

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 α o β . I nuclidi utilizzabili per **SPECT** sono **emettitori di radiazioni γ** , mentre quelli per **PET** sono **emettitori di positroni, β^+** . Sia nella SPECT che nella PET i raggi γ emessi dal nuclide (nella PET dopo annichilazione, vedi dopo) sono registrati dai detector di una γ -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																	2 He Helium	
3 Li Lithium	4 Be Beryllium																	
11 Na Sodium	12 Mg Magnesium																	
19 K Potassium	20 Ca Calcium																	
37 Rb Rubidium	38 Sr Strontium																	
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

E
Element

Denotes an element with isotopes suitable for both PET and SPECT

E
Element

Denotes an element with multiple isotopes with different physical half-lives

PET Isotopes

SPECT Isotopes

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

I radiofarmaci **terapeutici** sono invece molecole progettate per rilasciare dosi terapeutiche di radiazioni ionizzanti sotto forma di **particelle α o β** 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.

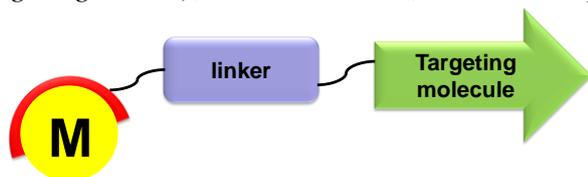
Caratteristiche generali dei radiofarmaci

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).

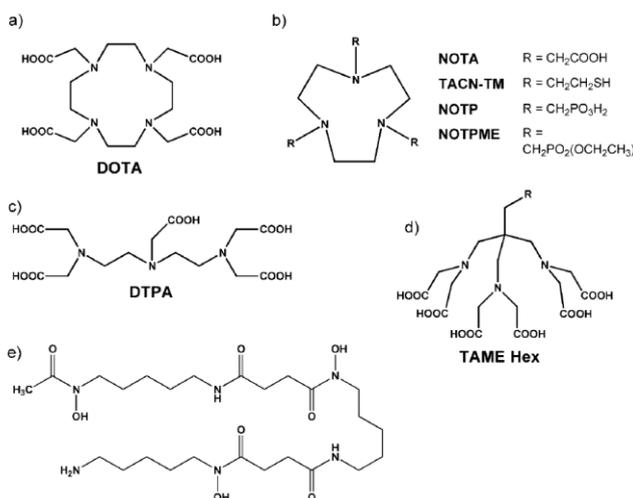
Dal punto di vista del *design*, i radiofarmaci per *imaging* a base di metalli (la maggioranza) possono essere divisi in due gruppi (trascurando i colloidali): **piccoli complessi** (o agenti di perfusione) e **coniugati**. I **complessi** devono avere elevata stabilità termodinamica e cinetica, per 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 metallici – 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

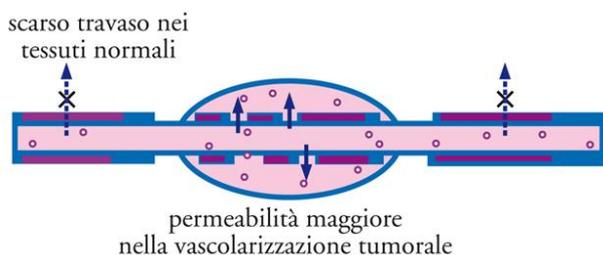
di solito almeno 4 atomi donatori (ma spesso anche 6 o più), la cui natura e geometria devono soddisfare le preferenze dello ione metallico. Essi possono essere macrociclici o aciclici. Tipicamente i macrocicli offrono maggiore stabilità termodinamica, ma i chelanti polidentati aciclici hanno cinetiche 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'',N''-hexaacetic acid, potenzialmente nonadentato), DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid, esadentato), il sideroforo 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 più volte citato effetto EPR, *Enhanced Permeability and Retention* (figura), variazioni locali di pH e pO₂ (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 prevalentemente determinata – almeno in linea di principio – 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}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 γ 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^a

isotope	half-life/h	source	production reaction	decay mode (% branching ratio)	E_{γ} /keV	abundance, I_{γ} /%	relevant oxidation states	common coordination numbers
^{67}Ga	78.2	cyclotron	$^{nat}\text{Zn}(p,x)^{67}\text{Ga}$ $^{68}\text{Zn}(p,2n)^{67}\text{Ga}$	ϵ (100)	91.265(5)	3.11(4)	3+	4, 5, 6
					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	$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	β^- (0.0037) IT (99.9963)	140.511(1)	89.06	1– to 7+	4, 5, 6
^{111}In	67.3	cyclotron	$^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$	ϵ (100)	171.28(3)	90.7(9)	3+	5, 6, 7, 8
					245.35(4)	94.1(10)		

^aUnless otherwise stated, standard deviations are given in parentheses (IT = isomeric transition; ϵ = electron capture).²⁰⁸

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

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

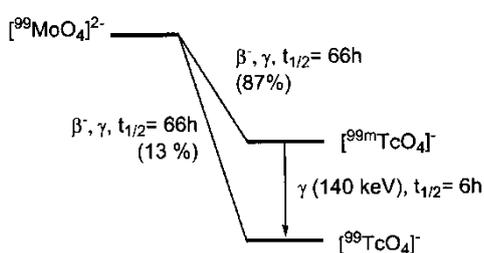
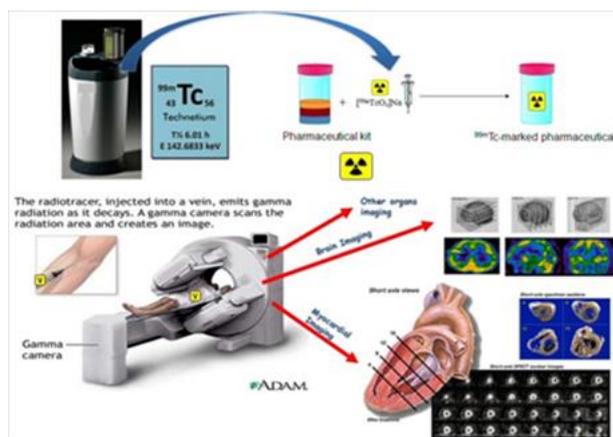
^{67}Ga (tempo di emivita 78 h), principalmente come citrato di Ga(III), che idrolizza lentamente, viene trasportato nell’organismo dalla transferrina ed è usato per la diagnosi di tumori;

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ (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

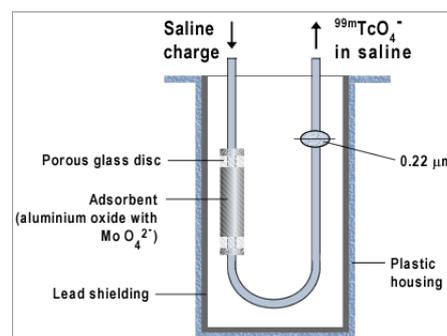
Dal punto di vista quantitativo, i radio-diagnostici di gran lunga più usati in SPECT sono quelli a base di tecnezio, con una fetta di mercato superiore all’80%. Per questo il tecnezio viene definito il “cavallo da soma” (*workhorse*) dei radiofarmaci (si valuta che venga usato in più di 25 milioni di 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}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 β -emettitore ^{99}Tc relativamente stabile (emivita 210.000 anni) è uno dei prodotti di fissione (6%) dell'uranio. In medicina nucleare si usa il ^{99}Tc in uno **stato nucleare eccitato**, come isotopo metastabile $^{99\text{m}}\text{Tc}$, che è un puro γ -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}Tc , è un puro β -emettitore che non disturba la rilevazione γ . 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}Mo (figura).



Ma più comunemente il ^{99}Mo viene estratto dai prodotti di fissione dei reattori nucleari, cioè deriva dal bombardamento di ^{235}U con neutroni lenti, 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 pertecnetato, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, risultante dal decadimento del ^{99}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 pertecnetato 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 $\{\text{Tc}=\text{O}\}^{3+}$, oppure complessi esacoordinati ottaedrici con il gruppo trans $\{\text{O}=\text{Tc}=\text{O}\}^+$. Molto spesso si sono utilizzati dei chelanti tetradentati per i siti di coordinazione

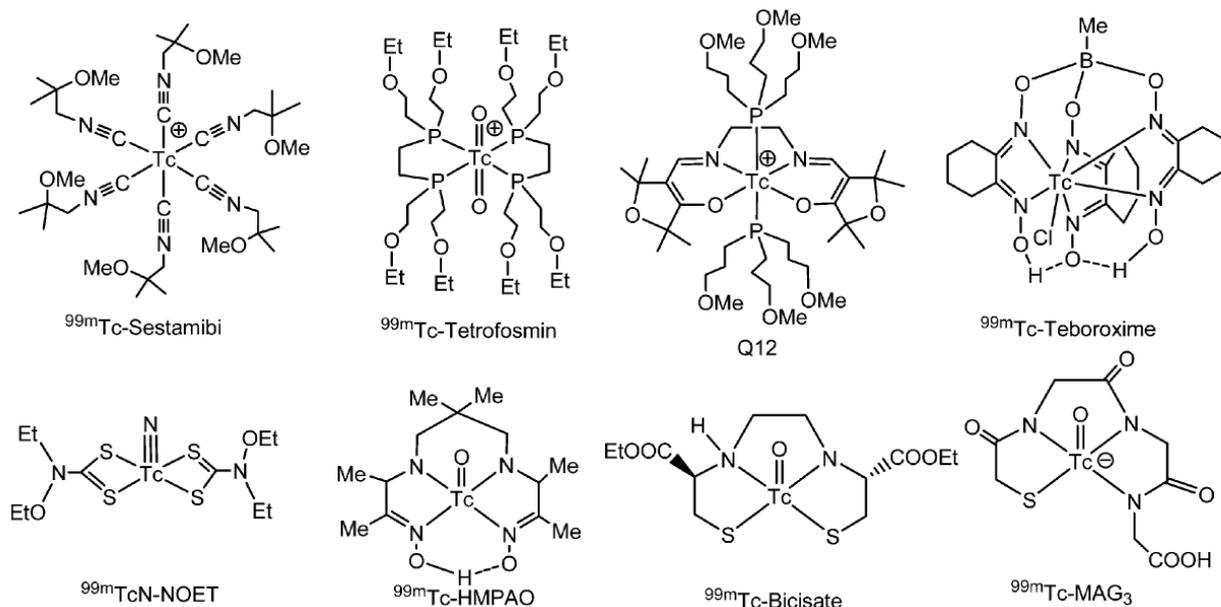
rimanenti. È anche possibile trasformare il gruppo $\{Tc=O\}^{3+}$ nel corrispondente nitruro $\{Tc\equiv N\}^{2+}$, ma i passaggi sintetici aggiuntivi rendono questo approccio inadatto per essere eventualmente trasformato in un kit. Meno studiato è stato il Tc(III), d^4 , mentre in anni recenti è stato 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.

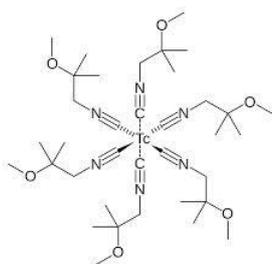
Radiofarmaci di tecnezio di prima generazione (agenti di perfusione)

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 -tetrafosmin (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, CH₃, 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}Tc -sestamibi

Il ^{99m}Tc -hexakis(2-methoxy-2-methylpropyl)nitrile (^{99m}Tc -sestamibi) è attualmente l'agente di *imaging* di gran lunga più usato a livello mondiale. È un complesso notevolmente semplice, formato



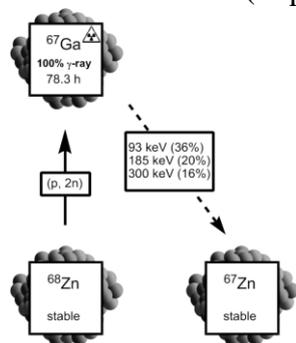
da un nucleo di $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$, d^6 basso spin e quindi coordinativamente inerte, circondato in geometria ottaedrica da sei leganti isonitrile uguali. Essendo lipofilo e con carica +1 il complesso penetra facilmente la membrana mitocondriale, dove si accumula a causa della carica negativa presente nella matrice interna dei mitocondri. Il ^{99m}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}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}Ga ($Z = 31$) che decade all'isotopo stabile ^{67}Zn ($Z = 30$) per cattura di elettroni (in pratica un protone si trasforma in neutrone) emettendo esclusivamente fotoni



γ 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}Ga viene prodotto in un ciclotrone da un isotopo stabile dello zinco tramite la reazione $^{68}\text{Zn}(p, n)^{67}\text{Ga}$ (figura). Il gallio ha come unico stato di ossidazione stabile 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 Fe^{3+}), lo ione Ga^{3+} forma addotti più stabili con macrocicli più piccoli, tipo NOTA, che con DOTA. Le

principali applicazioni del ^{67}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}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}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 Ga^{3+} . Tuttavia, rispetto a Ga^{3+} il catione In^{3+} è più grande, ha un $\text{p}K_a$ maggiore e ha cinetiche di scambio dei leganti più veloci (è più labile). Di conseguenza, In^{3+} si lega volentieri anche a gruppi più *soft* come i tiolati. Nella pratica, la maggior parte dei bio-coniugati marcati con ^{111}In (SPECT) usano come chelante DTPA o DOTA.
- Yttrio: anche per questo elemento lo stato di ossidazione biologicamente rilevante è 3+. Tuttavia il catione Y^{3+} è molto più grande sia di Ga^{3+} che di In^{3+} e di conseguenza preferisce numeri di coordinazione più elevati, tipicamente 8 o anche 9. Nonostante le grosse dimensioni,

lo ione 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}Y si usa nella PET, mentre ^{90}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}Ga e ^{111}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}Y , ^{177}Lu e gli altri lantanidi si depositano rapidamente nel tessuto osseo (generando una dose di radioattività intollerabile al midollo osseo).

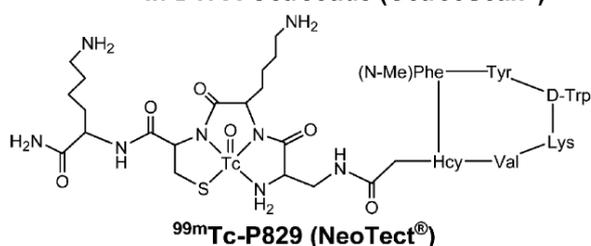
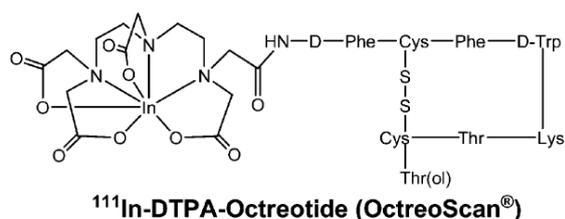
Radio-diagnostici target-specifici (*radioimmuno-scintigrafia*)

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 attentamente 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 biologica 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

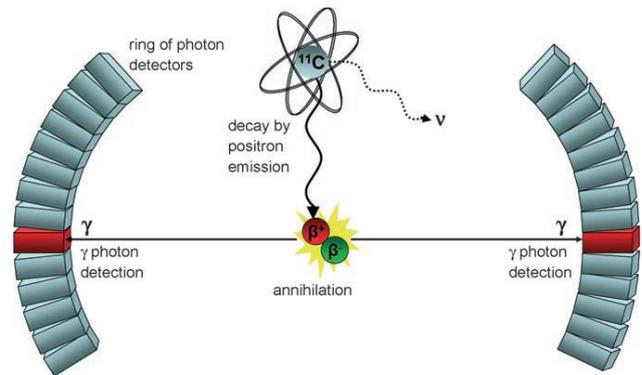


tessuti sani e/o a un basso livello di *uptake* da parte del tumore. Quindi, oltre alla stabile incorporazione del radionuclide nel peptide, la stabilizzazione del peptide con metodi chimici è di importanza cruciale per lo sviluppo di radiofarmaci di questo tipo. La stabilizzazione del peptide può essere ottenuta in diversi modi, ad esempio tramite la sostituzione di legami peptidici con altri legami, con l'uso di D- o β -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}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.

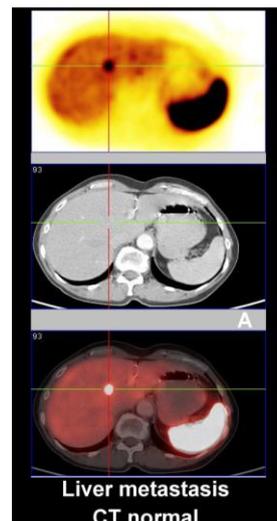
Tomografia di emissione di positroni (*Positron Emission Tomography, PET*)

La **tomografia di emissione di positroni** (*Positron Emission Tomography, PET*) utilizza radionuclidi che decadono con emissione di positroni, cioè particelle β^+ . 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 γ 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-precoca. 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 localizzazione delle metastasi monitorando l'accumulo e il metabolismo di certi radiofarmaci 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}F , ^{11}C , ^{13}N e ^{15}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}Ga , che viene prodotto per decadimento del ^{68}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

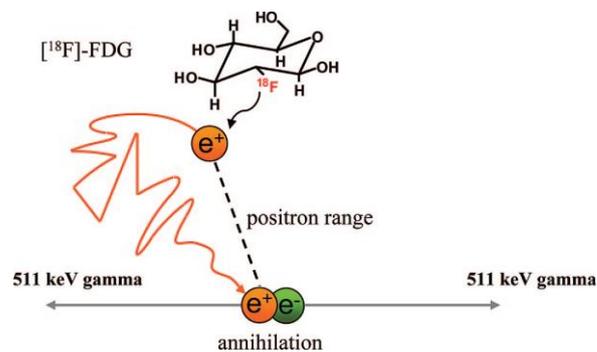
nuclide	half-life (min)	maximum energy (MeV)	mode of decay (%)	theoretical specific activity (GBq/ μ mol)
^{18}F	110	0.64	β^+ (97%) EC ^a (3%)	6.3×10^4
^{11}C	20.3	0.97	β^+ (99%)	3.4×10^5
^{13}N	10	1.20	β^+ (100%)	7.0×10^5
^{15}O	2	1.74	β^+ (100%)	3.4×10^6
^{76}Br	972	4.0	β^+ (57%) EC (43%)	7.2×10^3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

^a EC: electron capture.

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}C o ^{14}N rispettivamente con ^{11}C o ^{13}N è una **sostituzione isotopica**, l'inserimento di ^{18}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 bioisosteriche**: cioè non cambiano le caratteristiche steriche della molecola,

ma quelle elettroniche e chimiche sì. 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; al crescere dell'energia aumenta anche il percorso medio (e.g. 9 mm per ^{68}Ga) e di conseguenza diminuisce la risoluzione; 3) il suo tempo di semivita (110 min) è sufficientemente lungo da permettere dei processi di 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}F . Gli esempi più rappresentativi di molecole sostituite con ^{18}F utilizzate come probe per PET sono la 6- ^{18}F -fluoro-3,4-dihydroxyphenylalanine (^{18}F 6-Fluoro-L-DOPA), utilizzata per "vedere" il metabolismo cerebrale della dopamina e localizzare tumori neuroendocrini, e il 2- ^{18}F -fluoro-desossi-D-glucosio (^{18}F FDG), utilizzato per monitorare il metabolismo del glucosio. Senza dubbio ^{18}F FDG (figura) è il radiofarmaco PET di maggior successo clinico e commerciale. Il ^{18}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}F FDG-6-fosfato. Il successivo metabolismo del ^{18}F FDG-6-fosfato è tuttavia inibito perché l'atomo 2-O del glucosio è stato sostituito da un atomo di ^{18}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}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}C o ^{15}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}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}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}O . Infatti, viene di solito usata acqua marcata con ^{15}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

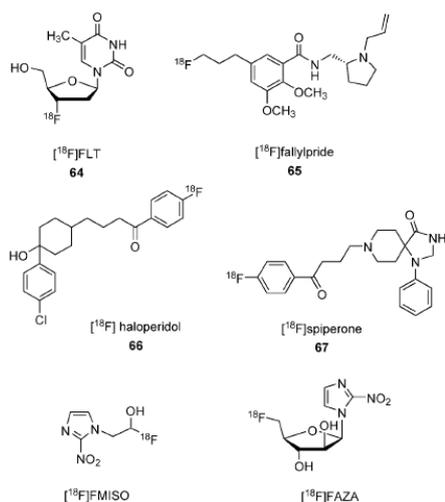
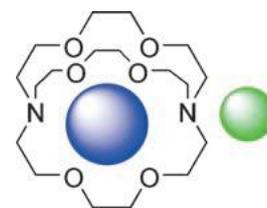
I tempi di semivita fisica piuttosto brevi della maggior parte dei nuclidi utilizzabili nella PET, richiedono che il tempo per la sintesi della molecola marcata (cioè il radio-farmaco) sia il più breve possibile. Infatti, la molecola marcata deve essere sintetizzata, purificata, analizzata, formulata (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 $50-500 \text{ GBq}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ (ca. $1-15 \text{ Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$). Dal momento che si possono ottenere immagini PET di buona qualità con dosi di radioattività molto piccole, serve somministrare 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}F , e la scelta del composto da bombardare dipende dalla forma chimica del ^{18}F che si vuole ottenere. Le strategie di sintesi per marcare molecole con ^{18}F si possono sostanzialmente dividere in due grosse aree: 1) **fluorurazione diretta**,

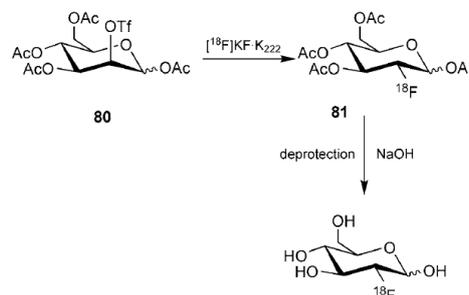
in cui l'isotopo ^{18}F viene introdotto direttamente nella molecola target in un unico stadio e 2) **fluorurazione indiretta**, che sfrutta dei gruppi prostetici, di solito dei piccoli frammenti alchilici o arilici marcati con ^{18}F che possiedono gruppi funzionali reattivi, e prevede degli approcci sintetici a più stadi. I gruppi prostetici con ^{18}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 F_2 marcato con ^{18}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 F_2 . La reazione nucleare $^{20}\text{Ne}(d, \alpha)^{18}\text{F}$ genera atomi di ^{18}F che poi reagiscono con $^{19}\text{F}_2$:



In alternativa al neon, si può bombardare con protoni diossigeno arricchito con ^{18}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), F_2 marcato viene di solito trasformato in agenti fluoruranti meno reattivi e più selettivi, come acetil-ipofluorito ($[^{18}\text{F}]\text{CH}_3\text{COOF}$), 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}F nucleofilo si irradia con protoni acqua arricchita con ^{18}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 criptandi in modo che non possano formare coppie ioniche con F^- , che è presente come ione nudo e quindi molto reattivo. Il criptando più comunemente utilizzato è il

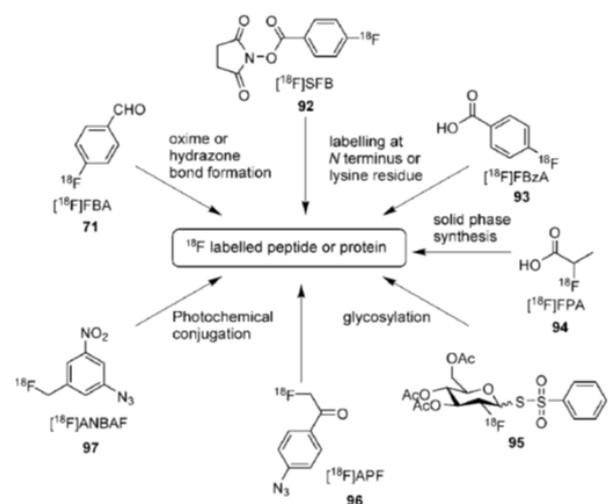


cryptando più comunemente utilizzato è il Kryptofix 2.2.2, K_{222} , ($[^{18}\text{F}]\text{KF}\cdot\text{K}_{222}$, figura) e le reazioni di sostituzione nucleofila sono solitamente condotte in solventi polari aprotici (DMF, DMSO o acetonitrile). Come già detto le fluorurazioni nucleofile sono quelle 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).

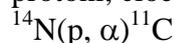


La marcatura isotopica di biomolecole (oligonucleotidi, peptidi e proteine) per applicazioni PET sta crescendo in importanza a causa dell'accresciuto interesse a utilizzare questi composti per la diagnosi di varie patologie. Dal momento che la marcatura diretta della maggior parte di peptidi e proteine usando ^{18}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}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}F sono mostrati in figura.



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



Di solito il nucleo di ^{11}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

dependono 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 logP (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

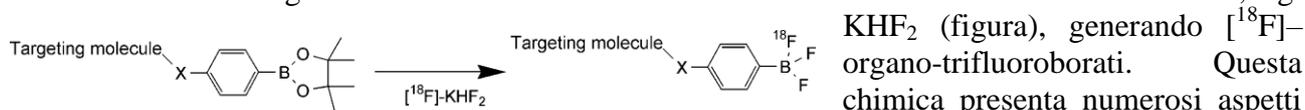
Spesso, il processo complessivo per attaccare ^{18}F a un atomo di carbonio è sfortunatamente troppo lungo e complesso per avere un utilizzo pratico. Infatti, la procedura per marcare un peptide con ^{18}F facendo un legame C–F tipicamente inizia “intrappolando” il fluoruro $^{18}\text{F}^-$ generato 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}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-boronici con sintoni contenenti fluoruro, e.g.



potenzialmente vantaggiosi per essere applicata al *radio-labeling* di biomolecole con ^{18}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_2) 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 kJ mol^{-1} per legami C-F) e quindi composti del silicio potrebbero essere sfruttabili per il *labelling* con ^{18}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, vedi sotto) 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- ^{19}F con $^{18}\text{F}^-$. 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

questo caso bisogna ricorrere a un procedimento in due stadi. Inoltre, sarebbe preferibile invertire l'ordine degli stadi, cioè introdurre prima l' Al^{3+} nel chelante e poi fare la fluorurazione con $^{18}\text{F}^-$. In questo modo la coniugazione alla biomolecola potrebbe essere fatta dopo l'inserzione a caldo dell'alluminio nel chelante e l'ultimo stadio sarebbe la fluorurazione dell'Al a temperatura ambiente.

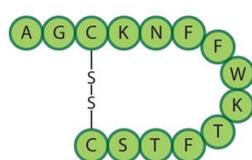
Radionuclidi metallici per PET

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}Ga , attualmente il più studiato in questo settore.

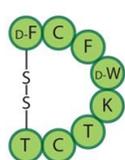
Table 1. Physical Properties of Some Common PET Radiometals^a

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

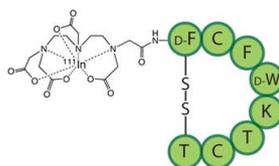
^{68}Ga -DOTATOC



Somatostatin



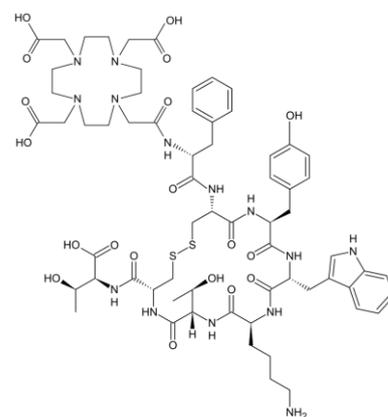
Octreotide



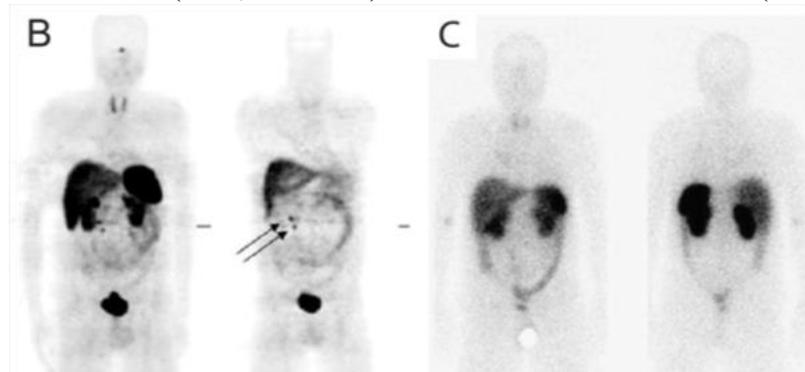
^{111}In -DTPA-Octreotide

Vediamo un esempio di coniugato con un radionuclide metallico per analisi PET. Il ^{68}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 aminoacidi 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}In -DPTA-ocreotide (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}Ga per l'*imaging* PET. Infatti, il breve tempo di semi-vita del ^{68}Ga (67.7 min; $\beta^+ = 89\%$) lo rende molto adatto per



essere coniugato a peptidi con rapidi profili farmacocinetici come l'ocreatide ($t_{1/2} \sim 100$ min). La maggiore energia dei positroni emessi rende il ^{68}Ga meno adatto del ^{19}F per misure quantitative (raziometriche), ma dal punto di vista qualitativo non mostra rilevanti differenze nella qualità delle immagini. La figura mostra un confronto dell'*imaging* di un tumore endocrino con ^{68}Ga -DOTATOC (PET, a sinistra) e con ^{111}In -DTPA-ocreatide (SPECT, a destra).



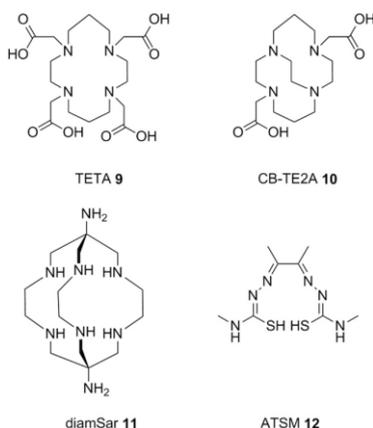
Si vede che la PET ha una risoluzione migliore e permette di individuare dei linfonodi addominali (freccie). Il ^{68}Ga viene prodotto tramite un processo di cattura di elettroni (EC) a partire dal radionuclide "padre" ^{68}Ge ($t_{1/2} = 270.95$ d) e può quindi venire prodotto come il $^{99\text{m}}\text{Tc}$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

di vita di circa 1 anno, e si possono eluire fino a tre dosi al giorno. Lo ione Ga^{3+} forma un addotto sufficientemente stabile, anche se non ottimale, con il DOTA. In questi ultimi anni il ^{68}Ga -DOTATOC (o l'analogo ^{68}Ga -DOTATATE, dove c'è l'octreotato al posto dell'ocreatide, la differenza sta in una treonina al posto del treoninolo come aminoacido C-terminale) è stato oggetto di molti studi preclinici e clinici e ha dimostrato di fornire una maggiore risoluzione rispetto a ^{111}In -DTPA-ocreatide (vedi sopra). Inoltre il ^{68}Ga -DOTATOC ha dimostrato di possedere una buona predittività per selezionare i pazienti che hanno probabilità di rispondere alla radio-terapia con ^{90}Y -DOTATOC o ^{177}Lu -DOTATOC (vedi dopo). Le strutture dei tre peptidi analoghi della somatostatina sono mostrate in figura; il $[\text{Tyr}^3]$ ocreatide è il peptide usato nel DOTATOC, mentre $[\text{Tyr}^3]$ ocreatate è quello usato nel DOTATATE. Si stanno anche sviluppando dei coniugati di questi peptidi con chelanti in grado di complessare stabilmente il $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

ocreatide	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (ol)
$[\text{Tyr}^3]$ ocreatide	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr (ol)
$[\text{Tyr}^3]$ ocreatate	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr

Gli altri due isotopi metallici sui quali sta crescendo l'interesse sono ^{89}Zr e ^{64}Cu . L'aspetto più interessante dello ^{89}Zr è che il suo tempo di semi-vita coincide con i tempi di biodistribuzione della maggior parte degli anticorpi, e quindi lo rende particolarmente adatto per la cosiddetta *immuno-PET*. Vi sono in clinica esempi in cui anticorpi coniugati a ^{89}Zr vengono usati per l'*imaging* di tumori specifici. Al momento, l'unico chelante usato per lo ^{89}Zr negli studi clinici è il sideroforo esadentato desferossiamina (DFO, vedi terapia di chelazione del ferro), che si coordina allo ione $^{89}\text{Zr}^{4+}$ tramite tre gruppi idrossammato. Tuttavia, sembra che gli addotti ^{89}Zr -DFO non siano sufficientemente stabili in vivo: si vede che al crescere del tempo dopo la somministrazione dei coniugati, l'uptake dello ^{89}Zr diventa aspecifico (diminuzione del rapporto *signal-to-noise*), indice di decomplessazione. Per ovviare a questo limite, sono stati sviluppati negli ultimi anni dei chelanti ottadentati, che vengono incontro alla tendenza dello ione zirconio ad avere numero di coordinazione 8. Ad esempio, il cosiddetto DFO* è "un'estensione" del DFO che incorpora un ulteriore gruppo idrossammato.

Il ^{64}Cu decade emettendo sia β^+ (17.9%, per PET imaging) che β^- (39%, per radioterapia, vedi dopo). Quindi è potenzialmente un nuclide teranostico, cioè può essere usato – in linea di principio – sia per diagnosi che per terapia (a dosaggi diversi). Questo fatto, insieme alla bassa energia dei positroni emessi (= alta risoluzione) e al tempo di semi-vita lungo (immuno-PET) lo rendono particolarmente interessante, anche se nessuno dei composti studiati è per ora entrato in uno studio di fase clinica. Al contrario degli altri nuclidi visti finora, il Cu(II) non è redox-inerte e si può ridurre a Cu(I) quando esposto ad un ambiente ipossico, come ad esempio nei tumori solidi. Tuttavia il Cu(I) presenta preferenze coordinative diverse e si ritiene che questa sia la ragione del rilascio del ^{64}Cu in vivo da chelanti tipo DOTA e TETA, che ha come conseguenza l'uptake



specifico del metallo, in particolare nel fegato. Sono quindi in fase di studio dei chelanti più forti, tipo la sarcosina diamSar e il TETA cross-linked, CB-TE2A, riportati in figura. In altri casi, tuttavia, il comportamento redox del Cu è proprio alla base del funzionamento dei radiofarmaci. Ad esempio, il complesso di ^{64}Cu con il tiosemicarbazone ATSM (Figura) è in fase di studio per l'*imaging* di regioni ipossiche: solo in esse il Cu(II) si riduce a Cu(I), venendo così rilasciato e rimanendo intrappolato (secondo gli autori) all'interno delle cellule.

Radiofarmaci terapeutici (radio-immunoterapia)

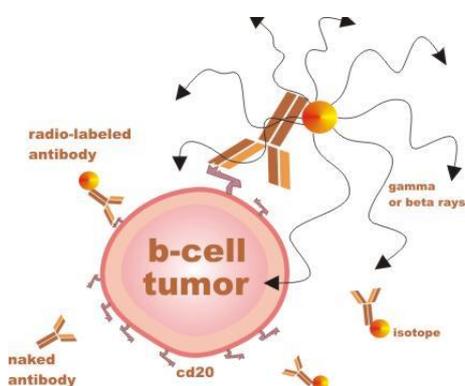
I radiofarmaci terapeutici sono molecole progettate per fornire dosi terapeutiche di radiazioni ionizzanti a cellule tumorali, in particolare anche per i tumori disseminati (metastasi). Idealmente questi farmaci dovrebbero localizzarsi nel sito malato in concentrazione sufficiente per fornire una quantità 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 1500–2000 cGy, mentre i tumori solidi richiedono tipicamente 3500–10000 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 2000 cGy, 1500 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 α o – preferibilmente – β ad alta energia. Le particelle β sono meno energetiche di quelle α , 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 β quelli più interessanti per la radioterapia sistemica dei tumori sono ^{131}I , ^{90}Y e vari lantanidi, in particolare ^{177}Lu (emettitore a bassa energia, 0.5 eV), ^{149}Pm e ^{153}Sm (a media energia) e ^{166}Ho (alta energia). ^{90}Y è particolarmente adatto per la radio-immunoterapia in quanto è un puro emettitore β ad alta energia (si trasforma in ^{90}Zr) e si produce con un generatore dal decadimento dello ^{90}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 β non consente l'*imaging*, ma si possono usare gli analoghi coniugati con ^{111}In al posto di ^{90}Y come radiodiagnostici SPECT per determinarne preventivamente la bio-distribuzione (assumendo che sia la stessa) e la dosimetria (lo ^{131}I è anche un emettitore γ 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}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 α hanno una potenza molto più elevata, e sono quindi delle interessanti alternative, o aggiunte, ai radionuclidi β -emettitori nella radio-immunoterapia. La maggiore potenza è dovuta al fatto che l'emissione di una particella α rilascia una grande quantità di energia in maniera lineare entro pochi diametri cellulari (50–90 μm). L'energia rilasciata linearmente (ipotizzando un percorso lineare) da una particella α (2 – 10 MeV/ μm) può essere da 100 a 1000 volte superiore rispetto ai β -emettitori standard (60 – 110 keV/ μm). Inoltre, al contrario dei radionuclidi β -emettitori che sono meno efficaci nei tessuti ipossici (perché generano meno ROS) l'effetto dell'ossigeno sugli emettitori α 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- α 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- α sono considerati adatti per applicazioni *in vivo*: ^{212}Bi ($t_{1/2} = 60.5$ min), ^{213}Bi ($t_{1/2} = 45.6$ min), ^{211}At ($t_{1/2} = 7.2$ h), ^{225}Ac ($t_{1/2} = 10$ d), ^{223}Ra ($t_{1/2} = 11.4$ d) e ^{212}Pb ($t_{1/2} = 10.6$ h). Particolarmente promettenti fra gli emettitori α sono ^{213}Bi e ^{225}Ac . ^{225}Ac decade con 5 emissioni α e 3 emissioni β in serie, la maggior parte con elevate energia, e quindi i radio-immuno-coniugati di ^{225}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}Bi e forse 5000–10000 volte rispetto agli emettitori β . Inoltre ^{225}Ac , così come il ^{223}Ra , ha altri due vantaggi: non emette raggi γ , 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.

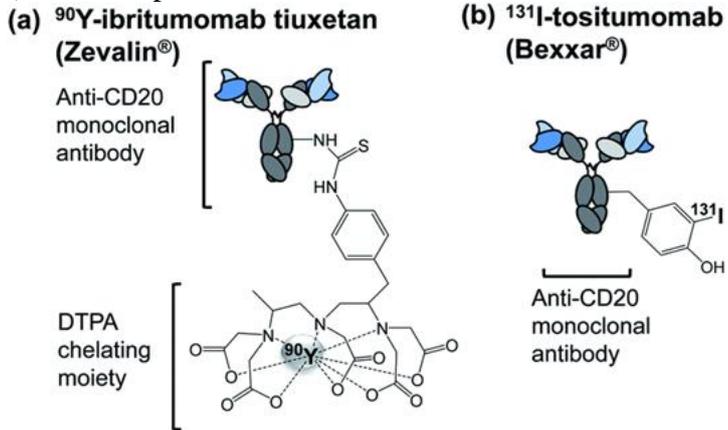
Dal punto di vista clinico la radio-immunoterapia è applicata principalmente ai tumori più sensibili



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}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}I e ^{90}Y , entrambi emettitori- β , 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

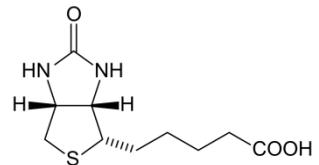
monoclonali anti-CD20, uno marcato con ^{131}I (^{131}I -tositumomab, lo iodio va su una tirosina) e l'altro con ^{90}Y (^{90}Y -ibritumomab tiuxetan) (figura) per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin a cellule B. Il "tiuxetan" è il nome del chelante bifunzionale per ^{90}Y , e non è altro che il DTPA funzionalizzato. ^{131}I -tositumomab (Bexxar[®], GlaxoSmithKline, NC, USA) e ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Zevalin[™], 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}I -tositumomab è stata interrotta dopo pochi anni per lo scarso utilizzo).



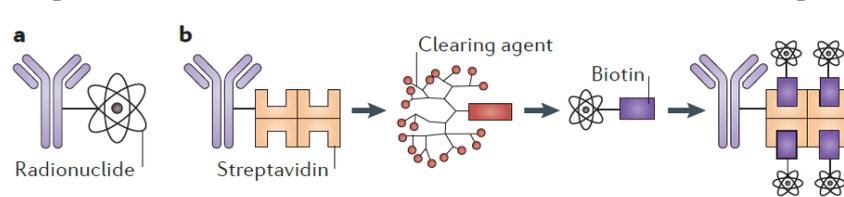
Entrambi i radionuclidi hanno vantaggi e svantaggi. ^{131}I è relativamente poco costoso e può essere usato sia per *imaging* (SPECT, essendo per il 10% un emettitore γ) che per terapia. Tuttavia, se le proteine marcate con ^{131}I subiscono endocitosi nelle cellule tumorali esse subiscono rapida degradazione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

medico. ^{90}Y è una buona alternativa, in quanto emette quasi esclusivamente particelle β e poiché questa radiazione non esce al di fuori del corpo del paziente, non è pericolosa per gli altri. Inoltre, le particelle β emesse da ^{90}Y sono più energetiche di quelle di ^{131}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}Y (e di altri eventuali radio-farmaci marcati con lantanidi). Si possono avere reazioni di trans-metallazione, cioè ^{90}Y viene sostituito nel chelante bifunzionale (e.g. DOTA) da altri ioni metallici endogeni, come Ca^{2+} e 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 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⁻¹, una delle più forti interazioni non-covalenti note



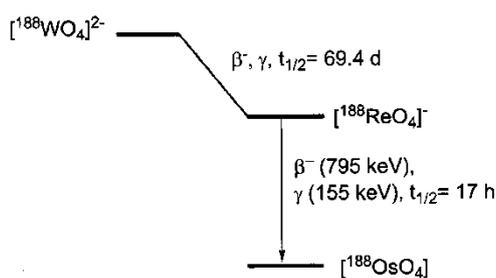
in natura). La strategia, illustrata in figura a confronto con quella "classica" (caso a), prevede che gli anticorpi vengano coniugati alla streptavidina (Ab-SA) e

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 tetrameric 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 β per il trattamento di tumori endocrini. Esempi sono ^{90}Y -DOTATOC e ^{177}Lu -DOTATATE. Dal momento che ^{90}Y emette particelle β a energia maggiore, i peptidi analoghi della somatostatina marcati con tale isotopo sono più adatti al trattamento di tumori più grandi, mentre quelli con ^{177}Lu sono più adatti al trattamento di tumori più piccoli. Sono possibili anche combinazioni di entrambi. Il ^{177}Lu ha il vantaggio di essere anche un emettitore γ 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 (^{111}In) o PET (^{68}Ga) (vedi sopra).

Molta ricerca viene attualmente condotta per sviluppare radiofarmaci terapeutici a base di ^{188}Re . Questo isotopo presenta molte analogie con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Il ^{188}Re decade emettendo particelle β^- (70%) e radiazioni γ (energia 155 keV) con un tempo di emivita di 17 ore. La emissione di particelle β^- è adatta per la terapia, mentre la co-emissione di radiazioni γ permette di seguire *in vivo* il composto e



di fare delle valutazioni quantitative. Il ^{188}Re può inoltre essere convenientemente ottenuto come perrenato $[^{188}\text{Re(VII)O}_4]^-$ in un generatore dal wolframato ^{188}W in maniera analoga a quanto visto per il $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (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 $[^{99\text{m}}\text{Tc(DMSA)}_2\text{O}]^-$ e $[^{188}\text{Re(DMSA)}_2\text{O}]^-$ (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*- $[\text{M}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ($\text{M} = ^{99\text{m}}\text{Tc}$ o ^{188}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^6 a basso spin e quindi i frammenti $\text{M}(\text{CO})_3$ 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}Re (e.g. fosfonati, anticorpi, peptidi, e anche particolari). Si ritiene che il maggior limite allo sviluppo di radio-farmaci a base di ^{188}Re sia la difficoltà di ottenimento, e quindi l'alto costo, del nuclide precursore ^{188}W , che può essere ottenuto a partire da ^{186}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}Y e ^{177}Lu , prodotti più facilmente, ha reso quelli a base di ^{188}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-molecule* (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}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}Cu ($t_{1/2}$ ca. 12.7 h), ^{86}Y ($t_{1/2}$ ca. 14.7 h), ^{111}In ($t_{1/2}$ ca. 2.8 d) o ^{89}Zr ($t_{1/2}$ ca. 3.2 d). Di regola, si è visto che le grandi biomolecole (>40 kDa) devono essere marcate con radionuclidi con tempi di semi-vita > 24h 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}Zr per *imaging* PET o con ^{111}In per *imaging* SPECT o con ^{177}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 C_{18} . Questi fattori sono particolarmente vantaggiosi rispetto alle procedure per i reagenti per *imaging* PET con ^{18}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}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}Cu , ^{111}In , e ^{89}Zr).