

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



**FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E FUNZIONALI**

**DIRETTORE: PROF. MARCO SALVATORE**

***DOTTORATO DI RICERCA IN IMAGING MOLECOLARE  
XXI CICLO***

**METODICHE RADIOCHIMICHE NELLA PRODUZIONE DI  
RADIOFARMACI PER TERAPIE RECETTORIALI CON  
RADIONUCLIDI E DI TRACCIANTI PER TOMOGRAFIA AD  
EMISSIONE DI POSITRONI**

Dottoranda  
***Anna Nardelli***

**ANNO ACCADEMICO 2007-2008**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>pagina 3</b>
<i>Premesse Biologiche</i>	
<i>Cenni di Diagnostica Clinica e Strumentale</i>	
<i>Cenni sulle Metodiche Medico-Nucleari</i>	
<i>Premesse Biocinetiche e Radiochimiche</i>	
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>pagina 17</b>
<i>Premesse</i>	
<i>Generalità sulle procedure</i>	
<i>Procedura Analitica</i>	
<i>Controllo di Qualità</i>	
<i>[18F]Fluorobenzaldeide ([18F]FB-CHO)</i>	
<i>Controllo di Qualità</i>	
<b>RISULTATI</b>	<b>pagina 29</b>
<i>Procedure Radiochimiche</i>	
<i>Controlli di Qualità</i>	
<i>Standardizzazione delle procedure</i>	
<i>[18F]Fluorobenzaldeide</i>	
<i>Aspetti Clinici</i>	
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>pagina 35</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>pagina 43</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	
<b>FIGURE E TABELLE</b>	

## **INTRODUZIONE**

La gestione dei pazienti affetti da neoplasie che non rispondano più a terapie convenzionali pone problematiche di rilevanza critica sotto l'aspetto clinico, diagnostico e terapeutico. Sebbene i progressi ottenuti nella prevenzione e nella diagnosi precoce abbiano consentito una riduzione sensibile del numero di neoplasie rinvenute in fase avanzata di malattia, il reperto occasionale di patologia diffusamente metastatica costituisce un evento medico di assoluto impegno che ha, tra l'altro, da sempre stimolato la ricerca clinica, laboratoristico-strumentale e terapeutica. In tale contesto, le opportunità che la medicina nucleare, in generale e l'imaging molecolare, in particolare, offrono sono potenzialmente infinite. La detettabilità di fini eventi metabolici o la possibilità di interagire a scopo terapeutico con i processi cellulari rappresentano l'elemento distintivo intrinseco di tale branca specialistica. Per tale motivo il nostro progetto di ricerca ha voluto contribuire dal punto di vista radiochimico, alla implementazione di consolidate procedure diagnostico-terapeutiche nella gestione clinica di alcune neoplasie, esplorando anche la possibilità di fornire nuove molecole ad alta affinità che avessero una valenza sia diagnostica che terapeutica. Il modello clinico-scientifico comportamentale è stato fornito da una particolarità di neoplasie che per le loro caratteristiche

intrinseche e per la storia naturale propria meglio si prestano ad implementare nuovi radiofarmaci, le neoplasie neuroendocrine. Tali entità presentano, usualmente, un basso profilo metabolico, un non-tumultuoso andamento clinico ed una espressività recettoriale peculiare che conferisce loro caratteristici aspetti molecolari. Ad esempio, la espressione ridondante di recettori di membrana o la internalizzazione dei complessi recettore-molecola affine costituiscono due dei molteplici aspetti molecolari che possono essere studiati a fini diagnostici o terapeutici. Tali premesse pongono le basi per lo sviluppo di molecole sempre più affini che possano veicolare radioisotopi emettitori di particelle. Alcuni radiocomposti costituiscono un presidio diagnostico e terapeutico indispensabile nella caratterizzazione e nella cura di alcune di queste neoplasie, come ad esempio l'In-111-octreotide. Recentemente, tuttavia, una notevole produzione scientifica [1-6] ha validato l'utilizzo di nuove molecole ad alta affinità per i recettori espressi dalle neoplasie neuroendocrine ponendo le basi per un più mirato e sensibile utilizzo diagnostico-terapeutico e la costruzione anche di nuove molecole.

### ***Premesse Biologiche***

I Tumori Neuroendocrini (NETs) rappresentano un eterogeneo gruppo di neoplasie cui appartiene una intrinseca capacità di svilupparsi in ogni distretto dell'organismo. Sebbene possano essere costituiti da cellule con differenti caratteristiche biologiche e diversa origine embriologica, quasi tutte presentano la medesima capacità di produrre ormoni, peptidi, amine regolatorie e mediatori biologici di varia natura. Tale gruppo di cellule costituisce il cosiddetto "Sistema Neuro-endocrino Diffuso" [7].

Le cellule neuroendocrine possono organizzarsi in tessuti ghiandolari collocati in strutture anatomicamente definibili (ipofisi, paratiroidi, midollare del surrene) o formare una rete di cellule diffusa nel tratto gastro-intestinale e nell'apparato respiratorio o anche in numerosi altri organi come la tiroide, la prostata e il timo. I tumori neuroendocrini rappresentano dei tumori rari (10-20 casi/1.000.000/anno), con un picco di incidenza tra i 40 ed i 60 anni [8]. La classificazione oggi accettata prevede l'uso della dizione di "tumore neuroendocrino" riservato a tutte le neoplasie con caratteristiche morfologiche e cliniche di tipo neuroendocrino [9]. La classificazione WHO 2000 ha proposto la distinzione in tre categorie in base al grado di differenziazione istologica: tumore endocrino ben differenziato; carcinoma endocrino ben differenziato; carcinoma endocrino scarsamente differenziato ed una

quarta categoria comprendente i tumori a doppia componente, endocrina ed esocrina. La sede più tipica dei tumori neuroendocrini è costituita dal distretto gastro-entero-pancreatico (GEP), con una frequenza pari al 70%. I tumori GEP rappresentano il 2% delle neoplasie gastro-enteriche diagnosticate ogni anno e sono classificati, in tumori carcinoidi, (istotipo più frequente; 55%), ed in tumori endocrini pancreatici. I tumori carcinoidi derivano dalla proliferazione neoplastica delle cellule enterocromaffini (EC-cells), a localizzazione ubiquitaria ed in grado di sintetizzare ed iper-secernere serotonina determinando le “sindromi da carcinoide” tipiche. I tumori endocrini di origine pancreatico-insulare, invece, sono classificati, in base a proprietà funzionali biosintetiche e secretive in: insulinoma (15%), gastrinoma (12%) e, con frequenza minore, VIPoma (1.4%), glucagonoma (1.2%) e somatostatina (0.5%). Tra i tumori non-GEP assumono maggiore rilevanza i tumori neuroendocrini del tratto respiratorio (carcinoma neuroendocrino a grandi cellule ed il microcitoma polmonare), i tumori della linea simpatico-midollare di derivazione neuro-ectodermica (feocromocitoma, paraganglioma, neuroblastoma) ed il carcinoma midollare della tiroide. Alcuni di essi si presentano in associazione ad altre neoplasie del sistema endocrino, configurando il quadro delle cosiddette MEN (Neoplasie Endocrine Multiple), forme eredo-familiari. I tumori

neuroendocrini, in generale, presentano una crescita lenta e sono caratterizzati da una limitata aggressività biologica e clinica, la cui prognosi è strettamente dipendente dall'istotipo.

### ***Cenni di Diagnostica Clinica e Strumentale***

Le strategie clinico-diagnostiche volte all'identificazione dei tumori neuroendocrini sono variegata in considerazione sia della localizzazione anatomica che delle caratteristiche funzionali delle neoplasie. La diagnosi di neoplasia neuroendocrina è primariamente strettamente legata al riconoscimento anatomo-patologico di una specifica differenziazione della cellula tumorale in senso neuroendocrino. Un esame immuno-istochimico, inoltre, è essenziale nell'identificazione di markers neuroendocrini generali (molecole citosoliche, come l'enolasi neurono-specifica, la PGP 9.5, la sinaptofisina e molecole granulari, quali le cromogranine (cromogranina A (CgA) e di markers specifici, che corrispondono alle differenti sostanze ormonali prodotte dalle cellule endocrine. L'immunoistochimica svolge inoltre un ruolo importante nella valutazione prognostica con la determinazione dell'indice proliferativo cellulare Ki-67. La diagnosi clinica dei tumori neuroendocrini risulta spesso non immediata. Nell'ambito della diagnostica di laboratorio, infine, un cenno va riservato all'analisi

genetica, indispensabile nelle forme familiari, con la ricerca del gene mutato eseguita mediante analisi mutazionale su leucociti del sangue periferico o direttamente su tessuto neoplastico. Nell'iter diagnostico rivestono cruciale importanza le indagini "in vivo" di imaging morfofunzionale. L'imaging radiologico riveste un ruolo importante nel fornire un substrato anatomico ai rilievi dell'imaging recettoriale, sia nelle forme localizzate, suscettibili di trattamento chirurgico, che in quelle localmente avanzate o metastatiche, candidate alla terapia medica e/o radiometabolica; la valutazione morfologica è inoltre essenziale per il monitoraggio della progressione tumorale, nonché della risposta alla terapia [10, 11]. Tra esse la tomografia computerizzata spirale e/o multistrato e la risonanza magnetica nucleare dinamica mostrano elevata sensibilità nell'identificazione delle neoplasie neuroendocrine. [11] mentre l'eco-endoscopia gioca un ruolo fondamentale nell'algoritmo diagnostico per la localizzazione e la stadiazione pre-operatoria dei tumori neuroendocrini del pancreas.

### ***Cenni sulle Metodiche Medico-Nucleari***

L'imaging funzionale con le metodiche di Medicina Nucleare ha recentemente acquisito un ruolo rilevante nella patologia neuroendocrina, permettendo di ottenere informazioni peculiari sulla

funzionalità della neoplasia ed offrendo la possibilità di studiare fenomeni metabolici cellulari specifici “*in vivo*” [11,12]. Le metodiche medico-nucleari utilizzano molecole a tropismo elettivo per il tessuto neuroendocrino legate ad isotopi radioattivi  $\gamma$ -emittenti che le rendono identificabili e localizzabili. L’introduzione della scintigrafia recettoriale con  $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-Octreotide}$  ( $^{111}\text{In-Pentetreotide}$ ; OctreoScan) nella pratica clinica ha rappresentato una vera e propria innovazione nell’approccio diagnostico ai tumori neuroendocrini, rappresentando attualmente l’indagine di prima scelta per l’imaging di tali neoplasie, con una elevata sensibilità nel riconoscimento di lesioni tumorali, sia primitive che metastatiche, esprimenti recettori per la somatostatina appartenenti soprattutto al sottotipo 2 (SSTR2) [11]. Inoltre, la possibilità di coniugare tali molecole ad isotopi beta-emettitori ha reso disponibile una ulteriore ed innovativa opzione terapeutica nella cura di tali neoplasie. Infatti, benché l’approccio terapeutico nei tumori neuroendocrini preveda una gestione multidisciplinare del paziente e la chirurgia rimanga l’approccio di prima scelta, del tutto recentemente hanno guadagnato notevole credito le terapie sistemiche anche in considerazione dell’andamento indolente, ma comunque evolutivo, di tali neoplasie. Tra esse, gli analoghi della somatostatina costituiscono una categoria di farmaci che trova, nell’ambito dei tumori

neuroendocrini, una specifica applicazione nel controllo della secrezione ormonale e della crescita tumorale [3]. Sulla base di tali presupposti biologici la terapia recettoriale con analoghi radiomarcanti della somatostatina (PRRT, Peptide Receptor RadioTherapy) si presenta come una promettente ed efficace alternativa terapeutica applicabile ai tumori a componente neuroendocrina che presentino sulla loro superficie una adeguata densità dei recettori per la somatostatina (SSTRs). Il presupposto essenziale della terapia recettoriale con analoghi radiomarcanti della somatostatina è la internalizzazione recettore-mediata del ligando radiomarcato con accumulo della radioattività a livello del bersaglio (il nucleo cellulare) ed emissione di radiazioni in grado di provocare danno cellulare. In presenza di un favorevole rapporto di captazione, la PRRT è in grado di colpire e determinare la morte sia delle cellule captanti che di quelle adiacenti [13,14]. Uno scenario del tutto nuovo è emerso con l'introduzione della tomografia ad emissione di positroni (PET) nella diagnostica strumentale dei tumori neuroendocrini [15]. I vantaggi della PET in ambito diagnostico si devono alla sua elevata sensibilità ed alla maggiore risoluzione spaziale in confronto alle comuni metodiche di imaging, nonché alla possibilità di eseguire valutazioni semi-quantitative del grado di uptake del tracciante negli organi bersaglio. Poiché l' $^{18}\text{F}$ -FDG ( $^{18}\text{F}$  2-Fluoro-2-

Deossi-Glucosio) si rivela un tracciante non propriamente adeguato alla visualizzazione dei tumori neuroendocrini per la loro intrinseca buona “differenziazione” ed un rate metabolico piuttosto basso, negli ultimi anni sono stati realizzati traccianti specifici che possono essere marcati con emettitori di positroni. Risultati interessanti sono stati pubblicati sull'utilizzo del 5-idrossi-triptofano (5-HTP) radiomarcato con l'isotopo Colina-11 ( $^{11}\text{C}$ ) nella visualizzazione dei tumori dell'intestino, particolarmente quelli secernenti serotonina [11]. La scintigrafia con il precursore della dopamina, la L-diidrossifenilalanina (DOPA) marcata con  $^{11}\text{C}$  o  $^{18}\text{F}$  sembra superiore a qualsiasi altra metodica per l'imaging dei feocromocitomi e dei paragangliomi metastatici [3]. Di recentissima introduzione, i peptidi DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide (DOTATOC) e DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-Octreotide (DOTANOC) marcati con il beta-emettitore Ga-68 rappresentano un'ulteriore evoluzione [4]. Inoltre, il Cu-64 è un radionuclide dotato di ottime proprietà farmacocinetiche e dosimetriche; il radiofarmaco che ne deriva, il  $^{64}\text{Cu}$ -TETA-Octreotide, sembra essere un tracciante promettente per l'imaging PET nei pazienti con neoplasia neuroendocrina. Appare evidente come, date le premesse, si sia sviluppata una enorme attività scientifica nella ricerca di nuove molecole da utilizzare sia a scopo diagnostico che terapeutico.

### ***Premesse Biocinetiche e Radiochimiche***

L'octapeptide ciclico D-Phe<sup>1</sup>-Octreotide è stato il primo analogo sintetico della somatostatina utilizzato nella pratica clinica a scopo diagnostico e terapeutico. La coniugazione del peptide con il radioisotopo Indio (<sup>111</sup>In), mediata dal legame con un chelante ciclico, l'acido dietilentriamminopentaacetico (DTPA), ha condotto alla sintesi dell'<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-Octreotide (<sup>111</sup>In-Pentetreotide; OctreoScan). L'ottimale biodistribuzione ed il buon profilo farmacocinetico rendono, tale radiofarmaco, il più utilizzato nella scintigrafia recettoriale per la diagnosi, stadiazione e follow-up dei tumori neuroendocrini. La scintigrafia con OctreoScan presenta una sensibilità superiore al 90% per la visualizzazione dei tumori neuroendocrini GEP. La scoperta di altri recettori peptidici, oltre a quelli per la somatostatina, iper-espressi in diversi tipi di tumori neuroendocrini e non, ha aperto la possibilità di utilizzare nuovi radiotraccianti nel campo dell'imaging molecolare medico-nucleare. Studi sperimentali attualmente in corso riguardano l'impiego di: <sup>123</sup>I-VIP per la visualizzazione degli adenocarcinomi e dei tumori GEP; <sup>111</sup>In-DTPA-minigastrina per il carcinoma midollare della tiroide; <sup>99m</sup>Tc-Bombesina per i carcinomi di prostata e mammella [1,16]. Nella scelta del ligando (molecola “vettrice”) del radioisotopo l'attenzione ricade sui peptidi per le loro caratteristiche di specificità,

versatilità e disponibilità. Oltre ad essere appropriati candidati per il “*targeting*” dei recettori espressi dal tumore, i peptidi possiedono una eccellente permeabilità tissutale, il che consente un loro facile e rapido accesso ai siti tumorali. Le loro piccole dimensioni, inoltre, conferiscono ad essi una ottima biodistribuzione ed una rapida clearance renale e/o epato-biliare [17]. Poichè sono molecole fisiologicamente presenti nell’organismo, al contrario dei chemioterapici, sono intrinsecamente non tossiche. Infine, per le loro intrinseche caratteristiche chimiche, si prestano ad essere coniugate con radioisotopi. La ridotta stabilità plasmatica della somatostatina nativa (peptide ciclico di 14 amminoacidi contenente un ponte disolfuro) ha condotto alla sintesi di analoghi con caratteristiche farmacocinetiche più favorevoli e con la capacità di preservare l’attività biologica della molecola originaria. L’Octreotide è un peptide costituito da un “core” bio-attivo di 8 residui amminoacidici; studi condotti sul profilo di affinità recettoriale dimostrano che tale molecola ha una affinità altissima per l’SSTR2 ( $IC_{50}$  pari a  $2.0 \pm 0.7$  nM); una affinità moderatamente elevata per l’SSTR5 ( $IC_{50}$  pari a  $22.0 \pm 6$  nM); una affinità intermedia per l’SSTR3 ( $IC_{50}$  pari a  $187 \pm 55$  nM); nessuna affinità per l’SSTR1 ( $IC_{50} > 10.000$  nM) [18]. L’Octreotide di per sé non costituisce il ligando ideale ai fini strettamente terapeutici;

l'introduzione di alcune modifiche a livello molecolare ha portato alla sintesi di nuovi peptidi che presentano un migliore profilo di affinità recettoriale ed una più favorevole cinetica. In ambito medico-nucleare, e più precisamente nella attuazione della terapia recettoriale con radionuclidi sono state recentemente implementate procedure di marcatura che prevedessero l'utilizzo di differenti precursori analoghi della somatostatina coniugati a differenti radionuclidi. In particolare, l'analogo TOCA (Figura 2) si differenzia dal convenzionale Octreotide per la presenza di tirosina (Tyr) in sostituzione di un gruppo fenolico (Phe), mentre il gruppo terminale (CO-CH<sub>2</sub>) è uguale per entrambi. Un ulteriore analogo, il TATE (Figura 3) presenta, come il TOCA, rispetto all'Octreotide una tirosina (Tyr) al posto del Phe, ma come gruppo terminale, presenta un COOH. I precursori esposti possono essere legati a differenti radionuclidi. Recentemente infine, nuove molecole sono state studiate con l'intento di migliorare l'affinità recettoriale dei composti [19]. Dopo una attenta analisi radiochimica, logistica e clinica, nel nostro istituto si è scelto di utilizzare, tra i composti menzionati, le combinazioni <sup>90</sup>Y-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE ed <sup>111</sup>In-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE. Di recente, come accennato, si è palesata la possibilità sfruttare le potenzialità della metodologia PET-TC nella fase diagnostica delle neoplasie neuroendocrine. Sebbene il Ga-68, emettitore di

positroni, coniugato con analoghi della somatostatina (di recentissima introduzione i peptidi DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide; DOTATOC e DOTA-1-Nal<sup>3</sup>-Octreotide; DOTANOC) costituisca un presidio diagnostico ormai validato in metodica PET, la gestione di tale radiofarmaco comporta costi e logistica problematici. Alla luce di tale premessa, abbiamo inteso verificare la possibilità di produrre derivati del fluoro-18 (F-18) che consentissero di marcare gli analoghi peptidici della somatostatina. Tale approccio consentirebbe di amplificare la sensibilità diagnostica dovuta alla affinità degli analoghi con quella dovuta alla metodologia PET. Abbiamo pertanto implementato le procedure di sintesi per la [18F]Fluorobenzaldeide. L'attuale scenario richiede standardizzazione e riproducibilità delle procedure di sintesi radiochimica in accordo alle normative di Good Manufacturing Practice (GMP). In particolare, lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la possibilità di rimpiazzare la radio-HPLC con metodi di purificazione con cartridges nella sintesi sia della [18F] Fluorotimidina che della [18F]Fluorobenzaldeide come precursore nella marcatura dei peptidi.

In definitiva, lo scopo della nostra attività ha inteso seguire differenti linee di ricerca. Prima tra tutte, quella di ottimizzare i processi di marcatura di analoghi della somastatina in termini sia di rendimento che di stabilità e sicurezza. Sono state messe in atto, inoltre, procedure

radiochimiche standardizzate che rispondessero ad esigenze e normative radioprotezionistiche. In seconda istanza è stato valutato, anche su feedback clinico, il routinario impiego dei radiofarmaci oggetto di studio e la loro “coniugabilità” con isotopi utilizzati a scopo diagnostico e terapeutico. Infine, si è studiata la possibilità di costruire radiomolecole che conservassero le ottimali caratteristiche di biodisponibilità degli analoghi della somatostatina ma che potessero essere marcate con isotopi emettitori di positroni, incrementando sensibilmente, grazie alla metodica della tomografia ad emissione di positroni (PET), le loro potenzialità diagnostiche.

## MATERIALI E METODI

### *Premesse*

I nuovi peptidi utilizzati a scopo diagnostico e terapeutico sono rappresentati dal D-Phe<sup>1</sup>-Phe<sup>3</sup>-Thr(olo)<sup>8</sup>-Octreotide (Phe<sup>3</sup>-OctreoTIDE) (Figura 1) e dal D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Thr<sup>8</sup>-Octreotide (Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE). Nell'Octreotide è presente l'amminoacido fenilalanina (Phe), situato in posizione 3 nella molecola originaria; quest'amminoacido viene sostituito nell'octreotate con l'amminoacido tirosina (Tyr), determinando un incremento nella idrofilicità del composto. Inoltre dalla sostituzione dell'amminoacido treoninolo, Thr(ol), in posizione -COOH terminale nel TIDE, con l'amminoacido naturale treonina, si è originata la molecola Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE che presenta un incremento nove volte maggiore nell'affinità per il recettore SSTR2 in confronto al Tyr<sup>3</sup>-OctreoTIDE (IC<sub>50</sub> pari a 1.5±0.4 nM vs 14±3 nM) e di circa sei-sette volte maggiore quando marcato con l'isotopo β emittente Ittrio-90 [18, 20]. Nell'ambito della terapia radiorecettoriale gli analoghi della somatostatina fungono da molecole vettrici, legando stabilmente il radioisotopo terapeutico e concentrandolo selettivamente sul target biologico di interesse. Tale legame è mediato da agenti chelanti polifunzionali che, nelle applicazioni terapeutiche, sono rappresentati dall'acido dietilenetriaminopentaacetico (DTPA) e dall'acido 1,4,7,10-

tetraazacyclododecan-tetraacetico (DOTA). Tali composti di coordinazione conferiscono al complesso molecolare una stabilità chimica, una maggiore idrofilicità e la loro polarità ne impedisce il retropassaggio transmembrana ed il contatto con gli enzimi lisosomiali, favorendo in tal modo un adeguato “tumor residence time”. Nella terapia radiorecettoriale l’azione terapeutica antitumorale è svolta dalle radiazioni ionizzanti ad alta energia emesse dalla interazione dei radioisotopi con la materia. Dall’innesco dei processi di ionizzazione ed eccitazione si producono radicali liberi, specie chimiche altamente reattive, che possono aggredire le bio-molecole responsabili della funzionalità cellulare, come il DNA, causando un danno più o meno grave o la morte cellulare. Tra i radioisotopi potenzialmente impiegabili nella sintesi di un radiofarmaco, la scelta è condizionata dalle proprietà di emissione nucleare, dal tempo e dalle caratteristiche di decadimento, nonché da alcuni parametri specifici. Tra questi ultimi, il LET (Linear Energy Transfer), definito come la quantità di energia depositata per unità di lunghezza nell’interazione con la materia, appare inversamente correlato con la probabilità di “cell killing”. Nelle procedure terapeutiche i peptidi sono radiomarcati con isotopi metallici, quali l’Indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), l’Ittrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) ed il Lutezio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) [20]. L’ $^{111}\text{In}$  è un isotopo  $\gamma$ -emittente con una emivita di 2.8 giorni. Le

emissioni  $\gamma$  a 171 KeV e 245 KeV rendono tale isotopo adatto all'esecuzione di indagini scintigrafiche; l'effetto terapeutico è invece attribuito all'emissione di elettroni Auger e di conversione a bassa energia, caratterizzati da un elevato LET (1.1-17) e da un range massimo di penetrazione tissutale compreso tra 0,5-15  $\mu\text{m}$ . Tuttavia, l'efficienza della radiazione ad alto LET degli isotopi Auger emittenti è subordinata alla vicinanza al nucleo cellulare (pochi nanometri di distanza) per cui la "cell killing probability" risulta piuttosto bassa. Tali considerazioni portano a considerare l'<sup>111</sup>In il radioisotopo non ideale per la terapia radio-recettoriale. L'<sup>90</sup>Y è un radioisotopo  $\beta$ -emettitore puro ad elevata energia (2.3 MeV), con una emivita di 2.67 giorni, un range di penetrazione massima nei tessuti >1 cm ed è prodotto per decadimento naturale dallo <sup>90</sup>Sr. Il suo elevato potenziale terapeutico deriva dall'emissione di particelle ad alta energia in grado di causare danno a tumori di grandi dimensioni; il lungo raggio di azione ( $\text{Range}_{\text{max}} = 12$  mm) consente di realizzare anche una irradiazione di "cross fire", per cui le cellule adiacenti a quelle effettivamente captanti, situate nel "range" del tragitto della radiazione, costituiscono un potenziale bersaglio della terapia. L'assenza di emissioni  $\gamma$  da parte dell'<sup>90</sup>Y rende difficile l'imaging e la esecuzione della dosimetria per un corretto planning terapeutico. Sono stati pertanto sintetizzati radiofarmaci

marcati con l'isotopo  $\gamma$ -emittente  $^{111}\text{In}$ , che mimano il comportamento biologico degli analoghi con  $^{90}\text{Y}$ . Il  $^{177}\text{Lu}$  è un radionuclide metallico con una emivita di 6.7 giorni ad emissione sia di particelle  $\beta$  di media energia (500 KeV) che di fotoni  $\gamma$  (113 e 208 KeV), il che rende possibile la contemporanea esecuzione dell'imaging, della dosimetria e della radioterapia. Il  $^{177}\text{Lu}$  svolge probabilmente un ruolo complementare a quello dell' $^{90}\text{Y}$ ; la sua più bassa penetrazione tissutale ( $\text{Range}_{\text{max}} = 2 \text{ mm}$ ) consente trattamenti più mirati per lesioni di piccole dimensioni e la sua emivita più lunga lo rende idoneo nei casi in cui è necessario un "tumor residence time" più prolungato. Le caratteristiche intrinseche del peptide DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE, come il migliore profilo di affinità recettoriale e la maggiore efficacia nel processo di internalizzazione del complesso ligando-recettore, nonché le intrinseche caratteristiche emissive dell' $^{90}\text{Y}$  rendono il radiocomposto cui essi danno luogo il farmaco ideale nella terapia radio-recettoriale [14,18,20]. Nel nostro laboratorio abbiamo implementato ed ottimizzato procedure di marcatura di tale radiofarmaco secondo la metodologia di seguito riportata ed è stata attuata anche una contestuale procedura di marcatura che consentisse di legare ad una aliquota dello stesso peptide l' $^{111}\text{In}$  allo scopo di permettere, contestualmente, nello stesso paziente, una indagine diagnostica all'atto dell'intervento terapeutico.

### ***Generalità sulle Procedure***

Le procedure di marcatura del peptide DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecan-tetraacetico)-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE con i radioisotopi <sup>90</sup>Y ed <sup>111</sup>In ed i controlli di qualità sono stati effettuati presso la sezione di Radiochimica dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali. Il precursore analogo della somatostatina DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE è stato sintetizzato presso il Dipartimento di Radiochimica dell'Università di Basilea (Svizzera) con una procedura a cinque stadi in accordo alla normativa GMP. L'Y-90 cloruro (<sup>90</sup>YCl<sub>3</sub>) e l'In-111 sono stati forniti dalla casa farmaceutica Perkin Elmer, PE.

#### **A) <sup>90</sup>Y-DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OCTREOTATE**

La procedura di marcatura del DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE con <sup>90</sup>Y si articola nelle seguenti fasi. Tipicamente, a 60 µg di DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE solubilizzato in H<sub>2</sub>O sono aggiunti 250 µl di una soluzione 0,4 M acetato di sodio/acido gentisico, pH 5. Il volume finale ottenuto viene trasferito in una vial contenente circa 50 mCi di <sup>90</sup>Y in 0,04 M HCl. La miscela viene incubata ad una temperatura di 90°C per 30 minuti per favorire il processo di incorporazione del radionuclide all'interno del chelante (DOTA). Dopo raffreddamento la miscela viene trasferita in una vial, posta in appositi contenitori schermati, contenente

100 µl di DTPA (acido dietilentriaminopentacetico) in soluzione salina NaCl 0,9%; il prodotto risultante da tali reazioni chimiche è il radiocomposto terapeutico  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE. Eseguita la marcatura si procede al controllo di qualità della purezza radiochimica, per valutare la percentuale di incorporazione del radionuclide all'interno del chelante e la eventuale contaminazione della soluzione e/o la formazione di sottoprodotti. A tale scopo, la miscela contenente  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE, dopo incubazione con albumina 2%, viene analizzata mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography); con tale metodica è possibile ottenere la separazione dell'isotopo metallico eventualmente non legato dalla molecola radiomarcata. Un ulteriore controllo di qualità viene eseguito mediante uno strumento analitico, di recente introduzione in commercio, il "Cyclone Plus Storage Phosphor System" (Perkin Elmer, PE), che, sfruttando il fenomeno della luminescenza foto-stimolabile, realizza una autoradiografia "senza film" su campioni di TLC (Thin Layer Chromatography).

#### B) $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OCTREOTATE

La preparazione del radiocomposto  $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE avviene in modo del tutto simile a quella precedentemente descritta per l' $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE. La reazione di incorporazione del

radiometallo nel chelante (DOTA) si realizza mediante incubazione della miscela contenente l' $^{111}\text{In}$  ed il DOTA-Tyr<sup>3</sup>- OctreoTATE a 90°C per 60 minuti. Per il controllo di qualità la miscela viene analizzata mediante HPLC, previa aggiunta di soluzione salina NaCl 0,9%.

### ***Procedura Analitica***

#### **A) $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OCTREOTATE [ $^{90}\text{Y}$ -(DOTA-TATE)]**

La marcatura del peptide DOTA-TATE con yttrio-90 e tutte le operazioni di preparazione avvengono in un'apposita cappa per manipolazioni FHR1-50 e nella cella di manipolazione Manuela presenti nel Laboratorio di Radiochimica G.M.P grado C. La procedura di marcatura utilizzata è descritta di seguito.

Il peptide in forma solida viene aliquotato e conservato in freezer (secondo le modalità di conservazione dettate nel certificato del peptide fornito dalla Pichem<sup>®</sup>). Il peptide, aliquotato, verrà di volta in volta prelevato per la marcatura. L'aliquota di DOTA-TATE è prelevata mediante pipetta Gilson con puntali sterili e posta in una eppendorf sterile. A tale aliquota è aggiunta una adeguata quantità di acido gentisico (acido 2,5 diidrossibenzoico) da utilizzare come scavenger radicalico antiossidante (10 mg per 20 mCi) [21]. La presenza dell'acido gentisico blocca i radicali eventualmente formati dalla ionizzazione in

seguito al decadimento dell'isotopo marcante. All'acido gentisico viene aggiunto acetato di sodio 0,4 M. L'acetato è indispensabile per la reazione con il cloruro di yttrio-90 in quanto forma il sale corrispondente prima di reagire con il peptide. Dalla soluzione di acido gentisico e acetato di sodio quindi, si preleva una appropriata aliquota e la si aggiunge alla eppendorf contenente il peptide. Tutto il volume così ottenuto viene versato nella vial contenente la soluzione di yttrio-90 cloruro. Si lascia incubare la vial per 30 min ad 90°C. Nel contempo in un contenitore schermato Biodex per  $\beta$  emettitori si posiziona una vial sterile. All'interno di questa vial si devono aggiungere in sequenza una soluzione salina 0.9%, il DTPA e albumina al 2%. La vial contenente l'yttrio-90 ed il peptide, terminato il periodo d'incubazione, viene lasciata raffreddare; tutto il volume viene prelevato e trasferito nella vial schermata Biodex preparata come sopra descritto.

#### B) $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OCTREOTATE

La marcatura del peptide DOTA-TATE con Indio-111 e tutte le operazioni di preparazione avvengono in un'apposita cappa per manipolazioni FHR1-50 e nella cella di manipolazione Manuela presenti nel Laboratorio di Radiochimica G.M.P grado C.

La procedura di marcatura utilizzata è descritta come segue. L'Indio-111 viene fornito come  $\text{InCl}_3$  in soluzione acida; per la marcatura si

utilizzano le proprietà chimiche dell'isotopo tale da formare complessi stabili con un gran numero di chelanti. Generalmente si sfrutta il legame tra l'Indio-111, un complesso formato dalla molecola da marcare e un chelante intermedio. Dalla soluzione di acido gentisico e acetato di sodio secondo le direttive disposte dall'IAEA [22], si preleva una adeguata aliquota e si aggiunge il peptide DOTATATE. Si versa tutto il volume nella soluzione di In-111 cloruro.

Si lascia incubare la vial per 1 h a circa 90°C in un apposito bagnetto riscaldante. Il fattore tempo-temperatura è stato valutato sperimentalmente per il tipo di contenitore utilizzato.

Trascorso il tempo necessario per la marcatura, si rimuove dal bagnetto la vial contenente il composto marcato con l'indio e si lascia raffreddare. Si aggiunge infine una quantità proporzionale di soluzione salina all'Indio per conferire una adeguata iniettabilità alla soluzione.

### ***Controllo di Qualità***

Il controllo di qualità del preparato viene effettuato per valutare la purezza radiochimica: yttrio-90 legato al composto. La cromatografia ascendente su silica gel (TLC) è il metodo di elezione per questo controllo. Il campione da analizzare, prelevato dal preparato viene opportunamente diluito con acqua. Una adeguata quantità viene

posizionata a 2 cm dalla base di una lastrina di silica gel di 1,5 cm di larghezza e 10 cm di lunghezza. Si lascia correre la lastra in una soluzione di Trisodio citrato 0.1N aggiustata a pH 5 con HCl fino ad un'altezza massima di 7 cm della lastra. Si lascia impressionare poi la lastrina insieme ad un riferimento su di una lastra fotosensibile ed analizzata mediante Cyclone della Perkin Elmer.

Elaborando l'immagine è possibile misurare la purezza radiochimica del composto rispetto all'ytrio-90 non chelato. Un controllo di qualità positivo prevede che sia garantita l'iniettabilità se la marcatura avviene con almeno il 95% di resa radiochimica. Tale controllo viene attuato anche per il radiofarmaco marcato con In-111.

### ***[18F]Fluorobenzaldeide ([18F]FB-CHO)***

Abbiamo ottimizzato una nuova procedura di marcatura che consentisse di produrre un precursore fluorinato adatto alla coniugazione con un peptide, la [18F]Fluorobenzaldeide ([18F]FB-CHO). La molecola finale consentirà una coniugazione chemoselettiva tra un peptide non-protetto aminooxi-funzionalizzato e tale aldeide marcata con F-18.

La [18F]FB-CHO (Figura 4) è stata preparata dal precursore 4-formyl-*N,N,N*-trimethylanilinium attraverso una fluorinazione diretta (dimethyl sulfoxide, 60°C, 15 min) e purificata utilizzando un sistema cartridge

cation-exchange/reversed-phase. La radio-HPLC è stata rimpiazzata da un sistema a due cartridges. I cartridges sono stati legati al reattore di un sintetizzatore commerciale, il Tracerlab FX-FN (GETM) tramite un sistema automatizzato costruito nel nostro laboratorio. E' stata implementata una procedura a 4 passaggi: a) il prodotto non purificato viene veicolato dal reattore attraverso il primo cartridge per intrappolare i prodotti che non hanno reagito e quelli secondari, quindi, viene veicolato ulteriormente attraverso il secondo cartridge (type C18) per intrappolare il prodotto marcato. b) le valvole elettromeccaniche del sistema sono azionate permettendo l'eluizione con etanolo (9ml) del prodotto marcato e permettendo il suo trasferimento nel reattore che viene preventivamente lavato con soluzione acquosa. c) la soluzione è evaporata in vacuum a 75°C per 7 minuti; d) infine il prodotto è inviato in una vial contenente una soluzione buffer pronta all'uso per eventuale somministrazione. I dati sono stati confrontati con quelli ottenuti per la [18F]Fluorotimidina. La sintesi della [18F]Fluorotimidina segue il metodo descritto da Machulla ed al. [23] che prevede l'utilizzo come primo cartridge dell'Alumina N mentre quello utilizzato per la [18F]Fluorobenzaldeide prevede l'uso di un cartridge SCX(2). La procedura analitica viene di seguito riportata in figura (Figura 5).

### *Controllo di Qualità*

Come per i radionuclidi emettitori gamma e beta anche in questo caso il radiocomposto viene analizzato mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography); con tale metodica è possibile ottenere la separazione dell'isotopo metallico eventualmente non legato dalla molecola radiomarcata (Figura 6). Un ulteriore controllo di qualità viene eseguito mediante uno strumento analitico, di recente introduzione in commercio, il "Cyclone Plus Storage Phosphor System" (Perkin Elmer, PE) (Figura 7).

## **RISULTATI**

### ***Procedure Radiochimiche***

#### *Y-90-DOTATATE e In-111-DOTATATE*

Le marcature di  $^{90}\text{Y}$ -DOTATATE e  $^{111}\text{In}$ -DOTATATE effettuate nel periodo di studio sono state 45. La quantità di acido genticico pesata è stata in media: 0.080 mg; il volume di acetato di sodio prelevato è stato sempre 1.5 ml. La quantità di Y-90 da utilizzare è stata in media di 44.6 mCi, in un volume medio di 75 $\mu$ l.

Il tempo di incubazione di acido genticico, acetato di sodio e Y-90 ha avuto una durata media di 34.8 minuti. La temperatura media di incubazione è stata di 93.1 °C. Sono sempre state utilizzate vials sterili sottovuoto; in tali vials, destinate alla raccolta del prodotto finale, è stata inserita una quantità media delle seguenti sostanze:

- 1.3 mL NaCl
- 100  $\mu$ l DTPA
- 1.9 mL albumina al 2%

Il tempo di raffreddamento medio dopo l'incubazione è stato di 9.6 minuti.

La soluzione fisiologica aggiunta al preparato è stata mediamente di 0.5 mL.

Le cinetiche di reazione si sono rivelate essere tempo- e temperatura-dipendenti in particolare le reazioni erano complete a 90° dopo 30 minuti circa, nonché dopo 1 ora circa per l'In-111. In tale contesto, tuttavia, delle 45 procedure di marcatura 20 furono inizialmente eseguite secondo un protocollo standard [24] con un tempo di incubazione medio, per l'Y-90, di  $30 \pm 2$  minuti (gruppo A). In seguito, abbiamo ritenuto opportuno aumentare il tempo di incubazione portandolo a circa 39 minuti nelle restanti 25 procedure (gruppo B). Abbiamo pertanto potuto osservare come la resa di marcatura fosse sensibilmente migliore nel gruppo B rispetto al gruppo A (95,6% vs 98,2%;  $p < 0.001$ ). (Figura 8). Pertanto la marcatura ed il controllo di qualità dell' $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE hanno determinato ed evidenziato la sintesi di un radioligando stabile ed altamente purificato, con attività specifica di marcatura  $>98\%$  e preservata affinità di legame recettoriale peraltro confermata alle immagini diagnostiche. Anche la procedura di marcatura dell' $^{111}\text{In}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE ha portato alla sintesi di un radiofarmaco altamente purificato (vedi controlli di qualità), con preservata affinità di legame recettoriale. In particolare, l'analisi clinico diagnostica in pazienti con detettabile carico tumorale ha sempre confermato tali evidenze. Inoltre, la percentuale di incorporazione del

radionuclide si è rivelata ottimale a pH medi di 4.5, considerando che tale parametro diveniva non riproducibile per pH superiori a 5.5.

### ***Controlli di Qualità***

I controlli di qualità di questi radiofarmaci sono stati effettuati mediante cromatografia ascendente su silica gel (TLC) le cui lunghezza e larghezza sono state in media 9.7 cm e 2.3 cm rispettivamente. La fase mobile utilizzata è stata Sodio citrato 0.1N a pH 5. Lo strumento utilizzato è stato sempre il Cyclone plus (PerkinElmer), uno strumento a base di schermi di fosforo che, mediante autoradiografia, permette un'elevata risoluzione dei radioisotopi in esame. Il metodo da noi utilizzato ha fatto sì che la resa di marcatura di tali preparati sia sempre stata >95% (range 95%-99%). La cromatografia ascendente su silica gel (TLC) si è rivelata effettivamente essere il metodo di elezione per questo controllo di qualità ed il sistema Cyclone plus (PerkinElmer) uno strumento affidabile anche sulla base dei feed-back clinico-diagnostici ottenuti.

### ***Standardizzazione delle procedure***

Come menzionato, tutte le operazioni di preparazione sono avvenute in un'apposita cappa per manipolazioni FHR1-50 e nella cella di

manipolazione Manuela presenti nel Laboratorio di Radiochimica. Inoltre, i prodotti finiti sono stati stoccati prima della somministrazione in contenitori schermati Biodex per  $\beta$  emettitori. L'adozione sistematica di tali metodiche ed una ottimizzata tempistica hanno consentito una buona riproducibilità.

### ***[18F]Fluorobenzaldeide***

I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti per la [18F] Fluorotimidina che prevede una preparazione radiochimica simile [23]. I risultati preliminari sono riportati in Tabella 1. L'[18F]FB-CHO è stato ottenuto con un rendimento radiochimico, non-ottimizzato del 49% in 30 minuti. Tale risultato permetterà di testare a pH acido ed indipendentemente dal peptide utilizzato l'efficienza di marcatura che è stimata essere del 60%-80% in 15 minuti a 60 gradi. Tali procedure consentono di prevedere un globale rendimento di marcatura fino al 40% per i peptidi-[18F]FBOA

### ***Aspetti Clinici***

Allo stato attuale sono stati sottoposti a terapia con  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-OctreoTATE 15 pazienti (11 maschi e 4 femmine) affetti da tumore neuroendocrino. Tutti i pazienti presentavano, prima dell'inizio del

trattamento, una malattia altamente evolutiva documentata clinicamente ed agli esami morfologici, non più responders alle terapie convenzionali e con scarso compenso sintomatologico. Ad una valutazione della risposta morfologica tumorale, è stata riscontrata una Risposta Completa (RC) in 3 dei 15 pazienti (20%), una Risposta Parziale (RP) in 2 dei 15 pazienti (13%), una Malattia Stabile (MS) in 8 dei 15 pazienti (54%) ed una Malattia Progressiva (MP) in 2 dei 15 pazienti (13%). Il tasso globale di risposta tumorale (RC + RP) è stato pari al 33%. La durata media della risposta tumorale globale (durata RC + RP) è stata pari a 54 settimane (range 24-82), quella di stabilizzazione di malattia è risultata pari a 65 settimane (range 31-108). Allo stato attuale 4 dei 15 pazienti trattati sono deceduti. Ad una valutazione TC di tipo quantitativo (valutazione dimensionale), 4 pazienti con tumore endocrino del pancreas e metastasi epatiche multiple hanno mostrato involuzione volumetrica delle lesioni epatiche, con riduzione media di volume pari al 16% (range 6,7-26). In aggiunta ad una valutazione TC di tipo qualitativo (segni morfologici indiretti di danno lesionale) gli stessi pazienti (tumore endocrino del pancreas e multiple metastasi epatiche) hanno mostrato, in corrispondenza dei segmenti epatici interessati da metastasi, alterazioni compatibili con una azione citotossica del radiofarmaco. Prima dell'inizio del trattamento tutti i pazienti

mostravano, alla scintigrafia con OctreoScan, captazione detettabile e significativa a livello della sede tumorale primitiva e/o metastatica. Dopo terapia 3 pazienti mostravano Risposta Completa (RC), 2 paziente Risposta Parziale (RP), 2 mostravano Malattia Progressiva (MP). Dei restanti 8 pazienti tutti mostravano Risposta Stabile. In termini di beneficio clinico, dopo radioterapia con <sup>90</sup>Y-DOTATATE tutti i pazienti hanno mostrato un significativo miglioramento ed un buon compenso clinico-funzionale, risultando nettamente migliorata la loro qualità di vita ed il loro performance status globale. In merito alla tossicità, durante la somministrazione endovenosa di <sup>90</sup>Y-DOTATATE, non si è verificata alcuna manifestazione clinica da tossicità acuta (reazioni cutanee, reazioni allergiche o febbre). In tutti i pazienti trattati non si è verificata alcuna tossicità ematologica di grado severo (3/4), in accordo ai criteri WHO. Nessun paziente ha sviluppato leucopenia e solo una riduzione media transitoria dei globuli bianchi del 20%, pur entro i limiti di normalità, era riscontrabile dopo ciascun ciclo di trattamento. In tutti i pazienti il nadir dei valori di emoglobina e dei globuli bianchi si riscontrava in media 4 settimane dopo ciascun ciclo di trattamento (range 3-5); con un pronto recupero ai valori pre-terapeutici dopo ulteriori 2 settimane. Nessun paziente ha sviluppato tossicità renale acuta e/o tardiva.

## DISCUSSIONE

L'ottimizzazione dei processi di marcatura degli analoghi della somatostatina costituisce, fin dalla iniziale implementazione di tali radiocomposti nella terapia recettoriale, una delle priorità più pressanti. Tale esigenza è dettata dal fatto che il prodotto finale di complicate procedure radiochimiche deve soddisfare criteri di rendimento, stabilità e sicurezza. Un preventivo ed analitico approccio a tali procedure impone di individuare punti critici, punti sensibili e punti di forza del sistema implementato. Nel nostro studio abbiamo indagato la possibilità di uniformare le metodiche di radiomarcatura per gli analoghi della somatostatina allo scopo di standardizzare un protocollo operativo che azzerasse le criticità e riducesse i punti sensibili. Uno dei primi risultati è stato quello di ottenere rese radiochimiche sensibilmente superiori al cut-off del 95% garantendo una sicurezza assoluta per l'iniettabilità di tali composti. Tale risultato, in accordo con precedenti studi [25] è stato ottenuto con l'osservazione, poi suffragata statisticamente al controllo TLC, che un tempo di incubazione prolungato del complesso peptide-acido-radionuclide aumentasse la resa radiochimica finale. In tale contesto vanno pertanto discussi alcuni aspetti sulle condizioni di ottimizzazione delle metodiche. E' stato ormai consolidato il ruolo nella terapia recettoriale (PRRT) dei peptidi DOTA-coniugati come il

[DOTA, Tyr3]octreotide (DOTATOC) ed il [DOTA0,Tyr3]octreotate (DOTA-TATE), che possono essere marcati con radionuclidi come l'ittrio-90, l'In-111 ed il Lu-177. I radioligandi per la PRRT richiedono alte attività specifiche e tutte le procedure di radio-sintesi devono soddisfare tale criterio. Tuttavia, sebbene tali radionuclidi siano prodotti carrier-free, dei contaminanti possono essere introdotti durante la produzione o come prodotti del decadimento. Una serie di fattori biologici, infatti, impongono la necessità di alte attività specifiche. In primo luogo, per l'utilizzo "in vivo" di tali molecole, la quota di radioligando che può essere somministrata è limitata dalla affinità e dalla quantità dei recettori espressi nei tessuti. I nostri risultati sono simili a quelli di altri autori [20] che hanno dimostrato come al di sopra di una dose ottimale un ulteriore incremento nella quantità di ligando aumenterebbe la competizione tra ligando marcato e non-marcato per il recettore, riducendo l'uptake del radiocomposto nei tessuti con positività recettoriale iperespressa. Una ponderata aliquotazione del peptide ha consentito, nel nostro caso, di ovviare a tale problematica. Inoltre, i meccanismi endocellulari che inficiano l'internalizzazione trans-membrana del complesso recettore-peptide potrebbero divenire cruciali desensibilizzatori ad alte concentrazioni di peptide. L'evenienza di tali problematiche indurrebbe una riduzione dell'uptake del

radiocomposto nei tessuti target come già dimostrato da Bunemann et al. [26]. Un'ulteriore conferma alla necessità di ottenere attività specifiche elevate nelle procedure di marcatura dei peptidi è stata fornita da alcuni autori [27] che hanno dimostrato come solo piccole quantità di peptide possano essere tollerate per quelle molecole che posseggono effetti collaterali di tipo farmacologico come la DOTA-bombesina o la DOTA-sostanza P. Una alta attività specifica ridurrebbe la quota di peptide da somministrare. Inoltre, in misura del tutto inaspettata la necessità di raggiungere alte attività specifiche può spesso essere invalidata da parametri radiochimici responsabili dei rates di reazione e del rendimento. Uno di essi è il pH che è stato, nel nostro studio ed in accordo con altri autori, [28,29] catalogato come un punto sensibile, una situazione cioè di “medio impatto” che nelle procedure di marcatura, se registrata, può compromettere il risultato finale ma lascia la possibilità per un completo “recovery”, se corretta. Ad esempio, il rate di formazione del complesso metallo-DOTA incrementa con il pH ma la solubilità dei metalli diminuisce con il pH conducendo alla formazione di idrossidi. Nel nostro studio abbiamo implementato le procedure di marcatura ad un pH di circa 5 che è stato stabilito essere il valore ideale al corretto funzionamento del sistema chimico, sebbene

alcuni autori [30,31] abbiano raccomandato una marcatura dei DOTA-analoghi ad un pH riconducibile a valori di 7-8 .

Nella ricerca delle condizioni ottimali per la marcatura del DOTATATE con Y-90 e In-111 abbiamo inoltre valutato altri parametri in grado di influenzare criticamente la cinetica di reazione ed il rendimento radiochimico. Uno dei punti critici, come già accennato, è risultato essere il tempo di incubazione. Dai nostri risultati appare evidente come un minimo aumento dei tempi di incubazione dei prodotti abbia consentito di ottenere un incremento del rendimento e quindi ottimali attività specifiche. La temperatura ed i tempi di incubazione infatti, sono stati catalogati come punti critici della metodica, passaggi cioè il cui mancato rispetto sarebbe in grado di far fallire la sintesi come peraltro evidenziato già da altri autori [25]. In merito alla scelta del radiocomposto adottato per le terapie, va sottolineato come da un punto di vista radiochimica la preferenza per l'uno o per l'altro componente è legata anche alla logistica. In particolare, il cadmio (Cd) prodotto del decadimento dell'In-111 è un forte competitore per l'incorporazione dell'In-111 nel radiofarmaco. Infatti, la più alta attività specifica sarebbe raggiungibile solo subito dopo la produzione dell'In-111 [25]. In definitiva l'effetto dei contaminanti sul rendimento della procedura potrebbe essere imponente ed inficiare il raggiungimento di alte attività

specifiche. Per tale motivo, ad esempio, si può ipotizzare che la scelta di utilizzare il radionuclide In-111 come effettore per la terapia potrebbe non essere ideale. Per lo stesso motivo, l'Afnio (Hf) prodotto del decadimento del Lutezio non è un forte competitore nelle reazioni e pertanto la sua presenza non avrebbe conseguenze nell'ottenimento della massima attività specifica raggiungibile. Tale aspetto pone il Lutezio come radionuclide ideale per le terapie da adottare in logistiche complicate. Nel nostro studio un buon compromesso, dal punto di vista radiochimico ma anche diagnostico, è stato raggiunto adottando l'Y-90 come radionuclide, nella cui vial di produzione è possibile riscontare pochi microgrammi di Zirconio (Zr) suo prodotto del decadimento. La scelta dell'OCTREOTATE come peptide è stata dettata anche da logiche economiche. A parziale supporto Capello ed al. [32] hanno valutato gli effetti terapeutici di analoghi della somatostatina coniugati mediante DOTA ad  $^{90}\text{Y}$  o  $^{177}\text{Lu}$  in un saggio "in vitro" su tumore pancreatico di ratto CA20948, concludendo che il DOTATATE marcato con  $^{90}\text{Y}$  o  $^{177}\text{Lu}$  rappresenta l'analogo peptidico più promettente e più adatto ai fini della terapia radiorecettoriale. Vanno infine menzionati i punti di forza della procedura dati dalla ottima stabilità del prodotto finale, la sua buona sicurezza e la riproducibilità delle metodiche. Recentemente, infine, si è palesata la possibilità sfruttare le potenzialità della

metodologia PET-TC nella fase diagnostica delle neoplasie neuroendocrine. Come menzionato il Ga-68, emettitore di positroni, coniugato con analoghi della somatostatina può presentare costi di gestione e logistica problematici [33]. Inoltre, la mancanza di appropriati metodi di radiofluorinazione per la sintesi su larga scala di peptidi marcati con Fluoro-18 costituisce il limite principale al loro utilizzo in metodica PET. Abbiamo pertanto ottimizzato una nuova procedura di marcatura che consentisse di produrre un precursore fluorinato adatto alla coniugazione con un peptide, la [18F]Fluorobenzaldeide ([18F]FB-CHO). La molecola finale consentirà una coniugazione chemoselettiva tra un peptide non-protetto aminooxi-funzionalizzato e tale aldeide marcata con F-18. La [18F]FB-CHO è stata preparata dal precursore 4-formyl-N,N,N-trimethylanilinium attraverso una fluorinazione diretta (dimethyl sulfoxide, 60°C, 15 min) e purificata utilizzando un sistema cartridge cation-exchange/reversed-phase. L'attuale scenario richiede standardizzazione e riproducibilità delle procedure di sintesi radiochimica in accordo alle normative di Good Manufacturing Practice (GMP). I sistemi commerciali completamente automatizzati attualmente in uso consentono di soddisfare tali normative utilizzando metodi di radio-HPLC per la purificazione finale del prodotto. Sebbene la radio-HPLC consenta di

ottenere una alta efficienza di separazione il suo utilizzo è dispendioso in termini temporali ed economici e richiede personale qualificato per il suo funzionamento. In ultima analisi essa potrebbe essere rimpiazzata da una purificazione con cartridge. Ebbene, il sistema costruito nel nostro laboratorio, per quanto abbia consentito di ottenere una resa radiochimica inferiore a quella ottenuta con i metodi di separazione con Radio-HPLC, consente di implementare una procedura di separazione su cartridge più veloce, riproducibile e pratica in accordo con le norme GMP [34]. Inoltre, il suo utilizzo non richiede personale altamente specializzato e può essere usato a supporto per sintesi che prevedano reazioni multi-steps come per esempio la marcatura di peptide con [18F]Fluorobenzaldeide. Il composto finale risulta essere resistente alla defluorinazione in vivo e può essere prodotto velocemente in quantità adeguate ad un utilizzo routinario. Tale procedura potrebbe aprire prospettive ulteriori per la marcatura di precursori con radioisotopi diagnostici e terapeutici. Tale lavoro di sistematizzazione delle procedure radiochimiche ha anche ottenuto un feed-back clinico positivo. Il trattamento con  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide nella nostra popolazione di pazienti affetti da neoplasia neuroendocrina metastatica comporta una risposta obiettiva tumorale pari al 33% ed una stabilizzazione di malattia nel 54% dei pazienti confermando

sostanzialmente i dati della letteratura [35]. In pazienti con malattia altamente evolutiva, non più responders alle terapie convenzionali, la stabilizzazione di malattia può e deve essere considerata come una risposta significativa. I nostri risultati dimostrano, inoltre, che la terapia con  $^{90}\text{Y}$ -DOTATATE presenta una ottima tollerabilità ed applicabilità cliniche, non essendo correlata ad alcuna manifestazione di tossicità acuta ed, al momento, di tossicità tardiva. Tra le prospettive cliniche future, un'alternativa attraente, già parzialmente in uso, è rappresentata da una terapia di associazione di analoghi della somatostatina marcati con  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$ , al fine di garantire un uptake più favorevole in sede tumorale nonché dallo sviluppo di nuovi analoghi della somatostatina che presentino caratteristiche più favorevoli ai fini dell'imaging e della terapia radionuclidica e mostrino elevata affinità recettoriale verso altri sottotipi di recettori [36].

## CONCLUSIONI

La ottimizzazione delle metodiche di radiomarcatura degli analoghi della somatostatina implementate presso il nostro Istituto hanno consentito di formulare procedure operative standardizzate. La riproducibilità e la resa radiochimica ottenuti hanno consentito l'utilizzo a scopo diagnostico e terapeutico di radiocomposti stabili e sicuri. Tali caratteristiche, certificate dai controlli di qualità, hanno trovato pronto riscontro clinico anche in termini di efficacia. La attuazione di metodiche radiochimiche atte a produrre un precursore fluorinato come la [18F]Fluorobenzaldeide, adatto alla coniugazione con un peptide, apre interessanti prospettive per l'utilizzo della tecnologia PET-TC nella patologia neuroendocrina con la possibilità di studiare e quantizzare anche i più fini meccanismi molecolari.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Kwekkeboom D, Krenning EP, de Jong M. Peptide receptor imaging and therapy. *J Nucl Med* 2000;41:1704-1713
2. Eriksson B, Bergstrom M, Orlefors H, et al. Use of PET in neuroendocrine tumors. In vivo applications and in vitro studies. *Q J Nucl Med* 2000;44:68-76
3. Oberg K, Kvols L, Caplin M, et al. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Ann Oncol* 2004;15:966-973
4. Wild D, Schmitt JS, Gini M et al: DOTANOC, a high-affinity ligand of somatostatin receptors subtypes 2, 3 and 5 for labelling with various radiometals. *Eur J Nucl Med* 2003;30:1338-1347
5. Eriksson B, Oeberg K. Summing up 15 years of somatostatin analog therapy in neuroendocrine tumors: Future outlook. *Ann Oncol* 1999;10:31

6. Oeberg K Advances in chemotherapy and biotherapy of endocrine tumors. *Curr Opin Oncol* 1998;10:58-65
7. Montuenga LM, Guembe L, Burrell MA, et al. The diffuse endocrine system: from embriogenesis to carcinogenesis. *Prog Histochem Cytochem* 2003;38:155-272
8. Taal BG, Visser O. Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology* 2004;80(S1):3-7
9. Solcia E, Kloppel G, Sobin L.H Histological Typing of Endocrine Tumors. World Health International Organization Histological Classification of Tumours. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, Second Edition 2000
10. Kaltsas GA, Besser GM, Grossman Ashely B. The diagnosis and Medical Management of Advanced Neuroendocrine Tumors. *Endocr Rev* 2004;25:458-511

11. Kaltsas GA, Rockall A, Papadogias D, et al. Recent advances in radiological and radionuclide imaging and therapy of neuroendocrine tumours. *Eur J Endocr* 2004;151-15:27
12. Rufini V, Calcagni ML, Baum RP. Imaging of Neuroendocrine Tumors. *Semin Nucl Med* 2006;36:228-247
13. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Valkema R, et al. Peptide receptor radionuclide therapy. *Ann NY Academy Sci* 2004;1014:234-245
14. de Jong M, Kwekkeboom D, Valkema R, et al. Radiolabelled peptides for tumour therapy: current status and future directions. Plenary lecture at the EANM 2002. *Eur J Nucl Med* 2003;30:463-469
15. Eriksson B, Bergstrom M, Orlefors H, et al. Use of PET in neuroendocrine tumors. In vivo applications and in vitro studies. *Q J Nucl Med* 2000;44:68-76

16. Kaltsas GA, Besser GM, Grossman Ashely B. The diagnosis and Medical Management of Advanced Neuroendocrine Tumors. *Endocr Rev* 2004;25:458-511
17. Kaltsas GA, Papadogias D, Makras P, et al. Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues. *Endocr Rel Cancer* 2005;12:683-699
18. Reubi JC, Schar JC, Waser B, et al. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *Eur J Nucl Med* 2000;27:273-282
19. Erchegyi J, Waser B, Schaer JC, et al. Novel sst(4)-selective somatostatin (SRIF) agonists. 3. Analogues amenable to radiolabeling. *J Med Chem.* 2003;46:5597-5605
20. Breeman WA, de Jong M, Kwekkeboom DJ, et al. Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1421-1429

21. Shuang L. and Edwards D.S. Stabilization of Y90 labeled DOTA-Biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid  
Bioconjugate Chem. 2001;4:554-558
22. IAEA. Technical reports n. 458:217
23. Machulla H.J. Procedure for Routine Synthesis of [18 F]-FLT in High Activities. J.Nucl. Med. 2001; 42: 257P
24. Chinol M, Bodei L, Cremonesi M, et al. Receptor-mediated radiotherapy with Y-DOTA-DPhe-Tyr-octreotide: the experience of the European Institute of Oncology Group. Semin Nucl Med. 2002;32:141-147
25. Breeman WA, De Jong M, Visser TJ, Erion JL, Krenning EP. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In and <sup>177</sup>Lu at high specific activities. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003;30:917-920

26. Bunemann M, Hosey MM. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* 1999;517:5–23
27. Jansen JB, Jebbink MC, Douglas BR, Lamers CB. Effect of loxiglumide (CR-1505) on bombesin- and meal-stimulated plasma cholecystokinin in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38:367–370
28. Szilagyi E TE, Kovacs Z, Platzek J, et al. Equilibria and formation kinetics of some cyclen derivative complexes of lanthanides. *Inorganica Chimica Acta* 2000; 298:226–234
29. Moerlein SM Welch MJ. The chemistry of gallium and indium as related to radiopharmaceutical production. *Int J Nucl Med Biol* 1981; 8:2772–2787
30. Kukis DL, DeNardo SJ, DeNardo GL, et al. Optimized conditions for chelation of yttrium-90-DOTA immunoconjugates. *J Nucl Med* 1998; 39:2105–2110
31. Liu S, Cheung E, Ziegler MC, Rajopadhye M, et al.. (90)Y and (177)Lu labeling of a DOTA-conjugated vitronectin receptor

antagonist useful for tumor therapy. *Bioconjug Chem* 2001; 12:559–568

32. Capello A, Krenning EP, Breeman WA, et al. Tyr<sup>3</sup>-octreotide and Tyr<sup>3</sup>-octreotate radiolabeled with <sup>177</sup>Lu or <sup>90</sup>Y: peptide receptor radionuclide therapy results in vitro. *Cancer Biother Radiopharm* 2003;18:761-768

33. Antunes P, Ginj M, Zhang H, Waser B, Baum RP, Reubi JC, Maecke H. Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007 Jul;34(7):982-93

34. Poethko T, Schottelius M, Thumshirn G, et al. Two-step methodology for High-Yield Routine Radiohalogenation of Peptides: <sup>18</sup>F-Labeled RGD and Octreotide Analogs. *J. Nucl. Med.* 2004, 45, 892-902

35. Kwekkeboom DJ, Muller-Brand J, Paganelli G, et al. Overview of results of Peptide Receptor Radionuclide Therapy with <sup>3</sup>

Radiolabeled Somatostatin Analogues. Eur J Nucl Med 2005;  
46:62S-66S

36. Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G  
SOM230 a novel somatotropin release inhibiting factor (SRIF)  
receptor binding and a unique antiseecretory profile. Eur J Endocr  
2002;146:707-716

Figura 1. Struttura chimica del D-Phe<sup>1</sup>-Octreotide

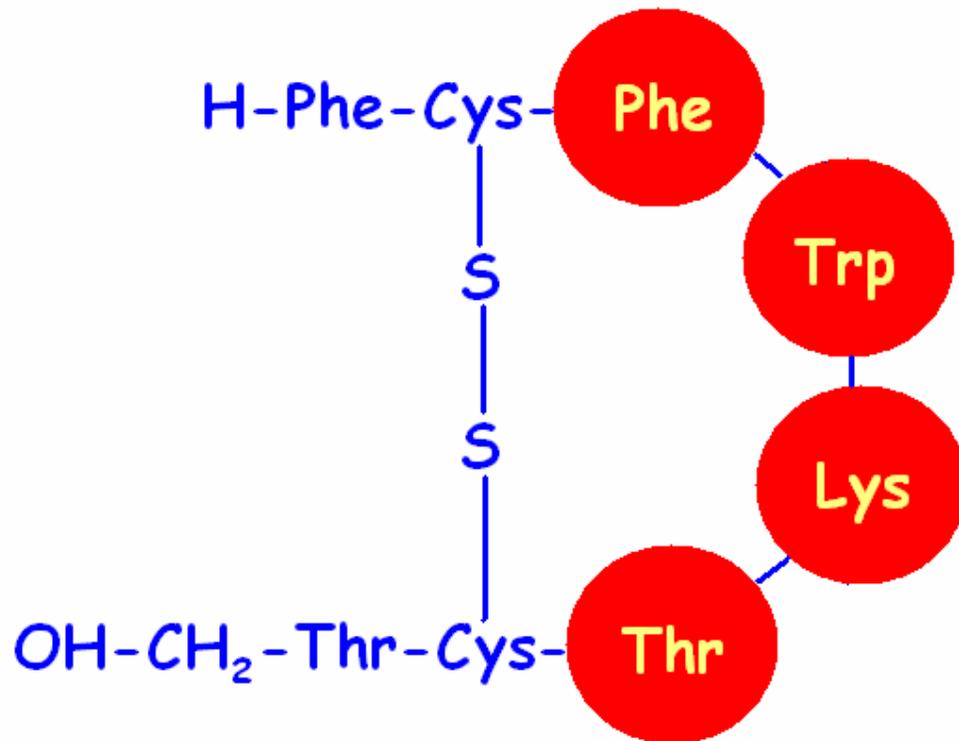


Figura 2. Struttura chimica del TOCA

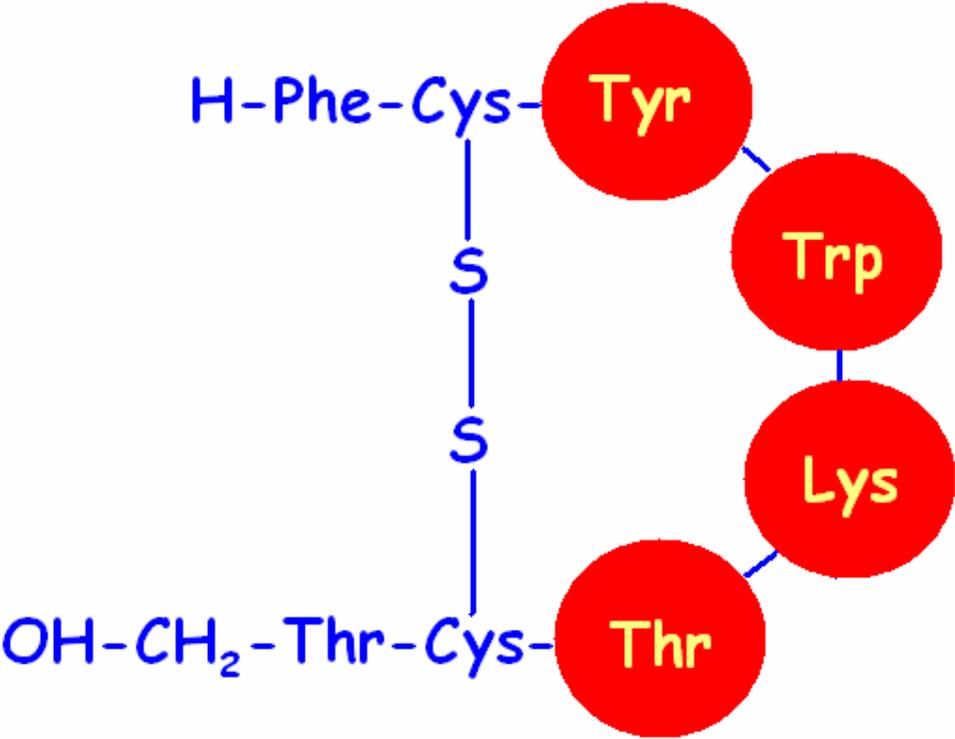
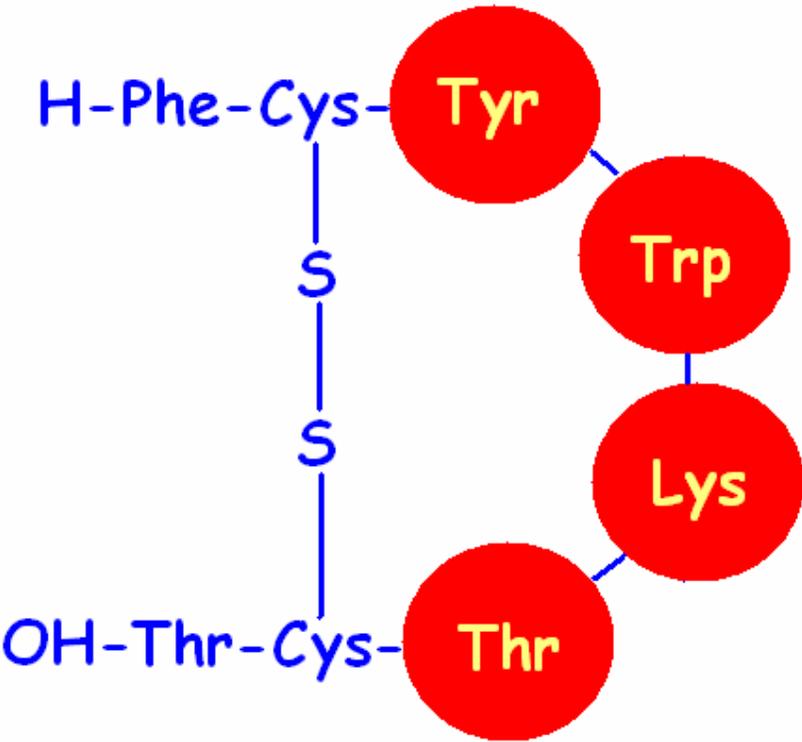
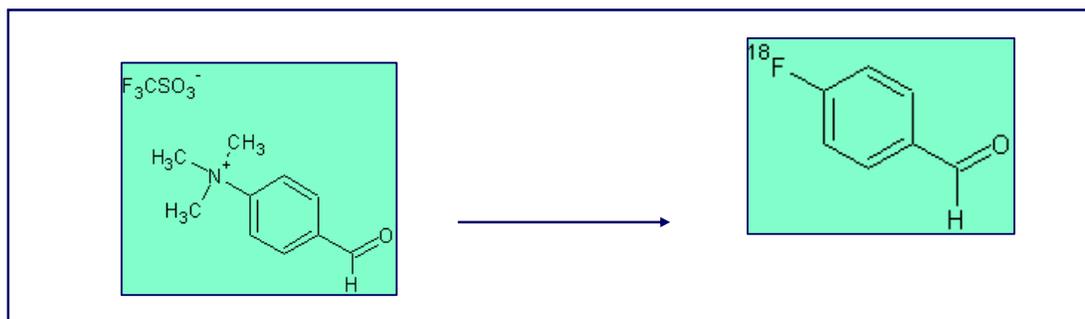


Figura 3. Struttura chimica dell'OCRETOTATE



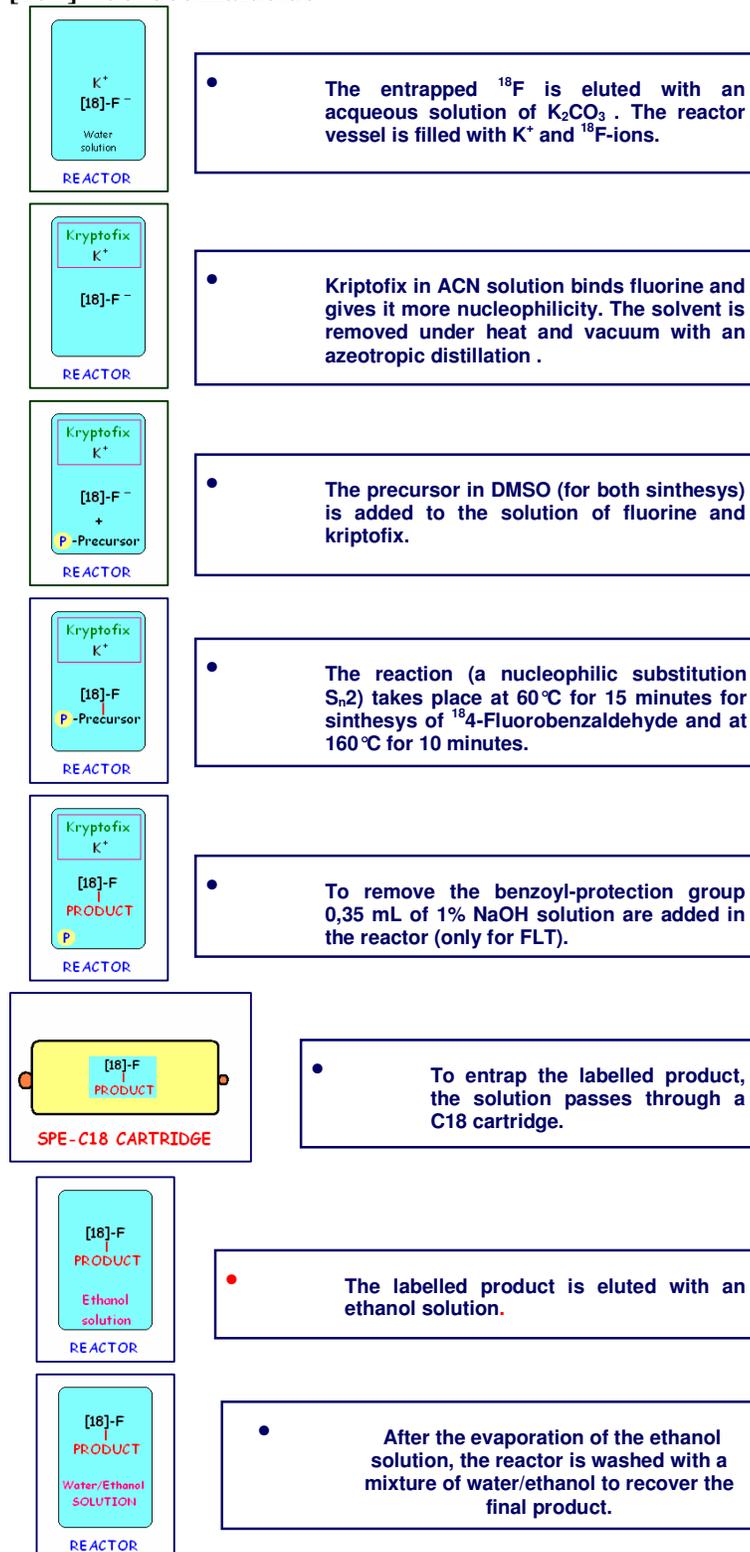
**Figura 4. Struttura chimica della [18F]Fluorobenzaldeide ([18F]FB-CHO)**



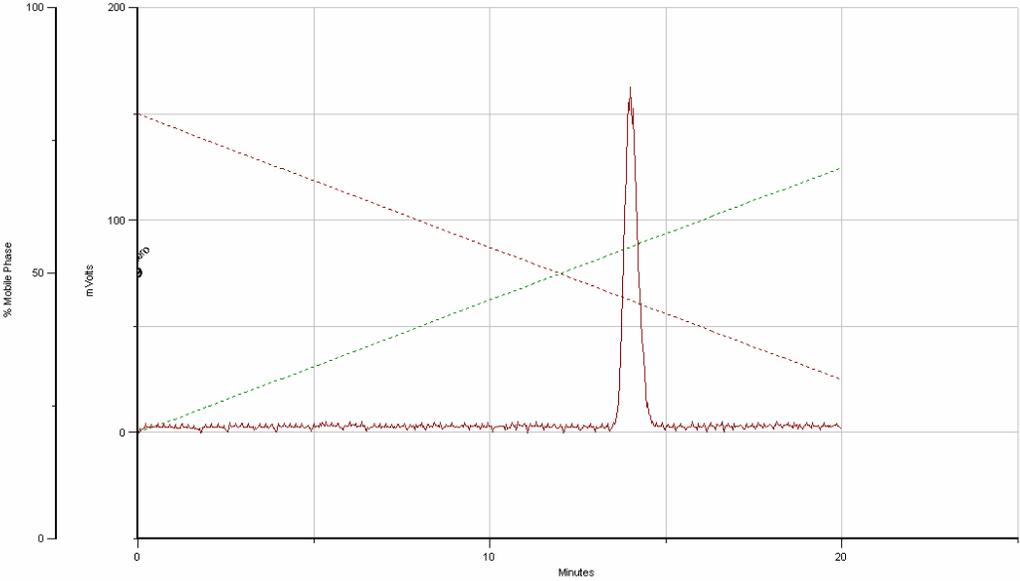
**4-Formil-N,N,N-Trimetilaniilium Triflate**

**4-<sup>18</sup>F-fluorobenzaldehyde**

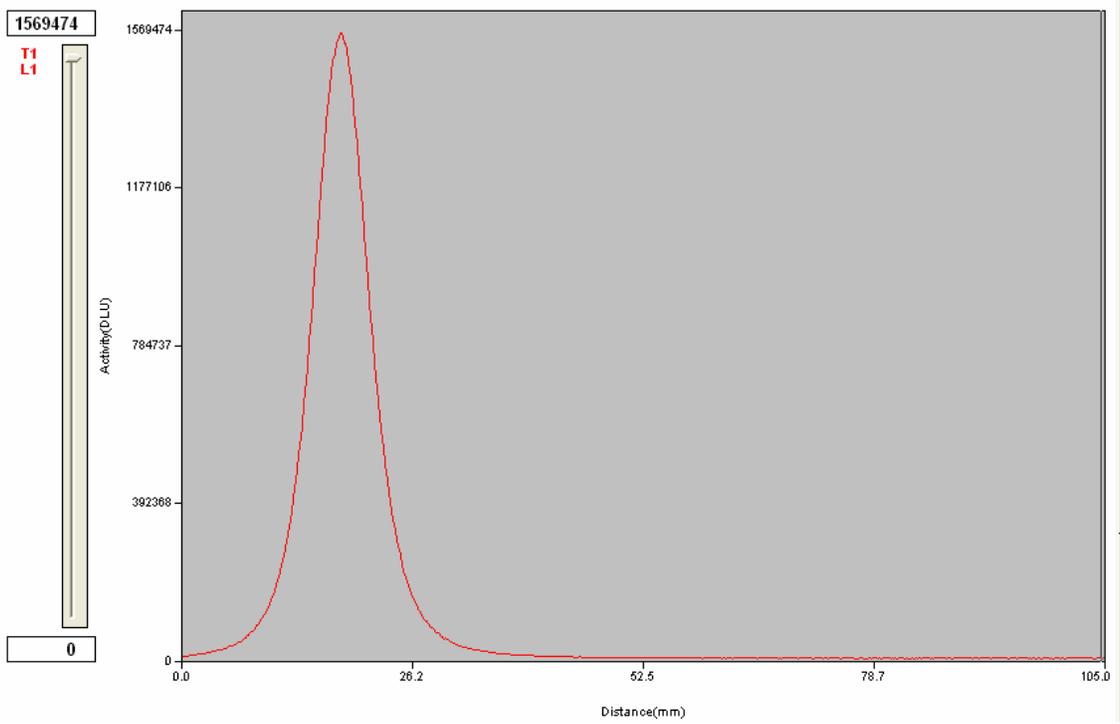
**Figura 5. Procedura analitica per la preparazione multi-steps della [18F]Fluorobenzaldeide**



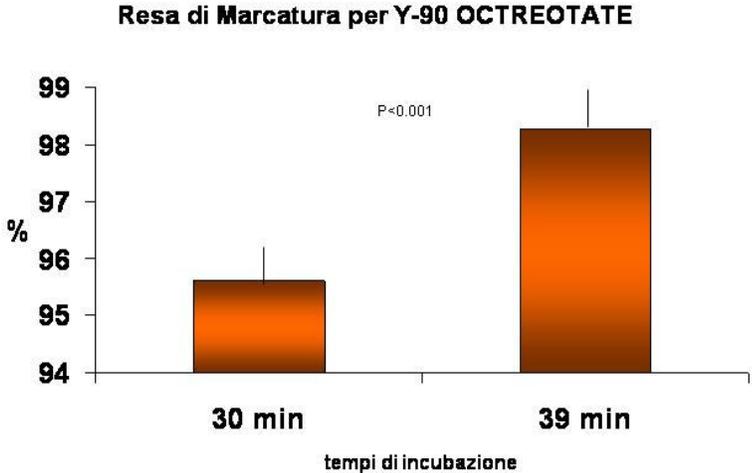
**Figura 6. Controllo di qualità mediante HPLC della [18F]Fluorobenzaldeide**



**Figura 7. Controllo di qualità della [18F]Fluorobenzaldeide mediante Cyclone Plus Storage Phosphor System**



**Figura 8. Resa di marcatura dell'Y-90 OCTREOTATE in funzione del tempo di incubazione**



**Tabella 1**

<b>Methods of purification of [18F]Fluorothymidine by HMCS</b>	<b>Radioactivity yield:</b> <i>9%</i>	<b>Synthesis time (min):30</b>
<b>Methods of purification of [18F]Fluorothymidine by R-HPLC</b>	<b>Radioactivity yield:</b> <i>15%</i>	<b>Synthesis time (min):50</b>
<b>Methods of purification of [18F]Fluorobenzaldehyde by HMCS</b>	<b>Radioactivity yield:</b> <i>32%</i>	<b>Synthesis time (min):50</b>
<b>Methods of purification of [18F]Fluorobenzaldehyde by R-HPLC</b>	<b>Radioactivity yield:</b> <i>65%</i>	<b>Synthesis time (min):70</b>

**HMCS: home-made cartridge automated separation**

**R-HPLC: Radio-HPLC separation method**