di rendere possibile la purificazione dal cadmio. È stata sintetizzata una piccola libreria di chelanti per ¹¹¹Ag i quali sono attualmente in fase di studio. Sono stati sintetizzati due radioligandi per il targeting attivo di radioisotopi su cellule tumorali sovraesprimenti il CCK2R. È stato inoltre effettuata la radiomarcatura con ⁶⁸Ga di entrambi i ligandi e ne è stata valutata la stabilità in PBS e sangue a seguito della radiomarcatura. I radioligandi così ottenuti verranno impiegati per dei preliminari studi in vitro e successivamente in vivo mediante microPET.

Bibliografia

- [1] Borgna F., Ballan M., Corradetti S., Vettorato E., Monetti A., Rossignoli M., Manzolaro M., Scarpa D., Mazzi U., Realdon N., Andrighetto A., 2017, Appl. Radiat. Isot. 127, 214–226.
- [2] Vértes A., Nagy S., Klencsar Z., Lovas R.G., Rosch F., 2011, Handbook of Nuclear Chemistry, Second, Springer US, Boston, MA, 2011. doi:10.1007/978-1-4419-0720-2.
- [3] C. Wayua, P.S. Low, J. Nucl. Med. 56 (2015) 113–119.
- [4] S. Corradetti, L. Biasetto, M. Manzolaro, D. Scarpa, S. Carturan, A. Andrighetto, G. Prete, J. Vasquez, P. Zanonato, P. Colombo, C.U. Jost, D.W. Stracener, Eur. Phys. J. A. 49 (2013) 56. doi:10.1140/epja/i2013-13056-1.