

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA**  
Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate

Direttore Prof. Alberto Cuocolo

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMORFOLOGICHE  
E CHIRURGICHE  
(XXXV° CICLO)**

Coordinatore Prof. Alberto Cuocolo

*TESI DI DOTTORATO*

**“SINTESI AUTOMATIZZATA DEL NUOVO  
LIGANDO PER TSPO PET IMAGING  
[<sup>18</sup>F]FLUOROETILTEMAZEPAM E  
METODOLOGIA DI NANOINCAPSULAZIONE IN  
MATRICI LIPIDICHE”**

**Tutor**

Ch.mo Prof. Marco Salvatore  
Ch.ma Prof.ssa Silvana del Vecchio

**Dottorando**

Dott. Dario Fiorenza

Anno Accademico  
2021/2022

**UNIVERSITY OF NAPLES FEDERICO II**



**MEDICINE AND SURGERY SCHOOL**

Advanced Biomedical Sciences Department

Director Prof. Alberto Cuocolo

**Ph.D.**

**BIOMORPHOLOGICAL AND SURGICAL SCIENCES  
(XXXV<sup>TH</sup> CYCLE)**

Coordinator Prof. Alberto Cuocolo

*Ph.D. THESIS*

**“FULLY AUTOMATED SYNTHESIS OF NOVEL  
TSPO PET IMAGING LIGAND  
[<sup>18</sup>F]FLUOROETHYLTEMAZEPAM AND  
METHODOLOGY OF NANOINCAPSULATION IN  
LIPID MATRICES”**

**Tutor**

Ch.mo Prof. Marco Salvatore

Ch.ma Prof.ssa Silvana del Vecchio

**Ph.D. Candidate**

Dr. Dario Fiorenza

Academic Year

2021/2022



## INDICE

ABSTRACT.....	1
PREFAZIONE .....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 NEUROINFIAMMAZIONE .....	5
1.2 PROTEINA TRASLOCATRICE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE 18kDa (TSPO) .....	14
1.3 LIGANDI TSPO A NUCLEO BENZODIAZEPINICO: Ro5-4864 .....	21
1.4 VEICOLAZIONE DI RADIOTRACCANTI MEDIANTE NANOPARTICELLE INGEGNERIZZATE .....	27
1.5 RADIOFLUORURAZIONE NUCLEOFILA NEI MODULI DI SINTESI AUTOMATIZZATI.....	30
1.6 SCOPO DELLA TESI .....	40
2. MATERIALI E METODI.....	44
2.1 PRODOTTI CHIMICI E MATERIALI.....	44
2.2 SINTESI DI PRECURSORE E STANDARD.....	45
2.3 SINTESI E CONTROLLO QUALITÀ .....	49
2.4 RADIOCHIMICA.....	49
2.5 PROCEDURE DI PREPRODUZIONE.....	49
2.6 PRODUZIONE DEL [ <sup>18</sup> F]FLUORURO .....	50
2.7 PRODUZIONE DEL [ <sup>18</sup> F]F-FETEM .....	51
2.8 SPECIFICHE E TEST DI CONTROLLO QUALITÀ (QC) [ <sup>18</sup> F]F-FETEM	

2.9	PRODUZIONE E CONTROLLO QUALITÀ DEL FDG-18:1 CAPROYLAMINA PE.....	54
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	56
4.	CONCLUSIONI.....	78
5.	BIBLIOGRAFIA.....	80

## ABSTRACT

Benzodiazepines, including temazepam are described as TSPO antagonists. In fact, TSPO was initially described as a peripheral benzodiazepine receptor (PBR) with a secondary binding site for diazepam. TSPO is a potential imaging target of neuroinflammation because there is an amplification of the expression of this receptor.

Herein, we developed a novel fluorinated benzodiazepine ligand, [<sup>18</sup>F]Fluoroethyltemazepam ([<sup>18</sup>F]F-FETEM), for positron emission tomography (PET) imaging of translocator protein (18 kDa).

[<sup>18</sup>F]F-FETEM was radiolabelled with an automated synthesizer via a one-pot procedure. We conducted a [<sup>18</sup>F]F-aliphatic nucleophilic substitution of a tosylated precursor followed by purification on C18 and Alumina N SPE cartridges. Quality control tests was also carried out.

We obtained 2.0–3.0% decay-uncorrected radiochemical activity yield (3.7% decay-corrected) within the whole synthesis time about 33 min. The radiochemical purity of [<sup>18</sup>F]F-FETEM was over 90% by TLC analysis.

This automated procedure may be used as basis for future production of [<sup>18</sup>F]F-FETEM for preclinical PET imaging studies.

As regards the possible methodology of encapsulation of [<sup>18</sup>F]-fluoroethyltemazepam radioligand in nanocarriers, a strategy of functionalization of complex lipid derivatives of phosphoethanolamine, whose polar head containing the -NH<sub>2</sub> group can react with the FDG forming a Amadori product not complete, through a Maillard reaction. The

compound synthesized according to this reaction scheme, which constitutes the external skeleton of the self-assembling nanocarrier, is FDG-18: 1 Caproylamina PE.

## **PREFAZIONE**

Nel corso degli ultimi anni sono stati sintetizzati e riportati in letteratura numerosi radiotraccianti specifici per la proteina traslocatrice di membrana mitocondriale 18 kDa TSPO, sia radiomarcanti con Carbonio-11 sia marcati con Fluoro-18.

Il primo radiotracciante, utilizzato da più di 20 anni, è il N-sec-butyl-1-(2-chlorophenyl)-N-[<sup>11</sup>C]C-methyl-3-isoquinolinecarboxamide, conosciuto con l'acronimo [<sup>11</sup>C]C-PK11195, farmacologicamente un antagonista della TSPO, in soluzione racemica di cui l'enantiomero (R) è quello maggiormente attivo.

In letteratura negli ultimi anni sono stati studiati molteplici ligandi della TSPO con struttura benzodiazepinica, isochinolinica (primo tra tutti il composto [<sup>11</sup>C]C-PK11195), imidazopiridinica, indoloacetammidica, pirrolobenzossazepinica, fenossifenilbenzossazepinica, e fenossifenilacetammidica.

A partire da un'attenta analisi retrospettiva della letteratura, mediante l'impiego di un approccio "scaffold", è stata progettata una molecola modulatrice della TSPO a nucleo benzodiazepinico, [<sup>18</sup>F]Fluoroetiltemazepam ([<sup>18</sup>F]F-FETEM). Tale approccio, ci ha permesso di individuare un "backbone" o impalcatura capace di mantenere, nel corretto allineamento, i gruppi funzionali determinanti al fine dell'interazione con il nostro bersaglio biologico (TSPO).

Il presente lavoro di tesi nasce dall'esperienza effettuata presso l'Istituto IRCCS SDN di Napoli, Reparto di Medicina Nucleare – Servizio di Radiofarmacia, dove, tra le molteplici attività di ricerca, vi è la progettazione e sintesi di un ligando radiomarcato, con la possibilità di nanoincapsulazione di tali ligando in matrice lipidica per aumentarne la biodisponibilità nel sito diagnostico d'interesse.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 NEUROINFIAMMAZIONE

L'infiammazione è un processo fisiologico di difesa messo in atto dall'organismo in risposta a qualunque tipo di aggressione da parte di insulti lesivi (*noxa*). Il cervello è stato per lungo tempo considerato un "sito immunitario privilegiato" sia per il suo isolamento anatomofisiologico dalla periferia grazie alla barriera ematoencefalica (*Blood-Brain Barrier*) sia per l'assenza di un convenzionale drenaggio linfatico. Tuttavia, il cervello è in grado di mettere in atto una reazione di tipo infiammatoria e se necessario una risposta immunitaria. Diversi stimoli possono innescare la risposta infiammatoria nel Sistema Nervoso Centrale (CNS), la cosiddetta neuroinfiammazione. Questi stimoli includono i Patterns Molecolari Associati a Patogeni (PAMPs) ed i Patterns Molecolari Associati a Danni (DAMPs). DAMPs possono essere danni fisiologicamente o chimicamente indotti da danni cellulari, oppure da agenti endogeni come molecole endogene modificate. Questi danni PAMPs e DAMPs sono riconosciuti da recettori specifici chiamati *Pattern Recognition Receptors* (PPRs), che sono espressi dalle cellule immunocompetenti all'interno del parenchima cerebrale. Queste cellule sono principalmente le cellule microgliali e, in misura minore, astrociti e macrofagi, quest'ultime si trova nel plesso coroideo, nelle meningi e nello spazio perivascolare. Generalmente in

condizioni di omeostasi le cellule microgliali sono descritte come “cellule di sorveglianza” e gli astrociti come “cellule a riposo”.

Microglia e astrociti appartengono alla famiglia delle cellule gliali, a cui appartengono anche gli oligodendrociti. Al di là della loro funzione immunologica, la microglia presenta un ruolo cruciale sia nello sviluppo sia nel mantenimento dell'omeostasi del CNS. Gli astrociti, le più abbondanti cellule gliali, adempiono ad un'ampia gamma di funzioni necessarie al supporto trofico, al rifornimento energetico, alla protezione neuronale ed al mantenimento dell'integrità della BBB.

A seguito del riconoscimento di segnali di pericolo, le cellule immunocompetenti scatenano un segnale a cascata che portano all'attivazione di pathway che consentono la formazione della risposta infiammatoria. A seconda dell'intensità della risposta infiammatoria può avere luogo un processo di infiltrazione delle cellule immunitarie periferiche (linfociti, cellule dendritiche e monociti).

La risposta infiammatoria è un processo organizzato e dinamico il quale schematicamente si esplica in due passaggi:

1. La prima fase inizia con il riconoscimento dei segnali di pericolo da parte delle cellule microgliali, il cui intento è quello di eliminare gli elementi di attivazione. È caratterizzato dall'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità 2 (MHC II) e di molecole costimolatorie (Cluster of Differentiation CD80, CD86), ed infine attraverso la sintesi di citochine pro-infiammatorie (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, ecc...), chemochine (CCL2, CCL5, ecc...), ossido nitrico (NO) e specie reattive dell'ossigeno (ROS,

come gli anioni superossido). Tutti sono necessari per eradicare l'agente responsabile dell'aggressione all'organismo.

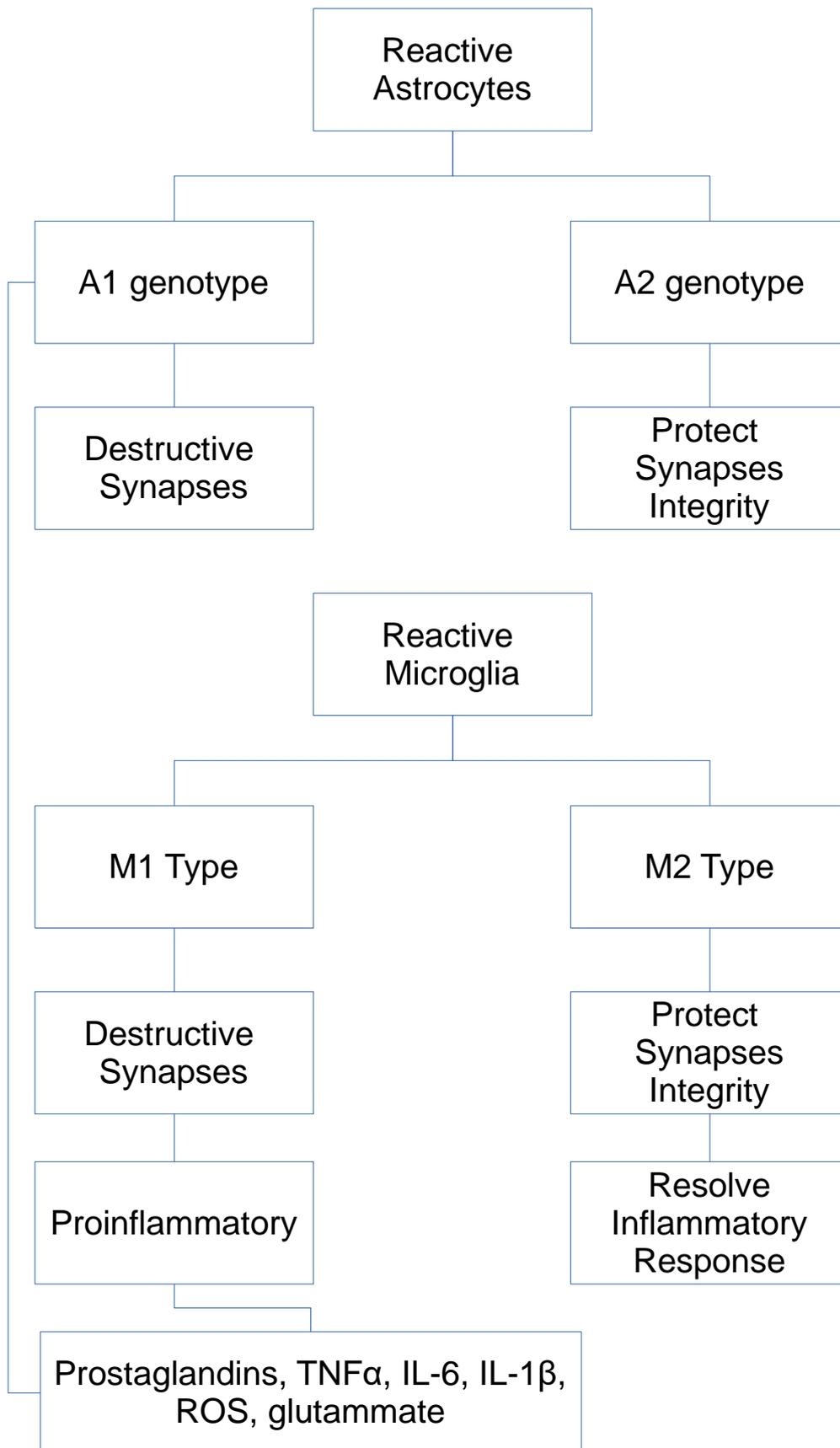
2. La seconda fase di risoluzione dell'infiammazione è caratterizzata dalla sintesi di molecole antinfiammatorie (come le citochine IL-10 ed il fattore di crescita trasformante beta TGF $\beta$ ), oltre che i fattori di riparazione tissutale. Questa fase porta all'arresto della fase acuta, la riparazione dei tessuti danneggiati ed il ritorno all'omeostasi. Una differenza sostanziale rispetto alla risposta infiammatoria sistemica è che questa fase di risoluzione mediata dalla microglia promuove anche la neuroprotezione e la neuroriparazione.

a. Da una parte la neuroprotezione è mediata attraverso la sintesi di fattori neurotrofici come il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF1), il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) ed il fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali (GDNF). La caratteristica più importante del GDNF è la sua capacità di supportare la sopravvivenza di neuroni dopaminergici e dei motoneuroni. Questa proteina può essere impiegata sia come trattamento della neuroinfiammazione sia come marker per imaging.

b. Dall'altra parte la neuro riparazione è mediata attraverso la stimolazione della neuro genesi da parte della microglia attraverso la plasticità dei circuiti neuronali.

Sino a quando il processo risulta essere coordinato, di breve durata e finemente regolato, la neuro infiammazione acuta è benefica. Tuttavia, in

caso di squilibrio, per esempio quando la persistenza dei fattori scatenanti oppure difetti nei meccanismi di risoluzione del processo di neuro infiammazione, la reazione neuro infiammatoria diviene cronica. In questo stadio la microglia e gli astrociti vanno incontro ad una modifica morfologica, funzionale e fenotipica, per cui vengono chiamati “microglia reattiva” ed “astrociti reattivi”. La conseguenza della cronicità è il rilascio prolungato di mediatori infiammatori ed ossidativi, con effetto devastante nel parenchima cerebrale e potenziale degenerazione dei neuroni, e la riduzione della produzione di fattori neurotrofici e neuroprotettivi. In tal modo la neuro infiammazione cronica è dannosa e porta al danno neuronale e lesioni irreversibili dei tessuti.



**Figura 1.** Fenotipi microgliali e astrocitici come possibili bersagli per imaging PET *in vivo* (Cavaliere et al., Front. Cell. Neurosci. 2020).

La letteratura scientifica ha recentemente riconosciuto che questa fase di neuroinfiammazione cronica è un componente centrale nella maggior parte delle malattie neurodegenerative, sia come causa eziologica sia come ruolo secondario. In qualunque dei casi, la neuro infiammazione partecipa attivamente ai danni cerebrali riversando nel parenchima cerebrale un arsenale di molecole infiammatorie ed ossidative che risultano tossiche per i neuroni. Per lungo tempo le malattie neurodegenerative sono state considerate come malattie neuronali autonome cellulari. Tuttavia, dati sperimentali, epidemiologici e genetici hanno chiaramente dimostrato che la neuroinfiammazione cronica contribuisce attivamente alla cascata di eventi che portano alla degenerazione neuronale. Per tale motivo la neuroinfiammazione è adesso riconosciuta come un promotore nell'eziologia e patogenesi delle malattie neurodegenerative come Alzheimer (AD), Parkinson (PD), Sclerosi laterale amiotrofica (ALS) e la malattia di Huntington (HD) (Chen et al., Hum. Mol. Genet. 2009).

Le malattie neurodegenerative colpiscono circa un bilione di persone nel mondo. Visto che la neuroinfiammazione gioca un ruolo dannoso in tutte le malattie del CNS, rappresenta anche un rilevante target terapeutico e diagnostico. Tuttavia, la presenza della BBB limita l'accesso ai target molecolari cerebrali. Infatti, circa il 98% delle molecole farmacologicamente attive nei confronti di target cerebrali non riesce a

passare la BBB, così come le nuove terapie biologiche come gli anticorpi monoclonali (mAb) e gli *small interfering* RNA (siRNA).

La malattia di Alzheimer è la maggiore malattia neurodegenerativa causa di demenza ed è caratterizzata da alterazione della memoria amnesica, problemi di linguaggio e cambi di comportamento a causa del declino cognitivo. Le caratteristiche neuropatologiche del AD includono l'accumulo di peptidi amieloidi  $\beta$  ( $A\beta$ ) con formazione di placche neuritiche e grovigli neurofibrillaridi (NFTs) depositi intraneuronali di proteine tau iperfosforilate/*misfolded*. Ciascuna di queste lesioni ha una caratteristica distribuzione durante l'evoluzione del AD ed ha una correlazione più o meno forte da un punto di vista clinicopatologico. Una propagazione transcellulare di queste proteine modificate (proteina tau e placche  $\beta$  amiloidi) avviene nel AD, in cui sembrerebbe che la iperfosforilazione tau sia promossa da un ambiente proinfiammatorio (ad esempio in presenza di interleuchina IL-6) e possa portare all'attivazione microgliale, evidenziando il circolo vizioso del processo di taupatie nel AD. Inoltre, a differenza dei grovigli neurofibrillari, i depositi di placche  $\beta$ amiloidi mostra un minore schema stereotipato spaziotemporale di progressione.

I Parkinsonismi sono generalmente età-correlati patologie neurodegenerative che principalmente colpiscono il sistema motorio. I sintomi includono la presenza di tremori, bradicinesia asimmetrica e rigidità muscolare. PD risultano dalla progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici, inizialmente nella substantia nigra, che causa un

parkinsonismo clinico quando la perdita di dopamina striatale raggiunge il 60%. Quindi i Parkinsonismi sono neuropatologicamente caratterizzati da una rarefazione neuronale nella *substantia nigra pars compacta* e la presenza di inclusioni di corpi di Lewy neuronali (o inclusioni citoplasmatiche gliali, a seconda se si formano all'interno dei neuroni o all'interno delle cellule della glia), che sono degli aggregati patologici insolubili di  $\alpha$ -sinucleina. Queste malattie sono conosciute come sinucleinopatie, dove il ruolo funzionale della proteina  $\alpha$ -sinucleina risulta ancora essere poco chiaro. Inoltre, studi hanno rivelato che è presente una overespressione della TSPO in diverse regioni cerebrali per cui l'attivazione microgliale non risulta essere confinata solo ai neuroni dopaminergici nigrostriatali, ad esempio a livello dell'area dell'ippocampo dovuta ad una risposta infiammatoria a seguito di una sinucleinopatia. In più TSPO PET imaging mostra che lo shift di attivazione microgliale avviene nelle fasi precoci di PD e può avvenire anche in assenza di demenza (Aiello et al., Neuroscience 2019).

La sclerosi multipla è una condizione cronica autoimmune caratterizzata dalla migrazione delle cellule-T mielino-reattive, con conseguente attivazione microgliale ed astrocitaria e reclutamento dei macrofagi circolanti periferici causando demielinizzazione e distruzione degli oligodendrociti all'interno del SNC. Studi hanno dimostrato che l'attivazione microgliale gioca un ruolo centrale nel supportare la condizione di neuroinfiammazione nella Sclerosi Multipla. Studi successivi suggeriscono che c'è una correlazione positiva tra il binding dei ligandi

della TSPO e la gravità della malattia e la durata, tuttavia i risultati non sono costanti.

La Sclerosi Laterale Amiotrofica è una rara malattia neurodegenerativa che esordisce in età adulta in cui i motoneuroni superiori e inferiori degenerano portando ad una progressiva paralisi muscolare con problemi respiratori con prognosi fatale, tipicamente 2-4 anni dall'insorgenza. Anche in questo caso studi hanno dimostrato che l'attivazione microgliale gioca un ruolo centrale nel supportare la condizione di neuroinfiammazione centrale.

La malattia di Huntington è disturbo neurodegenerativo che consiste in una ripetizione da trinucleotide (CAG) ereditario autosomico dominante in cui l'età di insorgenza è inversamente correlato con la dimensione dell'espansione di ripetizione di trinucleotide. Questa alterazione genica nell'esone 1 del gene codificante la proteina Huntingtina (HTT) porta al mutante HTT (mHTT) che è espressa dai monociti periferici nei pazienti HD e che induce perdita di funzione (ad esempio regolazione intracellulare dei trasporti) ed acquista funzioni tossiche (ad esempio promozione delle citochine proinfiammatorie). La malattia di Huntington è caratterizzata neuropatologicamente dalla formazione di inclusioni intracellulari di mHTT che porta atrofia a livello striatale, corticale ed ipotalamica, associata ad accumulo di reattività microgliale nelle stesse aree. In linea con questi riscontri, in vivo PET imaging della microglia mostra una overespressione della proteina TSPO nello striato, nelle regioni corticali e nell'ipotalamo. I sintomi di tale neuropatologia sono: problemi motori, declino cognitivo, disordini psichiatrici.

## **1.2 PROTEINA TRASLOCATRICE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE 18kDa (TSPO)**

La proteina traslocatrice TSPO è una proteina 18 kDa con 5 domini fortemente idrofobici di transmembrana, riscontrata principalmente sulla membrana mitocondriale esterna (Papadopoulos et al., Trends Pharmacol. Sci. 2006). Interagisce con StAR (proteina regolatrice steroidogenica acuta) per il trasporto del colesterolo nei mitocondri (Papadopoulos et al., J. Neuroendocr. 2018). È stata descritta inizialmente come recettore periferico delle benzodiazepine (PBR), presenta un sito di legame secondario per il diazepam, tuttavia successive ricerche hanno riscontrato che tale recettore è espresso in tutto il corpo e nel cervello. Negli esseri umani, la proteina traslocatore è codificata dal gene TSPO ed appartiene alla famiglia di proteine sensori ricche di triptofano (Morohaku et al., Endocrinology 2014).

La ragione per cui la proteina TSPO è riconosciuto come potenziale target di imaging dei gliomi è basata su due caratteristiche. La prima è che il TSPO rappresenta un componente del poro (MPT) di transizione della permeabilità mitocondriale. Difatti, una serie di ligandi alla proteina TSPO, modulando l'apertura del poro-MPT, mostrano attività antiproliferativa e proapoptotica in varie cellule tumorali (Hirsch et al., Exp. Cell Res. 1998). In secondo luogo, l'espressione del gene TSPO è aumentata in molti tumori e linee cellulari di cancro rispetto alle cellule non trasformate (Lee et al., J. Cell Physiol. 2004). Inoltre, nello stato di attivazione, la microglia

amplifica l'espressione del recettore benzodiazepinico TSPO sulla loro membrana esterna (Kim et al., Expert Opin. Ther. Pat. 2016).

Negli ultimi anni sono stati sintetizzati e riportati in letteratura numerosi ligandi (e radioligandi), sia marcati con carbonio-11 sia marcati con fluoro-18, per TSPO (Werry et al., Int. J. Mol. Sci. 2018):

- 2-fenilindolilgliosilammidi;
- Carbossammidi di chinazolina;
- arilossianilidi;
- Derivati del benzossazolone e del benzimidazolone;
- Derivati di imidazopiridina, pirrolochinolina, pirazolochinolina e pirazolopirimidina.

Gli antagonisti della TSPO, inclusa la benzodiazepine temazepam, hanno mostrato una significativa proprietà antagonista basata su saggi di proliferazione cellulare (Lindemann et al., Plant Cell Physiol. 2004). Sebbene le benzodiazepine, come il temazepam, siano molecole ben note in letteratura e utilizzate da decenni nella pratica clinica, l'applicazione clinica come antagonisti della TSPO è ancora in una fase iniziale (in vitro) (Fafalios et al., Clin. Cancer Res. 2009).

Il primo radiotracciante, utilizzato da più di 20 anni, è il N-sec-butyl-1-(2-chlorophenyl)-N-[<sup>11</sup>C]C-methyl-3-isoquinolinecarboxamide, conosciuto con l'acronimo [<sup>11</sup>C]C-PK11195, farmacologicamente un antagonista della TSPO, in soluzione racemica di cui l'enantiomero (R) è quello maggiormente attivo (Schweitzer et al., Drug Discov. Today 2010).

L'isochinolina PK11195 è stata originariamente descritta come un composto che parzialmente spiazzava alcune benzodiazepine come il diazepam. Infatti, tale composto presenta affinità recettoriale per i recettori periferici delle benzodiazepine. Inoltre, è possibile riscontrare il PK11195 in frazioni mitocondriali di estratti cerebrali e negli eritrociti mitocondri-free.

L'utilizzo clinico per imaging PET di questo radio tracciante è basato su tre osservazioni: in pazienti sani è mostrato solo un minimo binding del PK11195; in patologie del sistema nervoso centrale, in condizioni neuroinfiammatorie, il binding si riscontra particolarmente nella microglia attivata; la marcatura con il carbonio-11 ne consente l'utilizzo PET (Jiang et al., J. Nucl. Med. 2020).

Nel corso degli anni sono stati sviluppati, con studi preclinici e clinici, anche altri radio traccianti, alcuni dei quali utilizzano come radioisotopo il fluoro-18 che presenta, rispetto al carbonio-11, il vantaggio di avere un tempo di emivita più lungo (109 minuti rispetto ai 20 minuti del carbonio-11, secondo il database del National Nuclear Data Center (NNDC) Brookhaven National Laboratory, Upton NY, USA).

Il  $[(^{18}\text{F})(\text{S})\text{-N,N-diethyl-9-(2-fluoroethyl)-5-methoxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-4-carboxamide}]$ , noto con l'acronimo  $[(^{18}\text{F})\text{F-GE180}]$ , presenta una selettività di legame ed un'alta affinità per la TSPO, per tale motivo risulta essere un promettente radioligando per la diagnosi di condizioni neuro infiammatorie (Wickstrøm et al., J. Label. Compd. Radiopharm. 2014).

Il radioligando [ $^{18}\text{F}$ ]F-DPA-714 [N,N-diethyl-2-(2-(4-(2- $^{18}\text{F}$ )fluoroethoxy)phenyl)-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)acetamide] presenta anch'esso una selettività di legame ed un'alta affinità per la TSPO e ne è stata testata l'applicabilità per l'imaging PET in lesioni neuro infiammatorie del midollo spinale in modelli murini di sclerosi multipla, dove l'attivazione microglia/macrofagi gioca un ruolo centrale nel processo infiammatorio (Keller et al., Mol. Imaging Biol. 2017).

Altro radioligando PET marcato con fluoro-18 specifico per la TSPO è il N-(2,5-Dimethoxybenzyl)-2- $^{18}\text{F}$ -Fluoro-A-(2-Phenoxyphenyl)Acetamide, noto con l'acronimo [ $^{18}\text{F}$ ]F-PBR06 (Wanga et al., Steroids 2011). Tale radiotracciante presenta elevata affinità e specificità per la TSPO in numerose specie ed è stato utilizzato in studi sull'uomo per la quantificazione della proteina TSPO a livello cerebrale. Tuttavia vi sono delle restrizioni nell'utilizzo di tale radiotracciante in quanto vi è un lento accumulo di radiometaboliti del [ $^{18}\text{F}$ ]F-PBR06 con conseguente poca accuratezza nella quantificazione della proteina TSPO. Analogo discorso vige per la molecola omologa marcata con Carbonio-11, il N-(2- $^{11}\text{C}$ )metossibenzil)-N-(4-fenossipiridin-3-il)acetammide, noto con l'acronimo [ $^{11}\text{C}$ ]C-PBR28 (Solingapuram Sai et al., Sci. Pharm. 2015).

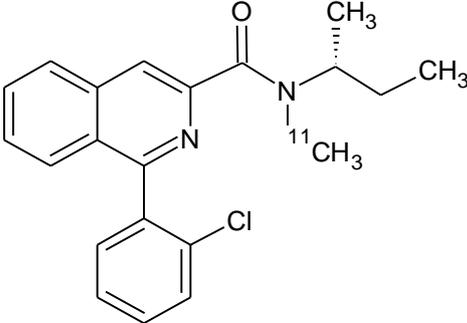
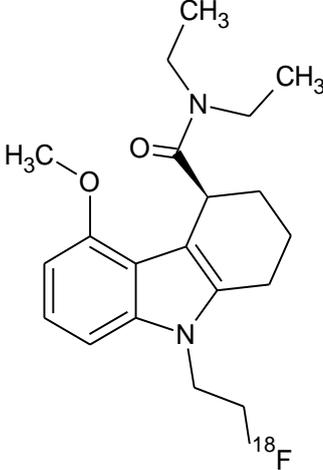
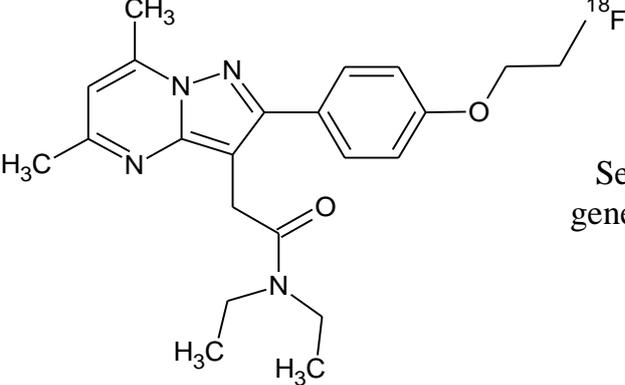
La fenossifenilacetammide [ $^{18}\text{F}$ ]F-FEPPA (N-acetil-N-(2- $^{18}\text{F}$ )fluoroetossibenzil)-2-fenossi-5-piridinamina) mostra proprietà eccezionali per quanto riguarda affinità alla TSPO, stabilità, lipofilia e facilità di radiosintesi (Vignal et al., Molecules 2018).

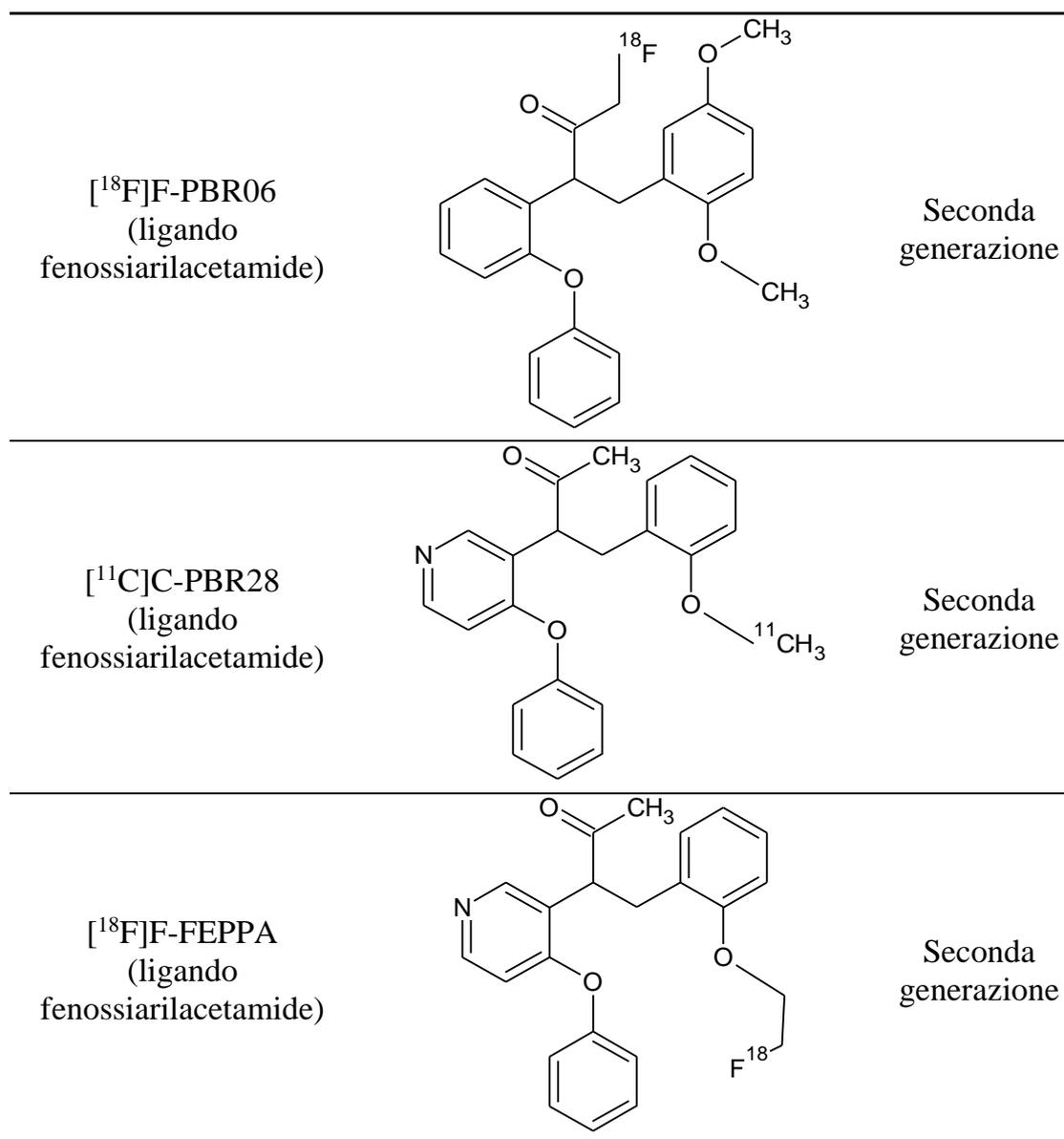
Il [<sup>18</sup>F]F-FEPPA è già stato utilizzato in diversi contesti preclinici e clinici, tuttavia è stato riportato solo l'effetto in vivo del polimorfismo. Sino a questo momento, sono stati eseguiti alcuni studi relativi al profilo di affinità di legame in vitro per quanto riguarda il polimorfismo rs6971, in termini di costante inibitoria ( $K_i$ ) verso la proteina TSPO umana.

I problemi principali dei traccianti attualmente sviluppati e riportati in letteratura per la proteina TSPO: scarsa distinzione tra le risposte pro- e antinfiammatorie, rapporto segnale-rumore basso a causa di un elevato binding non specifico, bassa variazione di risposta dinamica nel corso di patologie neurodegenerative, polimorfismi della proteina TSPO. Tali problematiche risultano essere state ridotte e/o eliminate con i radiotraccianti di seconda e terza generazione, tuttavia resta la non possibile differenziazione tra i genotipi M1 (neurotossico) e M2 (neuroprotettivo). Inoltre, anche se la struttura 3D pentamerica della proteina TSPO è stata rivelata, non risulta essere ancora chiaro il ruolo di tale recettore, in quanto non risulta chiara l'influenza della upregolazione del recettore come reazione immunitaria. Nuovi studi hanno mostrato che i radiotraccianti per la proteina TSPO (soprattutto quelli di prima e seconda generazione) mostrano tre modelli di affinità di legame derivati dal polimorfismo rs6971: leganti con alta affinità (HABs), leganti con affinità mista (MABs) e leganti con bassa affinità (LABs) (Fan et al., J. Nucl. Med. 2015). Il segnale PET fornito nei pazienti MAB e LAB porta ad una sottostima significativa dell'espressione del gene TSPO. Sembra tuttavia che i radioligandi di terza generazione TSPO siano non sensibili al polimorfismo rs6971, come

appunto il tracciante [ $^{18}\text{F}$ ]F-GE180, inoltre sembrerebbe che il rapporto lesione/background sia più alto degli altri traccianti TSPO. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato che lo stesso tracciante di terza generazione [ $^{18}\text{F}$ ]F-GE180 presenta delle scarse caratteristiche di imaging: l'assorbimento del cervello è veramente basso, le curve tempo-attività tissutale sono quasi piatte, il modello cinetico è difficile a causa del rumore e della presenza di un elevato assorbimento nei vasi sanguigni (circa il 20% dell'attività nelle regioni cerebrali deriva dal sangue) ed i parametri di outcome sono stati scarsamente identificati (Alam et al., Nucl. Med. Mol. Imaging 2018). Infatti, il volume di distribuzione (VT) del [ $^{18}\text{F}$ ]F-GE180 è circa 20 volte più basso del [ $^{11}\text{C}$ ]C-PBR28, nonostante la più grande concentrazione del [ $^{18}\text{F}$ ]F-GE180 nel plasma a causa del suo metabolismo più lento. Inoltre la più alta attività descritta in caso di lesioni cerebrali sembrerebbe essere dovuta dalle discontinuità nella barriera ematoencefalica (ad esempio come a seguito di trattamenti radioterapici nei pazienti affetti da glioma), con conseguente penetrazione dell'attività vasale, con accumulo aspecifico di [ $^{18}\text{F}$ ]F-GE180 e dei suoi radiometaboliti (Zanotti-Fregonara et al., Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2020).

**Tabella 1.** Radiotraccianti PET TSPO comunemente descritti in letteratura.

PET Tracer	Struttura Chimica	Generazione ligandi TSPO
$[^{11}\text{C}]\text{C-}^{\text{PK11195}}$ (ligando isochinolin carbossamide)		Prima generazione
$[^{18}\text{F}]\text{F-}^{\text{GE180}}$ (ligando tetraidrocarbazolo)		Terza generazione
$[^{18}\text{F}]\text{F-}^{\text{DPA-714}}$ (ligando pirazolpirimidina)		Seconda generazione



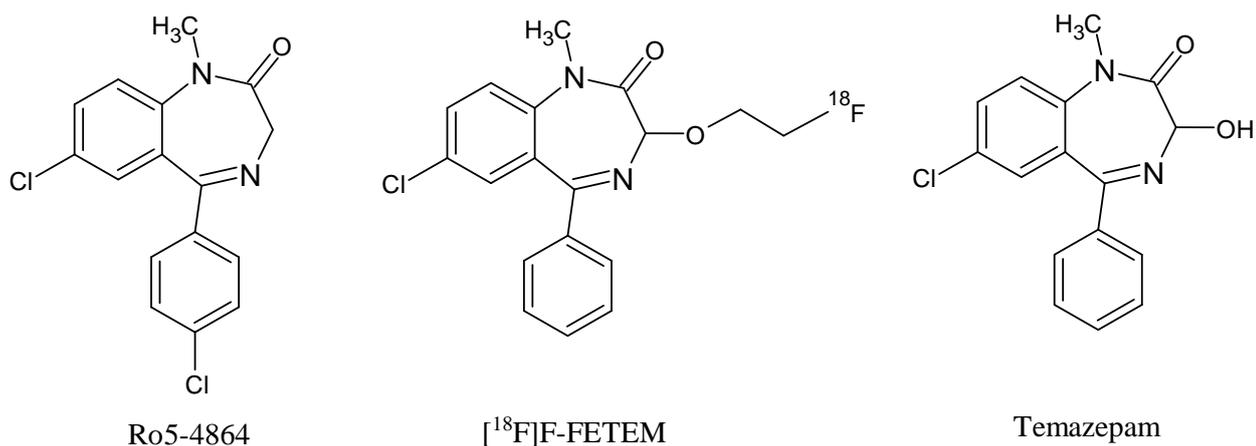
### 1.3 LIGANDI TSPO A NUCLEO BENZODIAZEPINICO: Ro5-4864

Ro5-4864 (4'-clorodiazepam, 7-cloro-5-(4-clorofenil)-1,3-diidro-1-metil-2H-1,4-benzodiazepin-2-one) è un farmaco derivato benzodiazepinico del diazepam che, a differenza della maggior parte dei derivati delle benzodiazepine, manca di affinità per i recettori GABA<sub>A</sub> e manca dei tipici effetti delle benzodiazepine (Marangos et al., Molecular Pharmacology July

1982). Ro5-4864 è risultato essere un potente ligando per il recettore periferico delle benzodiazepine, successivamente rinominato proteina traslocatrice di membrana mitocondriale 18kDa (TSPO). Nonostante i suoi effetti convulsivi, a dosi più basse Ro5-4864 si è dimostrato neuroprotettivo ed è diventato ampiamente utilizzato per la ricerca sul ruolo della proteina TSPO nei processi legati alla neuroinfiammazione/neurotossicità. Studi in vitro e modelli murini suggeriscono anche la possibilità di effetti analgesici, antidepressivi, cardioprotettivi, ed antitumorali.

Ro5-4864, differendo dal diazepam solo per un sostituito p-cloro, è quasi inattivo nello spiazzare il [<sup>3</sup>H]-diazepam dai siti di legame ad alta affinità a livello cerebrale, tuttavia risulta essere estremamente potente nello spiazzare il [<sup>3</sup>H]-diazepam dai siti di tipo periferico. Al contrario, il clonazepam, il più potente inibitore del legame a livello cerebrale, è un inibitore estremamente debole del legame ai siti di tipo periferico. Oltre ad essere un ligando per i siti di tipo periferico, Ro5-4864 spiazza il [<sup>3</sup>H]-diazepam dal sito micromolare del SNC e, come le altre benzodiazepine, inibisce la fosforilazione della proteina di membrana stimolata con Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (DeLorenzo et al., American Association for the Advancement of Science, 1981).

Ro5-4864 è quindi un ligando selettivo per i siti di legame delle benzodiazepine periferici e micromolari, ma la rilevanza di questi siti è attualmente in gran parte sconosciuta.



**Figura 2.** Strutture a confronto: Ro5-4864, [<sup>18</sup>F]F-FETEM, Temazepam.

Prove crescenti hanno stabilito il coinvolgimento della proteina traslocatrice 18-kDa (TSPO) nel processo di permeabilizzazione della membrana mitocondriale e successiva apoptosi attraverso la modulazione del poro di transizione della permeabilità mitocondriale. Studi recenti hanno dimostrato che il trattamento con Ro5-4864 ha provocato un effetto neuroprotettivo su lesione cerebrale traumatica. Tuttavia, la natura di questo effetto è rimasta incerta poiché si ritiene che i neuroni maturi siano privi della proteina TSPO. Al fine di studiare il meccanismo della neuroprotezione mediata da Ro5-4864, la risposta neuro-infiammatoria e neurosteroidica al danno corticale è stata testata in ratti trattati con ciclosporina A e Ro5-4864 operati da veicoli simulati. I livelli di interleuchina 1 $\beta$  e fattore di necrosi tumorale (TNF)  $\alpha$ , nonché la densità cellulare di astrociti e microglia nell'area lesa sono stati tutti ridotti dalla ciclosporina A. Al contrario, non è stato possibile osservare alcun effetto visibile negli animali trattati con Ro5-4864. Nessuno dei gruppi ha mostrato differenze significative rispetto agli

altri per quanto riguarda l'espressione del fattore neurotrofico derivato dal cervello (Palzur et al., Neuroscience 2016). Tecniche di immunofluorescenza hanno confermato l'assenza della proteina TSPO nei neuroni nativi sebbene abbia mostrato una chiara evidenza di co-localizzazione della proteina TSPO nel citoplasma dei neuroni danneggiati. Complessivamente, la protezione neuronale mediata da Ro5-4864 nella lesione cerebrale non può essere attribuita esclusivamente a un effetto indiretto del ligando sulla TSPO gliale, bensì può anche rappresentare la conseguenza della modulazione della TSPO sovraregolato nei neuroni danneggiati. Questa osservazione può essere importante per la futura ricerca farmacologica nel neurotrauma.

Anche il danno cerebrale dopo emorragia subaracnoidea (SAH) è strettamente correlato alla neuroinfiammazione indotta da microglia/macrofagi. La proteina traslocatrice TSPO rappresenta essere un marker di microglia/macrofagi attivati e i ligandi TSPO si sono rivelati utili per controllare la neuroinfiammazione. Ro5-4864 è in grado di regolare l'infiammazione nelle malattie neurologiche, ragion per cui sono stati studiati gli effetti di tale derivato benzodiazepinico sulla polarizzazione microglia/macrofagi in un modello di topo SAH, che è stato indotto dalla perforazione endovascolare (Zhou et al., Neuroscience letters 2020). I risultati hanno mostrato che il danno cerebrale risulta essere accompagnato dall'accumulo di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , nonché dall'aumento dei livelli di proteina iNOS. Infine, è stato dimostrato che Ro5-4864 migliora la funzione neurologica, aumentando l'espressione di fattori anti-infiammatori e

influenzando i fenotipi di microglia/macrofagi M2 dopo SAH. Insieme, questi dati rivelano un ruolo protettivo del ligando TSPO Ro5-4864 nei processi infiammatori della SAH, nonché una potenziale alternativa per il trattamento della SAH.

La proteina traslocatrice svolge un ruolo fondamentale anche nel dolore neuropatico e nei possibili meccanismi nel midollo spinale. Tuttavia, il suo meccanismo nel sistema nervoso periferico è poco conosciuto.

Quando il nervo periferico risulta danneggiato, si verifica una risposta complessa, inclusa l'assonopatia e la demielinizzazione. La demielinizzazione è coinvolta nella patogenesi dell'ipersensibilità al dolore meccanico. La demielinizzazione induce l'espressione anomala e il traffico dei canali  $\text{Na}^+$  con conseguente aumento dell'eccitabilità cellulare. A seguito di una lesione nervosa, l'espressione della proteina TSPO risulta essere aumentata e torna ad un livello normale al termine della rigenerazione, suggerendo così un ruolo della proteina TSPO anche nella rigenerazione dei nervi. La somministrazione del ligando Ro5-4864 ha accelerato la rigenerazione dei nervi periferici, pertanto, sono stati condotti studi sugli effetti di tale agonista della proteina TSPO sulla morfologia del nervo sciatico dopo la lesione del nervo risparmiato (SNI).

La proteina zero della mielina (P0) è un componente proteico importante delle proteine mieliniche dei nervi periferici, che rappresenta tra il 50% e il 70% della proteina totale. P0 è una glicoproteina di membrana integrale di 28 kDa, che sembra essere espressa dalle cellule di Schwann mielinizzanti, ma non risulta essere espressa né dalle cellule di Schwann non mielinizzanti

né dalle cellule della glia centrale. La proteina mielinica periferica 22 (PMP22) è una glicoproteina più piccola di 22 kDa che è stata prima purificata e caratterizzata dalla mielina del nervo periferico bovino. Rappresenta il 2-5% delle proteine totali. Pertanto, gli studio hanno dimostrato sia l'effetto antinocicettivo dell'agonista TSPO Ro5-4864 in modello SNI di ratto, sia l'effetto dell'agonista TSPO sulla rigenerazione della mielina nel nervo sciatico lesio.

In letteratura sono riportati studi per determinare la distribuzione della proteina traslocatrice nel ganglio della radice dorsale e i possibili meccanismi nel sistema nervoso periferico (Ma et al., Molecular pain 2018). I risultati hanno mostrato l'attivazione della proteina traslocatrice TSPO nel ganglio della radice dorsale a seguito di lesione. I segnali della proteina traslocatore sono stati principalmente colocalizzati con i neuroni nel ganglio della radice dorsale. Una singola iniezione intratecale di agonista proteico traslocatore Ro5-4864 ha esercitato un notevole effetto analgesico. Inoltre, Ro5-4864 ha anche inibito l'attivazione della chinasi fosfo-extracellulare regolata dal segnale 1 (p-ERK1), p-ERK2 e del fattore neurotrofico derivato dal cervello nel ganglio della radice dorsale. Nel frattempo, la somministrazione intratecale di 2 µg di Ro5-4864 ha ulteriormente accelerato l'espressione della proteina mielinica zero (P0) e della proteina mielinica periferica 22 (PMP22). I risultati hanno suggerito quindi che l'agonista TSPO Ro5-4864 presenta un effetto antinocicettivo per cui potrebbe alleviare il dolore neuropatico e attenuare p-ERK e l'attivazione del fattore neurotrofico derivato dal cervello nel ganglio della

radice dorsale. Inoltre, Ro5-4864 stimola l'espressione delle proteine di rigenerazione della mielina (effetto rimielinizzante) che possono anche rappresentare un fattore importante nei confronti dello sviluppo del dolore neuropatico. La proteina traslocatrice può quindi considerarsi un nuovo bersaglio per il trattamento del dolore neuropatico sia nel sistema nervoso centrale che periferico.

#### **1.4 VEICOLAZIONE DI RADIOTRACCIANTI MEDIANTE NANOPARTICELLE INGEGNERIZZATE**

Nel contesto della veicolazione di radiotraccianti (ma più in generale di molecole farmacologicamente attive che presentano target molecolari a livello cerebrale), le nano particelle ingegnerizzate (ENPs) grazie alle loro proprietà fisico-chimiche, la loro alta stabilità chimica, la capacità di incapsulare un'ampia gamma di farmaci idrofilici ed idrofobici, oltre che l'elevato livello di funzionalizzazione, rappresentano una delle più promettenti strategie per eludere la BBB e raggiungere così il CNS (Forte, Fiorenza et al., Journal of clinical medicine 2020).

Una delle strategie non invasive per la progettazione di ENPs è quella di utilizzare i meccanismi di trasporto endogeni attraverso la BBB delle molecole necessarie a livello cerebrale, attraverso i seguenti pathways:

1. I trasporti mediati da carrier (CMT) che sono utilizzati per portare nutrienti o sostanze endogene a livello cerebrale. Un esempio tra tutti il trasportatore del glucosio 1 (GLUT-1) per l'uptake del glucosio, oppure i carrier specifici per l'uptake degli amminoacidi essenziali;

2. La transitosi mediata dall'assorbimento (AMT) che include le interazioni elettrostatiche tra i composti cationici e le cariche negative della membrana delle cellule endoteliali promuovendo la formazione di vescicole di endocitosi;
3. La transctosi mediata da recettori (RMT) che si basa sull'espressione di recettori a livello della membrana plasmatica luminale delle cellule endoteliali: recettori della transferrina (TfR), recettori delle proteine 1 e 2 delle LDL (LRP-1 e 2), recettori dell'insulina e recettori dei folati. Questo pathway consente l'ingresso all'interno del CNS di macromolecole endogene.

Un'altra strategia non invasiva consiste nella somministrazione intranasale per bypassare la BBB, grazie alla presenza delle innervazioni del trigemino e dell'olfattivo. Tuttavia ci sono delle restrizioni all'utilizzo di tale via di somministrazione, in particolare la clearance mucociliare, il basso rate di assorbimento dei farmaci (che dipende dalle caratteristiche chimico fisiche della molecola) e l'effetto di primo passaggio dovuto alla degradazione enzimatica (citocromo P450, proteasi).

Nell'ambito dei processi coinvolti nella neuroinfiammazione, sono state dimostrate in letteratura una serie di ENPs coniugate per consentire il passaggio di molecole a basso ed alto peso molecolare:

1. ENPs latteoferrina-coniugate polietilenglicole-polilattide-poliglicolide, in quanto da una parte il PEG aumenta la circolazione ematica e la latteoferrina è un ligando che promuove il trasporto mediato da recettori. Tale ENPs è stata utilizzata per incapsulare molecole

farmacologicamente attive neuroprotettive come la urocortina, così come per trattamenti genici nel caso del fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali (GDNF);

2. Il PLGA o acido poli(lattico-co-glicolico) è un copolimero che viene utilizzato in molti dispositivi terapeutici approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA), grazie alla sua biodegradabilità e biocompatibilità. Tali ENPs sono stati utilizzati per incapsulare la curcumina, una promettente molecola estratta dalla *Curcuma longa* con proprietà antiinfiammatorie ed antiossidanti per il trattamento di patologie neurodegenerative. Il vantaggio in incapsulare tale molecola risiede nel fatto che presenta una bassa permeabilità a livello della BBB;
3. Le nanoparticelle lipidiche (LNs) sono minuscoli vettori colloidali composti da una matrice lipidica biodegradabile che presentano vantaggi rispetto ad altri vettori colloidali per il targeting del cervello. Pertanto, è importante eseguire una valutazione biocinetica in vivo del comportamento biologico e della tossicità cerebrale dei LN, poiché la mancanza di conoscenza su come queste particelle influenzano i normali processi cellulari all'interno del cervello ne ha limitato l'uso. Come già indicato, le cellule microgliali sono le sentinelle immunitarie primarie del cervello e rispondono rapidamente ai fattori di rischio del cervello e agli eventi rigorosamente controllati. L'esposizione di nanoparticelle di ossido ferrico innesca l'attivazione, il reclutamento e la fagocitosi della microglia. L'attivazione della microglia può fungere da allarme e da sistema di difesa quando i nanomateriali esogeni invadono, si aggregano

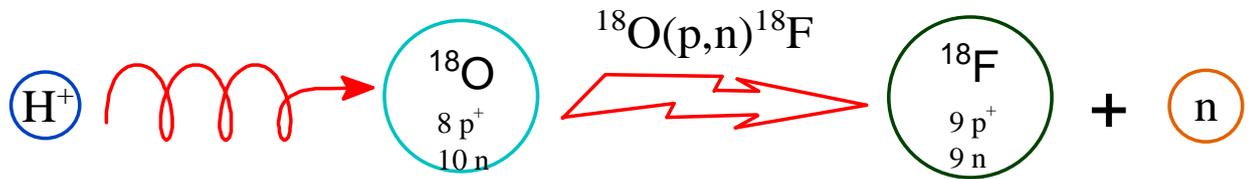
e si depositano nel cervello. Tuttavia, la domanda su come la microglia susciti risposte neuroinfiammatorie durante il danno neurotossico mediato da nanoparticelle è un problema di ricerca attualmente inesplorato. Tutte le attuali formulazioni LNP approvate dalla FDA contengono quattro lipidi: un lipide cationico ionizzabile, lipidi ausiliari che includono 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), colesterolo ed un coniugato di polietilenglicole (PEG)-lipide. Questi costituenti facilitano la formazione di nanoparticelle monodisperse, migliorano la stabilità delle nanoparticelle, consentono l'incapsulamento efficiente della molecola organica da veicolare e favoriscono l'assorbimento cellulare.

### **1.5 RADIOFLUORURAZIONE NUCLEOFILA NEI MODULI DI SINTESI AUTOMATIZZATI**

Come già precedentemente indicato, il radioisotopo Fluoro-18 presenta, rispetto al carbonio-11, il vantaggio di avere un tempo di emivita più lungo (109 minuti rispetto ai 20 minuti del carbonio-11, secondo il database del National Nuclear Data Center (NNDC) Brookhaven National Laboratory, Upton NY, USA).

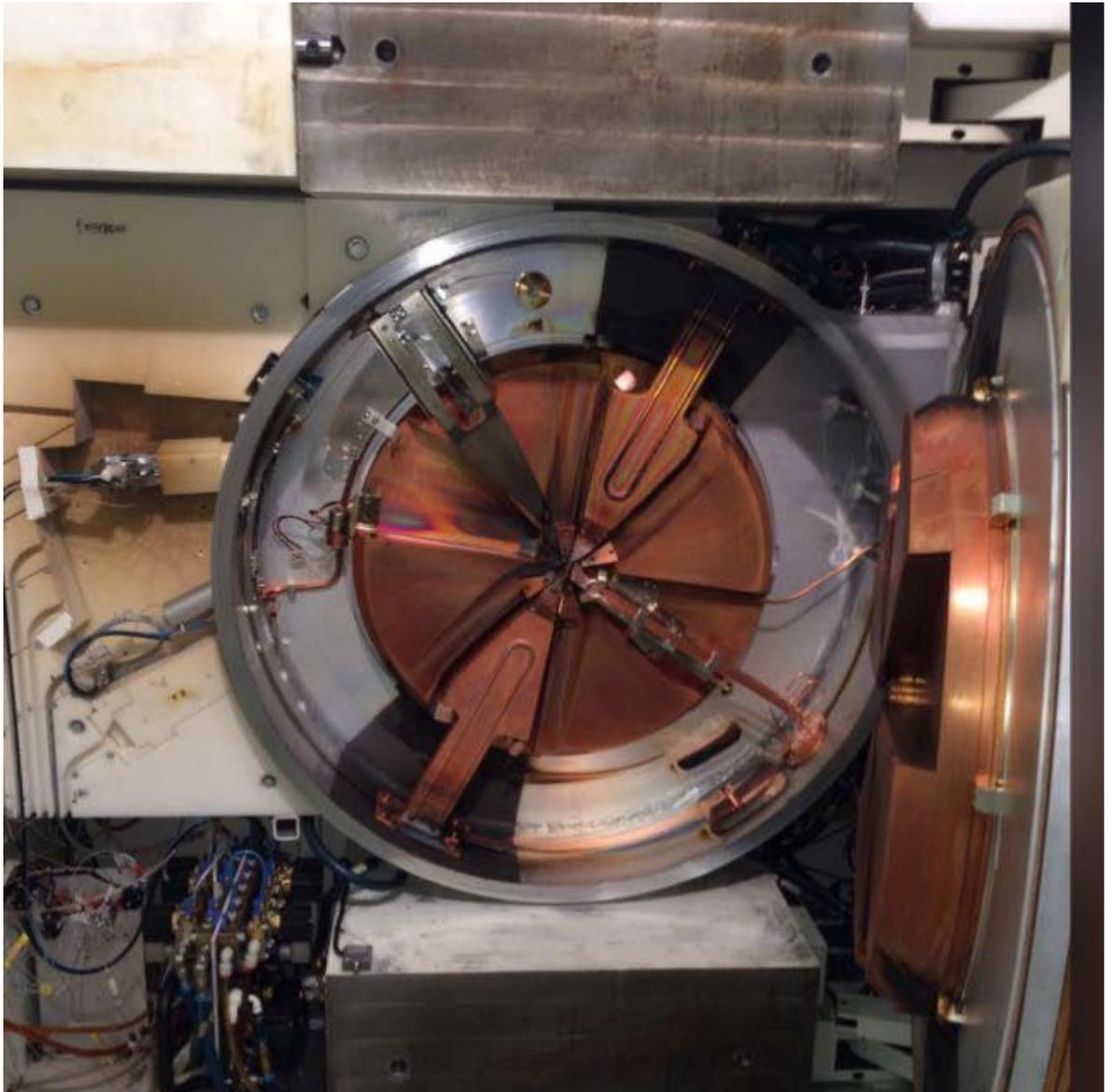
Oltre 300 GBq per lotto di radionuclide possono essere facilmente prodotti in un ciclotrone di energia medio-bassa tramite la reazione nucleare  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$  che si verifica durante l'irradiazione di protoni di acqua arricchita con isotopo  $^{18}\text{O}$  in un target (generalmente in argento oppure di

nuova generazione al niobio) ad alta pressione di gas inerte (generalmente elio).



**Figura 3.** Reazione nucleare produzione Fluoro-18 da acqua arricchita  $^{18}\text{O}$ .

L'emivita di 109 minuti (2 ore circa) consente approcci sintetici complessi, fornendo accesso a un'ampia varietà di radiofarmaci marcati con Fluoro-18 e consente anche la spedizione di flaconi multidose da un sito di produzione agli ospedali/centri diagnostici senza accesso diretto ad un ciclotrone e strutture di radiochimica/radiofarmacia annesse ai reparti di medicina nucleare.

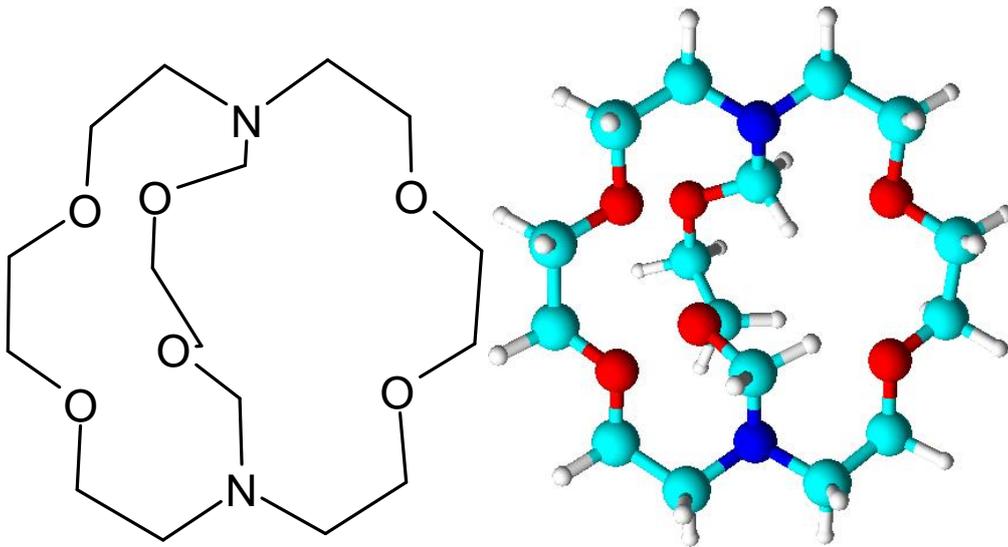


**Figura 4.** Ciclotrone MiniTrace GE.

Il fluoruro  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  è attualmente la fonte più pratica e generalmente disponibile di questo radionuclide e, in questa forma, viene utilizzato nella stragrande maggioranza delle procedure di radiomarcatura con Fluoro-18. La sostituzione nucleofila di un gruppo uscente appropriato in una molecola precursore con fluoruro  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  è il metodo più importante per la produzione di una varietà di radiotraccianti clinicamente rilevanti.  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  viene generato in un bersaglio contenente acqua arricchita poiché l'anione

fortemente idratato è generalmente non reattivo negli scenari di sostituzione nucleofila. Pertanto, fasi di pre-sintesi sono necessarie per isolare  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  dall'ambiente acquoso e trasformarlo in una specie nucleofila reattiva.

I primi lavori sulle fluorurazioni nucleofile Fluoro-18 includevano la rimozione dell'acqua target sfusa (volumi pari a circa 2-4 mL) mediante la sola fase di distillazione in presenza di  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , aggiunta per prevenire la formazione di  $[^{18}\text{F}]\text{HF}$  gassoso. Il proseguimento con la distillazione azeotropica con acetonitrile ha consentito la completa rimozione dell'acqua residua, tuttavia, l'intera procedura risultava essere lunga e generalmente poco pratica. In alternativa, è stata introdotta la separazione del  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  da  $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  (consentendo l'eventuale riciclo dell'acqua arricchita, come riportato in numerosi studi pubblicati) su una cartuccia a scambio anionico, risultando così essere la procedura ideale per la purificazione del  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  con implementazione nei sintetizzatori automatici commerciali. Il processo di purificazione del  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  si compone di due fasi: l'intrappolamento del radionuclide sulla resina e l'eluizione della radioattività adsorbita con una soluzione organico-acquosa contenente una base e un catalizzatore a trasferimento di fase, più comunemente la combinazione di  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e un etere corona appartenente alla classe di composti Criptandi (4,7,13,16,21,24-esaossa-1,10-diazabicciclo[8.8.8]esacosano, Kryptofix 222, K<sub>2.2.2</sub>).



**Figura 5.** Struttura 2D e tridimensionale del 4,7,13,16,21,24-esaossa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]esacosano.

L'aggiunta di  $K_{2.2.2}$  consente la solubilizzazione del  $[^{18}F]F^-$  in un solvente aprotico polare e migliora la nucleofilia dello ione fluoruro per la successiva fase di sostituzione nucleofila. La prima applicazione di  $K_{2.2.2}$  come criptando in una radiomarcatura con Fluoro-18 è stata segnalata nel 1986 per la sintesi nucleofila alifatica di un acido grasso; subito dopo, il  $K_{2.2.2}$  è stato impiegato di routine nella sintesi del 2-deossi-2- $[^{18}F]$ fluoro-D-glucosio ( $[^{18}F]F$ -FDG), il radiotracciante Fluoro-18 più comunemente usato in diagnostica PET (Hamacher et al, J. Nucl. Med. 1986). A seguito di questa applicazione routinaria nelle radiosintesi, un metodo di radiomarcatura che utilizza  $[^{18}F]KF/K_{2.2.2}/K_2CO_3$  essiccato azeotropicamente è stato utilizzato nella preparazione di una grande varietà di radiotraccianti per applicazioni cliniche e di ricerca in scenari di sostituzione nucleofila sia alifatica sia aromatica. In alternativa a  $K_{2.2.2}/K_2CO_3(KHCO_3)$ , il bicarbonato di tetrabuttilammonio ( $Bu_4NHCO_3$ ) è

stato introdotto più o meno nello stesso periodo (Brodack et al, Int. J. Rad. Appl. Instrum. A 1986) per la solubilizzazione del  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  e, a causa della sua basicità inferiore, è risultato essere efficace in un certo numero di fluorurazioni nucleofile.

Poiché la presenza di acqua riduce gravemente la reattività dello ione fluoruro nelle reazioni di sostituzione nucleofila, l'acqua in traccia dalla miscela eluente deve essere accuratamente rimossa. Solitamente ciò si ottiene attraverso un processo di essiccazione azeotropico multifase con l'aggiunta di diverse aliquote di acetonitrile. Sebbene questa procedura sia stata implementata nella maggior parte dei moduli di sintesi commerciali attualmente disponibili, l'efficienza dell'essiccazione dipende dal design del reattore, dalla modalità di trasferimento del calore, dal flusso di gas di essiccazione/vuoto e dal tempo. L'essiccazione incompleta influisce fortemente (e negativamente) sulla reattività del  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ , riducendo drasticamente le rese. Nel complesso, la fase di essiccazione azeotropica richiede tempo (6-15 min) ed è solitamente associata a significative perdite di radioattività dovute al decadimento e all'assorbimento del radionuclide sulle superfici interne del reattore.

Un'altra limitazione di questo approccio è l'uso di elevate quantità di base per facilitare l'eluizione del  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  trattenuto sulle cartucce SPE a scambio anionico standard di grandi dimensioni (Sep-Pak Plus QMA Light, PSHCO<sub>3</sub>). Un tipico eluente a base di K<sub>2.2.2</sub> contiene 2,0–3,5 mg (15–25 μmol) di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, che è una quantità inaccettabilmente grande quando si tratta di precursori sensibili alla base. Le condizioni di reazione di base

risultanti spesso portano alla formazione di sottoprodotti radiomarcanti indesiderati e alla generazione di impurezze risultanti dalla decomposizione del precursore.

Al fine di affrontare questi problemi, sono stati compiuti notevoli sforzi per sviluppare protocolli di adsorbimento/eluizione del  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  abbreviati, omettendo la procedura di essiccazione azeotropica e, cosa più importante, fornendo condizioni di fluorurazione  $^{18}\text{F}$  meno basiche e più miti per i precursori sensibili alle condizioni basiche. Numerosi metodi e tecniche innovativi sono stati introdotti da diversi gruppi attraverso l'ottimizzazione della scelta della base e del catalizzatore a trasferimento di fase utilizzati, la composizione del solvente eluente, il solvente di condizionamento della cartuccia (anione) e altri parametri. Di conseguenza, sono stati sviluppati e pubblicati numerosi protocolli perfezionati per la preparazione di particolari radiotraccianti.

La sostituzione nucleofila alifatica  $\text{S}_{\text{N}}2$  in presenza di  $\text{K}_{2.2.2}/\text{K}_2\text{CO}_3$  o  $\text{Bu}_4\text{NHCO}_3$  è attualmente il metodo più importante per la produzione della maggior parte dei radiotraccianti clinicamente rilevanti, tra cui  $[^{18}\text{F}]\text{F}\text{-FDG}$ , 3-deossi-3- $[^{18}\text{F}]\text{fluorotimidina}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{F}\text{-FLT}$ ),  $[^{18}\text{F}]\text{F}\text{-Fluoromisonidazolo}$  (1- $[^{18}\text{F}]\text{Fluoro}$ -3-(2-nitroimidazol-1-il)-propan-2-olo;  $[^{18}\text{F}]\text{F}\text{-FMISO}$ ), O-(2'- $[^{18}\text{F}]\text{Fluoroetil}$ -L-tirosina ( $[^{18}\text{F}]\text{F}\text{-FET}$ ).

La tipica sintesi in una fase (“*one-pot/one-vessel*”) o in due fasi di un radiotracciante si ottiene sostituendo nucleofili di un gruppo uscente appropriato nel precursore con  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  attivato in solventi aprotici polari (Acetonitrile, DMF, DMSO, ecc.) ad una temperatura di 80–130°C seguita

da (se necessario) rimozione dei gruppi protettivi/impurezze formatesi nel corso della procedura di sintesi. Questa metodologia è stata adattata anche alla marcatura di un certo numero di molecole bioattive marcate con Fluoro-18 preparate tramite radiofluorurazione diretta, nonché per la preparazione dei più comuni agenti [ $^{18}\text{F}$ ]F-fluoroalchilanti (Zhang et al., Curr. Top. Med. Chem. 2007) e gruppi [ $^{18}\text{F}$ ]F-protetici (Van der Born et al., Chem. Soc. Rev. 2017) per approcci di radiomarcatura indiretta. Nonostante il fatto che le metodologie convenzionali di distillazione azeotropica siano ben consolidate nelle fluorurazioni alifatiche e siano implementate nella maggior parte dei sintetizzatori automatizzati, gli approcci senza essiccazione hanno mostrato vantaggi distinti come la semplicità dell'automazione e tempi di produzione più brevi.

Tradizionalmente i metodi per aggirare il processo di distillazione azeotropica si basavano sulla variazione della composizione dell'eluente, per le cartucce SPE a scambio anionico, a base di  $\text{K}_{2.2.2}$  contenente  $\text{K}_2\text{CO}_3$  o  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$  meno basici e sulla riduzione della frazione di acqua nella miscela organica/acqua.

Nella maggior parte dei protocolli per fluorurazioni mediate da kryptofix, il [ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$  legato alla resina delle cartucce SPE a scambio anionico viene eluito con una soluzione di  $\text{K}_{2.2.2}/\text{K}_2\text{CO}_3$  disciolta in una miscela di solvente organico e acqua.

Il tipo di cartuccia a scambio anionico e la quantità di fase stazionaria (resina) influenzano sostanzialmente l'efficacia dell'eluizione [ $^{18}\text{F}$ ]F $^-$  nonché la successiva fase di radiomarcatura. Attualmente, il processo di

intrappolamento ed eluizione viene solitamente eseguito utilizzando una cartuccia standard Accell™ Plus QMA light Sep-Pak (riempita con 130 mg di polimero di cloruro di ammonio quaternario) o Chromafix® PS-HCO<sub>3</sub> meno comune (riempita con 46 mg di bicarbonato di ammonio quaternario polimero). Prima dell'uso, la cartuccia QMA\*Cl<sup>-</sup> viene condizionata con soluzioni acquose contenenti K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o KHCO<sub>3</sub>, mentre la cartuccia PSHCO<sub>3</sub> viene semplicemente condizionata prima con etanolo e successivamente con acqua. La resina QMA è disponibile anche sotto forma di carbonato, la cartuccia Sep-Pak Light (46 mg) Accel™ Plus QMA Carbonate che può essere utilizzata così com'è, senza alcun condizionamento (attualmente la più utilizzata nelle procedure routinarie di radiosintesi). Queste cartucce sono utilizzate in tutti i tipi di sintetizzatori automatizzati come componenti di cassette monouso preassemblate (GE FASTlab) o dei kit di reagenti appropriati (IBA Synthera). Cartucce di tipo a botte come Vac QMA 1 cc (100 mg), Oasis WAX 1 cc Vac Cartridge (30 mg), Strata™-XL-A anione forte polimerico (100 mg/3 ml) e altre sono comunemente riscontrate in protocolli di ricerca e sviluppo, tuttavia sono meno comuni nelle applicazioni di routine.

La scelta della giusta miscela di solventi eluenti può ridurre significativamente i tempi di essiccazione in seguito. Un eluente acquoso al 100% impiegato nei primi metodi pubblicati forniva un'efficienza di eluizione del 100%. Tuttavia, il tempo di distillazione azeotropica era troppo lungo affinché il metodo avesse un uso pratico significativo. Nella pratica corrente si utilizzano miscele acetonitrile-acqua con diverse

percentuali di acqua per abbreviare la procedura di essiccazione. L'uso di un eluente che contenga solo il 4% di acqua e il 96% di acetonitrile ha consentito di ottenere il complesso reattivo essiccato  $[K/K_{2.2.2.}] + [^{18}F]F^-$  senza ulteriore aggiunta di acetonitrile. Secondo questo protocollo, il radionuclide è intrappolato su una cartuccia standard a scambio anionico Accell™ Plus QMA light Sep-Pak (130 mg) preconditionata con 10 ml di soluzione 0,5 M di  $K_2CO_3$ . Il  $[^{18}F]F^-$  intrappolato viene eluito con 2 mL di miscela acetonitrile/acqua (96/4 v/v) contenente 9,8 mg (25  $\mu$ mol) di  $K_{2.2.2.}$  e 1,8 mg (12  $\mu$ mol) di  $K_2CO_3$ , con un'efficienza di eluizione maggiore del 98%. L'evaporazione dei solventi a 110 °C sotto un flusso di azoto (senza vuoto) produce direttamente  $[^{18}F]F^-$  reattivo.

Quindi, come sopra esposto, sforzi sostanziali si concentrano sulle precedenti fasi di pre-trattamento volte a migliorare la reattività del radionuclide  $[^{18}F]F^-$  acquoso che arriva dai ciclotroni.

Rese più elevate di  $[^{18}F]F^-$  reattivo, livelli più bassi di sottoprodotti, quantità minori di precursore utilizzato e minori impurezze in diversi casi consentono di sostituire del tutto la procedura di purificazione HPLC con una basata su cartuccia SPE, un vantaggio immenso per qualsiasi protocollo di produzione clinica.

## 1.6 SCOPO DELLA TESI

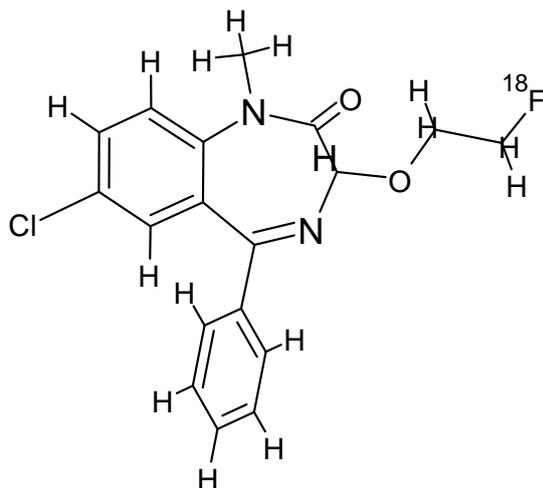
Nel presente lavoro di tesi, introduciamo un nuovo tipo di radiotracciante TSPO (3RS)-7-chloro-3-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethoxy)-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one, [<sup>18</sup>F]Fluoroetiltemazepam ([<sup>18</sup>F]F-FETEM) radiomarcato mediante modulo di sintesi automatizzato tramite una procedura *one-pot* (Fiorenza et al., Molecules 2021). I metodi validati riportati in letteratura per la radiomarcatura con radioisotopo fluoro-18 delle benzodiazepine (come ad esempio il radiotracciante [<sup>18</sup>F]Flumazenil) si avvalgono dell'utilizzo di metodi di purificazione mediante HPLC semipreparativo. Questi metodi di sintesi/purificazione comportano un notevole aumento dei tempi di produzione, che possono raggiungere anche gli 80 min, con una resa corretta per decadimento del 15%.

Nel presente lavoro di tesi, il metodo di sintesi/purificazione proposto ha raggiunto una serie di vantaggi tra cui: l'equilibrio tra la riduzione dei tempi di sintesi, la rimozione delle impurezze mediante cartucce SPE, l'utilizzo di un modulo di sintesi versatile con una procedura di pulizia non invasiva e senza problemi di carryover di prodotti ed impurezze provenienti da processi produttivi precedenti.

L'applicazione preclinica del nuovo radiotracciante [<sup>18</sup>F]F-FETEM può estendere la nostra comprensione sull'implicazione ed il ruolo della proteina TSPO all'interno delle malattie neurodegenerative.

Al fine di aumentare la biodisponibilità a livello cerebrale del radioligando e di evitare il metabolismo ad opera delle esterasi presenti a livello del

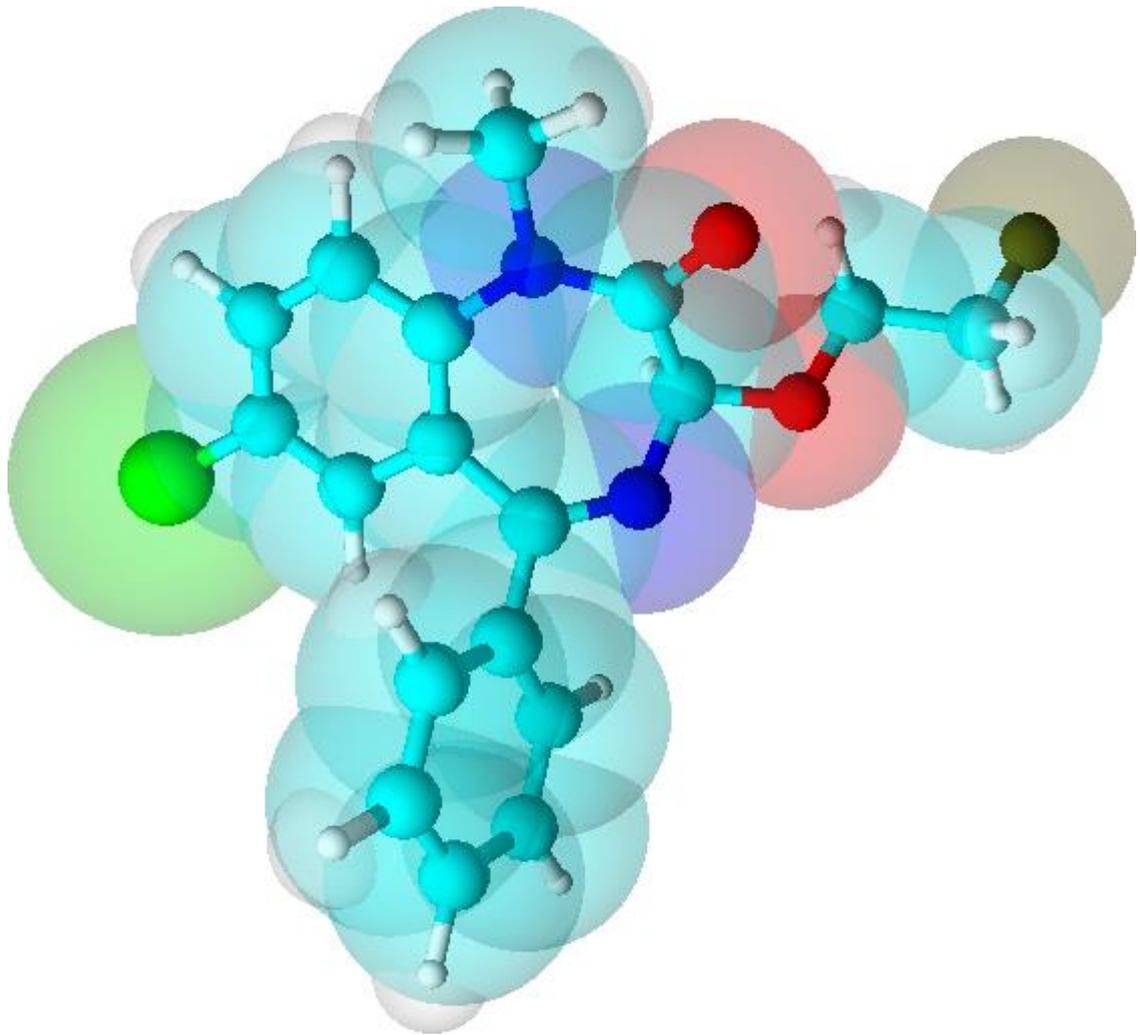
circolo ematico, è stata messa a punto una metodologia di incapsulamento del radioligando [18F]-fluoroethyltemazepam in nanovettori mediante una strategia di funzionalizzazione di un lipide complesso, derivato della fosfoetanolamina, la cui testa polare contenente il gruppo  $-NH_2$  che può reagire con il FDG formando un prodotto “quasi” Amadori. Il composto sintetizzato secondo tale schema di reazione, che costituisce lo scheletro esterno del nanovettore autoassemblante, è il FDG-18:1 Caproylamina PE.



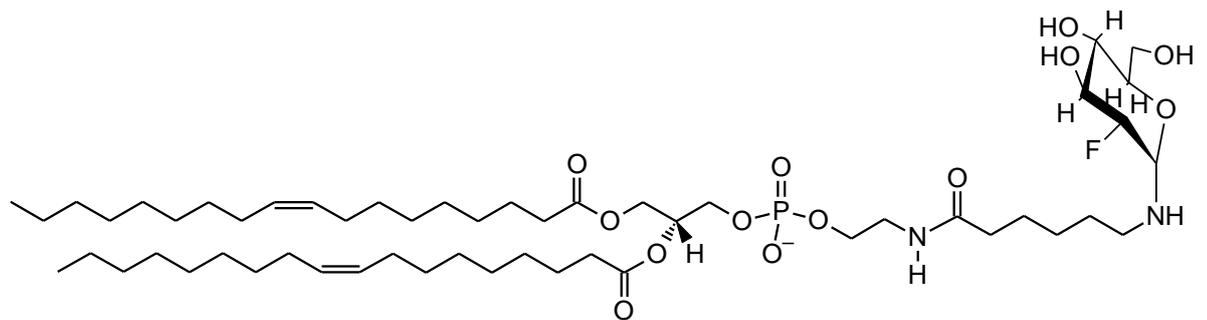
7-chloro-3-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethoxy)-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2*H*-1,4-benzodiazepin-2-one

Molecular Formula:	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Formula Weight:	346.7832432
Composition:	C(62.34%) H(4.65%) Cl(10.22%) F(5.48%) N(8.08%) O(9.23%)
Molar Refractivity:	91.39 ± 0.5 cm <sup>3</sup>
Molar Volume:	267.4 ± 7.0 cm <sup>3</sup>
Parachor:	685.1 ± 8.0 cm <sup>3</sup>
Index of Refraction:	1.599 ± 0.05
Surface Tension:	43.0 ± 7.0 dyne/cm
LogP:	3.26+/- 0.97
Density:	1.29 ± 0.1 g/cm <sup>3</sup>
Dielectric Constant:	Not available
Polarizability:	36.23 ± 0.5 10 <sup>-24</sup> cm <sup>3</sup>
RDBE:	11
Monoisotopic Mass:	346.088434 Da
Nominal Mass:	346 Da
Average Mass:	346.7832 Da
M+:	346.087885 Da
M-:	346.088982 Da
[M+H]+:	347.09571 Da
[M+H]-:	347.096807 Da
[M-H]+:	345.08006 Da
[M-H]-:	345.081157 Da

**Figura 6.** Struttura, nomenclatura e proprietà chimiche [<sup>18</sup>F]F-FETEM.



**Figura 7.** Struttura tridimensionale [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM.



$\text{C}_{53}\text{H}_{97}\text{FN}_2\text{O}_{13}\text{P}$   
 FW: 1020.32  
 LogP = 14.49 $\pm$  0.78

**Figura 8.** Struttura del composto FDG-18:1 Caproylamina PE.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 PRODOTTI CHIMICI E MATERIALI

1,10-Diaza-4,7,13,16,21,24-esaoxabicciclo[8,8,8]-esacosano (Kryptofix 2.2.2, K<sub>222</sub>), carbonato di potassio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), acetonitrile (anidro, 99,8%) sono stati ottenuti da ABX GmbH (Città, Radeberg, Germania). Dimetilsolfossido (DMSO; anidro, ≥99,9%), cloroformio (per analisi), acetone (Reag. Ph. Eur.) ed etanolo anidro assoluto (EtOH, Reag. Ph. Eur.) sono stati ottenuti da Merck Lifescience o Merck Millipore. Acqua sterile per preparazioni iniettabili (WFI, Ph. Eur.) è stata ottenuta da Galenica Senese (Città, Monteroni d'Arbia, Italia), gas elio in bombole da SOL (Città, Marcianise, Italia). Tutti i reagenti ed i solventi sono stati utilizzati così come ricevuti dai fornitori commerciali.

La [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O (≥98%), acqua arricchita per la produzione del radioisotopo [<sup>18</sup>F]fluoruro è stata acquistata da Rotem Industries Ltd. (Mishor Yamin D.N. Arava, City, Israel).

Le cartucce di estrazione in fase solida (SPE), Sep-Pak C18, Sep-Pak Plus Alumina N e Accell Plus QMA Carbonate sono state ottenute da Waters Corp. (Milford, MA, USA). I filtri sterili per siringa Millex GS ventilati con membrana in esteri misti di cellulosa (0,22 µm, 27 mm) sono stati ottenuti da Merck Millipore Ltd. (Cork, Irlanda).

Per la sintesi del nanovettore, etanolo anidro assoluto (EtOH, Reag. Ph. Eur.), acido acetico glaciale (ReagentPlus®, ≥99%), anilina (ACS reagent, ≥99.5%), 18:1 Caproylamine PE (Avanti Polar Lipids) sono stati ottenuti da

Merck Lifescience o Merck Millipore. Acqua sterile per preparazioni iniettabili (WFI, Ph. Eur.) è stata ottenuta da Galenica Senese (Città, Monteroni d'Arbia, Italia. Tutti i reagenti ed i solventi sono stati utilizzati così come ricevuti dai fornitori commerciali.

## 2.2 SINTESI DI PRECURSORE E STANDARD

Temazepam (standard di riferimento EP), N,N-dimetilformammide (DMF, anidro, 99,8%), cloruro di tionile ( $\text{SOCl}_2$ , ReagentPlus®,  $\geq 99\%$ ), glicole etilenico (ReagentPlus®,  $\geq 99\%$ ), cloroformio (per analisi), diclorometano (DCM, anidro,  $\geq 99.8\%$ ), p-Toluensolfonil cloruro (TsCl, ReagentPlus®,  $\geq 99\%$ ), 4-(Dimetilammino)piridina (DMAP, ReagentPlus®,  $\geq 99\%$ ), Trietilammina (TEA,  $\geq 99.5\%$ ), gel di silice 60 (extra puro per colonna cromatografia), etil acetato (anidro  $\geq 99.8\%$ ) sono stati ottenuti da Merck Lifescience o Merck Millipore.

Temazepam (2 g, 0,00665 moli), solubilizzato in DMF (10 mL), è stato aggiunto a cloruro di tionile (3,95 g, 0,0332 moli) in un eccesso stechiometrico di 5 equiv. La miscela di reazione è stata quindi tenuta sotto agitazione elettromagnetica a 0°C per tutta la notte. Successivamente, la miscela di reazione è stata fatta evaporare a pressione ridotta per rimuovere il solvente e l'eccesso di reattivo. Il prodotto così ottenuto (2,393 g, 0,0074 moli) è stato utilizzato senza ulteriore purificazione nella successiva fase di reazione.

Il glicole etilenico (20 mL) è stato precedentemente riscaldato ad una temperatura di 50°C a cui è stato aggiunto l'intermedio clorurato precedentemente ottenuto. La miscela di reazione così ottenuta è stata mantenuta a 50°C per 15 minuti ed è stato lasciato raffreddare a temperatura ambiente per ulteriori 4 ore sotto agitazione elettromagnetica. Successivamente, è stato aggiunto ghiaccio alla miscela di reazione ed è stata effettuata un'estrazione utilizzando cloroformio. La fase organica così ottenuta è stata retroestratta con acqua, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrata ed evaporata. L'intermedio così ottenuto (2,775 g, 0,00805 moli) è stato utilizzato senza ulteriore purificazione nel successivo stadio di reazione in cui è stato solubilizzato in DCM anidro (20 mL). A questa soluzione sono stati aggiunti cloruro di tosile (1,726 g, 0,00905 mol, 1,12 equivalenti), DMAP (0,393 g, 0,00321 mol, 0,4 equivalenti) e TEA (0,814 g, 1,12 mL, 0,00804 mol, 1 equiv.). La miscela risultante è stata tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per una notte. La miscela di reazione è stata fatta evaporare ed il residuo è stato purificato su una colonna cromatografica in gel di silice usando etil acetato/esano 7:3 v/v come miscela eluente. Infine, il prodotto finale così ottenuto è stato ricristallizzato da esano e identificato mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR e spettrometria di massa ESI-MS. L'aggiunta del glicole etilenico al temazepam (TEM-EtOH) e la successiva reazione di tosilazione (TEM-EtTos) sono state eseguite secondo quanto riportato nella Tabella 2.

Standard (TEM-EtOH): Yield 95%; mp: 220–221 °C. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.47 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3.87 (m, 2H, -OCH<sub>2</sub>-); 3.92 (s, 1H, -OH); 4.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-OH); 4.85 (s, 1H, -CH-); 7.34 (bs, 1H); 7.49 (m, 3H); 7.53 (d, 1H); 7.58 (dd, 1H); 7.65 (d, 2H). ESI-MS: 345.15 [M+H]<sup>+</sup>; 367.18 [M + Na]<sup>+</sup>; 483.16 [M + K]<sup>+</sup> (Calcd: 344.79).

Precursore (TEM-EtTos): Yield 53%; mp: 81–83 °C. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2.43 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3.14 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3.66 (m, 2H, -OCH<sub>2</sub>-); 4.10 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-O); 5.67 (s, 1H, -CH); 7.49–7.87 (m, 12H). ESI-MS: 499.3 [M + H]<sup>+</sup>; 521.20 [M + Na]<sup>+</sup>; 537.14 [M + K]<sup>+</sup> (Calcd: 498.98).

**Tabella 2.** Riepilogo della sequenza di reazione per la sintesi del precursore del [18F]F-FETEM

---

**Sintesi (3RS)-7-cloro-3-idrossietossi-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (TEM-EtOH)**

---

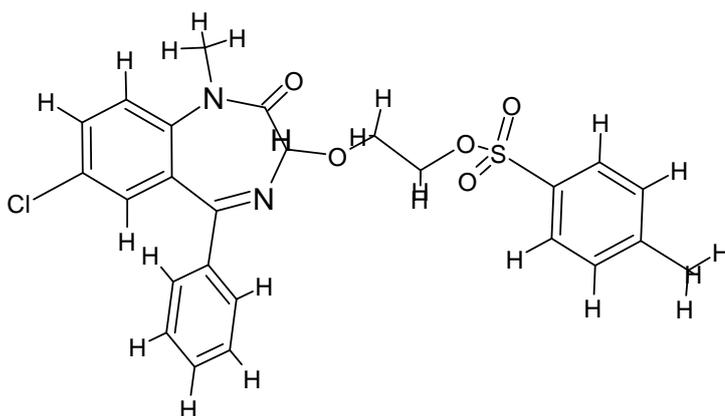
1. Aggiunta del cloruro di tionile (5 equiv., 3.95 g, 0.0332 mol) al temazepam (2 g, 0.00665 mol) in DMF (10 mL) sotto agitazione elettromagnetica *over night* (0°C)
2. Evaporazione del solvente
3. Aggiunta del glicole etilenico (20 mL a 50 °C) alla vial di reazione
4. Reazione a 50 °C per 15 min ed infine a temperatura ambiente per 4 h sotto agitazione elettromagnetica
5. Estrazione con cloroformio
6. Evaporazione della fase organica

---

**Sintesi (3RS)-7-cloro-3-tosiletossi-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-one (TEM-EtTos)**

---

7. Aggiunta del p-Toluensolfonil cloruro (1.12 equiv., 1.726 g, 0.00905 mol), TEA (0.814 g, 1.12 mL, 0.00804 mol, 1 equiv.) ed DMAP (0.393 g, 0.00321 mol, 0.4 equiv.) al TEM-EtOH (2.775 g, 0.00805 mol) in DCM (20 mL) sotto agitazione elettromagnetica *over night* (temperatura ambiente)
  8. Evaporazione del solvente
  9. Purificazione del TEM-EtTos su colonna di gel di silice
  10. Eluizione del TEM-EtTos mediante fase mobile etil acetato/esano 7:3 v/v
  11. Ricristallizzazione mediante esano
-



7-chloro-3-[2-(4-methylbenzene-1-sulfonate)ethoxy]-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2-one

Molecular Formula:	$C_{25}H_{23}ClN_2O_5S$
Formula Weight:	498.97852
Composition:	C(60.18%) H(4.65%) Cl(7.11%) N(5.61%) O(16.03%) S(6.43%)
Molar Refractivity:	$132.19 \pm 0.5 \text{ cm}^3$
Molar Volume:	$374.1 \pm 7.0 \text{ cm}^3$
Parachor:	$993.2 \pm 8.0 \text{ cm}^3$
Index of Refraction:	$1.624 \pm 0.05$
Surface Tension:	$49.6 \pm 7.0 \text{ dyne/cm}$
LogP:	4.59+/- 1.17
Density:	$1.33 \pm 0.1 \text{ g/cm}^3$
Dielectric Constant:	Not available
Polarizability:	$52.40 \pm 0.5 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^3$
RDBE:	17
Monoisotopic Mass:	498.10162 Da
Nominal Mass:	498 Da
Average Mass:	498.9785 Da
M+:	498.101071 Da
M-:	498.102168 Da
[M+H]+:	499.108896 Da
[M+H]-:	499.109993 Da
[M-H]+:	497.093246 Da
[M-H]-:	497.094343 Da

**Figura 9.** Struttura, nomenclatura e proprietà chimiche del precursore per la sintesi del  $[^{18}\text{F}]\text{F-FETEM}$ .

### 2.3 SINTESI E CONTROLLO QUALITÀ

La produzione del radioisotopo [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro è stata eseguita mediante un ciclotrone MINITrace GE 9.6MeV. La radiosintesi automatizzata del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM è stata eseguita mediante un modulo di radiosintesi automatizzato commerciale modificato TRACERlab F<sub>X</sub>FDG (GE Healthcare) (Manufacturer, City, Country, State Abbr. if USA GE Healthcare, Pollards Wood, Nightingales Lane, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Inghilterra HP8 4SP). La purezza radiochimica è stata eseguita con uno scanner Raytest miniGITA TLC (Produttore, Città, Paese, Stato Abbr. se USA Raytest, Straubenhardt, Germania).

### 2.4 RADIOCHIMICA

Le misurazioni della radioattività assoluta sono state eseguite utilizzando una camera a ionizzazione calibrata (Capintec CRC-25PET).

### 2.5 PROCEDURE DI PREPRODUZIONE

Prima di ogni sintesi, il sintetizzatore è stato pulito e le linee asciugate seguendo le istruzioni scritte interne specifiche del sintetizzatore e tutti i componenti monouso sono stati sostituiti. K<sub>222</sub> ( $15,0 \pm 0,5$  mg,  $39,84$   $\mu\text{mol}$ ) è stato sciolto in CH<sub>3</sub>CN ( $1,0 \pm 0,1$  mL). Il precursore ( $15,0 \pm 0,1$  mg,  $30,06$   $\mu\text{mol}$ ) è stato pesato in una fiala di vetro da 2,5 mL e sciolto in DMSO ( $1,0 \pm 0,1$  mL). La soluzione eluente EtOH:WFI 7:3 v/v ( $4,0 \pm 0,1$  mL) è stata

misurata in una siringa monouso. Successivamente, i reagenti sono stati caricati nelle posizioni del sintetizzatore appropriate come segue: (1) soluzione di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6 mg/mL, 0,55 mL); (2) Kryptofix® 222 (15 mg/1 mL acetoni-trile); (3) precursore di TEM-EtTos (15 mg/1 mL di DMSO); (4) vuoto; (5) Purificazione con WFI:EtOH 7:3 v/v (4,0 ± 0,1 mL); e (6) soluzione eluente EtOH:WFI 7:3 v/v (4,0 ± 0,1 mL). Le cartucce SPE (Accell Plus QMA, C18 e Plus Long Alumina N) sono state preconditionate con etanolo (2,0 mL) e acqua sterile (2,0 mL). Le cartucce Sep-Pak per la purificazione della miscela di reazione sono le cartucce C18. Il set di fiale del prodotto finale comprende una fiala di vetro sterile apirogena, cartuccia Plus Long Alumina N, due filtri sterili (filtri per siringhe Ventilati Millex®-GS per la filtrazione del prodotto finale e per la ventilazione) e una siringa per il campionamento QC. Questo set di fiale del prodotto finale è stato etichettato e assemblato in un isolatore (*cleanroom* di grado A).

## 2.6 PRODUZIONE DEL [<sup>18</sup>F]FLUORURO

L'acqua arricchita dell'isotopo ossigeno-18 viene trasferita dal sistema in un target d'argento ed è stata irradiata con protoni da 9,6 MeV prodotti con un ciclotrone MINITrace. La corrente del fascio è di 40 µA per un tempo di bombardamento pari a 30 min. Dopo l'irradiazione, l'acqua contenente il radioisotopo [<sup>18</sup>F]fluoruro viene trasferita, tramite un flusso di elio a 60 psi circa, in una fiala denominata “target vial” all'interno del modulo di sintesi.

## 2.7 PRODUZIONE DEL [<sup>18</sup>F]F-FETEM

La sintesi automatizzata viene controllata e monitorata da PC e comprende i seguenti passaggi automatizzati (tabella 3):

- Dopo l'irraggiamento ed il trasferimento dal ciclotrone al modulo di sintesi, il radioisotopo [<sup>18</sup>F]Fluoruro in fase acquosa viene intrappolato in una cartuccia QMA preconditionata.
- Il [<sup>18</sup>F]Fluoruro acquoso viene eluito con 0,55 mL di soluzione di carbonato di potassio 6 mg/mL e trasferito nel reattore del modulo di sintesi.
- Una volta che il [<sup>18</sup>F]Fluoruro acquoso è stato trasferito al reattore, Kryptofix® 222 viene aggiunto al reattore.
- Si procede alla formazione del complesso  $K_{222}/[^{18}F]^{-}/K^{+}$  mediante distillazione azeotropica a pressione ridotta e sotto flusso di elio. Il reattore viene riscaldato per 1,5 minuti a 97°C. Viene applicato un vuoto controllato e fornito un flusso di He.
- Dopo la fase di distillazione azeotropica, il riscaldatore ed il reattore vengono raffreddati e portati ad una temperatura di 60 °C mediante flusso di He (reattore) ed aria compressa (riscaldatore) e viene applicato un vuoto controllato.
- La soluzione precursore TEM-EtTos precaricata (15 mg/1 mL DMSO) viene aggiunta al reattore. Il reattore viene riscaldato per 5 min a 100°C sotto agitazione magnetica. Dopo la reazione, il reattore viene fatto

raffreddare sino ad una temperatura di 33°C mediante flusso di He (reattore) ed aria compressa (riscaldatore) e viene applicato un vuoto controllato.

- Dopo il raffreddamento, viene trasferita al reattore la soluzione di purificazione WFI:EtOH 7:3 v/v 4,0 mL.
- La miscela di reazione viene trasferita grazie all'ago presente nel reattore e caricata su cartuccia C18 Sep-Pak. L'eluato prodotto da questo trasferimento viene inviato alla bottiglia di scarto.
- Dopo aver caricato la miscela di reazione sulle cartucce di purificazione, la soluzione eluente EtOH:WFI 7:3 v/v 4.0 mL viene trasferita al reattore ed inviata direttamente alla cartuccia di purificazione. L'eluato contenente il radiofarmaco [18F]F-FETEM viene trasferito all'interno della fiala di raccolta del sintetizzatore.
- La soluzione contenente il radiotracciante [18F]F-FETEM sintetizzato viene inviata ad un isolatore (grado A), purificata su cartuccia Sep-Pak Plus Long Alumina N in una fiala di vetro sterile apirogena precedentemente etichettata.
- Dopo filtrazione sterilizzante, il filtro sterilizzante viene conservato in attesa di decadimento per poter eseguire il test del punto di bolla.
- Nell'isolatore viene raccolto un campione QC (1 mL) in un'altra fiala di vetro sterile apirogena precedentemente etichettata.
- Dopo aver ottenuto il campione QC, tutti i filtri e gli aghi sono stati rimossi dalla fiala del prodotto finale e viene misurata la radioattività residua.

**Tabella 3.** Riepilogo della sequenza di reazione per la sintesi del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM utilizzando un modulo di sintesi GE Tracerlab FxFDG.

<b>Sintesi del radiotracciante [<math>^{18}\text{F}</math>]F-FETEM</b>	
1.	[ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro intrappolato su cartuccia PS-HCO $_3^-$
2.	[ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro eluito mediante soluzione K $_2\text{CO}_3$ 0.55 mL (6 mg/mL)
3.	Aggiunta del catalizzatore Kryptofix $^{\text{®}}$ 222 (15 mg/1 mL acetonitrile) al reattore
4.	Distillazione azeotropica 97 °C/1.5 min
5.	Aggiunta del precursore (15 mg/1 mL DMSO) al reattore
6.	[ $^{18}\text{F}$ ]fluorurazione a 100°C per 5 min
<b>Purificazione del radiotracciante [<math>^{18}\text{F}</math>]F-FETEM</b>	
7.	Trasferimento e purificazione su cartuccia C18 con 4 mL WFI:EtOH 7:3
8.	Eluizione del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM mediante trasferimento di soluzione eluente (4 mL EtOH:WFI 7:3)
9.	Trasferimento del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM in una vial di raccolta
10.	Purificazione finale su Sep-Pak Plus Alumina N e filtrazione sterilizzante in serie

## **2.8 SPECIFICHE E TEST DI CONTROLLO QUALITÀ (QC) [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM**

I test QC sul campione QC vengono eseguiti seguendo le specifiche e i metodi di prova seguenti:

- Aspetto: soluzione limpida e gialla, priva di particelle (Metodo: ispezione visiva);
- Purezza radiochimica (RCP): la radioattività del fluoro-18 nella forma [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM deve essere  $\geq 90,0\%$  (Metodo: TLC);
- Identità radionuclidica: emivita di 105–115 min (Metodo: misurazione mediante calibratore di dose);
- Purezza radionuclidica:  $\geq 99,9\%$  della radioattività corrisponde al radioisotopo fluoro-18 (Metodo: spettrometria a raggi gamma);

- pH: 4,0–7,5 (Metodo: striscia indicatrice di pH);
- Amminopolietere: la porzione centrale della macchia dovuta alla soluzione in esame non è più intensa di quella della macchia dovuta alla soluzione di riferimento pari a 2,2 mg/V (Metodo: spot test su piastra in gel di silice TLC in reagente iodoplatinato).

## **2.9 PRODUZIONE E CONTROLLO QUALITÀ DEL FDG-18:1**

### **CAPROYLAMINA PE**

Anche la sintesi del composto FDG-18:1 Caproylamina PE è stata condotta “one pot”.

Il mix di reazione utilizzato è composto da: 5mg di 18:1 Caproylamina PE disciolti in 1mL di Etanolo Assoluto a cui viene aggiunto 100µL di Acido acetico glaciale (per acidificare il mix di reazione per favorire la formazione della forma aciclica del [<sup>18</sup>F]F-FDG), un volume pari a 20mg di FDG ed infine 5 µL del catalizzatore anilina. Le condizioni di reazione sono: incubazione del mix di reazione su piastra riscaldante sotto agitazione magnetica a 80°C.

Al fine di verificare la formazione del complesso ci si è avvalsi del radiocomposto 2-[<sup>18</sup>F]F-Fluoro-2-deossi-D-glucopiranosio ([<sup>18</sup>F]F-FDG). Per il controllo di qualità si è proceduti ad utilizzare il metodo TLC descritto nella relativa monografia di Farmacopea Europea 01/2014:1325:

- Piastra: piastra in gel di silice TLC R.
- Fase mobile: acqua R, acetonitrile R (5:95 V/V).

- Applicazione: circa 5  $\mu$ l.
- Sviluppo: su un percorso di 8 cm.
- Essiccazione: all'aria per 15 min.
- Rf: [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro = circa 0; 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-desossi-D-glucosio e 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-deossi-D-mannosio = circa 0,45; derivati parzialmente o completamente acetilati di 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-deossi-D-glucosio e 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-deossi-D-mannosio = da circa 0,8 a 0,95.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

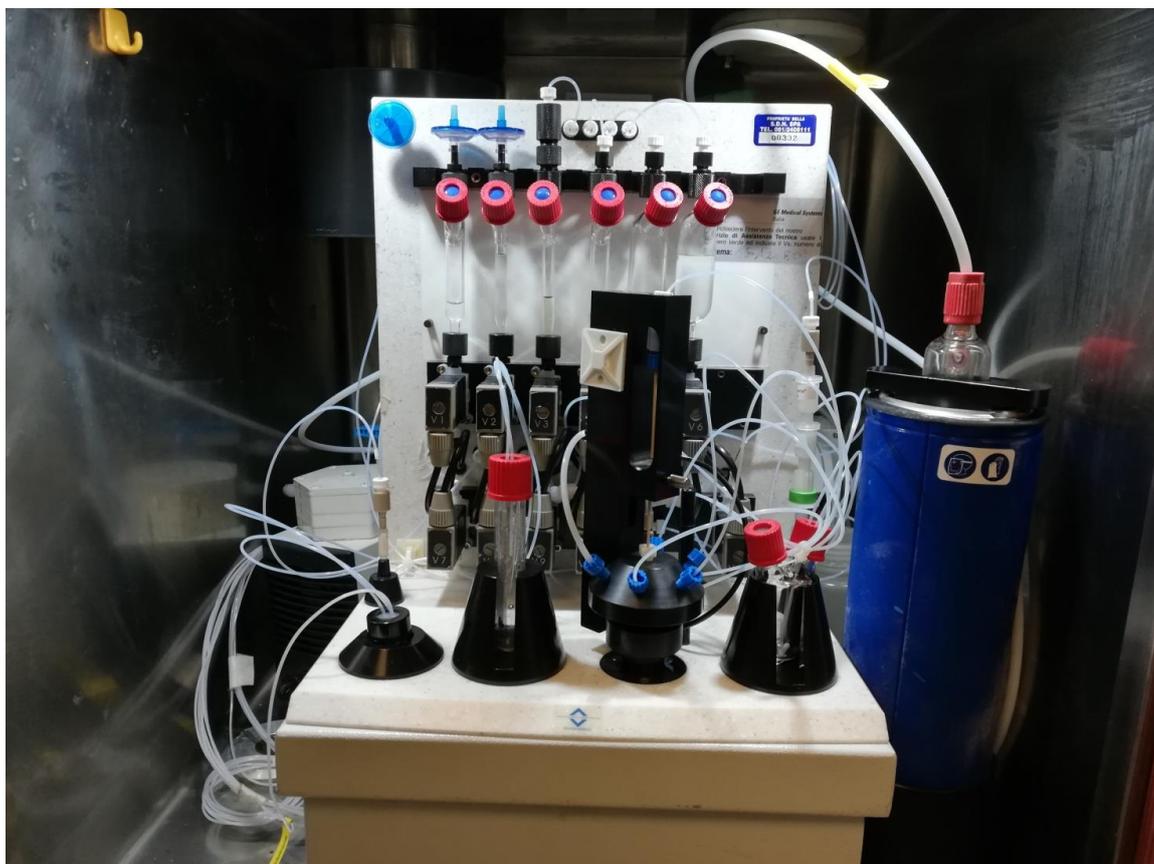
L'obiettivo della presente attività di ricerca è stata la sintesi della nuova molecola [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM e del suo corrispondente precursore p-toluensolfonil necessario per la radiofluorurazione. La crescente richiesta di nuovi radiotraccianti per il target TSPO da impiegare in ambito clinico ha portato a progettare una metodica per la sintesi/purificazione del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM completamente automatizzata.

Rispetto alle procedure descritte in letteratura, nel presente lavoro di tesi si è riusciti con successo ad applicare una tecnica di radiofluorurazione standard che prevedeva la formazione del complesso  $\text{K}[^{18}\text{F}]/\text{kryptofix}$  anidro a seguito di una reazione di sostituzione nucleofila condotta ad una temperatura di  $120^\circ\text{C}$  per 5 minuti in DMSO anidro. Al fine di ottimizzare le condizioni di reazione ideali, sono stati studiati temperatura, tempo e solvente, anche in funzione del decadimento radioattivo.

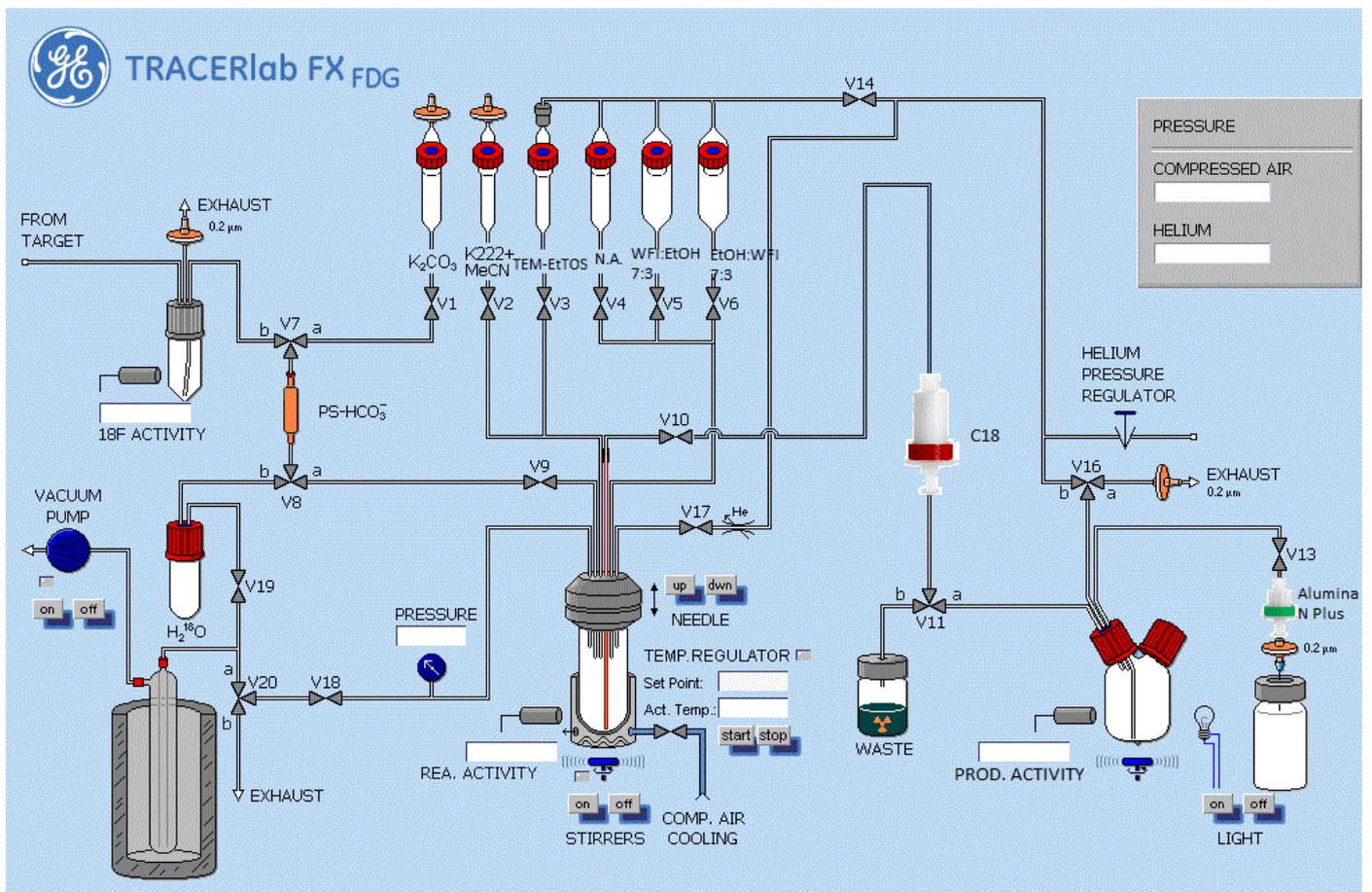
Come già precedentemente riportato in molteplici lavori, tra cui Li et al. 2008, è stato deciso di utilizzare nella progettazione del precursore, un distanziatore di etile tra il gruppo uscente p-toluensolfonil ed il nucleo benzodiazepinico, poiché la radiofluorurazione per sostituzione nucleofila procede più facilmente nei centri alifatici che nei centri elettrofili aromatici. Inoltre, il distanziatore di etile rappresenta un equilibrio tra le dimensioni limitate dell'unità protesica da un lato e la volatilità limitata degli intermedi radiofluorurati dall'altro. Pertanto, l'approccio generale presentato per la sintesi del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM sembra essere ben concepito ed è stato

quindi adottato per i nostri scopi, in quanto la modifica strutturale alla molecola del temazepam non modifica il legame con il sito di legame TSPO per le benzodiazepine (Glu 29 , Arg 32 , Lys 39 , e Val 154) posto sulla porzione citosolica della membrana mitocondriale esterna.

Per la sintesi automatizzata del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM è stato utilizzato un modulo di sintesi automatizzata modificato, disponibile in commercio per radiofluorurazioni, TRACERlab™ F<sub>x</sub>FDG (Figure 10-11), che è simile al modulo di sintesi TRACERlab™ FXN, che si è dimostrato essere una piattaforma di sintesi versatile per la produzione di una gamma di diversi radiofarmaci marcati con fluoro-18 (Shao et al., J. Label. Compd. Radiopharm. 2011).

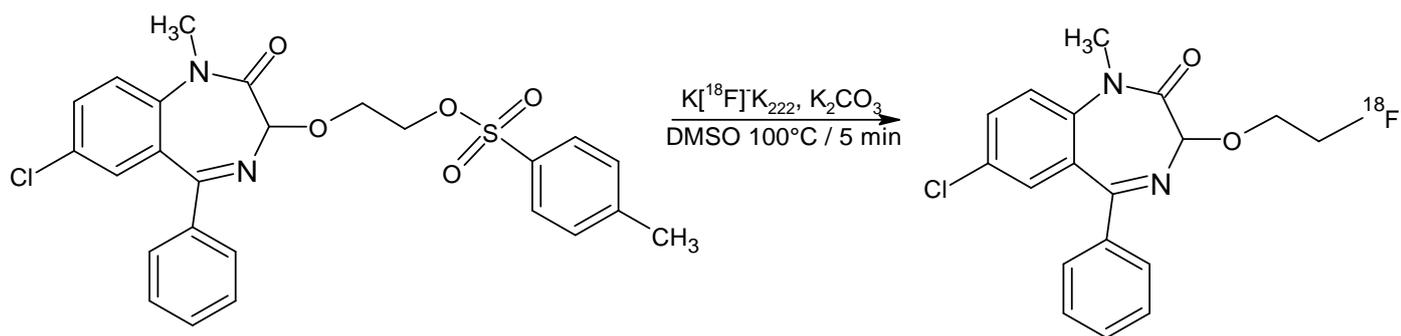


**Figura 10.** Modulo di sintesi automatizzato TRACERlab™ F<sub>x</sub>FDG per il radiotracciante [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM.

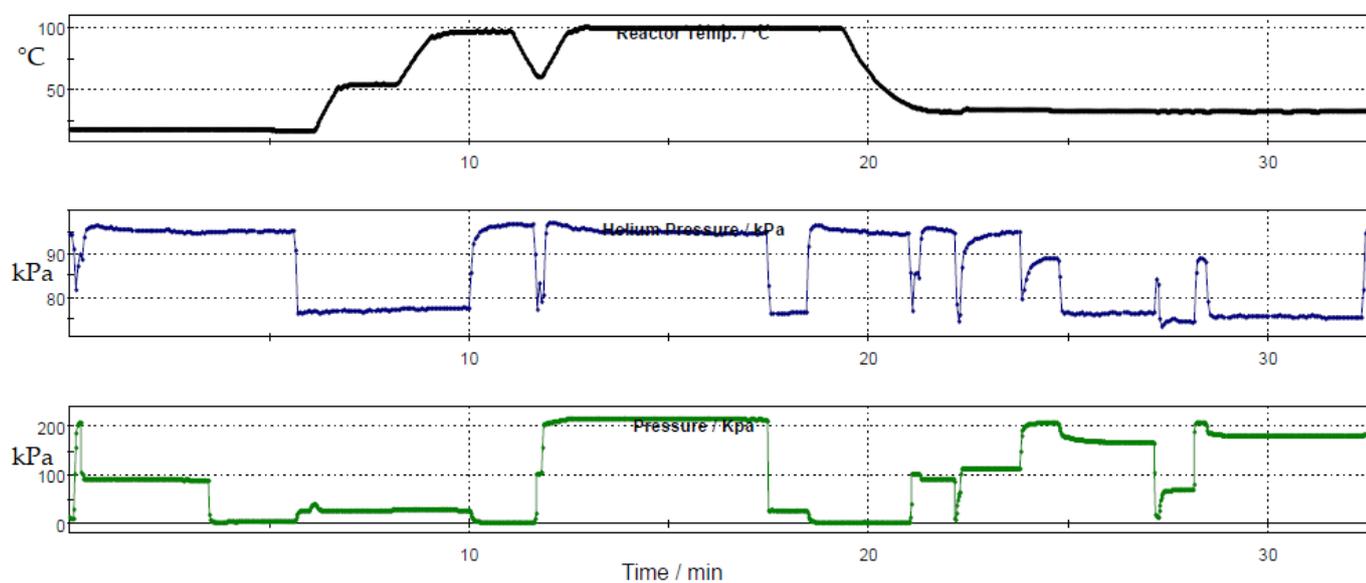


**Figura 11.** Sinottico utilizzato sul modulo di sintesi automatizzato TRACERlab™ F<sub>x</sub>FDG per il radiotracciante [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM.

La radiomarcatura del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM è stata ottenuta in una sintesi *one-pot* mediante la classica sostituzione nucleofila con [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro del precursore p-toluensolfonile, utilizzando carbonato di potassio e Kryptofix® 222 a 100 °C per 5 min (Figure 12-13) in un reattore chiuso sotto flusso di elio.



**Figura 12.** Schema di reazione del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM utilizzando il modulo di sintesi GE Tracerlab F<sub>x</sub>FDG in una sintesi *one-pot*.



**Figura 13.** Grafici temperatura, pressione dell'elio, pressione/tempo del reattore per la sintesi del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM utilizzando il modulo di sintesi GE Tracerlab F<sub>x</sub>FDG.

È stata utilizzata una concentrazione equimolare di  $[K/K_{2,2,2}]^+$   $[^{18}F]$ Fluoruro<sup>-</sup>/precursore e l'incorporazione del radioisotopo  $[^{18}F]$ Fluoruro è risultata essere del 2,0–3,0%. Lo schema di purificazione individuato, dato dalla combinazione di una cartuccia C18 a livello del modulo di sintesi e Alumina-N a livello del flacone terminale di raccolta della soluzione, ha fornito la massima resa. La purificazione Sep-Pak ha fornito una semplice separazione di  $[^{18}F]$ F-FETEM dalle impurità radiochimiche.

L'adsorbimento del radiotracciante  $[^{18}F]$ F-FETEM su cartuccia C18 ed il bilanciamento dato dalla selezione della soluzione di trasferimento (WFI:EtOH 7:3 v/v) e dalla soluzione eluente (EtOH:WFI 7:3 v/v) consente di ottenere la massima percentuale possibile di prodotto puro. Infatti la cartuccia C18 Sep-Pak consente una purificazione della miscela di reazione grezza (trasferita dal reattore mediante soluzione di purificazione WFI:EtOH 7:3 v/v), per cui il solvente utilizzato per la solubilizzazione del precursore DMSO, il catalizzatore K222 e la quota di  $[^{18}F]$ fluoruro che non ha reagito non vengono adsorbiti alla fase stazionaria C18, per cui vengono convogliati nel flacone di *waste*.

A causa dell'elevata temperatura di reazione (100°C) è stato selezionato come solvente polare non protico il DMSO, che consente di evitare l'eventuale evaporazione durante la reazione, anche grazie al breve tempo di reazione studiato (5 minuti), così come l'incremento eccessivo della pressione nel reattore.

La soluzione della formulazione finale è stata filtrata con un Sep-Pak Plus Alumina N direttamente collegato con un filtro sterile nella fiala del

prodotto finale. A partire da  $16,65 \pm 1,85$  GBq ( $450 \pm 50$  mCi) di  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ , è stato prontamente formulato  $0,499 \pm 0,037$  GBq ( $13,5 \pm 1$  mCi) di  $[^{18}\text{F}]\text{F-FETEM}$ , in un tempo di sintesi totale di media pari a 33 min ( $\pm$  deviazione standard).

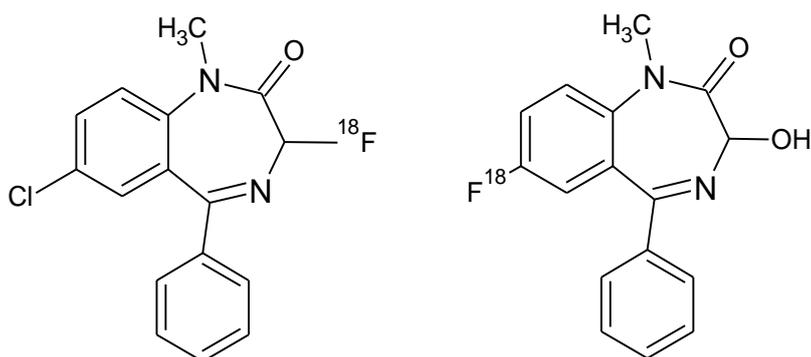
La *timelist* sviluppata ed impostata sul modulo di sintesi automatizzato è riportato in Tabella 4.

**Tabella 4.** *Timelist* utilizzata sul modulo di sintesi automatizzato TRACERlab™ F<sub>x</sub>FDG per il radiotracciante [<sup>18</sup>F]F-FETEM.

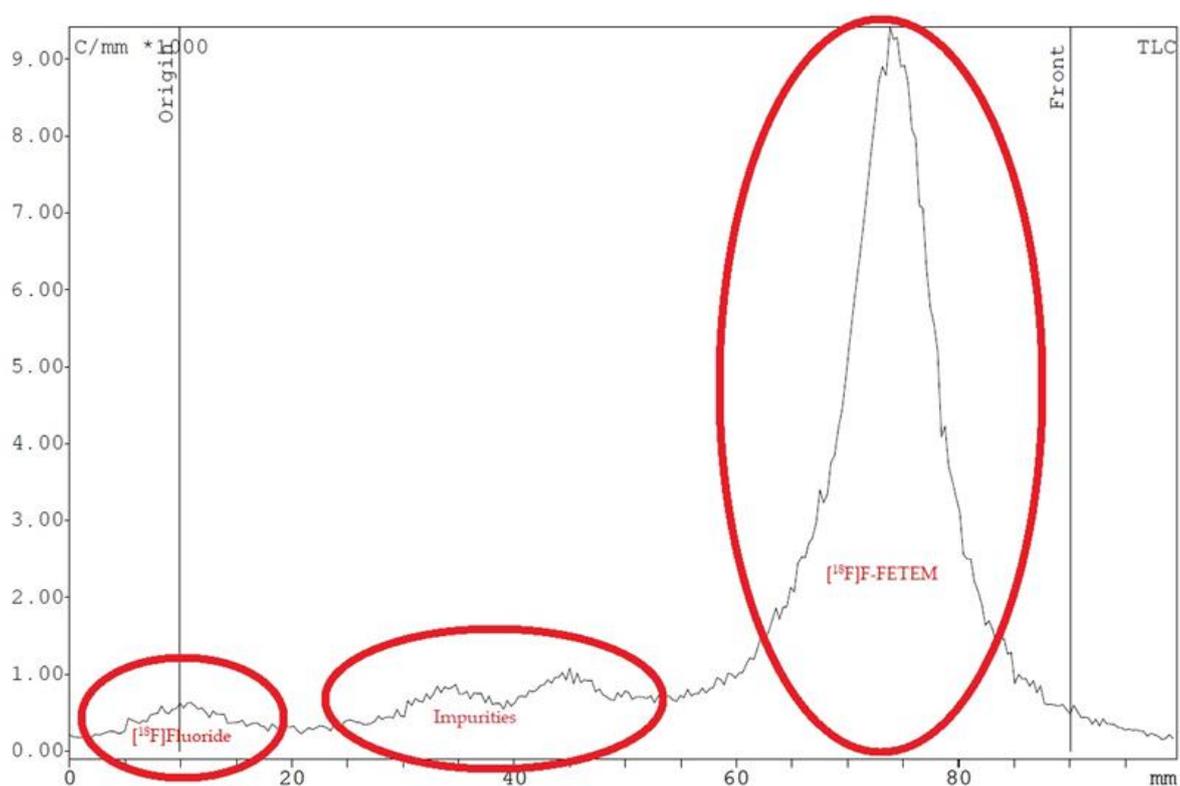
<u>Time</u>	<u>Device</u>	<u>Value</u>	<u>Comment</u>
0 Set	Stirrer	= On	
0 Set	V17 He reactor	= Open	
0 Set	Process Control	= Start Region	
10 Set	Process Control	= End Region	
10 Set	V18 Rea gas out	= Open	
10 Set	V20 Exh/vac rea	= b (down)	
10 Set	V17 He reactor	= Close	
12 Set	V19 Vac H2 18O	= Open	
12 Set	V8 H2O/Reactor	= b (left)	
12 Set	V20 Exh/vac rea	= a (up)	
12 Set	V18 Rea gas out	= Close	
12 Set	V7 K2CO3/Target	= b (left)	
3'20 Set	V8 H2O/Reactor	= a (right)	
3'20 Set	V19 Vac H2 18O	= Close	
3'20 Set	V1 TBA	= Open	K2CO3 0,55mL (6mg/mL)
3'20 Set	V18 Rea gas out	= Open	
3'20 Set	V9 Reactor in	= Open	
3'20 Set	V7 K2CO3/Target	= a (right)	
5'30 Set	V17 He reactor	= Open	
5'50 Set	V9 Reactor in	= Close	
5'50 Set	V2 MeCN	= Open	K222 (Cryptand) 15mg/1mL MeCN
5'50 Set	V1 TBA	= Close	
5'55 Set	Regulator Setpoint - Reactor Temp	= 55	
6'0 Set	V2 MeCN	= Close	
6'1 Wait For	Regulator Status - React Tmp	= Temp. OK	
t1+1'30 Set	Regulator Setpoint - Reactor Temp	= 97	
t1+1'30 Wait For	Regulator Status - React Tmp	= Temp. OK	
t2+1'0 Set	V17 He reactor	= Close	
t2+1'0 Set	V14 He vials	= Open	
t2+2'0 Set	Regulator Setpoint - Reactor Temp	= 60	
t2+2'0 Wait For	Regulator Status - React Tmp	= Temp. OK	
t3+0 Set	V17 He reactor	= Open	
t3+2 Set	V20 Exh/vac rea	= b (down)	
t3+5 Set	V17 He reactor	= Close	
t3+6 Set	V3 Triflate	= Open	TEM-EtTOS (15mg in 1mL DMSO)
t3+6 Set	Regulator Setpoint - Reactor Temp	= 100	
t3+11 Set	V18 Rea gas out	= Close	
t3+12 Set	V14 He vials	= Close	
t3+12 Set	V3 Triflate	= Close	
t3+12 Set	V20 Exh/vac rea	= a (up)	
t3+13 Wait For	Regulator Status - React Tmp	= Temp. OK	
t4+5'0 Set	Regulator Setpoint - Reactor Temp	= 100	

<b>Time</b>	<b>Device</b>	<b>Value</b>	<b>Comment</b>
t4+5'1 Wait For	Regulator Status - React Tmp	= Temp. OK	
t5+0 Set	V17 He reactor	= Open	
t5+1 Set V18	V18 Rea gas out	= Open	
t5+1'0 Set	V17 He reactor	= Close	
t5+1'50 Set	Regulator Setpoint - Reactor Temp	= 33	
t5+1'50 Wait For	Regulator Status - React Tmp	= Temp. OK	
t6+0 Set	V14 He vials	= Open	
t6+0 Set	V17 He reactor	= Open	
t6+2 Set	V20 Exh/vac rea	= b (down)	
t6+4 Set	V5 H2O	= Open	4.0mL WFI:EtOH 7:3
t6+4 Set	V17 He reactor	= Close	
t6+12 Set	V5 H2O	= Close	
t6+12 Set	V14 He vials	= Close	
t6+14 Set	V20 Exh/vac rea	= a (up)	
t6+14 Set	V18 Rea gas out	= Close	
t6+1'0 Set	Regulator Setpoint - Reactor Temp	= 33	
t6+1'1 Wait For	Regulator Status - React Tmp	= Temp. OK	
t7+2 Set	V17 He reactor	= Close	
t7+2 Set	V18 Rea gas out	= Open	
t7+2 Set	V14 He vials	= Open	
t7+4 Set	V4 HCl	= Open	N.A.
t7+11 Set	V4 HCl	= Close	
t7+11 Set	V18 Rea gas out	= Close	
t7+1'40 Set	Reactor Needle	= Down	
t7+1'40 Set	V17 He reactor	= Open	
t7+1'40 Set	V11 Waste	= b (left)	
t7+1'40 Set	V10 Reactor Out	= Open	
t7+5'0 Set	V14 He vials	= Open	
t7+5'0 Set	V17 He reactor	= Close	
t7+5'0 Set	V11 Waste	= a (right)	
t7+5'1 Set	V18 Rea gas out	= Open	
t7+5'2 Set	V6 H2O Elute	= Open	4.0mL Eluent solution EtOH:WFI 7:3
t7+6'0 Set	V18 Rea gas out	= Close	
t7+10'13 Set	Process Control	= Start Region	
t7+10'13 Set	FDG Sol. Light	= On	
t7+10'13 Set	V14 He vials	= Close	
t7+10'13 Set	V6 H2O Elute	= Close	
t7+10'13 Set	V10 Reactor Out	= Close	
t7+10'23 Set	Process Control	= End Region	
t7+10'28 Set	Process Control	= Reset	

Dopo la purificazione e la formulazione del radiotracciante, i risultati di questo studio forniscono evidenza di una resa radiochimica equivalente (non corretta per decadimento) del 2,0-3,0% (3,7% corretta per decadimento) di  $[^{18}\text{F}]\text{F-FETEM}$ . I risultati del controllo di qualità su TLC cloroformio/metanolo 9:1 v/v mostrano una purezza radiochimica del 90%  $[^{18}\text{F}]\text{F-FETEM}$ , il restante 10% è  $[^{18}\text{F}]\text{Fluoruro}$  e radioimpurezze non ancora identificate (Figure 14-15). Poiché questo sistema cromatografico TLC è già stato verificato e riportato in letteratura (Hancu et al., An. Univ. din Bucur. 2011), possiamo ipotizzare che altre impurezze radiochimiche ottenute da cromatogrammi TLC siano molecole a nucleo benzodiazepinico mostrate in Figura 14.

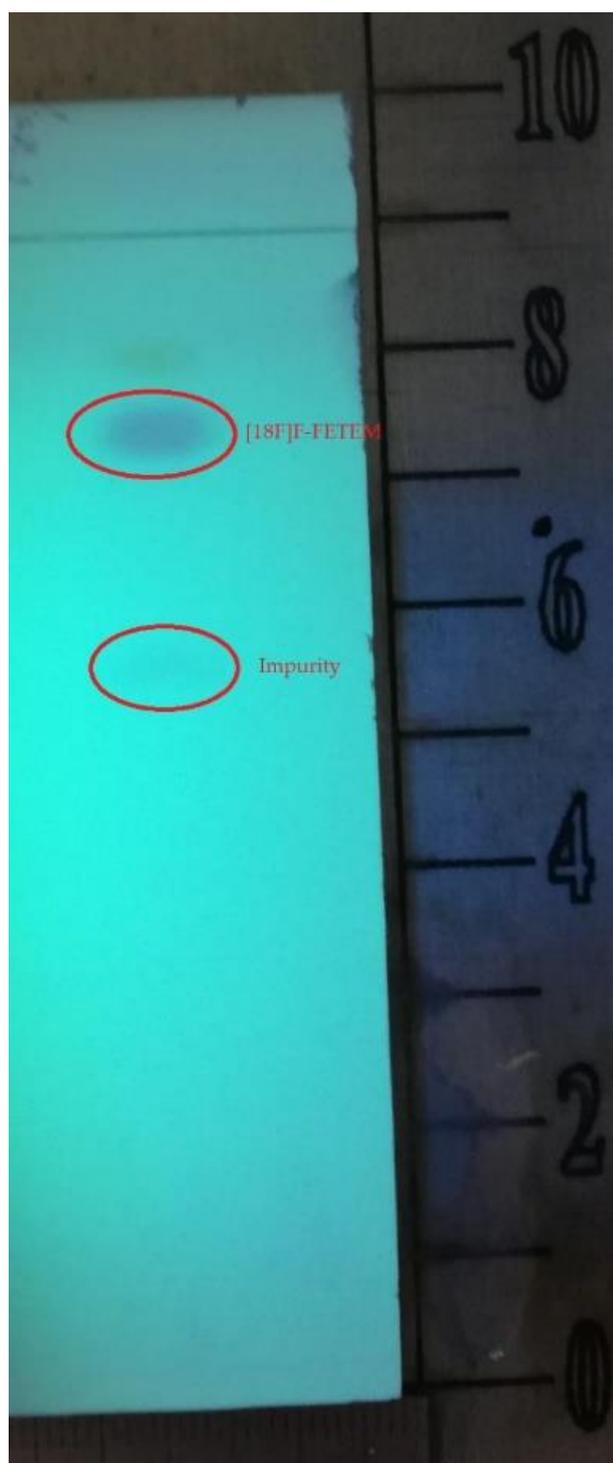


**Figura 14.** Possibili impurezze radiochimiche derivanti dalla sintesi del  $[^{18}\text{F}]\text{F-FETEM}$ .

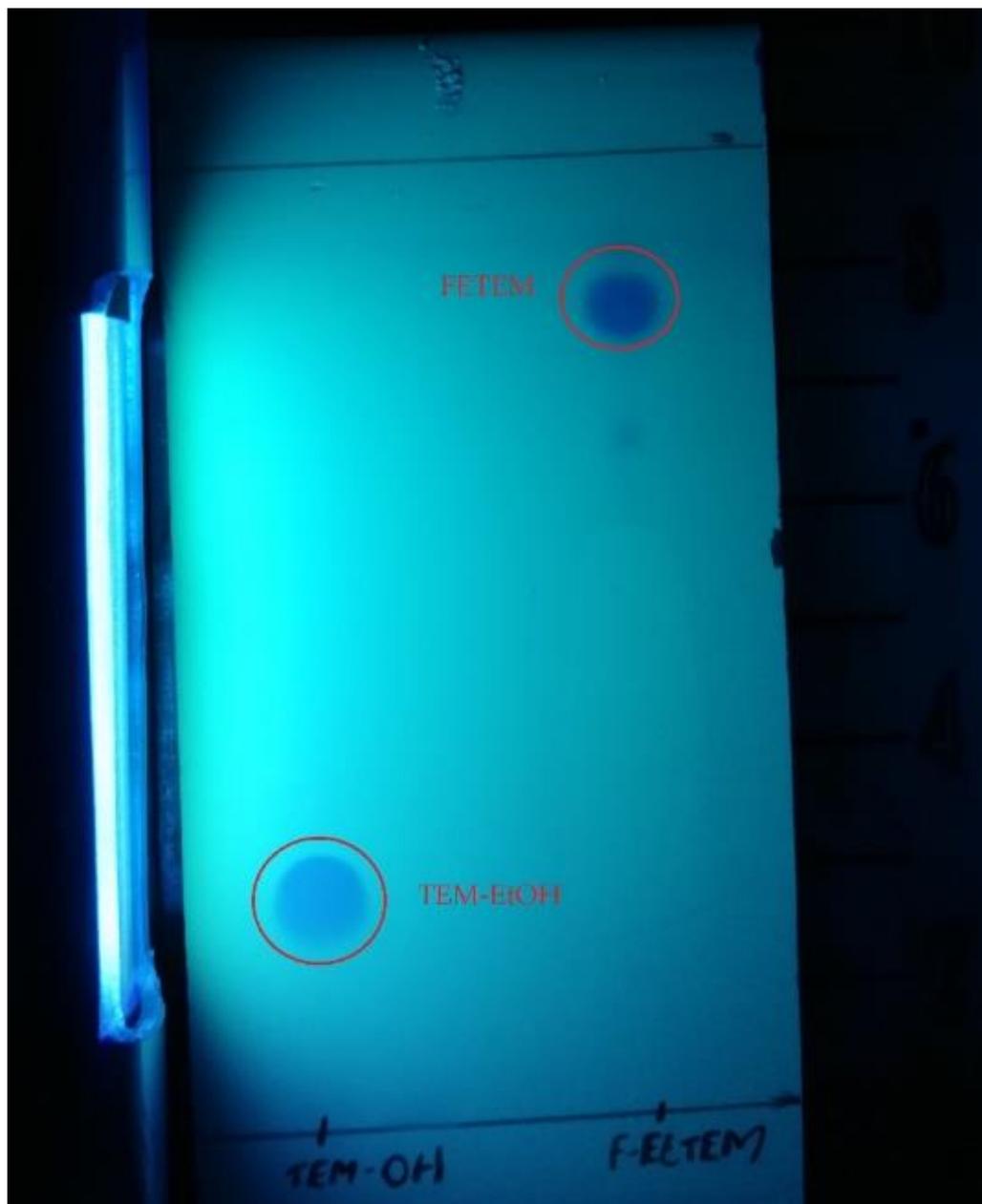


**Figura 15.** Analisi radio-TLC per la determinazione della purezza radiochimica del  $[^{18}\text{F}]\text{F-FETEM}$ .

Le impurezze evidenziate ed ipotizzate derivano dalla reazione di radiofluorurazione direttamente sull'anello benzodiazepinico, in un caso in posizione 3 (dove il gruppo uscente è rappresentato dal OH-EtTos) in un altro in posizione 6 (dove il gruppo uscente è rappresentato da un atomo di cloro). È stato dimostrato che le radioimpurezze e la quota di [<sup>18</sup>F]Fluoruro libero non aumentano durante il periodo di stabilità studiato (3 ore), tale per cui non si evincono fenomeni di radiolisi. Secondo i dati degli studi preclinici riportati in letteratura per i radiotraccianti TSPO, questa stabilità di 3 h consente di eseguire studi di biodistribuzione in vivo. Inoltre, le radioimpurezze non aumentano in tre ore e non sono stati trovati prodotti di decomposizione nelle tre ore analizzate, quindi consente di condurre uno studio di stabilità anche più lungo (sino a 6 ore). Inoltre, gli studi preclinici *in vivo* sono presenterebbero una maggiore maneggevolezza, anche a seguito della scelta del radioisotopo fluoro-18, rispetto al carbonio-11 (tempo di emivita pari a 109 min rispetto a 20 min per carbonio-11).



**Figura 16.** Analisi TLC della purezza chimica del  $[^{18}\text{F}]\text{F-FETEM}$  mediante lampada UV a 254 nm.



**Figura 17.** Analisi TLC degli standard FETEM e TEM-EtOH, lampada UV a 254 nm.

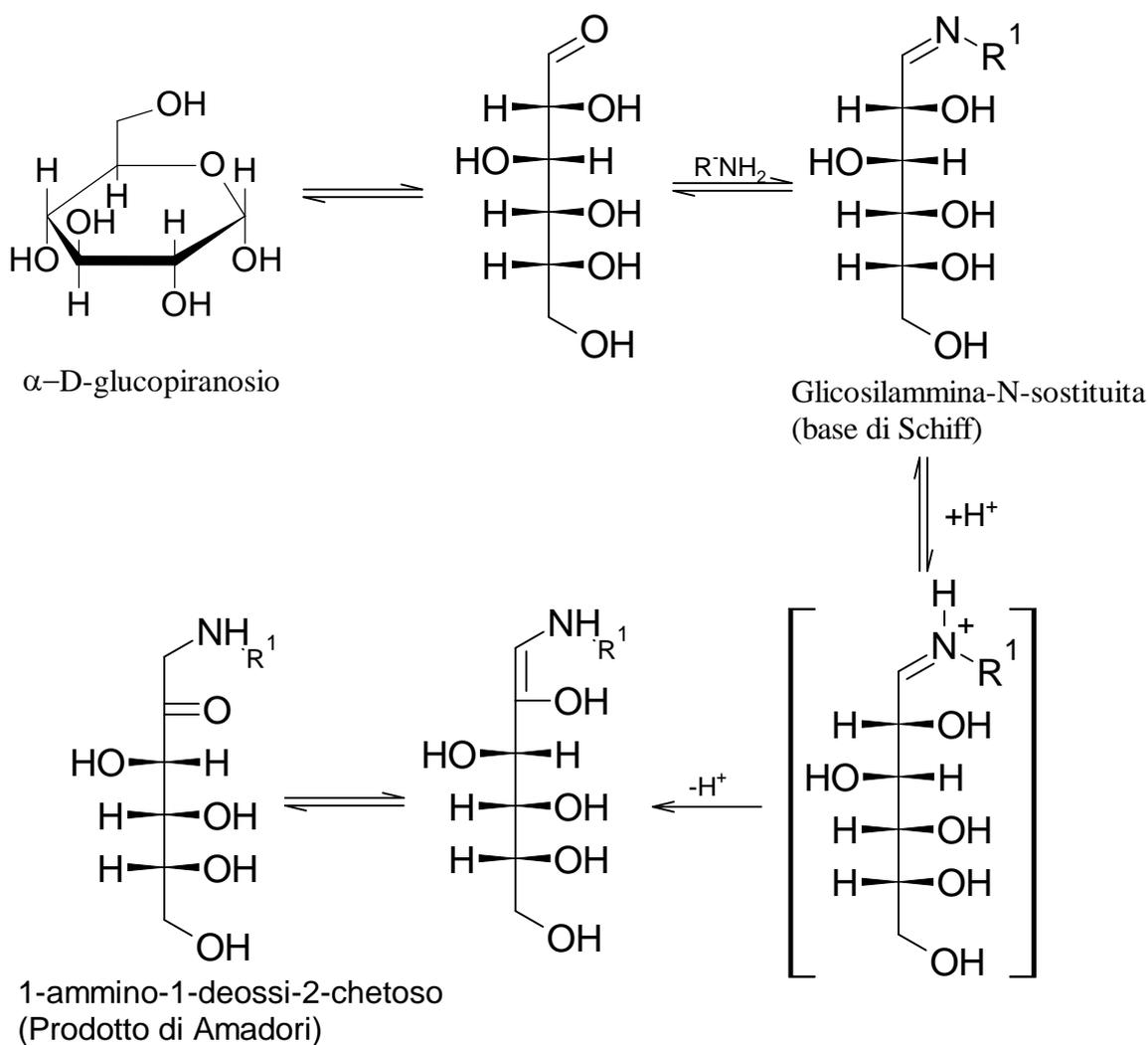
È stato applicato un metodo TLC, per l'analisi delle impurezze chimiche e radiochimiche del [<sup>18</sup>F]F-Fluoroetiltemazepam, già riportato e validato in letteratura per molecole con nucleo benzodiazepinico. L'identificazione del [<sup>18</sup>F]F-Fluoroetiltemazepam è stata effettuata utilizzando gli standard Fluoroetiltemazepam ed Etilidrossitemazepam come riferimento R<sub>f</sub>, eseguendo un'analisi TLC combinata (radio-UV). Pertanto, entrambi i tempi di ritenzione ottenuti dal radiocromatogramma (Figura 15) sono stati verificati combinando le informazioni derivate dall'analisi mediante rivelatore UV ad una lunghezza d'onda pari 254 nm (Figure 16-17).

Per quanto concerne la possibile metodologia di incapsulamento del radioligando [<sup>18</sup>F]F-Fluoroethyltemazepam in nanovettori è stata messa a punto una strategia di funzionalizzazione di lipide complesso, derivati della fosfoetanolamina, la cui testa polare contenente il gruppo -NH<sub>2</sub> che può reagire con il FDG formando un prodotto "quasi" Amadori, avvalendosi della Reazione di Maillard.

Per Reazione di Maillard si intende una reazione di imbrunimento non enzimatico costituita da una serie complessa di fenomeni che avviene in seguito all'interazione di zuccheri riducenti (carbonile C=O che reagisce, maggiormente coinvolti sono gli aldosi, in particolare il glucosio) e proteine (gruppi -NH<sub>2</sub>) in processi ad alte temperature e in condizione di bassa attività dell'acqua. Tale reazione risulta essere influenzata anche da altri fattori predisponenti, come ad esempio il pH acido. La reazione può essere suddivisa in tre fasi principali, tuttavia per lo scopo di sintesi del composto,

l'unica fase di reazione interessata risulta essere la prima, con formazione del prodotto di Amadori.

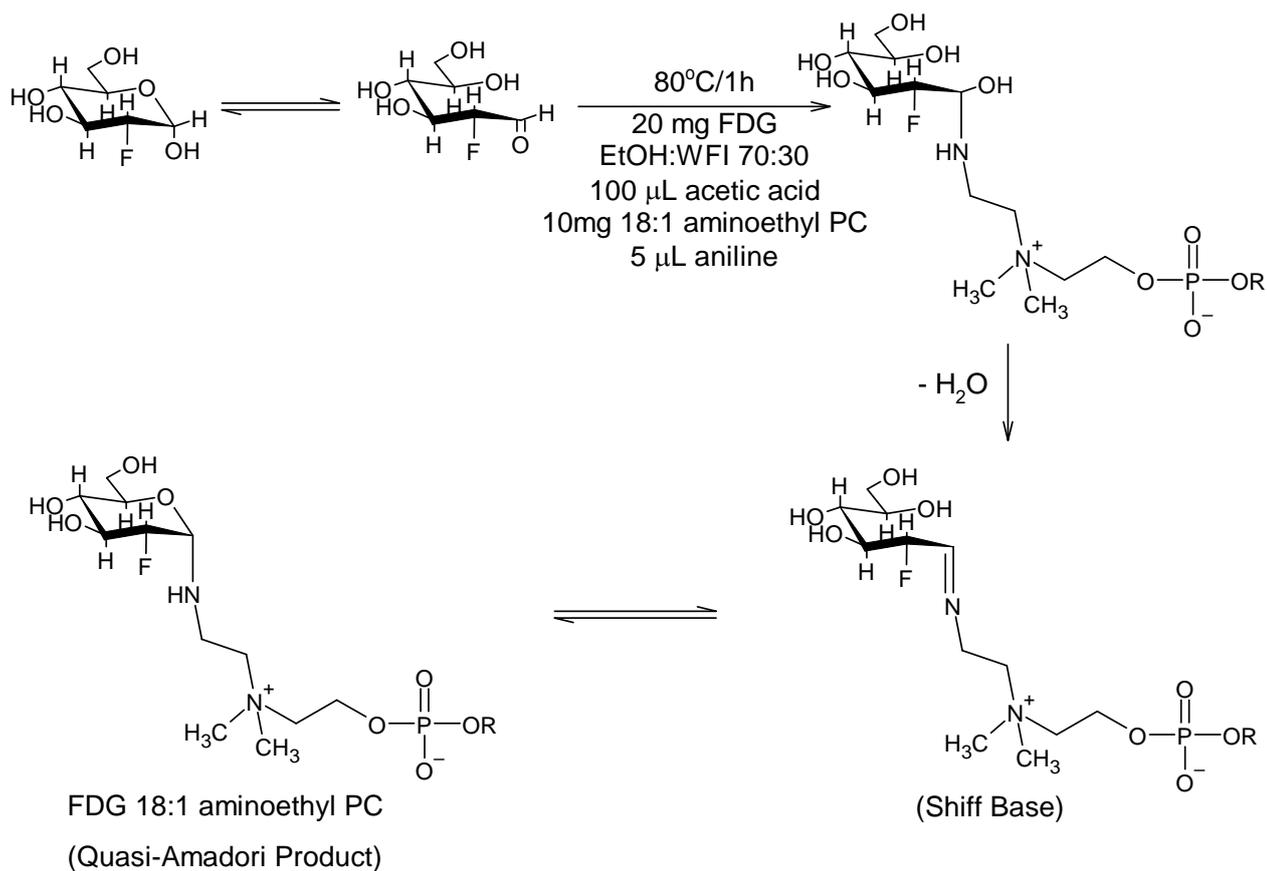
Tale prima fase risulta essere caratterizzata dalla formazione reversibile di una glicosilammina (una base di Schiff) tramite la reazione (favorita da condizioni debolmente acide) del carbonio carbonilico dello zucchero riducente, nella sua forma aperta, con il gruppo amminico di un amminoacido: si ha la formazione di una glicosilammina (instabile) che prende un protone e diventa una base di Schiff (molto reattiva). A causa della reattività elevata, la base di Schiff subisce un riarrangiamento dei doppi legami (riarrangiamento di Amadori per gli aldosi, riarrangiamento di Heyns per i chetosi) che porta alla formazione di un composto di Amadori o di Heyns a seconda che lo zucchero sia un aldoso (si trasformano in 1-ammino-1-deossi-2-chetosi) o un chetoso (si trasformano in 2-ammino-2-deossalidosi). Questo riarrangiamento è catalizzato, come indicato in precedenza, dalla presenza di un ambiente acido. Data la stabilità di questi prodotti, parte di essi rimane tale come concentrazione fino alla fine della reazione; si tratta però di un equilibrio dinamico con i prodotti successivi. I composti di Amadori-Heyns sono relativamente stabili e possono rappresentare i prodotti terminali della reazione.



**Figura 18.** Schema prima fase Reazione di Maillard.

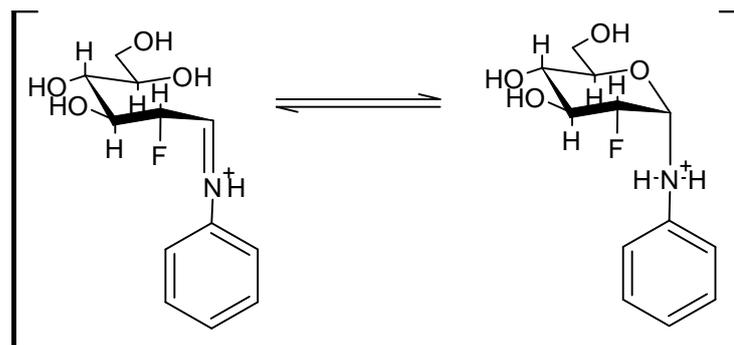
La strategia di sintesi messa a punto, che si avvale appunto della Reazione di Maillard sopra descritta, è stata verificata avvalendosi del radiocomposto 2-[ $^{18}\text{F}$ ]F-Fluoro-2-deossi-D-glucopiranosio ([ $^{18}\text{F}$ ]F-FDG).

Un esempio di funzionalizzazione è la sintesi del composto FDG-18:1 Caproilamina PE, come riportato in Figura 19.



**Figura 19.** Schema di sintesi del composto FDG-18:1 Caproylamina PE mediante catalisi con anilina.

L'anilina agisce come catalizzatore nucleofilo della formazione dell'immina in soluzione acquosa attraverso la formazione di un intermedio, riportato in Figura 20.



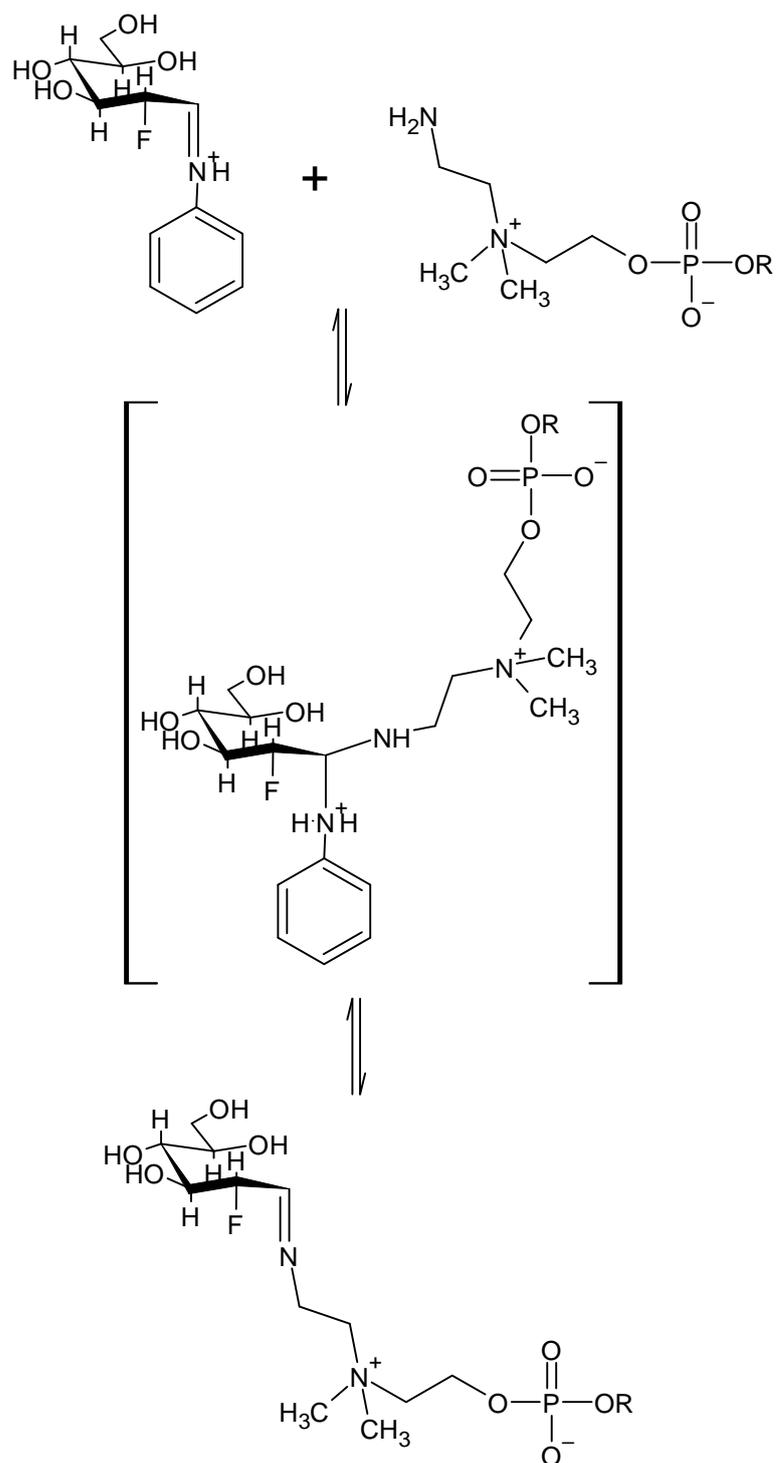
**Figura 20.** Intermedio glicosilamminico [ $^{18}\text{F}$ ]F-FDG-Anilina (base di Schiff protonata).

Il metodo di catalisi, dimostrato in letteratura scientifica, consiste nell'accelerazione della formazione di immine con macromolecole quali ad esempio peptidi a pH 4,5, che in generale estende l'ambito di questa reazione a condizioni rilevanti per la bioconiugazione delle macromolecole. L'anilina è un debole nucleofilo, poco reattivo ed è quindi compatibile con molti gruppi funzionali, come dimostrato qui dall'uso di composti non protetti.

Il legame imminico viene spesso utilizzato per legare gruppi prostetici a macromolecole complesse, come nel caso riportato nella presente tesi. Le reazioni a base di immina hanno trovato ampia applicazione nella coniugazione di biomolecole a causa della loro elevata chemioselettività. Aldeidi e chetoni possono essere facilmente introdotti nelle biomolecole e sono quasi inerti alla reazione con altri gruppi funzionali in queste molecole. In condizioni acide il gruppo carbonilico reagisce con le ammine primarie per formare un'immina reversibile, e l'equilibrio favorisce il

carbonile libero. Tuttavia, quando si utilizzano azoti ad effetto  $\alpha$ , l'equilibrio favorisce l'immina.

La formazione dell'immina può essere significativamente accelerata utilizzando l'anilina come catalizzatore nucleofilo. I miglioramenti della velocità si ottengono cambiando l'elettrofilo da un carbonile protonato, debolmente presente nel mix di reazione, a una base di Schiff anilina protonata, più densamente presente. La transiminazione ("trans-Schiffizzazione") della base di Schiff anilina protonata alla Fluorodeossiglicosilammina (Figura 21) procede rapidamente in condizioni acquose acide. I tassi di ligazione risultanti sono aumentati fino a 400 volte in soluzione acquosa a pH 4,5 rispetto ad un pH neutro pari a 7.



**Figura 21.** Transaminazione base di Schiff anilina protonata - Fluorodeossiglicosilammina.

Il mix di reazione utilizzato è composto da: 5mg di 18:1 Caproylamina PE disciolti in 1mL di Etanolo Assoluto a cui viene aggiunto 100µL di Acido

acetico glaciale (per acidificare il mix di reazione per favorire la formazione della forma aciclica del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FDG e la successiva fase di transiminazione), un volume pari a 20mg di FDG ed infine 5  $\mu\text{L}$  del catalizzatore anilina.

L'anomerizzazione, ossia il processo di conversione di un anomero nell'altro ( $\alpha$  e  $\beta$ ), viene favorita dalla presenza del pH nettamente acido della soluzione acquosa e consente la stabilizzazione della forma aperta aciclica del FDG.

Le condizioni di reazione sono state: incubazione del mix di reazione su piastra riscaldante sotto agitazione magnetica a 80°C.

È stato effettuato un controllo di qualità della purezza radiochimica mediante TLC su lastre gel di silice con fase mobile Acetonitrile:Acqua 95:5, prelevando ad intervalli di tempo regolari (tempo 0, 1 ora).

Dall'analisi dei cromatogrammi risulta evidente la formazione del complesso [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG-18:1 Caproylamina PE già alla prima ora di incubazione (rispetto alla seconda/terza ora senza la presenza di catalizzatore).

La prima fase dello studio per l'individuazione di possibili strategie di produzione di nanocarrier è stata focalizzata sulla preparazione di uno dei due sistemi lipidici individuati, ovvero quello a base di micelle. Quindi, è stato avviato uno studio formulativo per la preparazione di un lipide legato covalentemente al FDG. La prima fase dello studio preformulativo ha previsto la valutazione della formazione di micelle da parte del composto neosintetizzato, data la sua natura anfifilica. In particolare, la miscela di

reazione è stata diluita in acqua e analizzata al *NanosizerUltra*. Quindi, l'FDG-PE è stato diluito in acqua a differenti concentrazioni per valutare l'eventuale formazione di micelle. In particolare, dai risultati riportati in tabella 1, la formazione di micelle si è verificata nel caso delle diluizioni 1:10 e 1:5. Infatti, il composto forma spontaneamente le nanoparticelle con dimensioni comprese tra i 118 e i 165 nm.

**Tabella 5.** Analisi delle micelle FDG-PE.

<b>Medie e DS</b>	<b>Mean size (nm)</b>		<b>IP</b>		<b>PZ (mV)</b>	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Micelle						
PE 1:10	112,45	8,84	0,31	0,03	-16,57	0,81
PE 1:5	128,05	5,44	0,24	0,04	26,97	8,53

#### 4. CONCLUSIONI

Il nostro studio amplia il lavoro di Barresi et al. di ligandi TSPO come potenziali strumenti terapeutici o diagnostici. Infatti, nel loro lavoro, le benzodiazepine come il temazepam non sono riportate come ligandi. In letteratura, gli antagonisti TSPO, incluse le benzodiazepine temazepam, sono riportati in vitro, ma non sono mai stati utilizzati ligandi delle benzodiazepine per l'imaging PET. Una potenziale limitazione degli studi futuri è che [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM lega contemporaneamente la proteina TSPO ed i recettori GABA. Inoltre, non possiamo definire un'ottimizzazione della resa variando la quantità di precursore, comprese le regolazioni delle temperature e dei tempi di reazione. Nella produzione preclinica di [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM, abbiamo riscontrato problemi con la lipofilia del [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM. La resa radiochimica relativamente bassa (RCY) è dovuta alle perdite di radioattività nelle reazioni radiochimiche incomplete e, in misura minore, alle reazioni collaterali. C'è spazio per ulteriori ottimizzazioni. Tuttavia, siamo in grado di produrre quantità sufficienti di [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM per scopi preclinici. Sono necessari ulteriori studi per validare un metodo HPLC per [ $^{18}\text{F}$ ]F-FETEM, stiamo effettuando studi di validazione del metodo HPLC utilizzando il metodo riportato nella monografia Temazepam della Farmacopea Europea (01/2008:0954).

In conclusione, i nostri risultati hanno suggerito un nuovo tipo di radioligandi benzodiazepinici per TSPO mai descritti in precedenza.

Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per convalidare [18F]F-FETEM *in vivo* con modelli animali con patologie neurodegenerative.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Aiello, M.; Cavaliere, C.; Fiorenza, D.; Duggento, A.; Passamonti, L.; Toschi, N. Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases: Current Multi-modal Imaging Studies and Future Opportunities for Hybrid PET/MRI. *Neuroscience*, 2019, Vol.403, p.125-135.
- Alam, M.M.; Lee, J.; Lee, S.Y. Recent progress in the development of TSPO PET ligands for neuroinflammation imaging in neurological diseases. *Nucl. Med. Mol. Imaging* 2018, 51, 283–296.
- Barresi, E.; Robello, M.; Costa, B.; Da Pozzo, E.; Baglinia, E.; Salerno, S.; Da Settimo, F.; Martini, C.; Taliani, S. An update into the medicinal chemistry of translocator protein (TSPO) ligands. *Eur. J. Med. Chem.* 2021, 209, 112924.
- Brodack, J.W.; Kilbourn, M.R.; Welch, M.J.; Katzenellenbogen, J.A. NCA 16 alpha-[18F]fluoroestradiol-17 beta: The effect of reaction vessel on fluorine-18 resolubilization, product yield, and effective specific activity. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A* 1986, 37, 217–221.
- Cavaliere, C.; Tramontano, L.; Fiorenza, D.; Alfano, V.; Aiello, M.; Salvatore, M. Gliosis and Neurodegenerative Diseases: The Role of PET and MR Imaging. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2020, Vol.14, p.75-75.
- Chen, H.; Chan, D.C. Mitochondrial dynamics–fusion, fission, movement, and mitophagy–in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 2009, 18, R169–R176.

- DeLorenzo, R.J.; Burdette, S.; Holderness, J. Benzodiazepine Inhibition of the Calcium-Calmodulin Protein Kinase System in Brain Membrane. American Association for the Advancement of Science, 1981, Vol.213 (4507), p.546-549.
- Fafalios, A.; Akhavan, A.; Parwani, A.V.; Bies, R.R.; McHugh, K.J.; Pflug, B.R. Translocator protein blockade reduces prostate tumor growth. Clin. Cancer Res. 2009, 15, 6177–6184.
- Fan, Z.; Harold, D.; Pasqualetti, G.; Williams, J.; Brooks, D.J.; Edison, P. Can Studies of Neuroinflammation in a TSPO Genetic Subgroup (HAB or MAB) Be Applied to the Entire AD Cohort? J. Nucl. Med. 2015, 56, 707–713.
- Fiorenza, D.; Nicolai, E.; Cavaliere, C.; Fiorino, F.; Esposito, G.; Salvatore, M. Fully Automated Synthesis of Novel TSPO PET Imaging Ligand [<sup>18</sup>F]Fluoroethyltemazepam. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, Vol.26 (8), p.2372.
- Forte, E.; Fiorenza, D.; Torino, E.; di Polidoro, A. C.; Cavaliere, C.; Netti, P. A.; Salvatore, M.; Aiello, M. Radiolabeled PET/MRI Nanoparticles for Tumor Imaging. Journal of clinical medicine, 2020, Vol.9 (1), p.89.
- Hamacher, K.; Coenen, H.; Stocklin, G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-d-glucose using aminopolyether supported nucleophilic-substitution. J. Nucl. Med. 1986, 27, 235–238.
- Hancu, G.; Fülöp, E.; Rusu, A.; Mircia, E.; Gyéresi, Á. Thin layer chromatographic separation of Benzodiazepine derivatives. An. Univ. din Bucur. 2011, 20, 181–188.

- Hirsch, C.T.; Decaudin, D.; Susin, S.A.; Marchetti, P.; Larochette, N.; Resche-Rigon, M.; Kroemer, G. PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor, facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp. Cell Res.* 1998, 241, 426–434.
- Jiang, H.; Fairweather, D.; Parent, E.; Jain, M.; Cooper, L.; Cai, H. Improved production of (R)-[11C]PK11195 for PET imaging of inflammation. *J. Nucl. Med.* 2020, 61 (Suppl. 1), 1004.
- Keller, T.; Krzyczmonik, A.; Forsback, S.; López Picón, F.R.; Kirjavainen, A.K.; Takkinen, J.; Rajander, J.; Cacheux, F.; Damont, A.; Dollé, F.; et al. Radiosynthesis and preclinical evaluation of [18F]F-DPA, A novel Pyrazolo[1,5a]pyrimidine Acetamide TSPO radioligand, in healthy sprague dawley rats. *Mol. Imaging Biol.* 2017, 19, 736–745.
- Kim, E.T.; Pae, A.N. Translocator protein (TSPO) ligands for the diagnosis or treatment of neurodegenerative diseases: A patent review (2010–2015, part 1). *Expert Opin. Ther. Pat.* 2016, 26, 1325–1351.
- Lee, D.; Kang, S.K.; Lee, R.H.; Ryu, J.M.; Park, H.Y.; Choi, H.S.; Bae, Y.C.; Suh, K.T.; Kim, Y.K.; Jung, J.S. Effects of peripheral benzodiazepine receptor ligands on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.* 2004, 198, 91–99.
- Li, Z.; Lang, L.; Ma, Y.; Kiesewetter, D.O. [18F]Fluoropropylsulfonyl chloride: a new reagent for radiolabeling primary and secondary amines for PET imaging. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2008, 51, 23–27.
- Lindemann, P.; Koch, A.; Degenhardt, B.; Hause, G.; Grimm, B.; Papadopoulos, V. A novel *Arabidopsis thaliana* protein is a functional

peripheral-type benzodiazepine receptor. *Plant Cell Physiol.* 2004, 45, 723–733.

- Marangos, P.J.; Patel, J.; Boulenger, J.P.; Clark-Rosenberg R. Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using [<sup>3</sup>H]Ro 5-4864. *Molecular Pharmacology* July 1982, 22 (1) 26-32.
- Morohaku, K.; Pelton, S.H.; Daugherty, D.J.; Butler, W.R.; Deng, W.; Selvaraj, V. Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology* 2014, 155, 89–97.
- Palzur, E.; Sharon, A.; Shehadeh, M.; Soustiel, J.F. Investigation of the mechanisms of neuroprotection mediated by Ro5-4864 in brain injury. *Neuroscience*, 2016, Vol.329, p.162-170.
- Papadopoulos, V.; Baraldi, M.; Guilarte, T.R.; Knudsen, T.B.; Lacapère, J.J.; Lindemann, P.; Norenberg, M.D.; Nutt, D.; Weizman, A.; Zhang, M.R.; et al. Translocator protein (18kDa): New nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006, 27, 402–409.
- Papadopoulos, V.; Fan, J.; Zirkin, B. Translocator protein (18 kDa): An update on its function in steroidogenesis. *J. Neuroendocr.* 2018, 30, e12500.
- Schweitzer, P.J.; Fallon, B.A.; Mann, J.J.; Kumar, L.S.D. PET tracers for the peripheral benzodiazepine receptor and uses thereof. *Drug Discov. Today* 2010, 15, 933–942.
- Shao, X.; Hoareau, R.; Hockley, B.G.; Tluczek, L.J.M.; Henderson, B.D.; Padgett, H.C.; Scott, P.J.H. Highlighting the versatility of the tracerlab synthesis modules. Part 1: Fully automated production of [<sup>18</sup>F]labelled

radiopharmaceuticals using a Tracerlab FXFN. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2011, 54, 292–307.

- Solingapuram Sai, K.K.; Gage, D.; Nader, M.; Mach, R.H.; Mintz, A. Improved automated radiosynthesis of [11C]PBR28. *Sci. Pharm.* 2015, 83, 413–427.
- Van der Born, D.; Pees, A.; Poot, A.J.; Orru, R.V.A.; Windhorst, A.D.; Vugts, D.G. Fluorine-18 labelled building blocks for PET tracer synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 2017, 46, 4709–4773.
- Vignal, N.; Cisternino, S.; Rizzo-Padoin, N.; San, C.; Hontonnou, F.; Gelé, T.; Declèves, X.; Sarda-Mantel, L.; Hosten, B. [18F]FEPPA a TSPO radioligand: Optimized radiosynthesis and evaluation as a PET radiotracer for brain inflammation in a peripheral LPS-injected mouse model. *Molecules* 2018, 23, 1375.
- Wang, M.; Gao, M.; Miller, K.D.; Zheng, Q. Synthesis of [11C]PBR06 and [18F]PBR06 as agents for positron emission tomographic (PET) imaging of the translocator protein (TSPO). *Steroids* 2011, 76, 1331–1340.
- Werry, E.L.; Bright, F.M.; Piguet, O.; Ittner, L.M.; Halliday, G.M.; Hodges, J.R.; Kiernan, M.C.; Loy, C.T.; Kril, J.J.; Kassiou, M. Recent developments in TSPO PET imaging as a biomarker of neuroinflammation in neurodegenerative disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 20, 3161.
- Wickstrøm, T.; Clarke, A.; Gausemel, I.; Horn, E.; Jørgensen, K.; Khan, I.; Mantzilas, D.; Rajanayagam, T.; Veld, D.-J.I.T.; Trigg, W. The development of an automated and GMP compliant FASTlab™ synthesis of [(18) F]GE-

180; a radiotracer for imaging translocator protein (TSPO). *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2014, 57, 42–48, doi:10.1002/jlcr.3112.

- Zanotti-Fregonara, P.; Pascual, B.; Rostomily, R.C.; Rizzo, G.; Veronese, M.; Masdeu, J.C.; Turkheimer, F. Anatomy of 18 F-GE180, a failed radioligand for the TSPO protein. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2020, 47, 2233–2236.
- Zhang, M.-R.; Suzuki, K. [18F]Fluoroalkyl agents: Synthesis, reactivity and application for development of PET ligands in molecular imaging. *Curr. Top. Med. Chem.* 2007, 7, 1817–1828.
- Zhou, J.; Zhang, X.; Peng, J.; Xie, Y.; Du, F.; Guo, K.; Feng, Y.; Zhang, L.; Chen, L.; Jiang, Y. TSPO ligand Ro5-4864 modulates microglia/macrophages polarization after subarachnoid hemorrhage in mice. *Neuroscience letters*, 2020, Vol.729, p.134977-134977.