

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”**



**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE**

**XX CICLO (2005-2007)**

**SONDE INNOVATIVE  
PER PROCEDURE DI IMAGING MOLECOLARE  
NELLA DIAGNOSI TUMORALE**

**Tutore**

**PROF. G. MORELLI**

**Candidata**

**ANNA LUCIA TORNESELLO**

**Relatore**

**PROF. A. MOLINARO**

**Coordinatore**

**PROF. A. VITAGLIANO**

# INDICE

## Summary

### 1. Introduzione

- 1.2. I radiofarmaci
- 1.3. I peptidi radiomarcati
- 1.4. Progettazione di un radiofarmaco
- 1.5. Metalli radiattivi
- 1.6. Peptidi radiomarcati nella diagnosi delle patologie umane: neurologia, cardiologia, infezioni ed infiammazione, aterosclerosi e trombosi
- 1.7. Peptidi radiomarcati nella diagnosi delle patologie umane oncologiche
- 1.8. I recettori della colecistochinina (CCK) e la loro interazione con l'octapeptide CCK8 e minigastrina
- 1.9. Obiettivo della tesi

### 2. Materiali e Metodi

- 2.1. Materiali
- 2.2. Metodi
  - 2.2.1. Sintesi dei peptidi CCK8, DOTA-G-CCK8, minigastrina corta (DOTA SMG e DTPAGlu-SMG) e minigastrina lunga (DOTA-LMG e DTPAGlu-LMG)

- 2.2.2.** Sintesi dei coniugati radiomarcati  $^{99m}\text{TcO-PhosGC-CCK8}$  e  $^{99m}\text{TcO-PhosGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$
- 2.2.3.** Sintesi dei coniugati  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3)})^+$  e  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43)})^+$
- 2.2.4.** Radiomarcatura del complesso DOTA-G-CCK8 con  $^{67}\text{Ga}$  e DOTA-G-CCK8 con  $^{68}\text{Ga}$
- 2.2.5.** Sintesi dei coniugati radiomarcati:  $^{68}\text{GaDOTA minigastrina (SMG e LMG)}$
- 2.2.6.** Sintesi dei coniugati radiomarcati:  $^{111}\text{InDTPAGlu-minigastrina (SMG e LMG)}$

### 2.3. Studi in vitro ed in vivo

- 2.3.1.** Stabilità in vitro dei complessi  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3)})^+$  e  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43)})^+$
- 2.3.2.** Esperimenti di transchelazione dei complessi  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3)})^+$  e  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43)})^+$
- 2.3.3.** Esperimenti di Binding dei complessi radiomarcati (studi in vitro)
- 2.3.4.** Studi di Biodistribuzione (studi *in vivo*)

## 3. Risultati e Discussione

### a) Derivati del peptide CCK8 funzionalizzati con fosfine e marcati con $^{99m}\text{Tc}$

- 3.1.** Sintesi dei peptidi radiomarcati  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-CCK8}$  e  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$
- 3.2.** Studi *in vitro* dei radiomarcati  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-CCK8}$  e  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$

- 3.3. Studi *in vivo* dei radiomarcanti  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-CCK8}$  e  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$
- 3.4. Sintesi dei coniugati  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3)})^+$  e  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43)})^+$
- 3.5. Studi *in vitro* dei peptidi radiomarcanti  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3)})^+$  e  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43)})^+$
- 3.6. Studi *in vivo* dei peptidi radiomarcanti  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3)})^+$  e  $(^{99m}\text{Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43)})^+$
- b) Derivati del peptide CCK8 funzionalizzati con il chelante DOTA e marcati con 67-Gallio o 68-Gallio.**
- 3.7. Sintesi e radiomarcatura del peptide DOTA-G-CCK8 con  $^{67}\text{Ga}$  e  $^{68}\text{Ga}$
- 3.8. Binding cellulare e internalizzazione di DOTA-G-CCK8 con  $^{67}\text{Ga}$  e  $^{68}\text{Ga}$
- 3.9. Biodistribuzione e Imaging
- c) Derivati del peptide minigastrina marcati con 111-Indio attraverso il chelante DTPAGlu o con Gallio attraverso il chelante DOTA.**
- 3.10. Sintesi di  $^{111}\text{InDTPAGlu-minigastrina (SMG e LMG)}$  e  $^{68}\text{GaDOTA minigastrina (SMG e LMG)}$
- 3.11. Studi *in vitro* della minigastrina marcata con  $^{111}\text{In}$  e studi *in vitro* della minigastrina marcata con  $^{68}\text{Ga}$
- 3.12. Studi *in vivo* della minigastrina marcata con  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{111}\text{In}$
- 3.13. Studi *in vivo* sull'uomo

## 4 Conclusioni

### Bibliografia

### Abbreviazioni

### Pubblicazioni e Proceedings: Allegato A

## Summary

Radiolabeled molecules capable of targeting specific sites inside the body can be exploited for diagnostic purposes by imaging. Available single photon and positron emission tomography techniques allow identification of areas of the body where the particular target molecule is present. Thus gathering of relevant information on the biochemical properties of the tumor can be utilized to visualize, stage and monitor response to treatment of either through single photon emission computed tomography (SPECT or  $\gamma$ -scintigraphy) or positron emitting tomography (PET). Moreover the same targeting principle can be applied for disease treatment by directing to the tumor side radionuclides capable of delivering lethal radiation to cancer cells. Development of radiopharmaceuticals for both purposes has gained much interest overtime. Peptide based radiopharmaceuticals use the peptide moiety to deliver, with high specificity and selectivity, the radioactive ion and its emitting radiation, on a selected molecular target. Many papers and reviews have been published reporting on different aspects of radiochemistry and its role in medicine, with particular emphasis to diagnosis and treatment of cancer. Most popular technetium based radiopharmaceuticals, as well as those incorporating other radionuclides have been reviewed. Moreover antibodies and peptides, as carrier of radionuclides, have been developed and described in the past. Although antibodies show very high selectivity for their antigens they present some drawbacks such as the extravasation process due to their high molecular weight. Conversely the use of peptides as targeting tools has been validated in a number of applications.

Several receptor systems are being evaluated for the development of peptide-based radiopharmaceuticals for diagnostic and therapeutic purposes. This field is of particular interest for applications in oncology. Many of these receptor systems have been shown to be overexpressed in particular types of human cancers. The naturally occurring ligands for these receptors are, in many instances, small peptides. The sequences and interactions of these peptides with their specific receptors can be structurally characterized, and peptide derivatives can be designed and synthesized to

bear a chelating group for a radiometal. The properties of the peptide derivative as a radiopharmaceutical then can be tested. An excellent example of the successful clinical application of a peptide–receptor system has been the use of the radiolabeled somatostatin analog octreotide, which has been used in several clinical studies to identify tumors and other pathologic conditions in which specific subtypes of the somatostatin receptor are overexpressed.

We have focused on the cholecystinin (CCK) family of receptors. Two major CCK receptor subtypes have been identified (CCKAR and CCKBR). CCKBR also is the gastrin receptor, which promotes acid secretion in the fundal mucosa of the stomach. These receptors show physiologic distributions in several different tissues, with rather selective expression of one or the other subtype. The CCKAR subtype is expressed in the pancreas, where it has been found to be involved in enzyme secretion in pancreatic acini and insulin secretion from islet cells. It also is found in the gallbladder and other areas of smooth muscle in the gastrointestinal tract, in the gastric mucosa, and in certain areas of the central nervous system, such as vagal afferent neurons. On the other hand, CCKBR is expressed throughout the central nervous system and in various cell types in the gastric mucosa. The overexpression of both of these receptor subtypes in certain human tumors has been demonstrated. CCKAR has been found to be overexpressed in several pancreatic adenocarcinomas and, to a lesser extent, in gastroenteropancreatic tumors. CCKBR has been found to be overexpressed in a large percentage of medullary thyroid cancers (MTCs), in other tumors of neuroendocrine origin (such as small-cell lung cancers), and gastroenteropancreatic tumors. Several cancer cell lines derived from human pancreatic adenocarcinomas have been found to express CCKAR. CCKBR has been found in the rat pancreatic cell line AR42J and in other cell lines, including those derived from medullary thyroid carcinoma, such as the human cell line TT. Given the particularly high incidence of CCKBR overexpression in certain neuroendocrine tumors, such as MTCs, CCKBR-directed radiopharmaceuticals may be more successful than currently available somatostatin analogs in the imaging and treatment of these cancer types.

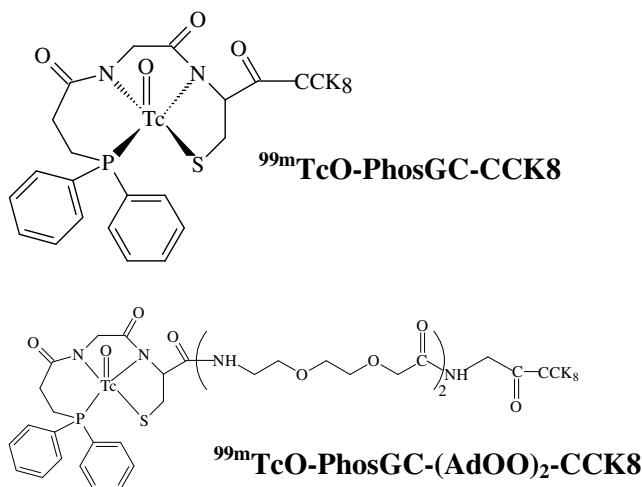
For this reason, several CCK and gastrin derivatives have been developed and fully *in vitro* and *in vivo* studied during this PhD Thesis.

The cholecystokinin C-terminal end peptide (CCK8) and the two gastrin analogs (SMG, small minigastrin and LMG, long minigastrin) have been modified by introducing a linker and a bifunctional chelator able to bind radioactive isotopes such as  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{67/68}\text{Ga}$  e  $^{111}\text{In}$ . *In vitro* and *in vivo* studies have been done on all radiolabelled peptides.

Technetium and Indium are gamma-emitting isotopes used for diagnostic nuclear medicine (SPECT), they are easily available.  $^{99m}\text{Tc}$  is produced from  $\text{MoO}_4^{2-}$  in a generator, and  $^{111}\text{In}$  is a cyclotron-produced radionuclide by  $^{111}\text{Cd}$ . Gallium-68 is a positron-emitting isotope so it can be used in PET applications.

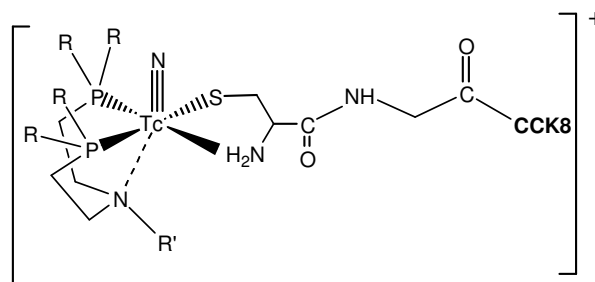
CCK8 has been modified by introducing appropriate bifunctional chelating agents and then radiolabelled with all three radioactive metal ions to form highly stable complexes.

Compounds showed in the figure below contains the N-(N-(3-diphenylphosphinopropionyl)glycyl) cysteine ligand (PhosGC), whose coordination set (PNNS) is made by the phosphorus of the phosphine, the nitrogen atoms of the two amido groups and the sulphur of the cysteine. Peptides synthesis has been carried out in solid phase under standard conditions using the Fmoc protocol. Peptides are coupled, in solid phase, at N-terminus with the chelating agent with high affinity toward oxo-technetium obtaining  $^{99m}\text{TcO-PhosGC-CCK8}$  and  $^{99m}\text{TcO-PhosGC-(ADOO)}_2\text{-CCK8}$ . The second complex has been synthesized by introducing two linkers between the chelating moiety and the bioactive CCK8 peptide, in order to increase the hydrophilicity of the CCK8 derivative.

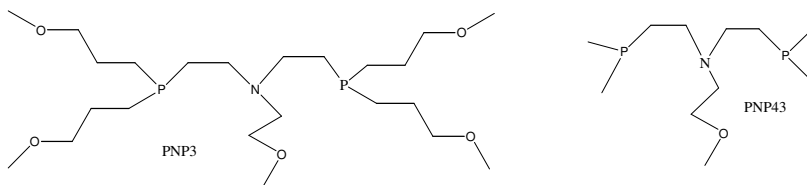


Complexes have been evaluated for their potential as radiopharmaceutical through characterization of their binding specificity and affinity, cellular internalization and retention in cell cultures overexpressing CCKB-R as well as their *in vivo* biodistribution properties in xenograft bearing nude mice. Both compounds show high affinity for the CCKB-R with  $K_d$  in the order of  $10^{-8}$ M. Phos-GC-(AdOO)<sub>2</sub>-CCK8 shows improved tumor targeting and faster clearance through the kidneys than Phos-GC-CCK8.

Two more compounds have been synthesized and studied *in vitro* and *in vivo*. In this chelating system (figure below) cysteine binds the  $[\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$  moiety through the  $[\text{NH}_2, \text{S}]$  pair to yield the corresponding mixed isomeric compound with high specific affinity.



Two PNP ligands have been evaluated:



Two experimental procedures have been evaluated to obtain the two radiolabeled complexes: two-steps procedure a) involved the preliminary production of a mixture of  $^{99m}\text{Tc}$ -nitrito precursor, all containing the core  $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$  through the reduction of pertechnetate with  $\text{SnCl}_2$  in the presence of SDH (succinic dihydrazide) as donor of the nitride nitrogen atom. In the second step, the diphosphine and the bidentate NS-Cys-Gly-CCK8 ligand were simultaneously added to the reaction vial to afford, after 30 min



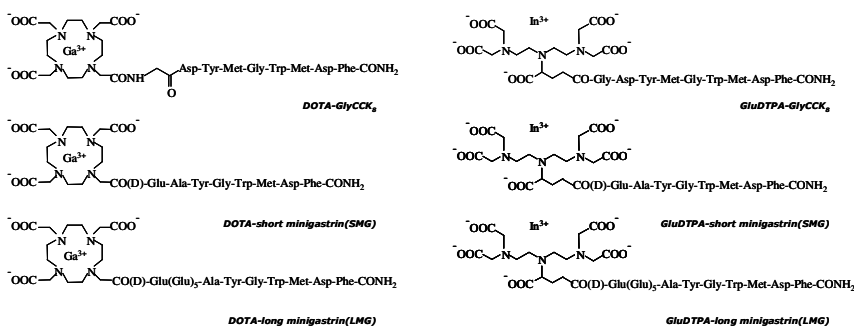
at 80 °C, the final mixed compound in high yield; one-step procedure b) was carried out through the addition of a fresh pertechnetate solution to the vial containing the following reagents: SnCl<sub>2</sub>, SDH, PNP3 (PNP43) and peptide ligand.

*In vitro* studies showed high binding affinity for CCKB receptor. *In vivo* studies on the (<sup>99m</sup>Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3))<sup>+</sup> conjugate showed the capability of the compound to target tumor cells.

In this study, also the bifunctional chelator DOTA has been used for its particular ability in binding <sup>67</sup>Ga e <sup>68</sup>Ga and its radiopharmaceutical applications (SPECT and PET applications). The full DOTA-CCK8 analog has been synthesized by solid phase. [<sup>67/68</sup>Ga]DOTA-G-CCK8 shows rapid specific binding to A431 cells overexpressing the CCKB-R. In biodistribution experiments, the conjugate gives high level targeting of CCKB receptor overexpressing xenografts 1h after injection and it shows low kidney retention. Accumulation of [<sup>67/68</sup>Ga]DOTA-G-CCK8 in the other organs, including liver, has been negligible and appeared to decrease in parallel to blood clearance of the compound.

A number of minigastrin analogs, (DOTA-SMG and DTPAGlu-SMG, DOTA-LMG and DTPAGlu-LMG) have been also synthesized as reported in the following figure. One or six glutamic acid residues have been linked at the N-terminal end of the minigastrin sequence to increase the peptide hydrophilicity and to improve the in-vivo biodistribution.

DOTA-SMG and DOTA-LMG have been labelled with <sup>68</sup>Ga, while DTPAGlu-SMG and DTPAGlu-LMG have been labelled with <sup>111</sup>In. DTPAGlu is a linear chelating agent, endowed with one carboxylic group more than DTPA molecule.



Saturation experiments with  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-DGlu(1)-minigastrin (SMG),  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-DGlu-Glu(5)-minigastrin (LMG) and  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-CCK8 on receptor expressing A431 cells shows similar binding affinities ( $K_d > 10^{-8}\text{M}$ ). Biodistribution experiments shows that targeting levels of  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-LMG on CCKB-R overexpressing xenografts are higher than that obtained either with  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-SMG or with  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-CCK8. High retention levels (10-20 folds), however, has been observed in kidneys with  $^{111}\text{In}$ -GluDTPA-LMG as compared to the other two compounds.

Furthermore, saturation experiments with  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-SMG and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-CCK8 on CCKB-R A431 cells shows a comparable binding affinity. Biodistribution assays also shows similar targeting levels of CCK2-R xenografts by  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-CCK8 ( $2.1 \pm 0.4\% \text{ID/g}$  at 1h) and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-SMG ( $2.2 \pm 0.6\% \text{ID/g}$  at 1h) as compared to the respective control xenografts (both  $< 0.5\% \text{ID/g}$  at 1h). A significant radioactivity uptake in kidneys has been observed using  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-SMG ( $2.4 \pm 0.1\% \text{ID/g}$  at 1h).

All the  $^{111}\text{In}$  labelled compounds show accumulation levels in kidneys higher than that observed in CCKB-R expressing tumour xenografts. The  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-CCK8 and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-SMG preferentially accumulated in the CCKB-R overexpressing cells.

In conclusion, this study indicate that the characteristics of Ga-DOTA-CCK8 are favourable for *in vivo* targeting of CCKB receptor. This compound appears suitable for imaging CCK receptor positive tumors and may potentially be utilized for radiolabeled peptide therapy with  $^{90}\text{Y}$  or other beta-emitting radiometals.

# INTRODUZIONE

## 1.1 I RADIOFARMACI

Nel corso dell'ultimo ventennio sono stati fatti straordinari progressi scientifici nel campo della biologia molecolare e cellulare che hanno sostanzialmente modificato gli approcci diagnostici e terapeutici di molte patologie umane. La scoperta dei meccanismi molecolari responsabili dell'insorgenza dei processi patologici e la continua identificazione di nuovi bersagli molecolari hanno dato un notevole contributo alle numerose sperimentazioni farmaceutiche e biomediche con l'introduzione di metodiche innovative di "imaging" molecolare per evidenziare processi biologici e metabolici "in vivo", particolarmente nel settore oncologico. Tali tecniche si basano sulla produzione di radiofarmaci, vale a dire di quelle "sonde" molecolari marcate con radionuclidi, in grado di evidenziare e misurare processi biochimici e metabolici. Le sonde sono costituite principalmente da piccole molecole organiche o inorganiche con composizione definita, ma possono essere anche delle macromolecole come per esempio anticorpi monoclonali e anticorpi umanizzati che sono radiomarcate in modo non stechiometrico con un radionuclide.

I radiofarmaci, a seconda delle loro applicazioni mediche, possono essere utilizzati in diagnostica e in terapia e possono essere classificati in base alle loro caratteristiche di biodistribuzione. Quest'ultima è determinata esclusivamente dalle proprietà chimiche e fisiche dei radiofarmaci e dal binding con il proprio recettore (radiofarmaci target-specifici) o da altre interazioni biologiche.

I radiofarmaci utilizzati nella diagnostica sono molecole marcate con isotopi gamma-emettitori per la tomografia ad emissione di singolo fotone (SPECT o  $\gamma$ -scintigrafia) o isotopi emettitori di positroni per la tomografia ad emissione di positroni (PET) e somministrate a dosi basse, nell'ordine di  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  M, alle quali non hanno alcun effetto farmacologico. La funzione di questi radiofarmaci è di evidenziare dettagliatamente la struttura morfologica degli organi o dei tessuti bersaglio e più di

tutto permettere di valutare la funzione fisiologica dell'organo/tessuto bersaglio attraverso l'accumulo del "radiotracciante".

Lo stesso principio può essere applicato per curare la malattia veicolando il radionuclide direttamente sul tumore in modo da sviluppare dosi di radiazioni letali per le cellule tumorali. Per tale scopo vengono utilizzati metalli beta-emettitori.

Lo sviluppo di radiofarmaci per entrambi gli scopi ha suscitato un crescente interesse ed ha portato alla produzione di numerosi articoli scientifici inerenti alla radiochimica ed al suo ruolo in medicina, con particolare enfasi per la diagnosi e la cura dei tumori (Lister-James et al., 1997; Shuang and Scott, 2001; Heron et al., 2003; Aloj and Morelli, 2004;).

Per molti anni lo sviluppo di sonde radiomarcate altamente specifiche per il legame a molecole bersaglio si è basato sull'utilizzo di anticorpi monoclonali (MoAbs) diretti contro antigeni tumorali (Hellstrom et al., 1980). Infatti, la loro diversità, specificità e la loro attività biologica hanno fatto sì che fossero considerati molecole ideali per applicazioni sia in patologie benigne sia in patologie maligne (Serafini, 1993). Tuttavia, diversi fattori possono influenzare la loro specificità di legame alla molecola bersaglio: l'immunogenicità degli anticorpi murini nell'uomo, la reattività incrociata con altri antigeni, la perdita di immunoreattività dopo la coniugazione con i radionuclidi, la limitata diffusione degli anticorpi attraverso i vasi sanguigni dovuta al loro alto peso molecolare e di conseguenza la ridotta accessibilità agli antigeni bersaglio (de Bie et al., 1992; Khaw, 1993; Fischman et al., 1993). Purtroppo, gli anticorpi monoclonali, nonostante siano state sviluppate nuove metodologie per migliorarne la specificità, non hanno raggiunto un promettente sviluppo in medicina nucleare (Hnatowich, 1990; de Bie et al., 1992) a causa del loro basso accumulo nel tumore. Mediante tecniche di ingegneria genetica sono stati creati MoAbs modificati per ottimizzarne le proprietà biochimiche come i frammenti Fab' and F(ab)'2 per aumentarne la specificità e ridurre il peso molecolare, gli anticorpi chimerici ed umanizzati per evitare la produzione di anticorpi anti-topo, ma i risultati non sono stati corrispondenti alle aspettative (Serafini, 1993; Fischman et al., 1993).

Più recentemente, con la scoperta di alcune classi di recettori, sulla membrana cellulare di vari tipi di tumori umani, in grado di legare ad alta affinità piccoli peptidi (Merrifield, 1997) sono state avviate numerose ricerche sullo sviluppo di nuovi

radiofarmaci particolarmente efficaci per la diagnosi e cura di varie patologie, basati su peptidi in grado di legare il proprio recettore “*in vivo*” (Miller, 1993; Thakur, 1995; Lister-James et al. 1997; Wentworth, 1999; Liu and Edwards 1999; Boerman et al., 2000; Signore, et al., 2001; Heron et al., 2003; Aloj and Morelli, 2004).

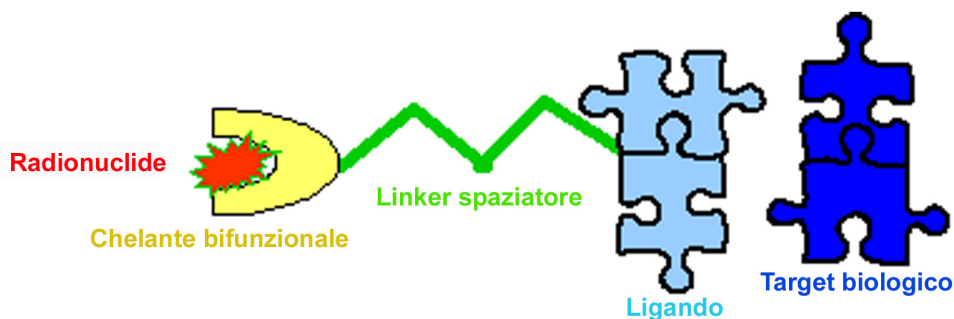
## 1.2 I PEPTIDI RADIOMARCATI

Lo studio di peptidi radiomarcanti che legano specificamente determinati recettori espressi sulla membrana cellulare fornisce un nuovo mezzo mediante il quale è possibile caratterizzare strutture cellulari, tessuti e organi “*in vivo*”. La maggior parte dei peptidi utilizzati in medicina nucleare sono costituiti da un numero di amminoacidi relativamente piccolo, spesso minore di 25. Pertanto, a differenza delle proteine e degli anticorpi essi hanno un basso peso molecolare, in genere minore di 8,000 kDa, e non hanno una struttura terziaria ben definita. I peptidi, inoltre, possono essere facilmente sintetizzati chimicamente, opportunamente stabilizzati e modificati per ottenere dei parametri farmacocinetici ottimali che, insieme all’alta affinità e specificità per le molecole bersaglio, contribuiscono alla rapida penetrazione dei tessuti tumorali, alla facile eliminazione dall’organismo ed alla bassa antigenicità. La stabilizzazione, effettuata principalmente per prevenire la digestione proteolitica all’interno dell’organismo, è ottenuta con diverse modificazioni chimiche quali ad esempio: N-metilazione o amidazione al C-terminale, ciclizzazione, utilizzo di D-aminoacidi o aminoacidi modificati, sostituzione di un amino gruppo con un immino gruppo, ecc.. La specificità dei peptidi nel veicolare i radionuclidi sul tessuto bersaglio e la rapidità di eliminazione dagli altri organi (particolarmente dai reni) può essere ottimizzata mediante l’introduzione di amminoacidi idrofilici o lipofilici per modificare il percorso di eliminazione senza alterare le proprietà di binding. L’introduzione di amminoacidi idrofilici favorisce l’eliminazione dei peptidi radiomarcanti attraverso i reni mentre nel caso venga aumentata la lipofilità è favorita l’eliminazione epatobiliare. La stessa radiomarcatura può portare ad una variazione nella lipofilità e nella carica totale con conseguenze sulla biodistribuzione e sulla cinetica (Lister-James et al., 1997). Per ottimizzare il targeting specifico è opportuno utilizzare una quantità ridotta di peptide

in modo da ridurre gli effetti farmacologici indesiderati e i siti di saturazione del recettore.

### 1.3 PROGETTAZIONE DI UN RADIOFARMACO

Attualmente la procedura ottimale per la sintesi di una sonda peptidica radiomarcata, che abbia alta specificità e alta affinità recettoriale, è conosciuta come “approccio bifunzionale” in cui si utilizza una biomolecola (ligando, BM) con elevata affinità recettoriale a cui è legato, mediante un linker spaziatore, un chelante bifunzionale (BFC) per la coniugazione del ligando e per la chelazione del radiometallo. Il gruppo chelante deve essere legato covalentemente alla biomolecola in un punto irrilevante per il binding così da preservarne le sue proprietà biologiche. (Fig. 1).



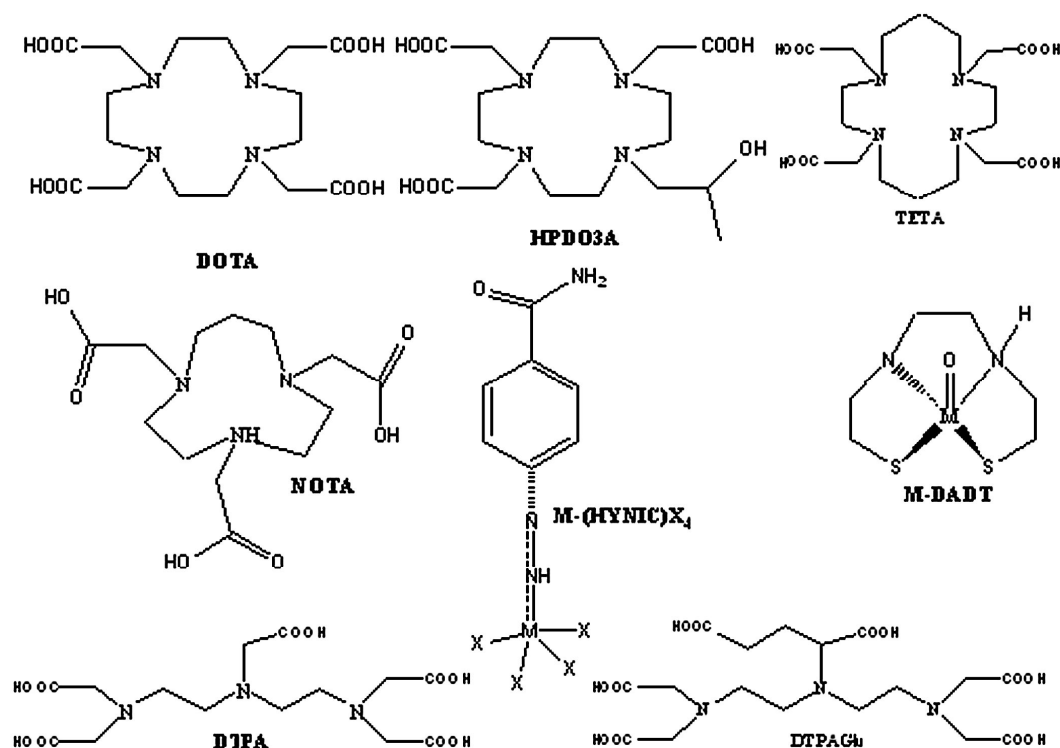
**Fig.1:** Schema di una generica sonda peptidica radiomarcata: il peptide (ligando) agisce come carrier per il target biologico specifico grazie alla sua selettiva affinità nel legare il recettore (target biologico). Tra il peptide e il chelante bifunzionale è inserito uno spaziatore (linker).

La scelta del chelante bifunzionale (BFC) è determinata principalmente dalla natura del radiometallo e dal suo stato di ossidazione. Un chelante bifunzionale ideale dovrebbe garantire la formazione di un complesso con alta resa e a concentrazioni molto basse del coniugato BFCA-BM. Tale complesso non deve sottostare a reazioni di ossidoriduzioni, deve essere termodinamicamente stabile e cineticamente inerte e presentare un basso numero di isomeri. Ciascuno di questi parametri, infatti può notevolmente influenzare le caratteristiche biologiche e farmacocinetiche del coniugato BFCA-BM.

Il chelante può essere modificato in modo da avere una elevata idrofilicità per aumentarne l'eliminazione attraverso i reni sia del coniugato BFC-BM radiomarcato sia di quello libero. Infatti una veloce eliminazione renale del BFC-BM minimizza la sua competizione con il BFC-BM radiomarcato per il recettore.

La strategia più semplice per aumentare la stabilità termodinamica e l'inerzia cinetica del complesso metallico è utilizzare un chelante polidentato. Questo dipende dalla grandezza e dalla geometria di coordinazione dello ione metallico, come per esempio l'ittrio e gli ioni metallici lantanidi che essendo grandi hanno bisogno di 8-9 atomi donatori per completare la sfera di coordinazione.

Nell'ultimo decennio sono stati utilizzati molti chelanti bifunzionali aciclici e macrociclici per la radiomarcatura di peptidi e di anticorpi (Fig. 2) (Liu et al., 2003). I chelanti maggiormente utilizzati sono il DTPA (acido dietilen-diamino-pentaacetico) ed il DOTA (1,4,7,10-acido tetraazociclododecanotetracetico).



**Fig.2:** Agenti chelanti più comunemente utilizzati: ligandi poliamminopolicarbossilici ciclici (come il DOTA, in alto a sinistra) o ramificati (come il DTPA, in basso a sinistra) e loro derivati. Gli agenti chelanti come (HYNIC)X e DADT sono in grado di legare metalli del gruppo VII della tavola periodica e vengono utilizzati per formare complessi stabili principalmente con <sup>99m</sup>Tc(V), <sup>186</sup>Re(V) e <sup>188</sup>Re(V).

L'elevata efficienza di radiomarcatura (veloce e con buona resa) in condizioni blande rappresenta il maggiore vantaggio nell'utilizzo di analoghi di DTPA (Keire et al., 1999) anche se spesso la labilità cinetica porta ad una tossicità dovuta al metallo radiattivo libero. Al contrario il DOTA presenta un'elevata inerzia cinetica ma una bassa cinetica di radiomarcatura dipendente da diversi fattori: dalle condizioni di radiomarcatura (Stimmel et al., 1995, Keire and Kobayashi, 1999), dalla concentrazione del coniugato con il DOTA, dal pH, dalla temperatura di reazione e dalla durata di reazione, dal buffer utilizzato, dalla sua concentrazione e dalla presenza di altri ioni metallici come  $Fe^{3+}$  e  $Zn^{2+}$ . L'utilizzo di una temperatura elevata per ottenere una buona efficienza di marcatura può essere utile per piccoli peptidi che non si degradano con il calore, mentre per anticorpi monoclonali si può generare bassa immunoreattività del bioconiugato marcato. Sebbene i peptidi funzionalizzati con il DOTA diano dei complessi metallici molto stabili in soluzione, la bassa cinetica di radiomarcatura è il maggiore ostacolo che limita il vasto sviluppo di biomolecole contenenti DOTA come chelante bifunzionale. Il chelante DTPAGlu è un ottimo compromesso tra il DOTA e il DTPA perché avendo cinque funzioni carbossiliche libere è in grado di legare il metallo radioattivo formando dei complessi più stabili rispetto agli altri due chelanti descritti.

Nelle applicazioni diagnostiche o terapeutiche un aspetto fondamentale è la massimizzazione del rapporto "target to background" (rapporto segnale/rumore) che nell'utilizzo dei peptidi radiomarcati è influenzato da diversi fattori: 1) il peptide radiomarcato deve avere alta affinità di interazione con la molecola bersaglio (recettore, antigene, ecc.), che può essere overespressa in modo da favorire il legame tra il radiofarmaco e la molecola bersaglio anche a concentrazioni relativamente basse; 2) Il binding non specifico, che è influenzato dalle proprietà chimiche del radiofarmaco, deve essere basso. Per esempio molti composti lipofili hanno la tendenza ad accumularsi nel fegato, per cui il radiofarmaco non riesce a raggiungere l'organo bersaglio creando elevati livelli di radioattività in organi non-bersaglio. Oppure il radiotracciante presenta alti livelli di binding alle proteine plasmatiche che gli impediscono di raggiungere l'organo bersaglio. 3) La stabilità del radiofarmaco, dopo l'iniezione, deve essere conservata per un tempo adeguato. L'azione di numerosi fattori presenti nel plasma potrebbero causare la decomposizione del composto e creare



metaboliti radiattivi che hanno diverse proprietà biologiche rispetto al radiofarmaco iniziale. Questo è particolarmente importante per i peptidi perché le proteasi possono rapidamente rompere il legame peptidico formando sequenze peptidiche ben definite. Di conseguenza, la biodistribuzione della radioattività iniettata si baserà sulle proprietà di qualsiasi metabolita a cui è legato il radioisotopo. 4) Il processo di radiomarcatura deve portare alla formazione di un radioisotopo stabile che sia legato alla molecola carrier. I composti radiomarcati con tecnezio o renio sono soggetti a ossidazione del radiometallo con un effetto simile. In questo caso si potrebbero avere problemi simili a quelli osservati con un eccessivo catabolismo del composto carrier. 5) Il radiofarmaco deve raggiungere l'organo bersaglio rapidamente pertanto i composti ottimali sono quelli a basso peso molecolare che possono facilmente diffondere dai vasi sanguigni alla regione extracellulare. 6) L'eliminazione dall'organismo deve essere rapida. Il composto deve essere presente nel plasma per il tempo adeguato ad interagire con il tessuto target ma dopo deve essere rapidamente eliminato dal sangue in modo da ridurre il livello di background di radioattività in circolo. 7) La via di eliminazione del radiotracciante non legato non deve interferire nella visualizzazione dell'organo target e non deve causare problemi di tossicità agli organi critici. L'escrezione avviene principalmente attraverso le vie urinarie o attraverso il sistema epatobiliare. In generale la via renale è preferibile perché più rapida e la maggior parte di radioattività viene eliminata attraverso le urine. L'escrezione epatobiliare causa accumulo di radioattività nel tratto gastrointestinale che può interferire nella visualizzazione degli organi addominali.

Per rispondere a tutti i requisiti appena descritti devono essere seguiti diversi passaggi per lo sviluppo di un peptide radiomarcato, come riportato in figura 3:

La prima fase consiste nell'individuare il bersaglio recettoriale, nell'analizzarne il livello di espressione nel tumore, e nello studio delle proprietà del ligando peptidico endogeno, si procede poi ad individuare dei potenziali analoghi con una maggiore stabilità *in vivo* e, se necessario, con più alta affinità recettoriale e selettività. Dopo aver valutato lo ione metallico radioattivo ed il chelante bifunzionale più idoneo, ed ancora i potenziali siti di legame sul peptide che non ne compromettono il binding con il recettore, è possibile procedere con la sintesi del coniugato peptidico. Quest'ultimo deve essere caratterizzato per le sue capacità di labelling, per i parametri strutturali e

per la capacità di legare frammenti di recettore, mediante studi chimico-fisici. Seguono poi studi *in vivo* ed *in vitro* per determinare l'internalizzazione nelle cellule, la biodistribuzione e qualità dell'immagine. Il migliore composto, dopo averne valutato la tossicità, sarà prodotto in condizioni standard controllate GMP (Good Manufacturing Practice) per essere utilizzato nei pazienti in fase clinica I per confermare il suo utilizzo clinico come radiofarmaco.

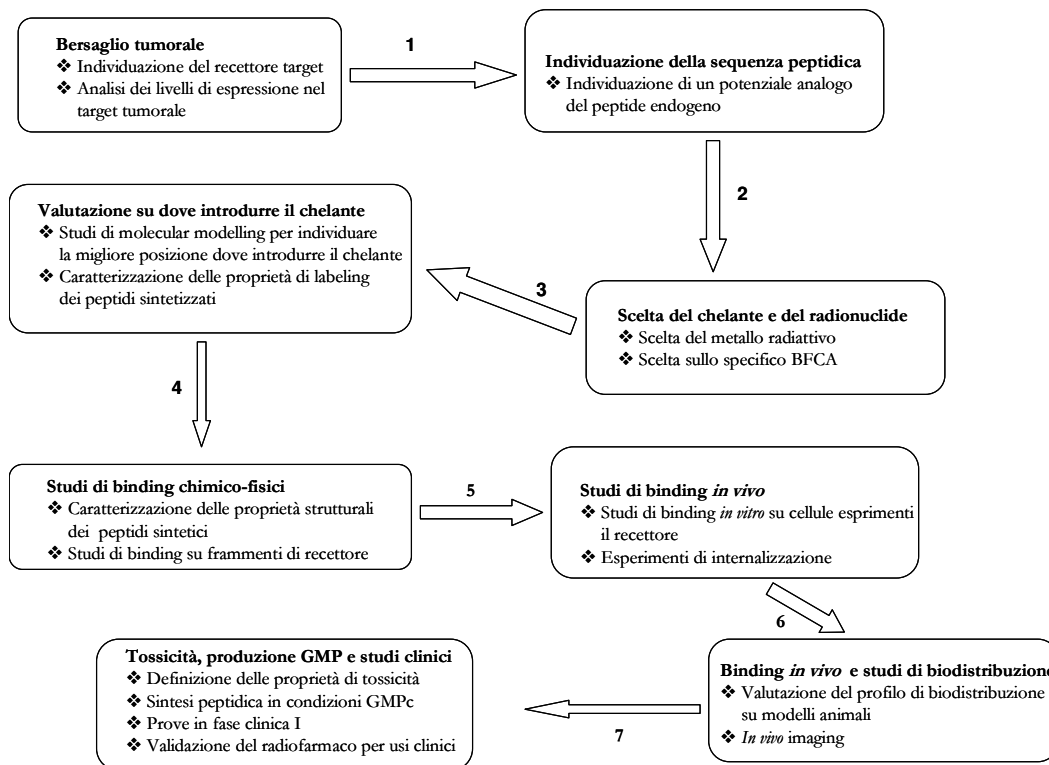


Fig.3: Schema riassuntivo dello sviluppo di un peptide radiomarcato.

## 1.4 METALLI RADIATIVI

I peptidi vengono radiomarcati con diversi radioisotopi sia non metallici, come  $^{127}\text{I}$  e  $^{131}\text{I}$ , sia metallici come  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  ecc. Sulla tabella periodica illustrata in Figura 4 sono evidenziati gli isotopi radiattivi che hanno un potenziale uso in medicina nucleare, in rosso sono riportati gli emettitori di radiazioni gamma, che sono utilizzati a scopo diagnostico mediante gamma-scintigrafia; in giallo sono rappresentati gli

elementi emettitori di positroni, utilizzati nella PET, mentre in verde i beta emettitori utilizzati in terapia.

IA																		VIIA
H	IIA																H	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg	IIB	IVB	VB	VIB	VIIIB	VIIIIB				IB	IIB	Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac	Ku	Ha	106	107	108	109										

Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

<span style="color: red;">■</span>	Elemento con isotopo emettitore di raggi $\gamma$	<span style="color: orange;">■</span>	Elemento con isotopo emettitore di particelle $\alpha$
<span style="color: green;">■</span>	Elemento con isotopo emettitore di elettroni (particelle $\beta$ )	<span style="color: yellow;">■</span>	Elemento con isotopo emettitore di positroni

**Fig 4:** Tabella periodica riportante tutti gli isotopi radiattivi aventi potenziale utilizzo in medicina nucleare. Gli elementi sono colorati in modo diverso a secondo delle proprietà dell'isotopo radioattivo: gli elementi gamma emettitori sono colorati in rosso e sono utilizzati nella gamma-scintigrafia; gli elementi emettitori di positroni, utilizzati nella PET, sono riportati in giallo, mentre gli elementi emettitori di particelle beta, utilizzati per la terapia, sono colorati in verde. Alcuni elementi presentano più isotopi perciò possono essere utilizzati in diverse applicazioni.

Alcuni elementi, come Ga, Cu e I, presentano diversi isotopi pertanto possono essere utilizzati in differenti applicazioni facilitandone lo sviluppo per uso clinico. Le proprietà chimiche di tali isotopi non cambiano e di conseguenza tutte le fasi di sviluppo del radiofarmaco, per esempio le procedure di radiomarcatura, la valutazione della stabilità chimica, la valutazione di tossicità ecc., possono essere messe a punto una sola volta utilizzando l'elemento freddo o l'isotopo gamma emettitore. Mentre, l'attività farmacologica della molecola cambia secondo l'isotopo utilizzato per la radiomarcatura.

I radionuclidi metallici sono particolarmente interessanti per lo sviluppo di radiofarmaci per le numerose proprietà nucleari (emivita, tipo di radiazione, emettitori di raggi gamma e di particelle beta) e per la loro ricca chimica di coordinazione. In

tabella 1 e 2 sono riportate le caratteristiche fisiche di alcuni radioisotopi maggiormente utilizzati in medicina nucleare.

**Tabella 1:** emettitori gamma

$^{99m}\text{Tc}$	$t_{1/2} = 6.02 \text{ h}$	$E\gamma = 140 \text{ keV}$
$^{201}\text{Tl}$	$t_{1/2} = 73 \text{ h}$	$E\gamma = 68 \text{ keV}$
$^{67}\text{Ga}$	$t_{1/2} = 78.3 \text{ h}$	$E\gamma = 93 \text{ keV}, 185 \text{ keV}, 300 \text{ keV}$
$^{111}\text{In}$	$t_{1/2} = 67,9 \text{ h}$	$E\gamma = 171 \text{ keV}$
$^{123}\text{I}$	$t_{1/2} = 13 \text{ h}$	$E\gamma = 159 \text{ keV}$

**Tabella 2:** emettitori di positroni

$^{18}\text{F}$	$t_{1/2} = 110 \text{ m}$	$E\gamma = 511 \text{ keV}$
$^{82}\text{Rb}$	$t_{1/2} = 1.3 \text{ m}$	$E\gamma = 511 \text{ keV}$
$^{13}\text{N}$	$t_{1/2} = 10 \text{ m}$	$E\gamma = 511 \text{ keV}$
$^{11}\text{C}$	$t_{1/2} = 20.4 \text{ m}$	$E\gamma = 511$
$^{68}\text{Ga}$	$t_{1/2} = 68 \text{ m}$	$E\gamma = 511$

Tra gli emettitori di raggi gamma il  $^{99m}\text{Tc}$ , per le sue ottimali caratteristiche fisiche e dosimetriche, ampia disponibilità (si ottiene dal generatore  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  sottoforma di  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) e relativo basso costo, è il marcatore più utilizzato in medicina nucleare (più

del 70% delle applicazioni mediche) la sua emivita (6 h) è lunga abbastanza da preparare il radiofarmaco ed acquisire l'immagine. Nello stesso tempo è corta abbastanza da permettere la somministrazione di un ammontare di millicurie di  $^{99m}\text{Tc}$  senza provocare una elevata dose di radiazione nel paziente.

Una delle caratteristiche del Tc è di avere una ricca chimica di coordinazione e diversi stati di ossidazione. Sebbene lo stato di ossidazione VII del pertecnato  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  sia quello più stabile in soluzione acquosa, si possono ottenere anche altri stati di ossidazione che vanno da Tc(I) a Tc(VII). La stabilità degli stati di ossidazione dipende dall'agente riducente, dal chelante e dalle condizioni di reazione. Sotto forma di pertecnato il Tc non è in grado di legare altre specie chimiche; grazie all'uso di sostanze riducenti come per esempio il cloruro stannoso, si è però in grado di trasformarlo in una specie con carica positiva solitamente IV, ma anche I, III, V, che sarà in grado di complessare una grande varietà di ligandi, formando complessi metallici di coordinazione.

Altri due radioisotopi, emettitori di raggi gamma, ampiamente utilizzati negli studi radiofarmaceutici sono l' $^{111}\text{In}$  e il  $^{67}\text{Ga}$ . Il primo è prodotto mediante generatore  $^{111}\text{Cd} - ^{111}\text{In}$  mentre il secondo per reazione nucleare dallo  $^{68}\text{Zn}$ . Nelle condizioni fisiologiche, il solo stato di ossidazione in soluzione acquosa per entrambi è +3 ed è lo stesso rilevante per la chimica radiofarmaceutica. La complessazione di Ga(III) e In(III) è dominata da atomi donatori come ossigeno, azoto e zolfo. I due isotopi hanno una chimica di coordinazione ben stabilita il cui numero di coordinazione può variare da 3 a 6 e dipende dal ligando. L'In(III) può formare anche complessi epta-coordinati. I complessi del Ga(III) e dell'In(III) sono molto stabili all'idrolisi e sono più stabili rispetto ai complessi degli stessi metalli con la transferrina. I ligandi che formano complessi più stabili sono generalmente multidentati e contengono gruppi carbossilici, amminici o tiolici.

Tra gli emettitori di positroni il  $^{18}\text{F}$  è utilizzato in più dell'80% di applicazioni PET. Infatti il  $^{18}\text{F}$  nell'FDG (fluorodeossiglucosio) è diventato molto importante nell'evidenziare masse tumorali e nel monitorare il progresso della malattia nel trattamento utilizzando la PET. Più recentemente il radioisotopo  $^{68}\text{Ga}$ , un emettitore di positroni, facilmente ottenibile mediante generatore  $^{68}\text{Ge} - ^{68}\text{Ga}$  e le cui caratteristiche

chimico-fisiche sono del tutto simili a quelle del  $^{67}\text{Ga}$ , viene utilizzato nella PET che è una tecnica più innovativa della medicina nucleare.

### **1.5 PEPTIDI RADIOMARCATI NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE UMANE: NEUROLOGIA, CARDIOLOGIA, INFEZIONI ED INFIAMMAZIONE, ATEROSCLEROSI E TROMBOSI**

Molti peptidi insieme ai loro sistemi recettoriali sono stati studiati sia *in vitro* (mediante caratterizzazione biochimica e biologica su sistemi cellulari) sia *in vivo* (su modelli murini e sull'uomo) e sono stati proposti come potenziali traccianti radiomarcanti per la diagnosi e la terapia di patologie umane (Tabella 3).

Il loro utilizzo nei vari sistemi ed organi ha dato risultati molto diversificati. L'utilizzo dei peptidi radiomarcanti per l' "imaging" molecolare in campo neurologico ha avuto notevoli limitazioni per la difficoltà a superare la barriera emato-encefalica delle molecole con un peso molecolare superiore a 600 kDa (Wolf et al., 1993). Inoltre, molti peptidi contengono aminoacidi carichi elettricamente e non possono superare la barriera. Un esempio della limitazione del peso molecolare è rappresentato dall'utilizzo dello pseudo-tetrapeptide radioiodinato con un peso molecolare di 747 kDa che sebbene avesse un moderato-alto "uptake" e specificità di legame sugli organi periferici esprimenti i recettori bersaglio l'uptake nel cervello rimaneva basso (0.07% ID/g a 1 h). Tuttavia, nonostante le ben note limitazioni, i nuovi obiettivi di ricerca mirano a legare i piccoli peptidi a proteine endogene complesse, come la transferrina, che sono attivamente trasportate attraverso la barriera ematoencefalica.

**Tabella 3.** Peptidi radiomarcati utilizzati in medicina nucleare per la diagnosi e la terapia di patologie umane

<b>Campo di interesse</b>	<b>Peptide</b>	<b>Isotopo</b>	<b>Referenze</b>
Neurologia	ANF analogues	$^{123}\text{I}$	(Wolf et al., 1993)
	$\beta$ -Amyloid	$^{125}\text{I}$	(Saito et al., 1995)
	ITIPP	$^{125}\text{I}$	(Collier et al., 2001)
Cardiologia	Annexin V	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Hofstra et al., 2000; Blankenberg et al., 1998 ; Narula et al., 2000)
	Octreotide	$^{111}\text{In}$	(Aparici et al., 2000)
	Endothelin analogues	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Johannsen et al., 1997; Dinkelborg et al., 1998)
Infezione/ infiammazione	IL-1/IL-1ra	$^{123}\text{I}$	(van der Laken et al., 1998; Barrera et al., 2000)
	IL-8	$^{123}\text{I}$	(van der Laken et al., 2000)
		$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Rennen et al., 2001)
	LTB4	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Brouwers et al., 2000)
	fMLFK	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Hartwig et al., 1999; Edwards et al., 1999)
	DMP444	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Oyen et al., 2000)
	EPI-HNE-2/4	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Hnatowich et al., 1998 ; Rusckowski et al., 2000 ; Qu et al., 2001)
	Antimicrobial peptides	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Welling et al., 2000)
	P483H	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Welling et al., 1999 ; Moyer et al., 1999 )
	IL-2	$^{123}\text{I}$	(Signore et al., 2000a; 2000b)
		$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Chianelli et al., 1997)
Aterosclerosi/ trombosi	Apticide (P280)	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Taillefer et al., 2000)
	P274	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Lister-James et a., 1997)
	TP-1300	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Pallela et al., 1998)
	Bitistatin	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Knight et al., 2000)
	DMP444	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Barrett et al., 1997)
	PAC1	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Knight et al., 1994)
	Annexin V	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Stratton et al., 1995)
	Fibrin alfa-chain	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	(Thakur et al., 2000)

Nel settore cardiologico i peptidi radiomarcati impiegati per l' "imaging" delle malattie cardiache includono l'annexina V, sia iodinata che marcata con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  mediante molecole linker come la diamine dimercaptide ( $\text{N}_2\text{S}_2$ ) o idrazinonicotinamide, octreotide marcata con  $^{111}\text{In}$  ed endoteline radiomarcate. L'annexina V radiomarcata si lega alla fosfatidilserina esposta sulla membrana cellulare, essa è un

fosfolipide anionico normalmente esposto sullo strato interno del doppio strato lipidico della membrana ma è selettivamente esposto sulla superficie di cellule che vanno incontro all'apoptosi (morte programmata della cellula) (van Engeland et al., 1998). L'apoptosi gioca un ruolo cruciale nelle aterosclerosi, danno da ischemia e riperfusione del miocardio, nelle miocarditi autoimmuni e virali e cardiomiopatie non ischemiche (Blankenberg et al., 1999). In queste patologie, l'annessina V radiomarcata con  $^{99m}\text{Tc}$  permette il monitoraggio non invasivo della dinamica della morte cellulare e dell'efficacia della terapia. Hofstra et al. (2000) ha dimostrato che l'annessina V radiomarcata con  $^{99m}\text{Tc}$  veniva accumulata nell'area infartuata (confermata con il classico esame SPECT del miocardio) di sei su sette pazienti con infarto miocardico acuto.

In un modello murino di rigetto acuto di trapianto cardiaco e in pazienti con rigetto al trapianto di cuore la scintigrafia con annessina V radiomarcata con  $^{99m}\text{Tc}$ , era in grado di identificare il rigetto (Blankenberg et al., 1998; Narula et al., 2000). Inoltre, nei ratti, dopo l'inizio della terapia immunosoppressiva con ciclosporine, il miglioramento della fase di rigetto corrispondeva ad una diminuzione del legame dell'annessina marcata con  $^{99m}\text{Tc}$  al tessuto cardiaco. Aparici et al. (2000) ha dimostrato l'accumulo di  $^{111}\text{In}$ -octreotide nel miocardio 4 ore dopo la somministrazione (riflettendo una infiltrazione linfocitaria ed attivazione dei recettori della somatostatina), la predisposizione al rigetto almeno una settimana prima che la biopsia endomiocardica riveli positività per la morte miocitica. L'infiltrazione linfocitaria nel rigetto da trapianto cardiaco può teoricamente essere anche visualizzata con interleuchina-2 radiomarcata (Thedrz et al., 1986). Per la visualizzazione delle cellule della muscolatura liscia o della proliferazione delle cellule endoteliali, per esempio la restenosi dopo angioplastica e/o placche aterosclerotiche, sono di potenziale interesse le endoteline radiomarcate (potenti vasocostrittori peptidici) (Johannsen et al., 1997; Dinkelborg et al., 1998). Tuttavia, è ancora da valutare se nell'uomo l'imaging esterno con questi peptidi avrà una sufficiente risoluzione.

Nella diagnosi delle malattie infettive ed infiammatorie è stata rivolta una particolare attenzione all'uso delle citochine, dei peptidi chemotattici, dei fattori piastrinici, dei derivati del leucotriene, dei derivati degli anticorpi monoclonali e dei traccianti non specifici per studiare l'infiammazione acuta e cronica.



Nell'infiammazione acuta la fagocitosi dei batteri stimola i macrofagi a rilasciare una varietà di mediatori quali le citochine regolatorie come IL-1 e tumour necrosis factor- $\alpha$ , e fattori chemotattici come IL-8 and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalaninylsine (fMLFK), che aumenta la permeabilità capillare e l'espressione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali. I recettori delle citochine sono generalmente espressi a bassi livelli sulle cellule non in divisione; durante l'attivazione la loro espressione può essere aumentata sulla superficie delle cellule coinvolte nel processo infiammatorio. Pertanto, citochine ad alta affinità radiomarcate rappresentano uno strumento promettente nella diagnostica di diverse condizioni patologiche. L'IL1 radiomarcata con  $^{123}\text{I}$  e il suo recettore antagonista (IL-1ra) (van der Laken et al., 1998) sono stati entrambi usati in studi preclinici sull'infiammazione acuta. L'IL-1ra radiomarcato permette la visualizzazione di sinoviti in pazienti con artrite reumatoide (Barrera et al., 2000). Tuttavia, né negli studi di imaging né quelli autoradiografici indicano che l'accumulo di IL-1ra sia dovuto specificamente al legame dell'IL1 al proprio recettore.

Il recettore antagonista del leucotriene-B4 (LTB4) (Brouwers et al., 2000) e il peptide chemotattico fMLFK (Hartwig et al., 1999; Edwards et al., 1999), entrambi marcati con tecnezio, sono stati impiegati in modelli animali per identificare foci di infiammazione. Nell'uomo il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMP444 (un antagonista radiomarcato del recettore IIa-IIIb) ha mostrato risultati incoraggianti per la diagnosi di endocarditi infettive (Oyen et al., 2000).

Recentemente, sono stati utilizzati peptidi antimicrobici radiomarcati, derivati dalla proteina ubiquidina, con lo scopo di distinguere l'infiammazione associata ad una infezione da quella sterile (Welling et al., 1999; 2000). Infine un peptide altamente affine per i leucociti P483H, marcato con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , è stato proposto per la marcatura *in vitro* delle cellule bianche del sangue. Il P483H contiene la regione di legame dell'eparina per il fattore piastrinico 4. La presenza di una sequenza ricca in lisine garantisce una rapida ed esclusiva eliminazione renale, come è stato dimostrato *in vivo* in conigli infettati con E. coli (Moyer et al., 1996). La maggior parte dei peptidi radiomarcati utilizzati per l'imaging dell'infiammazione acuta non si accumulano nei siti di infiammazione cronica. Queste condizioni patologiche sono caratterizzate da una infiltrazione cronica di cellule mononucleate con un piccolo aumento della permeabilità vascolare. Tra i radiofarmaci sviluppati negli ultimi anni l'IL-2 marcata con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ha

creato nuove possibilità per la diagnosi ed il follow-up delle malattie autoimmuni (Chianelli et al., 1997; Signore et al., 2000a; 2000b). I risultati ottenuti con l'utilizzo di IL-2 radiomarcata dimostrano che questo radiofarmaco è in grado di identificare cellule T attivate esprimenti i recettori dell'IL2 nei tessuti interessati. Questo è un passaggio essenziale per la prevenzione e la diagnosi della malattia.

La trombosi e l'embolismo venoso è un'altra condizione in cui l' "imaging" molecolare sta sviluppando un ruolo importante. I peptidi radiomarcati con  $^{99m}\text{Tc}$  recentemente sviluppati per l'imaging della trombosi hanno come bersaglio sia le piastrine attivate (il recettore GPIIb/IIIa e la fosfatidilserina) o la fibrina (porzione C-terminale della catena  $\gamma$  della fibrina). I peptidi radiomarcati che legano il recettore GPIIb/IIIa includono  $^{99m}\text{Tc}$ -P280 (apcptide, Acutect),  $^{99m}\text{Tc}$ -P748,  $^{99m}\text{Tc}$ -TP-1300 (un peptide derivante dal dominio attivo della trombospondina), la bitistatina marcata con  $^{99m}\text{Tc}$  (un polipeptide di 83 amminoacidi isolato dal *Bitis arietans* venom), il DMP444 marcato con  $^{99m}\text{Tc}$  e i prodotti contenenti la regione principale per il legame dell'anticorpo monoclonale PAC1 diretto contro il GPIIb/IIIa radiomarcato con  $^{99m}\text{Tc}$ . La scintigrafia con  $^{99m}\text{Tc}$ -P280 è risultata avere una sensibilità, specificità e concordanza rispettivamente del 90.6%, 83.9% e 87.3% se comparata con la venografia con contrasto per l'identificazione della trombosi in una serie di 243 pazienti (Taillefer et al., 2000). Il P748 marcato con  $^{99m}\text{Tc}$  ha una più lenta farmacocinetica rispetto al P280, però si accumula meglio nei trombi in un modello canino di trombosi venosa profonda (DVT) ed embolismo polmonare. Il TP-1300 marcato con  $^{99m}\text{Tc}$  ha mostrato un alto accumulo nelle piastrine attivate con trombina nei conigli, maiali e cani (Palella et al., 1998). I risultati ottenuti con il DMP444 marcato con  $^{99m}\text{Tc}$  dimostrano che può essere attivamente incorporato nei trombi arteriosi e venosi nei modelli preclinici e nella DVT acuta di pazienti asintomatici. Il suo potenziale clinico è incorso di valutazione in un trial clinico multicentrico (Barrette et al., 1997).

## 1.6 PEPTIDI RADIOMARCATI NELLA DIAGNOSI DELLE PATOLOGIE UMANE ONCOLOGICHE.

L'utilizzo di peptidi radiomarcanti in oncologia fornisce informazioni aggiuntive concernenti le caratteristiche dei tumori rispetto alla tomografia computerizzata, alla risonanza magnetica ed all'ecografia. In molti tumori l'espressione di antigeni patologici o modificati sulla superficie delle cellule o l'over-espressione di recettori di superficie offre una opportunità unica di ottenere uno strumento specifico per scopi diagnostici e terapeutici (Tabella 4).

I peptidi radiomarcanti utilizzati in oncologia sono classificati in due gruppi in accordo al tipo di recettore che essi legano: i) i radioligandi dei recettori legati a proteine G (GPCR); ii) radioligandi del recettore delle tirosine-kinasi; e iii) altri peptidi radiomarcanti

### *i) I radioligandi dei recettori legati a proteine G (GPCR)*

A questo gruppo di radiofarmaci appartengono gli analoghi della somatostatina. Essi sono formati da una famiglia di due peptidi, uno ciclico di 14 amminoacidi e uno di 28 amminoacidi. Gli analoghi della somatostatina esercitano molte funzioni fisiologiche sia sul sistema nervoso centrale sia nel tratto gastrointestinale e giocano un importante ruolo nell'inibizione della crescita del tumore. L'azione della somatostatina è mediata da specifici recettori situati sulla membrana plasmatica di specifiche cellule target; ne sono stati identificati cinque sottotipi (sst<sub>1</sub>, sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub>, sst<sub>4</sub>, sst<sub>5</sub>) che sono overespressi in molti tumori principalmente di origine neuroendocrina, pertanto vengono studiati come potenziali bersagli per analoghi radiomarcanti della somatostatina.

Entrambi i peptidi mostrano una elevata affinità per i loro recettori ma essendo degradati rapidamente *in vivo* sono stati sviluppati nel corso degli anni analoghi più resistenti alla degradazione biologica. L'ottapeptide ciclico analogo della somatostatina, octreotide marcato con <sup>111</sup>In (Octreoscan), è stato introdotto nella pratica clinica nel 1994 ed è comunemente utilizzato per visualizzare vari tumori e tessuti positivi per il recettore della somatostatina. Il primo analogo utilizzato *in vivo* per l'imaging

recettoriale è stato il Tyr<sup>3</sup>-octreotide radioiodinato, che ha evidenziato alti livelli di recettori della somatostatina in molti tumori endocrini

**Tabella 4.** Peptidi radiomarcanti utilizzati in medicina nucleare per la diagnosi e la terapia dei tumori umani

Peptide	Isotopo	Referenze
Octreotide	<sup>99m</sup> Tc	(Decristoforo et al, 1999; 2000a, 2000b, 2000c; Bangard et al., 2000)
	<sup>111</sup> In	Angeletti et al., 1998; Leners et al., 1996; Krenning et al., 1994a; 1994b; Kwekkeboom et al., 1996; Oppizzi et al., 1998; Signore et al., 1995; Maini et al., 1995; Fletcher et al., 1995; van Eijck et al., 1998; Decristoforo et al, 1999; 2000a, 2000b, 2000c; Bangard et al., 2000
	<sup>90</sup> Y	Waldherr et al., 2000; Paganelli et al., 1999
Depreotide	<sup>99m</sup> Tc	(Blum et al., 1999; 2000)[19], [20]
Vapreotide	<sup>99m</sup> Tc	(Thakur et al., 1997)
VIP	<sup>123</sup> I	(Virgolini et al., 1996; 1998; Raderer et al., 1998a; 1998b; Kurtaran et al., 1996)
	<sup>99m</sup> Tc	(Thakur et al., 2000)
CCK analogues	<sup>111</sup> In	(Kwekkeboom et al., 2000; de Jong et al., 1999; Behr et al., 1999)
Bombesin analogues	<sup>99m</sup> Tc	(Karra et al., 1999)
IGF	<sup>125</sup> I	(McAfee et al., 2000)
RGD-containing peptides	<sup>125</sup> I	(Haubner et al., 1999; 2001)
MSH analogues	<sup>99m</sup> Tc	(Chen et al., 2000; Sharma et al., 1999)
Neurotensin	<sup>99m</sup> Tc	(Chavatte et al., 1999)
	<sup>111</sup> In	(Terriere et al., 1997)
Calcitonin analogue	<sup>99m</sup> Tc	(Nelson et al., 1999)
EGF	<sup>111</sup> In	(Kurihara et al., 1999)
CDR	<sup>99m</sup> Tc	(Sivolapenko et al., 1995; Seki et al., 1999)
Glutathione	<sup>99m</sup> Tc	(Caglar et al., 2001)
YIGSR	<sup>131</sup> I	(Moyer et al., 1996)

Nel 1994 è stato ufficialmente introdotto un analogo radiomarcato con <sup>111</sup>In (Octreoscan) utilizzato in vasti studi clinici principalmente riguardanti i tumori di tipo neuroendocrino (Krenning et al., 1994a e 1994b; Signore et al., 1995; Kwekkeboom et al., 1996; Leners et al., 1996; Angeletti et al., 1998; Oppizzi et al., 1998), ma anche in tumori del sistema nervoso centrale (Maini et al., 1995), melanomi (Fletcher et al., 1997), tumori del polmone (Bombardieri et al., 1995) e tumori del seno (van Eijck et

al., 1998) tutti esprimono i recettori della somatostatina. Per ovviare alle limitazioni dell'uso dell'Octreoscan, cioè alto costo per ottenere il metallo radioattivo e proprietà fisiche non ottimali, sono stati studiati altri analoghi della somatostatina marcati con  $^{99m}\text{Tc}$ . Il Depreotide è un peptide di 10 amminoacidi che ha un'elevata affinità per i recettori sst2, sst3, sst5 ed è stato utilizzato con successo per caratterizzare noduli polmonari maligni. Il Vapreotide, che ha un'alta affinità per sst2 e sst5 e moderata affinità per sst3 e sst4 è stato studiato in modelli animali, mentre Hynic-octreotide è stato studiato sull'uomo e sembra essere un promettente radiofarmaco con proprietà farmacocinetica e biodistribuzione paragonabile all'Octreoscan.

Un ulteriore progresso nel campo degli analoghi della somatostatina è lo sviluppo di chelanti macrociclici che sono in grado di legare anche emettitori di  $\beta$ -particelle come  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$ . Tali composti comprendono il DOTAOC, DOTATOC, DOTAVAP e DOTALAN. Questi composti radiomarcati presentano un binding favorevole e una caratteristica biodistribuzione con elevato "uptake" e ritenzione in organi target. E' ben noto che uno degli analoghi,  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC, ha una reale attività terapeutica nel trattamento dei tumori neuroendocrini che hanno mostrato resistenza verso altre forme di trattamento (Paganelli et al., 1999; Waldherr et al., 2000);

Nonostante la somatostatina e i suoi analoghi abbiano avuto un largo uso nella diagnostica per immagini, solo un gruppo ristretto di tumori esprime i recettori per la somatostatina. Nella ricerca di un "peptide universale" capace di legare un vasto numero di tipi di tumore il peptide vasoattivo intestinale (VIP) è risultato essere il candidato migliore a tale scopo. Il peptide intestinale vasoattivo (VIP) è un mediatore neuroendocrino di 28 amminoacidi isolato dal piccolo intestino e sequenziato nel 1970.

La scintigrafia con  $^{123}\text{I}$ -VIP è utilizzata per tumori endocrini del tratto gastrointestinale, piccoli adenocarcinomi e tumori del fegato (Virgolini et al., 1996; 1998; Kurtaran et al., 1997; Raderer et al., 1998a; 1998b). Le limitazioni derivano dalle proprietà chimiche e fisiche della molecola; infatti il peptide è relativamente complesso e la parte responsabile del binding (C-Terminale) con il recettore non è stata ben identificata sebbene siano state identificate diverse parti essenziali nella sequenza, inoltre, così come la maggior parte dei neuropeptidi lineari naturali, VIP è un buon substrato per le peptidasi plasmatiche e di conseguenza è molto instabile nel sangue degradandosi nel giro di pochi minuti dall'iniezione. Infine, essendo il VIP

farmacologicamente molto potente anche dosi di farmaco molto piccole potrebbero produrre effetti tossici.

Per ampliare l'utilizzo della scintigrafia con i radiopeptidi è stato sviluppato un largo spettro di peptidi per bersagliare diversi tipi cellulari e tumori. Essi includono analoghi della bombesina, colecistochinina (CCK)/peptidi leganti il recettore della gastrina, neurotensina ed altri, con o senza modificazioni della loro struttura nativa (con l'uso di co-ligandi o coniugazione con gli zuccheri) per aumentarne l'efficienza di marcatura e la biodistribuzione *in vivo*.

La Bombesina è un neuropeptide di 14 amminoacidi isolato per la prima volta dalla pelle di rana, mentre GRP, il suo equivalente nei mammiferi, è formato da 27 amminoacidi. I due peptidi presentano forti analogie nella sequenza nella regione C-terminale e svolgono un importante ruolo nella proliferazione di cellule tumorali. Sono stati identificati quattro differenti recettori (GRP, NMB, BBS3 e bb4) che sono espressi nel sistema nervoso centrale e nei tessuti periferici come intestino e pancreas, ma sono anche presenti su diversi tumori come tumore del pancreas, del colon, della prostata, dei polmoni e del seno. Sono stati fatti diversi tentativi per sviluppare e valutare le proprietà degli analoghi della bombesina/GRP in modo da utilizzarli come eventuali radiofarmaci. Recentemente è stato dimostrato che la coniugazione del  $^{99m}\text{Tc}$ -diammino tiolo legato all' $\text{NH}_2$  in  $\epsilon$  della Lys<sup>3</sup>-Bombesina porta alla formazione di composti che presentano elevata attività per i recettori del GRP (Baidoo et al., 1998). Sono stati descritti anche studi effettuati sui coniugati della Bombesina-DTPA radiomarcati con  $^{99m}\text{Tc}$  e con  $^{111}\text{In}$  (Moody, et al., 1989; Breeman et al., 1999; Nock et al., 2003; Maina et al., 2005) e alcuni di essi sono stati recentemente utilizzati in studi preclinici (Nock et al., 2005). Hoffman e i suoi collaboratori (Hoffman et al., 1997; Karra et al., 1999) hanno dimostrato la fattibilità di formulare analoghi troncati della bombesina(7-14) radiomarcati che mantengono alta affinità di binding per i recettori GRP e che sono internalizzati in cellule esprimenti il recettore.

Data l'elevata densità di recettori GPR sui tumori, in particolare nel carcinoma della prostata e del seno, Van de Wiele et al. (Van de Wiele et al., 2000) ha riportato i primi risultati delle prove cliniche con un coniugato della bombesina(7-14) marcato con  $^{99m}\text{Tc}$  in pazienti affetti da carcinoma al seno e alla prostata. Le immagini scintigrafiche con il radiotracciante hanno dimostrato un uptake selettivo nei tumori

che si sono diffusi ai linfonodi e a siti distanti, così come in siti primari. Questi studi preliminari su umani rappresentano una prova del concetto e forniscono la prima evidenza che l'utilizzo dei derivati radiomarcanti della bombesina è un promettente approccio per il targeting *in vivo* di tumori esprimenti il recettore GPR. L'utilizzo di questi analoghi di GPR radiomarcanti per trattare questi tumori è di maggiore interesse, tuttavia non ci sono molti studi clinici in corso. Recentemente sono stati pubblicati analoghi della bombesina (Waser et al., 2004) radiomarcanti con  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ .

Gli studi autoradiografici nell'uomo hanno dimostrato l'espressione dei recettori di CCK-A e CCK-B/gastrin nel 90% dei carcinomi medullari della tiroide (Poston et al., 1991) e in un'alta percentuale di altri tumori come i tumori ovarici stremali, carcinoma del polmone a piccole cellule e astrocitomi (Reubi et al., 1997). Sono stati sviluppati una varietà di peptidi analoghi di CCK-A e CCK-B/gastrin e sono stati testati in modelli preclinici per il targeting *in vivo* dei recettori di CCK-B/gastrin (de Jong et al., 1999; Kwekkeboom et al., 2000). Il peptide analogo del recettore per il peptide del rilascio della gastrina (Gastrin-releasing peptide, GRP) rappresenta un altro recettore espresso in una varietà di tumori come quello del polmone, della mammella, della prostata e del pancreas.

L'ormone  $\alpha$ -MSH è un peptide di 13 amminoacidi che deriva dalla pro-opiomelanocortina che esercita la sua funzione nel cervello, nelle ghiandole periferiche e in particolare nella pelle di tutti i vertebrati dove controlla la formazione dei pigmenti nei melanociti epidermali. MSH svolge anche un prominente ruolo nella regolazione della proliferazione delle cellule del melanoma e nella funzione (Stolz et al., 1998). Sono stati descritti cinque sottotipi di recettori (melanocortin receptor MC-R 1-5), ma soltanto uno, MC1-R sembra essere specifico per le cellule del melanoma (Siegrist et al., 1995). Diversi livelli di espressione del recettore dell'MSH sono stati trovati anche su campioni chirurgici di melanoma ottenuti da diversi pazienti e analizzati mediante autoradiografia (Tatro et al., 1990). I traccianti radioattivi MSH per le applicazioni *in vivo* sono stati sviluppati sulla base di analoghi peptidici coniugati a chelanti come DTPA (Bard et al., 1993; Bagutti et al., 1993) o DOTA. Questi chelanti sono stati legati all'N-terminale dei peptidi dell' $\alpha$ -MSH ottenendo una buona attività pertanto possono essere considerati potenziali agenti per l'imaging. Altri radionuclidi, come renio e

tecnezio, sono stati coordinati a frammenti analoghi di  $\alpha$ -MSH sia attraverso un chelante peptidico N-Acetyl-Cys-Gly-Cys-Gly legato all'N-terminale della molecola  $\alpha$ -MSH fig.5 (Giblin et al., 1997), sia mediante l'introduzione di un ponte disolfuro di derivati ciclici [Cys<sup>4</sup>, Cys<sup>10</sup>] o [Cys<sup>5</sup>, Cys<sup>10</sup>]-  $\alpha$ -MSH, in modo da formare un ponte tiolato-metallo-tiolato (Giblin et al., 1998). Questi analoghi sono chimicamente stabili e biologicamente attivi e quindi potrebbero essere utilizzati per il targeting tumorale.

L'analogo della neurotensina è un peptide composto da tredici amminoacidi trovato nel cervello e nell'intestino, ha una funzione regolatoria di crescita nelle linee cellulari del colon e del pancreas. Presenta una sequenza chelante Gly-Ser-Cys-(Acm)-Gly (RP414) che ne permette la marcatura con <sup>99m</sup>Tc (Chavatte et al., 1999) Così come altri peptidi regolatori esso funziona come neurotrasmettitore e come neuromodulatore nel sistema nervoso centrale CNS ed essendo un ormone locale nel sistema nervoso periferico. Un'importante scoperta fu fatta ancora una volta da Ruebi (Reubi et al., 1998) che studiò 24 casi di cancro del condotto pancreatico, 18 casi di pancreatici croniche e 10 normali ghiandole pancreatiche con autoradiografia *in vitro* utilizzando [125I-Tyr<sup>3</sup>] -neurotensina come radioligando. Il 75% di adenocarcinoma esocrino pancreatico erano recettori della neurotensina (NT) positivi mentre il cancro del pancreas endocrino, pancreas normale e pancreatide cronica erano negative. Ancora una volta questi risultati aprono la possibilità di effettuare immagini su questi tumori mediante radioligandi appropriate. Terriere et al hanno sintetizzato analoghi stabilizzati di NT radiomarcati con <sup>111</sup>In (Terriere et al, 1998), che hanno mostrato un veloce passaggio nel sangue e veloce eliminazione attraverso tutto il corpo, attraverso i reni mentre i composti iodinati mostrano un accumulo nel fegato.

Infine, il peptide P1140 legante il recettore della calcitonina, con una sequenza chelante di 4 amminoacidi che può legare il <sup>99m</sup>Tc, è stato dimostrato legare il recettore della calcitonina espresso sulle cellule tumorali T47D e MCF-7, sia in vitro che in topi nudi inoculati con le stesse cellule. Il rapporto tumore/muscolo e tumore/sangue era rispettivamente di 4.5 e 5.7 (90 minuti dopo la somministrazione).

#### *ii) Radioligandi del recettore delle tirosine-kinasi.*

Una grande varietà di tumori esprimono i recettori del fattore di crescita epidermale (epidermal growth factor-EGF) ed del fattore di crescita simil-insulina I



(insulin-like growth factor-I, IGF-I), pertanto tali recettori sono un bersaglio primario per l'imaging e la terapia dei tumori.

Il radioligando  $^{111}\text{In}$ -DTPA-EGF è stato dimostrato essere significativamente internalizzato dalle cellule MDA-MB-468 esprimenti il recettore per l'EGF ( $1.3 \times 10^6$  EGFRs/cell) ma non dalle cellule MCF-7 cells ( $1.5 \times 10^4$  EGFRs/cell). La valutazione delle dosi di radiazioni ha suggerito che la dose di radiazioni somministrata dal  $^{111}\text{In}$ -DTPA-EGF può raggiungere 25 Gy, con 19 Gy nel nucleo cellulare (Reilly et al., 2000). La coniugazione del  $^{111}\text{In}$ -DTPA-EGF ad un vettore di veicolazione attraverso la barriera emato-encefalica ha permesso la visualizzazione del sistema nervosa centrale (Kurihara et al., 2000).

### *iii) Altri peptidi radiomarcanti*

Il pentadecapeptide sintetico  $\alpha$ -M2 marcato con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  è derivato dalla regione determinante la complementarità della terza catena pesante (CDR-3H) di un anticorpo monoclonale associato a tumore (marcato con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  via cisteina), il quale è stato dimostrato mediante studi preclinici accumularsi nei tumori della mammella e nelle loro metastasi (Sivolapenko et al., 1995). Appropriate modificazioni dell'originale peptide  $\alpha$ -M2 è risultato in un radioligando con una farmacocinetica superiore quando paragonato all'  $\alpha$ -M2 originale. Ulteriori studi saranno necessari per determinare il potenziale utilizzo nell'imaging dei tumori di questo peptide.

Un nuovo interessante approccio per l'imaging tumorale è rappresentato dalla valutazione *in vivo* del potenziale metastatico dei tumori. Il pentapeptide sintetico della laminina tyrosyl-isoleucyl-glycyl-seryl-arginine (YIGSR) lega le cellule tumorali metastatiche che esprimono il recettore ad alta affinità della laminina. Il YIGSR marcato con  $^{131}\text{I}$  e inoculato nei topi con il carcinoma Lewis Lung si accumula nel tumore, come dimostrato dagli studi autoradiografici (Moyer et al., 1996).

Un ulteriore approccio è rappresentato dalla sostanza P, la quale è un undecapeptide appartenente alla famiglia di peptidi correlati chimicamente, le tachichinine che sono caratterizzate dall'aver una simile sequenza al C-terminale. È ampiamente distribuito attraverso il sistema nervoso centrale e il sistema nervoso periferico dove svolge la funzione di neurotrasmettitore o di neuromodulatore. Nel sistema vascolare è un potente vasodilatatore. C'è una crescente evidenza che SP è di

importanza nella trasmissione del dolore e nelle risposte associate (Otsuka et al., 1987). Using a Bolton-Hunter-<sup>125</sup>I-labeled SP, Henning et al. (Henning et al., 1995) identificarono i recettori della Sostanza P su tumori della glia, nei tumori medullari della tiroide e nel tumore al seno. Tutti i tumori, incluso quelli senza recettori SP, esprimevano i recettori SP nei loro vasi tumorali e peritumorali. Specialmente l'alto numero di recettori nelle cellule del glioblastoma rende il recettore SP un bersaglio interessante per la radioterapia interna di questo tipo di tumore che ha una prognosi estremamente sfavorevole. I radioligandi derivati da SP per il targeting *in vivo* sintetizzati e studiati fino ad ora sono il [<sup>111</sup>In-DTPA-Arg<sup>1</sup>]-SP (Breeman et al., 1996) e il <sup>90</sup>Y-DOTAGA-SP (Schumacher et al., 2001).

## **1.7 I RECETTORI DELLA COLECISTOCHININA (CCK) E LA LORO INTERAZIONE CON I PEPTIDI CCK8 E MINIGASTRINA**

I recettori della colecistochinina appartengono alla super-famiglia delle proteine GPCR. Le GPCRs costituiscono una famiglia di proteine di membrana implicata nel riconoscimento e nella traduzione di diversi segnali come luce, Ca<sup>++</sup>, piccole molecole come i residui amminoacidici, nucleotidi, peptidi e proteine. Esse controllano l'attività degli enzimi, i canali ionici e il trasporto di vescicole attraverso la catalisi dello scambio della guanosina trifosfato (GTP)-guanosina difosfato (GDP) sulle proteine G eterotrimeriche (Mierke et al., 2001; Bockaert et al., 1999; Morisset, 2005). Tutte le GPCR hanno in comune un dominio centrale (core) costituito da sette eliche transmembrana (TM-I a TM-VII) collegate da tre loops intracellulari (IC1, IC2, IC3) e tre loops extracellulari (EX1, EX2, EX3) (Baldwin, 1993). Inoltre il dominio N-terminale è diretto verso lo spazio extracellulare e il dominio C-terminale verso lo spazio intracellulare (Fig 5).

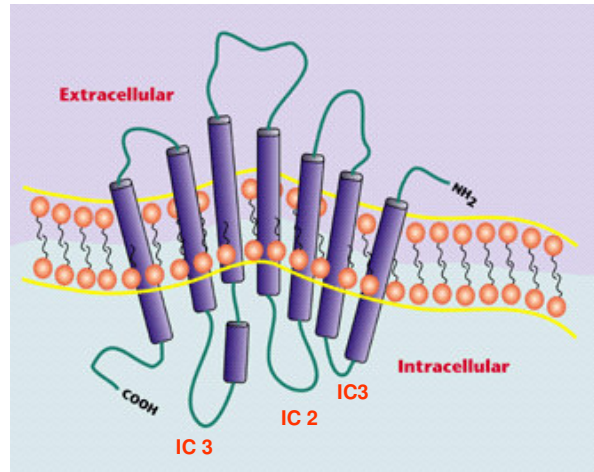
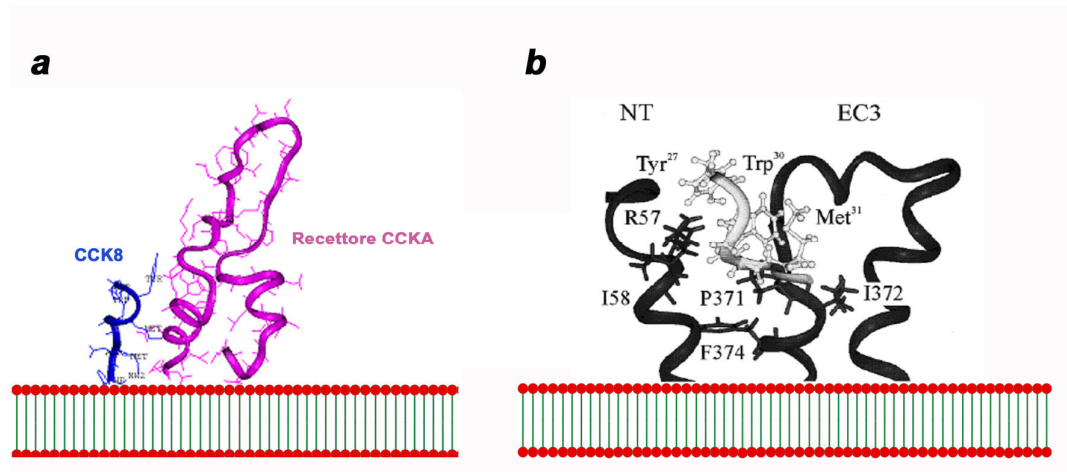


Fig.5: Schema rappresentativo dei recettori GPCRs

Esistono due isoforme del recettore per l'ormone peptidico colecistochinina ( $CCK_A$ -R,  $CCK_B$ -R, noti anche come  $CCK_1$ -R,  $CCK_2$ -R) che mostrano una distribuzione fisiologica in diversi tessuti con una espressione selettiva dell'una o dell'altro tipo (Wank et al., 1992) In particolare,  $CCK_A$ -R è localizzato prevalentemente nel tratto gastrointestinale e  $CCK_B$ -R particolarmente nel sistema nervoso centrale. Il  $CCK_A$ -R è overespresso negli adenocarcinomi pancreatici e nei tumori gastroenteropancreatici. Il  $CCK_B$ -R è overespresso in alta percentuale in tumori medullari della tiroide ed in altri tumori di origine neuroendocrina come il cancro del polmone a piccole cellule e i tumori gastroenteropancreatici.

Molti studi hanno valutato la modalità di binding dell'octapeptide della colecistochinina (CCK26-33 o CCK8) che presenta alta affinità per entrambi i recettori sebbene la forma solfatata del CCK8 (con un gruppo solfato su Tyr27) è mille volte più attiva del CCK8 non solfatato nel legame al recettore CCK di tipo A. Una caratterizzazione dettagliata per l'interazione di CCK8 ed il suo recettore è cruciale per lo sviluppo di analoghi di CCK8 con agenti chelanti capaci di coordinare con alta stabilità metalli per l'applicazione nella diagnosi dei tumori mediante medicina nucleare.



**Fig.6:** Interazione tra il peptide CCK8 (a) e il frammento N-terminale del recettore CCK<sub>A</sub>-47; interazione (b) tra il peptide CCK8 e il terzo loop extracellulare.

La caratterizzazione strutturale del complesso biomolecolare del CCK8 e la porzione extracellulare N-terminale del CCKA-R è stata ottenuta mediante risonanza magnetica nucleare ad alta risoluzione e analisi computazionale (Pellegrini and Mierke, 1999; Giragossian and Mierke, 2001). La struttura NMR del complesso suggerisce che il CCK8 lega il recettore CCKA con l'estremità C-terminale in prossimità delle sette eliche della GPCR e l'N-terminale del ligando, proiettandosi tra il loop TM1 e TM7 e formando interazioni specifiche con l'N-terminale del recettore CCKA. In particolare il NOEs intermolecolare chiaramente ha mostrato che la Tyr27 e Met28 del CCK8 sono in stretto contatto con il Trp39 del recettore nell'ambito del complesso (Fig. 6).

Gli studi condotti sul complesso CCK8/CCKB-R (Giragossian and Mierke, 2002), utilizzando il frammento di recettore di 28 residui amminoacidici appartenenti al loop 3 extracellulare e i residui dell'elica di transmembrana TMVI e TMVII, hanno mostrato che l'interazione tra ligando-recettore coinvolge il tetrapeptide C-terminale del CCK8.

L'evidenza strutturale, per entrambi i complessi ligando-recettore, suggerisce che le modificazioni sull'estremità N-terminale del CCK8 non influenzano il binding ai recettori di entrambi i sottotipi poiché l'amminogruppo terminale del CCK8 è distante dal frammento del recettore e diretto verso lo spazio extracellulare.

Il recettore CCKB, che lega la colecistochinina, è in grado di legare anche la gastrina, un peptide lineare che è sintetizzato come pre-proormone ed è post-trascrizionalmente processato formando una famiglia di peptidi che presentano la

stessa porzione C-terminale. La forma predominante è la gastrina-34 (big gastrin), ma la maggiore attività biologica è presentata dal peptide più piccolo (gastrina-14 o minigastrina). Inoltre, la piena bioattività è preservata dai cinque amminoacidi C-terminali della gastrina (pentagastrina) che sono identici a quelli contenuti nella colecistochinina, risultando in effetti biologici sovrapponibili. Pertanto i derivati peptidici contenenti un gruppo chelante covalentemente legato all’N-terminale del CCK8 e della gastrina potrebbero rappresentare un’efficiente classe di composti nell’applicazioni di imaging.

## 1.8 OBIETTIVO DELLA TESI

Il targeting di recettori di membrana overespressi in cellule tumorali rappresenta uno degli ambiti di ricerca di maggiore interesse per la diagnosi e la terapia dei tumori. Peptidi radiomarcanti aventi elevata affinità per i recettori sulle cellule tumorali possono essere utilizzati per scopi diagnostici mediante tecniche di medicina nucleare note come SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) e PET (Positron Emission Isotopes). Un ampio spettro di peptidi, dagli analoghi della somatostatina, ai peptidi RGD, agli analoghi della neurotensina e quelli della gastrina, è attualmente in fase di sperimentazione preclinica.

Tra i vari recettori di membrana, i due recettori della colecistochinina CCKA-R e CCKB-R rappresentano dei modelli promettenti per la loro elevata espressione in molti tipi di tumori umani (Reubi et al., 1997) e sono stati scelti come target recettoriali nell'ambito del presente lavoro di tesi. I risultati relativi al comportamento di binding dell'ottapeptide CCK8 H-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (CCK8) e dei due analoghi della gastrina DGlu(1)-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (DGlu(1)-minigastrina, SMG) e DGlu-Glu(5)-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (DGlu-Glu(5)-minigastrina, LMG) ai due recettori della colecistochinina, dal punto di vista strutturale e conformazionale hanno suggerito che la presenza degli agenti chelanti e dei relativi complessi con ioni metalli all'estremità N-terminale di questi peptidi non dovrebbe influenzare la loro interazione con i recettori CCKA-R sia con CCKB-R.

Risultati preliminari ottenuti presso il CIRPeB (Centro di Ricerca sui Peptidi Bioattivi) nell'ambito del gruppo di ricerca diretto dal Prof. Morelli ed in collaborazione con i gruppi di ricerca di Medicina Nucleare e di Modelli Animali presso l'Ist. Naz. Tumori "Fondazione. Pascale", hanno precedentemente mostrato che l'ottapeptide CCK8 complessato con l'<sup>111</sup>In mediante l'utilizzo di agenti chelanti, come DTPA e DTPAGlu, rappresenta un buon modello di tracciante radiomarcato per evidenziare nei topi, con la tecnica SPECT, masse tumorali esprimenti il recettore CCKB-R (Aloj et al., 2003; Aloj and Morelli, 2004; Benedetti et al., 2004).

L'obiettivo principale della presente tesi è stato sviluppare sonde radiomarcate a base peptidica da utilizzare come potenziali radiofarmaci nelle applicazioni

diagnostiche tese ad evidenziare la sovraespressione dei due recettori CCKA-R e CCKB-R.

Il lavoro è stato sviluppato secondo i seguenti punti: 1) modificare all'N-terminale l'octapeptide CCK8, precedentemente radiomarcato con  $^{111}\text{In}$ , inserendo ulteriori residui amminoacidici e molecole di fosfina che permettono la marcatura con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e conferiscono un diverso grado di idrofilicità al coniugato; 2) modificare all'N-terminale il CCK8 inserendo un chelante in grado di complessare il  $^{67}\text{Ga}$  e/o  $^{68}\text{Ga}$  per valutare l'attività biologica e le proprietà farmacocinetiche dei coniugati ed il loro potenziale utilizzo in clinica sia nella tecnica SPECT sia nella più innovativa tecnica PET; 3) valutare le proprietà biologiche e farmacocinetiche della minigastrina nella forma corta (DGlu(1)-minigastrina; SMG) e nella forma lunga (DGlu-Glu(5)-minigastrina; LMG) coniugate con DTPAGlu e con DOTA e radiomarcate sia con  $^{111}\text{In}$  sia con  $^{68}\text{Ga}$  sia *in vivo* che *in vitro*.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Materiali

Tutti i peptidi sono stati sintetizzati utilizzando una chimica Fmoc in fase solida. La resina, Rink-amide MBHA, è stata acquistata presso la ditta RAPP Polymer. Gli amminoacidi e gli attivanti, HOBt e HBTU, sono stati forniti dalla ditta INBIOS, la DIPEA dalla ditta Applied Biosystem,, la piperidina e il TFA dalla ditta Biosolve. Il TIS e l'EDT rispettivamente dalle ditte Aldrich e dalla Fluka. I solventi anidri per la sintesi peptidica, DMF e DCM, acetonitrile di grado HPLC e etere etilico è di provenienza Biosolve o Labscan. Acqua distillata ultrapura è stata ottenuta mediante il sistema MilliQ gradient combinato con il sistema Elix (Millipore).

L'analisi dei prodotti è stata effettuata mediante RP-HPLC analitico Shimadzu 10ADvp, dotato di rivelatore Diodo Array ed autocampionatore, utilizzando una colonna Vydac C18, 4.6-250 mm e utilizzando un gradiente lineare di CH<sub>3</sub>CN 0.1% TFA (eluente B) in H<sub>2</sub>O 0.1% TFA (eluente A). Purificazione dei peptidi e dei loro derivati è stata ottenuta mediante un sistema HPLC Shimadzu 8A, utilizzando un detector UV-VIS Shimadzu e una colonna Vydac C18, 22-250 mm e gli stessi eluenti utilizzati su scala analitica. I peptidi ed i loro derivati sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa MALDI-ToF, con uno spettrometro Voyager-DE della Perseptive Biosystem utilizzando come matrice l'acido  $\alpha$ -idrossi-4-cinnammico (Sigma-Aldrich).

Le fosfine (PNP3 e PNP43) sono state fornite dal gruppo di ricerca diretto dalla Dottoressa Bolzati, ICIS-CNR di Padova. La difenilfosfinopropionilsuccinimide è stata acquistata dalla Argus Spechem. Fmoc-8-amino-3,6-dioxaottanoico acido è stato comprato dalla Neosystem.

I precursori protetti dei chelanti DOTA e DTPAGlu sono stati forniti dalla ditta Bracco.

Il <sup>99m</sup>Tc sotto forma di Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> è eluito dal generatore <sup>99m</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc della Nycomed Amersham-Sorin. Il <sup>67</sup>Ga è stato acquistato dalla Tyco Srl sotto forma di



[<sup>67</sup>Ga]-citrato. Il <sup>68</sup>Ga è eluito dal generatore <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga della Eckert & Ziegler (Germania). <sup>111</sup>In sotto forma di Indio cloruro, <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub>, è stato acquistato dalla Mallinckrodt.

Per l'analisi dei coniugati radiomarcati è stato utilizzato un Hplc analitico Gilson 305 system equipaggiato con un detector di radioattività, e con una colonna Phenomenex Jupiter C18 utilizzando gli stessi eluenti e gradienti utilizzati per l'analisi dei peptidi.

## 2.2 Metodi

### 2.2.1. Sintesi dei peptidi CCK8, DOTA-G-CCK8, minigastrina corta (DOTA-SMG e DTPAGlu-SMG) e minigastrina lunga (DOTA-LMG e DTPAGlu-LMG)

La sintesi dei peptidi è stata effettuata con il sintetizzatore Syro Multisintech utilizzando una resina Rink Amide con grado di sostituzione pari a 0.65 mmol/g. Il protocollo di sintesi, uguale per tutti i peptidi, ha previsto cicli di accoppiamento composti dai seguenti moduli:

1. Deprotezione
2. Doppio accoppiamento

Il modulo di deprotezione consiste di due trattamenti di 5 minuti con una soluzione al 20% di Piperidina in DMF. Per il modulo di accoppiamento sono stati utilizzati 4 equivalenti di Fmoc-AA, 3.9 equivalenti di HOBt/HBTU (soluzione 0.45 M in DMF) e 8 equivalenti di DIPEA (soluzione 2 M in NMP) rispetto alla scala di sintesi. Il tempo di reazione per ogni accoppiamento è stato di 20 minuti. Dopo ogni modulo sono stati effettuati quattro lavaggi con DMF per un minuto. Al termine della sintesi il gruppo Fmoc è stato rimosso seguendo le condizioni utilizzate nel modulo di deprotezione e la resina è stata lavata con DMF, DCM e MeOH e seccata con Et<sub>2</sub>O.

I precursori protetti dei chelanti DTPAGlu e DOTA, aventi una sola delle funzioni carbossiliche libera, sono stati legati manualmente all'N-terminale dei peptidi seguendo la stessa chimica appena descritta, ma con tempi di reazione di accoppiamento più lunghi (1-2 ore). Nel caso del peptide (DOTA-G-CCK8) prima di legare il chelante DOTA è stata inserita, mediante sintetizzatore, un residuo di Glicina come spaziatore.

I peptidi sono stati staccati dalla resina, con contemporanea deprotezione delle catene laterali, trattando quest'ultima con una soluzione di TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/EDT nel rapporto 94/2.5/1/2.5 in volume, per 4 h sotto agitazione a T ambiente. La soluzione è stata poi filtrata e lavata con la minima quantità di TFA. Il filtrato è stato raccolto in etere etilico a 0°C, ed il precipitato è stato lavato più volte con Et<sub>2</sub>O, seccato e liofilizzato.

La purificazione è stata effettuata mediante RP-HPLC utilizzando gli eluenti H<sub>2</sub>O/0.1% TFA (A) e CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA (B) con un gradiente che varia dal 5% al 65% di B in 20 minuti ad una velocità di flusso di 20 ml/min per il CCK8, mentre per le minigastrine è stato utilizzato un gradiente che varia dal 20 all'80% di B in 20 minuti ad una velocità di flusso di 20ml/min.

Tutti i prodotti sono stati analizzati mediante Hplc di grado analitico e spettrometro di massa (MALDI-TOF), utilizzando come matrice l'acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnammico.

DOTA-G-CCK8 (DOTA-Gly-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> (m/z)= 1520, Rt = 17.90);

DOTA-SMG (DOTA-DGlu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> (m/z)= 1401, Rt = 19.03 min);

DTPAGlu-SMG ([M+H]<sup>+</sup> (m/z) = 1485, Rt= 20.53 min);

DOTA-LMG (DOTA-DGlu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> (m/z)= 2046, Rt = 21.13 min);

DTPAGlu-LMG ([M+H]<sup>+</sup>(m/z) = 2130, Rt = 21.06 min)

### **2.2.2. Sintesi dei coniugati radiomarcati <sup>99m</sup>TcO-PhosGC-CCK8 e <sup>99m</sup>TcO-PhosGC-(AdOO)<sub>2</sub>-CCK8**

Dopo aver sintetizzato il CCK8 (Asp(OtBu)-Tyr(TBu)-Met-Gly-Trp(Boc)-Met-Asp(OtBu)-Phe-Resina, la resina è stata divisa in due reattori. In uno, per ottenere il composto PhosGC-CCK8, sono stati legati prima i due amminoacidi Cisteina e Glicina e poi è stata fatta reagire la 3-difenilfosfinopropionil-succinimide in DMF aggiungendo quattro equivalenti di DIPEA sotto agitazione per 60 minuti. Nel secondo reattore sono stati fatti reagire prima una cisteina e una glicina e poi due residui di linker, 8-ammino-3,6-acido-dioxaottanoico (AdOO) per formare PhosGC-(AdOO)<sub>2</sub>-CCK8. terminate le sintesi, i due peptidi modificati all'N-terminale sono

stati staccati dalla resina e deprotetti utilizzando la miscela acida contenente TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/EDT nel rapporto 94/2.5/1/2.5 in volume. La reazione di cleavage è stata condotta sotto agitazione per tre ore. Le soluzioni poi sono state filtrate dalla resina e sono state raccolte in etere etilico a 0 °C, sono state poi centrifugate per separare i peptidi precipitati dal sovrinatante. Dopo aver effettuato tre lavaggi con etere etilico, i precipitati sono stati liofilizzati.

L'analisi dei prodotti è stata effettuata mediante RP-HPLC analitico su fase inversa, utilizzando un gradiente lineare che va dal 20% all'80% di B in 40 minuti a 1ml/min. Il tempo di ritenzione (Rt) è di 29.4 min per PhosGC-CCK8, e 27.6 min per PhosGC-(AdOO)<sub>2</sub>-CCK8. L'identità è stata accertata mediante spettroscopia di massa: [M+H]<sup>+</sup> PhosGC-CCK8 (m/z)= 1462 e [M+H]<sup>+</sup> PhosGC-(AdOO)<sub>2</sub>-CCK8 (m/z) = 1734.

Per la radiomarcatura dei due composti è stato utilizzato <sup>99m</sup>Tc generato da <sup>99</sup>Mo. Sono stati aggiunti 50 µg di ogni composto in una soluzione contenente 10 mM di NaOH e SnCl<sub>2</sub> e Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> entrambi ad una concentrazione finale di 100 µM, e 4-10 mCi di Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>, la miscela è stata fatta reagire per un'ora a 60 °C.

L'efficienza della radiomarcatura è determinata sia mediante TLC su Gel di silice, utilizzando come eluente una soluzione di citrato di sodio 0.3 M, sia un RP-HPLC analitico, collegato ad un radiodetector, utilizzando gli eluenti H<sub>2</sub>O allo 0.1% di TFA e CH<sub>3</sub>CN allo 0.1% di TFA con un gradiente che va dal 20% di B al 95% di B in 45 minuti.

### 2.2.3. Sintesi dei coniugati (<sup>99m</sup>Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3))<sup>+</sup> e (<sup>99m</sup>Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43))<sup>+</sup>

Per la sintesi del peptide Cys-Gly-CCK8, per la sua caratterizzazione e purificazione sono state utilizzate le stesse condizioni descritte per la sintesi di GC-CCK8. (Cys-Gly-CCK8 [M+H]<sup>+</sup> (m/z)= 1224, Rt= 23.89 min).

Per la sintesi dei due complessi radiomarcati sono stati messi a punto due metodi. **Metodo 1** (procedura in due step): è stato <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (0.5 ml, 50.0 MBq-3.0 GBq) in un vial contenente diidrazide succinica (SDH) (5.0 mg), SnCl<sub>2</sub> (0.1 mg sospeso in in 0.1 ml

di soluzione salina) ed etanolo (0.5 ml). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 30 minuti per formare il precursore  $^{99m}\text{Tc}$ -nitrito  $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ . Successivamente, contemporaneamente al peptide purificato (0.10 mg sospeso in 0.250 ml di buffer fosfato 0.1M pH 7.4), sono stati aggiunti i ligandi, PNP3 per la formazione di  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$  e PNP43 per la formazione di  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$  (1.0 mg sciolti in 0.1 ml di EtOH). La reazione è stata condotta per 60 minuti alla temperatura di 80°C.

**Metodo 2** (procedura in un unico step): è stato aggiunto  $^{99m}\text{TcO}_4$  (0.5 ml, 50.0 MBq-3.0 GBq) in un vial contenente diidrazide succinica (SDH) (5.0 mg),  $\text{SnCl}_2$  (0.1 mg sospeso in in 0.1 ml di soluzione salina) ed etanolo (0.5 ml), i ligandi PNP3 per la formazione di  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$  e PNP43 per la formazione di  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$  (1.0 mg sciolti in 0.1 ml di EtOH) e il peptide (0.10 mg sospeso in 0.250 ml di buffer fosfato 0.1M pH 7.4). La reazione è stata condotta a 80°C per 60 minuti.

Entrambi i metodi hanno portato agli stessi risultati e ad una resa di reazione (valutata mediante HPLC) del 95% dopo purificazione. La purificazione del radiomarcato è stata effettuata mediante una colonna Sep pack C18 eluita con una miscela di EtOH/buffer fosfato 0.2 M, pH 7.4, 80/20 (1x0.25 ml, 1x0.75 ml).

#### **2.2.4. Radiomarcatura del complesso DOTA-G-CCK8 con $^{67}\text{Ga}$ e DOTA-G-CCK8 con $^{68}\text{Ga}$**

Per effettuare la marcatura del peptide con  $^{67}\text{Ga}$  è stato necessario trasformare il  $^{67}\text{Ga}$ -citrato in  $\text{GaCl}_3$ . E' stato fatto adsorbire prima il  $^{67}\text{Ga}$ -citrato su silice SEP-PAK, poi sono stati effettuati dei lavaggi con  $\text{H}_2\text{O}$  in modo da rimuovere il citrato ed infine è stato eluito il  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  con  $\text{HCl}$  diluito, ottenendo così un'attività finale di 4 mCi/ml. Il peptide è stato poi sciolto in  $\text{H}_2\text{O}$  e 20% di  $\text{CH}_3\text{CN}$  ad una concentrazione di 0.5 mM. Separatamente al  $^{67}\text{GaCl}_3$  è stato aggiunto HEPES 1M fino ad ottenere un pH di 3.5-4. Un volume di soluzione di peptide è stato aggiunto poi a dieci volumi di  $^{67}\text{GaCl}_3$  e lasciato a reagire per 45 minuti a 80°C. Il prodotto è stato purificato mediante una

colonnina con fase stazionaria C18 effettuando dei lavaggi con 5 ml di H<sub>2</sub>O sterile, ed è stato eluito con una miscela di 400 µl di etanolo puro in 0.1% di soluzione salina.

L'efficienza di radiomarcatura è stata controllata mediante RP-HPLC collegato ad un radiodetector, utilizzando H<sub>2</sub>O con 0.1%TFA e CH<sub>3</sub>CN con 0.1% TFA (gradiente dal 5% B al 70% B in 15 minuti ad 1ml/min. Rt= 12.0 min).

Il <sup>68</sup>Ga è stato ottenuto direttamente dal generatore <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga mediante eluizione con una soluzione di acetone-acido cloridrico all'80% di acetone e con una concentrazione di HCl di 0.15 M. La soluzione ottenuta è stata aggiunta direttamente alla soluzione di peptide, sciolto in H<sub>2</sub>O e 20% di CH<sub>3</sub>CN ad una concentrazione di 0.5 mM. La reazione di radiomarcatura è stata condotta ad una temperatura di 80 °C per 45 minuti. per la purificazione del radiomarcato, il prodotto è stato caricato su una colonnina con fase stazionaria C18 e dopo aver fatto dei lavaggi con 5 ml di H<sub>2</sub>O sterile, è stato fatto eluire con una miscela di 400 µl di etanolo puro in 0.1% di soluzione salina. L'efficienza di radiomarcatura è stata verificata mediante RP-HPLC collegato ad un radiodetector, utilizzando H<sub>2</sub>O con 0.1%TFA e CH<sub>3</sub>CN con 0.1% TFA (gradiente dal 5% CH<sub>3</sub>CN al 70% in 15 minuti ad 1ml/min. Rt = 12.0 min).

#### ***2.2.5. Sintesi dei coniugati radiomarcati: <sup>68</sup>GaDOTA minigastrina (SMG e LMG)***

Le soluzioni per i due peptidi sono state preparate come per il composto DOTA-G-CCK8 descritto nel paragrafo 2.2.4. Alla soluzione peptidica è stato aggiunto <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup>, ottenuto dal generatore <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga. La reazione è stata condotta in microonde per dieci minuti. La miscela di reazione è stata fatta passare attraverso una colonna C18 trattata prima con 5 ml di H<sub>2</sub>O, e poi con 0.4 ml di etanolo puro. L'efficienza della reazione è stata verificata mediante RP-HPLC collegato ad un radiodetector, utilizzando H<sub>2</sub>O con 0.1%TFA e CH<sub>3</sub>CN con 0.1% TFA (gradiente dal 5% B al 70% B in 15 minuti ad 1ml/min.). (<sup>68</sup>GaDOTA-SMG Rt = 16.0 min; <sup>68</sup>GaDOTA-LMG Rt = 18 min).

### 2.2.6. Sintesi dei coniugati radiomarcanti: $^{111}\text{InDTPAGlu-minigastrina}$ (SMG e LMG)

I peptidi sono stati sciolti in  $\text{CH}_3\text{CN}$  e in 20% di  $\text{H}_2\text{O}$  ad una concentrazione finale di 0.1-1 mmol/L.  $^{111}\text{In}$ , sotto forma di  $^{111}\text{InCl}$ , è stato trasformato, prima di effettuare la reazione di radiomarcatura, in  $^{111}\text{In}$ -citrato aggiungendo 10 volumi di 0.3 M di Na-citrato (pH 9.5). Un volume di soluzione di peptide è stato poi aggiunto a 10 volumi di  $^{111}\text{In}$ -citrato e la miscela è stata incubata per un'ora a temperatura ambiente. La completezza e l'efficienza della reazione sono state verificate mediante TLC e RP-HPLC. L'eluente utilizzato per la TLC è stato una miscela di citrato di sodio (0.3 mol/L) mentre le analisi HPLC sono state condotte utilizzando  $\text{H}_2\text{O}$  contenente 0.1% di TFA e  $\text{CH}_3\text{CN}$  contenente 0.1% di TFA con un gradiente lineare che va dal 5% al 70% di  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 30 minuti.

## 2.3 Studi in vitro ed in vivo

### 2.3.1. Stabilità in vitro dei complessi $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ e $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$

La stabilità in vitro dei complessi  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$  e  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$  è stata valutata monitorando la purezza radiochimica (RCP) a differenti tempi secondo la seguente procedura : in un tubo test di propilene sono stati aggiunti 50  $\mu\text{l}$  di  $^{99m}\text{Tc}$  a: 1) 950  $\mu\text{l}$  di soluzione salina, 2) 450  $\mu\text{l}$  di siero umano, 3) 450  $\mu\text{l}$  di siero di topo e 4) 450  $\mu\text{l}$  di omogenato di fegato di topo. La risultante miscela è stata incubata a 37°C per 24h.

A 15 min, una, due, tre e ventiquattro ore sono state prelevate aliquote da 50  $\mu\text{l}$  di ogni soluzione e diluite con 950  $\mu\text{l}$  di buffer fosfato (0.02 M, pH 7.4).

Successivamente sono stati prelevati 100  $\mu\text{l}$  di campioni 1), 2), e 3) e direttamente analizzati mediante RP-HPLC utilizzando una colonna C4. I solventi utilizzati sono stati: A= DMGA (0.05 M pH 8, per NaOH 0.1 M; DMGA= 3.3 acido

dimetilglutarico), B= CH<sub>3</sub>CN; con gradiente che va dal 25% di B in 25 min. al 33% di B in 27 min.

Contemporaneamente il campione 4) è stato passato su una colonna ad estrazione OASISHLB prima di iniettarlo in HPLC. Le condizioni per eluirlo dalla colonna sono state: MeOH (1 min), H<sub>2</sub>O (1 ml), e MeOH al 5% (3 ml). L'attività è stata eluita con una miscela di EtOH/ buffer fosfato 0.2 M, pH 7.4, 80/20 (1 ml). L'8% di attività iniziale viene raccolta nelle frazioni eluite e analizzata mediante TLC e HPLC.

### **2.3.2. Esperimenti di transchelazione dei complessi (<sup>99m</sup>Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3))<sup>+</sup> e (<sup>99m</sup>Tc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43))<sup>+</sup>**

Gli esperimenti di transchelazione sono stati condotti sui complessi purificati utilizzando un eccesso di Cisteina o di GSH (Glutathione). Sono stati aggiunti in un tubo test di propilene da 5 ml contenente una soluzione di tampone fosfato (250 µl, 0.2 M, pH 7.4) e H<sub>2</sub>O (100 µl), un'aliquota (50 µl) di una soluzione stock di GSH (10 mM). La soluzione è stata miscelata con un vortex e incubata a 37 °C per 24 ore. Contemporaneamente è stata condotta la reazione di controllo utilizzando H<sub>2</sub>O anziché GSH. Dopo 30 minuti, 1, 2, 3 e 24 ore sono state prelevate dalla miscela di reazione delle aliquote che sono state analizzate mediante cromatografia TLC e HPLC.

La stessa procedura è stata applicata utilizzando cisteina idrocloruro (10.0 mM) come ligando di scambio. I due complessi sono risultati essere inerti in entrambi i casi.



### **2.3.3. *Esperimenti di Binding dei complessi radiomarcati (studi in vitro)***

Gli esperimenti di saturazione di binding sono stati effettuati utilizzando cellule A431 overesprimenti il recettore CCK2-R e cellule che non overesprimono il recettore utilizzate come controllo negativo. Le cellule sono state inoculate su piastre multipozzetto ad una densità di 200000 cellule per pozzetto. Gli esperimenti sono stati ripetuti a diverse concentrazioni di peptide radiomarcato a 4 °C. La radioattività legata alle cellule è stata recuperata mediante digestione triptica dopo due rapidi lavaggi con PBS ghiacciato seguiti da 1h di incubazione e misurata con un gamma counting. Le curve di binding sono state generate dopo normalizzazione per il numero di cellule e sottraendo il binding non specifico utilizzando il software Kaleidagraph. Le costanti di dissociazioni ( $K_{dS}$ ) e i numeri apparenti di siti di binding per cellula ( $B_{max}$ ) sono stati ricavati dalla seguente equazione:  $bound = (B_{max} \times [peptide\ radiomarcato]) / (K_d + [peptide\ radiomarcato])$ .

Gli esperimenti di internalizzazione cellulare sono stati determinati comparando le differenze nell'accumulo di composto incubato con cellule A431-CCKB-R a 4 °C, temperatura alla quale la maggior parte dei processi metabolici sono bloccati, e a 37 °C, temperatura alla quale tutti i processi metabolici, compresi l'internalizzazione del recettore, sono attivi. Le cellule sono state incubate con peptide radiomarcato (20 nmol/L) alle due temperature per 60 e 120 minuti. Alcuni pozzetti sono stati lavati con PBS per rimuovere la radioattività non legata e poi incubati nuovamente per 60 minuti a 4 °C con peptide non radiomarcato (30  $\mu$ mol/L) per spostare la radioattività legata in superficie. La radioattività associata alle cellule è stata determinata dopo che la radioattività non legata è stata eliminata nei lavaggi e poi normalizzata per contenuto di proteina.

### **2.3.4. *Studi di Biodistribuzione (studi in vivo)***

Le cellule A431 overesprimenti il recettore CCKB-R e cellule controllo sono state inoculate nei due fianchi di topo nudo (100  $\mu$ l; densità cellulare:  $2 \times 10^7$ ). I tumori sono stati fatti crescere per circa 14 giorni. La biodistribuzione del peptide radiomarcato è stata determinata dopo iniezione nella vena caudale di circa 1.85 MBq

(50  $\mu\text{Ci}$ , 0.2-0.5 nmol di peptide) di peptide radiomarcato per ogni topo. Sono stati utilizzati 5 animali per ogni esperimento. Gli animali sono stati sacrificati dopo 30, 120, e 240 minuti dopo l'iniezione. Sono stati pesati i vari organi (sangue, polmoni, fegato, milza, reni, stomaco, intestino, muscoli e campioni del tumore) e la radioattività è stata misurata mediante un gamma counter. Il relativo ammontare di radioattività negli organi è stato calcolato ed espresso come percentuale di dose iniettata per grammo di tessuto ( $\%ID/g$ ), normalizzata per un topo di 20 g.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

La sovraespressione dei recettori CCKB-R degli ormoni colecistochinina e gastrina (CCKA-R e CCKB-R, individuati anche come CCK<sup>1</sup>-R e CCK<sup>2</sup>-R) in diversi tumori umani ha fornito le basi molecolari per lo sviluppo di analoghi radiomarcanti dei peptidi CCK e gastrina per imaging tumorale e per la terapia con radionuclidi (Reubi et al., 1996, 1997; Béhé et al., 2002). Diversi gruppi di ricerca, infatti sono stati attivamente coinvolti in questo obiettivo utilizzando sia la sequenza del CCK8 sia della gastrina e utilizzando nuovi chelanti e nuovi approcci di radiomarcatura (Behr et al., 1998; Reubi et al., 1998; de Jong et al., 1999; Kwekkeboom et al., 2000; Béhé et al., 2003; Aloj et al., 2004; Laverman et al., 2004). (Morelli et al., 2002; Béhé et al., 2005; Nock et al., 2005; von Guggenberg et al., 2004).

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati diversi traccianti contenenti <sup>99m</sup>Tc, <sup>67/68</sup>Ga e <sup>111</sup>In mediante vari approcci di radiomarcatura utilizzando analoghi di CCK8 e gastrina funzionalizzati con diversi sistemi chelanti.

La scelta della posizione di marcatura dei peptidi si basa su studi precedenti di modeling molecolare (meccanismi molecolari e quantomeccanici) (Morelli et al., 2002) che hanno dimostrato che modificazioni all'N-terminale del peptide CCK8, come per esempio l'introduzione di un chelante, non modificano il binding del peptide con il recettore.

I derivati peptidi ottenuti e studiati in vitro ed in vivo dopo marcatura con il metallo radioattivo, possono essere suddivisi nelle seguenti classi:

- a) derivati del peptide CCK8 funzionalizzati con fosfine e marcati con <sup>99m</sup>Tcnezio;
- b) derivati del peptide CCK8 funzionalizzati con il chelante DOTA e marcati con <sup>67</sup>-Gallio o <sup>68</sup>-Gallio;
- c) derivati del peptide minigastrina marcati con <sup>111</sup>-Indio attraverso il chelante DTPAGlu o con Gallio attraverso il chelante DOTA.

I risultati relativi allo sviluppo delle tre classi di composti sopra citati è riportato qui di seguito.

a) *Derivati del peptide CCK8 funzionalizzati con fosfine e marcati con  $^{99m}\text{Tc}$ -Tecnezio.*

3.1 *Sintesi dei peptidi radiomarcanti  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-CCK8}$  e  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$*

La sintesi del peptide CCK8 è stata eseguita in fase solida mediante una chimica Fmoc (White and Chan, 2000), secondo il protocollo descritto nel capitolo Materiali e Metodi e secondo lo schema riportato di seguito in figura 7.

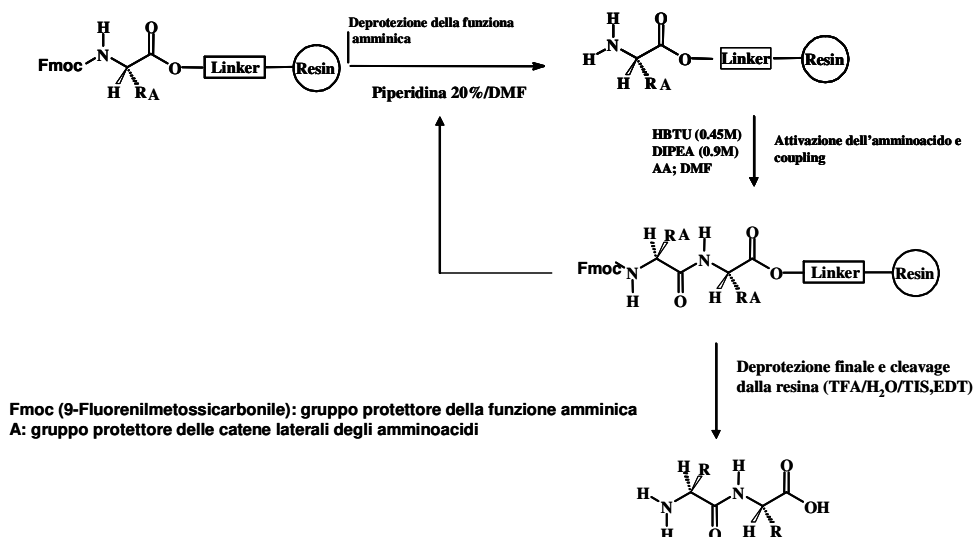
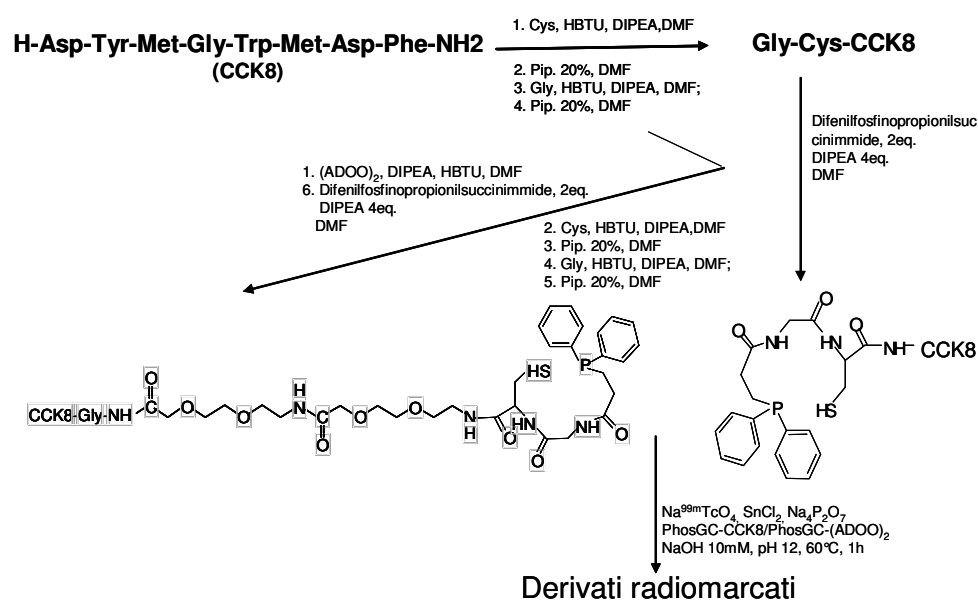


Fig.7: Schema di sintesi peptidica in fase solida con chimica Fmoc.

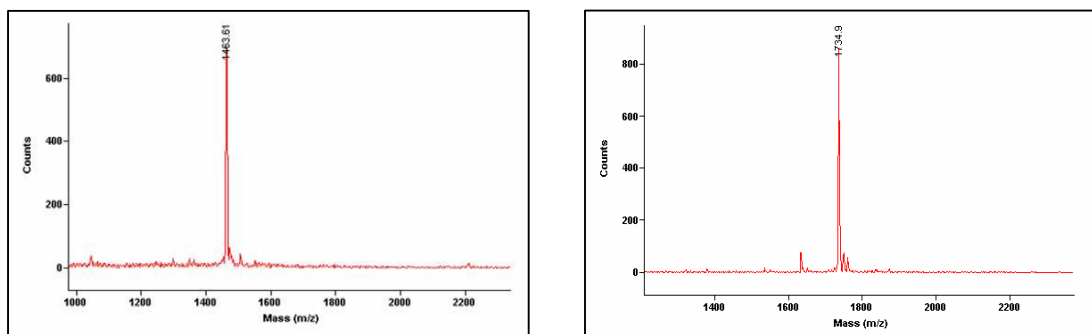
L'ammidazione del C-terminale è necessaria al fine di preservare l'attività biologica del CCK8. Per ottenere il coniugato  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-CCK8}$  sono stati aggiunti all'N-terminale del peptide biologicamente attivo CCK8 due altri amminoacidi, cisteina e glicina, mentre nel caso del coniugato  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$  prima di aggiungere gli stessi amminoacidi sono state inserite due unità di linker spaziatore acido-8-ammino-3,6-dioxaottanoico (ADOO) per rendere meno idrofobico il complesso finale. Il linker ossoetilenoico è stato legato al peptide in fase solida seguendo le procedure della chimica Fmoc; infatti avendo ad una estremità una funzione amminica protetta dal gruppo Fmoc e all'altra estremità una funzione

carbossilica libera, quest'ultima può reagire facilmente utilizzando le stesse condizioni utilizzate per la formazione del legame ammidico tra due amminoacidi. Su entrambi i peptidi è stato fatto reagire un derivato carbossilico di una difenilfosfina preattivata come succinimide (3-difenilfosfinopropionil succinimide). La reazione avviene in condizioni leggermente basiche e in DMF. La presenza della fosfina è necessaria perché il fosforo, insieme allo zolfo della catena laterale della cisteina e insieme ai due atomi di azoto ammidici formano un sistema chelante in grado di coordinare il Tc ottenendo complessi termodinamicamente e cineticamente stabili (Fig.8).



**Fig.8:** Schema di sintesi per la formazione dei prodotti <sup>99m</sup>TcO-PhoGC-CCK8 e PhoGC-(AdOO)<sub>2</sub>-CCK8

Alla fine della sintesi i due peptidi vengono staccati dalla resina utilizzando una miscela di TFA, EDT, TIS e H<sub>2</sub>O, precipitata per aggiunta di etere, purificati mediante HPLC in fase inversa e caratterizzati mediante spettrometria di massa Maldi-TOF e cromatografia HPLC analitica. In figura sono riportati i due spettri di massa dei due prodotti dopo purificazione e liofilizzazione.



**Fig.9:** Spettro Maldi-ToF dei composti puri  $^{99m}\text{TcO}$ -PhoGC-CCK8 (sinistra) e PhoGC-(AdOO) $_2$ -CCK8 (destra)

I due prodotti sono stati successivamente radiomarcati con  $^{99m}\text{TcO}$  (Osso-Tecnezio) utilizzando le classiche procedure di marcatura con Osso-Tecnezio. Infatti, la reazione di radiomarcatura è stata condotta in ambiente basico a (pH 12) in presenza di pertecnato ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) ottenuto direttamente dal generatore  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  in cui il Tc si trova nello stato di ossidazione VII. Tale stato di ossidazione del Tc non è sfruttabile nelle reazioni di complessazione per cui è stato necessario ridurlo allo stato di ossidazione V utilizzando l'agente riducente  $\text{SnCl}_2$ . L'efficienza di radiomarcatura è stata controllata mediante HPLC ed è stato osservato che rispetto al coniugato CCK8 con  $^{111}\text{In}$  precedentemente studiato (Aloj et al., 2003) dal gruppo di ricerca diretto dal Prof. Morelli i due coniugati con  $^{99m}\text{Tc}$  presentano una minore efficienza di radiomarcatura e un picco leggermente più slargato all'HPLC come mostrato in Figura 10. L'andamento cromatografico potrebbe essere attribuito alla maggiore idrofobicità dei complessi dovuta alla presenza della fosfina.

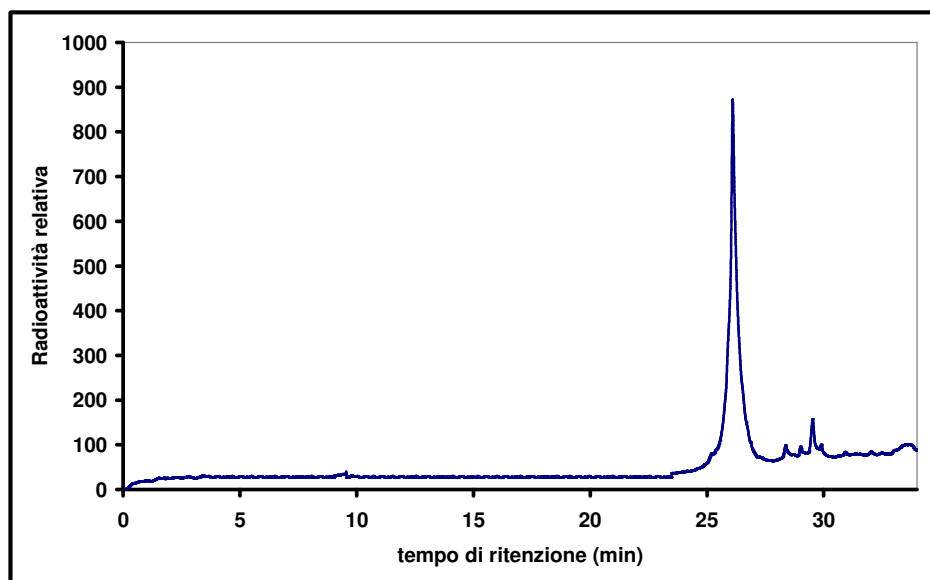


Fig. 10a: RP-HPLC analitico del coniugato radiomarcato  $^{99m}\text{Tc}$ -PhoGC-(AdOO) $_2$ -CCK8

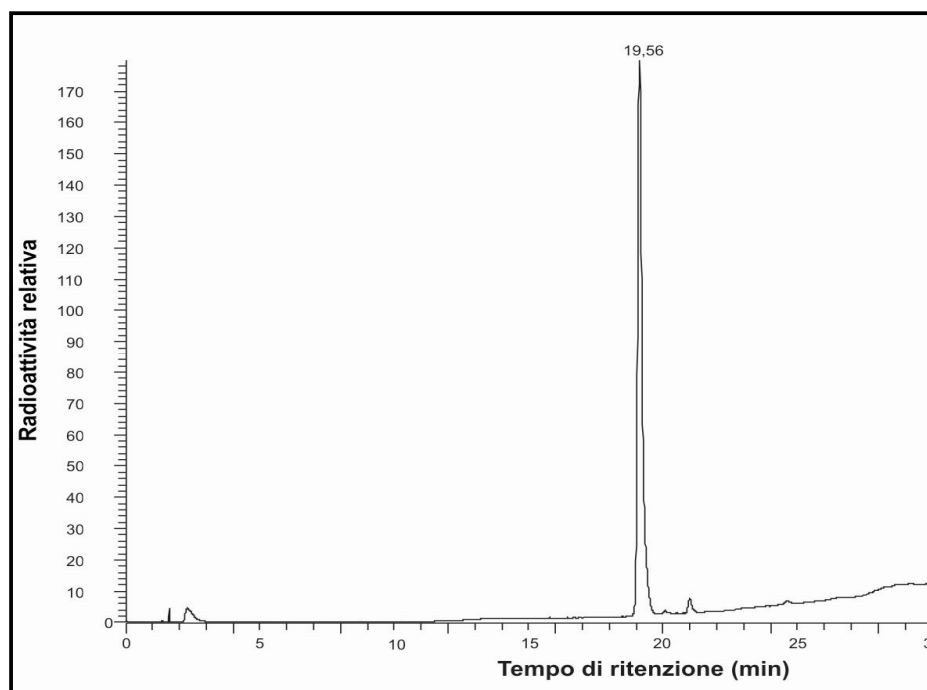


Fig. 10b: RP-HPLC analitico del coniugato radiomarcato  $^{99m}\text{Tc}$ -PhoGC-CCK8

### 3.2 Studi *in vitro* dei radiomarcanti $^{99m}\text{TcO-PhoGC-CCK8}$ e $^{99m}\text{TcO-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$

I due derivati fosfinici del CCK8 radiomarcanti con  $^{99m}\text{Tc}$  sono stati studiati *in vitro* per verificare innanzitutto la loro abilità a legare in modo specifico il recettore CCKBR e per valutare se conservavano una affinità dell'ordine di grandezza nanomolare, analoga al peptide libero CCK8 o al suo derivato con Indio-111, verso il recettore. Come sistema target sono state usate cellule appartenenti alla linea cellulare di origine umana A431 transfettate in modo da garantire una sovraespressione del recettore (A431-CCKBR). Le stesse cellule non esprimenti il recettore (A431) sono state utilizzate come controllo negativo per verificare la specificità del legame.

Un sommario di tutti i risultati ottenuti durante lo studio *in vitro* su cellule dei due peptidi è riportato nella seguente Tabella (Tabella 5) in cui vengono anche paragonati i comportamenti *in vitro* dei due diversi peptidi.

È stato osservato che, per quanto riguarda il comportamento *in vitro*, entrambi i derivati fosfinici del CCK8 hanno mostrato risultati paragonabili; infatti si può osservare che entrambi i derivati peptidici hanno presentato un'elevata affinità per il recettore CCKB con una costante  $K_d$  dell'ordine di  $10^{-8}\text{M}$ .

Tabella 5: Proprietà *in vitro* dei due peptidi coniugati

	$^{99m}\text{Tc-Phos-GC-(ADA)}_2\text{-CCK8}$	$^{99m}\text{Tc-Phos-GC-CCK8}$
<b>Radiomarcatura</b>	<b>90-95%, picco slargato in HPLC</b>	<b>90-95%, picco slargato in HPLC</b>
<b>Stabilità in siero</b>	<b>Metaboliti non rilevati dopo 18 ore di incubazione a 37°C</b>	<b>Metaboliti non rilevati dopo 18 ore di incubazione a 37°C</b>
<b>Affinità di binding, <math>K_d</math> (nM)</b>	<b><math>3.0 \pm 0.9 \times 10^{-8} \text{ M}</math></b>	<b><math>3.2 \pm 0.5 \cdot 10^{-8} \text{ M}</math></b>
<b>Internalizzazione del radiomarcato</b>	<b>Si, &gt; 75% at 2h</b>	<b>Si, &gt; 75% at 2h</b>
<b>Rilascio di radioattività</b>	<b>&gt;60 % ritenuta dopo 180 min</b>	<b>&gt; 60 % ritenuta dopo 180 min</b>
<b>Specificità di interazione</b>	<b>&gt;50:1, A431-CCKBR : A431-WT dopo due ore di uptake</b>	<b>&gt;50:1, A431-CCKBR : A431-WT dopo due ore di uptake</b>



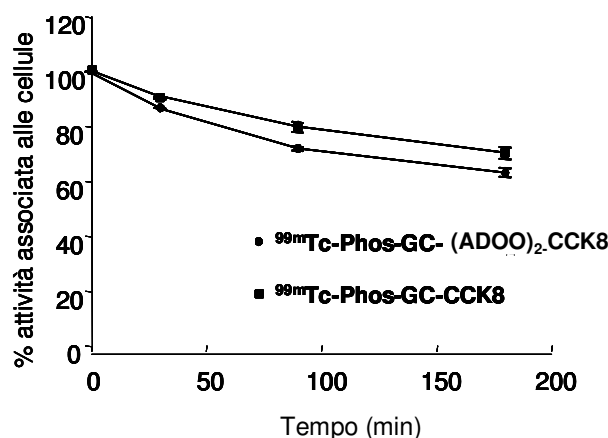


Fig.11: Ritenzione cellulare di radiomarcato ( $^{99m}\text{Tc-PhoGC-CCK8}$  e  $^{99m}\text{Tc-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$ )

La maggior parte delle molecole radiopeptidiche, una volta legate al recettore, viene internalizzata dopo che le cellule sono incubate per due ore a  $37^\circ\text{C}$  (tabella 5), tale fenomeno, come aspettato, non era osservabile nelle cellule A431-CCKB-R tenute a  $4^\circ\text{C}$  e nelle cellule A431 non esprimenti il recettore CCKB-R. Inoltre come mostrato in figura 11 si è osservato un lento rilascio di attività da parte delle cellule che avevano legato ed internalizzato il tracciante.

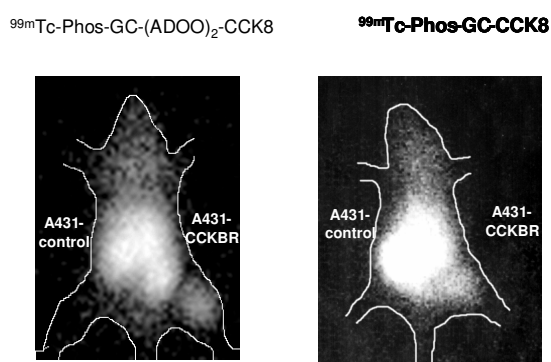
Lo studio della stabilità dei peptidi marcati in fluidi biologici è stato effettuato mediante incubazione per 18 ore in siero di topo. Entrambi hanno presentato una elevata stabilità.

### 3.3 Studi *in vivo* dei radiomarcanti $^{99m}\text{TcO-PhoGC-CCK8}$ e $^{99m}\text{TcO-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$

Le proprietà di biodistribuzione dei radiomarcanti  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-CCK8}$  e  $^{99m}\text{TcO-PhoGC-(AdOO)}_2\text{-CCK8}$  sono state valutate dopo inoculazione endovenosa in un modello murino. I due composti presentano una biodistribuzione leggermente diversa tra loro e diversa dal coniugato radiomercato, precedentemente studiato, contenente  $^{111}\text{In}$  ( $^{111}\text{In-DTPAGlu-CCK8}$ ).

Benché entrambi i composti mostrino un elevato accumulo di radioattività a livello gastrointestinale, le immagini scintigrafiche sono diverse per i composti.

In figura 12 sono riportate le immagini scintigrafiche acquisite due ore dopo aver iniettato il coniugato peptidico radiomarcato. Nel muscolo destro e sinistro dei topi sono state inoculate rispettivamente le cellule tumorali esprimenti il recettore (A431-CCKB-R) e cellule tumorali non esprimenti il recettore (A431-control). È evidente che nel caso del coniugato contenente il linker idrofilico (Fig.12 sinistra), si ha una minore captazione di radioattività nel tratto gastrointestinale dando luogo ad una migliore definizione dell'immagine del tumore. Questo è dovuto al fatto che l'introduzione del linker ha reso il complesso meno idrofobico rispetto all'altro.



**Fig.12:** Immagine scintigrafica acquisita due ore dopo l'iniezione dei peptidi radiattivi.

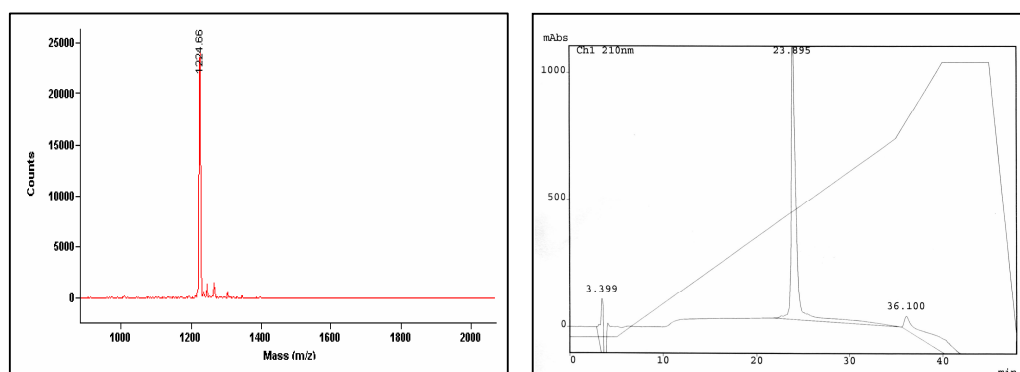
Inoltre è stato osservato che nel caso del coniugato più idrofilico si ha una veloce eliminazione attraverso i reni. Quest'ultimo aspetto è molto importante perché una veloce eliminazione riduce la tossicità del radiofarmaco.

In conclusione, benché i due composti mostrino un comportamento in vitro sostanzialmente equivalente, la diversa biodistribuzione, dovuta alla diversa idrofilicità delle molecole, fa sì che il composto contenente il linker idrofilico porta a risultati in vivo maggiormente utilizzabili nell'imaging di tumori che esprimono il recettore di tipo B delle colecistochinina.

### 3.4 Sintesi dei coniugati $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ e $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$

Nell'ambito della classe di derivati del peptide CCK8 marcati con  $^{99m}\text{Tc}$  grazie alla presenza di un chelante fosfinico, sono stati studiati complessi di Tecnezio in cui il legante fosfinico non è covalentemente legato al peptide ma funge come chelante aggiuntivo nel processo di complessazione del tecnezio al peptide.

Per ottenere questi composti, all'estremità N-terminale del peptide CCK8 sono state inserite una Glicina, che funge da spaziatore tra l'agente chelante e la parte biologicamente attiva del peptide, e una Cisteina il cui gruppo  $-\text{SH}$  sulla catena laterale insieme al gruppo  $-\text{NH}_2$  terminale è coinvolto nella coordinazione del metallo radioattivo. Il peptide NS-Cys-Gly-CCK8 è stato sintetizzato secondo la procedura standard di chimica Fmoc. E' stato purificato mediante HPLC su fase inversa e analizzato mediante spettroscopia di massa MALDI-TOF e cromatografia HPLC analitica. Di seguito sono riportati il cromatogramma del prodotto puro e lo spettro di massa corrispondente, da cui si evince che il prodotto è stato ottenuto con buone rese ed elevata purezza.



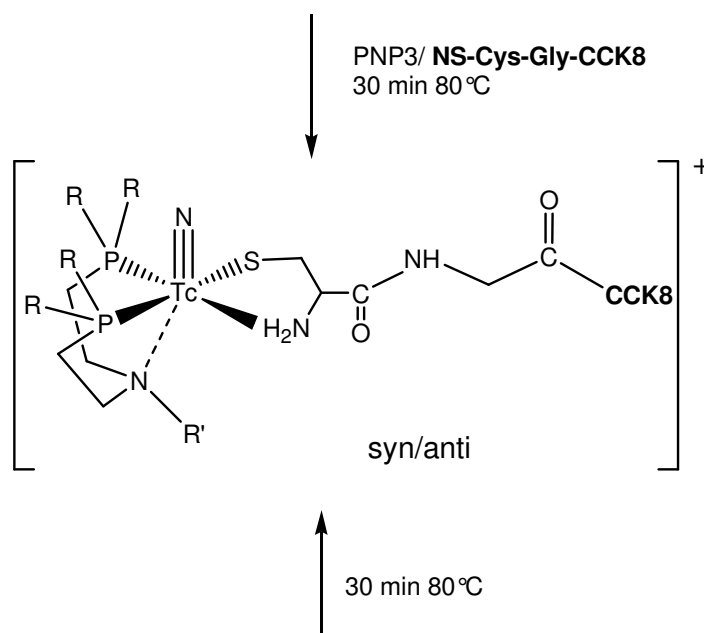
**Fig 13:** Spettro Maldi-ToF del peptide puro (destra), Profilo HPLC analitico del peptide puro (destra).

Il peptide viene marcato con Tecnezio utilizzando come coligandi per il metallo una amino-di-fosfina che agisce come chelante tridentato e un gruppo nitruro. Il set di coordinazione del metallo Tecnezio è quindi costituito dai due atomi di fosforo della di-fosfina, un gruppo amminico, sempre appartenente al co-ligando fosfinico, un

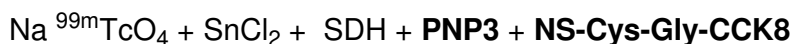
gruppo amminico proveniente dall'estremità amminica del peptide, un atomo di zolfo della cisterna presente sulla parte peptidica ed un atomo di azoto del nitruro.

La procedura di radiomarcatura per i composti  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ , e  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$  è schematizzata come segue:

### Method 1

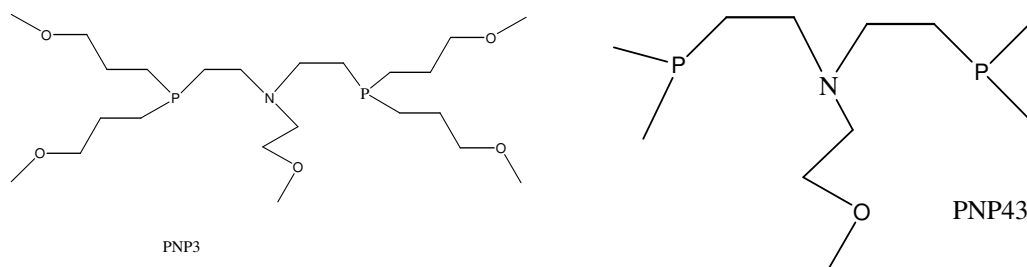


### Method 2



**Fig.13:** Schema di sintesi del peptide radiomercato contenente la amino-difosfina PNP3. Analogamente è stato preparato il composto radiomercato contenente la amino-difosfina PNP43. Il metodo 1 prevede due steps di reazione mentre il metodo 2 è a singolo step.

In figura 14 sono riportate le due fosfine utilizzate per la sintesi dei due complessi peptidici del Tecnezio, le due fosfine si differenziano per le loro proprietà di idrofobicità e di ingombro sterico.

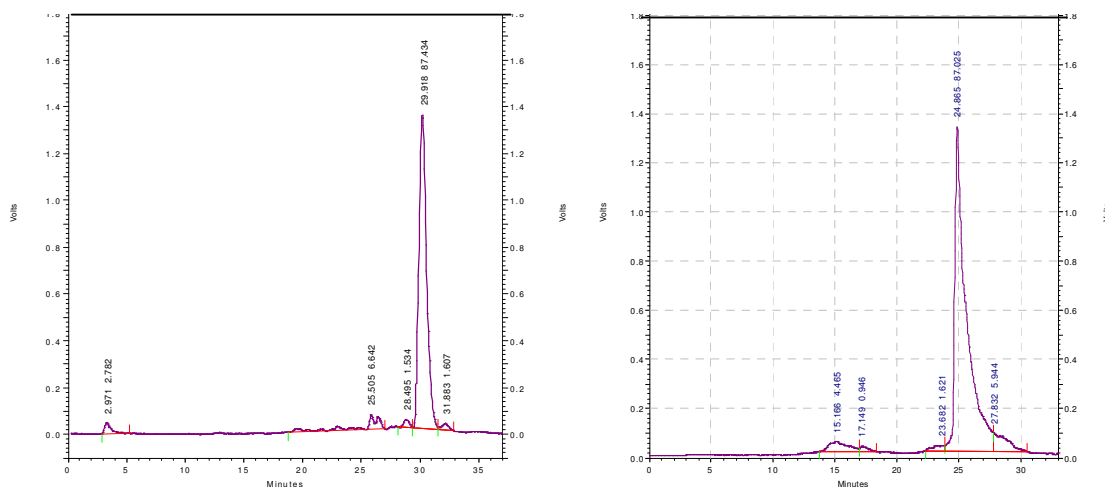


**Fig.14:** Ligandi PNP3 e PNP43 di tipo fosfinico.

Sono state messe a punto due metodiche per la formazione dei coniugati. In una si utilizza una procedura a due step in cui si forma prima una miscela di precursori  $^{99m}\text{Tc}$ -nitrito, contenenti tutti il core  $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ , attraverso la riduzione di pertecnato con cloruro stannoso(II) in presenza di SDH come donatore di atomi di azoto (I step) e poi vengono aggiunti contemporaneamente la difosfina e il ligando bidentato NS-Cys-Gly-CCK8 per ottenere la miscela finale di composti con buone rese (II step).

La seconda metodica prevede un solo step di reazione e porta alla formazione dei composti asimmetrici finali con resa e grado di purezza paragonabili a quelli ottenuti utilizzando la procedura a due step (Fig.15 a e b). Per praticità in tutti gli esperimenti è stata utilizzata la seconda metodica in cui si aggiunge semplicemente una soluzione di pertecnato alla miscela di reazione contenente:  $\text{SnCl}_2$ , SDH, PNP3 e NS-Cys-Gly-CCK8.

Il fatto che le due procedure portano alla stessa miscela di isomeri syn/anti con rese paragonabili dimostra che una volta che si è formato il core  $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$  si ha una rapida coordinazione della fosfina per formare il complesso  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{PNP})]^{2+}$ . Questo significa che le fosfine giocano un ruolo fondamentale nella stabilizzazione del core  $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}(\text{N})]^{2+}$  e nel promuovere la reattività del complesso intermedio  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{PNP})]^{2+}$  che immediatamente ed efficientemente reagisce con il ligando bidentato per formare il composto finale. La formazione di due forme isometriche syn/anti è dovuta alla presenza del C asimmetrico in alfa della cisteina e quindi dipende dall'orientazione del gruppo COO-sostituito della cisteina rispetto al core centrale. Purtroppo non è possibile separare cromatograficamente i due isomeri per cui nelle prove *in vivo* ed *in vitro* è stata utilizzata una miscela dei prodotti.

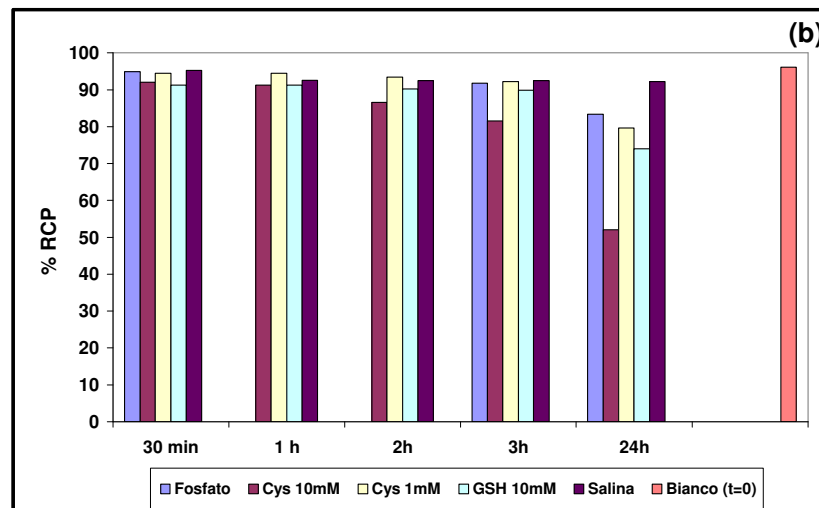
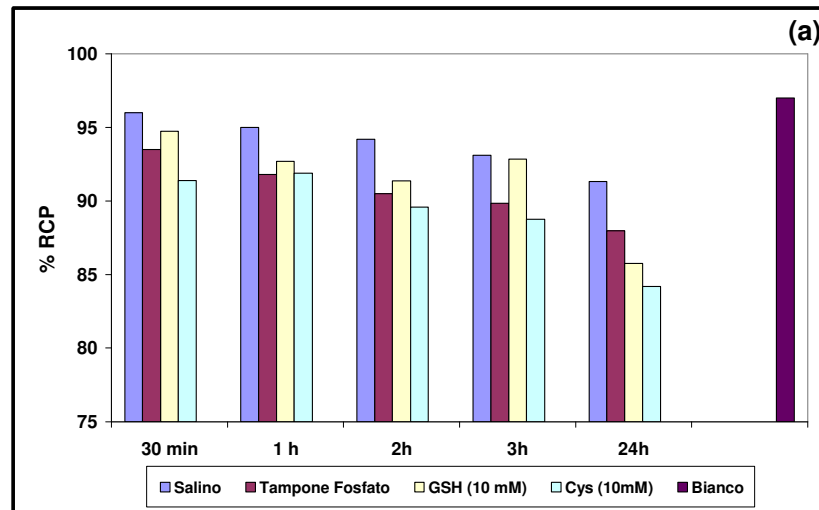


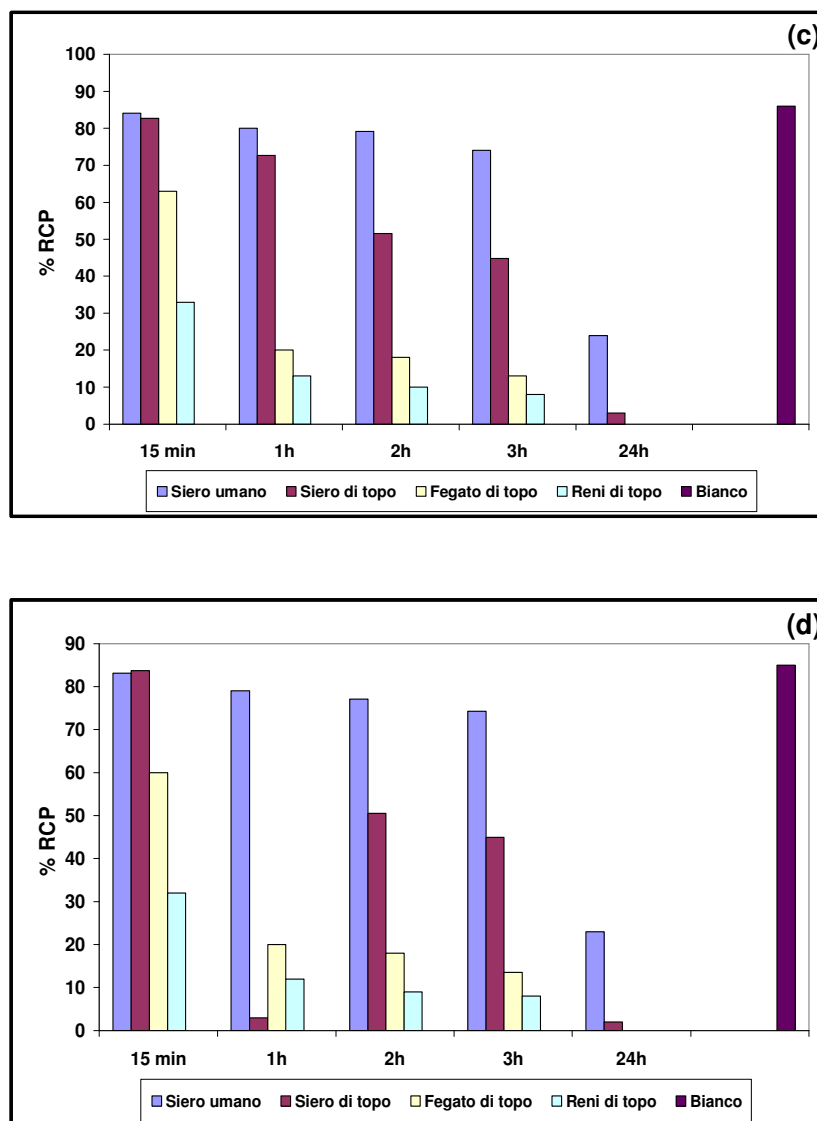
**Fig.15:** Profilo analitico dei due peptidi. a)  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ , b)  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$

Le due fosfine utilizzate (Fig.14) differiscono per dimensioni e per idrofobicità; infatti è stato osservato che aumentare l'idrofilicità del complesso migliora la biodistribuzione.

### 3.5 Studi *in vitro* dei peptidi radiomarcanti $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ e $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$

Entrambi i composti sono stabili in soluzione salina e in buffer fosfato (0.2 M; pH 7.4) per 24 ore; inoltre è stata osservata una elevata inerzia rispetto alla transchelazione utilizzando un eccesso di cisteina libera o glutatione; questo conferma l'elevata stabilità termodinamica e elevata inerzia cinetica dei due coniugati (Fig. 16a  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$  e Fig 16b  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$ ). La stabilità *in vitro* dei due composti è stata valutata dopo incubazione con siero umano, siero di topo e omogenato di fegato di topo a 37°C per 24 ore (Fig.16c  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$  e Fig 16d  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$ ). I complessi sono risultati essere stabili nelle prime tre ore; dopo 24 ore l'80% di attività è associata con il peptide dopo incubazione nel siero umano e circa il 50% dopo incubazione nel siero di topo. Questo risultato porta alla conclusione che i complessi sono resistenti alle azioni enzimatiche.





**Fig.16:** Studi di stabilità *in vitro*: studi di transchelazione con Cys e GSH di (a)  $(99mTc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3))^+$ ; e (b)  $(99mTc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43))^+$ ; studi di stabilità in siero di (c)  $(99mTc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3))^+$  e (d)  $(99mTc(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP43))^+$ .

Per quanto riguarda le proprietà di binding cellulare, gli esperimenti sono stati condotti a 4°C per bloccare l'internalizzazione del recettore in modo da misurare soltanto l'interazione tra ligando e recettore. I composti hanno mostrato elevata affinità di binding e specificità per le cellule A431-CCK2-R, con la tipica curva di saturazione riportata in figura 17.



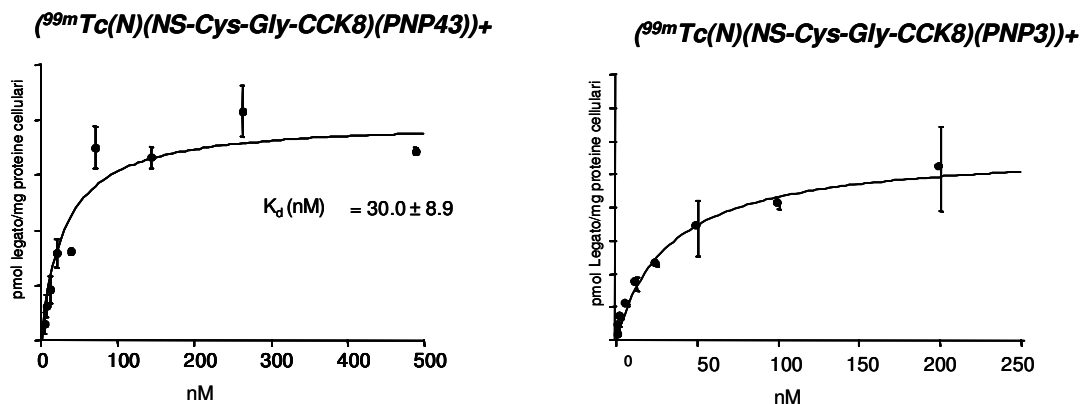


Fig.17: Affinità di legame e specificità per le cellule A431-CCK2-R, con la tipica curva di saturazione.

Il livello di binding non specifico, valutato mediante incubazione del complesso con cellule non esprimenti il recettore in presenza di un eccesso di peptide non radiomarcato di cento volte, è stato molto basso. I valori ottenuti sono molto simili a quelli ottenuti per il complesso, studiato precedentemente, del CCK8 coniugato con  $^{111}\text{In}$  (Aloj et al., 2004).

### 3.6 Studi *in vivo* dei peptidi radiomarcati $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ e $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP43}))^+$

Sono stati condotti studi di biodistribuzione sul complesso radiomarcato  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ . In figura 18 sono riportati gli studi di distribuzione del peptide radiomarcato effettuati su topi nudi a 1 ora dalla somministrazione del radioattivo.

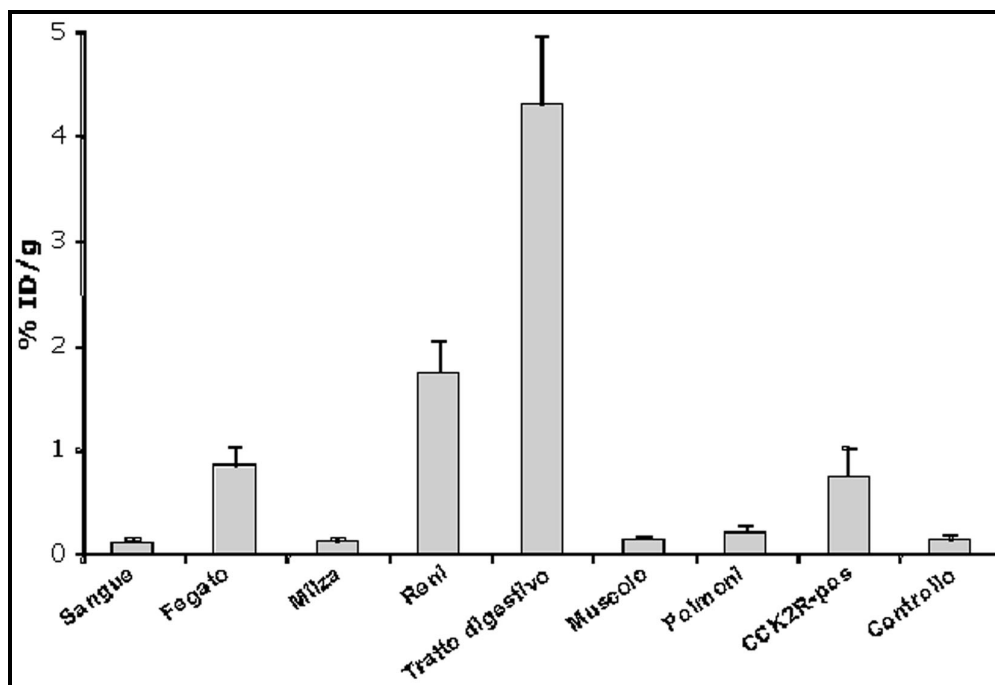


Fig. 18: Biodistribuzione del complesso radiomarcato  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ .

Il complesso ha mostrato una rapido e specifico uptake sulle cellule A431 esprimenti il recettore di tipo B, rispetto alle cellule tumorali non esprimenti il recettore, con un rapporto target/non-target di 4:1. L'attività è stata rapidamente eliminata dal sangue e dai tessuti (polmone, milza e muscoli). Sono state osservate concentrazioni relativamente alte nel fegato e nei reni. L'eliminazione della radioattività è avvenuta maggiormente attraverso il sistema epato-biliare, poiché dopo un'ora la maggiore attività è stata trovata nel tratto intestinale.

In letteratura sono riportati diversi studi su peptidi che legano i recettori CCK-R radiomarcati utilizzando diversi approcci. Il targeting recettore-specifico è stato ottenuto facilmente e la maggior parte dello studio è rivolto a ridurre l'accumulo nei tessuti non target. La maggior parte dei composti descritti sembrano essere eliminati attraverso il sistema urinario, anche se in alcuni casi alti livelli di ritenzione per periodi prolungati sono stati osservati nei reni. Questo inconveniente a volte può richiedere misure correttive come la co-iniezione di composti competitori per ridurre l'accumulo nei reni (Béché et al., 2005).

L'elevata radioattività intestinale del coniugato  $(^{99m}\text{Tc}(\text{N})(\text{NS-Cys-Gly-CCK8})(\text{PNP3}))^+$ , è un risultato sfavorevole; tuttavia, la osservata alta rapidità di

eliminazione che provoca una bassa ritenzione nel fegato e nei reni suggerisce ulteriori indagini e studi su peptidi marcati con questo sistema chelante, con lo scopo di migliorare le proprietà di biodistribuzione.

**b) derivati del peptide CCK8 funzionalizzati con il chelante DOTA e marcati con  $^{67}\text{Ga}$  o  $^{68}\text{Ga}$ .**

### 3.7 Sintesi e radiomarcatura del peptide DOTA-G-CCK8 con $^{67}\text{Ga}$ e $^{68}\text{Ga}$

Dopo aver sintetizzato il peptide CCK8 secondo il protocollo standard di sintesi in fase solida aggiungendo una glicina come spaziatore all'N-terminale, è stato legato il chelante DOTA, utilizzando un suo precursore. Quest'ultimo ha tre funzioni carbossiliche protette con il gruppo tBu e una libera, per cui è stato possibile legarlo in fase solida. La deprotezione delle funzioni carbossiliche dal gruppo tBu avviene in condizioni acide durante il distacco del peptide dalla resina. Dopo purificazione HPLC si è ottenuto un prodotto con buone rese e con elevata purezza (>95 %).

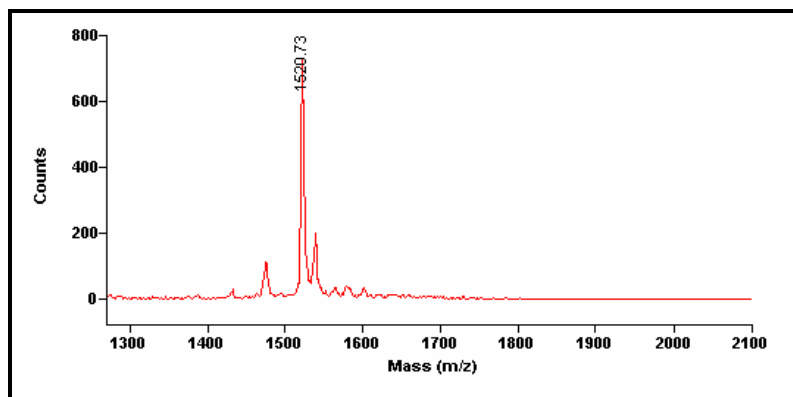


Fig.19. Spettro MALDI-TOF del coniugato DOTA-GlyCCK8.

La radiomarcatura è rapida ed efficiente sia con  $^{67}\text{Ga}$  sia con  $^{68}\text{Ga}$ . Nel primo caso, avendo a disposizione il  $^{67}\text{Ga}$  sotto forma di citrato è stato necessario trasformarlo in cloruro prima di utilizzarlo per la radiomarcatura. Il  $^{67}\text{Ga}$ , infatti forma dei complessi particolarmente stabili con il citrato (Clausén et al., 2005) per cui la resa

di radiomarcatura del coniugato con il DOTA risultava essere bassa, nonostante il DOTA fosse un chelante in grado di coordinare il Ga con elevata efficienza.

Il  $^{68}\text{Ga}$  invece è stato prelevato direttamente sotto forma di cloruro dal generatore  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ . In figura 20 sono schematizzate le reazioni di radiomarcatura del DOTA-G-CCK8 con entrambi gli isotopi radiattivi.

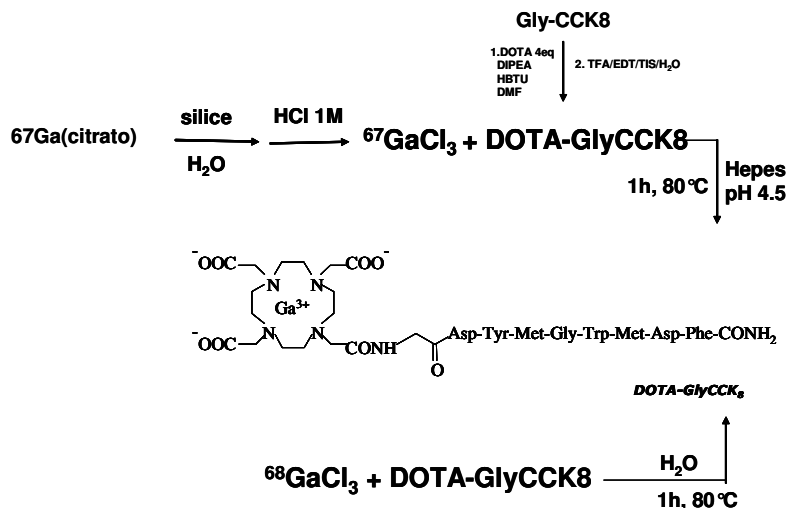


Fig.20: Schema di radiomarcatura di DOTA-G-CCK8 con  $^{67}\text{Ga}$  e  $^{68}\text{Ga}$

La radiomarcatura con entrambi gli isotopi è stata rapida e con elevata purezza radiochimica come mostra il cromatogramma (HPLC) in figura 21.

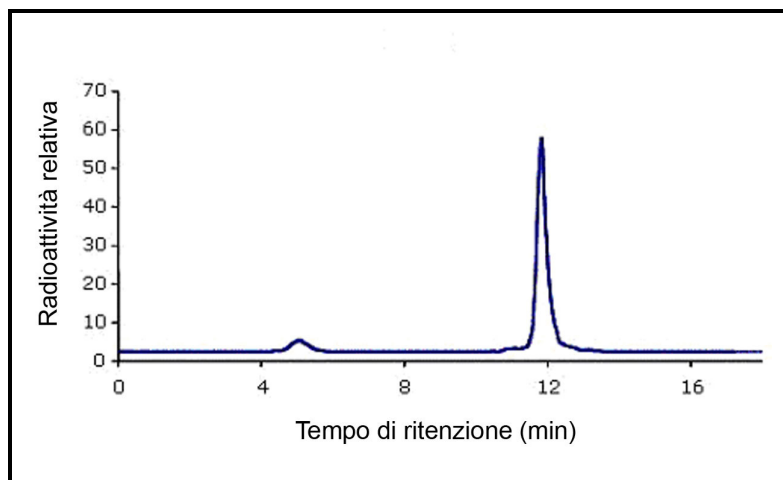
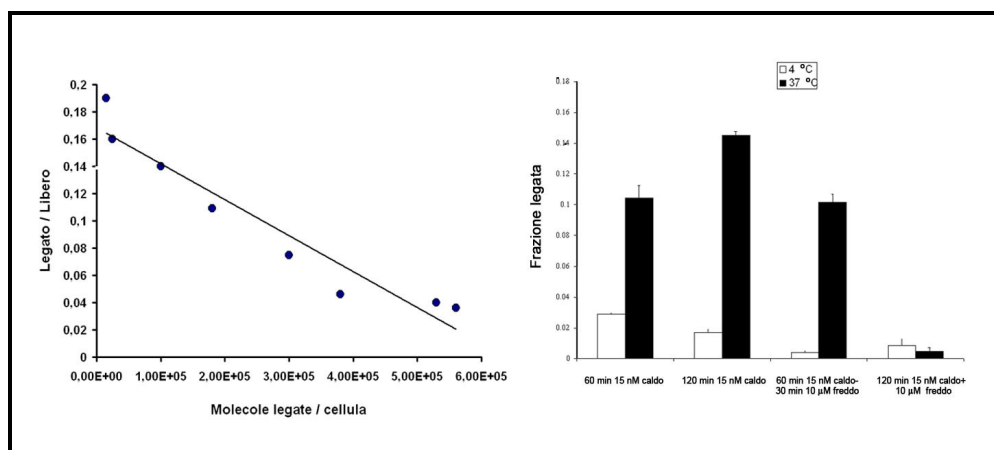


Fig.21: RP-HPLC del coniugato  $^{67/68}\text{Ga}$ -DOTA-G-CCK8

### 3.8 Binding cellulare e internalizzazione di DOTA-G-CCK8 con $^{67}\text{Ga}$ e $^{68}\text{Ga}$

I due coniugati radiomarcanti  $[^{67/68}\text{Ga}]\text{DOTA-G-CCK8}$  hanno mostrato elevata specificità per le cellule A431-CCKB-R. Infatti il binding non-specifico, stimato incubando il composto con cellule non esprimenti il recettore o con cellule esprimenti il recettore in presenza di 100 volte in eccesso di peptide non marcato, è stato molto basso. In figura 22 è riportata la curva di saturazione del  $[^{67}\text{Ga}]\text{DOTA-G-CCK8}$  su cellule A431-CCKBR. Entrambi gli esperimenti sono stati condotti a  $4^\circ\text{C}$  per bloccare l'internalizzazione del recettore così da misurare soltanto l'interazione ligando-recettore.



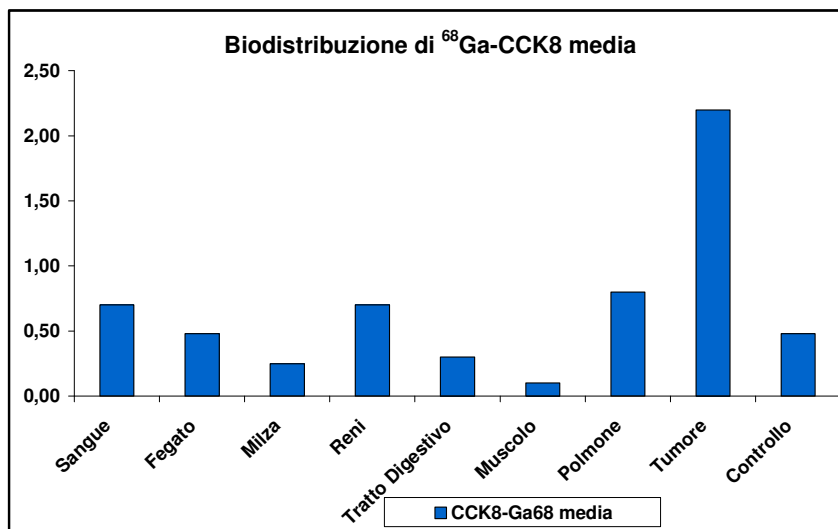
**Fig 22:** a) Curva di saturazione del radiomarcato  $[^{67}\text{Ga}]\text{DOTA-G-CCK8}$  su cellule A431-CCKBR; b) studio di internalizzazione.

Per valutare se i peptidi sono stati internalizzati dalle cellule, sono stati condotti esperimenti paralleli in cui le cellule A431-CCKBR sono state incubate con 15nM di  $[^{67/68}\text{Ga}]\text{DOTA-G-CCK8}$  a  $4^\circ\text{C}$  (internalizzazione bloccata) e a  $37^\circ\text{C}$  (internalizzazione attiva) (Fig. 22b). E' stato visto un progressivo accumulo di radiomarcato in cellule incubate a  $37^\circ\text{C}$  soltanto con peptide marcato mentre i livelli di radioattività associati alle cellule sono costanti in cellule incubate a  $4^\circ\text{C}$  a 60 e a 120 minuti, suggerendo che a  $37^\circ\text{C}$  avviene l'internalizzazione. La contemporanea incubazione con un eccesso di peptide caldo ha prodotto un basso livello di attività associata alle cellule confermando la specificità dell'interazione. Dopo aver incubato per 120 minuti con solo il peptide marcato le cellule vengono incubate per altri 60 minuti a  $37^\circ\text{C}$  con il peptide freddo. Un'elevata percentuale di radioattività (85%) è stata spiazzata mediante peptide freddo

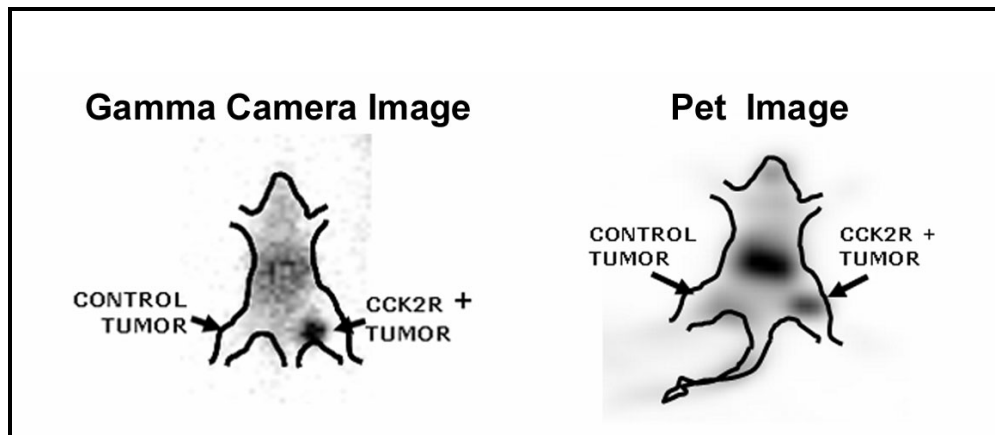
in cellule incubate a 4 °C mentre una piccola quantità (10%) è stata spiazzata in cellule incubate a 37°C, questo significa che la maggior parte di peptide radiomarcato è stato internalizzato in cellule a 37°C.

### 3.9 Biodistribuzione e Imaging

Gli esperimenti di biodistribuzione sono stati effettuati su topi nudi e hanno mostrato che il peptide radiomarcato [ $^{67/68}\text{Ga}$ ]DOTA-G-CCK8 ha dato alti livelli di targeting del recettore CCKB-R dopo un'ora dall'iniezione. In figura 23 è riportato lo studio di biodistribuzione sui vari organi. È evidente una bassa ritenzione nei reni e l'accumulo di radioattivo negli altri organi è irrilevante e decresce con l'eliminazione dal sangue. Più dell'80% di attività è stata eliminata attraverso i reni dopo 30 minuti.



**Fig.23:** Biodistribuzione di [ $^{67/68}\text{Ga}$ ]DOTA-G-CCK8 dopo iniezione intravenosa. La radioattività associata agli organi è espressa in percentuale %ID per grammo di tessuto normalizzata per un topo di 20g.



**Fig.24:** Destra: Immagine di [ $^{67}\text{Ga}$ ]DOTA-G-CCK8 acquisita con una gamma-camera dopo un'ora dall'iniezione; Sinistra: Immagine PET di [ $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-G-CCK8 acquisita dopo un'ora dall'iniezione.

In figura 24 (destra) è riportata l'immagine ottenuta con la gamma camera acquisita dopo un'ora dall'iniezione, da cui è evidente che si è avuto un accumulo elevato del radiomarcato sulle cellule tumorali esprime il recettore di tipo B e un basso accumulo sul tumore controllo. La stessa immagine è stata acquisita utilizzando la tecnica PET (Fig. 22 destra), quindi dopo iniezione del radiomarcato [ $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-G-CCK8, ottenendo gli stessi promettenti risultati.

**c) Derivati del peptide minigastrina marcati con  $^{111}\text{In}$  attraverso il chelante DTPAGlu o con Gallio attraverso il chelante DOTA.**

**3.10 Sintesi di  $^{111}\text{In}$ DTPAGlu-minigastrina (SMG e LMG) e  $^{68}\text{Ga}$ DOTA minigastrina (SMG e LMG)**

La sintesi dei due peptidi derivati della minigastrina (SMG e LMG) è stata condotta in fase solida secondo il protocollo riportato nel capitolo Materiali e Metodi. I due chelanti, DTPAGlu e DOTA, sono stati legati in fase solida (Fig. 25). Infatti il precursore del legante DTPAGlu, come quello del legante DOTA descritto precedentemente, ha tutte le funzioni carbossiliche protette da gruppi ter-butilici tranne una che è utilizzata per la formazione del legame ammidico.

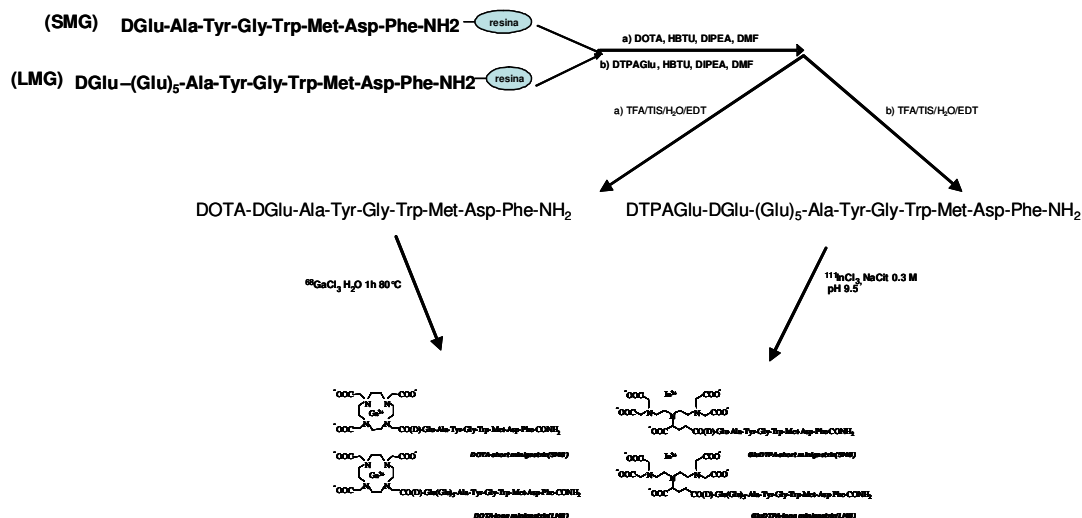


Fig. 25: Schema di sintesi dei derivati della minigastrina e radiomarcatura con <sup>68</sup>Ga e con <sup>111</sup>In.

La minigastrina corta (SMG) differisce dalla minigastrina lunga (LMG) semplicemente per la presenza di un solo residuo di acido glutammico nella sequenza rispetto ai cinque presenti all'N-terminale della LMG. In entrambi i casi all'N-terminale il residuo di acido glutammico è in forma D per conferire al peptide una maggiore stabilità. Inoltre l'aggiunta di più unità di acido glutammico è mirata a ridurre l'accumulo nei reni (Béhé et al. 2005). Infatti l'accumulo nei reni accentuato dalla presenza di peptidi cationici può essere ridotto co-iniettando amminoacidi cationici come lisine e arginine.

Tutti i prodotti sono stati ottenuti con elevata purezza (Fig. 26) e con alte rese.

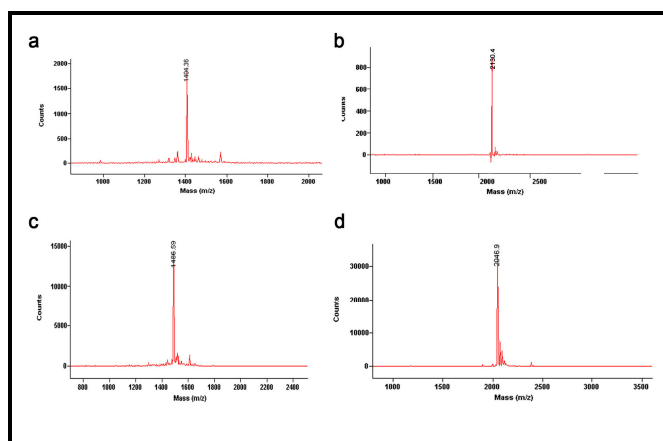
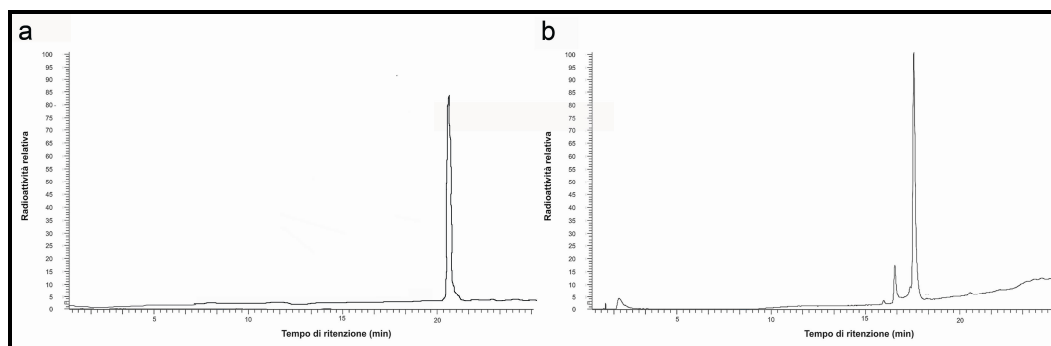


Fig. 26: Spettri Maldi-ToF: a) DOTA-SMG, b) DTPAGlu-LMG; c) DTPAGlu-SMG; d) DOTA-LMG



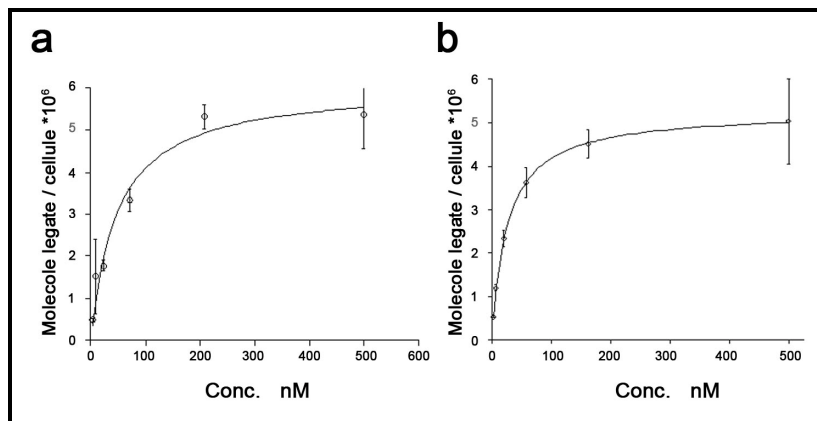
La radiomarcatura sia con  $^{68}\text{Ga}$  che con  $^{111}\text{In}$  è stata efficiente ottenendo delle ottime rese di radiomarcato come evidente dalle analisi HPLC in figura 27.



**Fig. 27:** RP-HPLC del peptide radiomarcato  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-SMG (a) e  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-SMG (b). Analoghi risultati si sono ottenuti per i coniugati  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-LMG e  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-LMG.

### 3.11 Studi *in vitro* della minigastrina marcata con $^{111}\text{In}$ e studi *in vitro* della minigastrina marcata con $^{68}\text{Ga}$

Gli esperimenti di saturazione con  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-DGlu(1)-minigastrina e  $^{111}\text{In}$ -DTPAGlu-DGlu-Glu(5)-minigastrina sul recettore di tipo B espresso sulle cellule A431 hanno mostrato una paragonabile affinità di binding ( $K_d < 10^{-8}\text{M}$ ), (Fig 28). Questo risultato è stato paragonato con il precedente studio eseguito con il peptide CCK8 modificato con il chelante DTPAGlu e radiomarcato con  $^{111}\text{In}$  e anche in questo caso la costante di binding è paragonabile. Inoltre, gli esperimenti di saturazione con  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-DGlu(1)-minigastrina e  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-CCK8 su cellule A431 esprimenti il recettore CCKB ha mostrato una paragonabile affinità di binding.



**Fig.28:** Studi di binding in vitro effettuati su cellule A431-CCKBR: (a) <sup>111</sup>InDTPAGlu-LMG e (b) <sup>111</sup>InDTPAGlu-SMG.

### 3.12 Studi *in vivo* della minigastrina marcata con <sup>68</sup>Ga e <sup>111</sup>In

Gli esperimenti di biodistribuzione hanno mostrato livelli di targeting di <sup>111</sup>In-DTPAGlu-DGlu-Glu(5)-minigastrina più alti rispetto a quelli ottenuti con <sup>111</sup>In-DTPAGlu-DGlu(1)-minigastrina o con <sup>111</sup>In-DTPAGlu-CCK8. Elevati livelli di ritenzione (2-3 volte maggiori), sono stati osservati nei reni con <sup>111</sup>In-DTPAGlu-DGlu-Glu(5)-minigastrina se paragonati agli altri due composti (Fig 29a).

Per quanto gli studi di biodistribuzione condotti sulle minigastrine modificate con il chelante DOTA e marcate con <sup>68</sup>Ga, essi hanno dimostrato caratteristiche simili nel targeting degli xenografts esperimenti CCKB-R da parte del <sup>68</sup>Ga-DOTA-CCK8 ( $2.1 \pm 0.4$  %ID/g at 1h) e <sup>68</sup>Ga-DOTA-DGlu(1)-minigastrina ( $2.2 \pm 0.6$  %ID/g at 1h) paragonati ai rispettivi xenografts di controllo (entrambi  $<0.5$  %ID/g at 1h). Tuttavia con l'uso del <sup>68</sup>Ga-DOTA-DGlu(1)-minigastrina ( $2.4 \pm 0.1$  %ID/g at 1h) si è osservato un accumulo significativo di radioattività nei reni (Fig. 29b).

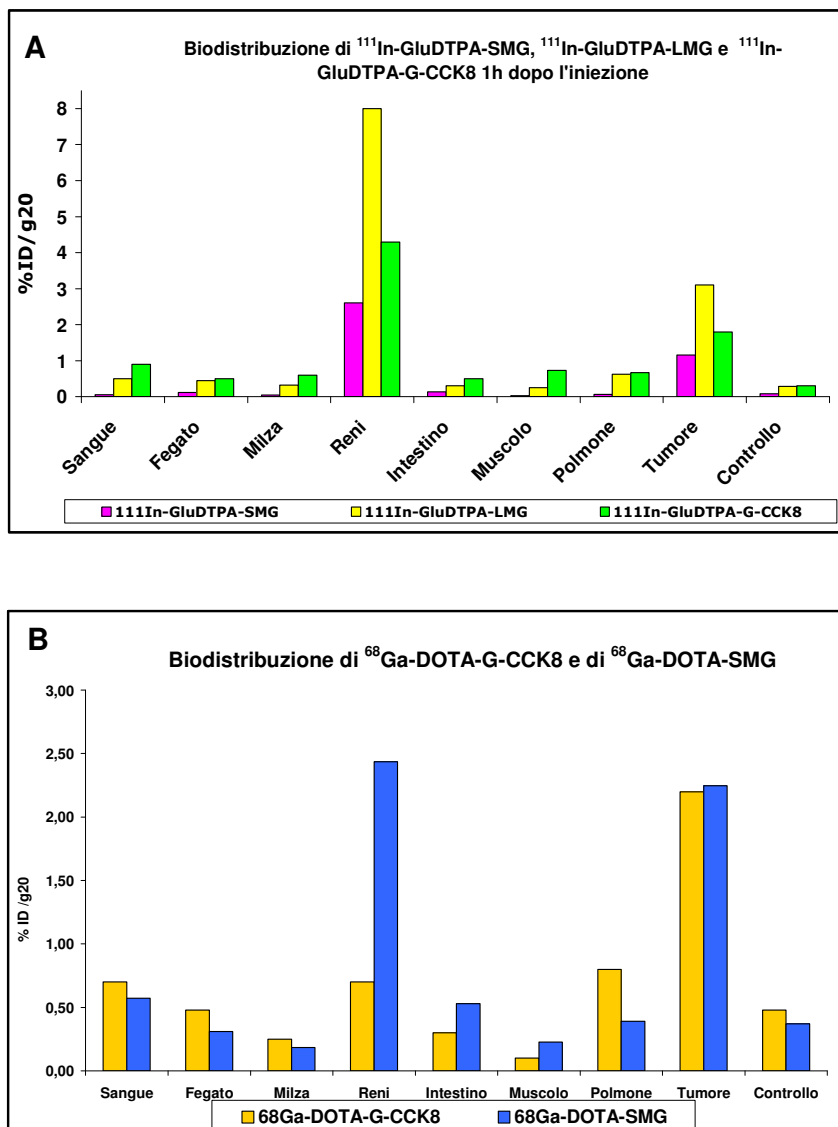
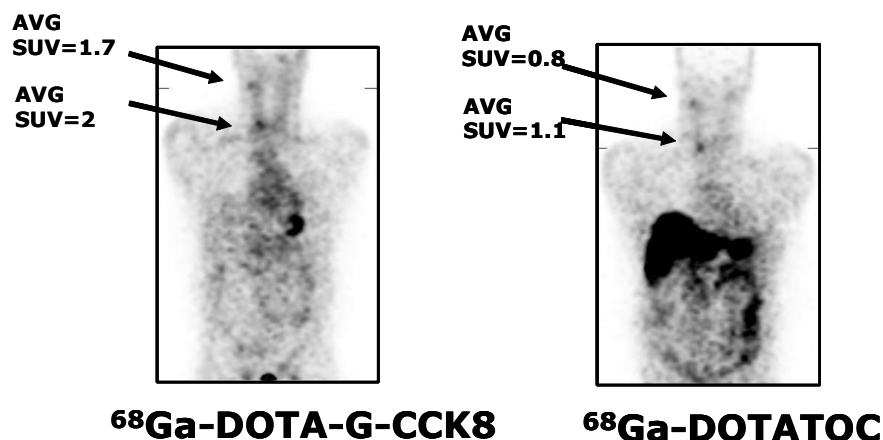


Fig.29: a) Biodistribuzione di DTPAGlu-Gly-CCK8, DTPAGlu-SMG, DTPAGlu-LMG radiomarcati con  $^{111}\text{In}$   
 b) Biodistribuzione di  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-SMG and  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-G-CCK8

### 3.13 Studi *in vivo* sull'uomo

Dall'esame comparativo dei risultati ottenuti sui composti appartenenti alle tre diverse classi, è emerso che il derivato del peptide CCK8 marcato con Gallio-68 mediante il chelante DOTA, sia per l'alta affinità recettoriale, sia per la sua biodistribuzione in vivo, che per la qualità delle immagini PET, è quello più promettente, fra tutti quelli studiati, per un ulteriore sviluppo. Si è pertanto provveduto ad effettuare, presso la divisione di Medicina Nucleare dell'Istituto Tumori Pascale di Napoli, una indagine su un paziente consenziente dopo approvazione del Comitato

Etico della struttura. Il paziente, affetto da tumore medullare della tiroide, è stato trattato in giorni diversi, con il radiofarmaco attualmente in uso clinico  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC (Octreotide) e con il composto  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-G-CCK8 (Fig 30)



**Fig.30:** Immagini PET su un paziente affetto da tumore midullare della tiroide acquisite dopo iniezione del composto  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-G-CCK8 (sinistra), o  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC (destra).

Nella figura sopra sono riportate le due immagini PET: a sinistra l'immagine ottenuta dopo iniezione del composto  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-G-CCK8, e a destra l'immagine acquisita dopo iniezione del farmaco  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC (Octreotide) che è un analogo della somatostatina attualmente utilizzato in clinica per visualizzare masse tumorali o metastasi. Il risultato ottenuto con il nuovo composto da noi sviluppato è molto interessante e promettente: utilizzando il radiofarmaco  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-G-CCK8 si ha una maggiore captazione di radioattività nel tumore ed un minore accumulo di radioattività nel tratto gastrointestinale e negli organi interni rispetto al  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC. Dal questo studio preliminare sembra quindi che i recettori CCKB-R possano costituire un target molto importante per l'imaging di particolari tumori che li sovraesprimono, come ad esempio il tumore medullare della tiroide.

## 4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di dottorato sono state sviluppate sonde peptidiche biospecifiche, radiomarcate con gli isotopi radiattivi  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , in grado di legare ad alta affinità i recettori della colecistochinina, CCKA-R e CCKB-R, overespressi in diversi tipi di tumori. Tali recettori sono in grado di legare in modo specifico l'octapeptide (CCK8) analogo della colecistochinina e due peptidi derivati della gastrina, minigastrina corta (SMG) e minigastrina lunga (LMG). I peptidi sono stati sintetizzati e modificati, mediante l'inserimento di un chelante bifunzionale (DOTA, DTPA-Glu o sistemi fosfinici) in modo da poter coordinare i diversi isotopi radioattivi. Sono state sviluppate innovative metodologie di sintesi in fase solida per l'introduzione dei sistemi chelanti e metodi di complessazione di ioni metallici. Le diverse biosonde ottenute sono state valutate sia *in vitro* che *in vivo* per la loro attività di targeting e caratteristiche di biodistribuzione.

Tutti i coniugati del CCK8 con un sistema chelante di tipo fosfinico, in grado di coordinare il  $^{99}\text{Tc}$ , hanno mostrato un significativo accumulo di radioattività nel tratto gastrointestinale. Per questi complessi è stato visto che è necessario modularne le proprietà di idrofilicità/idrofobicità per migliorare la loro biodistribuzione ed il rapporto target/background. In particolare, dopo l'inserimento di un linker idrofilico tra il peptide ed il sistema chelante si è avuta la riduzione dell'accumulo di radioattività a livello gastrointestinale.

Gli studi *in vitro* hanno dimostrato che il coniugato del CCK8 modificato con il chelante DOTA e radiomarcato sia con  $^{67}\text{Ga}$  sia con  $^{68}\text{Ga}$  possiede elevata specificità di legame per le cellule tumorali esprimenti il recettore CCKB-R. Inoltre gli studi *in vivo* sul modello murino hanno evidenziato un elevato accumulo sul tumore (xenografts di cellule esprimenti il recettore CCKB-R) e basso accumulo negli organi interni.

I peptidi derivati della gastrina, coniugati con DOTA e con DTPAGlu, hanno dato risultati paragonabili a quelli ottenuti con i coniugati fosfinici del CCK8 e cioè un sostanziale accumulo a livello renale e gastrointestinale nonostante l'aggiunta di più unità di acido glutammico all'N-terminale della minigastrina.

In conclusione, questi risultati indicano che le caratteristiche del [ $^{67}\text{Ga}$ ]DOTA-G-CCK8 e [ $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-G-CCK8 sono le più favorevoli per il targeting e l'imaging del recettore CCKB, poiché il peptide conserva un'alta affinità per il recettore, è internalizzato in cellule esprimenti il CCKB-R e dimostra un rapido accumulo in cellule tumorali inoculate sottocute nei topi con una rapida eliminazione della radioattività non legata attraverso la via renale. Gli studi preliminari sull'uomo utilizzando il composto [ $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-G-CCK8 nella diagnostica PET hanno dimostrato che, similmente a quanto osservato nel modello animale, tale composto presenta una buona biodistribuzione con elevata affinità per le cellule del carcinoma tiroideo e basso accumulo negli organi interni. Pertanto il DOTA-G-CCK8 è un promettente radiofarmaco per la diagnostica radiologica quando è marcato con  $^{68}\text{Ga}$ , e potrebbe risultare utile, dopo marcatura con  $^{60}\text{Y}$ , anche nella radioterapia mirata al tessuto tumorale.

## BIBLIOGRAFIA

- Aloj L, Caraco` C, Panico M, Zannetti A, Del Vecchio S, Tesauro D, De Luca S, Arra C, Pedone C, Morelli G, Salvatore M, *In Vitro and In Vivo Evaluation of <sup>111</sup>In-DTPAGlu-G-CCK8 for Cholecystokinin-B Receptor Imaging*. **J Nucl Med** 2004; 45:485-494.
- Aloj L, Morelli G. *Design, synthesis and preclinical evaluation of radiolabeled peptides for diagnosis and therapy*. **Curr Pharm Des.** 2004; 10(24):3009-31. Review.
- Angeletti S, Corleto VD, Schillaci O, Marignani M, Annibale B, Moretti A, Silecchia G, Scopinaro F, Basso N, Bordi C, Delle Fave G. *Use of the somatostatin analogue octreotide to localise and manage somatostatin-producing tumours*. **Gut** 1998; 42:792-794.
- Aparici CM, Narula J, Puig M, et al. *Somatostatin receptor scintigraphy predicts impending cardiac allograft rejection before endomyocardial biopsy*. **Eur J Nucl Med** 2000; 27:1754-1759.
- Bagutti C, Forro G, Ferralli J, Rubin B, Chiquet-Ehrismann R. *The intracellular domain of teneurin-2 has a nuclear function and represses zic-1-mediated transcription*. **J Cell Sci.** 2003 Jul 15; 116(Pt 14):2957-2966.
- Baidoo KE, Lin KS, Zhan Y, Finley P, Scheffel U, Wagner HN Jr, *Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues*. **Bioconjug Chem.** 1998 Mar-Apr; 9(2):218-225.
- Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder RC 2nd, Cachau RE, Collins J, Silva AM, Erickson JW. *Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design* : **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1993 Jul 15; 90(14):6796-6800.
- Bandera A, Gori A, Rossi MC, Degli Esposti A, Ferrario G, Marchetti G, Tocalli L, Franzetti F. *A case of costochondral abscess due to Corynebacterium minutissimum in an HIV-infected patient*. : **J Infect.** 2000 Jul; 41(1):103-105.
- Bangard M, Behe M, Guhlke S, Otte R, Bender H, Maecke HR, Biersack HJ. *Detection of somatostatin receptor-positive tumours using the new <sup>99m</sup>Tc-tricine-HYNIC-D-Phe1-Tyr3-octreotide: first results in patients and comparison with <sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe1-octreotide*. **Eur J Nucl Med** 2000; 27:628-637.
- Bard DR, Wraight EP, Knight CG. BisMSH-DTPA. *A potential imaging agent for malignant melanoma* **Ann N Y Acad Sci.** 1993 May 31; 680:451-453.
- Barrera P, van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJ, van de Ven MT, van Lent PL, van de Putte LB, Corstens FH. *Radiolabelled interleukin-1 receptor antagonist for detection of synovitis in patients with rheumatoid arthritis*. **Rheumatology (Oxf)** 2000; 39:870-874.
- Barrett JA, Crocker A, Hemingway S, et al. *DMP444, a technetium-labelled platelet GPIIb/IIIa antagonist for the detection of arterial thrombi [abstract]*. **J Nucl Med** 1997; 38:18P.
- B  h   M, Kluge G, Becker W, Gotthardt M, Behr TM *Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys*. **J Nucl Med.** 2005; 46(6):1012-1015.
- B  h   M, Becker W, Gotthardt M, Angerstein C, Behr TM. *Improved kinetic stability of DTPA-dGlu as compared with conventional monofunctional DTPA in chelating indium and yttrium: preclinical and initial clinical evaluation of radiometal labelled minigastrin derivatives* **Eur J Nucl Med Mol Imaging.** 2003 Aug; 30(8):1140-1146.

- Béhe M, Behr TM *Cholecystokinin-B (CCK-B)/gastrin receptor targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other CCK-B receptor expressing malignancies*. **Biopolymers** 2002; 66(6):399-418.
- Behr TM, Jenner N, Radetzky S, Béhe M, Gratz S, Yücekent S, Raue F, Becker W *Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors in vivo: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin* **Eur J Nucl Med**. 1998 Apr; 25(4):424-430.
- Behr TM, Jenner N, Behe M, Angerstein C, Gratz S, Raue F, Becker W. *Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors*. **J Nucl Med** 1999; 40:1029-1044.
- Benedetti E, Morelli G, Accardo A, Mansi R, Tesauro D, Aloj L *Criteria for the design and biological characterization of radiolabeled peptide-based pharmaceuticals*. **BioDrugs** 2004; 18(5):279-295.
- Blankenberg FG, Vriens PW, Tait JF, Berry GJ, Strauss HW, Robbins RC. *Non-invasive detection and quantification of acute heart transplant rejection using  $^{99m}\text{Tc}$  radiolabeled annexin V*. **Radiology** 1998; 209P:1337.
- Blankenberg F, Narula J, Strauss HW. *In vivo detection of apoptotic cell death: a necessary measurement for evaluating therapy for myocarditis, ischemia, and heart failure*. **J Nucl Cardiol** 1999; 6:531-539.
- Blum JE, Handmaker H, Rinne NA. *The utility of a somatostatin-type receptor binding peptide radiopharmaceutical (P829) in the evaluation of solitary pulmonary nodules*. **Chest** 1999; 115:224-232.
- Blum J, Handmaker H, Lister-James J, Rinne N. *A multicenter trial with a somatostatin analog ( $^{99m}\text{Tc}$ ) depreotide in the evaluation of solitary pulmonary nodules*. **Chest** 2000; 117:1232-1238.
- Bockaert J, Pin JP. *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success* **EMBO J**. 1999 Apr 1; 18(7):1723-1729.
- Boerman OC, Oyen WJ, Corstens FH. *Radio-labeled receptor-binding peptides: a new class of radiopharmaceuticals*. **Semin Nucl Med**. 2000 Jul; 30(3):195-208.
- Bombardieri E, Chiti A, Crippa F, Seregini E, Cataldo I, Maffioli L, Soresi E  *$^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe-1-octreotide scintigraphy of small cell lung cancer* **Q J Nucl Med**. 1995 Dec; 39(4 Suppl 1):104-107.
- Bormans G, Cleyhens B, Adriaens P, Vanbilloen H, De Roo M, Verbruggen A. *Investigation of the labelling characteristics of  $^{99m}\text{Tc}$ -mercaptoacetyltryglycine*. **Nucl Med Biol** 1995; 22: 339-349.
- Breeman WA, VanHagen MP, Visser-Wisselaar HA, van der Pluijm ME, Koper JW, Setyono-Han B, Bakker WH, Kwekkeboom DJ, Hazenberg MP, Lamberts SW, Visser TJ, Krenning EP. *In vitro and in vivo studies of substance P receptor expression in rats with the new analog [ $^{111}\text{In}$ -DTPA-Arg<sup>1</sup>]substance P* **J Nucl Med**. 1996 Jan; 37(1):108-117.
- Breeman WA, Hofland LJ, de Jong M, Bernard BF, Srinivasan A, Kwekkeboom DJ, Visser TJ, Krenning EP *Evaluation of radiolabelled bombesin analogues for receptor-targeted scintigraphy and radiotherapy* **Int J Cancer**. 1999 May 17; 81(4):658-665.
- Brouwers AH, Laverman P, Boerman OC, Oyen WJ, Barrett JA, Harris TD, Edwards DS, Corstens FH. *A  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled leukotriene B<sub>4</sub> receptor antagonist for scintigraphic detection of infection in rabbits*. **Nucl Med Commun** 2000; 21:1043-1050.
- Caglar M, Ciftci I, Hosal S, Kilinc K, Ercan MT. *Detection of head and neck cancer with  $^{99m}\text{Tc}$  glutathione: a correlative study with tissue glutathione and glutathione S-transferase levels*. **Nucl Med Commun** 2001; 22:33-38.
- Chavatte K, Wong E, Fauconnier TK, et al. *Rhenium and technetium- $^{99m}$  oxocomplexes of neurotensin(8-13)*. In: Nicolini M, Mazzi U, eds. *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine 5*. **Padova: SG Editoriali**; 1999:513-518.



- Chen JQ, Cheng Z, Hoffman TJ, Jurisson SS, Quinn TP. *Melanoma-targeting properties of (99m)technetium-labelled cyclic alpha-melanocyte-stimulating hormone peptide analogues.* **Cancer Res** 2000; 60:5649-5658.
- Chianelli M, Signore A, Fritzberg AR, Mather SJ. *The development of technetium-99m-labelled interleukin-2: a new radiopharmaceutical for the in vivo detection of mononuclear cell infiltrates in immune-mediated diseases.* **Nucl Med Biol** 1997; 24:579-586.
- Clausén M, Ohman LO, Persson P. *Spectroscopic studies of aqueous gallium(III) and aluminum(III) citrate complexes* **J Inorg Biochem.** 2005 Mar;99(3):716-26.
- Collier TL, Schiller PW, Waterhouse RN. *Radiosynthesis and in vivo evaluation of the pseudopeptide delta-opioid antagonist [125I]ITIPP(psi).* **Nucl Med Biol** 2001; 28:375-381.
- de Bie SH, Ferreira TC, Pauwels EK, Cleton FJ. *Immunoscintigraphy for cancer detection: "a thousand ills require a thousand cures."* **J Cancer Res Clin Oncol.** 1992; 118(1):1-15.
- de Jong M, Bakker WH, Bernard BF, Valkema R, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Srinivasan A, Schmidt M, Krenning EP. *Preclinical and initial clinical evaluation of 111In-labeled nonsulfated CCK8 analog: a peptide for CCK-B receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy.* **J Nucl Med** 1999; 40: 2081-2087.
- Decristoforo C, Cholewinski W, Donnemiller E, Riccabona G, Moncayo R, Mather SJ. *Detection of somatostatin receptorpositive tumours using the new 99mTc-tricine-HYNIC-D-Phe1-Tyr3-octreotide: first results in patients and comparison with 111In-DTPA-D-Phe1-octreotide.* **Eur J Nucl Med** 2000a; 27: 1580.
- Decristoforo C, Mather SJ, Cholewinski W, Donnemiller E, Riccabona G, Moncayo R. *99mTc-EDDA/HYNIC-TOC: a new 99mTc-labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumours; first clinical results and intra-patient comparison with 111In-labelled octreotide derivatives.* **Eur J Nucl Med** 2000b; 27:1318-1325.
- Decristoforo C, Melendez-Alafort L, Sosabowski JK, Mather SJ. *<sup>99m</sup>Tc-HYNIC-[Tyr3]-octreotide for imaging somatostatinreceptor-positive tumors: preclinical evaluation and comparison with <sup>111</sup>In-octreotide.* **J Nucl Med** 2000c; 41:1114-1119.
- Dinkelborg LM, Duda SH, Hanke H, et al. *Molecular imaging of atherosclerosis using a technetium-99m-labelled endothelin derivative.* **J Nucl Med** 1998; 10:1819–1822.
- Edwards DS, Liu S, Ziegler MC, Harris AR, Crocker AC, Heminway SJ, Barrett JA, Bridger GJ, Abrams MJ, Higgins JD. *RP463: a stabilized technetium-99m complex of a hydrazine nicotinamide derivatized chemotactic peptide for infection imaging.* **Bioconjug Chem** 1999; 10:884-891.
- Fischman AJ, Babich JW, Strauss HW. *A ticket to ride: peptide radiopharmaceuticals.* **J Nucl Med.** 1993 Dec; 34(12):2253-63.
- Fletcher WS, Lum SS, Nance RW, Pommier RF, O'Dorisio MS. *The current status of somatostatin receptors in malignant melanoma.* **Yale J Biol Med** 1997; 70:561–563. 17. Bombardieri E, Chiti A, Crippa F, Seregini E, Cataldo I, Maffioli L, Soresi E. *<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe-1-octreotide scintigraphy of small cell lung cancer.* **Q J Nucl Med** 1995; 39 Suppl 1:104–107.
- Giblin MF, Jurisson SS, Quinn TP. *Synthesis and characterization of rhenium-complexed alpha-melanotropin analogs* **Bioconjug Chem.** 1997 May-Jun;8(3):347-53
- Giragossian C, Mierke DF. *Intermolecular interactions between cholecystokinin-8 and the third extracellular loop of the cholecystokinin A receptor.* **Biochemistry.** 2001 Apr 3;40(13):3804-9.
- Giragossian C, Mierke DF. *Intermolecular interactions between cholecystokinin-8 and the third extracellular loop of the cholecystokinin-2 receptor* **Biochemistry.** 2002 Apr 9;41(14):4560-6.

- Hartwig E, Hoellen I, Liener U, Kramer M, Wickstroem M, Kinzl L *Occupational disease 2108. Degeneration pattern in magnetic resonance tomography of the lumbar spine in patient with differential weight-bearing activity*] **Unfallchirurg.** 1997 Nov;100(11):888-94.
- Hartwig W, Carter EA, Jimenez RE, Werner J, Fischman AJ, Fernandez-Del Castillo C, Warshaw AL. *Chemotactic peptide uptake in acute pancreatitis: correlation with tissue accumulation of leukocytes.* **J Appl Physiol** 1999; 87:743-749.
- Haubner R, Wester HJ, Burkhart F, Senekowitsch-Schmidtke R, Weber W, Goodman SL, Kessler H, Schwaiger M. *Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics.* **J Nucl Med** 2001; 42:326-336.
- Haubner R, Wester HJ, Reuning U, Senekowitsch-Schmidtke R, Diefenbach B, Kessler H, Stocklin G, Schwaiger M. *Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting.* **J Nucl Med** 1999; 40:1061-1071.
- Hellstrom KE, Brown JP, Hellstrom I. *Monoclonal antibodies to tumor antigens.* **Contemp Top Immunobiol.** 1980;11:117-37.
- Henning W, Vo L, Albanese J, Hill BC *High-yield purification of cytochrome aa3 and cytochrome caa3 oxidases from Bacillus subtilis plasma membranes* **Biochem J.** 1995 Jul 1;309 ( Pt 1):279-83
- Heron DE, Godette KD, Wynn RA, Arterbery VE, Streeter OA, Roach M 3rd, Simpson JR, Blough M, Thomas CR Jr. *Radiation medicine innovations for the new millenium.* **J Natl Med Assoc.** 2003 Jan;95(1):55-63.
- Hnatowich DJ, Qu T, Chang F, Ley AC, Ladner RC, Rusckowski M. *Labeling peptides with technetium-99m using a bifunctional chelator of a N-hydroxysuccinimide ester of mercaptoacetyltryglycine.* **J Nucl Med** 1998; 39:56-64.
- Hnatowich DJ. *Antibody radiolabeling, problems and promises.* **Int J Rad Appl Instrum B.** 1990;17(1):49-55.
- Hofstra L, Liem IH, Dumont EA, et al. *Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction.* **Lancet** 2000; 356:209-212.
- Johannsen B, Jankowsky R, Noll B, et al. *Technetium coordination ability of cysteine-containing peptides: X-ray absorption spectroscopy of a Tc-99m labelled endothelin derivative.* **Appl Radiat Isotopes** 1997; 48:1045-1050.
- Karra SR, Schibli R, Gali H, Katti KV, Hoffman TJ, Higginbotham C, Sieckman GL, Volkert WA. *99mTc-labeling and in vivo studies of a bombesin analogue with a novel water-soluble dithiadiphosphine-based bifunctional chelating agent.* **Bioconjug Chem** 1999; 10:254-260.
- Keire DA, Kobayashi M. *NMR studies of the metal-loading kinetics and acid-base chemistry of DOTA and butylamide-DOTA* **Bioconjug Chem.** 1999 May-Jun;10(3):454-63
- Keire DA, Solomon TE, Reeve JR Jr *Identical primary sequence but different conformations of the bioactive regions of canine CCK-8 and CCK-58* **Biochem Biophys Res Commun.** 1999 Dec 20;266(2):400-4
- Khaw BA, Strauss HW, Narula J. *"Magic bullets:" from muskets to smart bombs!!!* **J Nucl Med.** 1993 Dec;34(12):2264-8.
- Knight LC, Baidoo KE, Romano JE, Gabriel JL, Maurer AH. *Imaging pulmonary emboli and deep venous thrombi with 99mTc-bitistatin, a platelet-binding polypeptide from viper venom.* **J Nucl Med** 2000; 41:1056-1064.

- Knight LC, Radcliffe R, Maurer AH, Rodwell JD, Alvarez VL. *Thrombus imaging with Tc-99m synthetic peptides based upon the binding domain of a monoclonal-antibody to activated platelets.* **J Nucl Med** 1994; 35:282–288.
- Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Oei HY, de Jong RJ, Dop FJ, de Herder WW, Reubi JC, Lamberts SW. *Somatostatin receptor scintigraphy in carcinoids, gastrinomas and Cushing's syndrome.* **Digestion** 1994a; 55 Suppl 3:54–59.
- Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Oei HY, de Jong RJ, Dop FJ, Reubi JC, Lamberts SW. *Somatostatin-receptor scintigraphy in gastroenteropancreatic tumors. An overview of European results.* **Ann N Y Acad Sci** 1994b; 733:416–424.
- Kurihara A, Deguchi Y, Pardridge WM. *Epidermal growth factor radiopharmaceuticals: In-111 chelation, conjugation to a blood-brain barrier delivery vector via a biotin-polyethylene linker, pharmacokinetics, and in vivo imaging of experimental brain tumours.* **Bioconjug Chem** 1999; 10:502–511.
- Kurtaran A, Raderer M, Muller C, Prokesch R, Kaserer K, Eibenberger K, Koperna K, Niederle B, Virgolini I. *Vasoactive intestinal peptide and somatostatin receptor scintigraphy for differential diagnosis of hepatic carcinoid metastasis.* **J Nucl Med** 1997; 38:880–881.
- Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Kooij PP, Erion J, Srinivasan A, de Jong M, Reubi JC, Krenning EP. *Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma.* **Eur J Nucl Med** 2000; 27:1312–1317.
- Kwekkeboom DJ, Krenning EP. *Somatostatin receptor scintigraphy in patients with carcinoid tumors.* **World J Surg** 1996; 20:157–161.
- Laverman P, Béhé M, Oyen WJ, Willems PH, Corstens FH, Behr TM, Boerman OC *Two technetium-99m-labeled cholecystokinin-8 (CCK8) peptides for scintigraphic imaging of CCK receptors.* **Bioconjug Chem.** 2004 May-Jun;15(3):561-8
- Leners N, Jamar F, Fiasse R, Ferrant A, Pauwels S. *Indium-111-pentetreotide uptake in endocrine tumors and lymphoma.* **J Nucl Med** 1996; 37:916–922.
- Lister-James J, Moyer BR, Dean RT. *Pharmacokinetic considerations in the development of peptide-based imaging agents.* **Q J Nucl Med** 1997; 41:111–118.
- Lister-James J, Vallabhajosula S, Moyer BR, Pearson DA, McBride BJ, De Rosch MA, Bush LR, Machac J, Dean RT. *Pre-clinical evaluation of technetium-99m platelet receptor-binding peptide.* **J Nucl Med.** 1997 Jan;38(1):105-11.
- Liu S, Edwards DS. *<sup>99m</sup>Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals.* **Chem Rev.** 1999 Sep 8;99(9):2235-68.
- Maini CL, Sciuto R, Tofani A, Ferraironi A, Carapella CM, Occhipinti E, Mottolese M, Crecco M. *Somatostatin receptor imaging in CNS tumours using <sup>111</sup>In-octreotide.* **Nucl Med Commun** 1995; 16:756–766.
- McAfee JG, Carrasquillo JA. *Effects of insulin-like growth factor binding proteins on insulin-like growth factor-I biodistribution in tumor-bearing nude mice.* **J Nucl Med** 2000; 41:318–326.
- McAfee JG, Neumann RD *Radiolabeled peptides and other ligands for receptors overexpressed in tumor cells for imaging neoplasms.* **Nucl Med Biol.** 1996 Aug;23(6):673-6
- Merrifield B *Concept and early development of solid-phase peptide synthesis* **Methods Enzymol.** 1997;289:3-13
- Mierke DF, Giragossian C. *Peptide hormone binding to G-protein-coupled receptors: structural characterization via NMR techniques 1:* **Med Res Rev.** 2001 Sep;21(5):450-71
- Miller L. *Synthetic peptides come of age.* **J Nucl Med.** 1993;34(11):15N, 18N, 27N-30N.

- Moody TW, Getz RL, Goldberg WJ, Bernstein JJ *Bombesin-like, substance P and vasoactive intestinal polypeptide receptors in fetal cortical homografts to host cortex and spinal cord* **J Neural Transplant.** 1989;1(3-4):105-12
- Morelli G, De Luca S, Tesauro D, Saviano M, Pedone C, Dolmella A, Visentin R, Mazzi U *CCK8 peptide derivatized with diphenylphosphine for rhenium labelling: synthesis and molecular mechanics calculations* **J Pept Sci.** 2002 Jul;8(7):373-81
- Morisset J. *The gastrointestinal cholecystokinin receptors in health and diseases* **Rocz Akad Med Bialymst.** 2005;50:21-36
- Moyer BR, Vallabhajosula S, Lister-James J, Bush LR, Cyr JE, Snow DA, Bastidas D, Lipszyc H, Dean RT. *Technetium-99m-white blood cell-specific imaging agent developed from platelet factor 4 to detect infection.* **J Nucl Med** 1996; 37: 673–679.
- Narula J, Acia ER, Narula N, et al. *Phase-I Tc-99m-annexin-V imaging study in heart transplant rejection: can non-invasive detection of apoptosis in cardiac allografts obviate the need for endomyocardial biopsy.* **Circulation** 2000; 102:3714.
- Nelson CA, Moyer BR, Pearson DA, et al. *A peptide analog of calcitonin labeled with Tc-99m targets MCF-7 human breast cancer xenografts in nude mice.* **J Nucl Med** 1999; 40:103P.
- Nock BA, Maina T, Béhé M, Nikolopoulou A, Gotthardt M, Schmitt JS, Behr TM, Mäcke HR *CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with (99m)Tc-labeled minigastrin analogs* **J Nucl Med.** 2005 Oct;46(10):1727-36
- Nock B, Maina T, Tisato F, Papadopoulos M, Raptopoulou CP, Terzis A, Chiotellis E *Synthesis and characterization of six-coordinate "3 + 2" mixed-ligand oxorhenium complexes with the o-diphenylphosphinophenolato ligand and tridentate coligands of different N and S donor atom combinations* **Inorg Chem.** 2000 May 15;39(10):2178-84.
- Oppizzi G, Cozzi R, Dallabonzana D, Orlandi P, Benini Z, Petroncini M, Attanasio R, Milella M, Banfi G, Possa M. *Scintigraphic imaging of pituitary adenomas: an in vivo evaluation of somatostatin receptors.* **J Endocrinol Invest** 1998; 21:512–519.
- Oyen WJ, Boerman OC, Brouwers FM, Barrett JA, Verheugt FW, Ruiter DJ, Corstens FH, van der Meer JW. *Scintigraphic detection of acute experimental endocarditis with the technetium- 99m labelled glycoprotein IIb/ IIIa receptor antagonist DMP444.* **Eur J Nucl Med** 2000; 27:392–399.
- Paganelli G, Zoboli S, Cremonesi M, Macke HR, Chinol M. *Receptor-mediated radionuclide therapy with 90Y-DOTA-DPhe1-Tyr3-octreotide: preliminary report in cancer patients.* **Cancer Biother Radiopharm** 1999; 14:477–483.
- Pallela V, Consigny PM, Shi R, Thakur ML. *Imaging vascular thrombosis with Tc-99-TP-1300 peptide derived from active domain of thrombospondin (TSP) [abstract].* **J Nucl Med** 1998; 39:64P.
- Pellegrini M, Mierke DF. *Structural characterization of peptide hormone/receptor interactions by NMR spectroscopy* **Biopolymers.** 1999;51(3):208-20
- Poston GJ, Gillespie J, Guillou PJ *Biology of pancreatic cancer.* **Gut.** 1991 Jul;32(7):800-12.
- Qu T, Wang Y, Zhu Z, Rusckowski M, Hnatowich DJ. *Different chelators and different peptides together influence the in vitro and mouse in vivo properties of <sup>99m</sup>Tc.* **Nucl Med Commun** 2001; 22:203–215.
- Raderer M, Kurtaran A, Hejna M, Vorbeck F, Angelberger P, Scheithauer W, Virgolini I. *<sup>123</sup>I-labelled vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with colorectal cancer.* **Br J Cancer** 1998b; 78:1–5.

- Raderer M, Kurtaran A, Yang Q, Meghdadi S, Vorbeck F, Hejna M, Angelberger P, Kornek G, Pidlich J, Scheithauer W, Virgolini I. *Iodine-123-vasoactive intestinal peptide receptor scanning in patients with pancreatic cancer.* **J Nucl Med** 1998a; 39:1570–1575.
- Reilly RM, Kiarash R, Cameron RG, Porlier N, Sandhu J, Hill RP, Vallis K, Hendler A, Gariépy J *<sup>111</sup>In-labeled EGF is selectively radiotoxic to human breast cancer cells overexpressing EGFR* **J Nucl Med.** 2000 Mar;41(3):429-38
- Rennen HJ, Boerman OC, Oyen WJ, van der Meer JW, Corstens FH. *Specific and rapid scintigraphic detection of infection with <sup>99m</sup>Tc-labeled interleukin-8.* **J Nucl Med** 2001; 42:117–123.
- Reubi JC, Waser B. *Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas* **Int J Cancer.** 1996 Sep 4;67(5):644-7
- Reubi JC, Schaer JC, Waser B *Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors* **Cancer Res.** 1997 Apr 1;57(7):1377-86
- Reubi JC, Schaer JC, Markwalder R, Waser B, Horisberger U, Laissue J *Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance* **Yale J Biol Med.** 1997 Sep-Dec;70(5-6):471-9
- Reubi JC *Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy* **Endocr Rev.** 2003 Aug;24(4):389-427
- Reubi JC. *Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy.* **Q J Nucl Med.** 1997 Jun;41(2):63-70
- Ruszkowski M, Qu T, Pullman J, Marcel R, Ley AC, Ladner RC, Hnatowich DJ. *Inflammation and infection imaging with a <sup>99m</sup>Tc-neutrophil elastase inhibitor in monkeys.* **J Nucl Med** 2000; 41:363–374.
- Saito Y, Buciak J, Yang J, Pardridge WM. *Vector-mediated delivery of <sup>125</sup>I-labeled beta-amyloid peptide A beta 1–40 through the blood-brain barrier and binding to Alzheimer disease amyloid of the A beta 1–40/vector complex.* **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:10227–10231.
- Schumacher GE, Barr JT *Therapeutic drug monitoring: do the improved outcomes justify the costs?* **Clin Pharmacokinet.** 2001;40(6):405-9.
- Seki I, Itaya Y, Hanaoka K, Yoshida Y, Shiramaki Y, Kato-Azuma M. *Technetium-99m chelating amino acid sequence for peptide labelling.* In : Nicolini M, Mazzi U, eds. **Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine 5.** Padova: SG Editoriali; 1999:419–426.
- Serafini AN. *From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units: an overview.* **J Nucl Med.** 1993 Mar;34(3 Suppl):533-6.
- Sharma SD, Shi YQ, Cai HZ, et al. *Novel melanocortin receptor-1 specific Tc-99m-metallopeptide for melanoma tumor imaging.* **J Nucl Med** 1999; 40:120P.
- Siegrist W, Sauter P, Eberle AN *A selective protein kinase C inhibitor (CGP 41251) positively and negatively modulates melanoma cell MSH receptors* **J Recept Signal Transduct Res.** 1995 Jan-Mar;15(1-4):283-96
- Signore A, Annovazzi A, Chianelli M, Corsetti F, Van de Wiele C, Watherhouse RN. *Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy.* **Eur J Nucl Med.** 2001 Oct;28(10):1555-65.
- Signore A, Chianelli M, Annovazzi A, Bonanno E, Spagnoli LG, Pozzilli P, Pallone F, Biancone L. *<sup>123</sup>I-interleukin-2 scintigraphy for in vivo assessment of intestinal mononuclear cell infiltration in Crohn's disease.* **J Nucl Med** 2000a; 41:242–249.

- Signore A, Chianelli M, Annovazzi A, Rossi M, Maiuri L, Greco M, Ronga G, Britton KE, Picarelli A. *Imaging active lymphocytic infiltration in coeliac disease with iodine-123-interleukin- 2 and the response to diet.* **Eur J Nucl Med** 2000b; 27:18–24.
- Signore A, Procaccini E, Chianelli M, Salerno G, Iozzo P, Annovazzi A, Leonetti F, Tamburrano G, Ronga G. *SPECT imaging with 111In-octreotide for the localization of pancreatic insulinoma.* **Q J Nucl Med** 1995; 39 Suppl 1:111–112.
- Sivolapenko GB, Douli V, Pectasides D, et al. *Breast cancer imaging with radiolabelled peptide from complementarity-determining region of antitumour antibody.* **Lancet** 1995; 346:1662–1666.
- Stimmel JB, Stockstill ME, Kull FC Jr *Yttrium-90 chelation properties of tetraazatetraacetic acid macrocycles, diethylenetriaminepentaacetic acid analogues, and a novel terpyridine acyclic chelator.* **Bioconjug Chem.** 1995 Mar-Apr;6(2):219-25
- Stolz LE, Huynh CV, Thorner J, York JD *Identification and characterization of an essential family of inositol polyphosphate 5-phosphatases (INP51, INP52 and INP53 gene products) in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* **Genetics.** 1998 Apr;148(4):1715-29
- Stratton JR, Dewhurst TA, Kasina S, Reno JM, Cerquiera MD, Baskin DG, Tait JF. *Selective uptake of radiolabelled annexin- V on acute porcine left atrial thrombi.* **Circulation** 1995; 92:3113–3121.
- Taillefer R, Edell S, Innes G, Lister-James J. *Acute thromboscintigraphy with Tc-99m-apcitide: results of the phase 3 multicenter clinical trial comparing Tc-99m-apcitide scintigraphy with contrast venography for imaging acute DVT.* **J Nucl Med** 2000; 41:1214–1223.
- Tatro JB, Atkins M, Mier JW, Hardarson S, Wolfe H, Smith T, Entwistle ML, Reichlin S *Melanotropin receptors demonstrated in situ in human melanoma* **J Clin Invest.** 1990 Jun;85(6):1825-32
- Terriere D, Chavatte K, Boumon R, Tourwe D, Mertens J. *Radiosynthesis and evaluation of a new In111-neurotensin analogue: a potential tumor tracer for SPECT [abstract].* **Eur J Nucl Med** 1997; 24:902.
- Thakur ML, Kolan H, Li J, Wiaderkiewicz R, Pallela VR, Duggaraju R, Schally AV. *Radiolabeled somatostatin analogs in prostate cancer.* **Nucl Med Biol** 1997; 24:105–113.
- Thakur ML, Marcus CS, Saeed S, Pallela V, Minami C, Diggles L, Le Pham H, Ahdoot R, Kalinowski EA. *<sup>99m</sup>Tc-labeled vasoactive intestinal peptide analog for rapid localization of tumors in humans.* **J Nucl Med** 2000; 41:107–110.
- Thakur ML, Pallela VR, Consigny PM, Rao PS, Vessileva- Belnikolovska D, Shi R. *Imaging vascular thrombosis with <sup>99m</sup>Tc labeled fibrin alpha-chain peptide.* **J Nucl Med** 2000; 41:161–168.
- Thakur ML. *Radiolabelled peptides: now and the future.* **Nucl Med Commun.** 1995 Sep;16(9):724-32
- Thedrz P, Paineau J, Jacques Y, Chatal JF, Pelegrin A, Bouchaud C, Soullillou JP. *Biodistribution of an anti-interleukin-2 receptor monoclonal-antibody in rat recipients of a heart allograft, and its use as a rejection marker in gamma-scintigraphy.* **Transplantation** 1989; 48:367–371.
- Van de Wiele C, Dumont F, Vanden Broecke R, Oosterlinck W, Cocquyt V, Serreyn R, Peers S, Thornback J, Slegers G, Dierckx RA *Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study* **Eur J Nucl Med.** 2000 Nov;27(11):1694-9
- van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJ, van de Ven MT, van der Meer JW, Corstens FH. *Imaging of infection in rabbits with radioiodinated interleukin-1 (alpha and beta), its receptor antagonist and a chemotactic peptide: a comparative study.* **Eur J Nucl Med** 1998; 25:347–352.

- van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJ, van de Ven MT, van der Meer JW, Corstens FH. *Radiolabeled interleukin-8: specific scintigraphic detection of infection within a few hours.* **J Nucl Med** 2000; 41:463–469.
- van Eijck CH, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. *Somatostatin receptors and breast cancer.* **Q J Nucl Med** 1998; 42:18–25.
- van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, et al. *Annexin-V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure.* **Cytometry** 1998; 31:1–9.
- Virgolini I, Kurtaran A, Leimer M, Kaserer K, Peck-Radosavljevic M, Angelberger P, Hubsch P, Dvorak M, Valent P, Niederle B. *Location of a VIPoma by iodine-123-vasoactive intestinal peptide scintigraphy.* **J Nucl Med** 1998; 39:1575–1579.
- Virgolini I, Raderer M, Kurtaran A, Angelberger P, Yang Q, Radosavljevic M, Leimer M, Kaserer K, Li SR, Kornek G, Hubsch P, Niederle B, Pidlich J, Scheithauer W, Valent P. *<sup>123</sup>I-vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor scanning: update of imaging results in patients with adenocarcinomas and endocrine tumors of the gastrointestinal tract.* **Nucl Med Biol** 1996; 23:685–692.
- von Guggenberg E, Behe M, Behr TM, Saurer M, Seppi T, Decristoforo C. *<sup>99m</sup>Tc-labeling and in vitro and in vivo evaluation of HYNIC- and (Nalpha-His)acetic acid-modified [D-Glu1]-minigastrin* **Bioconj Chem.** 2004 Jul-Aug;15(4):864-71
- Waldherr C, Haldemann A, Maecke HR, Crazzolaro A, Mueller-Brand J. *Exceptional results in neuroendocrine-metastases-caused paraplegia treated with [<sup>90</sup>Y-DOTA]-D-Phe1-Tyr3-octreotide (<sup>90</sup>Y-DOTATOC), a radiolabelled somatostatin analogue.* **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2000; 12:121–123.
- Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A. *Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1992 Sep 15;89(18):8691-5
- Welling MM, Nibbering PH, Paulusma-Annema A, Hiemstra PS, Pauwels EK, Calame W. *Imaging of bacterial infections with <sup>99m</sup>Tc-labeled human neutrophil peptide-1.* **J Nucl Med** 1999; 40:2073–2080.
- Welling MM, Paulusma-Annema A, Balter HS, Pauwels EK, Nibbering PH. *Technetium-99m labelled antimicrobial peptides discriminate between bacterial infections and sterile inflammations.* **Eur J Nucl Med** 2000; 27:292–301.
- Wentworth P Jr. *Recent developments and applications of liquid-phase strategies in organic synthesis.* **Trends Biotechnol.** 1999 Nov;17(11):448-52.
- Wolf H, Marschall F, Scheffold N, Clausen M, Schramm M, Henze E. *Iodine-123 labelling of atrial natriuretic peptide and its analogues: initial results.* **Eur J Nucl Med** 1993; 20:297–301.

## ABBREVIAZIONI

ADOO	8-ammino-3,6-acido-dioxaottanoico
BM	Biomolecola
CCK	Colecistochinina
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-Diisopropilettilammina
DMF	N,N-Dimetilformammide
DMGA	3,3 acido dimetilglutarico
DOTA	1,4,7,10-tetra-azo-ciclododecano tetracetico
DTPA	Acido dietilen-diammino-pentacetico
DTPAGlu	Acido N,N-bis[2-[bis(carbossietil)amino]etil]-L-glutammico
Fmoc	9-Fluorenilmetossicarbonile
HATU	2-(1H-9-Azobenzotriazolo-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronioesafluorofosfato
HBTU	2-(1H-benzotriazolo-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronioesafluorofosfato
HOBT	N-idrossibenzotriazolo
LMG	Long Minigastrin
MALDI-ToF	Matrix Assistant Laser Desorption Ionization-Time of Flight
NMP	N-metilpirrolidone
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PEG-PS	Polietilen Glicol-polistirene
PET	Positron Emission Isotopes
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
SDH	Diidrazide Succinica
SMG	Small Minigastrin
SPECT	Single Photon Emission Computer Tomography
TFA	Acido Trifluoroacetico
TIS	Triisopropilsilano



## Allegato A:

Agostani S, Bolzati C, Didoné E, Cavazza-Ceccato M, Aloj L, Arra C, Ausilio M, Tornesello AL, Tesauro D, Morelli G. “*The [Tc(N)(PNP)]<sup>2+</sup> metal fragment labeled cholecystokinin-8 (CCK8) peptide for CCK-2 receptors imaging: in vitro and in vivo studies*”, **Journal of Peptides Science**, 2007; 13: 211-219.



Articolo.pdf

Tornesello AL, Benedetti E, Tesauro D, Agostani S, Didonè E, Aloj L, Tarallo L, Bolzati C, Morelli G, <sup>99m</sup>Tc Labelling of CCK8 peptides by using aminodiphosphine coligands: *In vitro and in vivo evaluation for cholecystokinin-B receptor imaging* Peptides 2006 (Proceedings of 29th European Peptide Society) Symposium Danzica 3-8 settembre 2006 pag. 572 -573.



Proc\_eps.pdf

Aurilio M., Tarallo L., Tornesello A.L., Della Moglie R., Tesauro D., Barbieri A., Arra C., Morelli G., Lastoria S., Aloj L., “Improved CCK-2 receptor targeting with Ga-67-DOTA-CCK8”, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, volume 33, Supplement 14/ September 2006. n.276* (Proceeding of Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine), Atene, 30 settembre-4 Ottobre 2006



Proc. EANM.pdf