

## Imaging

Il cosiddetto *imaging*, spesso anche chiamato più o meno impropriamente *molecular imaging*, è un termine generico che comprende tutte quelle tecniche che possono essere utilizzate per la diagnosi precoce, la caratterizzazione, e il monitoraggio in tempo reale di una patologia oppure per determinare l'efficacia di una terapia (e.g. la risposta alla somministrazione di un farmaco). Più propriamente, la definizione di *molecular imaging* (2007) è la seguente: il *molecular imaging* riguarda la visualizzazione, caratterizzazione e misurazione di processi biologici a livello molecolare o cellulare nell'uomo o in altri organismi viventi. Le tecniche di *imaging* comprendono quelle basate su radionuclidi (medicina nucleare), la risonanza magnetica (MRI), le tecniche ottiche (e.g. fluorescenza), la tomografia computerizzata e l'ecografia (ultrasuoni). La Tomografia Computerizzata, indicata con l'acronimo TC (nota anche come Tomografia Assiale Computerizzata, TAC), è una metodica di diagnostica per immagini ormai impiegata da più di due decenni e utilizza, così come le metodiche radiologiche tradizionali, raggi X. La TC consiste in una particolare applicazione dei raggi X che, grazie ad una valutazione statistico-matematica (computerizzata) dell'assorbimento di tali raggi da parte delle strutture corporee esaminate, consente di ottenere immagini di *sezioni assiali* del corpo umano. La TC può essere considerata una delle innovazioni più importanti nello sviluppo della Radiologia dopo la comparsa dei raggi X, in quanto il suo utilizzo ha permesso di riconoscere lesioni prima difficilmente individuabili. Quasi sempre gli esami TC, in particolare se effettuati a scopo diagnostico, richiedono l'impiego di un mezzo di contrasto, ovvero un farmaco a base di iodio iniettato per via endovenosa.

Allo stato attuale le tecniche di *imaging* più sensibili e che consentono il vero *imaging* a livello molecolare, cioè un *imaging funzionale* (vedi dopo), sono quelle di radio-diagnostica (*radio-imaging*) basate su emissioni di radionuclidi. Bisogna tuttavia sottolineare che la scelta della modalità di *imaging* da utilizzare dipende principalmente dal tipo di problema da investigare (e non secondariamente dal costo e dalla disponibilità degli strumenti).

## Radiofarmaci (*radio-imaging* e radio-immunoterapia)

A seconda delle loro applicazioni mediche, i radiofarmaci possono venire divisi in due grosse categorie, i *diagnostici* e i *terapeutici*.

Le tecniche diagnostiche, cioè di *radio-imaging* (anche dette *nuclear-imaging*), sono la **radioscintigrafia**, spesso meglio nota col termine inglese *Single Photon Emission Computed Tomography*, **SPECT**, e la **tomografia di emissione di positroni** (*Positron Emission Tomography*, **PET**). Negli ultimi 30 anni le tecniche di *radio-imaging* hanno rivoluzionato la pratica clinica, in particolare in cardiologia, neurologia e oncologia. La capacità di SPECT e PET di fornire informazioni funzionali e biochimiche su tessuti, complementari alle mappe anatomiche fornite da altre tecniche di *imaging*, si è dimostrata essenziale nella diagnosi e nella terapia di molte malattie. SPECT e PET hanno la sensibilità necessaria per visualizzare la maggior parte delle interazioni che avvengono tra biomolecole e loro leganti, come ad esempio tra neurotrasmettitori e recettori cerebrali, e sono in grado di determinare concentrazioni addirittura picomolari di specifiche biomolecole.

I **radiodiagnostici** devono ovviamente localizzarsi con la massima selettività possibile nell'organo/tessuto bersaglio. Per poter svolgere questa funzione senza sottoporre l'organismo a un inutile rischio da radiazioni, i nuclidi usati per *imaging* non devono emettere (o il meno possibile) particelle  $\alpha$  o  $\beta$ . I nuclidi utilizzabili per **SPECT** sono **emettitori di radiazioni  $\gamma$** , mentre quelli per **PET** sono **emettitori di positroni,  $\beta^+$** . Sia nella SPECT che nella PET i raggi  $\gamma$  emessi dal nuclide (nella PET dopo annichilazione, vedi dopo) sono registrati dai detector di una  $\gamma$ -camera esterna e il segnale viene poi processato e convertito in un'immagine che identifica la localizzazione del tracciante radioattivo. Gli elementi utilizzabili (tramite uno o più dei loro isotopi) sono riassunti in figura. L'intensità del colore è proporzionale al tempo di semi-vita fisico del/degli isotopi di quell'elemento. In genere i radio-diagnostici per SPECT o PET sono usati a **concentrazioni molto**

**basse**, nell'intervallo  $10^{-6} - 10^{-8}$  M e non ci si aspetta che abbiano alcun effetto farmacologico né rilevante tossicità biologica. Per quanto riguarda l'effetto radio-biologico complessivo, esso dipenderà da molti fattori quali: la possibilità del radionuclide di legarsi a *carrier* biologici, l'assorbimento effettivo da parte dell'organismo e la sua localizzazione, il tipo e l'energia della radiazione emessa, il tempo di emivita biologico (che dipenderà moltissimo dalla speciazione del radionuclide) e radioattivo (cioè fisico), cioè il tempo medio di esposizione dell'organismo a un dato isotopo. Dal punto di vista diagnostico SPECT e PET permettono di individuare lesioni da alcuni centimetri a millimetri a concentrazioni da micro- a nano-molari del tracciante radioattivo. La PET presenta molti aspetti interessanti ed è sicuramente superiore alla SPECT per studi quantitativi. Tuttavia, in termini di logistica, disponibilità, accesso e costo, i radio-farmaci di tipo SPECT sono sicuramente più vantaggiosi. Scanner SPECT di uso preclinico, da usare con piccoli animali, con risoluzione sub-millimetrica ed elevata sensibilità sono ormai commercialmente disponibili ad un costo molto inferiore a scanner PET con caratteristiche comparabili. E' molto probabile che le *performance* della strumentazione SPECT di tipo clinico migliorerà ulteriormente nel futuro prossimo.

1 H Hydrogen		<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Short Half-Life</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PET Isotopes</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SPECT Isotopes</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Long Half-Life</div> </div>																2 He Helium								
3 Li Lithium		4 Be Beryllium																		5 B Boron		6 C Carbon	7 N Nitrogen	8 O Oxygen	9 F Fluorine	10 Ne Neon
11 Na Sodium		12 Mg Magnesium		<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">## E Element</div> Denotes an element with isotopes suitable for both PET and SPECT           <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">## E Element</div> Denotes an element with multiple isotopes with different physical half-lives         </div>																13 Al Aluminum	14 Si Silicon	15 P Phosphorus	16 S Sulfur	17 Cl Chlorine	18 Ar Argon	
19 K Potassium		20 Ca Calcium		21 Sc Scandium	22 Ti Titanium	23 V Vanadium	24 Cr Chromium	25 Mn Manganese	26 Fe Iron	27 Co Cobalt	28 Ni Nickel	29 Cu Copper	30 Zn Zinc	31 Ga Gallium	32 Ge Germanium	33 As Arsenic	34 Se Selenium	35 Br Bromine	36 Kr Krypton							
37 Rb Rubidium		38 Sr Strontium		39 Y Yttrium	40 Zr Zirconium	41 Nb Niobium	42 Mo Molybdenum	43 Tc Technetium	44 Ru Ruthenium	45 Rh* Rhodium	46 Pd Palladium	47 Ag Silver	48 Cd Cadmium	49 In Indium	50 Sn Tin	51 Sb Antimony	52 Te Tellurium	53 I Iodine	54 Xe Xenon							
55 Cs Cesium		56 Ba Barium		57-70 Lanthanides			71 Lu* Lutetium	72 Hf Hafnium	73 Ta Tantalum	74 W Tungsten	75 Re* Rhenium	76 Os Osmium	77 Ir Iridium	78 Pt Platinum	79 Au Gold	80 Hg Mercury	81 Tl Thallium	82 Pb Lead	83 Bi Bismuth	84 Po Polonium	85 At Astatine	86 Rn Radon				
87 Fr Francium		88 Ra Radium		89-102 Actinides			103 Lr Lawrencium	104 Rf Rutherfordium	105 Db Dubnium	106 Sg Seaborgium	107 Bh Bohrium	108 Hs Hassium	109 Mt Meitnerium	110 Ds Darmstadtium	111 Rg Roentgenium	112 Cn Copernicium	113 Uut Ununtrium	114 Fl Flerovium	115 Uup Ununpentium	116 Lv Livermorium	117 Uus Ununseptium	118 Uuo Ununoctium				

\*Isotopes typically used for radiotherapy with which SPECT is also possible but not common — e.g.,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{186}\text{Re}$ , etc. — have been omitted.

I radiofarmaci **terapeutici** sono invece molecole progettate per rilasciare dosi terapeutiche di radiazioni ionizzanti sotto forma di **particelle  $\alpha$  o  $\beta$**  a siti specifici (siti malati), tipicamente tumori. I maggiori ostacoli all'uso di questi radiofarmaci sono la disponibilità di isotopi con caratteristiche adatte per la terapia e – soprattutto – tecniche efficaci per riuscire a localizzarli in specifici tessuti malati. In linea di principio, la capacità di effettuare un trattamento sistemico con opportuni radiofarmaci che siano in grado di localizzarsi specificamente nei tumori potrebbe offrire l'occasione di trattare i tumori metastatici disseminati (obiettivo non raggiungibile con i metodi di irraggiamento esterno e tramite impianto di “semi” radioattivi). In un contesto ideale, i radio-terapeutici dovrebbero essere in grado di accumularsi presso il sito malato fino a raggiungere una concentrazione tale da rilasciare una dose di radiazione citotossica per le cellule tumorali, ed avere una rapida eliminazione (*clearance*) dal sangue e dagli altri organi per minimizzare i danni da radiazione ai tessuti normali.

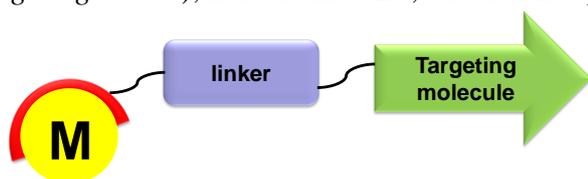
### Caratteristiche generali dei radiofarmaci

Il primo stadio nella sintesi di un radiofarmaco è la produzione del radio-isotopo stesso. I radio-isotopi possono essere ottenuti in tre modi diversi: a) per decadimento di radionuclidi a tempo di semi-vita più lungo in un generatore; b) in un ciclotrone, bombardando un opportuno elemento o

suo composto con particelle cariche accelerate, tipicamente protoni o nuclei di deuterio (deuteroni); c) tramite bombardamento nucleare con neutroni in un reattore nucleare. Una volta generato il nuclide desiderato, esso deve venire purificato dal suo isotopo “padre” e da altri eventuali sottoprodotti della reazione nucleare e quindi isolato in una forma utile prima di essere incorporato in un agente di *imaging*.

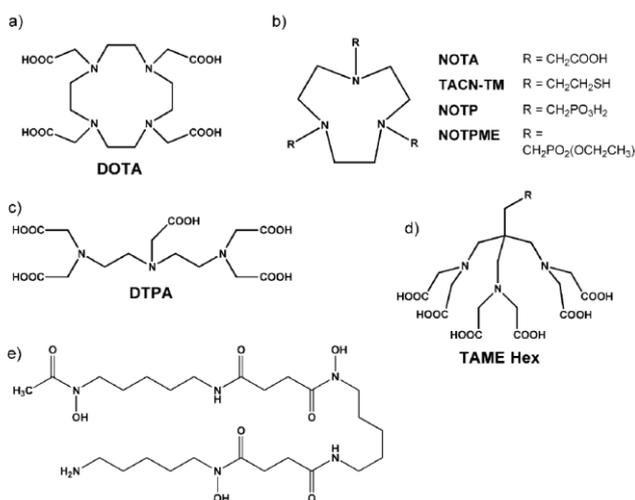
I radionuclidi metallici non vengono quasi mai somministrati come tali, ma coordinati a leganti, molto spesso chelanti polidentati (un’eccezione è quella del  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  che, somministrato come citrato, si lega alla transferrina).

Dal punto di vista del *design*, i radiofarmaci per *imaging* a base di metalli (la maggioranza) possono essere divisi in due gruppi (trascurando i colloidi): **piccoli complessi** (o agenti di perfusione) e **coniugati**. I **complessi** devono avere elevata stabilità termodinamica e cinetica, per evitare reazioni di trans-metallazione, cioè che il metallo vada a legarsi da altre parti, diminuendo la selettività e aumentando il rumore di fondo (e la radio-tossicità). Nuclidi a lunga semi-vita potrebbero anche causare danni biologici. Analogamente si vuole limitare la produzione di metaboliti, soprattutto di quelli marcati col radionuclide. È evidente che la chimica dei radio-nuclidi – per ciascuno stato di ossidazione – è la stessa di quella dell’isotopo stabile, in termini di numeri e geometrie di coordinazione preferiti, proprietà *hard-soft* e così via. È quindi necessario conoscere la chimica di coordinazione di questi ioni per poter ottimizzare la scelta dei loro leganti. Indipendentemente dalla natura del metallo, la sintesi su scala radiochimica presenta numerosi aspetti critici che la differenziano notevolmente dalla sintesi su macro-scala dei complessi con i comuni metalli “cold” (non radioattivi). I **coniugati** si compongono di solito di quattro parti: una *targeting molecule* (o *targeting vector*), il radio-metallo, un chelante per il metallo e un *linker* che permetta di connettere



il chelante con il *targeting vector* (figura). Spesso chelante e *linker* costituiscono una unica molecola, detta chelante bifunzionale. Il *targeting vector* è tipicamente una biomolecola, come un peptide, una proteina, un anticorpo monoclonale, ma può essere anche una molecola più semplice,

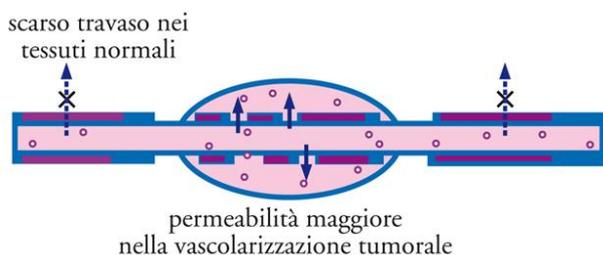
in particolare molecole essenziali per la proliferazione cellulare, come vitamine, nucleosidi, carboidrati, e aminoacidi. Il *targeting vector* deve avere dei recettori specifici, o essere il substrato di processi enzimatici, che siano sovra-espressi nel tessuto di interesse. Ad esempio il recettore del folato, una proteina di membrana sulla superficie cellulare, è sovra-espresso in molti tumori umani. Quindi l’acido folico, opportunamente coniugato con radionuclidi, è un potenziale “cavallo di Troia molecolare” per il trasporto selettivo di agenti diagnostici o terapeutici nelle cellule tumorali. Un altro target biologico molto interessante è la *human thymidine kinase 1* (hTM1), in quanto il livello di hTM1 è molto elevato in numerosi tumori. Quindi la hTM1 è adatta ad essere sfruttata per scopi diagnostici e terapeutici utilizzando (come substrati della hTM1) derivati di timidina e uridina contenenti radionuclidi. I chelanti possiedono di solito almeno 4 atomi donatori (ma spesso anche 6 o più), la cui natura e geometria deve soddisfare le preferenze dello ione metallico. Essi possono essere dei macrocicli o aciclici. Tipicamente i macrocicli offrono maggiore stabilità termodinamica, ma i chelanti polidentati aciclici hanno cinetiche di coordinazione più veloci. Una cinetica lenta di coordinazione del metallo può implicare che, per avere un grado di marcatura elevato in un tempo ragionevole, sia necessario scaldare. Se il *targeting vector* è una piccola biomolecola o un peptide questo di solito non è un problema,



ma lo diventa nel caso di anticorpi che si degradano ad alta temperatura. La figura mostra i più comuni chelanti utilizzati: gli aciclici TAME Hex (tris(aminomethyl)-ethane-N,N',N'',N''',N''''-hexaacetic acid, potenzialmente nonadentato), DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid, esadentato), il siderofooro naturale desferossiamina (DFO, esadentato) e i macrocicli NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid, esadentato), e DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, ottadentato). Come mostrato in figura per il NOTA, anche gli altri possono essere variamente funzionalizzati. Nei leganti tipo NOTA, DOTA e DTPA uno dei gruppi carbossilici può essere utilizzato per la coniugazione con la *targeting molecule*, ad esempio tramite la formazione di un legame amidico (cioè sono già dei chelanti bifunzionali). Ovviamente questo fa diminuire di uno il numero di potenziali gruppi leganti, che può essere un problema per gli ioni più grandi a numero di coordinazione elevato. La formazione di stereoisomeri e di enantiomeri deve essere evitata (o almeno limitata) in quanto essi potrebbero avere diversa biodistribuzione. Il rilascio del radionuclide *in vivo* deve essere evitato, in quanto porterebbe ad una distribuzione incontrollata della radioattività (che farebbe ridurre il contrasto e potrebbe aumentare la radio-tossicità), quindi il chelante deve essere in grado di competere favorevolmente con i leganti e chelanti naturali presenti *in vivo*. Inoltre, in seguito alla coniugazione col frammento radioattivo, la attività biologica e l'affinità della molecola biologicamente attiva (cioè il vettore, la *targeting molecule*) non dovrebbe venire compromessa o alterata. Il chelato col radionuclide è spesso tenuto lontano dalla parte della molecola responsabile del riconoscimento recettoriale proprio nel tentativo di minimizzare possibili interferenze nel *binding* al recettore. Dal punto di vista strutturale si ritiene che tanto più le dimensioni del frammento metallico radioattivo (cioè metallo + leganti ancillari) sono piccole, e tanto meno l'affinità biologica del vettore viene alterata. Questo aspetto è di vitale importanza quando il recettore tollera solo piccole variazioni strutturali della *targeting molecule* (cioè del vettore biologico). Per quanto riguarda il *linker*, esso deve essere stabile in condizioni fisiologiche e deve influenzare il meno possibile sia la capacità coordinativa del chelante che la specificità del *binding vector*. Tipicamente il radio-nuclide viene inserito nell'ultimo stadio della sintesi del coniugato.

La differenza più ovvia ed eclatante rispetto alla sintesi classica è che sintesi e purificazione devono essere condotte in un tempo limitato (determinato dal tempo di semi-vita fisico del nuclide). Molto spesso le procedure scelte dipendono proprio da questo parametro. Un'altra differenza, forse meno ovvia, è la bassissima concentrazione che i radionuclidi hanno nella maggior parte delle reazioni di *radio-labeling*. In genere la concentrazione del radio-nuclide è inferiore di almeno 3 ordini di grandezza (ma spesso anche di più) rispetto a qualsiasi altro reagente nella reazione di marcatura. Questo implica che ci sia normalmente un ampio eccesso di tutti gli altri reagenti, con cinetiche dello pseudo primo ordine rispetto alla concentrazione del radioisotopo. Il vantaggio è che reazioni che in condizioni normali impiegherebbero ore o giorni per andare a completezza su scala macroscopica, possono venire condotte in minuti o secondi con i radioisotopi. Tuttavia, la bassissima concentrazione del radionuclide nelle reazioni di radio-sintesi implica che qualsiasi potenziale impurezza, in particolare altri metalli che potessero competere col radio-metallo in oggetto, diventa un grosso problema. Dal punto di vista analitico, la produzione di quantità così piccole di prodotto marcato pone ovviamente dei problemi. Per esempio, le tipiche tecniche di caratterizzazione come l'NMR non sono utilizzabili. I radiofarmaci vengono solitamente caratterizzati usando HPLC, TLC o GC con radio-detector in combinazione con spettrometria di massa. Se è disponibile un analogo composto *cold*, la co-eluzione in HPLC è sufficiente a stabilire identità e purezza del composto marcato.

E' ovviamente necessario, o almeno desiderabile, che il radioisotopo, nella forma in cui viene somministrato, venga assorbito quanto più selettivamente possibile dal suo organo/tessuto bersaglio o dai tumori. I tessuti tumorali, a causa del loro metabolismo alterato e spesso accelerato, sono in grado di accumulare certi composti inorganici. Possibili elementi di selettività, sui quali si può operare per il *targeting* specifico dei tumori solidi, sono: il già citato effetto EPR, *Enhanced Permeability and Retention* (figura), variazioni locali di pH e  $pO_2$  (i tumori solidi hanno tipicamente



pH inferiore ai tessuti sani e sono ipossici), variazioni nel metabolismo cellulare, variazioni delle concentrazioni di recettori di membrana.

I piccoli complessi e i coniugati si differenziano anche notevolmente per la bio-distribuzione: per i complessi essa dipende solo dalle caratteristiche chimico-fisiche del composto e si parla quindi di

agenti di perfusione (*perfusion agents*), per i coniugati invece essa è determinata dall'affinità tra la *targeting molecule* e il suo specifico recettore.

È chiaro che il radio-nuclide che si sceglie dipende innanzitutto se è per SPECT o PET, ma una volta che la tecnica sia stata scelta è molto importante che il tempo di semi-vita fisico del radionuclide sia compatibile col tempo di semi-vita biologico del radiofarmaco che lo contiene. Per esempio  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  non vanno bene per marcare anticorpi, perché il radionuclide decadrebbe in modo molto significativo prima che l'anticorpo raggiunga la sua concentrazione ottimale sul *target* (cioè ha un tempo di semi-vita biologico lungo). Viceversa i nuclidi con tempo di semi-vita fisico breve vanno bene per gli agenti di perfusione, che hanno biodistribuzione veloce.

## SPECT

La radioscintigrafia (*Single Photon Emission Computer Tomography*, **SPECT**) utilizza nuclidi che emettano (possibilmente) solo radiazioni  $\gamma$  e l'energia della radiazione emessa deve essere preferenzialmente fra 100 e 250 keV, la regione meglio accessibile ai contatori di scintillazione e quindi più adatta all'uso dei detector esterni. La tabella riporta le caratteristiche dei principali radionuclidi metallici usati nella SPECT.

Table 2. Physical Properties of Some Common SPECT Radiometals<sup>a</sup>

isotope	half-life/h	source	production reaction	decay mode (% branching ratio)	$E_\gamma/\text{keV}$	abundance, $I_\gamma/\%$	relevant oxidation states	common coordination numbers	
$^{67}\text{Ga}$	78.2	cyclotron	$^{nat}\text{Zn}(p,x)^{67}\text{Ga}$	$e^-$ (100)	91.265(5)	3.11(4)	3+	4, 5, 6	
			$^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$		93.310(5)	38.81(3)			
					184.576(10)	21.410(10)			
					208.950(10)	2.460(10)			
					300.217(10)	16.64(12)			
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.0	generator	$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	$\beta^-$ (0.0037) IT (99.9963)	140.511(1)	89.06	1- to 7+	4, 5, 6	
						393.527(10)			4.56(24)
$^{111}\text{In}$	67.3	cyclotron	$^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$	$e^-$ (100)	171.28(3)	90.7(9)	3+	5, 6, 7, 8	
						245.35(4)			94.1(10)

<sup>a</sup>Unless otherwise stated, standard deviations are given in parentheses (IT = isomeric transition;  $e^-$  = electron capture).<sup>208</sup>

Finora, nella radiodiagnostica sono stati usati principalmente questi tre isotopi:

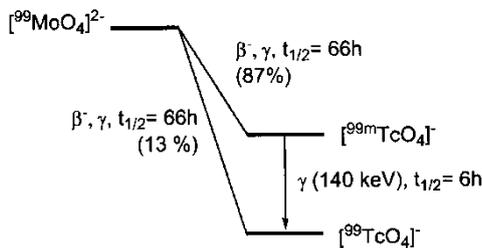
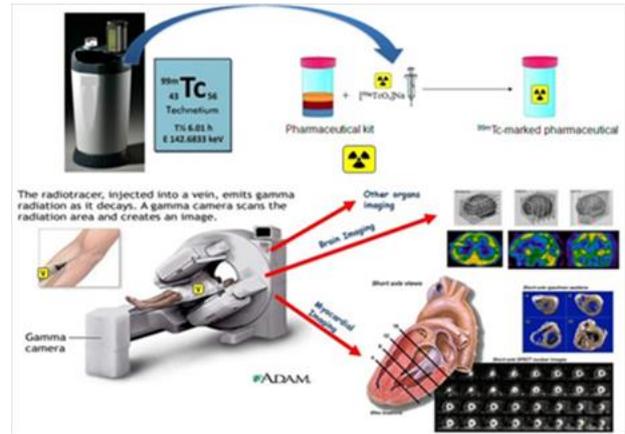
$^{131}\text{I}$  (tempo di emivita 8 d), soprattutto come ioduro, è selettivo esclusivamente per la ghiandola tiroidea;

$^{67}\text{Ga}$  (tempo di emivita 78 h), principalmente come citrato di Ga(III), che idrolizza lentamente, viene trasportato nell'organismo dalla transferrina ed è usato per la diagnosi di tumori;

$^{99\text{m}}\text{Tc}$  (tempo di emivita 6 h), sotto forma di numerosi complessi, viene usato su larga scala per l'*imaging* di numerose regioni del corpo umano (vedi dopo).

## Radiodiagnostici di tecnezio

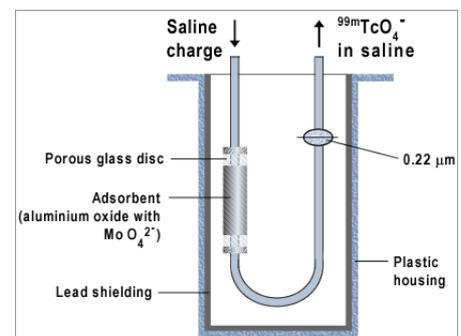
Dal punto di vista quantitativo, i radio-diagnostici di gran lunga più usati in SPECT sono quelli a base di tecnezio, con una fetta di mercato superiore all'80%. Per questo il tecnezio viene definito il "cavallo da soma" (*workhorse*) dei radiofarmaci (si valuta che venga usato in più di 25 milioni di analisi all'anno, più di 19 milioni nei soli USA nel 2007). Il tecnezio non è un elemento naturale, in quanto il suo isotopo più stabile ( $^{98}\text{Tc}$ , tempo di emivita di 4 milioni di anni) non è il prodotto di alcuna serie di decadimento radioattivo e quindi tutto il tecnezio prodotto all'inizio dell'universo è ormai scomparso. Tuttavia l'isotopo  $\beta$ -emettitore  $^{99}\text{Tc}$  relativamente stabile (emivita 210.000



anni) è uno dei prodotti di fissione (6%) dell'uranio. In medicina nucleare si usa il  $^{99}\text{Tc}$  in uno **stato nucleare eccitato**, come isotopo metastabile  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , che è un puro  $\gamma$ -emettitore, con un tempo di emivita molto conveniente di 6 h e una energia di emissione di 140 keV, cioè nell'intervallo utile per la rilevazione e non pericoloso. In aggiunta, l'isotopo figlio, il  $^{99}\text{Tc}$ , è un puro  $\beta$ -emettitore che non disturba la rilevazione  $\gamma$ . Uno dei maggiori

vantaggi di questo isotopo, e motivo del suo largo impiego in campo medico, consiste nel fatto che esso può venire facilmente ottenuto tramite dei generatori portatili sfruttando il decadimento del  $^{99}\text{Mo}$  (figura). Questo nuclide "padre" decade a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  con un tempo di emivita di 66 h, molto conveniente per consentire il suo trasporto in luoghi lontani da quello di produzione e programmare la produzione del tecnezio radioattivo per uso clinico. Il  $^{99}\text{Mo}$  può essere generato bombardando con neutroni l'isotopo non radioattivo del molibdeno  $^{98}\text{Mo}$  (reazione  $n,\gamma$ ), quindi in un reattore nucleare non in un ciclotrone. Ma più comunemente il  $^{99}\text{Mo}$  viene estratto dai prodotti di fissione dei reattori nucleari, cioè deriva dal bombardamento di  $^{235}\text{U}$  con neutroni, e viene trasformato in molibdato,  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ . Il molibdato viene caricato su una colonna di allumina che viene eluita con soluzione salina. Il pertechnetato,  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ , risultante dal decadimento del  $^{99}\text{Mo}$  è monoanionico e viene trattenuto meno fortemente dall'allumina e quindi facilmente separato dal molibdato dianionico  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$  che è ritenuto in colonna.

Il pertechnetato stesso, che è un anione grande come lo ioduro, può essere usato per l'*imaging* della tiroide. Tuttavia normalmente, per la maggior parte delle applicazioni, si richiede la riduzione da Tc(VII) ad uno stato di ossidazione inferiore, da +5 a +1, che deve essere effettuata in presenza di opportuni chelanti che vadano a complessare selettivamente e stabilmente lo ione ridotto. I chelanti devono essere molto efficienti e selettivi, in modo da formare il radiofarmaco in alta resa (> 95%) anche a bassa concentrazione di legante, come una singola specie pronta per essere iniettata (possibilmente senza ulteriori stadi di purificazione). Come riducenti si usano solitamente composti di Sn(II), non tossici come i corrispondenti prodotti di ossidazione di Sn(IV). Bisogna sempre ricordare che la chimica per arrivare al prodotto iniettabile deve essere relativamente semplice, deve avvenire in condizioni fisiologiche, deve essere selettiva e veloce ed usare eventuali reagenti non tossici. L'ideale è che i complessi (per la perfusione) o i bioconiugati possano venire preparati tramite una semplice formulazione *one-pot* e *one-step* in soluzione acquosa salina, adatta ad essere utilizzata in kit anche da non-chimici (metodo cosiddetto "*shake and bake*").



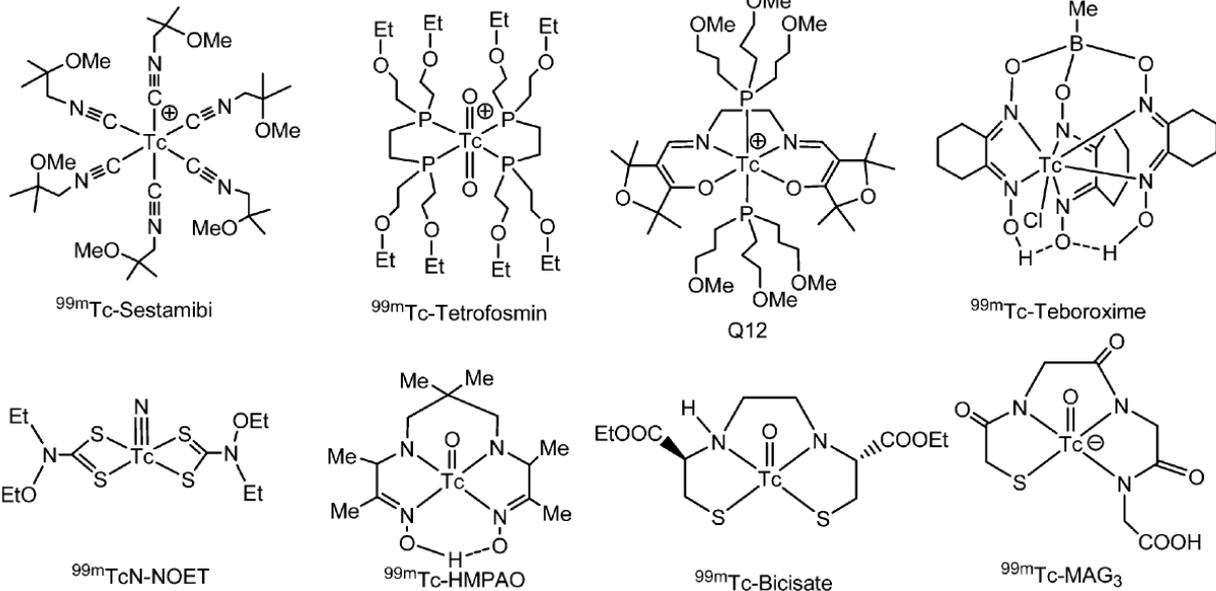
Gli atomi donatori nei chelanti, per ottenere addotti stabili e inerti, dipenderanno dallo stato di ossidazione del tecnezio: si va da Tc(VII) molto *hard* a Tc(I) decisamente *soft*. Gli stati di ossidazione più studiati sono stati Tc(V), dove il centro metallico ha configurazione elettronica  $d^2$  e tipicamente forma complessi pentacoordinati con geometria di piramide a base quadrata caratterizzati del gruppo  $\{Tc=O\}^{3+}$ , oppure complessi esacoordinati ottaedrici con il gruppo trans  $\{O=Tc=O\}^+$ . Molto spesso si sono utilizzati dei chelanti tetradentati per i siti di coordinazione rimanenti. È anche possibile trasformare il gruppo  $\{Tc=O\}^{3+}$  nel corrispondente nitruro  $\{Tc\equiv N\}^{2+}$ , ma i passaggi sintetici aggiuntivi rendono questo approccio inadatto per essere eventualmente trasformato in un kit. Meno studiato è stato il Tc(III),  $d^4$ , mentre in anni recenti è stato molto studiato il Tc(I),  $d^6$  basso spin, che si presenta quasi sempre con il frammento organometallico molto stabile *fac*- $[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ . Il catione, molto lipofilo, si ottiene in un unico stadio in soluzione fisiologica dal pertechnetato: i 3 CO sono fortemente coordinati e le 3 molecole d'acqua possono essere facilmente sostituite da chelanti tridentati facciali, che possono servire per la coniugazione a bio-molecole.

La grande sfida per i chimici di coordinazione che operano in questo settore è quella di sviluppare nuovi leganti, appositamente progettati per portare selettivamente il  $^{99m}Tc$  in particolari organi (ad esempio leganti non polari potrebbero permettere il superamento della barriera emato-encefalica e permettere l'*imaging* selettivo del cervello) o tessuti (e.g. i tumori) o in precisi processi fisiologici.

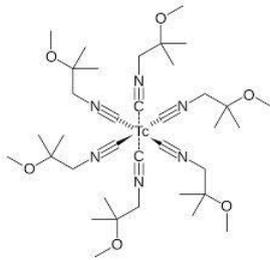
Un ulteriore grosso vantaggio del tecnezio è che le sue proprietà dal punto di vista chimico e chimico-fisico sono molto simili a quelle del renio, il metallo più pesante nello stesso gruppo, il cui isotopo principale è stabile. Quindi la chimica sviluppata per il renio *cold* può venire trasferita al tecnezio *hot* (e viceversa), utilizzando il cosiddetto principio del *matched pair*. Come vedremo ci sono degli isotopi radioattivi del renio che possono essere usati per radio-terapia, cioè è idealmente possibile sviluppare in parallelo agenti diagnostici e terapeutici.

### **Radiofarmaci di tecnezio di prima generazione**

I principali radiofarmaci di  $^{99m}Tc$  cosiddetti "di prima generazione", tutti piccoli complessi di coordinazione ( $MW < 2000$ ), sono riportati in figura. Sono tutti classificati come agenti di perfusione. La loro bio-distribuzione e capacità di localizzazione in un particolare organo o tessuto dipendono esclusivamente dalla loro forma, dimensione, carica e lipofilità, cioè si localizzano in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche. Oltre al  $^{99m}Tc$ -sestamibi che verrà trattato a parte, ricordiamo i complessi  $^{99m}Tc$ -teboroxime (Cardiotec) e  $^{99m}Tc$ -tetraformin (Myoview) per l'*imaging* cardiaco, il  $^{99m}Tc$ -bicisate (Neurolite) come agente di perfusione cerebrale,  $^{99m}Tc$ -gluceptate (Glucoscan) e  $^{99m}Tc$ -mertiatide (Technescan MAG3) per l'*imaging* dei reni. Complessi polimerici inerti di  $^{99m}Tc$  con leganti difosfonati,  $^{-2}O_3P-CR_2-PO_3^{2-}$  ( $R = H, CH_3, OH$ ), non in figura, sono risultati particolarmente utili per l'*imaging* del tessuto osseo, presumibilmente perché i leganti bifunzionali fosfonati (simili ai polifosfati) si possono legare da una parte al tecnezio e dall'altra ai cristalli di idrossiapatite delle ossa.

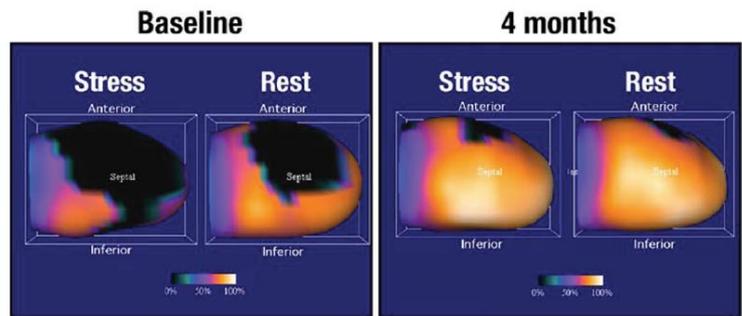


### $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi



Il  $^{99m}\text{Tc}$ -hexakis(2-methoxy-2-methylpropyl)nitrile ( $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi) è attualmente l'agente di *imaging* di gran lunga più usato a livello mondiale. È un complesso notevolmente semplice, formato da un nucleo di  $^{99m}\text{Tc}$ (I),  $d^6$  basso spin e quindi coordinativamente inerte, circondato in geometria ottaedrica da sei leganti isonitrile uguali. Essendo lipofilo e con

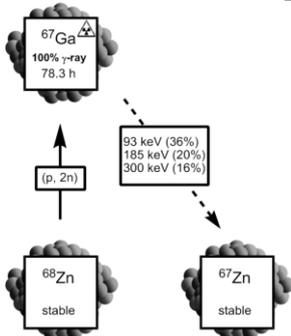
carica +1 il complesso penetra facilmente la membrana mitocondriale, dove si accumula a causa della carica negativa presente nella matrice interna dei mitocondri. Il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi ha tre principali applicazioni cliniche. La prima, e di gran lunga più comune, è quella per l'*imaging* cardiaco. A causa della sua localizzazione mitocondriale, l'*uptake* del radiofarmaco nel miocardio è direttamente proporzionale al flusso sanguigno nell'organo. La figura mostra la parte anteriore di un miocardio poco dopo un infarto (la zona nera significa assenza di perfusione) e dopo 4 mesi, con una situazione ischemica notevolmente migliorata. Il  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi viene anche impiegato nella diagnostica di tumori, in particolare per il tumore al seno. La terza applicazione riguarda l'*imaging* della tiroide, in particolare per l'identificazione e localizzazione di adenomi.



### Radiodiagnostici di gallio

Per SPECT si utilizza l'isotopo  $^{67}\text{Ga}$  ( $Z = 31$ ) che decade all'isotopo stabile  $^{67}\text{Zn}$  ( $Z = 30$ ) per cattura di elettroni (in pratica un protone si trasforma in neutrone) emettendo esclusivamente fotoni

$\gamma$  di varie energie con un tempo di semi-vita sufficientemente lungo ( $t_{1/2} = 78.3$  h) da consentire che venga consegnato anche a grandi distanze dal luogo di produzione. Il  $^{67}\text{Ga}$  viene prodotto in un ciclotrone da un isotopo stabile dello zinco tramite la reazione  $^{68}\text{Zn}(p, 2n)^{67}\text{Ga}$  (figura). Il gallio ha come unico stato di ossidazione stabile  $\text{Ga}^{3+}$ , è relativamente *hard* e tipicamente preferisce legarsi con geometria ottaedrica a leganti polidentati aventi anche atomi di ossigeno anionici come donatori; altri atomi donatori possono essere sia S che N. Essendo piuttosto piccolo (raggio ionico 0.62 Å, molto simile al  $\text{Fe}^{3+}$ ), lo ione  $\text{Ga}^{3+}$  forma addotti più



stabili con macrocicli più piccoli, tipo NOTA, che con DOTA. Le principali applicazioni del  $^{67}\text{Ga}$ , somministrato come semplice sale citrato, sono l'*imaging* di processi infiammatori e di tumori. Dal momento che nella tecnica PET si può usare anche l'isotopo  $^{68}\text{Ga}$  (vedi dopo), c'è il vantaggio che la chimica sviluppata per un isotopo vale anche per l'altro (senza dimenticare però che il  $^{68}\text{Ga}$  ha un tempo di vita molto più breve, ca. 68 min). Un altro vantaggio è che il gallio appartiene alla cosiddetta "famiglia degli ioni 3+", tutti tipicamente *hard* e con chimica abbastanza simile: Ga, In, Y e Lu.

- Indio: come il gallio, lo stato di ossidazione 3+ è l'unico stabile in acqua e la sua chimica di coordinazione è simile a quella del  $\text{Ga}^{3+}$ . Tuttavia, rispetto a  $\text{Ga}^{3+}$  il catione  $\text{In}^{3+}$  è più grande, ha un  $\text{pK}_a$  maggiore e ha cinetiche di scambio dei leganti più veloci (è più labile). Di conseguenza,  $\text{In}^{3+}$  si lega volentieri anche a gruppi più *soft* come i tiolati. Nella pratica, la maggior parte dei bio-coniugati marcati con  $^{111}\text{In}$  (SPECT) usano come chelante DTPA o DOTA.
- Yttrio: anche per questo elemento lo stato di ossidazione biologicamente rilevante è 3+. Tuttavia il catione  $\text{Y}^{3+}$  è molto più grande sia di  $\text{Ga}^{3+}$  che di  $\text{In}^{3+}$  e di conseguenza preferisce numeri di coordinazione più elevati, tipicamente 8 o anche 9. Nonostante le grosse dimensioni, lo ione  $\text{Y}^{3+}$  ha caratteristiche *hard* e quindi per la sua chelazione si utilizzano leganti con atomi di ossigeno anionici. Se un legante offre meno di otto atomi donatori, la sfera di coordinazione dello ione sarà completata da leganti esogeni, tipicamente molecole d'acqua. L'isotopo  $^{86}\text{Y}$  si usa nella PET, mentre  $^{90}\text{Y}$  in radio-immunoterapia (vedi dopo). Considerazioni analoghe valgono per il lutezio e altri radionuclidi dei lantanidi.

Da notare che, per quanto riguarda la tossicità che si può avere nel caso i radionuclidi escano dai loro chelanti,  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{111}\text{In}$  tendono a localizzarsi nel fegato e nei polmoni a causa della loro grande affinità per la transferrina, che li lega (e può in effetti competere con il chelante del radiofarmaco), mentre  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  e gli altri lantanidi si depositano rapidamente nel tessuto osseo (generando una dose di radioattività intollerabile al midollo osseo).

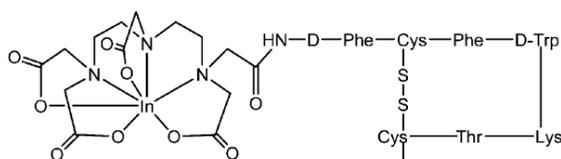
### Radio-diagnostici target-specifici (radioimmuno-scintigrafia)

I radiodiagnostici SPECT di seconda generazione (5 o 6, al momento) sono tutti del tipo target-specifico, in cui cioè il radionuclide è coniugato, tramite un chelante bifunzionale, a un *targeting vector* con elevata affinità per uno specifico recettore.

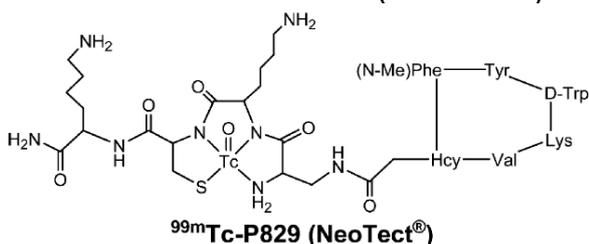
Tipici *targeting vectors* per i radionuclidi sono anticorpi monoclonali, o loro frammenti, che riconoscono proteine sulla superficie di cellule tumorali (e.g. proteine sovra-esprese da tali cellule), e quindi permettono di combinare assieme una metodologia di rilevazione molto sensibile con un meccanismo di trasporto specifico (radioimmuno-scintigrafia).

Anche i peptidi, o peptido-mimetici, vengono attivamente investigati come potenziali *Trojan horse molecolari* per veicolare radionuclidi. Peptidi naturali regolano numerose funzioni fisiologiche nel

corpo umano: essi possono agire come ormoni, neurotrasmettitori e fattori di crescita. Inoltre, è noto che alcuni peptidi sono associati a condizioni patologiche. Tali peptidi normalmente presentano elevata affinità per i loro corrispondenti recettori. Di conseguenza, radioconiugati di piccoli peptidi sono potenzialmente molto promettenti. Tuttavia, piccoli peptidi presentano normalmente un breve tempo di emivita biologico in quanto vengono rapidamente degradati da peptidasi e proteasi endogene. Nel caso i peptidi siano coniugati con un radioisotopo, la degradazione può portare ad una distribuzione incontrollata della radioattività nei tessuti sani e/o a un basso livello di *uptake* da parte del tumore. Quindi, oltre alla stabile



$^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotide (OctreoScan®)



$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -P829 (NeoTect®)

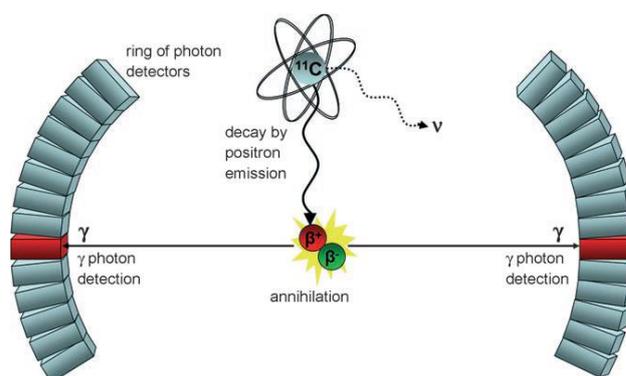
tessuti sani e/o a un basso livello di *uptake*

incorporazione del radionuclide nel peptide, la stabilizzazione del peptide con metodi chimici è di importanza cruciale per lo sviluppo di radiofarmaci di questo tipo. La stabilizzazione del peptide può essere ottenuta in diversi modi, ad esempio tramite la sostituzione di legami peptidici con altri legami, con l'uso di D- o  $\beta$ -aminoacidi, o tramite ciclizzazione. La figura riporta due esempi di coniugati di piccoli peptidi con radionuclidi per analisi SPECT disponibili commercialmente. Sono entrambi usati per la diagnosi di **tumori endocrini** che sovra-esprimono il recettore per la somatostatina (vedi dopo il coniugato col  $^{68}\text{Ga}$  nella PET).

Contrariamente a quanto si pensava inizialmente, i radionuclidi metallici e i loro chelanti influiscono su molte proprietà dei *targeting vectors* non solo dal punto di vista strutturale ma anche di importanti parametri chimico-fisici, come idrofilia/lipofilia e carica complessiva. L'aggiustamento fine di tali parametri ha spesso un'influenza rilevante sulle capacità di *targeting* del bioconiugato e sui tempi e modi della sua escrezione. Ad esempio, frammenti idrofili favoriscono la rapida escrezione del radiofarmaco con l'urina, evitando l'accumulo di radioattività nel fegato e nei reni.

## Tomografia di emissione di positroni (*Positron Emission Tomography, PET*)

La **tomografia di emissione di positroni** (*Positron Emission Tomography, PET*) utilizza radionuclidi che decadono con emissione di positroni, cioè particelle  $\beta^+$ . Queste particelle riescono a percorrere una distanza molto breve dal nucleo emittente (da 0.5 a 2 cm, a seconda della loro energia) e quando collidono con un elettrone nel tessuto circostante si ha il fenomeno di **annichilamento**, con generazione di due raggi  $\gamma$  che viaggiano in direzioni opposte con energia di 511 eV e che possono essere misurati con precisione da un sistema di detector esterni (figura). L'acquisizione di un gran numero di questi eventi (milioni!) permette di ricostruire un'immagine con informazioni sulla distribuzione spaziale della radioattività in funzione del tempo. Data la sua elevata sensibilità, al contrario di MRI, CT e ultrasuoni che forniscono essenzialmente immagini anatomiche molto

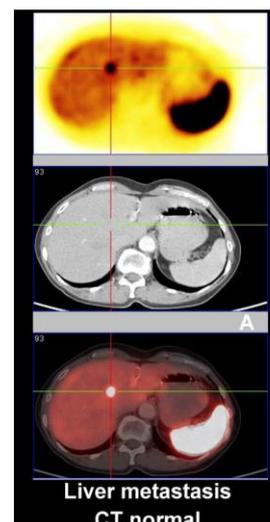


dettagliate (*imaging strutturale*), la PET (così come la SPECT) è in grado di misurare alterazioni chimiche che avvengono prima che una malattia si manifesti tramite segni anatomici macroscopici, consentendo – in linea di principio – una diagnosi super-precoce. Infatti, gli esperimenti PET forniscono informazioni su processi metabolici, su interazioni enzima/recettore e su meccanismi biochimici nei tessuti viventi (*imaging molecolare o funzionale*). In genere la PET ha migliore sensibilità e risoluzione rispetto alla SPECT e sta diventando più utilizzata in clinica. La PET viene estesamente usata in oncologia, per la diagnosi dei tumori e la localizzazioni delle metastasi monitorando l'accumulo e il metabolismo di certi radiofarmaci PET nei tumori. In neurologia la PET viene usata per la caratterizzazione di disturbi neurologici (e.g. sindromi di Alzheimer e di Parkinson) in stadi molto precoci, attività anomala dei neurotrasmettitori, danni causati da ictus e così via. In campo cardiologico viene usata per visualizzare la perfusione del miocardio e come strumento per la diagnosi e la caratterizzazione di patologie alle coronarie. In futuro, la PET svolgerà un ruolo sempre più importante nello sviluppo di nuovi farmaci e nella personalizzazione delle terapie farmacologiche, consentendo di visualizzare e quantificare la bio-distribuzione di un farmaco *in vivo*.

Un grosso passo avanti nella tecnologia degli scanner è stata l'integrazione in un unico strumento di PET e CT. La combinazione **PET/CT** permette di ottenere e confrontare direttamente le dettagliate immagini anatomiche fornite dalla CT con le informazioni di tipo funzionale fornite dalla PET. Un esempio è fornito in figura, dove la CT da sola (centro) non individua la metastasi al fegato.

Per ottenere queste informazioni è quindi necessario preparare delle molecole che contengano almeno un nuclide che emetta positroni (*PET probes*). I principali nuclidi che possono essere sfruttati per la tecnica PET sono elencati in tabella. Essi comprendono  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$  e  $^{15}\text{O}$ , cioè i normali costituenti delle molecole bio-organiche e, contrariamente alla SPECT, relativamente pochi metalli (ma si veda anche la specifica tabella sui nuclidi metallici più avanti). Con l'eccezione del  $^{68}\text{Ga}$ , che viene prodotto per decadimento del  $^{68}\text{Ge}$  con generatori tipo quelli per il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , tutti gli altri nuclidi emettitori di positroni possono venire prodotti con un **ciclotrone**, bombardando un opportuno composto con protoni o con deuteroni accelerati.

Il vantaggio di poter utilizzare nuclei come C, N e O è che, in linea di principio, si possono sintetizzare radiofarmaci che sono chimicamente indistinguibili dalle loro controparti non-radioattive. Cioè radiofarmaci contenenti questi nuclei hanno le stesse proprietà chimico-fisiche e biochimiche dei composti non marcati. Quindi, in linea di principio, è possibile marcare direttamente le molecole o biomolecole di interesse senza interferire con la loro attività biologica. Al contrario, soprattutto nei casi in cui il radioisotopo è un metallo che necessita di uno specifico



**Table 1. Physical Properties of Commonly Used Positron-Emitting Radionuclides**

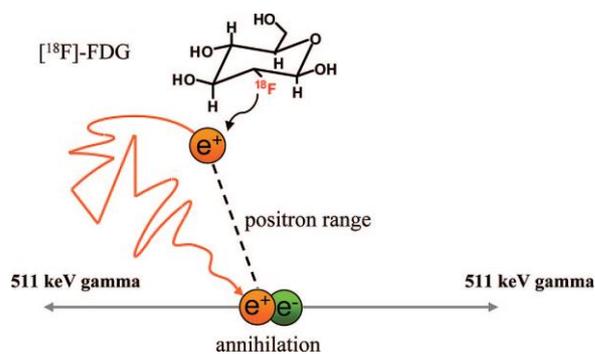
nuclide	half-life (min)	maximum energy (MeV)	mode of decay (%)	theoretical specific activity (GBq/ $\mu\text{mol}$ )
$^{18}\text{F}$	110	0.64	$\beta^+$ (97%) EC <sup>a</sup> (3%)	$6.3 \times 10^4$
$^{11}\text{C}$	20.3	0.97	$\beta^+$ (99%)	$3.4 \times 10^5$
$^{13}\text{N}$	10	1.20	$\beta^+$ (100%)	$7.0 \times 10^5$
$^{15}\text{O}$	2	1.74	$\beta^+$ (100%)	$3.4 \times 10^6$
$^{76}\text{Br}$	972	4.0	$\beta^+$ (57%) EC (43%)	$7.2 \times 10^3$
$^{124}\text{I}$	60 192	2.14	$\beta^+$ (25%) EC (75%)	$1.15 \times 10^3$
$^{68}\text{Ga}$	68.1	1.90	$\beta^+$ (89%) EC (11%)	$1.02 \times 10^5$
$^{64}\text{Cu}$	762	0.655	$\beta^+$ (19%) EC (41%) $\beta^+$ (40%)	$9.13 \times 10^3$

<sup>a</sup> EC: electron capture.

caratteristiche steriche della molecola, ma quelle elettroniche e chimiche si. A volte questo può essere un vantaggio, come si vedrà fra poco.

Tra tutti i nuclidi utilizzabili per la sintesi di radiofarmaci PET, il fluoro-18 è quello con le proprietà fisiche più favorevoli: 1) ha un ottimo profilo emissivo, con il 97% di emissione di positroni; 2) l'energia relativamente bassa dei positroni emessi (0.63 MeV) si traduce in una migliore risoluzione dell'*imaging* (il percorso del positrone è il più corto, mediamente 2.3 mm in acqua); 3) il suo tempo di semivita (110 min) è sufficientemente lungo da permettere dei processi di

chelante (vedi SPECT), la cosiddetta *imaging "handle"*, cioè la parte che funge da reporter, può essere un frammento relativamente grande che, come già detto, una volta attaccato alla molecola *targeting*, ne può alterare o modificare l'attività biologica. Mentre la sostituzione di  $^{12}\text{C}$  o  $^{14}\text{N}$  rispettivamente con  $^{11}\text{C}$  o  $^{13}\text{N}$  è una **sostituzione isotopica**, l'inserimento di  $^{18}\text{F}$  normalmente non lo è, in quanto di solito le biomolecole non contengono atomi di fluoro. Tuttavia, la sostituzione di un atomo di H o di un gruppo idrossile con un atomo di fluoro è una delle più comuni **sostituzioni bio-isosteriche**: cioè non cambiano le



sintesi relativamente complessi, tempi di indagine *in vivo* più lunghi e, molto importante, da consentire la distribuzione ai centri di medicina nucleare che non possiedono la strumentazione necessaria alla produzione di  $^{18}\text{F}$ . Gli esempi più rappresentativi di molecole sostituite con  $^{18}\text{F}$  utilizzate come probe per PET sono la 6- $^{18}\text{F}$ -fluoro-3,4-dihydroxyphenylalanine ( $^{18}\text{F}$ 6-Fluoro-L-DOPA), utilizzata per “vedere” il metabolismo cerebrale della dopamina e localizzare tumori neuroendocrini, e il 2- $^{18}\text{F}$ -fluoro-desossi-D-glucosio ( $^{18}\text{F}$ FDG), utilizzato per monitorare il metabolismo del glucosio. Senza dubbio  $^{18}\text{F}$ FDG (figura) è il radiofarmaco PET di maggior successo clinico e commerciale. Il  $^{18}\text{F}$ FDG si comporta *in vivo* similmente al glucosio: il trasportatore del glucosio lo trasporta dal plasma al tessuto, dove viene fosforilato da un enzima (esochinasi) per dare il  $^{18}\text{F}$ FDG-6-fosfato. Il successivo metabolismo del  $^{18}\text{F}$ FDG-6-fosfato è tuttavia inibito perché l'atomo 2-O del glucosio è stato sostituito da un atomo di  $^{18}\text{F}$ , e quindi il composto non viene degradato enzimaticamente ma si accumula nelle cellule in funzione del trasporto sangue-tessuti e dell'attività dell'esochinasi dando quindi un'immagine del metabolismo “energetico”. Le informazioni ottenute vengono quindi sfruttate per identificare e caratterizzare quelle patologie che comportano alterazioni nel metabolismo del glucosio. Per esempio, numerosi studi sperimentali e clinici hanno dimostrato che l'*uptake* di FDG nelle cellule tumorali (che hanno livelli di glicolisi aumentati rispetto a quelle sane) correla con la velocità di crescita del tumore e con il grado di sviluppo di metastasi. Quindi il  $^{18}\text{F}$ FDG è un potente agente di *imaging* per localizzare un tumore, le metastasi e per determinare la loro risposta alla terapia. Se la marcatura del glucosio avvenisse con  $^{11}\text{C}$  o  $^{15}\text{O}$ , producendo un'esatta replica della molecola, questa procederebbe nelle trasformazioni del ciclo di Krebs generando molti metaboliti marcati che sarebbero difficilmente differenziabili in uno scan PET.

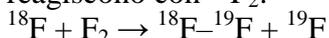
Non bisogna tuttavia dimenticare che il tempo di semivita fisico del radionuclide usato per marcare il *PET probe* deve anche essere commensurato al processo biologico che si vuole studiare. Il nucleo di  $^{11}\text{C}$ , con un tempo di semivita nucleare di soli 20.3 min, è particolarmente adatto per marcare composti con tempo di vita biologico molto breve. Rispetto ai composti contenenti  $^{18}\text{F}$ , il breve tempo di vita fisico permette anche di ripetere l'analisi sullo stesso soggetto a intervalli brevi. Un processo con un tempo di semivita biologico molto breve, come ad esempio il flusso sanguigno, può essere adeguatamente studiato utilizzando il tempo di semivita di 2 minuti del  $^{15}\text{O}$ . Infatti, viene di solito usata acqua marcata con  $^{15}\text{O}$  per studiare il flusso sanguigno nel cervello. Tuttavia, il grosso svantaggio è che composti marcati con questo nucleo devono essere prodotti e usati nello stesso posto (che quindi deve possedere un ciclotrone) e le reazioni chimiche devono essere veloci.

### **Strategie di labeling**

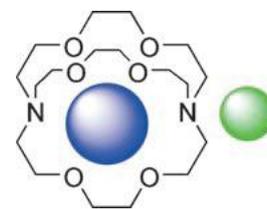
I tempi di semivita fisica piuttosto brevi della maggior parte dei nuclidi utilizzabili nella PET, richiedono che il tempo per la sintesi della molecola marcata (cioè il radio-farmaco) sia il più breve possibile. Infatti, la molecola marcata deve essere sintetizzata, purificata, analizzata, formulata (di solito come soluzione salina) e sterilizzata entro pochi minuti. Idealmente, i processi di sintesi e purificazione non dovrebbero essere più lunghi di 2 – 3 volte il tempo di semivita fisico del nuclide e l'introduzione del radionuclide dovrebbe avvenire il più avanti possibile nella sequenza sintetica del radio-farmaco. Una volta prodotto tramite ciclotrone il composto marcato di partenza (sintone), questo viene trasferito alla cosiddetta *hot cell* (una camera sigillata rivestita di piombo, avente una finestra con uno spesso vetro al piombo), dove viene trasformato nel prodotto marcato finale, il *PET probe*, tramite una serie di processi chimici, molto spesso automatizzati o condotti da robot controllati da computer in modo da limitare il più possibile l'esposizione degli operatori alle radiazioni. Le difficoltà tecniche sono aumentate dal fatto che si lavora con quantità minuscole di radio-isotopi prodotti dal ciclotrone, tipicamente su scala da pico- a nano-molare. Di solito si usa un largo eccesso di precursore non marcato (*cold reagent*), tipicamente  $10^3 - 10^4$  volte rispetto al reagente radioattivo, per garantire che la reazione vada a completezza (e rapidamente, con cinetiche dello pseudo primo ordine rispetto al radio-isotopo). Tipici tempi di reazione variano da 1 a 30 minuti, a seconda del nuclide in questione, con volumi di reazione da 0.2 a 1 mL. Tutti i radiofarmaci, sia per uso umano che animale, devono avere un elevato livello di purezza

radiochimica (tipicamente > 95%) e questa viene tipicamente raggiunta con una purificazione tramite HPLC. Infine, dal momento che i radiofarmaci sono somministrati essenzialmente per endovena, è importante che siano sterili e apirogeni. Ogni composto marcato è caratterizzato dalla **attività specifica**, che è una misura della radioattività per unità di massa del composto, espressa di solito in giga-Becquerel per micromole ( $\text{GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ) o Curies per micromole ( $\text{Ci} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ). Tipiche attività specifiche per *PET probes* sono dell'ordine di  $50\text{--}500 \text{ GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$  (ca.  $1\text{--}15 \text{ Ci} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ). Dal momento che si possono ottenere immagini PET di buona qualità con dosi di radioattività molto piccole, serve amministrare quantità molto piccole di composto marcato, tipicamente a livelli di pochi microgrammi (o anche meno). Ciò comporta che il composto non perturba il sistema biologico in esame e che possono essere studiati anche composti molto potenti o tossici nell'uomo perché si utilizzano dosi sub-farmacologiche o sub-tossiche.

Sono note molte reazioni nucleari per la produzione di  $^{18}\text{F}$ , e la scelta del composto da bombardare dipende dalla forma chimica del  $^{18}\text{F}$  che si vuole ottenere. Le strategie di sintesi per marcare molecole con  $^{18}\text{F}$  si possono sostanzialmente dividere in due grosse aree: 1) **fluorurazione diretta**, in cui l'isotopo  $^{18}\text{F}$  viene introdotto direttamente nella molecola target in un unico stadio e 2) **fluorurazione indiretta**, che sfrutta dei gruppi prostetici, di solito dei piccoli frammenti alchilici o arilici marcati con  $^{18}\text{F}$  che possiedono gruppi funzionali reattivi, e prevede degli approcci sintetici a più stadi. I gruppi prostetici con  $^{18}\text{F}$  vengono fatti reagire con molecole biologiche più complesse che non sono adatte, o sufficientemente stabili, per i metodi di fluorurazione diretta. Le strategie di fluorurazione diretta si dividono a loro volta in due aree: **fluorurazione nucleofila** e **fluorurazione elettrofila**. Dei due metodi, la fluorurazione nucleofila è decisamente più importante perché sfrutta reazioni dotate di maggiore selettività, in grado di produrre composti radioattivi con alta specificità adatti come traccianti PET. Per le fluorurazioni elettrofile si usa in genere  $\text{F}_2$  marcato con  $^{18}\text{F}$  o suoi opportuni derivati. Per produrre  $^{18}\text{F}\text{-F}_2$  si bombarda con deuteroni una miscela gassosa formata da neon contenente lo 0.1% di  $\text{F}_2$ . La reazione nucleare  $^{20}\text{Ne}(d, \alpha)^{18}\text{F}$  genera atomi di  $^{18}\text{F}$  che poi reagiscono con  $^{19}\text{F}_2$ :



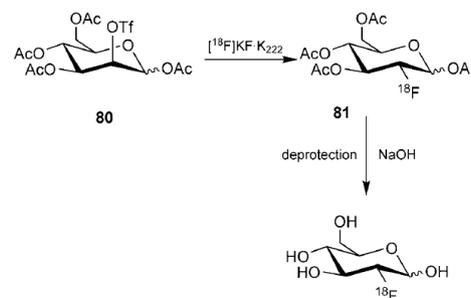
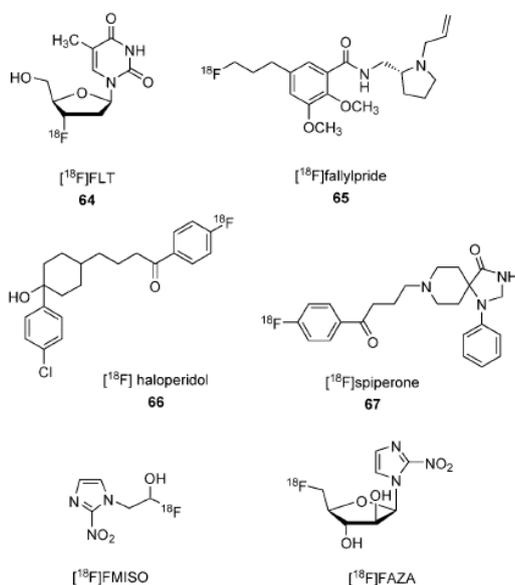
In alternativa al neon, si può bombardare con protoni diossigeno arricchito con  $^{18}\text{O}$ :  $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$ . Dal momento che il fluoro molecolare è molto reattivo (e quindi poco specifico, genera spesso miscele di prodotti fluorurati),  $\text{F}_2$  marcato viene di solito trasformato in agenti fluoruranti meno reattivi e più selettivi, come acetil-ipofluorito ( $[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$ ),  $\text{XeF}_2$  e fluoro-N-sulfonamidi. È chiaro che usando  $^{18}\text{F}\text{-}^{19}\text{F}$  la massima resa radiochimica per la marcatura di qualsiasi molecola non può essere >50%. Per ottenere  $^{18}\text{F}$  nucleofilo si irradia con



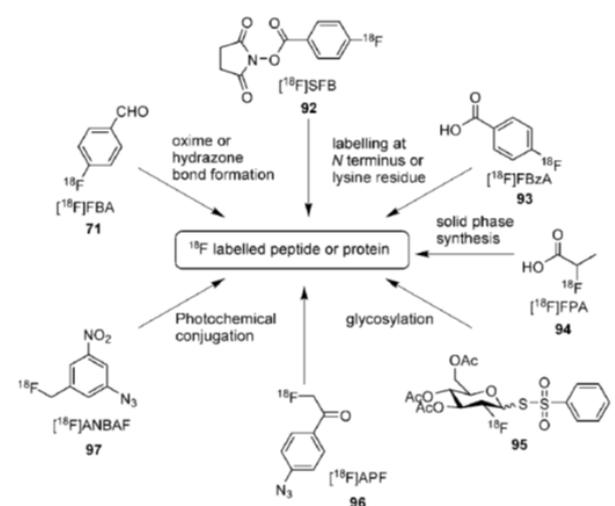
protoni acqua arricchita con  $^{18}\text{O}$ , secondo la reazione nucleare vista prima  $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$ . Lo **ione fluoruro** che si ottiene in soluzione acquosa è un nucleofilo debole a causa della forte idratazione e quindi inadatto. Quindi le reazioni di

sostituzione nucleofila devono essere condotte in assoluta assenza di acqua. Il fluoruro viene

attivato intrappolando i cationi (tipicamente dei metalli alcalini) in modo che non possano formare coppie ioniche con  $\text{F}^-$ , che è presente come ione nudo e quindi molto reattivo. Il criptando più comunemente utilizzato è il Kryptofix



2.2.2,  $K_{222}$ , ( $[^{18}\text{F}]\text{KF}\cdot\text{K}_{222}$ , figura) e le reazioni di sostituzione nucleofila sono solitamente condotte

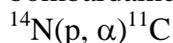


in solventi polari aprotici (DMF, DMSO o acetonitrile). Come già detto le fluorurazioni nucleofile sono quelle di gran lunga più importanti. Oltre a  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  (figura), altri traccianti preparati per questa via sono la 3'-deoxy-3'- $[^{18}\text{F}]\text{fluorothymidine}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ ) molto usata in diagnosi oncologiche,  $[^{18}\text{F}]\text{fallypride}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{haloperidol}$  e  $[^{18}\text{F}]\text{spiperone}$  usati in studi sui recettori della dopamina, il  $[^{18}\text{F}]\text{fluoroazomycinarabinofuranoside}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ ) e  $[^{18}\text{F}]\text{Fluoromisonidazole}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ ) per l'*imaging* di tessuti ipossici (figura).

La marcatura isotopica di biomolecole (oligonucleotidi, peptidi e proteine) per

applicazioni PET sta crescendo in importanza a causa dell'accresciuto interesse a utilizzare questi composti per la diagnosi di varie patologie. Dal momento che la marcatura diretta della maggior parte di peptidi e proteine usando  $^{18}\text{F}$  nucleofilo non è appropriata a causa delle condizioni piuttosto drastiche e non-fisiologiche (alte temperature, ambiente basico e solventi organici) che potrebbero facilmente distruggere le molecole, si utilizza l'approccio indiretto, cioè la reazione in condizioni blande (temperatura ambiente e soluzione acquosa) con **gruppi prostetici** marcati con  $^{18}\text{F}$ . Inoltre, la reazione dei gruppi prostetici dovrebbe essere chemo-selettiva e non avere effetti negativi sulle proprietà biologiche della biomolecola. Esempi di gruppi prostetici marcati con  $^{18}\text{F}$  sono mostrati in figura.

Esistono numerose reazioni nucleari per la produzione di  $^{11}\text{C}$ , ma quella usata più comunemente è il bombardamento del diazoto con protoni, cioè:



Di solito il nucleo di  $^{11}\text{C}$  così prodotto viene incorporato in  $^{11}\text{CO}_2$  oppure in  $^{11}\text{CH}_4$ , poi trasformati in  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  utilizzato per il *radio-labeling* tramite metilazione di altre molecole.

### Requisiti generali di PET *imaging probes*

Affinché una molecola marcata con nuclidi emettitori di positroni abbia possibilità di diventare un *PET probe* deve ovviamente soddisfare un certo numero di requisiti, che dipendono anche da qual è l'obiettivo dell'*imaging*. Il cervello è tipicamente il comparto più difficile. Innanzitutto è essenziale che i radiofarmaci PET non subiscano rapido metabolismo durante il tempo della misura. Infatti se il composto marcato si frammenta nell'organismo, può generare una serie di metaboliti marcati, che generano un segnale di fondo indesiderato, diminuendo la risoluzione. Molto spesso si vuole investigare con il *probe* uno specifico recettore o enzima. In questi casi il radiofarmaco deve avere un'affinità di *binding* sub-nanomolare per la molecola *target*. In altre parole, il *binding* non specifico del radiofarmaco deve essere basso in modo da raggiungere un elevato rapporto segnale/rumore, cioè *target/background*, ossia un elevato contrasto. In particolare si deve cercare di limitare il *binding* non specifico del *probe* radioattivo con le proteine del sangue, in quanto solo la frazione del radiofarmaco che è libera nel sangue può diffondere al di fuori del circuito venoso. Se il bersaglio del farmaco è il cervello, il *probe*, oltre ad avere un basso *binding* non-specifico, deve essere in grado di attraversare passivamente (a meno che non intervengano meccanismi di trasporto attivo) la barriera emato-encefalica (BBB). A questo scopo la molecola deve avere una opportuna lipofilia. Si stima che valori di  $\log P$  (coefficiente di partizione *n*-ottanolo/acqua) compresi fra 1.5 e 3 siano ottimali. Una molecola troppo lipofila potrebbe rimanere intrappolata nella membrana e non raggiungere il *target* di interesse. In genere, molecole ottimali per attraversare la BBB non devono formare troppi legami a idrogeno (max 8–10) e devono avere un peso molecolare (che è una misura per il volume della molecola) inferiore a 400–600 Da.

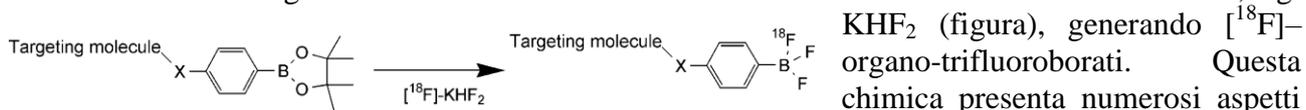
## Fluorurazione inorganica

Spesso, il processo complessivo per attaccare  $^{18}\text{F}$  a un atomo di carbonio è sfortunatamente troppo lungo e complesso per avere un utilizzo pratico. Infatti, la procedura per marcare un peptide con  $^{18}\text{F}$  facendo un legame C–F tipicamente inizia “intrappolando” il fluoruro  $^{18}\text{F}^-$  generato dal ciclotrone su una cartuccia di uno scambiatore di anioni, che viene poi eluita con potassio carbonato e kryptofix-222. Questa soluzione viene poi essiccata per riscaldamento sotto flusso di gas inerte, e il residuo secco viene ridisciolti in acetonitrile e ri-seccato per rimuovere l’acqua rimanente tramite la formazione di un azeotropo. L’acqua residua infatti ridurrebbe la nucleofilicità dello ione fluoruro. Il processo di essiccamento dura almeno 20 min. Il  $^{18}\text{F}$  così ottenuto viene poi usato per sostituire un gruppo uscente sulla molecola prostetica. Dopo la marcatura la molecola prostetica viene purificata tramite estrazione da fase solida (*solid-phase extraction*, SPE) oppure tramite HPLC, per poi venire attaccata al *targeting vector* (e.g. il peptide). Molti metodi sono possibili per la coniugazione, ad esempio – tra gli altri – formazione di ossime, acilazione, alchilazione, *coupling* maleimide/tiolo, o *click chemistry*. Acilazione e alchilazione vengono spesso usate su molecole piccole, di solito con gruppi funzionali protetti lasciando un solo sito reattivo, in modo da minimizzare i sotto-prodotti. La formazione di un legame tramite ossime, maleimide/tiolo e *click chemistry* si usa solitamente con molecole più complesse, dove la coniugazione avviene solo su siti specifici. Il coniugato tra il gruppo prostetico fluorurato e il peptide o la proteina deve venire di nuovo purificato. L’intero processo richiede spesso da 1 a 3h, con conseguente diminuzione della attività specifica per il decadimento del nuclide radioattivo.

Sarebbe quindi molto utile avere dei metodi alternativi, semplici e veloci, per riuscire a legare  $^{18}\text{F}$  a una gran varietà di composti, soprattutto peptidi. Ci sono, a questo riguardo, anche degli approcci “inorganici” per la fluorurazione nucleofila, cioè per l’introduzione di  $^{18}\text{F}^-$  in molecole per *imaging* PET. Infatti, numerosi elementi diversi dal carbonio hanno forti entalpie di legame col fluoro (cioè formano con esso legami forti) ma la formazione di questi legami, che sono anche cineticamente piuttosto stabili, avviene con energie di attivazione inferiori rispetto a quelle dei legami C–F. Per il momento, la ricerca si è concentrata su tre elementi, boro, silicio e alluminio.

### Boro

I legami covalenti B–F sono fra quelli termodinamicamente più stabili ( $> 730 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). La maggior parte degli studi per utilizzare il boro come sito di legame del fluoruro per poi marcare biomolecole hanno riguardato la reazione di esteri aril-boronic con sintoni contenenti fluoruro, e.g.



potenzialmente vantaggiosi per essere applicata al *radio-labeling* di biomolecole con  $^{18}\text{F}$ : *i*) la reazione col fluoruro può venire condotta in soluzione acquosa (o almeno parzialmente acquosa), al contrario di molte delle reazioni “organiche”, e può quindi evitare lo stadio finale di eliminazione del solvente organico, solitamente per distillazione azeotropica; *ii*) la marcatura avviene in un unico stadio “radioattivo” ed è specifica per il boro; *iii*) non si hanno intermedi parzialmente fluorurati, si legano sempre tre fluoruri; *iv*) Il legame B–F nei trifluoroborati è stabile rispetto all’idrolisi in condizioni fisiologiche. Nonostante i vantaggi, questa procedura ha ancora dei limiti che devono essere superati prima che possa diventare pratica. In particolare, la reazione col fluoruro (o con KHF<sub>2</sub>) è piuttosto lenta e quindi le rese del processo di marcatura sono basse a meno che si usino concentrazioni elevate dei reagenti, ossia volumi di reazione molto piccoli (e.g. 10 $\mu\text{L}$ ). Questo è un limite pratico per l’applicazione clinica, a meno che si trovino dei metodi semplici per concentrare le soluzioni di  $^{18}\text{F}^-$  prodotte dai ciclotroni alla scala di pochi microlitri. Inoltre, le rese di *labelling* sono tipicamente  $< 95\%$  e quindi sono necessari degli stadi di purificazione.

### Silicio

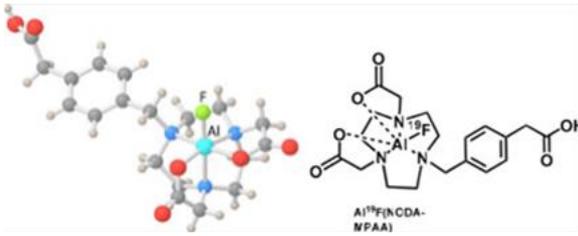
Anche l’energia del legame Si–F è molto elevata (tipicamente  $> 570 \text{ kJ mol}^{-1}$ , vs  $480 \text{ kJ mol}^{-1}$  per legami C–F) e quindi composti del silicio potrebbero essere sfruttabili per il *labelling* con  $^{18}\text{F}$ . Sintetizzando i risultati riportati in letteratura, si può concludere che la formazione di legami Si–F

(ad esempio sfruttando la sostituzione nucleofila che viene usata come stadio di deprotezione nella sintesi degli alcoli) è fattibile e il *labelling* può essere condotto in soluzione acquosa, anche se finora è risultato più efficiente usare condizioni in cui l'acqua viene esclusa (i.e. solventi organici anidri).



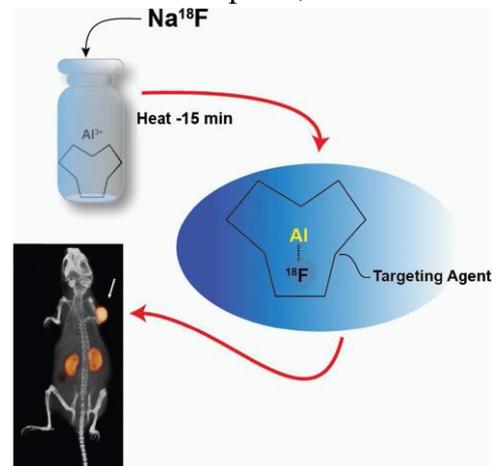
In genere le procedure per la formazione di legami Si–F sono più semplici rispetto ai metodi convenzionali per la formazione di legami C–F, e si può sfruttare anche lo scambio isotopico Si–<sup>19</sup>F con <sup>18</sup>F<sup>–</sup>. Sebbene le biomolecole potrebbero in linea di principio venire marcate in un unico stadio (purché ovviamente siano già funzionalizzate con un gruppo che porta il silicio), finora i processi a due stadi (i.e. la marcatura di un gruppo prostetico seguita dalla sua coniugazione alla biomolecola) hanno dato risultati migliori. Un problema intrinseco piuttosto rilevante è rappresentato dalla tendenza all'idrolisi del legame Si–F nei triorgano-fluorosilani. La velocità di idrolisi in condizioni fisiologiche può venire molto rallentata usando dei gruppi alchilici ingombranti, in particolare gruppi terbutilici. Questo tuttavia porta ad una eccessiva lipofilia con conseguente accumulo nel fegato. Sarà probabilmente necessario funzionalizzare i gruppi ingombranti con dei sostituenti idrofili per attenuare questo problema.

### **Alluminio**

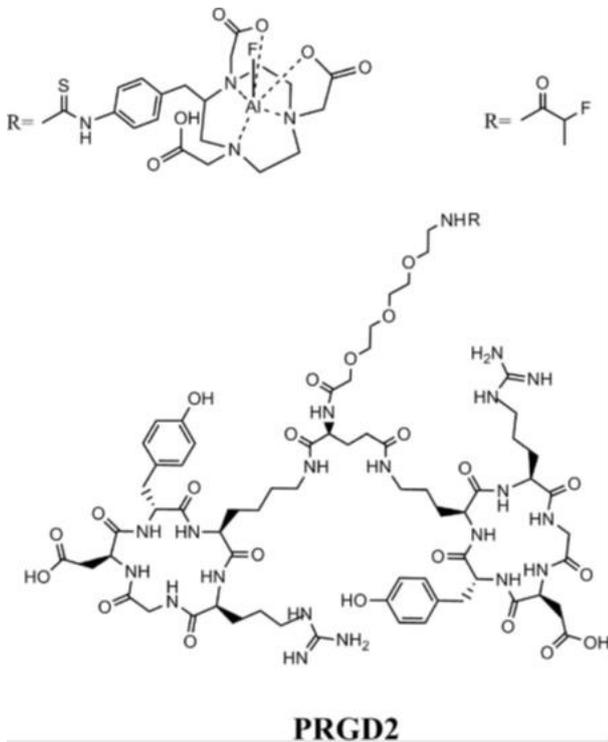


È noto che lo ione fluoruro si può coordinare come legante a numerosi ioni metallici, in alcuni casi anche formando dei legami molto forti. L'interazione del fluoruro con lo ione  $\text{Al}^{3+}$  è tra le più forti ( $> 670 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) e il legame  $\text{Al-F}$  è stabile in condizioni fisiologiche. Si è verificato che lo ione  $\text{Al}^{3+}$ , esposto a basse concentrazioni di fluoruro, forma un

complesso mono-fluorurato stabile. La fluorurazione con  $^{18}\text{F}^-$  viene fatta a pH 4, che è risultato essere ottimale: a pH troppo alti si possono formare idrossidi di Al che precipitano, mentre a pH troppo bassi si forma HF. Il complesso mono-fluorurato può venire poi rapidamente incorporato in un opportuno chelante. Si è verificato che il NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid) è il chelante più adatto, in quanto non rilascia  $\text{Al-F}$  (i.e. ha sufficiente stabilità cinetica). Il pH 4, usato per fluorurare  $\text{Al}^{3+}$ , è anche adatto per l'incorporazione nel chelante. Dal momento che l'Al non tende ad avere numero di coordinazione superiore a 6, uno dei tre acidi carbossilici del NOTA può essere utilizzato per la coniugazione al *targeting vector*. La figura riporta la struttura di un complesso modello con il chelante pentadentato NODA (1,4,7-triazacyclononane-1,4-diacetate).



Inserendo  $^{18}\text{F-Al}$  in un coniugato NOTA-octreotide (i.e. un analogo della somatostatina) è stato possibile ottenere una buona immagine PET di un tumore pancreatico nel topo (figura). Questi derivati  $\text{Al-F}$  sono al momento i più promettenti fra quelli non tradizionali. Un coniugato preparato con questo approccio, utilizzando come *targeting vector* il peptide PRGD2 (figura), è stato utilizzato in uno studio clinico nell'uomo per l'*imaging* di un tumore al polmone. Questo peptide appartiene alla categoria dei peptidi-RGD, cioè peptidi che contengono arginina-glicina-acido aspartico. I peptidi RGD ciclici hanno un'alta affinità e selettività per il recettore di una delle più importanti integrine, l'integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Questa integrina svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attivazione cellulare, sopravvivenza e migrazione, e riuscire a visualizzarla e quantificarla offre un'ottima possibilità di valutare la neo-vascularizzazione di un tumore e stabilire se ha probabilità di rispondere a una terapia anti-angiogenica. La procedura di *labeling* del peptide utilizzando  $^{18}\text{F-Al}$  è stata molto più veloce e semplice rispetto al metodo di *labeling* con  $^{18}\text{F}$  precedentemente usato (stessa figura) e l'addotto si è dimostrato stabile anche *in vivo*.



Il maggiore limite di questo approccio, ora disponibile anche in kit, sta nel fatto che l'inserimento del complesso  $\text{Al-F}$  nel chelante richiede il riscaldamento a  $100^\circ\text{C}$  e ciò preclude la marcatura di biomolecole termo-sensibili (il peptide RGD citato prima è termostabile). In questo caso bisogna ricorrere a un procedimento in due stadi. Inoltre, sarebbe preferibile invertire l'ordine degli stadi, cioè introdurre prima l' $\text{Al}^{3+}$  nel chelante e poi fare la fluorurazione con  $^{18}\text{F}^-$ . In questo modo la coniugazione alla biomolecola

PRGD2

potrebbe essere fatta dopo l'inserzione a caldo dell'alluminio nel chelante e l'ultimo stadio sarebbe la fluorurazione dell'Al a temperatura ambiente.

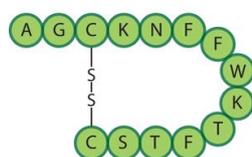
## Radionuclidi metallici per PET

Come si vede dalla tabella, ci sono anche numerosi nuclidi metallici che possono essere utilizzati per sviluppare radiofarmaci PET. Come considerazione generale, è preferibile che il radionuclide non abbia altri decadimenti radioattivi oltre all'emissione di positroni, sia per ottimizzare la risoluzione che per limitare la quantità di radiazioni subita dal paziente. Vedremo un caso che riguarda il  $^{68}\text{Ga}$ .

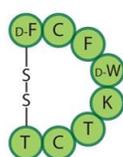
Table 1. Physical Properties of Some Common PET Radiometals<sup>a</sup>

isotope	half-life/h	source	production reaction	decay mode (% branching ratio)	$E_{\beta^+}/\text{keV}$	abundance, $I_{\beta^+}/\%$	$E_{\gamma}/\text{keV}$ (intensity, $I_{\gamma}/\%$ )	relevant oxidation states	common coordination numbers
$^{64}\text{Cu}$	12.7	cyclotron	$^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$	$\epsilon + \beta^+$ (61.5) $\beta^+$ (17.6) $\beta^-$ (38.5)	278.2(9)	17.60(22)	511.0 (35.2)	1+, 2+	4, 5, 6
$^{68}\text{Ga}$	1.1	generator	$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$	$\epsilon + \beta^+$ (100) $\beta^+$ (89.1)	836.02(56)	87.94(12)	511.0 (178.3)	3+	4, 5, 6
$^{86}\text{Y}$	14.7	cyclotron	$^{86}\text{Sr}(p,n)^{86}\text{Y}$	$\epsilon + \beta^+$ (100) $\beta^+$ (31.9)	535(7)	11.9(5)	443.1 (16.9) 511.0 (64) 627.7 (36.2) 703.3 (15) 777.4 (22.4) 1076.6 (82.5) 1153.0 (30.5) 1854.4 (17.2) 1920.7 (20.8)	3+	8, 9
$^{89}\text{Zr}$	78.4	cyclotron	$^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$	$\epsilon + \beta^+$ (100) $\beta^+$ (22.7)	395.5(11)	22.74(24)	511.0 (45.5) 909.2 (99.0)	4+	8

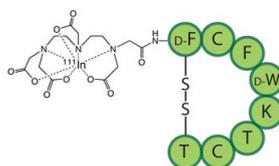
### $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC



Somatostatin



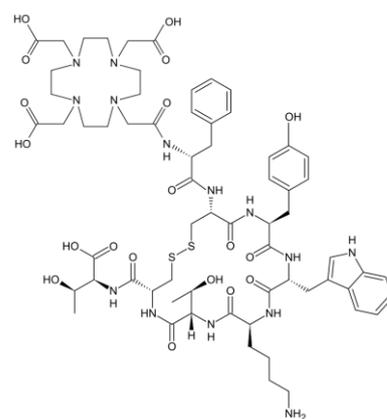
Octreotide

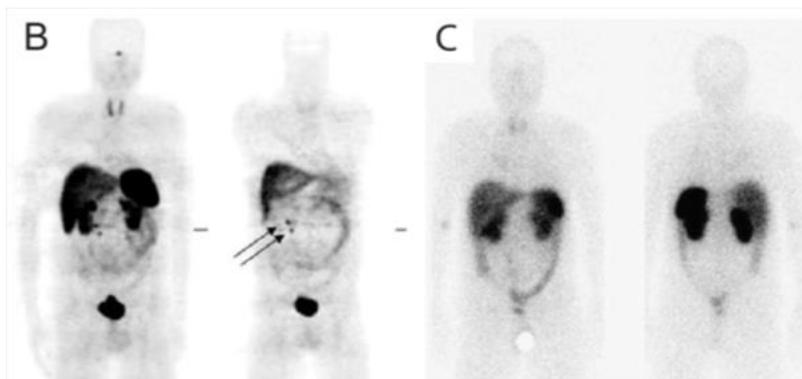


$^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotide

Vediamo un esempio di coniugato con un radionuclide metallico per analisi PET. Il  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC è un coniugato dell'octreotide (DOTATOC = DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotide, figura). Esso è

uno dei più promettenti agenti di *imaging* PET attualmente in uso clinico perché si è dimostrato superiore al FDG per l'*imaging*, cioè l'individuazione, di tumori neuroendocrini (NET). I tumori neuroendocrini sovra-esprimono i recettori per la somatostatina, che è un peptide ciclico con un ponte disolfuro fra due cisteine (figura). L'octreotide è un analogo sintetico (approvato dalla FDA) della somatostatina: è un otta-peptide ciclico con due amminoacidi D (per aumentare la stabilità *in vivo* rispetto alla somatostatina, il cui tempo di semi-vita biologico è di soli 3 min) che mantiene un'elevata affinità per i recettori della somatostatina. Questa sua capacità di *targeting* è stata sfruttata sia per uso diagnostico che terapeutico. Il coniugato  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide (OtreoScan®, visto prima) è diventato il radio-tracciante SPECT di uso clinico standard nella diagnosi di tumori endocrini (figura). Lo sviluppo della tecnica PET, e il passaggio dal chelante DTPA al DOTA, hanno portato a considerare l'opportunità di usare il  $^{68}\text{Ga}$  per l'*imaging* PET. Infatti, il breve tempo di semi-vita del  $^{68}\text{Ga}$  (67.7 min;  $\beta^+ = 89\%$ ) lo rende molto adatto per essere coniugato a peptidi con rapidi profili farmacocinetici come l'octreotide ( $t_{1/2} \sim 100$  min). La figura mostra un confronto dell'*imaging* di un tumore endocrino con  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC (PET, a sinistra) e con  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide (SPECT, a destra).





Si vede che la PET ha una risoluzione migliore e permette di individuare dei linfonodi addominali (frecce). Il  $^{68}\text{Ga}$  viene prodotto tramite un processo di cattura di elettroni (EC) a partire dal radionuclide “padre”  $^{68}\text{Ge}$  ( $t_{1/2} = 270.95$  d) e può quindi venire prodotto come il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  usando un generatore compatto e poco costoso. Lo ione  $\text{Ga}^{3+}$  forma un

addotto sufficientemente stabile, anche se non ottimale, con il DOTA. In questi ultimi anni il  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC (o l’analogo  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE, dove c’è l’ocreatato al posto dell’ocreatide, la differenza sta in una treonina al posto del treoninolo come amminoacido C-terminale) è stato oggetto di molti studi preclinici e clinici e ha dimostrato di fornire una maggiore risoluzione rispetto a  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide (vedi sopra). Inoltre il  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC ha dimostrato di possedere una buona predittività per selezionare i pazienti che hanno probabilità di rispondere alla radio-terapia con  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC o  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC (vedi dopo). Le strutture dei tre peptidi analoghi della somatostatina sono mostrate in figura; il [Tyr<sup>3</sup>]ocreatide è il peptide usato nel DOTATOC, mentre [Tyr<sup>3</sup>]ocreatate è quello usato nel DOTATATE. Si stanno anche sviluppando dei coniugati di questi peptidi con chelanti in grado di complessare stabilmente il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

octreotide	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (ol)
[Tyr <sup>3</sup> ]ocreatide	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (ol)
[Tyr <sup>3</sup> ]ocreatate	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr

## Radiofarmaci terapeutici (radio-immunoterapia)

I radiofarmaci terapeutici sono molecole progettate per fornire dosi terapeutiche di radiazioni ionizzanti a cellule tumorali, in particolare anche per i tumori disseminati (metastasi). Idealmente questi farmaci dovrebbero localizzarsi sul sito malato in concentrazione sufficiente per fornire una quantità di radiazione tale da essere citotossica (cioè sufficiente a danneggiare il DNA di queste cellule in modo irreparabile, portandole a morte) ma allontanarsi rapidamente dal sangue e altri organi in modo da minimizzare il danno da radiazione ai tessuti sani. Quindi in tutti i casi il radionuclide è legato a un *targeting vector*, tipicamente un anticorpo, per raggiungere la massima selettività possibile, espressa dall’**indice terapeutico**. Questo parametro, che si vuole massimizzare, è il rapporto fra la dose di radiazione somministrata al tessuto malato e quello sano. Quando possibile, la dose di radiazione assorbita da tumori e tessuti sani viene misurata quantitativamente tramite PET (approccio teranostico). Come unità di misura si usa il centigray (cGy). I tumori sensibili alla radio-terapia come i linfomi (vedi dopo) possono dare remissioni complete per dosi di radiazioni di 1,500–2,000 cGy, mentre i tumori solidi richiedono tipicamente 3,500–10,000 cGy per dare qualche risposta. Queste dosi devono poter essere somministrate risparmiando il più possibile i tessuti normali, soprattutto quelli sensibili alle radiazioni, in modo che organi come reni, polmoni, e midollo spinale ricevano dosi di radiazioni inferiori a 2,000 cGy, 1,500 cGy, e 100 cGy, rispettivamente. In altri termini, l’indice terapeutico (TI) tra tumore (in particolare per i tumori solidi) e tessuto sano radio-sensibile dovrebbe essere >10 per i reni e >50 per il midollo spinale. Infine, bisogna anche tenere presente che nello sviluppo di agenti radioterapeutici la tossicità chimica è un fattore che può diventare rilevante.

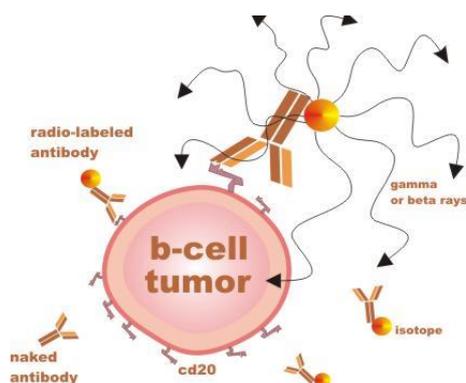
Per la radio-immunoterapia si usano radionuclidi che emettano particelle  $\alpha$  o – preferibilmente –  $\beta^-$  ad alta energia. Le particelle  $\beta^-$  sono meno energetiche di quelle  $\alpha$ , ma hanno un buon intervallo di penetrazione nei tessuti (2 - 12 mm), che è particolarmente importante per aggredire i tumori solidi molto eterogenei. Fra i vari radionuclidi emettitori di particelle  $\beta^-$  quelli più interessanti per la radioterapia sistemica dei tumori sono  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$  e vari lantanidi, in particolare  $^{177}\text{Lu}$  (emettitore a

bassa energia, 0.5 eV),  $^{149}\text{Pm}$  e  $^{153}\text{Sm}$  (a media energia) e  $^{166}\text{Ho}$  (alta energia).  $^{90}\text{Y}$  è particolarmente adatto per la radio-immunoterapia in quanto è un puro emettitore  $\beta$  ad alta energia (si trasforma in  $^{90}\text{Zr}$ ) e si produce con un generatore dal decadimento dello  $^{90}\text{Sr}$ . Ha un tempo di semi-vita di 2.7 giorni che è sufficientemente breve per la terapia (semi-vite troppo lunghe aumentano la tossicità generalizzata) ma anche abbastanza lungo da permettere che i radio-farmaci vengano preparati e consegnati al sito per l'uso clinico. Essendo un puro emettitore  $\beta$  non consente l'*imaging*, ma si possono usare gli analoghi coniugati con  $^{111}\text{In}$  al posto di  $^{90}\text{Y}$  come radiodiagnostici SPECT per determinarne preventivamente la bio-distribuzione (assumendo che sia la stessa) e la dosimetria (lo  $^{131}\text{I}$  è anche un emettitore  $\gamma$  per il 10%, quindi si può utilizzare la SPECT, oppure per dati quantitativi migliori si può usare la PET con l'analogo marcato con  $^{124}\text{I}$ ). Inoltre l'ittrio e i lantanidi hanno una chimica di coordinazione simile (stato di ossidazione 3+, *hard*, numeri di coordinazione elevati a causa delle grandi dimensioni), e la loro coordinazione a una serie di chelanti bifunzionali è ben compresa e messa a punto.

I radionuclidi che emettono particelle  $\alpha$  hanno una potenza molto più elevata, e sono quindi delle interessanti alternative, o aggiunte, ai radionuclidi  $\beta$ -emettitori nella radio-immunoterapia. La maggiore potenza è dovuta al fatto che l'emissione di una particella  $\alpha$  rilascia una grande quantità di energia in maniera lineare entro pochi diametri cellulari (50–90  $\mu\text{m}$ ). L'energia rilasciata linearmente (ipotizzando un percorso lineare) da una particella  $\alpha$  (2 – 10 MeV/ $\mu\text{m}$ ) può essere da 100 a 1000 volte superiore rispetto ai  $\beta$ -emettitori standard (60 – 110 keV/ $\mu\text{m}$ ). Inoltre, al contrario dei radionuclidi  $\beta$ -emettitori che sono meno efficaci nei tessuti ipossici (perché generano meno ROS) l'effetto dell'ossigeno sugli emettitori  $\alpha$  è minimo (i danni sono fatti direttamente dalle particelle) e quindi si può avere una citotossicità efficace anche nelle aree dei tumori che sono ipossiche. Quindi, per le loro caratteristiche, gli emettitori- $\alpha$  sono particolarmente adatti per aggredire micro-metastasi e singole cellule tumorali come quelle delle leucemie e dei linfomi.

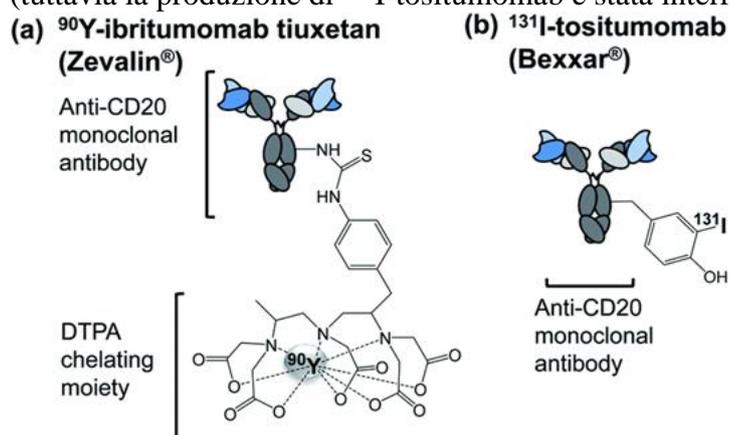
Tenendo conto del tipo di decadimento radioattivo e della disponibilità, solo pochi radionuclidi emettitori- $\alpha$  sono considerati adatti per applicazioni *in vivo*:  $^{212}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 60.5$  min),  $^{213}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 45.6$  min),  $^{211}\text{At}$  ( $t_{1/2} = 7.2$  h),  $^{225}\text{Ac}$  ( $t_{1/2} = 10$  d),  $^{223}\text{Ra}$  ( $t_{1/2} = 11.4$  d) e  $^{212}\text{Pb}$  ( $t_{1/2} = 10.6$  h). Particolarmente promettenti fra gli emettitori  $\alpha$  sono  $^{213}\text{Bi}$  e  $^{225}\text{Ac}$ .  $^{225}\text{Ac}$  decade con 5 emissioni  $\alpha$  e 3 emissioni  $\beta$  in serie, la maggior parte con elevate energia, e quindi i radio-immuno-coniugati di  $^{225}\text{Ac}$  sono dei veri e propri nano-reattori atomici che rilasciano una cascata di particelle alle cellule tumorali con una potenza stimata 1000 volte più grande rispetto ai coniugati di  $^{213}\text{Bi}$  e forse 5000–10000 volte rispetto agli emettitori  $\beta$ . Inoltre  $^{225}\text{Ac}$ , così come il  $^{223}\text{Ra}$ , ha altri due vantaggi: non emette raggi  $\gamma$ , facilitandone il trasporto, e possiede un tempo di vita relativamente lungo che ne consente la consegna in siti lontani da quello di produzione e anche di essere utilizzato per lo studio di processi biologici lenti.

Dal punto di vista clinico la radio-immunoterapia è applicata principalmente ai tumori più sensibili alle radiazioni, e cioè leucemie e linfomi (cioè tumori con cellule tumorali singole in un fluido e non aggregate in masse solide). Come già detto, i tumori solidi sono più radio-resistenti (anche per via dell'ipossia) e richiedono dosi complessive di radiazioni da 5 a 10 volte superiori per dare



qualche risposta. Qualche risultato è stato ottenuto solo quando la somministrazione può avvenire direttamente nel comparto del tumore solido (e.g. nel cervello) e non tramite endovena. La scelta dell'antigene espresso sulla superficie delle cellule tumorali e dell'anticorpo a lui più affine (*targeting vector*) è assolutamente cruciale affinché la radio-immunoterapia possa avere successo. Un **antigene ideale** deve essere altamente espresso con densità uniforme sulla superficie di tutte le cellule del tumore ( $> 10^5$  siti per cellula), non deve essere espresso (o molto meno) nelle cellule sane, l'affinità antigene-anticorpo deve essere dell'ordine

nanomolare, così che l'immuno-reattività dell'anticorpo marcato sia molto alta (> 90%). Se, dopo il *binding* con l'antigene, l'anticorpo viene internalizzato (e metabolizzato) è bene usare dei radionuclidi che tendano a rimanere nelle cellule (come in genere fanno i metalli), mentre se non viene internalizzato si può usare anche  $^{131}\text{I}$ . Fra gli antigeni noti che soddisfano almeno in parte questi requisiti il **CD20** si è dimostrato un ottimo bersaglio nelle cellule tumorali di tipo B (nei linfomi). L'antigene CD20 è una fosfoproteina non-glicosilata, di circa 35 kDa, che viene espressa sulla superficie del 95% dei linfociti B nei linfomi non Hodgkin a cellule B. La scelta del radionuclide ottimale per una radio-immunoterapia dipende sia dal problema clinico che da considerazioni pratiche. I radionuclidi  $^{131}\text{I}$  e  $^{90}\text{Y}$ , entrambi emettitori- $\beta$ , sono stati usati in più del 95% degli studi clinici perché hanno caratteristiche emissive favorevoli, buona disponibilità, una chimica ben sviluppata e una radiochimica "maneggevole", che in definitiva consentono di effettuare una marcatura stabile e affidabile degli anticorpi. Essi rappresentano attualmente lo standard a cui gli altri nuclidi si devono confrontare. L'FDA ha approvato due anticorpi monoclonali anti-CD20, uno marcato con  $^{131}\text{I}$  ( $^{131}\text{I}$ -tositumomab, lo iodio va su una tirosina) e l'altro con  $^{90}\text{Y}$  ( $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetan) (figura) per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin a cellule B. Il "tiuxetan" è il nome del chelante bifunzionale per  $^{90}\text{Y}$ , e non è altro che il DTPA funzionalizzato.  $^{131}\text{I}$ -tositumomab (Bexxar<sup>®</sup>, GlaxoSmithKline, NC, USA) e  $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>™</sup>, Spectrum Pharmaceuticals, CA, USA) rappresentano al momento (2015) gli unici farmaci per radio-immunoterapia in uso clinico e sono una pietra miliare in questa terapia (tuttavia la produzione di  $^{131}\text{I}$ -tositumomab è stata interrotta dopo pochi anni per lo scarso utilizzo).

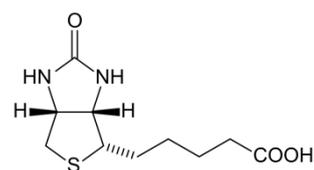


Entrambi i radionuclidi hanno vantaggi e svantaggi.  $^{131}\text{I}$  è relativamente poco costoso e può essere usato sia per *imaging* (SPECT, essendo per il 10% un emettitore  $\gamma$ ) che per terapia. Tuttavia, se le proteine marcate con  $^{131}\text{I}$  subiscono endocitosi nelle cellule tumorali esse subiscono rapida degradazione rilasciando  $^{131}\text{I}$ -tirosina e  $^{131}\text{I}$  libero nel flusso sanguigno. Inoltre, le radiazioni  $\gamma$  emesse dal  $^{131}\text{I}$  potrebbero essere pericolose per i familiari del paziente e per il personale

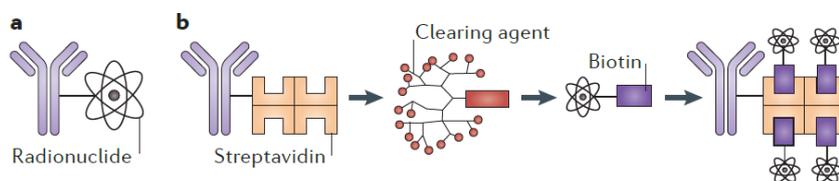
medico.  $^{90}\text{Y}$  è una buona alternativa, in quanto emette quasi esclusivamente particelle  $\beta$  e poiché questa radiazione non esce al di fuori del corpo del paziente, non è pericolosa per gli altri. Inoltre, le particelle  $\beta$  emesse da  $^{90}\text{Y}$  sono più energetiche di quelle di  $^{131}\text{I}$ , ed è ritenuto all'interno delle cellule tumorali anche dopo endocitosi.

Il maggior problema della radio-immunoterapia con gli anticorpi monoclonali marcati con i radioisotopi sono le loro **cinetiche lente** sia di diffusione per raggiungere il *target* (questo può essere più un problema per l'*imaging*) ma soprattutto di *clearance* dal flusso sanguigno di quelli che non si legano ai loro antigeni. Quest'ultima comporta dei livelli alti di radioattività di fondo, cioè in altre parole degli indici terapeutici non sufficientemente elevati. Più tempo l'anticorpo marcato sta nel flusso sanguigno e più alta è la possibilità di reazioni che portano a radio-tossicità, in particolare nel caso di  $^{90}\text{Y}$  (e di altri eventuali radio-farmaci marcati con lantanidi). Si possono avere reazioni di trans-metallazione, cioè  $^{90}\text{Y}$  viene sostituito nel chelante bifunzionale (e.g. DOTA) da altri ioni metallici endogeni, come  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , rilasciando  $^{90}\text{Y}^{3+}$  libero che va ad accumularsi nelle ossa generando radio-tossicità al midollo osseo. Inoltre il chelante bifunzionale deve anche competere *in vivo* con altri chelanti naturali, come ad esempio la transferrina, che ha una forte affinità per gli ioni  $\text{M}^{3+}$  e potrebbe "prenderci" lo ione  $^{90}\text{Y}^{3+}$ .

Sono state proposte diverse strategie per cercare di ovviare a questo problema. L'unica qui riportata, definita *multi-step pre-targeted radio-immunotherapy* (PRIT) sfrutta l'affinità straordinariamente elevate



dell'avidina (o streptavidina) per la biotina (figura) (la costante di dissociazione streptavidina-biotina è dell'ordine di  $10^{-14}$  mol L<sup>-1</sup>, una delle più forti interazioni non-covalenti note in natura). La strategia, illustrata in figura a confronto con quella "classica" (caso a), prevede che gli anticorpi vengano coniugati alla streptavidina (Ab-SA) e somministrati al paziente. Dopo che essi si sono

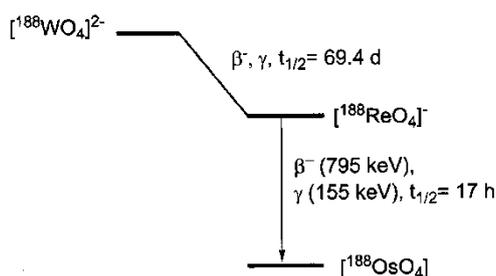


attaccati ai loro antigeni nello stadio lento, si può somministrare un agente che acceleri la rimozione dal flusso sanguigno di quelli non legati, e solo a questo punto si

somministra il radionuclide legato alla biotina (DOTA-biotina). Questo, essendo a basso peso molecolare, diffonde rapidamente e si va a legare alla streptavidina già legata alla cellule tumorali oppure viene escreto rapidamente tramite l'urina. Inoltre, la molecola tetramericca di streptavidina può legare quattro unità di biotina marcata, amplificando la radioattività sul tumore. In altre parole la strategia PRIT utilizza il *pre-targeting* per dissociare la fase di lenta distribuzione dell'anticorpo dalla fase di somministrazione del radionuclide terapeutico.

In alternativa agli anticorpi monoclonali, in numerosi ospedali sono in corso terapie sperimentali con peptidi analoghi della somatostatina (quindi *targeting vectors* molto più piccoli e di rapida escrezione) marcati con emettitori  $\beta$  per il trattamento di tumori endocrini. Esempi sono <sup>90</sup>Y-DOTATOC e <sup>177</sup>Lu-DOTATATE. Dal momento che <sup>90</sup>Y emette particelle  $\beta$  a energia maggiore, i peptidi analoghi della somatostatina marcati con tale isotopo sono più adatti al trattamento di tumori più grandi, mentre quelli con <sup>177</sup>Lu sono più adatti al trattamento di tumori più piccoli. Sono possibili anche combinazioni di entrambi. Il <sup>177</sup>Lu ha il vantaggio di essere anche un emettitore  $\gamma$  e di permettere quindi l'*imaging* SPECT. Dal momento che ci sono poche terapie disponibili per il trattamento di tumori endocrini inoperabili o metastatizzati, la radio-immunoterapia con analoghi della somatostatina è una possibilità molto promettente, purché i pazienti rispondano positivamente alla scintigrafia pre-terapia con gli stessi peptidi coniugati a emettitori SPECT (<sup>111</sup>In) o PET (<sup>68</sup>Ga) (vedi sopra).

Molta ricerca viene attualmente condotta per sviluppare radiofarmaci terapeutici a base di <sup>188</sup>Re. Questo isotopo presenta molte analogie con <sup>99m</sup>Tc. Il <sup>188</sup>Re decade emettendo particelle  $\beta^-$  (70%) e radiazioni  $\gamma$  (energia 155 keV) con un tempo di emivita di 17 ore. La emissione di particelle  $\beta^-$  è adatta per la terapia, mentre la co-emissione di radiazioni  $\gamma$  permette di seguire *in vivo* il composto e di fare delle valutazioni quantitative. Il <sup>188</sup>Re può inoltre



essere convenientemente ottenuto come perrenato [<sup>188</sup>Re(VII)O<sub>4</sub>]<sup>-</sup> in un generatore dal wolframato <sup>188</sup>W in maniera analoga a quanto visto per il <sup>99m</sup>Tc (figura).

Oltre alle buone caratteristiche di generazione e di decadimento radioattivo, un ulteriore vantaggio è dato dal fatto che le proprietà di tecnezio e renio sono molto simili dal punto di vista chimico e chimico-fisico. Quindi la chimica sviluppata per il tecnezio può venire trasferita al

renio e viceversa (inoltre è possibile lavorare con isotopi non radioattivi di renio, cosa non possibile con il tecnezio), ed è così idealmente possibile sviluppare in parallelo agenti diagnostici e terapeutici (*theranostic matched pairs*). Un esempio di *matched pair* è quello [<sup>99m</sup>Tc(DMSA)<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> e [<sup>188</sup>Re(DMSA)<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> (DMSA = acido dimercapto-succinico) che sono stati molto studiati per l'*imaging* e il trattamento delle metastasi ossee, soprattutto derivanti dal tumore alla prostata. In anni recenti sono molto studiati i precursori organometallici *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M = <sup>99m</sup>Tc o <sup>188</sup>Re, entrambi in stato di ossidazione +1) che presentano 3 CO fortemente coordinati e 3 molecole d'acqua che possono essere facilmente sostituite da chelanti tridentati che possono servire per la coniugazione a bio-molecole. I complessi di Tc(I) e Re(I) hanno configurazione elettronica d<sup>6</sup> a basso spin e quindi i frammenti M(CO)<sub>3</sub> sono molto inerti e di conseguenza molto stabili anche in

condizioni fisiologiche quando coordinati a chelanti tridentati. Sono stati effettuati numerosi studi clinici iniziali usando diversi radio-farmaci a base di  $^{188}\text{Re}$  (e.g. fosfonati, anticorpi, peptidi, e anche particolati). Si ritiene che il maggior limite allo sviluppo di radio-farmaci a base di  $^{188}\text{Re}$  sia la difficoltà di ottenimento, e quindi l'alto costo, del nuclide precursore  $^{188}\text{W}$ , che può essere ottenuto a partire da  $^{186}\text{W}$  tramite due successive reazioni di cattura di neutroni solo in pochi reattori nucleari (2 o 3 al mondo!) in grado di generare un flusso di neutroni sufficientemente elevato ( $>10^{15} \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ). La disponibilità di altri radionuclidi con proprietà simili, in particolare  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$ , prodotti più facilmente, ha reso quelli a base di  $^{188}\text{Re}$  meno competitivi.

### Generalità dei radionuclidi metallici

A conclusione di questa sintetica trattazione delle tecniche di radio-diagnostica e radio-terapia, notiamo che esse utilizzano per la maggior parte radionuclidi metallici, soprattutto nella SPECT e nella radio-immunoterapia. L'uso di radio-isotopi metallici ha degli svantaggi (vedi la PET) ma anche dei vantaggi, che sono qui riassunti. Come abbiamo visto, i radionuclidi metallici si utilizzano molto spesso come coniugati di una *targeting-molecole* (o *targeting vector*) o comunque coordinati a dei leganti, cioè mai come ioni liberi. La grande varietà di radionuclidi metallici permette di scegliere accuratamente il tempo di semi-vita fisico del radioisotopo in modo da adeguarlo al tempo di semi-vita biologico del suo *targeting-vector*. Per esempio, agenti che abbiano tempi di residenza *in vivo* brevi possono essere funzionalizzati con il  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2}$  ca. 68 min) o con il  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $t_{1/2}$  ca. 6h), mentre vettori che richiedono tempi più lunghi per raggiungere il loro *target* devono essere funzionalizzati con  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2}$  ca. 12.7 h),  $^{86}\text{Y}$  ( $t_{1/2}$  ca. 14.7 h),  $^{111}\text{In}$  ( $t_{1/2}$  ca. 2.8 d) o  $^{89}\text{Zr}$  ( $t_{1/2}$  ca. 3.2 d). Di regola, si è visto che le grandi biomolecole ( $>40 \text{ kDa}$ ) devono essere marcate con radionuclidi con tempi di semi-vita  $> 24\text{h}$  per dare la possibilità di raccogliere immagini anche per tempi relativamente lunghi dopo la somministrazione (i.e. 3 – 7 d).

Un secondo punto di forza dei radionuclidi metallici è che essi permettono di utilizzare diversi chelanti bifunzionali con **elevata modularità**, permettendo la creazione di un vasto insieme di agenti di *imaging*. Per esempio, lo stesso anticorpo può venire coniugato con relativa facilità a chelanti come la desferossiamina (DFO), il DTPA e il DOTA ed essere poi marcato – rispettivamente – con  $^{89}\text{Zr}$  per *imaging* PET o con  $^{111}\text{In}$  per *imaging* SPECT o con  $^{177}\text{Lu}$  per radio-immunoterapia. In alcuni casi, in particolare con i chelanti più versatili come DTPA, DOTA e NOTA si può cambiare radionuclide senza cambiare il chelante. Questa elevata modularità diventa particolarmente utile dal punto di vista clinico quando un agente di *imaging* marcato con un opportuno isotopo può essere somministrato in combinazione con un agente terapeutico del tutto uguale tranne per il fatto che usa un altro radionuclide.

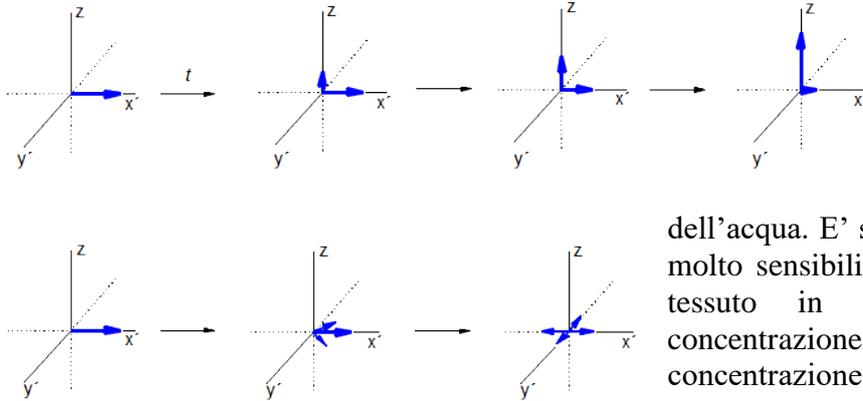
Un terzo vantaggio dei radioisotopi metallici è che di solito le procedure di radio-metallazione sono veloci e si possono condurre in condizioni blande. In genere anche le procedure di purificazione sono piuttosto semplici, di solito cromatografia a scambio ionico o HPLC a fase inversa su una comune colonna  $\text{C}_{18}$ . Questi fattori sono particolarmente vantaggiosi rispetto alle procedure per i reagenti per *imaging* PET con  $^{18}\text{F}$  o nuclei simili.

Un ultimo fattore non trascurabile a vantaggio dei radionuclidi metallici è che essi permettono di svincolarsi dalla necessità di avere un ciclotrone nelle adiacenze del sito di utilizzo. Infatti, molti possono essere prodotti tramite dei generatori portatili (e.g.  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) o possiedono tempi di semi-vita sufficientemente lunghi da permetterne la spedizione a ospedali e centri di ricerca lontani da un ciclotrone (e.g.,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{111}\text{In}$ , e  $^{89}\text{Zr}$ ).

## Tomografia di risonanza magnetica (MRI)

Negli ultimi 30 anni la tomografia di risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI) ha assunto una crescente importanza come metodo diagnostico di immagine che riesce a fornire risoluzione spaziale e contrasto superbi. Il maggiore vantaggio dell'MRI rispetto agli altri metodi radiodiagnostici come CT, SPECT o PET è senza dubbio l'assenza di dannose radiazioni ad elevata energia. Il maggior limite per la tecnica MRI, come vedremo ampiamente dopo, è la **bassa sensibilità**.

La tecnica MRI si basa sul monitoraggio della distribuzione e delle differenti proprietà delle molecole d'acqua nei tessuti tramite la misura della variazione nello spazio del **tempo di rilassamento longitudinale ( $T_1$ )**, cioè lungo le linee del campo magnetico applicato (detto anche



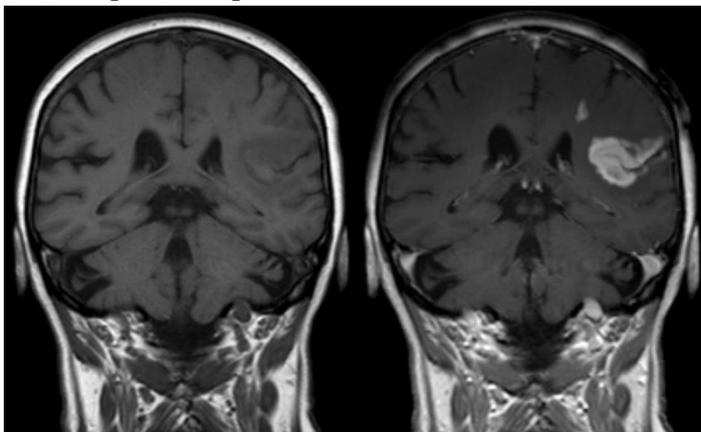
rilassamento spin-reticolo, o *spin-lattice*, figura sopra) e/o di quello **trasversale ( $T_2$ )** (detto anche rilassamento spin-spin, figura sotto) degli spin nucleari dei protoni

dell'acqua. E' stato dimostrato che  $T_1$  e  $T_2$  sono molto sensibili alle condizioni biochimiche del tessuto in esame (come per esempio concentrazione di acqua, temperatura, pH, concentrazione di sali o grassi,...); di conseguenza uno scanner MRI, confrontando

questi parametri tra le parti sane e quelle che hanno subito delle variazioni patologiche in uno stesso tessuto, è in grado di fornire un ottimo contrasto. Al momento, la risoluzione raggiunta dai moderni strumenti MRI ospedalieri è sub-millimetrica, ma in laboratorio è già stata raggiunta una **risoluzione a livello cellulare**. Di conseguenza, il futuro potenziale dell'MRI come tecnica diagnostica è ancora enorme. Il contrasto a livello dei tessuti molli è molto buono e l'MRI fornisce rapidamente informazioni anatomiche. Inoltre, le sequenze di impulsi, oltre a poter essere "pesate" secondo i tempi di rilassamento  $T_1$  o secondo  $T_2$ , possono essere variate in modo da evidenziare, ad esempio, le differenze fra tessuti che hanno diversa densità di protoni, differenti velocità di diffusione dell'acqua, oppure differenti *chemical shifts* (e.g. acqua rispetto a lipidi). Oltre che per stabilire variazioni di tipo anatomico, l'MRI può essere utilizzato per monitorare la funzionalità di organi, per esempio è stata utilizzata per seguire le funzioni del cervello umano in tempo reale.

Tuttavia si è osservato che per certi organi o tessuti, come il tratto gastro-intestinale o il cervello, le informazioni diagnostiche ottenute con una semplice immagine MRI non sono sufficienti. In questi casi diventa necessaria la somministrazione di un opportuno **agente di contrasto** (*contrast agent*, CA). I migliori CA sono composti contenenti **ioni paramagnetici**.

Dal punto di vista fisico, vi sono due classi di agenti di contrasto, classificati secondo il processo di rilassamento di spin nucleare che essi accelerano (in prevalenza), cioè i  $T_1$ -CA (paramagnetici) e i  $T_2$ -CA (super-paramagnetici). Mentre i  $T_1$ -CA inducono un contrasto positivo, cioè fanno aumentare i segnali  $^1\text{H}$  NMR del tessuto interessato (il tessuto con il tempo di rilassamento  $T_1$  più breve diventa iper-intenso, cioè più chiaro), i composti che accelerano il tempo di rilassamento trasversale inducono una diminuzione dei segnali dei protoni e quindi un contrasto negativo (il tessuto diventa più scuro). Il tempo di rilassamento longitudinale  $T_1$  dei protoni dell'acqua in soluzioni diamagnetiche è tipicamente circa 5 volte più grande (cioè più lungo) di quello trasversale ( $T_2$ ) e quindi è più facile da accorciare. Storicamente quindi i  $T_1$ -CA sono stati studiati più



estesa; dal punto di vista chimico essi sono complessi di ioni metallici paramagnetici con **tanti elettroni spaiati** come Fe(III), Mn(II) e Gd(III) con opportuni chelanti organici. I  $T_2$ -CA (che in realtà influenzano anche il  $T_1$ ) sono stati sviluppati in un periodo più recente e consistono di nanoparticelle microcristalline di ossidi di ferro, anche chiamate *Small Superparamagnetic Iron Oxides* (SPIO) o *Ultra-small Superparamagnetic Iron Oxides* (USPIO).

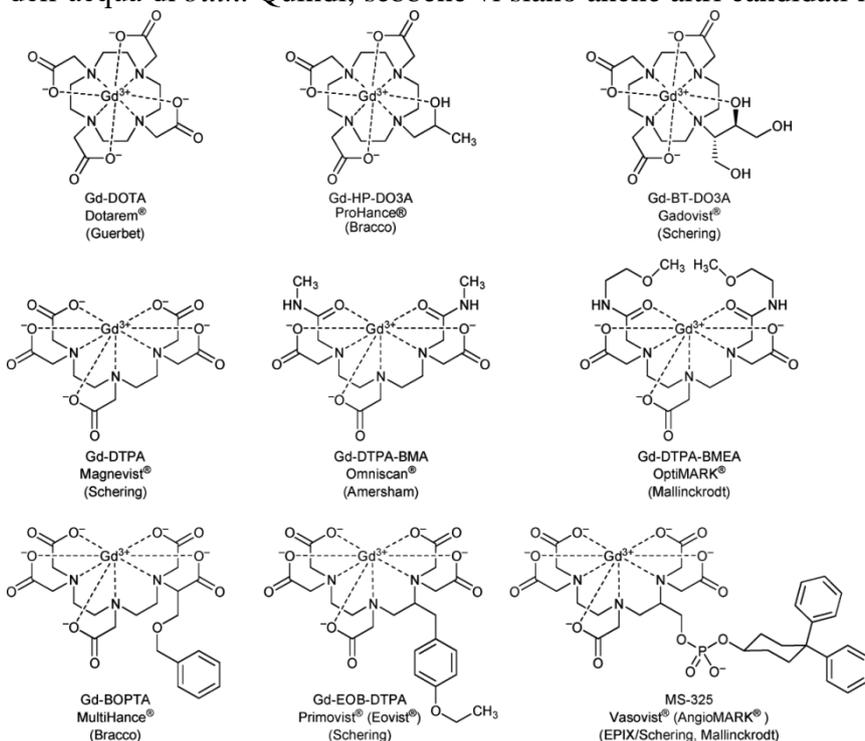
In pratica essi sono fatti da particelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}_2\text{O}_3$  di composizione non-stoichiometrica e di dimensioni da alcuni nanometri a parecchie decine di nanometri, coperte da polimeri biocompatibili (e.g. destrani o polisilossani) per rallentarne la decomposizione. La figura mostra un'immagine ("pesata" in  $T_1$ ) di un cervello dopo un infarto; si vede che solo la presenza di un agente di contrasto (a destra) riesce ad evidenziare chiaramente un danno nella barriera emato-encefalica.

Inoltre, tutti i CA possono venire suddivisi in base al loro sito di azione in agenti extracellulari non-specifici, organo-specifici e del sangue.

Nella pratica clinica, si valuta che nei soli USA vengono effettuati più di 30 milioni di *scan* MRI ogni anno, con un costo che supera i 20 milioni di dollari. Più del 40% degli esami MRI (cioè parecchi milioni al mondo ogni anno) vengono effettuati con l'uso di un agente di contrasto. I CA più utilizzati in clinica sono i  $T_1$ -CA basati su complessi di Gd(III) ed essi verranno trattati più in dettaglio. L'uso di nanoparticelle di ossidi di ferro è piuttosto limitato, si valuta meno del 10% di tutte le somministrazioni di agenti di contrasto. Dal momento che la concentrazione dei protoni dell'acqua contenuta nei tessuti è molto elevata (ca. 90 M), l'effetto dei CA deve essere di tipo **catalitico**, cioè deve essere amplificato. Se fosse direttamente proporzionale alla concentrazione del CA, come per i radio-farmaci, non si potrebbe vedere alcun effetto.

## Agenti di contrasto di gadolinio(III)

In un buon agente di contrasto basato su un catione metallico paramagnetico, il tempo di rilassamento intrinseco dello stato di **spin elettronico del catione** deve essere abbastanza lungo per permettere l'efficiente trasferimento dell'informazione magnetica ai nuclei degli idrogeni dell'acqua di *bulk*. Quindi, sebbene vi siano anche altri candidati nella serie dei lantanidi che hanno



un elevato momento magnetico intrinseco (cioè tanti elettroni spaiati), la posizione (attualmente) prevalente del Gd(III) è dovuta non solo al fatto che esso possiede un elevato momento magnetico intrinseco (7.9 BM) dovuto ai 7 elettroni spaiati di tipo f, ma anche al fatto che il suo stato di spin elettronico è totalmente simmetrico (un termine di *ground state*  $^8S_{7/2}$ ), in conseguenza del quale il suo tempo di rilassamento elettronico è molto più lungo che per gli altri ioni lantanidici Ln(III), dell'ordine  $10^{-8} - 10^{-9}$  s. Da notare che, sebbene i CA a base di Gd(III) diminuiscano

sia il tempo di rilassamento longitudinale che quello trasversale, la variazione percentuale nel tessuto per la velocità di rilassamento longitudinale è molto molto maggiore e di conseguenza questi agenti si visualizzano meglio con *scan* "pesati" su  $T_1$  ( $T_1$ -weighted scans). Comunque, il maggior problema per l'applicazione medica di ioni di metalli pesanti come il Gd(III) è la notevole tossicità dello ione libero, cioè l'acqua-ione ( $\text{LD}_{50} = 0.2 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  nel topo). In anni recenti si è infatti evidenziato che trattamenti prolungati con CA di gadolinio inducono tossicità renale (*nephrogenic systemic fibrosis*), soprattutto in pazienti già affetti da problemi renali. Quindi, per l'uso clinico, il Gd(III) deve essere legato all'interno di un complesso di elevata stabilità sia termodinamica che cinetica nei confronti di reazioni di trans-chelazione e trans-metallazione: cioè lo ione gadolinio non

deve venire scambiato con altri chelanti biologici né venir sostituito da altri ioni metallici biologici, come  $Zn^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ .

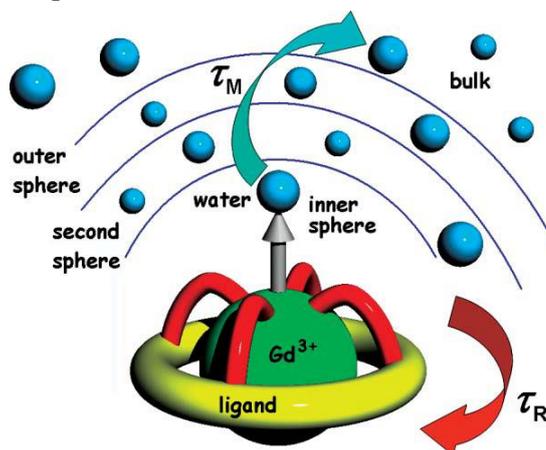
Per questo scopo, cioè per ottenere complessi stabili e inerti, sono stati sviluppati sostanzialmente due tipi di chelanti organici, gli stessi già incontrati nei radiofarmaci: derivati del tetra-aza macrociclo a 12 membri cyclen (cyclen = 1,4,7,10-tetraazaciclodododecano) e derivati di triammine acicliche (in particolare della dietilene-triammina) con molti bracci chelanti (soprattutto con funzioni carbossiliche), noti rispettivamente come derivati di tipo **DOTA** e **DTPA**, in modo tale da fornire una coordinazione ottadentata allo ione  $Gd(III)$ . Ricordiamo che i lantanidi sono ioni grandi e di natura *hard* e hanno elevati numeri di coordinazione, tipicamente almeno 8 o 9. In questi complessi il numero di coordinazione del  $Gd(III)$  è 9, con l'ultimo sito occupato da una molecola di



$H_2O$  che è cruciale per il meccanismo di contrasto (vedi dopo). In figura vengono mostrati i 9 complessi di  $Gd(III)$  usati clinicamente al momento; fra di essi i primi 6 hanno applicazioni generiche, cioè sono dei cosiddetti **agenti extracellulari non-**

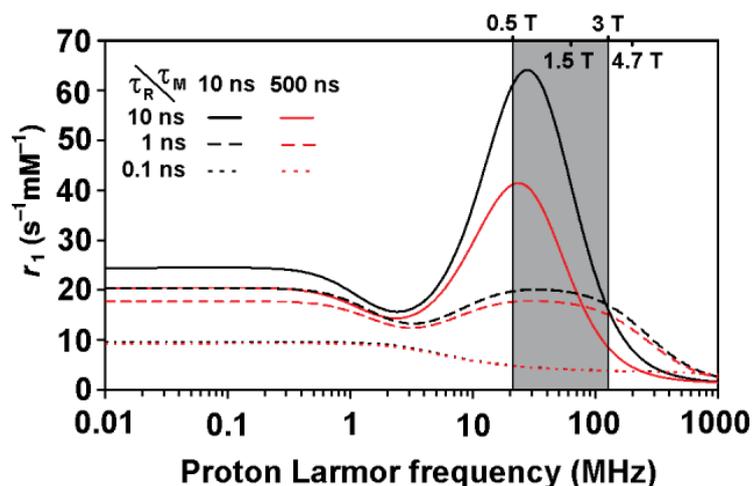
**specifici**. In seguito a iniezione intravenosa questi composti si distribuiscono rapidamente tra plasma e spazi interstiziali (cioè nel fluido extra-cellulare) e sono infine eliminati con l'urina con tempi di semi-vita di circa 1.6 h. Nelle malattie neurologiche, questi CA sono particolarmente utili per individuare lesioni risultanti dal danneggiamento della barriera emato-encefalica. Invece MultiHance<sup>®</sup> e Primovist<sup>®</sup> sono specifici per il fegato (essendo più lipofili) e Vasovist<sup>®</sup> per il flusso sanguigno (CA angiografico). Quest'ultimo, anche in seguito al legame con l'albumina (vedi dopo), rimane intravascolare, consentendo di ottenere un'immagine dei vasi sanguigni. La figura mostra la differenza fra il pre-contrasto (a sinistra), il contrasto ottenuto con un CA extracellulare (al centro) e con uno angiografico. Le dosi possono essere di poche micromoli per kg (per Primovist<sup>®</sup>), ma molto più comunemente sono dell'ordine di 0.1 – 0.3 millimoli per kg, cioè si somministrano grammi di composto di Gd per ogni *scan*, ossia quantità molto più grandi di quelle utilizzate per i radio-farmaci. In altre parole, la tecnica MRI è molto meno sensibile di SPECT e PET.

L'efficacia di un agente di contrasto è misurata come la capacità di una sua soluzione 1 mM di aumentare la velocità di rilassamento longitudinale  $R_1$  ( $= 1/T_1$ ) dei protoni dell'acqua ed è chiamata **relattività** (*relaxivity*,  $r_1$ ). Secondo la **teoria di Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM Theory)**, la relattività è governata da un numero di parametri chimico-fisici, caratteristici della struttura del complesso e della sua dinamica in soluzione. Quelli che possono essere controllati chimicamente (figura) sono ovviamente di primaria importanza nel *design* dei leganti. Essi sono: 1) il numero di molecole di acqua direttamente coordinate al  $Gd(III)$  ( $q$ , molecole di acqua di sfera interna); infatti il  $Gd^{3+}$  induce il rilassamento dei protoni dell'acqua tramite un meccanismo dipolare e l'effetto dipende dalla distanza tra i nuclei secondo  $1/r^6$  e perciò è fondamentale che ci siano una o più molecole di acqua labili, cioè scambiabili con quelle di *bulk*, nella sfera di coordinazione interna. 2) il tempo di correlazione rotazionale, il cosiddetto *tumbling time* molecolare del complesso ( $\tau_R$ ). 3) il tempo di residenza delle molecole di acqua coordinate ( $\tau_M$ ); tanto più questo è piccolo e tanto più rapidamente il rilassamento viene trasferito tramite la molecola coordinata all'acqua di *bulk*. 4) Le interazioni del complesso con le molecole di acqua nella seconda sfera di coordinazione e con quelle più esterne (il numero di idratazione  $q_{SS}$  e il tempo medio di residenza  $\tau_{MSS}$ ); 5) parametri elettronici, cioè essenzialmente il tempo di rilassamento elettronico dello ione paramagnetico;



questo deve essere il più lungo possibile per rilassare in modo più efficiente l'acqua coordinata. In molecole con *tumbling* veloce, questo parametro è più importante di  $\tau_M$  per determinare la rilassività.

Questi parametri possono essere valutati e misurati indipendentemente. Valori tipici di tali parametri per  $T_1$ -CA usati in clinica sono: una molecola di acqua coordinata, più di 100 ns per  $\tau_M$  e 0.1 ns per  $\tau_R$ . **Valori ottimali** per un campo magnetico di 1.5 T (che è quello più comunemente usato negli attuali scanner per MRI, ma gli strumenti moderni si spostano rapidamente verso 3T per aumentare sensibilità e risoluzione) dovrebbero essere circa 10 ns per  $\tau_M$  (cioè le molecole d'acqua nella sfera interna dovrebbero scambiare più rapidamente con l'acqua di *bulk*) e almeno 10 ns per  $\tau_R$



(cioè il moto di rotazione della molecola dovrebbe essere più lento). La discrepanza fra valori reali ed ottimali comporta che la rilassività di questi complessi sia piuttosto bassa, tipicamente dell'ordine di  $5 s^{-1} mM^{-1}$ , mentre secondo il modello della teoria SBM dovrebbe essere teoricamente possibile ottenere valori anche 20 volte superiori, ottimizzando tutti i parametri attraverso il *design* del legante (figura). La figura mostra le simulazioni calcolate dei profili di rilassività in funzione di diversi valori di  $\tau_R$  e del tempo di residenza dell'acqua

$\tau_M$  per valori fissi dei parametri elettronici. E' chiaro che ogni campo magnetico richiede diversi parametri ottimali di  $\tau_R$  e  $\tau_M$  e che la massima rilassività può essere ottenuta per campi magnetici corrispondenti alla frequenza di Larmor del protone (10 – 70 MHz per campi magnetici da 0.24 a 1.65 T) per valori di  $\tau_R$  più alti possibile e valori di  $\tau_M$  nel range 10 – 50 ns. Per campi magnetici più elevati (100–400 MHz per la frequenza di Larmor) la situazione cambia e sono preferibili valori ancora più piccoli di  $\tau_M$ , e  $\tau_R$  dovrebbe avere un valore intermedio. In pratica, CA adatti per campi magnetici elevati dovrebbero avere pesi molecolari (e quindi dimensioni, cioè  $\tau_R$ ) intermedi e velocità di scambio dell'acqua molto elevata. Ovviamente, un aumento dell'efficacia del complesso, cioè del suo valore di  $r_1$ , consentirebbe di diminuire le dosi somministrate.

Negli ultimi 20 anni vi è quindi stata una intensa attività di ricerca per migliorare le proprietà del legante; in particolare la struttura del complesso deve essere modificata in modo tale da aumentare la velocità di scambio dell'acqua coordinata di 10 volte e da aumentare il *tumbling time* (cioè diminuire la velocità di rotazione molecolare) di due ordini di grandezza. Si è visto che effettivamente alcuni dei parametri citati sopra (in particolare  $q$ ,  $\tau_M$  e  $\tau_R$  e la seconda sfera di idratazione) possono venire modificati su una base chimica tramite opportuno *design* del legante. Altri parametri fisici presenti nella teoria SBM, come il rilassamento elettronico del Gd(III) (punto 5 sopra), sebbene dipendano intrinsecamente dalla struttura del complesso, sono (per ora) difficilmente prevedibili e modificabili razionalmente. In generale, si può dire che un rilassamento elettronico troppo veloce porta ad una significativa riduzione della rilassività complessiva. Sembra che una disposizione altamente simmetrica degli atomi donatori del chelante fornisca complessi di Gd(III) con tempi di rilassamento elettronico più elevati (e quindi preferibili).

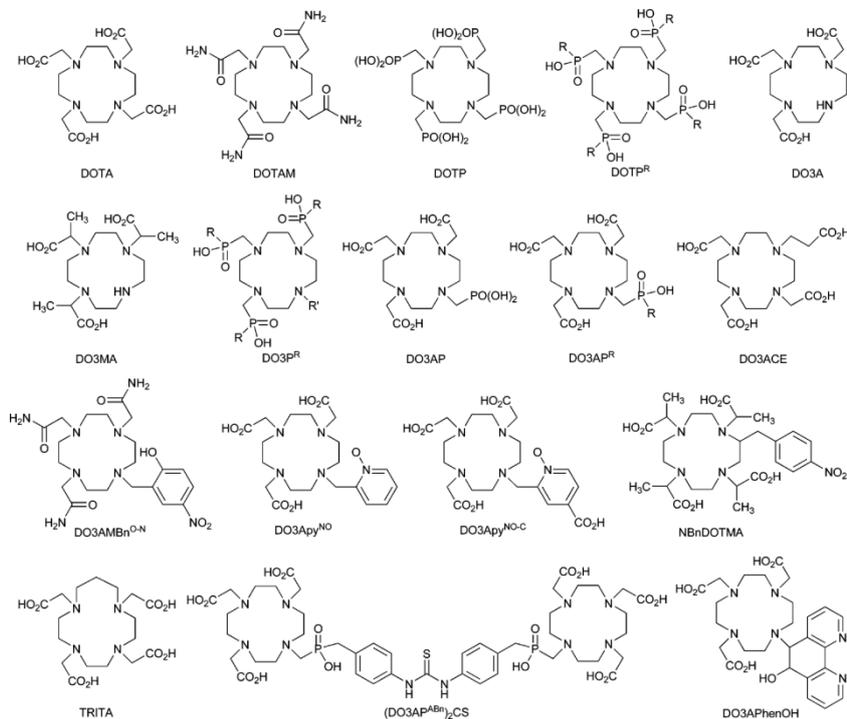
Infine vi è naturalmente il problema della localizzazione degli agenti di contrasto nell'organo o tessuto bersaglio. Gli agenti di contrasto per MRI vengono comunemente trasportati nel corpo dal sistema vascolare, ma l'interesse medico è focalizzato su particolari organi o tessuti e sulla loro funzionalità; quindi si è cercato di modificare le caratteristiche strutturali di DOTA e DTPA non solo per modificare i parametri citati sopra, ma anche per cercare di ottenere **selettività di organo e/o di tessuto** e anche per renderli sensibili a variazioni chimico-fisiche nel loro micro-ambiente,

come pH, concentrazione di O<sub>2</sub>, concentrazione di ioni, temperatura, attività enzimatica (questi ultimi vengono definiti anche *Responsive Contrast Agents, RCA*). Alcuni **RCA** vengono utilizzati anche in ricerca preclinica e nello studio di processi di biologia molecolare (ad esempio RCA che cambiano la rilassività in seguito alla rottura di alcuni specifici legami chimici o che siano sensibili

alla presenza di ioni o metaboliti specifici).

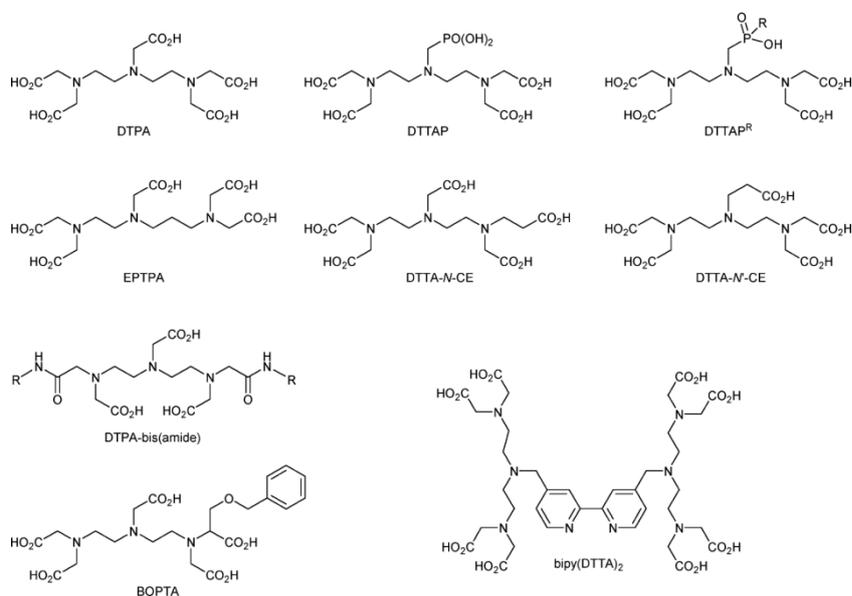
### Leganti per MRI

Con lo scopo di ottenere agenti di contrasto più efficaci, sono stati investigati molti leganti derivati dal DOTA (**DOTA-like**) e da DTPA (**DTPA-like**). Il prototipo DOTA si lega come tetra-anione al Gd(III); i 4 atomi N ed i 4 atomi O formano due piani paralleli e sfalsati nella sfera di coordinazione, a dare una geometria di antiprisma quadrato; il piano O<sub>4</sub> è sormontato dalla molecola di acqua coordinata. Sono possibili 4 diastereoisomeri (λ o δ) dei gruppi etilenici del



macrocielo e dell'orientazione Λ o Δ dei bracci acetato. Una serie di leganti DOTA-like è riportata in figura. Sono state saggiate funzionalità diverse dai carbossilati nei bracci laterali. Il **DO3A** e suoi derivati, che hanno soltanto tre bracci laterali, sono chelanti eptadentati, quindi i loro derivati hanno due molecole di acqua nella sfera di coordinazione interna, e quindi dovrebbero aumentare la rilassività (a scapito della stabilità termodinamica e cinetica del chelato). Tuttavia le due molecole d'acqua coordinate sono presenti solo in soluzioni acquose pure e diluite, mentre *in vivo* vengono sostituite da bio-leganti anionici chelanti come carbonato, citrato, amminoacidi,...e, ad alte concentrazioni, si formano anche specie dimeriche.

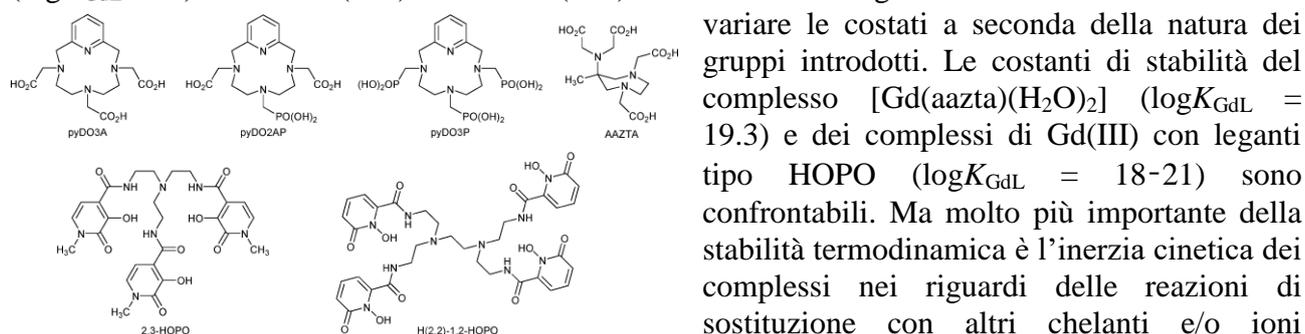
Anche derivati del DTPA possono fornire una coordinazione eptadentata, quando il carbossile del braccio sull'azoto centrale della dietilentriammina è rimpiazzato da un sostituito che non coordini al Gd(III) (ad esempio bipy(DTTA)<sub>2</sub> in figura).



Dal momento che i CA passano attraverso i reni, dove il pH è acido (può raggiungere valori intorno a 4.5) è importante che essi presentino una *long-term stability* (sia termodinamica che cinetica) a questi valori bassi di pH. In generale, dal punto di vista cinetico i complessi con leganti macrociclici tipo DOTA sono più inerti di quelli con leganti aperti tipo DTPA (e quindi sono potenzialmente meno tossici).

Recentemente sono stati introdotti nuovi prototipi di leganti eptadentati (AAZTA e derivati), e altri basati su unità idrossipiridinone (HOPO) legate a scheletri poliamminici, e.g. tren (figura). Il 2,3-HOPO, pur essendo esadentato, ha una costante di formazione molto alta (vedi dopo), probabilmente perché ha solo atomi donatori di O e viene così meglio incontro alle preferenze dello ione *hard*  $Gd^{3+}$ . Il complesso è complessivamente ottacoordinato, con  $q = 2$ , con una relassività di  $10.5 \text{ mm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , cioè praticamente doppia rispetto a quella degli agenti utilizzati clinicamente. Il complesso tuttavia, essendo neutro, non è molto solubile. Come è facilmente immaginabile, è in atto un gran lavoro di ricerca volto a funzionalizzare e migliorare la struttura di base e sono stati sintetizzati molti leganti tipo-HOPO i cui complessi col gadolinio spesso presentano buona stabilità e proprietà relassometriche migliori rispetto a quelli con derivati di DOTA e DTPA.

La stabilità termodinamica dei complessi di Gd con leganti otta- ed epta dentati (L) capostipiti tipo DOTA, DTPA e DO3A, misurata come  $\log K_{GdL}$  è molto elevata, e aumenta nell'ordine DO3A ( $\log K_{GdL} \sim 21$ ) < DTPA ( $\sim 22$ ) < DOTA ( $\sim 24$ ). Modifiche dei leganti nelle catene laterali fanno



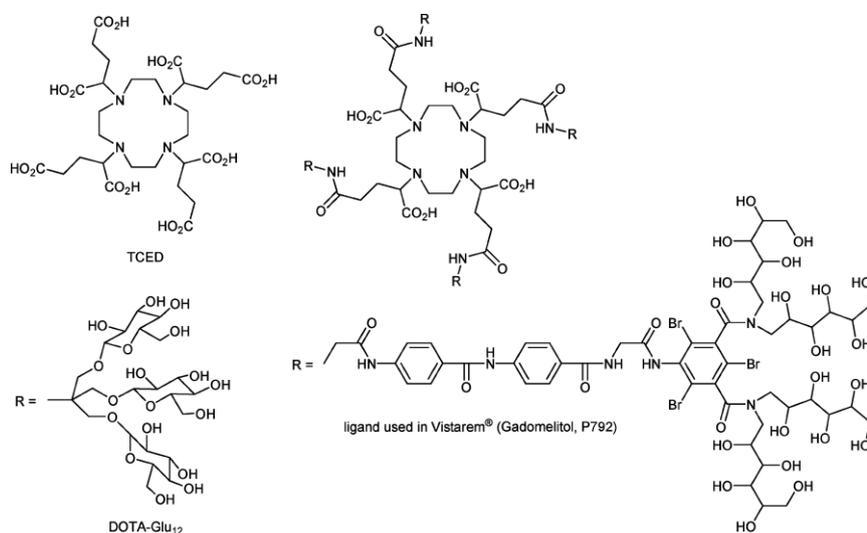
variare le costanti a seconda della natura dei gruppi introdotti. Le costanti di stabilità del complesso  $[Gd(aazta)(H_2O)_2]$  ( $\log K_{GdL} = 19.3$ ) e dei complessi di Gd(III) con leganti tipo HOPO ( $\log K_{GdL} = 18-21$ ) sono confrontabili. Ma molto più importante della stabilità termodinamica è l'inerzia cinetica dei complessi nei riguardi delle reazioni di sostituzione con altri chelanti e/o ioni

metallici presenti nell'organismo. Particolarmente studiate, per valutare la stabilità cinetica, sono le reazioni di trans-metallazione (e.g. sostituzione del  $Gd^{3+}$  con  $Zn^{2+}$ ) e la de-complessazione in condizioni acide (per mimare la situazione nei reni). In genere, si può dire che i leganti macrociclici tipo-DOTA formano complessi più stabili anche dal punto di vista cinetico (anche a pH leggermente acido) rispetto a quelli a catena aperta.

## Design dei complessi e parametri che influenzano la relassività

Per ottenere un agente con elevata relassività e di uso pratico si deve idealmente realizzare la massimizzazione di ciascun parametro rilevante e la loro combinazione ottimale, mantenendo la stabilità del chelato e la solubilità. In generale si può dire che, con i chelanti visti sopra, il metallo è circondato dal legante (i complessi sono tutti termodinamicamente molto stabili: quello "meno" stabile fra i 9 composti utilizzati clinicamente, Gd-DTPA-BMA, ha un  $pGd = 15.8$ .) e il numero di molecole di acqua coordinate dipende non solo dal numero di atomi donatori, ma anche dalla dimensione dei gruppi donatori e dalla geometria del poliedro di coordinazione. Come già detto, chelanti epta- o esa-dentati favoriscono in teoria la coordinazione di più molecole di acqua, ma in realtà i loro complessi formano facilmente dimeri o polimeri e le molecole d'acqua sono facilmente sostituite da piccoli bio-leganti (il ché porta al *quenching* della relassività del complesso). In teoria, la relassività di un complesso con 2 molecole di acqua nella sfera interna dovrebbe essere il doppio di quella di complessi con una sola molecola coordinata. La formazione di addotti ternari con piccoli anioni in soluzione è soppressa quando il complesso abbia una carica negativa. Al momento i complessi di Gd(III) con AAZTA e HOPO hanno sicuramente 2 molecole di acqua coordinate e la loro relassività non è molto influenzata dalla presenza in soluzione di piccoli leganti. Tuttavia non ci sono ancora sufficienti dati sulla stabilità cinetica (estremamente importante per la tossicità) di questi complessi.

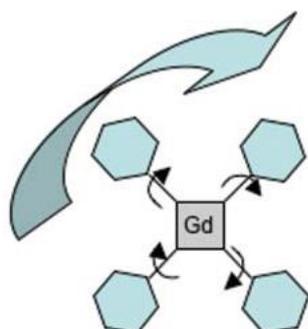
Un altro parametro importante per la rilassività di un complesso è  $\tau_M$ , il tempo di permanenza nella sfera di coordinazione della molecola di acqua coordinata al gadolinio. Il tempo di residenza dovrebbe essere ragionevolmente corto per aumentare la rilassività; valori di 10–30 ns sono ideali per campi di 1.5 T (cioè 60 MHz). Tuttavia, per i magneti più potenti che diventeranno commerciali nei prossimi anni (fino a 11.7 T corrispondenti a 500 MHz) saranno necessari  $\tau_M$  più brevi, 1 – 10 ns, possibilmente vicini a quelli di scambio dell'acqua in  $[\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$  (1.2 ns). Il valore di  $\tau_M$  dipende essenzialmente dalla carica del complesso, dalla accessibilità del solvente, dai parametri sterici intorno al sito di coordinazione dell'acqua (quindi dalla struttura e conformazione del complesso), e dal meccanismo di scambio dell'acqua (dissociativo o associativo). Complessi con carica negativa hanno tempi molto più brevi (50 – 300 ns) rispetto a quelli dei complessi neutri o carichi positivamente (che hanno  $\tau_M$  che possono arrivare a millisecondi). In genere, la presenza di sostituenti ingombranti intorno al sito di coordinazione accelera la velocità di scambio dell'acqua; inoltre è preferibile una certa flessibilità nella geometria della sfera di coordinazione. Per i derivati tipo DOTA, il valore di  $\tau_M$  dipende anche dallo stereoisomero prevalente in soluzione. In generale, il valore di  $\tau_M$  non influenza in modo significativo la rilassività dei CA con basso peso molecolare



(cioè con valori di *tumbling time* piccoli), tuttavia questo parametro deve venire ottimizzato per CA che abbiano un lento movimento di *tumbling*, cioè  $\tau_R$  grande (vedi dopo).

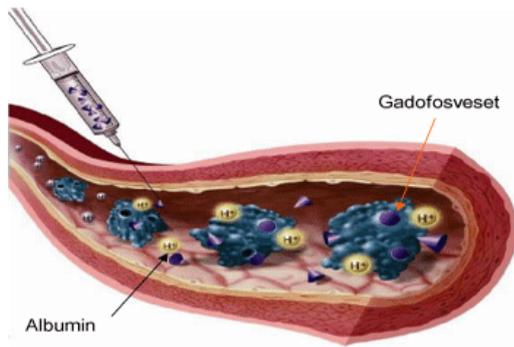
Per quanto riguarda i parametri della seconda sfera di coordinazione,  $q_{SS}$  e  $\tau_{MSS}$ , il tempo di residenza delle molecole di acqua  $\tau_{MSS}$  è molto più corto di  $\tau_M$  (teoricamente dell'ordine di picosecondi). Il contributo di

questi parametri alla rilassività complessiva può essere rilevante, e in certi casi superare addirittura il contributo della prima sfera di coordinazione. La strategia è quella di avere dei gruppi periferici, tipo acidi fosfonici o –OH, in grado di dare legami a idrogeno con le molecole di acqua e quindi aumentarne il numero. Ad esempio, il legante DOTA-like denominato TCED (figura) è stato funzionalizzato con catene laterali ricche di gruppi –OH. Il derivato con le funzioni polisaccaridiche Vistarem® (oltre ad aumentare  $\tau_R$ , vedi dopo) aumenta anche la seconda sfera di molecole di H<sub>2</sub>O arrivando a una rilassività di circa  $23 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



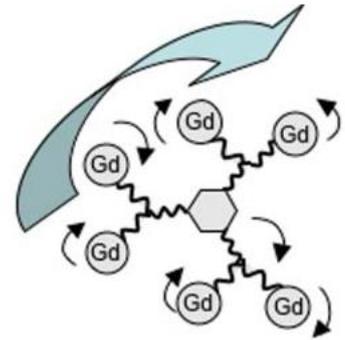
Come già detto, il tempo di correlazione rotazionale  $\tau_R$  (*tumbling time*) è un parametro fondamentale. Si può dire che nei sistemi in cui questo parametro è stato ottimizzato, l'intera rilassività è controllata dal tempo di correlazione rotazionale. Per rallentare i movimenti di riorientazione dei complessi di gadolinio (cioè aumentare  $\tau_R$ ) sono state usate diverse strategie. In genere un aumento di  $\tau_R$  è conseguenza di un aumento del volume molecolare del complesso. Ad esempio, una strategia elegante per aumentare  $\tau_R$  consiste nel posizionare il Gd(III) nel baricentro della molecola, così che il *tumbling time* molecolare venga trasferito efficacemente alla rotazione del vettore del legame Gd–OH<sub>2</sub>, cioè il Gd

può solo ruotare alla velocità dell'intera molecola. Ad esempio, passando da  $[\text{Gd}(\text{dota})(\text{H}_2\text{O})]^-$  a  $[\text{Gd}(\text{dota-Glu}_{12})(\text{H}_2\text{O})]^-$  (figura) si ha un aumento di peso molecolare da circa 500 a circa 3200 e di conseguenza la rilassività aumenta da circa  $4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a circa  $23.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

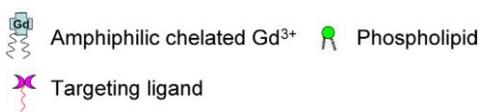
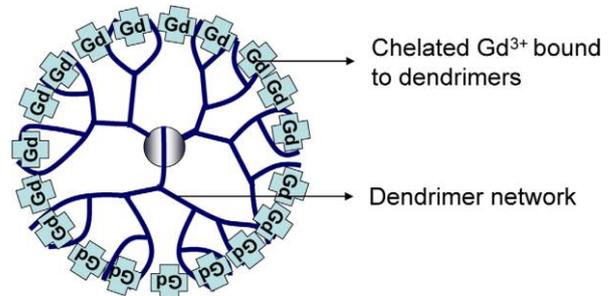


La presenza di interazioni non-covalenti è un altro modo per rallentare il *tumbling time* molecolare. Un approccio in questo senso è quello di posizionare catene periferiche idrofobiche che facilitano la interazione del complesso con l'albumina (*Human Serum Albumine*, HSA). L'esempio più noto di questo approccio è il complesso MS-325 (Vasovist<sup>®</sup>, vedi figura prima), la cui relaxività aumenta da 5 a 40 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> in presenza di HSA. Da notare tuttavia che spesso l'aumento di  $\tau_R$  dovuto al *binding* con una macromolecola (e.g. albumina) comporta anche un

aumento del tempo di scambio dell'acqua coordinata,  $\tau_M$ , che influisce negativamente sulla relaxività! Un altro approccio (di tipo non supramolecolare) consiste nel legare covalentemente un certo numero di complessi di Gd(III) a un *carrier* macromolecolare o a un dendrimero (figura). Per questo approccio servono dei leganti bifunzionali (vedi anche complessi per radio-diagnostica). Se il *carrier* e/o i *linker* sono flessibili e permettono movimenti di *tumbling* locale dei complessi di Gd, l'aumento complessivo di  $\tau_R$  è tipicamente sempre inferiore a quanto atteso. Quindi per CA polimerici, sia i *linker* che il *carrier* polimerico dovrebbero essere più rigidi possibile e possibilmente di forma sferica (piuttosto che lineare) per aumentare il *tumbling time* e quindi la relaxività.



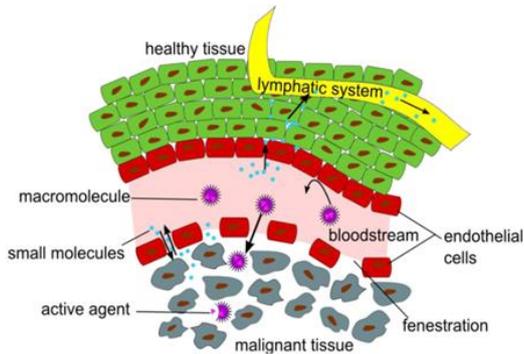
L'utilizzazione di vettori biologici, come anticorpi monoclonali o peptidi, per il *targeting* dei CA sarebbe molto utile sia per le applicazioni diagnostiche che per quelle di biologia molecolare. Tuttavia queste molecole sono molto costose e, in generale, non possono essere usate in dosi simili a quelle dei CA già in uso clinico. Inoltre, la concentrazione nell'organismo dei recettori corrispondenti a questi vettori non è sufficientemente elevata (cioè la sensibilità del metodo è ancora troppo bassa). Per aumentare la sensibilità dei CA per MRI ci sono sostanzialmente due strategie: una è quella di ottimizzare la sensibilità, ovvero la relaxività, del singolo CA (come già visto), l'altra è quella di sviluppare delle **strategie di amplificazione**, per concentrare un elevato numero di CA (e.g. ioni Gd(III)) in uno



spazio relativamente piccolo, in modo da avere una relaxività complessiva (non specifica) molto elevata. Sono stati tentati diversi approcci, generando aggregati multi-Gd sia di tipo covalente (e.g. polimeri, dendrimeri, nanotubi, nanoparticelle ...) o non-covalente (e.g. liposomi, micelle, o anche proteine come l'apoferritina o l'albumina come nel caso del Magnevist già discusso). Esempi generici di un dendrimero e di un liposoma "targettato" sono illustrati nelle figure. Questo aumento servirebbe soprattutto per portare la tecnica MRI a livello cellulare, come per i radiofarmaci, abbinando i CA a dei *targeting vectors*. Con gli attuali CA di Gd questo non è possibile. Come già detto, un CA commerciale di Gd, con una relaxività di circa 5 mM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>, per dare un contrasto visibile deve raggiungere

una **concentrazione di almeno 125  $\mu$ M**. In caso di un'ipotetica *targeted imaging*, assumendo una

stechiometria di binding 1 : 1 tra Gd e molecola bersaglio, questo richiederebbe che il bersaglio biologico fosse presente a una concentrazione almeno 125  $\mu\text{M}$ ! Quindi è chiaro che per raggiungere un *imaging* a livello molecolare la rilassività specifica e/o il numero di Gd per molecola deve aumentare.

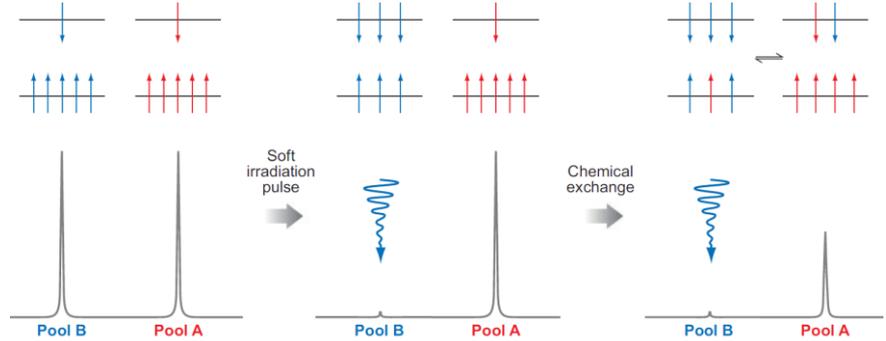


Per CA di dimensioni sufficientemente grandi, è anche possibile sfruttare l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*, figura) per il *targeting* dei tumori.

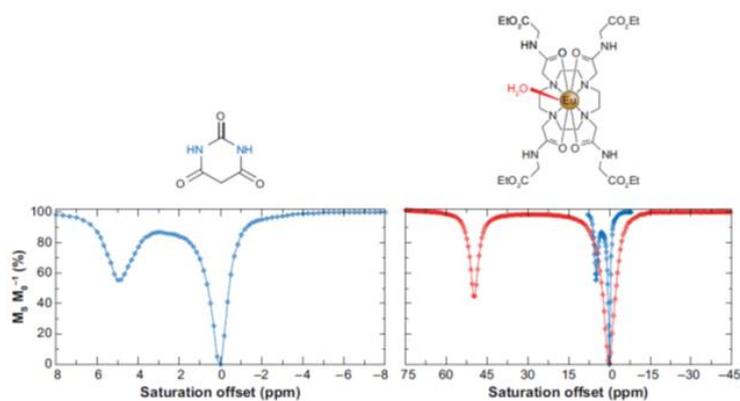
Infine è molto probabile che in futuro verranno sviluppati **probe multimodali**, cioè molecole che permettano di combinare diversi tipi di *imaging*, ad esempio la combinazione di MRI con fluorescenza, SPECT, PET, etc (sempre tenendo conto però della diversa sensibilità di ciascuna tecnica).

### CEST Agents (*Chemical Exchange Saturation Transfer*)

Questa metodologia emergente sfrutta un parametro della tecnica MRI finora non utilizzato e cioè la **frequenza**. La tecnica denominata CEST si basa sull'utilizzo di composti mobili che contengano dei protoni in scambio lento con l'acqua di *bulk* (e.g. molecole di  $\text{H}_2\text{O}$  coordinata a ioni metallici, o gruppi  $-\text{NH}$  o  $-\text{OH}$ ) e sullo sfruttamento della ben nota procedura di trasferimento di saturazione (*saturation transfer*). In questa tecnica, saturando la frequenza di risonanza caratteristica dell'agente (una banda relativamente stretta e quindi *sharp*), la saturazione viene trasferita dai protoni mobili in scambio a quelli dell'acqua di *bulk*, diminuendone l'intensità (come illustrato in figura) e generando così il contrasto. Il requisito fondamentale per un agente CEST è che la velocità di scambio tra i suoi protoni mobili e i protoni dell'acqua di *bulk* ( $k_{\text{CEST}}$ ) sia lenta, o meglio sia più piccola della differenza tra le frequenze di assorbimento dei protoni in scambio (cioè  $k_{\text{CEST}} < \Delta\omega$ ). Se non si verifica questa condizione, cioè se lo scambio è troppo veloce, non si vede un segnale distinto per l'agente CEST, ma la sua risonanza e quella dell'acqua di *bulk* danno un'unica risonanza mediata (cioè avviene la coalescenza delle due risonanze). Una peculiarità unica degli agenti CEST è che il contrasto viene generato "*on demand*", cioè solo quando viene "accesa" la frequenza che satura la risonanza dei protoni in scambio CEST. Di conseguenza, l'immagine pre-contrasto può venire registrata quasi simultaneamente a quelle post-contrasto dal momento che la loro acquisizione differisce solo sullo stato on/off della frequenza di saturazione. Inoltre, con gli agenti CEST è possibile, somministrando più agenti diversi, oppure un solo agente che abbia diversi tipi di protoni in scambio lento, cioè che abbiano frequenze di risonanza diverse (ad esempio protoni di acqua coordinata al metallo e di gruppi del legante), visualizzare più di un agente nella stessa immagine e anche nella stessa regione di spazio (solo cambiando la frequenza di saturazione). Per esempio, potrebbe essere possibile inserire in due tipi diversi di cellule due diversi agenti CEST, iniettarle contemporaneamente e seguire la loro distribuzione nel tempo via MRI. Oppure seguire nel tempo due (o più) parametri in un tessuto, ad esempio pH e concentrazione di un metabolita.



La diminuzione dell'intensità della risonanza in seguito al trasferimento di saturazione dall'agente CEST (cioè in seguito alla saturazione della sua risonanza) dipende da diversi parametri. Infatti, il trasferimento di saturazione dal CEST all'acqua di *bulk* dipende da  $k_{\text{CEST}}$ , dalla concentrazione dell'agente CEST e dal numero di protoni mobili fra loro equivalenti (o pseudo-equivalenti, cioè molto simili magneticamente) che vengono saturati applicando la radiazione di opportuna frequenza ed intensità. Gli agenti CEST possono essere sia diamagnetici che paramagnetici (**PARACEST**). Quelli diamagnetici hanno due limiti: la differenza di *chemical shift* tra la risonanza dei protoni da saturare e quella dell'acqua di *bulk* è piccola (in genere < 5 ppm) e questo fa sì che i processi di scambio sfruttabili debbano essere relativamente lenti (se fossero veloci il segnale coalescerebbe con quello dell'acqua) e rende inevitabile che avvenga la parziale involontaria saturazione del segnale dell'acqua di *bulk*, diminuendo il contrasto. Gli ioni paramagnetici dei lantanidi sono particolarmente utili come agenti CEST perché inducono grandi *chemical shift* per le risonanze dei protoni vicini: questo grande *saturation offset* rende possibile utilizzare processi di scambio più veloci. La figura rappresenta, lo spettro CEST di un agente diamagnetico, come l'acido barbiturico, confrontato sulla stessa scala a quello di un agente paramagnetico di Eu, dove i protoni in scambio sono quelli della molecola d'acqua coordinata, che è in scambio sufficientemente lento con l'acqua di *bulk*. Da notare che in questo caso, al contrario di quanto visto per i CA tradizionali, è necessario modificare il chelante, tipicamente introducendo



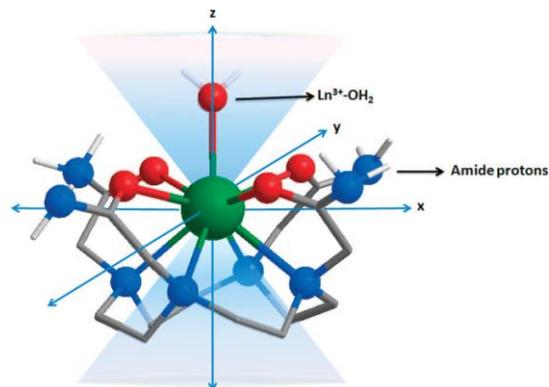
gruppi amidici, per fare sì che la velocità di scambio dei protoni dell'acqua coordinata al complesso paramagnetico non sia troppo veloce!

Finora i PARACEST più studiati sono tutti dello stesso tipo, cioè dei complessi di ioni lantanidi (3+) con due tipi diversi di protoni mobili: *i*) protoni di molecole d'acqua coordinate allo ione Ln(III) e/o *ii*) protoni mobili appartenenti al legante, tipicamente amidici. Dal momento che lo ione Gd<sup>3+</sup>, avendo 7 elettroni spaiati in 7 orbitali 4f, è isotropo, esso non può funzionare come agente di *shift*, ma altri ioni paramagnetici dei lantanidi con una **distribuzione anisotropica dei loro elettroni f** possono venire utilizzati, e inducono variazioni di *chemical shift* molto grandi dei protoni adiacenti, decine o anche centinaia di ppm. La tabella illustra le proprietà paramagnetiche degli ioni dei lantanidi. Il PRE è il *Paramagnetic Relaxation Enhancement* e il raggio della sfera gialla indica la distanza alla quale i segnali <sup>1</sup>H NMR subiscono un significativo accorciamento del tempo di rilassamento (si vede che il raggio è massimo per il Gd<sup>3+</sup>). Invece PCS è lo *Pseudo-Contact Shift*, il principale contributo che determina la variazione di *chemical shift* indotta da ciascuno ione sui nuclei vicini e le iso-superfici rappresentano la grandezza e il segno del *chemical shift*: si vede che è nullo per Gd<sup>3+</sup>, mentre è massimo per Tb<sup>3+</sup> e Dy<sup>3+</sup>.

Ln	La <sup>3+</sup>	Ce <sup>3+</sup>	Pr <sup>3+</sup>	Nd <sup>3+</sup>	Sm <sup>3+</sup>	Eu <sup>3+</sup>	Gd <sup>3+</sup>	Tb <sup>3+</sup>	Dy <sup>3+</sup>	Ho <sup>3+</sup>	Er <sup>3+</sup>	Tm <sup>3+</sup>	Yb <sup>3+</sup>	Lu <sup>3+</sup>
$\mu_{\text{eff}}/\mu\text{B calcd.}$	0.00	2.54	3.58	3.68	0.85	0.00	7.94	9.72	10.63	10.60	9.59	7.57	4.53	0.00
$\chi/10^{-32}\text{m}^3$	0.0	5.6	11.2	11.4	0.6	6.0	55.1	82.7	99.2	98.5	80.3	50.0	18.0	0
$\Delta\chi_{\text{ax}}/10^{-32}\text{m}^3$	0	2.1	3.4	1.7	0.2	-2.3	0	42.1	34.7	18.5	-11.6	-21.9	-8.3	0
$\Delta\chi_{\text{rh}}/10^{-32}\text{m}^3$	0	0.7	2.1	0.4	-0.1	-1.6	0	11.2	20.3	5.8	-8.6	-20.1	-5.8	0

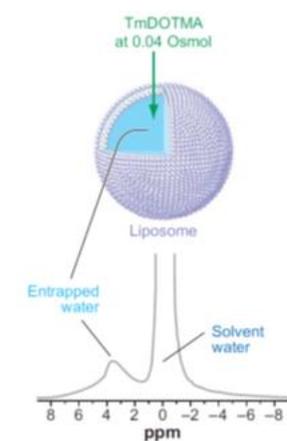
  

Per esempio, i complessi di tulio e disprosio corrispondenti a quello di europio della figura precedente inducono *chemical shift* di segno opposto, come si vede dai colori di PCS nella figura sopra, +500 ppm (Tm<sup>3+</sup>) e -720 ppm (Dy<sup>3+</sup>). La figura successiva mostra come in un tipico complesso Ln<sup>3+</sup>-DOTA-tetraamide la molecola d'acqua coordinata occupa una posizione apicale ed è quindi allineata con l'asse magnetico principale del complesso e perciò risente del *chemical shift* maggiore (vedi PCS nella tabella sopra), mentre i protoni amidici sono situati più lontani dal metallo e in una zona in cui il campo dipolare dello ione Ln<sup>3+</sup> (indicato dal cono blu) è quasi nullo, per cui essi hanno variazioni di *chemical shift* più piccole e di segno opposto.

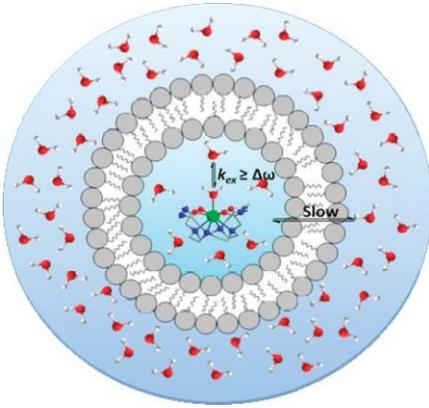


Il principale vantaggio degli agenti CEST, e in particolare PARACEST, rispetto ai convenzionali CA che abbreviano T<sub>1</sub>, è il tipo di informazioni che possono essere ottenute. Infatti, in linea di principio, ogni variazione di qualche parametro (e.g. pH, temperatura) che faccia variare la velocità di scambio dei protoni si rifletterà sui segnali CEST. Cioè i CA di tipo CEST hanno caratteristiche adatte per essere degli agenti di contrasto MRI reattivi (*Responsive* o *Smart*). La definizione di un **agente di contrasto reattivo** (*responsive*) è la seguente: è un agente che fa variare il contrasto di un'immagine in maniera diversa a seconda della presenza di un'altra specie biologica, o di una variazione in qualche parametro fisiologico o biochimico, come pH, concentrazione di O<sub>2</sub>, l'attività di qualche enzima, la presenza di particolari *marker* o metaboliti in un tessuto...

Uno dei maggiori limiti attuali degli agenti di contrasto CEST è che hanno una sensibilità piuttosto bassa: tipicamente la loro concentrazione per avere un contrasto osservabile (5%) deve essere 1 – 10 mM, mentre un CA classico di Gd produce un contrasto del 50% a concentrazioni di circa 50 μM. Un modo semplice (in teoria) di aumentare la sensibilità dei CA CEST è quello di aumentare il numero di protoni scambiabili. In questa ottica sono stati sviluppati i cosiddetti **lipoCEST**, cioè dei liposomi (cioè delle nano-vescicole, con diametro compreso fra 50 e 400 nm, la cui membrana consiste di un doppio strato fosfolipidico) “caricati” all'interno con degli agenti di *shift* paramagnetici (e.g. complessi di europio). In tali liposomi tutte le molecole di acqua presenti all'interno, che sono in scambio lento con quelle esterne (figura), non sono più magneticamente equivalenti a quelle di *bulk* e l'intero liposoma diventa così un'antenna CEST, potenzialmente con un aumento fino a 6 – 8 ordini di grandezza del numero di protoni in scambio



(rispetto ai due protoni di una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$  coordinata a  $\text{Eu}^{3+}$ !) portando una diminuzione del limite di rilevazione fino a 90 pM. In questo caso la velocità di scambio dell'acqua coordinata al lantanide con l'acqua di bulk all'interno del liposoma deve essere veloce, così che tutte le molecole di acqua interne risentano degli effetti paramagnetici del reagente di *shift* il più velocemente possibile. Quindi in questo caso il requisito CEST ( $\Delta\omega \gg k_{\text{ex}}$ ) deve essere soddisfatto dalla velocità

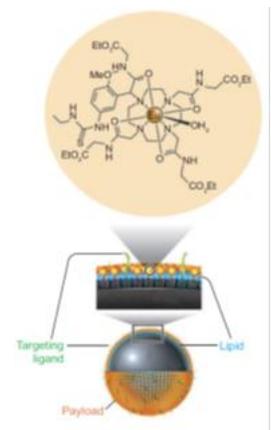


di scambio dell'acqua (o dei protoni) attraverso il doppio-strato lipidico. Poiché la massima concentrazione del reagente di *shift* nel liposoma è limitata dall'osmolarità, il *chemical shift* dell'acqua intra-liposomiale differisce poco da quella di bulk (da +4 a -4 ppm di differenza) e va a cadere nel tipico intervallo di specie endogene con protoni scambiabili che creano interferenze. Il concetto è illustrato in figura. Questo è il principale limite attuale all'utilizzo pratico dei lipoCEST. Un'altra possibilità è quella di ricoprire una nanoparticella con agenti CEST, come mostrato nella figura sotto.

Una evoluzione molto recente dei lipoCEST è quella dei cosiddetti

**CellCEST**, che sfrutta le molecole di acqua del citosol di una cellula – caricata con un opportuno agente di *shift* – come sorgenti dell'effetto CEST. In quest'ottica, i globuli rossi sono risultati particolarmente adatti.

La figura dopo illustra uno dei citati vantaggi dei CA CEST, cioè che in un singolo esperimento si possono usare diversi agenti che vengono selettivamente attivati solo quando si irradia la loro frequenza. L'immagine (in colori arbitrari) mostra dei capillari contenenti cellule dello stesso tipo caricate con differenti agenti PARACEST:  $[\text{Tb-DOTAMGly}]^-$  in B, il

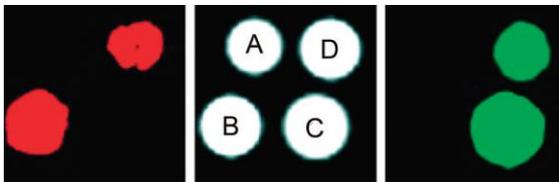


corrispondente

$[\text{Eu-DOTAMGly}]^-$  in C, mentre D

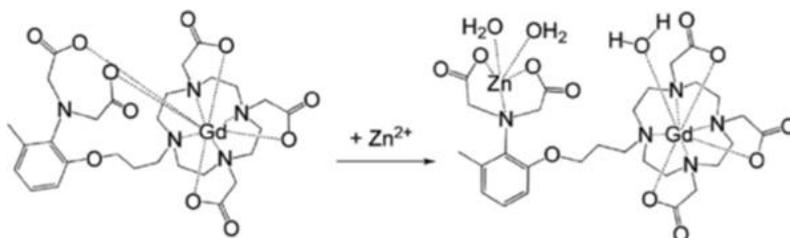
contiene una miscela delle due. Si vede che, irradiando

l'una o l'altra delle due frequenze è possibile evidenziare solo uno dei due agenti CEST.



### Agenti di contrasto per MRI reattivi (*responsive CA*)

Come già detto, gli attuali CA per MRI tipicamente operano nell'ambiente extracellulare. Con il progredire delle tecniche MRI verso una risoluzione cellulare, molta ricerca si sta rivolgendo allo sviluppo di agenti di contrasto che riescano a penetrare la membrane cellulare, in quanto la maggior parte dei processi fisiologici di interesse avvengono appunto nell'ambiente intracellulare (ad esempio legando il chelato col Gd a dei *cell penetrating peptides*). La strategia per lo sviluppo di agenti di contrasto reattivi (*responsive*) prevede che uno o più dei parametri che influenzano la rilassività ( $q$  o  $\tau_M$  per i CA tipo gadolinio, il *chemical shift* per i CEST) siano modulabili in modo che la rilassività indotta sia diversa prima e dopo il processo di attivazione. Dal momento che i sistemi in fase di studio sono ancora molto lontani da qualsiasi applicazione *in vivo* per i problemi già più volte citati (bassa sensibilità, scarsa penetrazione cellulare, stabilità cinetica e termodinamica..) viene mostrato qui un solo esempio per illustrare il concetto, un CA progettato



come sensore di ioni  $\text{Zn}^{2+}$ . Il chelato col gadolinio porta un legante che ha una elevata affinità per lo ione zinco. In assenza di zinco la rilassività è bassa perché  $q = 0$  a causa del legame dei carbossilati al Gd al

posto dell'acqua. In presenza di Zn(II) la rilassività raddoppia a causa (si ritiene) del fatto che diventa  $q = 1$ , come illustrato in figura.

### Altri agenti di contrasto

Come già detto (vedi terapia magnetotermica), nanoparticelle fatte di materiali ferromagnetici, quando siano al di sotto di una certa dimensione, possono esibire un tipo di magnetismo unico, detto **super-paramagnetismo**. Nanoparticelle super-paramagnetiche di ossido di ferro (*SuperParamagnetic Iron Oxide nanoparticles*, **SPIO**) vengono utilizzate come agenti di contrasto in MRI. Queste particelle sono molto efficaci nell'accorciare il tempo di rilassamento trasversale,  $T_2$ , dei protoni dell'acqua. Le caratteristiche rilassometriche e farmacologiche delle SPIO dipendono principalmente dalle loro dimensioni. Tipicamente le SPIO sono formate da un *core* cristallino di magnetite ( $Fe_3O_4$ ) e  $\gamma$ -maghemite ( $Fe_2O_3$ ) ricoperto da un opportuno materiale (*coating*, vedi dopo), con diametri compresi tra 60 e 250 nm. Le dimensioni delle nano-particelle, dato il ruolo fondamentale svolto da questo parametro, rappresentano la prima difficoltà per questa classe di agenti di contrasto, ossia è piuttosto difficile controllare dimensione e dispersione e, più in generale, avere delle metodologie di preparazione riproducibili. Infatti, la sintesi di SPIO di dimensioni definite è spesso un processo difficile da controllare, soprattutto a causa della natura colloidale della ferrite. Una volta che la preparazione del *core* cristallino sia stata ottimizzata, la particella, per essere utilizzabile *in vivo*, deve essere ricoperta con un materiale biocompatibile. Il ricoprimento può venire fatto con PEG, o materiali polimerici come destrano, amido, glicosammino-glicano, silossani organici, copolimeri stirene-divinilbenzene solfonati. Il ricoprimento è fondamentale per prevenire l'aggregazione delle particelle e la loro sedimentazione e generare invece una sospensione stabile, pronta per l'uso clinico. Inoltre, il tipo di *coating* è importante per definire il comportamento farmacocinetico della nanoparticella. Tuttavia, nonostante il ricoprimento idrofilo spesso presente sulla loro superficie, le SPIO prima o dopo vengono catturate dai macrofagi, sia quelli in circolazione che residenti nei tessuti, e quindi si localizzano principalmente in fegato e milza. Per questo motivo le principali indicazioni diagnostiche che si possono ottenere dalle nanoparticelle di ossidi di ferro riguardano la visualizzazione del fegato. La tabella riporta gli agenti di contrasto basati su SPIO approvati per uso clinico o in fase di valutazione clinica (2012).

Pre-Clinical Agent	Commercial Name	MR Target	Status
AMI-25	Ferumoxide, Feridex, Endoderm	Liver	Approved
OMP	Abdoscan	Bowel	Approved
AMI-121	Gastromark, Ferumoxsil, Lumirem	Bowel	Approved
SHU555A	Resovist	Liver	Approved (EU, Japan, Australia), Phase III (USA)
AMI-227	Combidx, Sinerem, Ferumoxtran	Lymph Node Metastases	Phase III
CODE 7228	Feraheme, Ferumoxytol	Vasculature	Phase II

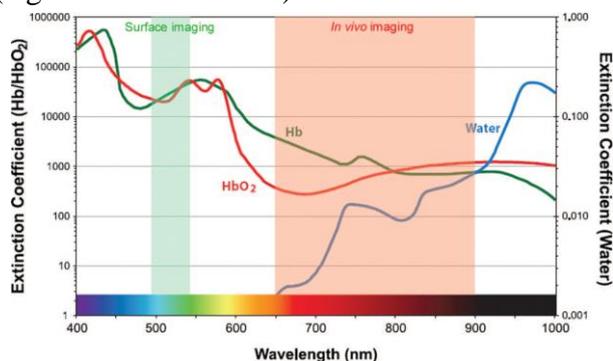
Uno dei principali svantaggi delle SPIO è legato al tipo di meccanismo di contrasto che esse generano. Infatti, il loro effetto sulle immagini MRI consiste in una diminuzione del segnale (le immagini sono più scure) e questo impedisce che possano essere usate per l'*imaging* di parti di un organismo in cui il segnale sia già intrinsecamente basso. In compenso però, le SPIO sono i migliori agenti di contrasto per esperimenti di *imaging* a livello cellulare. Infatti, le nanoparticelle hanno una sensibilità molto elevata, tanto da essere efficaci già a livello nanomolare. La loro elevata sensibilità e il fatto che vengono facilmente internalizzate dalle cellule, tramite *uptake* passivo o attivo, le rende particolarmente adatte ad essere utilizzate in esperimenti di *labeling* cellulare, dopo essere state funzionalizzate con *targeting vectors*.

## Imaging ottico

Come già detto, per poter effettuare del vero *molecular imaging*, cioè visualizzare specifiche molecole che sono in concentrazione relativamente bassa nei tessuti biologici, le tecniche di *imaging* devono essere altamente sensibili. CT e MRI sono, per ora, solo tecniche di *imaging* anatomico o al più funzionale, mentre SPECT, PET e le tecniche ottiche, a cui accenneremo ora e che usano dei **fluorofori** (o *probe* ottici), possono essere utilizzate per *imaging* molecolare. SPECT e PET permettono l'analisi a corpo intero, ma utilizzano nuclei radioattivi (con tutto quello che comporta) e inoltre hanno una risoluzione spaziale e temporale non sempre sufficiente.

L'*imaging* ottico ha sensibilità paragonabile a quella di SPECT e PET e il fluoroforo può venire coniugato, come i radionuclidi, a un opportuno *targeting vector* per dargli la necessaria specificità. L'*imaging* ottico ha anche il vantaggio di poter utilizzare dei *probe* ottici che sono attivabili (*switchable*), quelli che in MRI erano stati chiamati *responsive agents*. Un altro potenziale vantaggio di questa tecnica è che quando il tempo di vita dello stato eccitato emissivo del fluoroforo è sufficientemente lungo si può misurare il segnale nel tempo, la cosiddetta *time-resolved detection* (TRD) che fa aumentare considerevolmente il rapporto segnale-su-rumore (perché l'autofluorescenza delle biomolecole endogene si spegne prima). A fronte di questi vantaggi, le tecniche ottiche non consentono la quantificazione (al contrario di SPECT e PET) a causa di *scattering* e assorbimento della luce emessa.

Al momento le tecniche di *imaging* ottico sono ampiamente utilizzate per l'analisi di tessuti ex-vivo (e.g. dopo una biopsia) e per screening in vitro (diagnosi biomediche, saggi immunologici), con un forte sviluppo delle applicazioni nella chirurgia guidata ed endoscopia. L'utilizzo di *imaging* ottico in vivo è ancora molto scarso, la visualizzazione attraverso la pelle è limitata a tessuti superficiali (e.g. seno e linfonodi). Solo due fluorofori sono approvati dalla FDA per uso medico, il verde



indocianina (*indocyanine green*, ICG) e la fluoresceina, e il loro uso è essenzialmente in oftalmologia (angiogramma della retina).

Un *probe* fluorescente per *imaging* ottico in campo biomedico deve soddisfare a numerosi requisiti: i) l'eccitazione deve avvenire nella finestra terapeutica (vedi PDT e nanoparticelle); in pratica, sia la luce di eccitazione che quella emessa (fluorescenza) dovrebbero stare fra 650 e 900 nm (luce intorno a 600 nm oltre a non essere

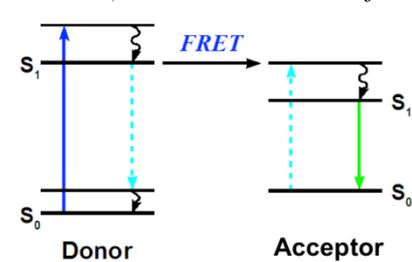
abbastanza penetrante, genera anche molta auto-fluorescenza dei cromofori naturali dei tessuti, tipo emoglobina, e quindi un fondo troppo elevato). Tuttavia, ricordiamo che per l'*imaging* in tessuti superficiali o esposti, e ancor più per esami in vitro, si può usare anche luce poco penetrante (figura). ii) La differenza di lunghezza d'onda fra luce incidente e l'emissione di fluorescenza si chiama *Stokes shift* e deve essere il più grande possibile; iii) l'intensità della luce emessa (*brightness*) è un altro fattore importante: se questa è elevata riesce ad avere maggior penetrazione. Inoltre, se la resa quantica è elevata si può usare una luce di eccitazione meno intensa. Tuttavia spesso l'aumento di *brightness* comporta un aumento delle dimensioni del fluoroforo. Ad esempio, la *green fluorescent protein*, GFP, è molto brillante, ma ha un peso molecolare di 25 – 50 kDa ed è difficile da coniugare, rendendo poco pratico lo sviluppo di suoi coniugati da iniettare; iv) la stabilità è un altro fattore importante. Molti fluorofori organici, seppur stabili in vitro, vengono degradati dopo l'incorporazione nelle cellule, tipicamente tramite *uptake* lisosomiale. Inoltre, molti subiscono anche *photobleaching*, cioè sono foto-instabili. Siccome i fluorofori sono tipicamente coniugati a *targeting vectors*, il problema della stabilità riguarda l'intero coniugato, e dipenderà dalla sua farmacocinetica. Per esempio, un fluoroforo che da solo sarebbe escreto rapidamente, quando sia coniugato a una molecola grande avrà tempi di permanenza in vivo più lunghi e quindi potrebbe andare incontro a processi degradativi imprevisti, con effetti potenzialmente negativi sull'emissione di fluorescenza. D'altra parte, anche i *probe* fluorescenti modificano la

farmacocinetica del *targeting vector* a cui sono coniugati, soprattutto se sono molti o se sono molto grandi (rispetto alle dimensioni molecolari), tipo le nanoparticelle o i *quantum dots*.

I fluorofori possono convenientemente venire suddivisi in 3 categorie: piccole molecole organiche di sintesi, con peso molecolare fra 300 e 2000 Da, spesso disponibili commercialmente; proteine prodotte spontaneamente da numerosi organismi (e.g. GFP), con peso molecolare fra 30 e 50 kDa; nano-cristalli (e.g. *quantum dots*) e nanoparticelle, cioè solidi caratterizzati da dimensioni relativamente grandi e da rese quantiche elevate. Da tenere presente che se il *targeting vector* o il fluoroforo sono di grandi dimensioni (e.g. anticorpi e nanoparticelle) il loro tempo di residenza nell'organismo è lungo (al contrario la *clearance* delle piccole molecole è rapida, tramite l'urina), quindi possono generare un *background* diffuso piuttosto elevato.

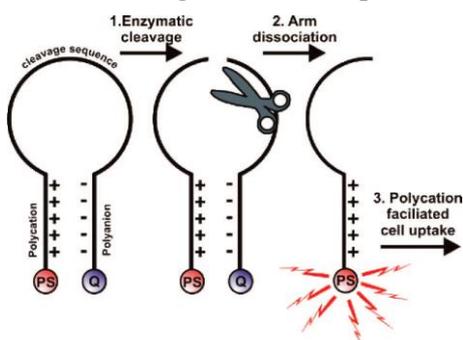
Come già accennato, uno dei vantaggi dei sensori ottici è che essi possono essere attivabili (*switchable*). L'attivazione può avvenire ad esempio in un ambiente specifico (e.g. in base al pH o alla presenza di un certo analita), altrimenti il fluoroforo resta invisibile; ciò permette di avere un rumore di fondo (*background*) molto basso e quindi una ottima sensibilità. La figura mostra l'esempio di un fluoroforo derivato dalla fluoresceina che è sensibile all'ossigeno di singoletto. Un'altra strategia di attivazione molto comune, utilizzata soprattutto con i fluorofori grandi, è quella del *quenching* o *self-quenching*: cioè due o più *probe* ottici, uguali o diversi, si disattivano a vicenda quando sono vicini ma si attivano in seguito a

disgregazione del costrutto che li tiene vicini. Un meccanismo di questo tipo molto sfruttato è il **FRET** (*Förster – o anche fluorescence – resonance energy transfer*). Il FRET è un processo di



trasferimento di energia non radiativo fra due diversi *probe* (figura): il fluoroforo cosiddetto donatore, o anche fotosensibilizzatore (PS) trasferisce energia da un suo stato elettronico eccitato al cromoforo accettore tramite un meccanismo non radiativo che prevede l'accoppiamento dei dipoli. In pratica l'emissione di fluorescenza del cromoforo donatore deve sovrapporsi con la

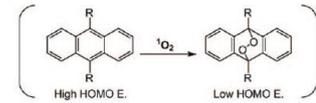
banda di assorbimento dell'accettore (figura), quindi è possibile prevedere il suo verificarsi in base agli spettri di assorbimento ed emissione dei due cromofori. L'accettore può emettere a sua volta fluorescenza a lunghezze d'onda maggiori o decadere in modo non radiativo, spegnendo completamente l'emissione di fluorescenza del sistema; in questo caso viene più propriamente detto *quencher*. L'efficienza di questo meccanismo di trasferimento di energia è inversamente proporzionale alla sesta potenza della distanza fra i due cromofori. Il FRET è quindi attivo solo quando i due cromofori distano fra loro pochi nanometri (<10 nm) e hanno la giusta orientazione reciproca. Addirittura è possibile utilizzare l'intensità del FRET per valutare la distanza fra i cromofori. Un generico esempio di FRET, in cui l'attivazione della luminescenza avviene in seguito



a una reazione enzimatica è mostrato in figura. Una disattivazione simile a quella FRET può anche avvenire quando più cromofori uguali siano sufficientemente vicini fra loro (*self-quenching*) oppure il *quencher* può essere lo stesso *carrier* dei cromofori, e.g. una proteina (figura). In tutti i casi l'allontanamento del cromoforo dai *quencher* accende la fluorescenza. La figura successiva riporta il caso generico in cui l'attivazione della fluorescenza avviene in seguito a internalizzazione nella cellula. Più fluorofori dello

(a) Singlet Oxygen Probes

Key reaction: Endoperoxide formation

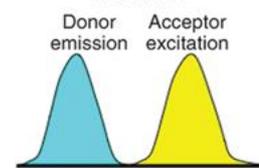


Reaction scheme for detection of singlet oxygen

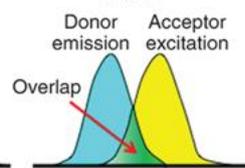


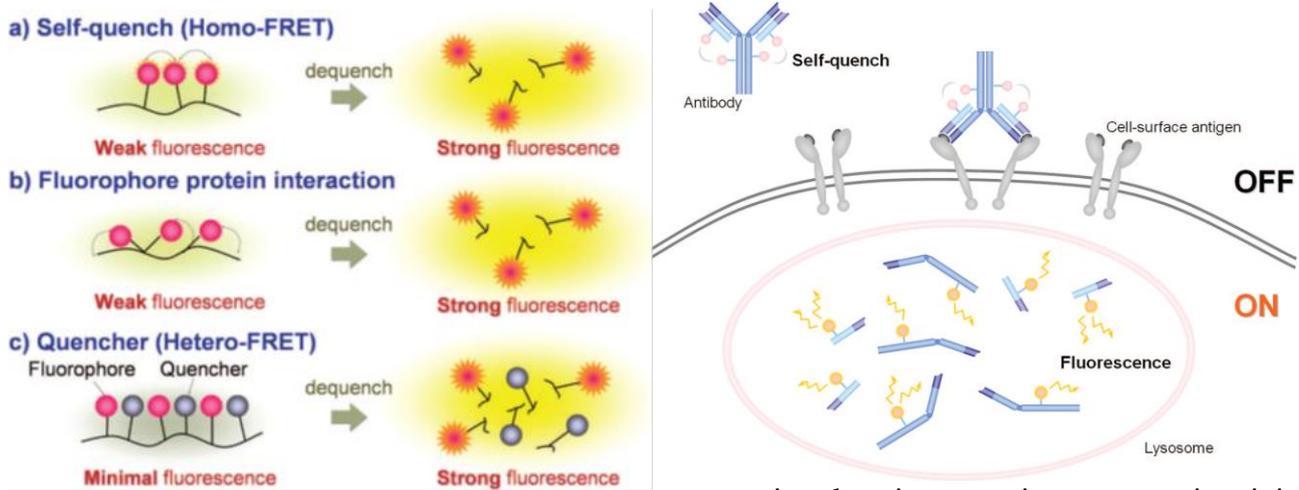
Spectral overlap

No FRET



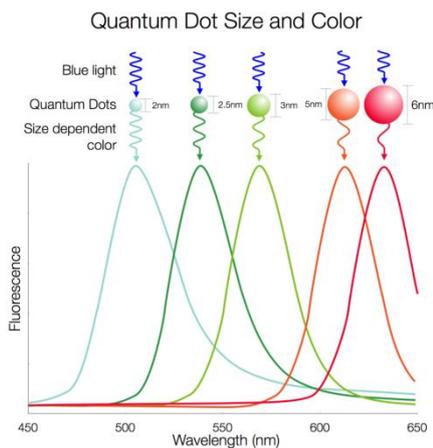
FRET





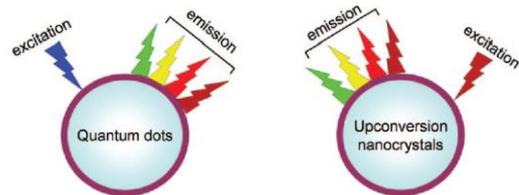
stesso tipo, legati a un anticorpo, sono inattivi a causa del *self-quenching*. Quando l'anticorpo si lega al suo bersaglio sulla superficie della cellula, viene internalizzato in un lisosoma e qui metabolizzato, attivando la fluorescenza del probe.

Dal punto di vista dell'*optical imaging inorganico*, facciamo qualche cenno solo ai *quantum dots*, ai sistemi contenenti ioni lantanidi e alle nanoparticelle. I *quantum dots* (QD) sono dei nanocristalli di semiconduttori, ad esempio CdSe, con diametro 2-10 nm. L'eccitazione luminosa nel visibile fa passare un elettrone dalla banda di valenza, piena, alla banda di conduzione. A causa



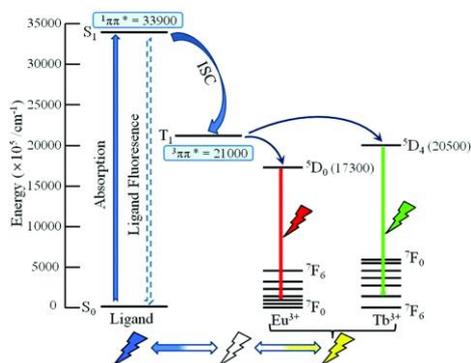
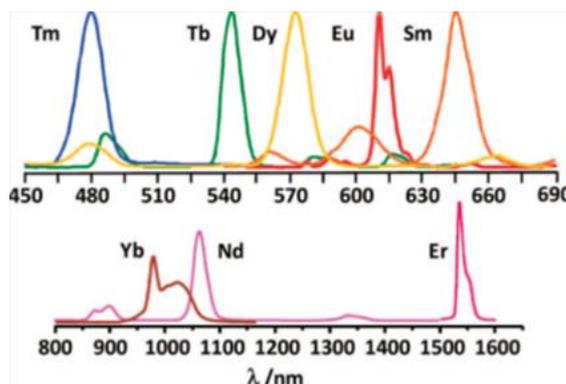
delle dimensioni nanometriche della particella, la ricombinazione buco-elettrone genera l'emissione di fluorescenza. I QD sono caratterizzati dall'aver un intervallo molto ampio di frequenze di eccitazione, praticamente tutto lo spettro del visibile, ma un'emissione molto focalizzata (picco stretto) e molto intensa (*ultra-bright*), e di essere molto resistenti al *photobleaching*. La lunghezza d'onda della luce emessa dipende direttamente dalle dimensioni del cristallo: più grande è il cristallo e più l'emissione si sposta verso il rosso (figura). Tuttavia raramente i QD riescono ad emettere nel NIR (cioè ad avere un'emissione molto penetrante). Un nuovo tipo di QD che si sta sviluppando è quello dei cosiddetti *upconversion nanocrystals* (figura). I tipici fluorofori, compresi i normali QD, emettono luce di

lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella di eccitazione. Invece i nanocristalli in grado di dare *upconversion* emettono luce a lunghezze d'onda minori (nel visibile o nel NIR) in seguito a eccitazione nel NIR (ovviamente assorbono più fotoni a energia minore per poterne emettere uno a energia maggiore!). Questa capacità fa diminuire drasticamente l'auto-fluorescenza di fondo perché i fluorofori endogeni non sono eccitati dalle lunghezze d'onda più lunghe. Quindi, oltre ad una elevata penetrazione nei tessuti (per via della lunghezza d'onda nel NIR sia in eccitazione che in emissione) si ha anche un ottimo rapporto segnale-surore (anche detto *target-to-background*).



La maggior preoccupazione per l'uso dei nanomateriali è la loro tossicità. I QD, per esempio, contengono elementi tossici come cadmio e selenio. Questi cristalli fluorescenti sono generalmente più grandi del limite per l'escrezione renale (<6 nm di diametro), quindi hanno una *clearance* ritardata e vengono prevalentemente escreti attraverso il fegato e nella bile senza alcun significativo metabolismo. Il *coating* (necessario sia per renderli solubili in acqua che per stabilizzarli) e la coniugazione con i *targeting vectors* fanno ancora aumentare le loro dimensioni.

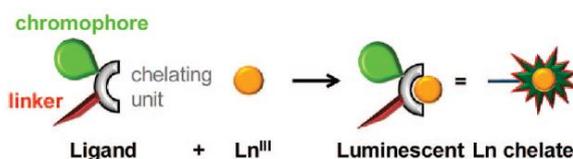
Un'alternativa molecolare ai QD è rappresentata da **complessi degli ioni dei lantanidi**, Ln(III), che hanno bande di emissione che vanno dal visibile al NIR (figura). Gli ioni Ln(III) hanno numerose bande di assorbimento strette nel visibile e NIR (prevalentemente transizioni f – f), ma poco intense ( $\epsilon$  piccoli). Tuttavia, è possibile sfruttare l'effetto antenna dei leganti, in un processo detto di **sensibilizzazione**: cioè parte dell'energia assorbita dai leganti può venire trasferita a stati eccitati dello ione Ln(III), il quale poi emette la sua luminescenza caratteristica (in figura il caso di un complesso di Eu che emette nel rosso e di uno di Tb che emette nel



verde). La sensibilizzazione ha due ulteriori vantaggi, oltre a permettere di sfruttare l'emissione dei Ln(III): *i*) per eccitazione diretta i Ln(III) hanno uno *Stokes shift* molto piccolo, ma quando vengono eccitati tramite i leganti si hanno degli *pseudo-Stokes shift* che sono spesso molto più grandi di quello dei fluorofori organici; *ii*) il trasferimento di energia dal legante al metallo riduce il *photobleaching* del sistema. Il limite di questa strategia è che molto spesso l'eccitazione del legante-antenna avviene con luce UV; per questo si cerca di modificare i leganti in modo che assorbano a lunghezze d'onda maggiori. Sebbene praticamente tutti gli ioni Ln(III) siano

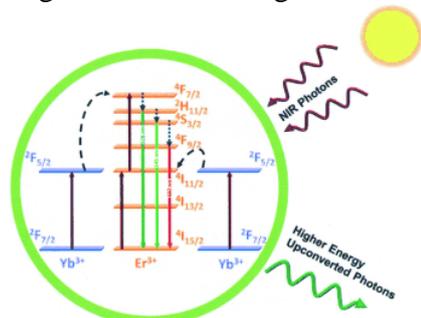
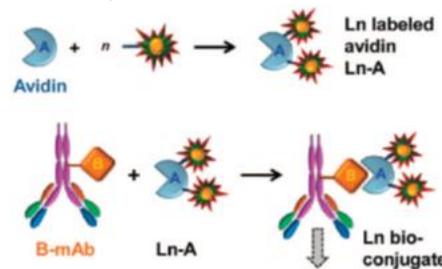
luminescenti, alcuni sono più emissivi di altri. La resa quantica di emissione è direttamente correlata alla competizione con i processi non radiativi per la disattivazione dello stato eccitato. Quindi, gli ioni che presentano una piccola differenza di energia fra lo stato emissivo più basso e il sottolivello più alto del *ground state* (e.g.  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  e  $\text{Yb}^{3+}$ ) solitamente hanno basse rese quantiche in soluzione acquosa (cioè i processi non-radiativi competono molto efficacemente con l'emissione). Tuttavia essi sono interessanti in quanto emettono nel NIR. Invece  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Tb}^{3+}$  hanno degli *energy gap* maggiori e quindi delle rese quantiche più elevate, cioè sono degli emettitori migliori. Tuttavia, mentre europio e terbio emettono nel visibile (rispettivamente nel rosso e nel verde), il gadolinio emette nell'UV e quindi non è utile per applicazioni biologiche.

I potenziali *probe* luminescenti a base di lantanidi da usarsi in campo biomedico devono – idealmente – soddisfare numerosi requisiti. Quelli di tipo chimico e fotofisico sono: *i*) solubilità in acqua; *ii*) elevata stabilità termodinamica a pH fisiologici e in presenza dei fluidi biologici; *iii*) grande stabilità cinetica; *iv*) intenso assorbimento (da parte dei leganti), possibilmente nel visibile e verso il rosso, eventualmente tramite aggiunta di un cromoforo al chelante; *v*) efficiente sensibilizzazione della luminescenza dello ione metallico (cioè trasferimento di energia dallo stato eccitato del legante); *vi*) intensa emissione di fluorescenza, cioè elevata resa quantica (minimizzazione del decadimento non-radiativo); *vii*) lungo tempo di vita dello stato eccitato emissivo in modo da poter effettuare la *time-resolved detection*; *viii*) fotostabilità. Ci sono poi anche dei requisiti di tipo biochimico/farmacologico, che dipendono molto dal tipo di esperimento che viene condotto, soprattutto se in vitro o in vivo. Per l'utilizzo in vitro è richiesto che i composti: *ix*) siano non citotossici; *x*) riescano a interagire specificamente col target biologico, senza cioè alterare sostanzialmente la bio-affinità del loro *targeting vector*. Per gli esperimenti in vivo il problema della tossicità, e quindi della stabilità termodinamica e cinetica, è molto critico, così come il requisito *xi*) che il probe venga escreto in un tempo ragionevole (cioè abbia una clearance abbastanza veloce), tipicamente 12 – 48 h. Chiaramente per soddisfare i criteri di stabilità, si devono impiegare come leganti dei chelanti polidentati, tipo quelli visti



per MRI. Il costrutto generale di un probe luminescente di questo tipo è illustrato in figura. Il probe luminescente deve poi venire coniugato, tramite il *linker*, a un opportuno *targeting vector*, ad esempio un anticorpo. Si può fare la coniugazione diretta, oppure indiretta, mediata dall'interazione avidina – biotina: si può legare il *probe* all'avidina e coniugare la biotina all'anticorpo (biotinizzazione), come in figura, o viceversa.

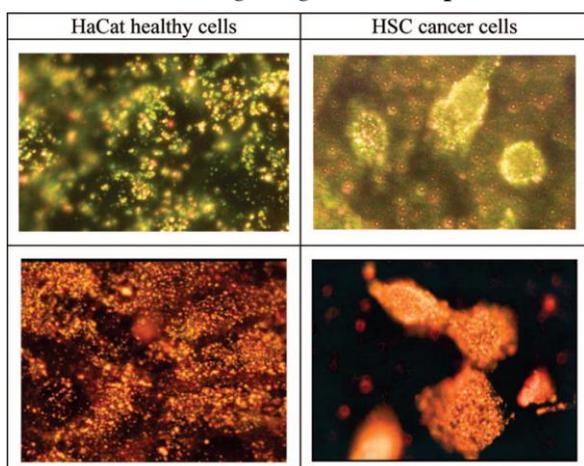
Oltre ai complessi, ci sono molti esempi di nanoparticelle inorganiche a base di materiali ceramici (e.g. silice,  $\text{SiO}_2$ ) drogate con ioni Ln(III). La matrice inorganica funge da sensibilizzatore del lantanide e l'emissione conserva le stesse caratteristiche dei complessi di Ln(III), cioè bande di emissione strette, intense e con lunghi tempi di vita. La frequenza di emissione può essere modulata inserendo degli ioni come droganti. Come visto per i QD, ci sono anche nanoparticelle di silice a base di



coppie di lantanidi che sono in grado di dare **upconversion**. La figura illustra schematicamente il principio dell'*upconversion*, con un Ln che assorbe fotoni nel NIR e trasferisce l'energia di due fotoni all'altro Ln che emette nel visibile. Per essi valgono le considerazioni fatte per i QD.

Vediamo infine un cenno alle nanoparticelle metalliche, in particolare le **AuNP** che abbiamo già trattato a proposito della terapia fototermica. Nel caso delle AuNP l'*imaging* utilizza non la fluorescenza emessa, ma la **luce dispersa** (*scattered*) dalle

nanoparticelle. Una AuNP presenta uno *scattering* la cui intensità è fino a 5 ordini di grandezza superiore della tipica emissione di un fluoroforo, cioè può fornire immagini con un contrasto molto elevato e, oltretutto, consente di usare la **microscopia a campo scuro** (*dark-field microscopy*). Questa tecnica, che utilizza dei normali microscopi opportunamente modificati, usa per eccitazione una luce che incide il campione ad un angolo molto alto così che solo la luce dispersa viene raccolta dall'obiettivo del microscopio. Si usa luce bianca e solo le frequenze che corrispondono alle LSPR delle AuNP vengono fortemente disperse: le NP vengono viste come degli spot brillanti, del colore corrispondente alla LSPR, su uno sfondo scuro. Si riescono addirittura ad osservare le singole NP. La microscopia a campo scuro è molto utile per visualizzare specifiche biomolecole, coniugando le AuNP a dei *targeting vectors* specifici. Ad esempio, la figura mostra un possibile utilizzo per la



diagnosi del cancro tramite l'*imaging* dell'indicatore (*biomarker*) cancerogeno EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Delle AuNP (sopra delle nanosfere e sotto dei *nanorods*) sono state coniugate a anticorpi anti-EGFR, e così si attaccano specificamente alla superficie delle cellule cancerogene che sovra-esprimono EGFR. Di conseguenza la superficie delle cellule cancerogene è caratterizzata da forte *scattering* LSPR da parte delle AuNP legate specificamente agli EGFR, mentre le cellule sane hanno una distribuzione casuale delle AuNP a causa del *binding* non specifico (figura).

Infine, ci sono anche esempi di potenziali *probe* ottici basati su composti di metalli di transizione. Abbiamo già discusso i complessi di Ru(II) del tipo  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  a proposito della PDT. Questi complessi interagiscono in vitro con il DNA, intercalando un legante fra coppie di basi azotate nella doppia elica. La forza dell'intercalazione cresce al crescere delle dimensioni del legante aromatico e il complesso con la fenazina (figura) ha la caratteristica che diventa fluorescente solo quando intercala nel DNA (altrimenti la sua fluorescenza in acqua è spenta) ed è sensibile a variazioni conformazionali del DNA. Altri esempi

riguardano complessi di Ir(III), Re(I) e Pt(II). Il maggior limite dei luminofori basati sui metalli di transizione è che in genere essi hanno rese quantiche di emissione piuttosto modeste, il che rappresenta un forte limite alle potenziali applicazioni perché implica che devono venire usati in concentrazione elevata. Tuttavia, molto spesso possono venire eccitati con luce nel visibile.

