UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Istituto di Chimica Inorganica e delle Superfici
(ICIS - CNR)

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO SCIENZE FARMACEUTICHE
CICLO XX

IL SISTEMA $[M^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ (M=Tc-99m, Re-188) NELLA SCINTIGRAFIA MIOCARDICA E IN MEDICINA NUCLEARE MOLECOLARE

Direttore della Scuola Ch.mo Prof. Maurizio Casarin
Supervisore Ch.mo Prof. Giuliano Bandoli
Coadiutore Dott.ssa Cristina Bolzati

Dottoranda: Dott. Stefania Agostini

31 gennaio 2008

Alla mia famiglia

A Giacomo

A tutte le persone che non hanno mai smesso di credere in me.

SOMMARIO

Il gruppo di ricerca, in cui ho svolto il presente lavoro, ha recentemente messo a punto una efficiente strategia di sintesi per la preparazione, in alta resa, di azoturo complessi di Tc(V), del tipo $[Tc^{V}(N)(XY)(PNP)]^{+/0}$, dove XY è un legante bidentato avente atomi coordinanti π-donatori, quali S, O, N, e PNP è un legante amminodifosfinico. Questo sistema è dotato di una elevata versatilità chimica dovuta alla possibilità di introdurre delle variazioni nella struttura dei due leganti indipendentemente, in modo da modulare finemente le caratteristiche chimico-fisiche-biodistributive del complesso finale. Esso, quindi, può essere efficacemente utilizzato nella preparazione di radiocomplessi applicabili sia nella diagnosi, quali agenti di perfusione o recettore-specifici, sia nella radioterapia metabolica.
L'effettiva applicabilità del sistema allo sviluppo di radiofarmaci utilizzabili nella scintigrafia perfusionale e nella Medicina Nucleare molecolare è stata determinata nella presente ricerca attraverso la sintesi e la valutazione biologica di:

- azoturo complessi di Tc-99m per scintigrafia perfusionale miocardica,
- azoturo complessi di Tc-99m per *imaging target*-specifico di recettori CCK-B,
- azoturo complessi di Re-188 per terapia recettore-specifica,

sviluppati nel dettaglio rispettivamente nelle Sezioni A, B e C.

L'applicabilità del sistema all'ottenimento di radiofarmaci per scintigrafia miocardica perfusionale è stata evidenziata con lo sviluppo di complessi monocationici del tipo $[^{99m}Tc(N)(DBODC)(PNP3/5)]^{+}$ [DBODC=N,N-bis-etossietilditiocarbammato, PNP3=N,N-bis-[(dimetossipropil)fosfinoetil]metossietilammina, e PNP5=N,N-bis-[(dimetossipropil) fosfinoetil] etossietilammina)], attualmente in studio clinico di fase I per interessanti proprietà biologiche, soprattutto se confrontate con quelle di [^{99m}Tc]-Sestamibi (Cardiolite®) e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin (Myoview®). Nonostante una elevata e persistente captazione cardiaca e una rapida *clearance* dal tessuto ematico, epatico e polmonare, tali azoturo complessi presentano una estrazione di primo passaggio comparabile con quella dei traccianti monocationici, ma relativamente bassa se confrontata con i complessi neutri [^{99m}Tc]-Teboroxime e $^{99m}Tc(N)NOET$. Per questi ultimi l'alta estrazione di primo passaggio è correlata con la loro elevata lipofilia, parametro che regola la diffusione attraverso le membrane biologiche.
Nella Sezione A si è valutata la possibilità di aumentare l'estrazione di primo passaggio di

[^{99m}Tc(N)(DBODC)(PNP3/5)]$^{+}$ mantenendo inalterate le proprietà farmacocinetiche che permettono di ottenere un'ottima qualità delle immagini scintigrafiche. La dissimmetria del complesso consente di modularne finemente le proprietà idrofiliche/lipofiliche mediante l'introduzione di opportune variazioni del legante amminodifosfinico o ditiocarbammico. Sono quindi stati sintetizzati e caratterizzati nuovi leganti amminodifosfinici (PNPX) con diversa lipofilia, conferita da diverse funzionalizzazioni sugli atomi di fosforo e di azoto. Essi sono stati successivamente utilizzati nella preparazione in alta resa dei corrispondenti azoturo complessi [^{99m}Tc(N)(DBODC)(PNPX)]$^{+}$, applicando una procedura di sintesi che richiede un singolo passaggio. I composti presentano una grande stabilità termodinamica ed inerzia chimica, assieme ad interessanti profili farmacocinetici, determinati *ex vivo* in ratti Sprague Dawely. Tali risultati hanno evidenziato che la variazione del legante amminodifosfinico modifica la lipofilia dell'intero radiocomplesso e quindi anche la sua biodistribuzione. In particolare, [^{99m}Tc(N)(DBODC)(PNP7/10)]$^{+}$ [PNP7=N,N-bis-[di(metossietil)fosfinoetil]etossietilammina; PNP10=N,N-bis-[di(metossietil)fosfinoetil]metossietilammina] presentano una captazione cardiaca più rapida ed elevata rispetto ai complessi di riferimento che purtroppo si accompagna a valori lievemente più bassi dei rapporti cuore/fegato e cuore/polmoni rispetto a quelli ottenuti con [^{99m}Tc(N)(DBODC)(PNP3/5)]$^{+}$. Tali valori si mantengono, tuttavia, nettamente superiori a quelli dei traccianti tecneziati monocationici attualmente in commercio.

L'attività cardiaca valutata a tempi brevi dalla somministrazione rappresenta una buona approssimazione dell'indice di estrazione coronarico di primo passaggio; i più alti valori di *uptake* miocardico a 2 minuti p.i. per [^{99m}Tc(N)(DBODC)(PNP7/10)]$^{+}$ suggeriscono pertanto un possibile aumento di tale parametro.

La Sezione B riporta studi di sintesi e valutazione biologica di azoturo complessi recettore-specifici potenzialmente utilizzabili in Medicina Nucleare molecolare per la visualizzazione di tessuti neoplastici, dimostrando l'applicabilità del sistema [^{99m}Tc(N)(PNP)]$^{2+}$ alla marcatura di peptidi. A tale scopo è stato opportunamente selezionato l'analogo del peptide CCK8 per la sua elevata affinità per i recettori delle colecistochinine di tipo B, iperespressi in numerosi tumori. Esso è stato derivatizzato all'estremità N-terminale con il dipeptide glicina-cisteina (Cys-Gly-CCK8) in modo tale che l'amminoacido glicina funga da spaziatore tra peptide e agente chelante per il Tc-99m,

rappresentato dalla L-cisteina (Cys) che presenta i gruppi NH_2 ed SH disponibili per la coordinazione al metallo.

I leganti amminodifosfinici utilizzati sono rappresentati da PNP3 e PNP43 [PNP43= N,N-bis-[di(metil)fosfinoetil]metossietilammina] che sono stati progettati e sintetizzati per modulare idrofilia e farmacocinetica dei complessi finali.

Sono state valutate le caratteristiche radiochimiche e le proprietà biologiche *in vitro* ed *ex vivo* dei composti $[^{99m}Tc(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3/43)]^+$, per verificarne la potenzialità quali agenti *target*-specifici per la visualizzazione di cellule tumorali esprimenti il recettore delle colicistochinine di tipo B.

Entrambi i radiocomplessi sono stati sintetizzati in alta resa, utilizzando basse concentrazioni del derivato peptidico e seguendo una via di sintesi semplificata, costituita da un unico passaggio che si presta ad una possibile formulazione in *kit*, cosicché la sintesi possa venire utilizzata in qualsiasi centro di Medicina Nucleare provvisto di un generatore $^{99}Mo/^{99m}Tc$.

I complessi sono risultati inerti nei confronti di reazioni di transchelazione e studi condotti in liquidi biologici hanno dimostrato una buona stabilità verso reazioni di idrolisi enzimatica.

Studi *in vitro condotti* su cellule A431 iperesprimenti recettori CCK-B hanno dimostrato che i complessi *syn,anti*-$[^{99m}Tc(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3/43)]^+$ possiedono alta e specifica affinità di legame per i recettori CCK-B, con curve di saturazione dei siti di legame caratteristiche e costante di dissociazione (K_d) di 19.0 ± 4.6 nmol/l per $[^{99m}Tc(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^+$ e 26.8 ± 2.9 nmol/l per $[^{99m}Tc(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^+$. Tali valori dimostrano che l'introduzione del dipeptide cisteina-glicina e del frammento metallico $[^{99m}Tc(N)(PNP)]^{2+}$ non perturba la naturale affinità del peptide nativo CCK8.

La specificità dell'interazione del ligando per il suo recettore è mantenuta nel modello *in vivo* di *nude mice*, mostrando in cellule trapiantate esprimenti CCK-B un accumulo specifico, con un rapporto di 4:1 rispetto al tumore di controllo.

Nella Sezione C sono riportati gli studi volti al trasferimento della tecnologia del frammento metallico $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ alla sintesi di analoghi azoturo complessi disimmetrici di Re-188, del tipo $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP)]^{+/0}$, costituiti da un legante amminodifosfinico e da un cisteinato derivato (Cys~), quali potenziali agenti da utilizzare nella radioterapia metabolica. La cisteina può essere legata covalentemente, mediante la

formazione di un legame carboamidico all'estremità terminale libera, ad una molecola bioattiva in grado di veicolare il complesso al sito di azione dove, grazie a interazioni specifiche, si localizza, permettendo il trattamento del tessuto patologico esprimente il recettore.

La sintesi dei complessi di Re-188 è stata analizzata, per quanto attiene alla cinetica e alla stabilità dei singoli intermedi, dalla partenza (riduzione del perrenato), alla molecola da utilizzare come donatore a formare il terminale azoturo, fino alla cinetica e alle condizioni di complessazione. Indagini accurate hanno permesso di ottenere i complessi $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP)]^{+/0}$ con alta resa radiochimica, ma condizioni di reazione che richiedono bassi valori di pH ed alta temperatura. Le cinetiche di reazione e le metodiche di preparazione dei complessi di Re-188 sono state confrontate con quelle applicate nella sintesi degli analoghi di Tc-99m.

I complessi ottenuti sono stati caratterizzati mediante confronto cromatografico (TLC ed HPLC) con gli analoghi complessi ottenuti a livello macroscopico con Re-185/187.

Le manipolazioni con Re-188 sono state condotte al "Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazie" di Rossendorf (Dresda), con la collaborazione del Prof. H.-J. Pietzche e del Dr. B. Noll.

ABSTRACT

Recently we have described the synthesis of a new class of asymmetrical nitrido complexes, based on the chemical properties of the substitution labile $[Tc^{V}(N)X_2(PNP)]^{2+}$ complex (PNP=aminodiphosphine, X=Cl, OH, H_2O), which represent an interesting opportunity in design both perfusion and target-specific radiopharmaceuticals.

According to this strategy, the strong electrophylic $[Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ moiety efficiently reacts with bifunctional ligands (XY) carrying coordinating atoms π-donors such as S, O or N, to afford asymmetrical nitrido heterocomplexes of the type $[Tc^{V}(N)(XY)(PNP)]^{0/+}$.

In this work, studies to demonstrate the effective applicability of this technology to the preparation of perfusion and target-specific agents are reported, through synthesis and biological evaluation of:

- ^{99m}Tc-nitrido complexes as potential myocardial imaging tracers,
- ^{99m}Tc-nitrido complexes as potential target-specific agents, for imaging CCK-B receptor,
- ^{188}Re-nitrido complexes for therapeutic targeting.

In "*Sezione A*" is described the synthesis and the biological evaluation of a series of novel monocationic ^{99m}Tc-nitrido complexes of general formula $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (DBODC= bis(N-ethoxyethyl)-dithiocarbamato; PNPX= aminodisphosphine).

The pharmakokinetic profiles of these new compounds were compared with the commercially available agents and with the analogues $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3/5)]^{+}$ (PNP3= N,N-bis-[di(methoxypropyl)phosphinoethyl]methoxyethylamine; PNP5=N,N-bis-[di(methoxypropyl)phosphinoethyl]ethoxyethylamine). $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$ is currently under clinical evaluation as potential myocardial imaging tracer, taking into account its particular imaging properties which approach the ideal behaviour.

In spite of this, $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3/5)]^{+}$, analogously to the other cationic Tc-99m complexes, present a relatively low first-pass extraction (approximately 60%) and minimal redistribution. Thus, modifications of these compounds to increase their first pass extraction and keeping unaltered the interesting imaging properties, are required. Herein

we studied how the modification of PNPX ligand could affect the biological behaviour of these monocationic compounds. In order to achieve it, some PNPX with different lipophilicity were synthetized. Corresponding ^{99m}Tc-nitrido complexes were prepared in one or two steps. *In vitro* stability of the compounds remarked their kinetic inertness. Results from biodistribution studies, performed in rats, revealed that most of the complexes have a high initial and persistent heart uptake with rapid clearance from blood, liver and lungs.

Among the tested compounds, $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7/10)]^{+}$ (PNP7= N,N-bis-[di(methoxyethyl)phosphinoethyl]ethoxyethylamine; PNP10=N,N-bis-[di(methoxyethyl) phosphinoethyl]methoxyethylamine) showed improved heart uptake with respect to $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3/5)]^{+}$, with slightly lower heart-to-lung and heart-to-liver ratios. Biodistribution studies revealed that complexes have a high initial and persistent heart uptake with rapid clearance from the blood, liver and lung. In particular, the significant increase of the heart uptake at early injection time, suggests that the first-pass extraction fraction of these complexes may be increased with respect to the other cationic Tc-99m agents.

The metal fragment $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ is a substitution labile complex which represents an interesting opportunity in designing receptor-specific Tc-99m agents. The "*Sezione* B" reports the first application of this technology to the preparation of target specific radiolabeled peptides. The CCK8 nonsulfated octapeptide was selected as target vector in reasons of its high affinity and selectivity for CCK-B receptors, which are overexpressed with particularly high incidence in some neuroendocrine tumors, like MTCs (>90%). The peptide was coupled with the dipeptide Gly-Cys on the N-terminal side where it should not affect the interaction with receptors. Glycine was selected as spacer and cysteine as bidentate chelating ligand presenting NH_2 and SH free for coordination to metal.

In reason of the versatility of the metal fragment approach, it is possible to change only PNP ligand in order to modify lipofilicity and biodistribution of the heterocomplex. Two different aminodisphosphines were synthetized and used in this study: PNP3 and the more hydrophilic PNP43 (PNP43=N,N-bis-[di(methyl)phosphinoethyl]methoxyethyl amine).

The nitrido-Tc(V) $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3/43)]^{+}$ complexes were prepared in

high yield, through a two steps or alternatively following a simplified one-step procedure. Using the one-step synthesis, a low amount of Cys-Gly-CCK8 (0.20-0.05 mg) was necessary to obtain the quantitative and specific formation of the final heterocomplex (yield 90%), evidencing that the peptide does not modify the excellent coordinating properties of Cys.

In vitro studies showed that complexes are stable and no transchelation reactions occurred confirming for these compounds high thermodynamic stability and kinetic inertness.

Stability studies carried out in human and mouse serum as well as in mouse liver homogenates revealed for these compounds high stability toward enzymatic hydrolysis.

$[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3/43)]^{+}$ showed high specific binding to A431 cells overexpressing CCK-B, with the typical saturation curve. The apparent K_d was estimated to be 19.0 ± 4.6 nmol/l for $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^{+}$ and 26,76 ± 2,9 nmol/l for $[^{99m}Tc(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^{+}$.

In vivo evaluation of the compound $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^{+}$ in nude mice tumor model showed rapid, specific targeting to A431-CCK-B xenografts as there was a four-fold higher accumulation compared to receptor-negative tumor.

This study displayed that Cys-Gly-CCK8 can be rapidly and efficiently labelled with the synthon $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$, without compromising affinity and selectivity binding proprieties of the native peptide.

The "*Sezione C*" reported the first application of $[M^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ technology to the preparation of ^{188}Re-nitrido mixed compounds as potential target-specific therapeutical radiopharmaceuticals.

In order to achieve it, $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP)]^{+/0}$ complexes were prepared. These mixed compounds are characterized by the presence of two different ligands coordinated to the nitrido *core*: an aminodisphosphine, involved in the lipophilicity modulation of the complex, and a cysteine- derivative, devoted to carrier the bioactive molecule involved in targeting mechanism.

The strategy in biologically targeted therapy is to chemically package the radionuclide to take advantage of metabolic pathways or tumor characteristics so that the radionuclide is localized in the target organ or tissue while the nuclear energy is discharged with minimal exposure to healthy tissue.

The β^- emitting radionuclide Re-188 is an attractive candidate for the preparation of

radiopharmaceuticals having a potential application as therapeutic agents for its availability (transportable $^{188}W/^{188}Re$ generator) and suitable nuclear properties. The organometallic chemistry of technetium rather closely resembles that of rhenium but there is a significant difference between the standard reduction potential of these two metals.

A novel procedure for the high-yield preparation of ^{188}Re-nitrido complexes was studied in terms of donor of nitride nitrogen atoms, pH, temperature and kinetics.

Complexes were characterized by chromatographic methods, and by comparison with the corresponding complexes prepared at macroscopic level.

Re-188 compounds were prepared under supervision of Dr. B. Noll and Prof. H.-J. Pietzche at the ”Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazie”, Rossendorf (Dresden).

INTRODUZIONE AL LAVORO

Il presente lavoro di ricerca è diviso in tre Sezioni, in ciascuna delle quali l'esposizione dei dati sperimentali e la discussione dei risultati è preceduta da una introduzione che permette di comprendere i temi trattati.

- Sezione A: in questa sezione sono riportati gli studi di sintesi e valutazione biologica di azoturo complessi di Tc-99m quali potenziali agenti per scintigrafia di perfusione miocardica e la preparazione di leganti amminodifosfinici PNP utilizzati in ogni parte del lavoro e che costituiscono la base del metodo del frammento metallico $[M^{V}(N)(PNP)]^{2+}$.

- Sezione B: in questa sezione sono riportati gli studi di sintesi e valutazione biologica di azoturo complessi di Tc-99m con il peptide Cys-Gly-CCK8 quali potenziali agenti recettore-specifici utilizzabili in Medicina Nucleare molecolare per la visualizzazione di tessuti neoplastici esprimenti i recettori CCK-B.

- Sezione C: in questa sezione sono riportati gli studi relativi alla sintesi di azoturo complessi di Re-188, volti a dimostrare l'applicabilità del metodo del frammento metallico alla preparazione di composti utilizzabili in radioterapia recettore-specifica.

INDICE

SOMMARIO.....I

ABSTRACT.....V

INTRODUZIONE AL LAVORO.....IX

PREFAZIONE.....1

Sezione A:

SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI AZOTURO COMPLESSI DI Tc-99m PER SCINTIGRAFIA PERFUSIONALE MIOCARDICA

A1. Obiettivo.....5

A2. Introduzione.....9

A2.1 Medicina Nucleare.....9
Radiofarmaci: definizione e classificazione.....9
Complessi metallici come radiofarmaci.....11
A2.2 Il Tecnezio: generalità e chimica di coordinazione.....13
Generalità sui leganti fosfinici.....36
A2.3 Scintigrafia perfusionale del miocardio.....39
A2.3.1 Diagnosi di cardiomiopatia.....39
A2.3.2 Radiofarmaci SPET per scintigrafia perfusionale del miocardio.....45
A2.3.3 Radiofarmaci PET per scintigrafia perfusionale del miocardio:cenni.64

A3 Parte sperimentale.....69

A3.1 Materiali e metodi.....69
A3.2 Sintesi dei leganti amminodifosfinici (PNP).....71
A3.2.1 Sintesi di N,N-bis-(2-fosfaniletil)R-etilammina (R=metossi, etossi).....71
A3.2.2 Sintesi di N,N-bis-[di(idrossimetil)fosfinoetil] metossietilammina (PNP3OH).....79
A3.2.3 Sintesi di N,N-bis-[di(4-metossifenil)fosfinoetil] etossietilammina (PNP9).....80
A3.3 Preparazione dei complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$.....87
I. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (X=3,5,7,10): reazione a due *steps*.....87
II. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (X=3,5,7,10): reazione *one pot*.....87
III. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$.....88
IV. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$.....88
V. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)_2]$.....89

A3.4 Calcolo di Logk'$_0$.....89
A3.5 Studi di stabilità.....90
A3.5.1. Studi di stabilità *in vitro*.....90
A3.5.2. Studi di transchelazione con L-cisteina e Glutatione.....91
A3.6 Studi di biodistribuzione *ex vivo*.....92

A4. Risultati e discussione.....93

A4.1 Preparazione dei complessi [$^{99m}Tc^{V}$(N)(DBODC)(PNPX)]$^{+}$.....93
A4.2 Calcolo di Logk'$_0$.....95
A4.3 Studi di stabilità.....97
A4.4 Studi di biodistribuzione *ex vivo*.....97

A5. Conclusioni.....105

A6. Riferimenti bibliografici.....107

Sezione B:

SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI AZOTURO COMPLESSI DI TC-99M PER *IMAGING TARGET*-SPECIFICO DI RECETTORI CCK-B

B1. Obiettivo.....115

B2. Introduzione.....117

B2.1 *Imaging* molecolare.....117
B2.1.1 Radiofarmaci *target*-specifici.....118
B2.1.2 Imaging recettoriale con peptidi.....119
Definizione di peptidi.....120
Iperespressione recettoriale come *target*.....121
Peptidi e radiopeptidi come agenti *targets*.....123
Applicazioni cliniche.....125
B2.1.3 Recettori della colecistochinina (CCK).....126
Implicazioni fisiologiche dei recettori CKK.....128
Espressione di recettori CCK-A e CCK-B in tumori.....130
B2.1.4 Diagnosi e terapia con peptidi marcati.....132

B3. Parte sperimentale.....135

B3.1 Materiali e metodi.....135
B3.2 Sintesi dei complessi *syn/anti*-[^{99m}Tc(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$.....137
B3.3 Efficienza di marcatura del legante Cys-Gly-CCK8.....139
B3.4 Purificazione.....139
B3.5 Studi *in vitro*.....140
B3.5.1 Transchelazione con L-Cisteina e Glutatione.....140
B3.5.2 Studi di stabilità in siero umano, siero di *mouse* e omogenato di fegato di *mouse*.....140

B3.6 *Binding in vitro* di CCK-B.....142
B3.7 Studi di biodistribuzione *ex vivo*.....143

B4. Risultati e discussione.....145

B4.1. Formazione del complesso [^{99m}Tc(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$.....145
B4.2 Efficienza di marcatura del legante Cys-Gly-CCK8.....149
B4.3 Studi di stabilità *in vitro*.....150
B4.4 Studi di *binding in vitro* di CCK-B.....152
B4.5 Studi di biodistribuzione *ex vivo*.....153

B5. Conclusioni.....155

B6. Riferimenti Bibliografici.....157

Sezione C:

SINTESI DI AZOTURO COMPLESSI DI Re-188

PER RADIOTERAPIA RECETTORE-SPECIFICA

C1. Obiettivo.....163

C2. Introduzione.....165

C2.1 Radioterapia.....165
C2.1.1 Scelta del radionuclide.....169
Particelle β.....169
Particelle α.....171
Elettroni Auger.....172
Emivita.....173
Alcuni importanti radionuclidi utilizzati in radioterapia.....174
C2.1.2 Scelta della molecola vettrice.....175
C2.1.3 Proprietà del tessuto bersaglio.....176
C2.1.4 Effetti biologici delle radiazioni.....177
L'interazione delle radiazioni ionizzanti con la materia.....177
Curve di sopravvivenza cellulare.....179
C2.2 Renio-186 e Renio-188.....192
C2.2.1 Chimica di coordinazione del renio.....196
Reattività dei complessi di renio.....198
C2.2.2 Strategie sintetiche di marcatura di biomolecole con Re-186/188.....200
C2.2.3 Radiofarmaci di Re-188.....205
Tc-99m E Re-186/188: diverso comportamento
dei radiofarmaci *in vivo*.....207

C3. Parte Sperimentale.....211

C3.1 Materiali e metodi.....211
C3.2 Sintesi dei prodotti di partenza di Re-185/187.....215

I. Preparazione di $(NBu_4)[ReO_4]$.....215
II. Preparazione di $(NBu_4)[Re^{VI}NCl_4]$.....216
III. Preparazione di $[Re(N)Cl_2(PPh_3)_2]$.....217
C3.3 Preparazione dei complessi $[^{185/187}Re^{V}(N)(XY)(PNP3)]^{0/+}$.....218
I. Preparazione di $[Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.....218
II. Preparazione di *syn,anti*-$[Re^{V}(N)(CysOEt)(PNP3)]^{+}$.....221
III. Preparazione di *syn,anti*-$[Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]^{+}$.....224
IV. Preparazione di *syn,anti*-$[Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)]$.....227
C3.4 Preparazione dei complessi $[^{188}Re^{V}(N)(XY)(PNP3)]^{0/+}$.....230
I. Preparazione di $[^{188}Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.....230
II. Preparazione di *syn,anti*-$[^{188}Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]^{+}$.....232
III. Preparazione di *syn,anti*-$[^{188}Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)]$.....234
C3.5 Preparazione dei complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(XY)(PNP3)]^{0/+}$.....236
I. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.....236
II. Preparazione di *syn,anti*-$[^{99m}Tc^{V}(N)(CysOEt)(PNP3)]^{+}$.....236
III. Preparazione di *syn,anti*-$[^{99m}Tc^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)]$.....236

C4. Risultati e discussione.....241

C4.1 Azoturo complessi di Re-185/187.....241
C4.2 Azoturo complessi di Re-188.....248

C5. Conclusioni.....253

C6. Riferimenti bibliografici.....255

Appendice: SIGLE ED ABBREVIAZIONI.....261

PREFAZIONE

Lo sviluppo tecnologico e metodologico delle tecniche di *imaging* quali tomografia computerizzata (CT), risonanza magnetica nucleare (RMN), PET/CT (*Positron Emission Tomography*) e SPET (*Single Photon Emission Tomography*), hanno avuto un influsso fondamentale sulla diagnosi precoce di numerose patologie, in particolare quelle cardiovascolari e tumorali.

Le procedure diagnostiche medico-nucleari possono essere classificate in tre grandi campi di applicazione: cardiologia nucleare, *imaging* funzionale e oncologia *target*-specifica.

Nel 2004 negli USA sono state effettuate 15.8 milioni di indagini SPET, delle quali 8 milioni solo di cardiologia nucleare, 7.8 milioni di *imaging* funzionale e 25.000 di oncologia nucleare; contro 1 milione di indagini PET [1]. L'applicazione principale della tecnica PET-CT è quella oncologica, mentre la SPET, come si evince dai dati sopra riportati, ha un ruolo primario in cardiologia e negli studi funzionali di fegato, polmone, reni, cistifellea e tiroide.

Molti agenti SPET *target*-specifici, in cui la parte biologicamente attiva è costituita da anticorpi e peptidi, sono dotati di una specificità tissutale maggiore di ^{18}F-FDG, consentendo di discriminare tra tessuti sani e neoplastici con alta selettività.

Questi aspetti, aggiunti alle caratteristiche chimico-fisiche, nucleari e di produzione favorevoli dei radionuclidi SPET rispetto a quelli PET, fanno capire come siano clinicamente ed economicamente giustificati studi rivolti al miglioramento dei metodi di elaborazione dei dati e delle immagini, in termini di accuratezza e di risoluzione spaziale.

Introdotta per emulare il successo della PET-CT, la SPET-CT, unendo le tecniche di *imaging* SPET e la tomografia computerizzata, possiede le caratteristiche per diventare una modalità di *imaging* primaria. Tale tecnica permette l'acquisizione di immagini caratterizzate da un importante dettaglio anatomico che, sommandosi alle informazioni metaboliche tissutali ottenute con radionuclidi, migliora l'accuratezza della diagnosi. La sua elevata sensibilità potrebbe dunque dare nuovo impulso sia alla cardiologia che ad altri studi funzionali, anche grazie a costi relativamente bassi.

In campo cardiologico, la fusione delle tecniche SPET e CT potrebbe permettere di rivelare contemporaneamente le deficienze di perfusione e le loro cause, quali calcificazioni

[1] M. Burns, "Can SPECT-CT Revitalize Nuclear Medicine?" Jun 2005

coronariche, permettendo la diagnosi precoce di aterosclerosi e di stenosi coronarica, ed aumentando l'accuratezza di diagnosi e di trattamento dei pazienti.

Tale tecnica potrebbe essere di cruciale importanza anche nell'ambito della diagnosi di patologie di origine tumorale e non, per le quali la precisa localizzazione anatomica è molto rilevante, come nella visualizzazione di sedi di infiammazione, in studi di comparazione perfusione/ventilazione come nell'*imaging* di embolie polmonari, in neurologia, dove l'elevato dettaglio anatomico-funzionale è essenziale ai fini della corretta diagnosi di patologie cerebrali.

Considerando lo scenario medico-nucleare, appare evidente come i radiofarmaci attualmente in uso clinico come traccianti di perfusione sono dotati di caratteristiche farmacocinetiche che si discostano enormemente dal comportamento ideale, mentre l'introduzione di agenti recettore-specifici risulta estremamente limitata.

Il numero di nuovi traccianti a base di Tc-99m, radionuclide utilizzato nel 90% delle indagini SPET, che ha ottenuto l'autorizzazione all'immissione in commercio negli ultimi anni è stato relativamente basso, se confrontato con i decenni precedenti. Le cause di questa chiara stagnazione del mercato sono attribuibili a fattori sia scientifici, come la difficoltà di ottenere complessi *target*-specifici in grado di preservare le proprietà biologiche della molecola nativa, che economici, quali l'elevato costo di sviluppo, il limitato ritorno economico e l'aumentata *performance* e concorrenza di altre tecniche di *imaging*. Nonostante ciò, la ricerca di migliori strategie sintetiche utilizzabili nella preparazione di radiofarmaci non si è mai arrestata. Particolare interesse è stato rivolto allo sviluppo di metodologie (HYNIC, $[Tc^{I}(CO)_3]^+$, $[Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$) per la marcatura di molecole biologicamente attive ed in particolare di sequenze peptidiche, quali potenziali agenti di *imaging* nel monitoraggio della terapia genica e dei processi metabolici, e nella valutazione degli assetti recettoriali in tessuti normali o patologici. Tra questi nuovi approcci sintetici, il sistema $[M^{V}(N)(PNP)]^{2+}$, per le favorevoli caratteristiche chimico-fisiche, rappresenta un ottimo candidato per lo sviluppo di nuovi radiofarmaci da utilizzare sia nella diagnosi medico-nucleare che nella radioterapia recettore-specifica.

Sezione A

Sintesi e valutazione biologica di azoturo complessi di Tc-99m per scintigrafia perfusionale miocardica.

A1. Obiettivo.

In questa Sezione l'attività è rivolta allo studio struttura-attività di complessi monocationici dissimetrici del tipo $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$, ove DBODC è N,N-bis-etossietilditiocarbammato e PNPX un legante amminodifosfinico. Tali complessi sono studiati quali potenziali agenti da utilizzare nella scintigrafia perfusionale del miocardio.

La scintigrafia perfusionale miocardica è una metodica non invasiva che permette lo studio della funzionalità cardiaca tramite la visualizzazione scintigrafica del muscolo cardiaco nel quale sia distribuito e concentrato un radiofarmaco somministrato per via venosa periferica. Per l'esecuzione di questa indagine sono utilizzati radiofarmaci in grado di concentrarsi nel cuore in modo direttamente proporzionale al flusso coronarico regionale, utilizzando un meccanismo di interazione non specifico con il tessuto bersaglio. Un agente di perfusione cardiaca ideale dovrebbe possedere un'alta estrazione di primo passaggio, in modo da poter essere captato rapidamente dal tessuto miocardico immediatamente dopo l'iniezione ed inoltre dovrebbe presentare un rapido *wash-out* da organi e tessuti non bersaglio, quali polmoni, fegato e sangue, in modo da consentire una chiara visualizzazione dell'intera regione cardiaca.

Recentemente sono stati proposti come potenziali agenti per *imaging* cardiaco alcuni complessi monocationici di Tc-99m la cui struttura è presentata in Figura 1, con formula generale $[^{99m}Tc(N)(DTC)(PNP)]^{+}$ aventi un *core* azoturo e due diversi leganti bidentati: l'uno, DTC, è un legante monoanionico del tipo ditiocarbammato, quale DBODC, mentre l'altro, PNP, è un chelante amminodifosfinico neutro del tipo PNP3 (N,N-bis-[di(metossipropil)fosfinoetil]metossietilammina) o PNP5 (N,N-bis-[di(metossipropil) fosfinoetil]etossietilammina).

Studi di biodistribuzione *ex vivo,* condotti in vari modelli animali ed *in vivo* su volontari umani sani, hanno mostrato che questi eterocomplessi presentano delle caratteristiche che si avvicinano a quelle ideali, soprattutto se paragonati con i traccianti monocationici tenceziati attualmente in uso clinico (Cardiolite® e Myoview®). Essi sono rapidamente estratti dal tessuto cardiaco, dove permangono per un tempo prolungato e presentano una rapida *clearance* ematica e polmonare. In particolare, la captazione epatica è transitoria e l'eliminazione da questo organo rapida e quantitativa (l'attività iniziale è completamente

escreta nell'intestino dopo un'ora dall'iniezione).

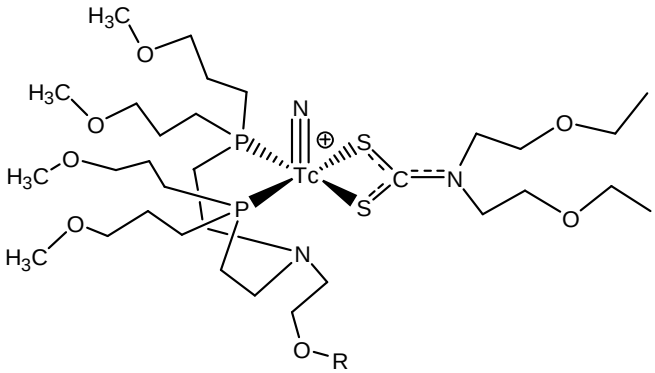


Figura 1. Complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP)]^{+}$,
R=CH_3 per PNP3, R=CH_2CH_3 per PNP5.

La captazione cardiaca è paragonabile a quella di Cardiolite® e Myoview® mentre i rapporti cuore/polmoni e cuore/fegato rivelano una significativa differenza. Infatti i rapporti per $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]^{+}$ e $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$ aumentano notevolmente nel tempo diventando molto elevati nell'intervallo tra 60-120 minuti p.i.. Ciò permette, a un'ora dall'iniezione, un'ottima visualizzazione dell'intero tessuto cardiaco, in particolar modo della parete infero-apicale.

Malgrado queste premesse, gli eterocomplessi in studio presentano una estrazione di primo passaggio (approssimativamente del 60%), paragonabile a quella dei traccianti monocationici tecneziati in uso clinico, ma relativamente bassa se confrontata con i complessi neutri ^{99m}Tc-teboroxime (88-91%) e ^{99m}Tc(N)NOET (80-90%), come visualizzato in studi di perfusione di primo passaggio in modello canino. Per questi ultimi composti l'alta estrazione di primo passaggio sembra essere correlata con la loro elevata lipofilia, parametro che regola la diffusione attraverso le membrane biologiche.

Si è valutata quindi la possibilità di migliorare le caratteristiche biologiche del complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$, incrementando l'estrazione di primo passaggio e mantenendo inalterate le altre proprietà farmacocinetiche che garantiscono un ottimo livello di immagini. La dissimmetria del complesso consente di modularne puntualmente le proprietà idrofiliche/lipofiliche, mediante l'introduzione di opportune variazioni del legante amminodifosfinico o ditiocarbammico in modo indipendente, permettendo di modificarne così il profilo biodistributivo, con l'obiettivo di realizzare una versione ottimizzata dell'agente di perfusione miocardica $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$.

Sono quindi stati sintetizzati complessi del tipo [^{99m}Tc(N)(DBODC)(PNPX)]$^{+}$. I leganti amminodifosfinici PNPX con diversa lipofilia, conferita da diverse funzionalizzazioni sugli atomi di fosforo e di azoto, sintetizzati ed utilizzati in questo studio, sono rappresentati in Figura 2.

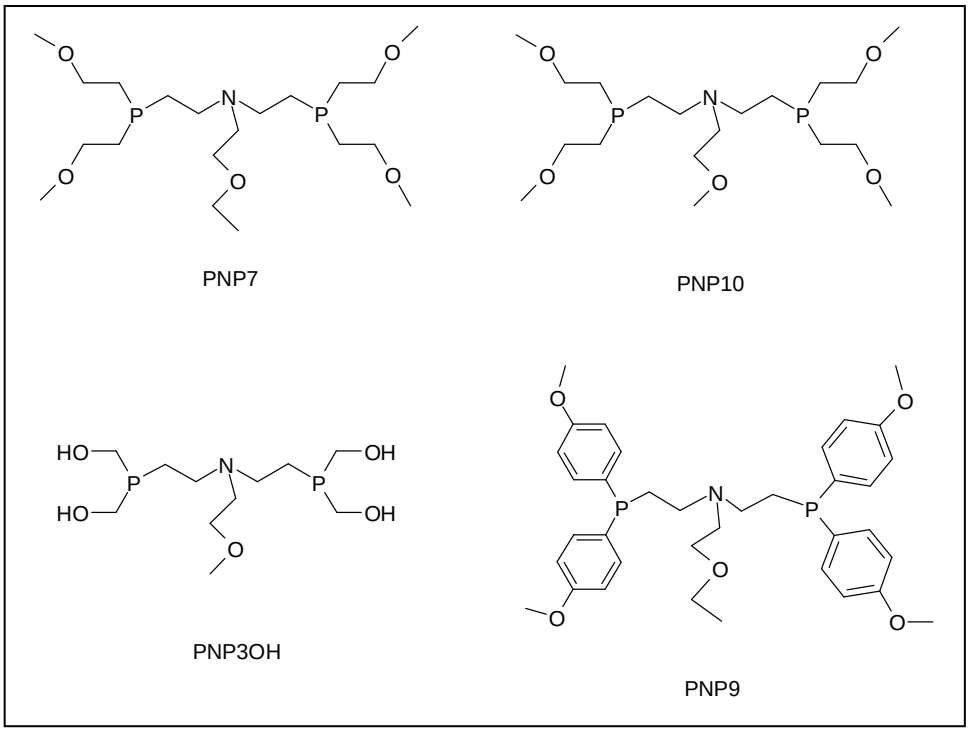


Figura 2. Leganti amminodifosfinici PNPX utilizzati nel presente lavoro.

A2. Introduzione.

A2.1 MEDICINA NUCLEARE.

La Medicina Nucleare è la specialità dell'*imaging* che, avvalendosi di radiofarmaci caratterizzati da emissione di radiazioni gamma o positroni, è in grado di ottenere immagini (scintigrafie) che descrivono la distribuzione *in vivo* del tracciante, fornendo utili informazioni di tipo biochimico e fisiologico concernenti il tessuto in esame. La possibilità di utilizzare radionuclidi emittenti particelle in grado di veicolare una dose di radiazione citotossica a tessuti selezionati come bersaglio, consente inoltre l'applicazione di tale disciplina a scopi terapeutici. La terapia con radionuclidi, utilizzata per oltre mezzo secolo nel trattamento di patologie tiroidee, è attualmente estesa alla cura di molte forme tumorali (es. Zevalin®, anticorpo marcato con Y-90, recentemente entrato in commercio per il trattamento del linfoma non-Hodgkin).

RADIOFARMACI: DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE.

Un radiofarmaco è una molecola contenente nella struttura chimica un radionuclide emittente radiazioni γ, β^+, elettroni Auger o particelle α o β^-, usato per la diagnosi e la terapia di molte patologie. A seconda della radiazione emessa si ha una diversa possibile applicazione medica; pertanto, si possono distinguere due grandi categorie: radiofarmaci diagnostici e terapeutici. I radiofarmaci per applicazione diagnostica sono molecole marcate con isotopi γ emittenti per SPECT (tomografia computerizzata a singola emissione di fotoni) o isotopi emittenti positroni per PET (tomografia ad emissione di protoni). Nel caso di particelle α o β^- o elettroni Auger, la radiazione è assorbita localmente dal tessuto patologico per indurre effetti citotossici.

Una seconda possibile classificazione prende in considerazione le caratteristiche biodistributive del tracciante: per alcuni, detti radiofarmaci di perfusione, la farmacocinetica è influenzata dalle proprietà chimico-fisiche del composto, per altri, definiti "*target*-specifici", è determinata dal *binding* recettoriale o da specifiche interazioni biologiche.

I radiofarmaci sono piccole molecole organiche o complessi inorganici somministrati

principalmente per via venosa periferica. Il radionuclide deve essere quindi incorporato stabilmente all'interno di queste molecole, affinché esse siano in grado, dopo l'iniezione per via sistemica, di giungere inalterate ai tessuti bersaglio ed essere qui ritenute in base a determinate condizioni fisiologiche o ad una specifica espressione genica.

Il radionuclide può essere associato ad una biomolecola vettrice come una proteina, un peptide, un anticorpo o un neurotrasmettitore che fornisce il meccanismo di *targeting*. In questo contesto esso è quindi meramente un "passeggero", con una minima influenza sul meccanismo di localizzazione e riconoscimento del bersaglio.

Il radionuclide può anche essere parte di un composto le cui proprietà *in vivo* sono intrinseche alla chimica propria dell'elemento stesso e non dipendono solo dalle caratteristiche chimico-fisiche del complesso. Ad esempio, nei complessi di rame bis(tiosemicarbazone), utilizzati nella metodica PET per la misura del flusso ematico e dell'ipossia (tumori ipossici e disturbi cardiaci), le proprietà di *targeting* dipendono dall'attività redox del metallo stesso.

Scopo delle applicazioni diagnostiche è la descrizione dettagliata della morfologia anatomica e soprattutto delle funzioni fisiologiche di organi o tessuti in cui sia concentrato il radiofarmaco, fornendo così un metodo non invasivo per identificare la patologia e monitorare l'efficacia di un trattamento terapeutico. La concentrazione a cui vengono utilizzati tali radiofarmaci è molto bassa, tra 10^{-6} e 10^{-8} M, concentrazione alla quale generalmente non hanno effetti farmacologici.

I radiofarmaci diagnostici sono principalmente complessi metallici con un opportuno chelante organico, negli agenti di perfusione, o una biomolecola nei radiofarmaci *target*-specifici.

I radiocomplessi per applicazione terapeutica sono molecole progettate allo scopo di veicolare una dose di radiazione ionizzante curativa a specifici siti patologici, per lo più tumorali. Ostacolo principale ad una più ampia diffusione della radioterapia, utilizzata da più di quaranta anni per il trattamento di patologie tiroidee mediante radioiodio, è la disponibilità e la produzione di opportuni isotopi e la loro elevata e selettiva localizzazione nel tessuto bersaglio. Dosi terapeutiche di radiazioni possono essere veicolate al sito bersaglio applicando tre diverse strategie: irradiazione esterna o convenzionale, impianti oppure somministrazione sistemica (trattate estesamente nella Sezione C).

La somministrazione sistemica di radiofarmaci progettati per la localizzazione selettiva al sito tumorale offre l'importante opportunità di trattare sedi metastatiche secondarie sconosciute. Idealmente un composto radioterapico dovrebbe localizzarsi alla sede della lesione in concentrazione tale da veicolare una dose di radiazione citotossica alle cellule tumorali e mostrare una rapida *clearance* da sangue e altri tessuti in modo da minimizzare il danno ai tessuti sani.

Raggiungere il massimo rapporto *target/background* è la chiave per avere buona qualità di immagine e, nelle applicazioni terapeutiche, minimizzare gli effetti collaterali. Permette inoltre il riconoscimento di siti patologici molto piccoli con un'importanza cruciale nella visualizzazione di micrometastasi in pazienti portatori di neoplasie. Nonostante la risoluzione dei recenti PET *scanners* sia dell'ordine di alcuni millimetri, tumori di dimensioni inferiori possono, in linea di principio, essere visualizzati e localizzati (sebbene non risolti) se si riesce a veicolare una dose sufficientemente elevata alla sede implicata.

Complessi metallici come radiofarmaci.

La chimica inorganica (inclusa la chimica organometallica) gioca un ruolo chiave nello sviluppo di nuovi radiofarmaci in quanto molti dei radionuclidi potenzialmente utili sono dei metalli. Persino nella PET, dove radionuclidi "organici" (C-11, F-18, N-13, O-15) hanno avuto, fino a poco tempo fa, un ruolo chiave ed esclusivo, stanno rapidamente acquisendo importanza radionuclidi di metalli (come rame, gallio, ittrio e zirconio) e non-metalli più pesanti (bromuri, ioduri, astaturi).

Nel corso della storia molti metalli e loro complessi sono stati utilizzati per il trattamento di diverse patologie, come artrite e cancro. Al contrario, l'uso di metalli radioattivi e loro complessi come radiofarmaci per *imaging* e radioterapia è invece un'area relativamente nuova. In particolare alcuni metalli, grazie a interessanti proprietà nucleari quali tipo di emissione, emivita e ricca chimica di coordinazione, rivestono importanza nello sviluppo di radiofarmaci.

Radiopharmaceutical	Trade name	Primary uses
Indium-111 pentetate	Indium-111 DTPA®	Imaging of CSF kinetics
Indium-111 oxyquinoline	Indium-111 oxine®	Labeling leukocytes and platelets
Samarium-153 EDTMP	Quadramet®	Palliative treatment of bone pain
Tc-99m Bicisate (ECD)	Neurolite®	Cerebral perfusion imaging
Tc-99m Disofenin (DISIDA)	Hepatolite®	Hepatobiliary imaging
Tc-99m Exametazine (HMPAO)	Ceretec®	Cerebral perfusion imaging
Tc-99m Gluceptate	Glucoscan®	Renal imaging
Tc-99m Lidofenin (HIDA)	Technescan® HIDA	Hepatobiliary imaging
Tc-99m Mertiatide	Technescan® MAG3	Renal imaging
Tc-99m Oxidronate (HDP)	Osteoscan® HDP	Bone imaging
Tc-99m Pentetate (DTPA)	Techneplex®, Technescan®	Renal imaging and function studies
Tc-99m Sestamibi	Cardiolite®	Myocardial perfusion imaging
	Miraluma®	Breast tumor imaging
Tc-99m Succimer (DMSA)	DMSA	Renal imaging
Tc-99m Teboroxime	Cardiotec®	Myocardial perfusion imaging
Tc-99m Tetrofosmin	Myoview®	Myocardial perfusion imaging

Tabella 1. Piccoli complessi di radionuclidi per diagnosi e terapia[1].

In Tabella 1 sono riportati esempi di radiofarmaci commerciali costituiti da piccoli complessi di metalli radioattivi e la loro applicazione medica. Si nota come il radionuclide Tc-99m sia il più utilizzato nell'*imaging* medico-nucleare. Dalla prima applicazione clinica del $^{99m}TcO_4^-$ per patologie tiroidee, in analogia con lo iodio, molti complessi di Tc-99m sono stati sintetizzati e studiati come potenziali agenti di *imaging*, portando all'ottenimento di radiofarmaci spesso indicati con il termine di "agenti metallo essenziali" (Figura 3), per i quali la chimica di coordinazione del tecnezio riveste un ruolo cruciale. Per questi composti, infatti, biodistribuzione e *targeting* dipendono unicamente dalle caratteristiche chimico-fisiche (lipofilia, carica e dimensione) del complesso.

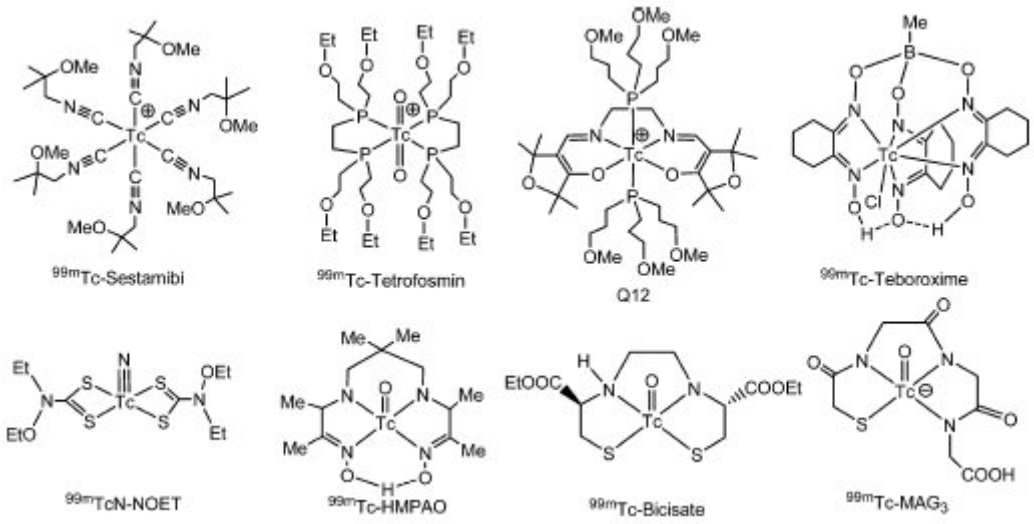


Figura 3. Struttura di radiofarmaci basati su piccoli complessi metallici.

A2.2. IL TECNEZIO: GENERALITA' E CHIMICA DI COORDINAZIONE.

Attualmente la Medicina Nucleare utilizza in più del 90% delle applicazioni diagnostiche radiofarmaci che contengono l'isotopo metastabile del Tecnezio-99, per le sue peculiari e vantaggiose caratteristiche chimico-fisiche:

- emissione di radiazione γ monocromatica di energia pari a 140 keV, ottimale per la rivelazione con gamma-camere o scanner rettilineo;
- assenza di emissioni α e β^-, potenzialmente pericolose per il paziente;
- resa fotonica esterna del 90%, che permette un'ottima qualità di immagine;
- tempo di dimezzamento di 6.02 ore, sufficientemente lungo per sintetizzare i radiofarmaci, testarne la purezza, iniettarli nel paziente e condurre l'indagine nel minore tempo possibile, minimizzando l'esposizione del paziente e dell'ambiente alla radiazione;
- il principale prodotto di decadimento è Tc-99, il quale decade a rutenio stabile in 2.15×10^5 anni e questo, unito al fatto che è presente in piccolissime concentrazioni nei radiofarmaci, fa sì che esso non sia biologicamente dannoso;
- numerosi stati di ossidazione, da -1 a +7, il che offre un'ampia possibilità di "manipolazione" chimica per la sintesi di potenziali agenti di *imaging*;
- facilità di approvvigionamento e costi relativamente bassi del pertecnetato di sodio $Na[^{99m}TcO_4]$, materiale di partenza, ottenuto dal generatore $^{99}Mo/^{99m}Tc$, ampiamente in uso nella pratica clinica.

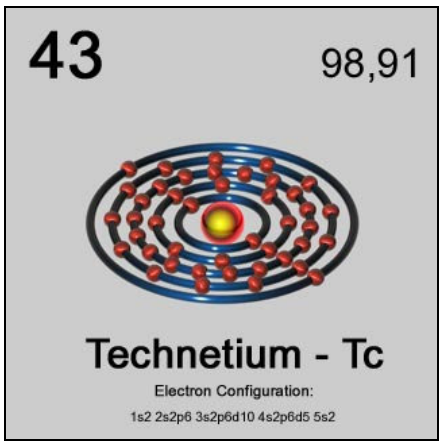


Figura 4. Il Tecnezio.

Il Tecnezio (Figura 4), $_{43}$Tc, è un metallo di transizione appartenente al Gruppo 7 della Tavola Periodica di Mendeleev, color grigio-argento. Il nome deriva dal greco *τεχνητος* , artificiale, poiché esso fu preparato artificialmente nel 1937 da Emilio Segrè e Carlo Perrier bombardando un bersaglio di molibdeno con deuteroni ^{2}H (nuclei di deuterio, costituiti da un protone ed un neutrone) nel ciclotrone di Berkeley in California. In natura, tracce microscopiche dell'isotopo Tc-99 traggono origine dalla fissione spontanea dell'uranio.
I trenta isotopi conosciuti hanno numero di massa compreso tra 90 e 110, sono instabili e per questo radioattivi e hanno tempi di dimezzamento compresi tra 0.86 secondi (Tc-110) e 4.2 x 10^6 anni (Tc-98). (Tabella 2).

Nuclide	$t_{½}$	Emissione
^{90m}Tc	5.0 s	β^+, γ
^{90}Tc	7.9 s	β^+, γ
^{91m}Tc	3.3 s	β^+, γ
^{91}Tc	3.14 m	β^+, γ
^{92}Tc	4.4 m	β^+, γ
^{93m}Tc	43.5 m	γ
^{93}Tc	2.7 h	β^+, γ
^{94m}Tc	53 m	β^+, γ
^{94}Tc	4.9 h	β^+, γ
^{95m}Tc	60 d	β^+, γ
^{95}Tc	20 h	γ
^{96m}Tc	52 m	γ
^{96}Tc	4.3 d	γ
^{97m}Tc	91 d	γ
^{97}Tc	2.6x10^6 y	β^-, γ

Nuclide	$t_{½}$	Emissione
^{98}Tc	4.2x10^6 y	β^-, γ
^{99m}Tc	**6.02 h**	**γ**
^{99}Tc	**2.1x10^5 y**	**β^-**
^{100}Tc	15.8 s	β^-, γ
^{101}Tc	14.2 m	β^-, γ
^{102m}Tc	4.3 m	β^-, γ
^{102}Tc	5.3 s	β^-, γ
^{103}Tc	54.2 s	β^-, γ
^{104}Tc	18.2 m	β^-, γ
^{105}Tc	7.6 s	β^-, γ
^{106}Tc	36 s	β^-, γ
^{107}Tc	21 s	β^-, γ
^{108}Tc	5 s	β^-, γ
^{109}Tc	1.4s	β^-
^{110}Tc	0.83 s	β^-, γ

Tabella 2. Emivite e tipi di decadimento degli isotopi del Tecnezio [5].
(s= secondi, m= minuti, d= giorni, y= anni).

Di questi isotopi sono commercialmente disponibili due isomeri: Tc-99g (*ground* o semplicemente Tc-99) e Tc-99m (metastabile). Essi hanno identica composizione nucleare (43 protoni e 56 neutroni), ma differiscono per il diverso contenuto energetico nucleare.
Il radionuclide Tc-99g è ottenuto per decadimento radioattivo, con emissione di radiazioni β^-, del Molibdeno Mo-99, il quale è ricavato come sottoprodotto della fissione dell'Uranio U-235 o per bombardamento neutronico del Mo-98. Tc-99 decade a Ru-99 stabile con un tempo di dimezzamento di 2.15 x 10^5 anni, emettendo radiazioni β^- a bassa energia (290 keV) che, per interazione con la materia, producono espulsione di elettroni o irraggiamento X "di frenata" (effetto Bremsstrahlung). Se l'isotopo è utilizzato in quantità

inferiori a 10 mg, le radiazioni β^- sono assorbite dallo spessore delle pareti della vetreria da laboratorio, rendendo scarsamente pericoloso l'utilizzo del Tc-99. Tuttavia, per evitare qualsiasi rischio di contaminazione, tutte le manipolazioni si eseguono in *glove-boxes* in leggera depressione. Potendolo manipolare in quantità ponderate, esso è utilizzato nella sintesi di composti tecneziati caratterizzabili con le comuni tecniche analitiche, e confrontabili mediante metodi cromatografici con analoghi complessi di Tc-99m, preparati in concentrazione micro- o nano-molare. Tc-99 è disponibile in commercio in soluzioni acquose di pertecnetato di ammonio $NH_4[^{99}TcO_4]$ e allo stato solido come biossido di Tecnezio $^{99}TcO_2$, facilmente ossidabile con perossido di idrogeno a pertecnetato.

L'isotopo Tc-99m è generato dal decadimento radioattivo con emissione di radiazioni β^- (con energia di 1.23 MeV) del Mo-99 il quale per l'87% delle disintegrazioni decade a Tc-99m e per il restante 13% a Tc-99. Il nucleo del Tc-99m si trova in uno stato energetico eccitato detto metastabile e la sua diseccitazione avviene attraverso un processo che prende il nome di transizione isomerica. Essa prevede l'emissione di tre fotoni gamma, dei quali due vengono convertiti in elettroni e radiazioni X, mentre il terzo, che costituisce il 99% delle disintegrazioni, conduce all'emissione di una radiazione di 140 keV utilizzata nelle misure scintigrafiche (Figura 5).

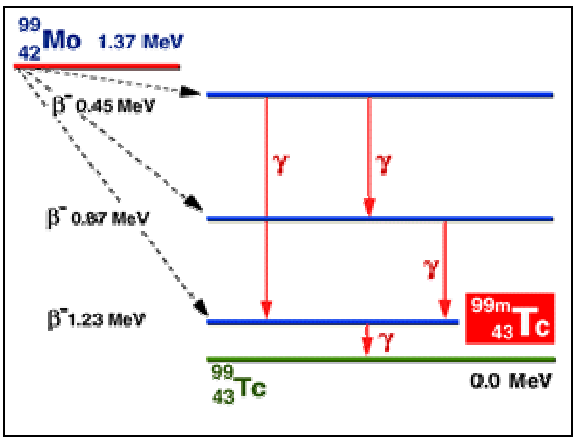


Figura 5. Decadimento del Mo-99 a Tc-99.

L'uso generalizzato del Tc-99m è stato reso possibile dallo sviluppo di un generatore portatile che ne ha permesso l'impiego anche in strutture lontane dai luoghi di produzione, superando le limitazioni di tempo per le fasi di preparazione, controllo di qualità, trasporto e immagazzinamento dei prodotti marcati.

Il funzionamento di un generatore è basato su una successione di decadimenti radioattivi

(serie radioattiva) di due o tre fasi attraverso le quali un radionuclide a emivita relativamente lunga, detto genitore, decade ad un radionuclide a corta emivita, detto figlio, utilizzabile direttamente nella preparazione di radiofarmaci. Poiché i radionuclidi in oggetto non sono isotopi di uno stesso elemento è possibile una separazione chimica ed un isolamento tra "padre" e "figlio".

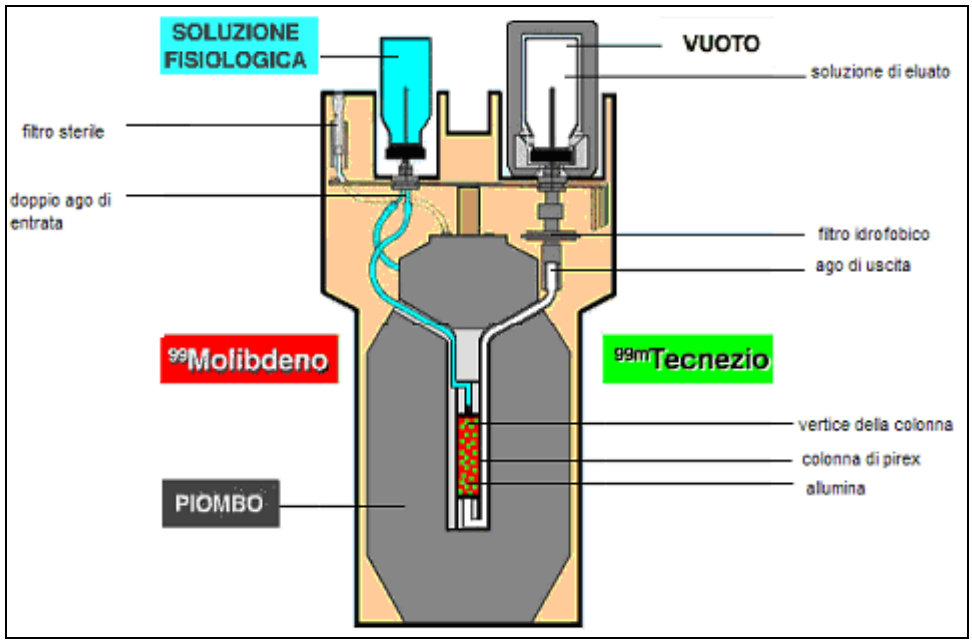


Figura 6. Sezione del generatore che si basa sulla coppia $^{99}Mo/^{99m}Tc$.

Il generatore di Tc-99m si basa sulla coppia $^{99}Mo/^{99m}Tc$: il Molibdeno (numero atomico 42) e il Tecnezio (numero atomico 43) sono due elementi chimicamente differenti ed hanno proprietà chimico-fisiche diverse, pertanto possono essere separati tramite una resina a scambio ionico (Figura 6). Il cuore del generatore è costituito da una colonna cromatografica sterile di allumina sulla quale viene adsorbito il Mo-99 nella forma di $[^{99}MoO_4]^{2-}$, inserita in un contenitore di piombo (alcuni cm di spessore) per frenare le radiazioni gamma emesse dal Mo-99 (di energia fino a 1 MeV). Il molibdato decade, con una emivita di 67.7 ore, a pertecnetato $[^{99m}TcO_4]^-$ che a sua volta decade a Tc-99 con un'emivita di 6.02 ore. Sulla colonna, in mancanza di interventi esterni, sono quindi presenti, in equilibrio fra loro, sia il Mo-99 sia il Tc-99m. Essa è collegata all'esterno con due recipienti: uno di partenza, contenente soluzione fisiologica sterile ed uno di arrivo, in depressione, opportunamente schermato. La depressione provoca lo svuotamento del flaconcino contenente la soluzione fisiologica che, passando attraverso la colonna, eluisce

$[^{99m}TcO_4]^-$ raccolto nel recipiente finale con una concentrazione 10^{-7}-10^{-8} M, pronto per essere utilizzato per la preparazione di radiofarmaci. Subito dopo l'eluizione, la colonnina contiene quindi solo Mo-99, ma, poiché il decadimento continua, si riforma Tc-99m. Il processo di rigenerazione procede con andamento esponenziale e, in circa una emivita (6 ore), si rigenera il 50% del Tc-99m, dopo 12 ore il 75% e dopo 18 ore il 90% circa. Dopo 4 emivite (24 ore) Mo-99 e Tc-99m raggiungono nuovamente l'equilibrio e il generatore può essere nuovamente eluito. Ovviamente, poiché nel frattempo il Mo-99 è decaduto, non si otterrà più la stessa quantità di Tc-99m del giorno precedente, bensì circa il 70% (Figura 7).

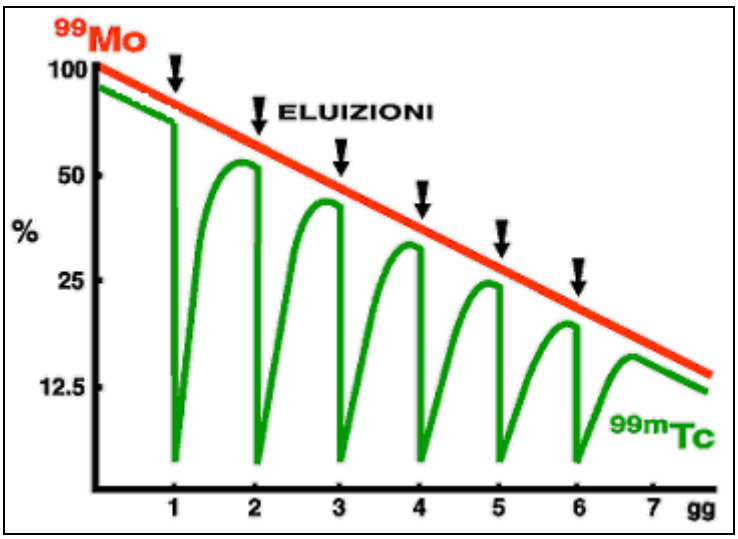


Figura 7. Processo di rigenerazione del Tc-99m dal generatore eluito giornalmente.

Questo generatore offre indubbi vantaggi: purezza chimica, stabilità e sterilità dell'eluato, costi bassi e facilità di utilizzo, ottenimento di un'elevata attività grazie all'eluizione di un piccolo volume (anche inferiore a 5 ml), rendimento elevato e stabile dell'eluizione, radioprotezione assicurata nelle fasi di produzione, trasporto ed utilizzo.

Vi sono tuttavia alcuni inconvenienti, legati soprattutto alla possibile contaminazione dell'eluato per presenza di impurezze radiochimiche di Mo-99 o di Tc-99m in stati di ossidazione diversi, non utilizzabili per il processo di marcatura; e impurezze chimiche, come alluminio o radicali liberi, che possono agire come agenti ossidoriduttivi.

CHIMICA DI COORDINAZIONE DEL TECNEZIO.

Il Tecnezio per la configurazione elettronica $[Kr]4d^55s^2$ ovvero $[Kr]4d^65s^1$ può presentare diversi stati di ossidazione da -1 (d^8), come nel complesso $[Tc(CO)_5]^-$, a +7 (d^0), come nel $[TcO_4]^-$; tale ampia possibilità deriva dal fatto che, procedendo lungo la serie di transizione, il numero di elettroni contenuti negli orbitali di tipo d aumenta e, nella zona centrale della serie, tali orbitali non sono completamente vincolati in una struttura elettronica inerte, ma rimangono disponibili per la formazione di legami. L'elevata disponibilità di questi elettroni rende possibile non solo la formazione di complessi in cui il metallo si trova in alti stati di ossidazione, ma viene anche facilitata la retro-donazione di elettroni dal metallo al legante, con conseguente stabilizzazione dei bassi stati di ossidazione.

Alcuni stati di ossidazione sono caratterizzati dalla presenza di un raggruppamento particolarmente stabile, tale da poter essere considerato un vero e proprio gruppo funzionale inorganico, definito *core* [2] (Tabella 3).

Con l'eccezione del pertecnetato, impiegato quasi esclusivamente per lo studio delle patologie tiroidee, tutti i radiofarmaci esistenti contengono Tc ad uno stato di ossidazione inferiore a +7 ed in particolare gli stati di ossidazioni più comuni sono +1 (d^6), +3 (d^4) e +5 (d^2).

Stato di ossidazione	*Core*
7+	TcO_4^-
6+	TcN^{3+}
5+	TcO^{3+}; $Tc_2O_3^{4+}$; TcN^{2+}; TcS^{3+}; $TcNR^{3+}$
4+	Tc^{4+}; TcP_2^{4+}; $TcO(OH)^+$; $Tc(OH)_2^{2+}$
3+	TcP_3^{3+}; Tc^{3+}
2+	Tc^{2+}
1+	Tc^+; $Tc(CNR)_6^+$; $Tc(CO)_3^+$
0	Tc; Tc_2
1-	Tc^-

Tabella 3. Stati di ossidazione del Tecnezio.

In soluzione acquosa gli stati di ossidazione più stabili sono il IV e soprattutto il VII.
La riduzione del pertecnetato, ottenuto dal generatore, rappresenta perciò una tappa essenziale per la complessazione del metallo con qualunque legante. La riduzione può avvenire in presenza di opportuni agenti coordinanti in grado di stabilizzare il metallo, portando alla formazione del complesso finale oppure di un intermedio labile che per transchelazione originerà il complesso finale.
Il pertecnetato è un debole ossidante, più debole del permanganato, anche a pH acido (Tabella 4); gli agenti riducenti maggiormente utilizzati sono cloruro di stagno (II), cloruro di ferro (II), acido cloridrico, acido ascorbico e sodio boroidruro. E' poi possibile utilizzare agenti quali fosfine ariliche o alchiliche (trifenilfosfina, PPh_3 o tricianoetilfosfina PCN) e le analoghe arsine, in ambiente acido, in grado sia di ridurre che di coordinare il Tecnezio, dando origine a complessi stabili.

Tecnezio	**E° (volts)**
TcO_4^-/TcO_2	+0,738
TcO_4^-/Tc	+0,477
TcO_2/Tc	+0,281

Tabella 4. Potenziali elettronici standard di riduzione in soluzione acquosa.

Lo stato di ossidazione del metallo è definito dalla natura del legante, dalle condizioni di reazione, quali temperatura, pH e concentrazione del legante [3], e dalla natura degli atomi coordinanti nei leganti. Ad esempio, la riduzione del pertecnetato con cloruro di stagno (II) in presenza di un legante tetradentato, quale il "cyclam", porta alla formazione di un complesso di Tc(V), mentre lo stesso riducente in presenza di un alchilisonitrile produce, a caldo, un complesso di Tc(I): il ^{99m}Tc-MIBI [4]. Con la fosfina bidentata DMPE, $[(CH_3)_2PCH_2CH_2P(CH_3)_2]$, si ottengono complessi di Tc(V), se la reazione è condotta a temperatura ambiente, di Tc (III) a pH acido ed alta temperatura, e di Tc (I) a pH basico ed alta temperatura [5].
Le capacità ossidoriduttive e coordinative del tecnezio sono influenzate, da un punto di vista cinetico, dalla concentrazione del metallo; per questo motivo, a livello macroscopico, con Tc-99g, si possono ottenere specie diverse da quelle osservate a livello nanomolare con Tc-99m. La drastica riduzione della concentrazione del metallo può, infatti, portare all'attivazione di percorsi cinetici assenti a livello macroscopico.

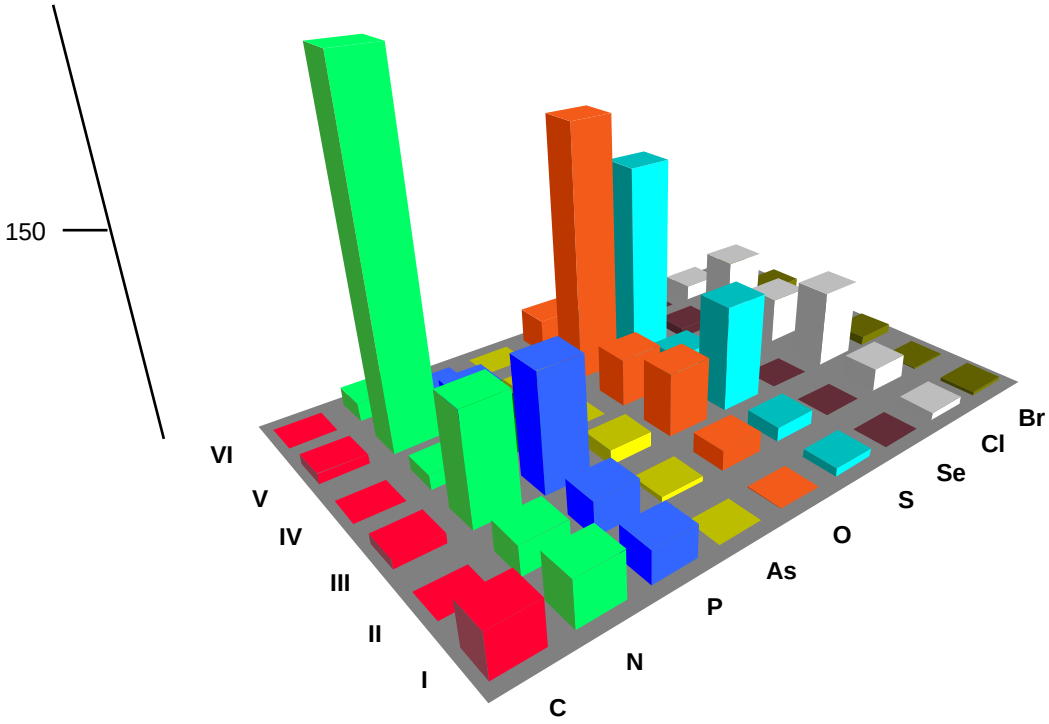


Figura 7. Atomi coordinanti rispetto al numero di ossidazione del Tecnezio

Il Tecnezio, nei suoi diversi stati di ossidazione, è in grado di formare complessi stabili con un'ampia varietà di leganti (σ-donatori e π-accettori) contenenti diversi atomi donatori (C, N, P, O, S, Cl, Br). Come visualizzato nel grafico in Figura 7, l'atomo più frequentemente coordinante il Tecnezio è l'azoto (28,3%) seguito da ossigeno (21.3%), zolfo (18.3%), fosforo (12.3%) e cloro (12.2%) [6].

L'azoto ed il fosforo sono atomi donatori molto versatili, indipendentemente dallo stato di ossidazione del metallo, e così anche gli alogeni, che si presentano omogeneamente distribuiti tra tutti gli stati di ossidazione. L'ossigeno invece predilige gli alti stati di ossidazione (V), mentre lo zolfo stabilizza gli stati intermedi (III-V).

La formazione e la stabilità cinetica e termodinamica dei complessi di Tecnezio sono influenzati dallo stato di ossidazione, tipo di *core* e proprietà elettroniche del metallo, da proprietà elettroniche ed effetti chelanti degli atomi coordinanti e da effetti mesomerici che favoriscono la ridistribuzione della densità elettronica.

Nei complessi stabili il numero di coordinazione, da cui dipende la struttura geometrica, è compreso tra 4 e 9 ed i più frequenti sono 5, pentacoordinato con geometria piramidale a base quadrata o bipiramidale trigonale, e 6, esacoordinato, con geometria ottaedrica, più o meno distorta.

L'attività biologica dei complessi è determinata dalle caratteristiche della molecola nel suo insieme e la sua stabilità, geometria e proprietà magnetiche ed elettriche (quali la carica)

della sfera esterna sono influenzate dal metallo e dagli atomi che lo coordinano, mentre i leganti sono implicati principalmente nel conferimento delle proprietà biologiche, seppure sempre in relazione alle condizioni imposte dalla geometria e dalla carica del complesso stesso. Dal punto di vista della strategia sintetica è auspicabile avere a disposizione leganti modificabili nello scheletro molecolare, in modo da modulare l'affinità del complesso per un determinato bersaglio o il bilancio idro-lipofilico, senza interferire sulla formazione del legame coordinativo metallo-legante.

Lo studio della chimica di coordinazione del Tecnezio rappresenta il primo passo non solo verso la preparazione e lo sviluppo di nuovi radiofarmaci, ma anche verso la ricerca di sistemi chelanti facilmente derivatizzabili nella loro parte più esterna, in modo da favorire il legame con molecole biologicamente attive (come anticorpi e peptidi) e che possano essere usati nella sintesi di complessi stabili di Tc.

La strategia di sintesi di un radiofarmaco dovrebbe essere compatibile con l'applicazione in un reparto di Medicina Nucleare e pertanto prevedere un ridotto numero di passaggi sintetici, condizioni più blande possibili, alta resa, bassa concentrazione di eccipienti e utilizzo di solventi biocompatibili, in modo da consentire il veloce ottenimento di una preparazione iniettabile.

Complessi di Tc(I).

Complessi di Tc(I) presentano generalmente geometria ottaedrica o pseudo-ottaedrica con le sei posizioni di coordinazione saturate da leganti quali fosfine, isonitrili e carbonili, che possiedono nella struttura elettronica orbitali di tipo π vuoti in grado di stabilizzare il metallo per retrodonazione, delocalizzando l'alta densità elettronica.

I leganti π–accettori sono generalmente privi di carica e per conseguenza tutti i radiofarmaci di Tc(I) finora preparati sono monocationici.

Il complesso di Tc(I) più utilizzato in Medicina Nucleare è ^{99m}Tc-sestamibi (Cardiolite®), in scintigrafia miocardica perfusionale, presenta geometria ottaedrica nella quale il Tc è coordinato da sei leganti 2-metossi-isobutil-isonitrile (Figura 8).

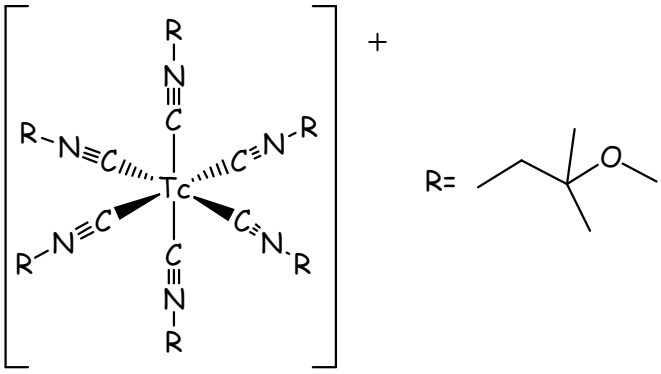


Figura 8. Struttura del complesso ^{99m}Tc-sestamibi.

Altro interessante complesso di Tc(I), esacoordinato, monocationico e a geometria ottaedrica è $[^{99m}Tc(CO)_3(OH_2)_3]^+$, proposto da Alberto, ottenuto facilmente in soluzione acquosa mediante un kit (Isolink®, distribuito da Mallinkrodt) (Figura 9) [7].

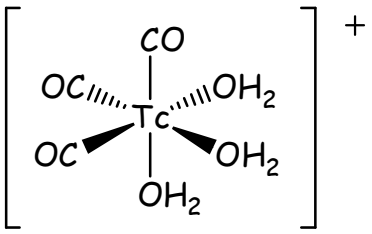


Figura 9. Struttura del complesso ^{99m}Tc-tricarbonile.

In questo complesso le tre molecole di acqua possono essere facilmente sostituite da leganti tridentati, con caratteristiche geometriche tali da coordinare facialmente $[^{99m}Tc^{I}(CO)_3]^+$, oppure bi- o monodentati e atomi di cloro a saturare la sfera di

coordinazione. Gli atomi coordinanti preferenziali sono azoti, soprattutto istidinici, che possono essere facilmente derivatizzati con peptidi o altre biomolecole.

Complessi di Tc(II), (III) e (IV).

I complessi in cui il Tc si trova negli stati di ossidazione intermedi presentano generalmente simmetria sferica e possono raggiungere la saturazione dei siti di coordinazione in presenza di un eccesso di legante. I possibili numeri di coordinazione sono 4, 5, 6 e 7.

Essi presentano una certa instabilità ossidoriduttiva che potrebbe essere sfruttata per lo sviluppo di prodotti ossidabili o riducibili "in vivo", utili per evidenziare processi biologici di tipo ossidoriduttivo. In molti casi per stabilizzare questi stati di ossidazione vengono utilizzate combinazioni di leganti.

I complessi di Tc(II), generalmente ottenuti con leganti che presentano spiccate caratteristiche acide, sono instabili e vengono facilmente ossidati negli analoghi complessi di Tc(III).

In molti complessi di Tc(III) i leganti sono fosfine variamente sostituite, e, se usati in eccesso ed in ambiente acido, si ha la riduzione del "*core*" $[Tc{=}O]^{+3}$, con la formazione di fosfinossido e complessi di Tc(III) in cui il metallo è coordinato dalle stesse fosfine o con altri gruppi. Se la fosfina è funzionalizzata con un gruppo funzionale in grado di deprotonarsi (ossidrile, tiolo, amminico, carbossilico) essa può giocare un ruolo vitale sia nella riduzione del metallo a Tc(III) che nella sua stabilizzazione attraverso la formazione di legami di tipo coordinativo. Grazie alla possibilità di modificare le subunità associate al fosforo si può modulare la lipofilia ed il comportamento biologico del tracciante e pertanto questo approccio può essere utilizzato nella preparazione di molti potenziali radiofarmaci.

Atomi di azoto di tre diossime vicinali possono formare, con Tc(III), complessi esacoordinati in cui la sfera di coordinazione è completata da un atomo di cloro (Figura 10). Un esempio è costituito dal complesso ^{99m}Tc-Teborossima appartenente alla famiglia dei complessi BATO (*Boronic acid Adducts of Technetium diOximes*), un tempo usati come agenti di perfusione cardiaca (derivato 1,2-dicicloesildiossimico) e cerebrale (derivato 1,2-dimetilgliossimico).

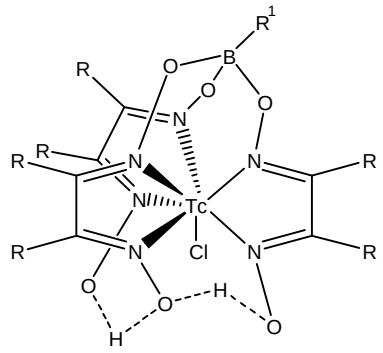


Figura 10. Struttura dei complessi BATO.

$Tc^{IV}O_2 \cdot nH_2O$ è prodotto di idrolisi della reazione di riduzione del pertecnetato, poco solubile in acqua e molto inerte chimicamente.

$[Tc^{IV}O]^{2+}$ reagisce con leganti del tipo fosfati e fosfonati con varia capacità coordinante. Si formano miscele di prodotti per coordinazione di metilenbisfosfonati che dipendono dall'ingombro sterico dei sostituenti e dalla diversa capacità chelante. I complessi hanno grande affinità per gli ioni calcio e trovano applicazione in diagnostica medico-nucleare per indagini del tessuto scheletrico e del miocardio infartuato [8].

Complessi di Tc(V).

Gli stati di ossidazione III e V sono i più importanti nella chimica del Tecnezio.

Lo stato di ossidazione V, studiato nel presente lavoro, è il più rappresentato nei radiofarmaci di Tc-99m attualmente in uso in Medicina Nucleare: ne sono esempio *Technescan-MAG3®*, per monitorare la funzionalità renale, *Myoview®*, per scintigrafia perfusionale del miocardio, ^{99m}Tc-d,l-HMPAO o *Ceretec®* e *Neurolite®* per valutare la perfusione cerebrale.

Nei complessi di Tc(V), il centro metallico presenta una elevata elettrondeficienza, per cui reagisce con basi di Lewis per dare origine a *core* più stabili e a diversa struttura (Figura 11). I più importanti sono i *core* di osso tecnezio $[Tc{=}O]^{3+}$ e quelli di azoturo tecnezio $[Tc{\equiv}N]^{2+}$.

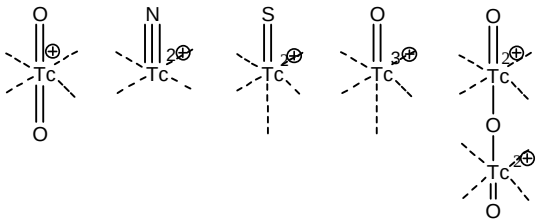


Figura 11. *Core* del Tc (V).

Il core osso tecnezio è quello che si riscontra con maggiore frequenza nella struttura chimica dei radiofarmaci attualmente in uso (Figura 12). L'unità $[Tc^{V}=O]^{3+}$ possiede un ordine di legame formale corrispondente ad un doppio legame, forma complessi a geometria piramidale a base quadrata in presenza di chelanti tetradentati del tipo N_4, N_2S_2 e N_3S_3; a geometria ottaedrica con chelanti tetradentati P_2N_2 con un alogeno o un alcossido in posizione *trans* al gruppo osso; neutri a geometria piramidale a base quadrata distorta oppure bipiramide trigonale con leganti tridentati del tipo SNS e gruppo tiolato. Quest'ultimo sistema è stato impiegato per la sintesi di radiofarmaci specifici per il recettore $5HT_{2A}$ della serotonina, dove il complesso mima la porzione della ketanserina (il principale antagonista della serotonina) responsabile del legame con il recettore [9].
Il *core* osso presenta una spiccata reattività che ne rende difficile la stabilizzazione in soluzione acquosa in cui tende a dismutare a TcO_2 e TcO_4^- [10].

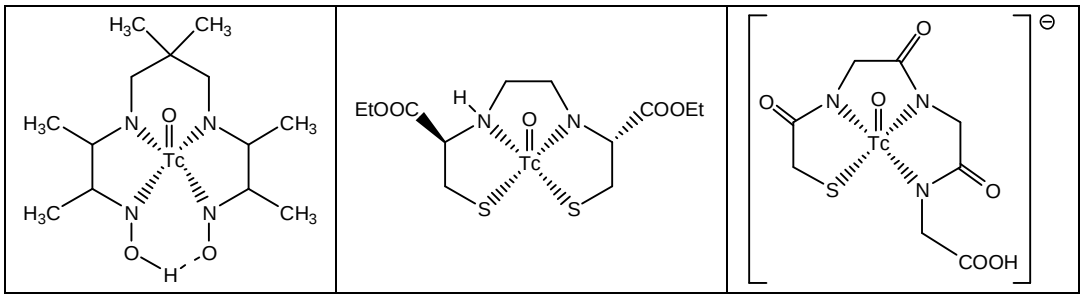


Figura 12. Radiofarmaci con *core* osso: [^{99m}Tc]-*d*,*l*-HMPAO, Ceretec®, e [^{99m}Tc]-*L*,*L*-ECD, Neurolite®, per agenti di perfusione cerebrale; [^{99m}Tc]-MAG3, TechneScan®, agente di perfusione renale.

Il *core* diosso $[Tc^{V}O_2]^+$ è più stabile del monoosso, si trova nel tracciante per scintigrafia perfusionale del miocardio ^{99m}Tc-Tetrofosmin, Myoview® (Figura 13).

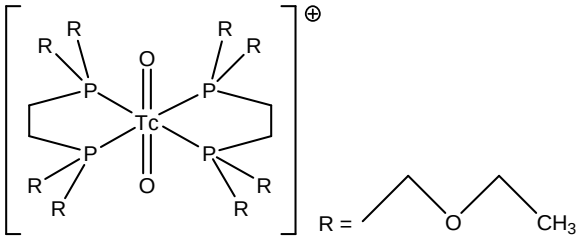


Figura 13. Struttura di^{99m}Tc-Tetrofosmin, Myoview®.

Complessi che contengono il *core* azoturo $[Tc^{V}(N)]^{2+}$ sono oggetto di studio del presente

lavoro di tesi.

Il gruppo azoturo è tra i più forti donatori di elettroni π e quando agisce come legante terminale ha un ordine di legame formale corrispondente ad un triplo legame formato da un legame σ e due legami π formati per sovrapposizione degli orbitali 2p occupati dell'azoto con due orbitali 4d vuoti, di appropriata simmetria, del metallo. Questa condizione è soddisfatta quando l'atomo di Tc è negli alti stati di ossidazione; si conoscono, infatti, complessi contenenti il *core* azoturo del Tc(V), Tc(VI), come nel complesso $[Tc^{VI}(N)Cl_4]^-$, e Tc(VII). Il legante azoturo è in grado di stabilizzare questi stati e i complessi che si formano, rendendo il metallo inerte nei confronti di reazioni ossidoriduttive.

La chimica del *core* $[Tc^{V}(N)]^{2+}$ è caratterizzata dalla formazione di complessi a geometria quadrato-piramidale oppure pseudo-ottaedrica che contiene un legante anionico o neutro in *trans* al *core* ad una distanza generalmente elevata (2,66÷3,0 Å). La situazione è simile a quella dell'osso *core* con il quale l'azoturo risulta isoelettronico ed isostrutturale, anche se in questo caso il legante determina la geometria e la carica residua dei complessi senza modificare l'unità $[Tc^{V}(N)]^{2+}$, come invece accade per $[Tc^{V}(O)]^{3+}$ che può diventare diosso.

Il *core* azoturo può essere sintetizzato in modo semplice ed efficiente in presenza di un'adatta sorgente di gruppi azoturo N^{3-}, quale può essere un'azide o un'idrazina o un ditiocarbazato. Il primo procedimento, utilizzato da Baldas per la formazione del *core* azoturo, prevedeva l'uso di sodio azide in ambiente acido per acido cloridrico e a pressione ridotta, partendo da $^{99m}TcO_4^-$ ed ottenendo $[^{99m}Tc^{VI}(N)Cl_4]^-$. Una via alternativa di sintesi, proposta da Pasqualini, prevedeva l'utilizzo di trifenilfosfina e acido cloridrico 1M come riducenti del pertecnetato e un legante del tipo ditiocarbazato. Si otteneva così la formazione di un complesso intermedio con un osso *core* e il legante ditiocarbazato, in grado successivamente di trasferire l'azoto ditiocarbazico al metallo, formando il terminale azoturo. Diversamente, l'utilizzo di leganti, quale S-metilditiocarbazato, portava alla sintesi diretta del *core* azoturo.

Tale *core* non è ottenuto come prodotto unico ma si ottengono una miscela di intermedi in grado di reagire tutti con opportuni leganti e formare un unico complesso finale [11].

E' possibile ottenere il *core* Tc-99m in alta resa in tampone fosfato dopo soli 15 minuti a temperatura ambiente, a partire da pertecnetato, in presenza di stagno cloruro quale riducente, e di diidrazide succinica, idrosolubile e poco tossica, come donatore di N^{3-}.

Il *core* $[Tc^{V}(N)]^{2+}$ presenta, rispetto al *core* osso, una minore reattività e quindi una maggiore stabilità nei confronti delle reazioni di ossido riduzione e in situazioni di pH variabile,e tale fatto conferisce ai radiofarmaci una maggiore stabilità sia *in vivo* che *in vitro*. La presenza del gruppo azoturo, per la diversa elettronegatività e per la maggiore capacità di donatore π [12], rispetto al *core* osso influenza anche:

- la lunghezza del legame, Tc≡N più corto di Tc=O;
- la maggiore probabilità di formazione di complessi pentacoordinati piuttosto che esacoordinati a causa dell'aumento dell'effetto di *trans* labilizzazione operato dal *core* azoturo rispetto all'osso *core;*
- l'angolo di legame con un generico legante equatoriale, maggiore nei complessi con unità azoturo perché ha minore ingombro sterico;
- la carica sul metallo, maggiormente neutralizzata negli azoturo-complessi;
- il legame con leganti equatoriali, di lunghezza maggiore negli azoturo complessi e meno stabile;
- per quanto attiene alla base di Lewis, che complessa il metallo, composti contenenti l'unità osso sono coordinati stabilmente da leganti sia *soft* che *hard,* mentre quelli con il *core* azoturo prediligono leganti *soft*, come fosfine e ditiocarbammati.

Esistono altri *core* caratterizzati dalla presenza di un legame tecnezio-azoto: il *core* imido $[Tc{=}N{-}R]^{3+}$; idracido $[Tc{-}N{-}R{-}R']^{3+}$, dove Tc ha numero di ossidazione +5; quello diazenido [Tc-N-N-R] dove il metallo si trova in uno stato di ossidazione più basso, il cui esatto valore dipende dal grado di protonazione dell'atomo di azoto [13]; e il legante nitrosile. [14] Quest'ultimo presenta un doppio legame metallo-azoto e l'azoto legato ad un atomo di ossigeno con doppio legame in una conformazione lineare. Esiste poi anche una conformazione piegata e a ponte (Figura 14).

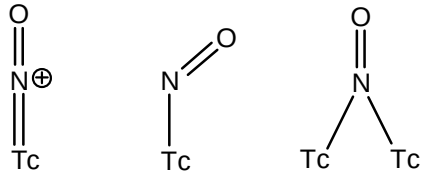


Figura 14. Modalità di legame del legante nitrosile:lineare, piegato e a ponte.

Nella conformazione lineare, il legante nitrosile presenta una carica formale +1 sull'atomo

di azoto. Questo, unitamente alle proprietà π-accettrici, lo rende unico se paragonato ai leganti osso e azoturo, soprattutto per la capacità di stabilizzare il metallo nei più bassi stati di ossidazione; il set di atomi coordinanti necessari per completare la sfera di coordinazione e la geometria dei complessi è attualmente in corso di indagini.

Recentemente, è stato riportato un metodo efficace e semplice per ottenere $H[Tc(NO)Cl_4]$ a partire da pertecnetato in una reazione "one pot" utilizzando idrossilammina idrocloruro, convertito poi nel complesso finale $[TcCl(NO)(DPPE)_2]^+$ in alta resa (DPPE= bis(difenilfosfino)etano). [15].

Il *core* diazenido, [Tc]HYNIC, riportato per la prima volta da Abrams per la marcatura di IgG [16] è stato applicato con elevata efficienza alla marcatura di proteine [17] e molte piccole biomolecole quali peptidi chemotattici [18, 19], analoghi della somatostatina [20] [21] liposomi, [22] oligonucleotidi antisenso, [23] leganti per recettori dei folati [24] e polipeptidi [25]. HYNIC, opportunamente derivatizzato, può occupare solo uno o due siti di coordinazione e per completare la sfera coordinativa è necessaria la presenza di un coligante, quale tricina o glucoeptonato, che permettono di modificare il carattere idro/lipofilico del complesso, ma che conferiscono a questo complesso "binario" instabilità termodinamica in soluzione acquosa.

L'introduzione di un sistema "ternario" costituito da tre diversi tipi di leganti: HYNIC, tricina e fosfina (TPPTS) in rapporto 1:1:1, [^{99m}Tc(HYNIC-BM)(tricina)(fosfina)], ha consentito l'ottenimento di complessi di Tc-99m e Tc-99 in alta resa, dotati di grande stabilità in soluzione acquosa e in più forme isomeriche, a seconda della presenza nella biomolecola (BM) di centri chirali. Questo approccio, applicato con successo alla marcatura di peptidi chemotattici [26], antagonisti recettoriali della vitronectina [27] e antagonisti recettoriali di GPIIb/IIIa [28], non è utilizzabile con biomolecole che contengono ponti disolfuro, in quanto facilmente ridotti da alte temperature di reazione e grandi quantità di legante fosfinico richiesti per la complessazione. Questo fatto costituisce un problema in quanto spesso i legami disolfuro sono vitali per il mantenimento di una struttura tridimensionale definita che gioca un ruolo chiave nel riconoscimento recettoriale. Liu ha recentemente riportato complessi macrociclici con derivati di HYNIC contenenti fosfina e nicotina (L) [29] del tipo [^{99m}Tc(L)(tricina)] (Figura 15), ottenuti in alta resa ed utilizzando una bassa concentrazione di leganti. La struttura di questi complessi macrociclici non è ancora completamente chiara.

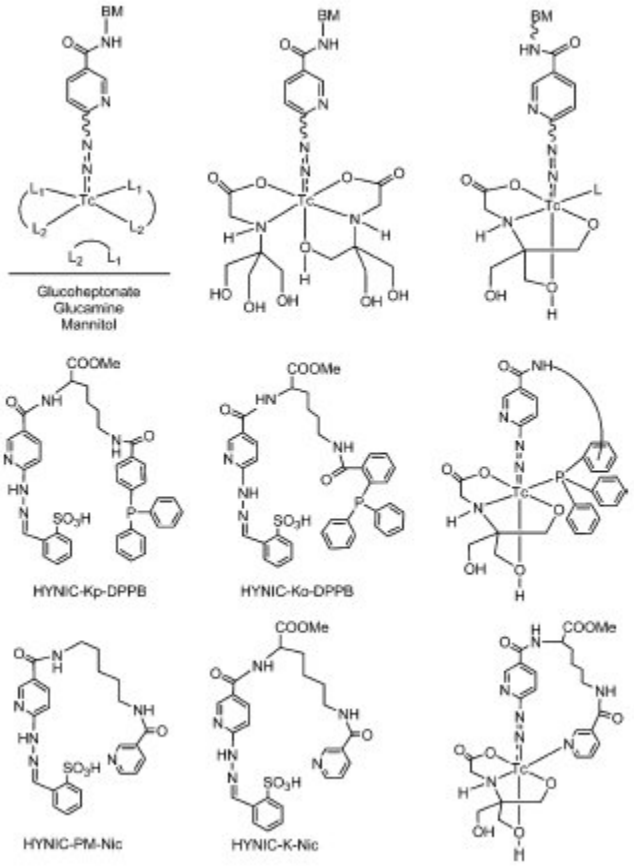


Figura 15. Complessi con *core* diazenido, [Tc]HYNIC.

Coordinazione del *core* $[Tc^{V}(N)]^{2+}$.

Complessi contenenti $[Tc^{V}(N)]^{2+}$, per le caratteristiche steriche ed elettroniche proprie del *core* azoturo, presentano generalmente numero di coordinazione cinque, a geometria diversa a seconda del *set* di atomi coordinanti che completano la sfera di coordinazione (Figura 16).

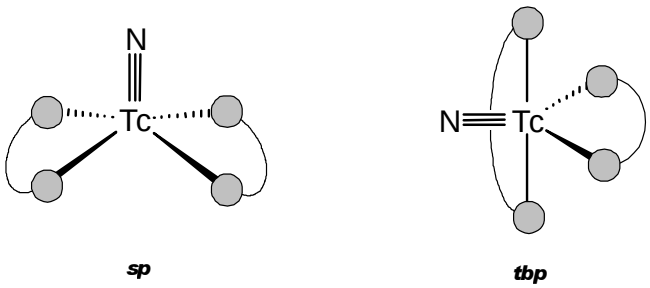


Figura 16. Possibili strutture di azoturo-complessi pentacoordinati.

Si hanno complessi a geometria piramidale a base quadrata (sp) quando gli atomi coordinanti sono basi di Lewis π-donatrici tutti uguali, con orbitali di geometria tale da

potersi sovrapporre agli orbitali d del metallo. In questo contesto, un legante con caratteristiche *soft*, in grado di donare densità elettronica al metallo, determinerà un allungamento del legame Tc-N, contrariamente, un legante *hard* ne causerà un accorciamento e comporterà una diminuzione della capacità *trans*-labilizzante e un avvicinamento (fino a 3 Å) del metallo al piano equatoriale dei leganti, così da permettere l'avvicinamento di un legante *soft* nella sesta posizione di coordinazione [30].

La geometria trigonale bipiramidale (tbp) è favorita quando gli atomi coordinanti sono diversi tra loro, costituiti da due basi di Lewis π-accettrici (come fosfori fosfinici) dotati di orbitali vuoti, e da due π-donatrici (come zolfi tiolici) con orbitali pieni di simmetria idonea a sovrapporsi con gli orbitali del metallo. In questi complessi a sfera di coordinazione mista, i due atomi π-accettori tendono ad occupare le posizioni assiali, in trans l'uno rispetto all'altro, mentre i due atomi π-donatori condividono con il gruppo azoturo le posizioni equatoriali.

Il *core* azoturo, per l'elevato ingombro sterico dovuto al legame multiplo terminale, è preferibilmente coordinato da leganti bidentati piuttosto che tetradentati.

Se la sfera di coordinazione del metallo è saturata da due leganti bidentati identici tra loro il complesso è definito "simmetrico", mentre se il centro metallico è coordinato da due leganti bidentati diversi è detto dissimmetrico. Complessi di azoturo tecnezio "simmetrici" sono ad esempio $[Tc(N)(DTC)_2]$, con DTC ditiocarbammato, a geometria piramidale a base quadrata oppure $[Tc(N)(PS)_2]$, con PS fosfino-tiolo, a geometria bipiramidale trigonale (Figura 17).

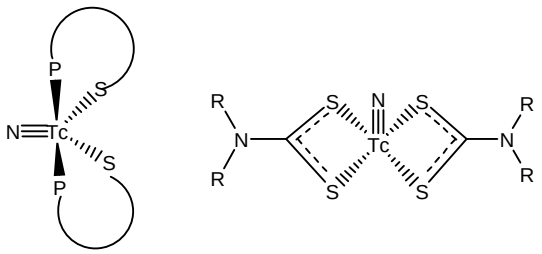


Figura 17. Strutture di $[Tc(N)(PS)_2]$ e di $[Tc(N)(DTC)_2]$.

E' dimostrato che l'aggiunta, anche contemporanea, di un legante bidentato dalle spiccate caratteristiche π-accettrici, L, e di un secondo dalle caratteristiche π-donatrici, L', porta alla formazione selettiva di un complesso misto bisostituito dissimmetrico $[Tc(N)(L)(L')]^n$

anche se in linea teorica, si potrebbero formare anche le specie: $[Tc(N)(L)_2]^n$, e $[Tc(N)(L')_2]^n$. L'uso di basi di Lewis π-accettrici quali fosfine monodentate e atomi di alogeni, basi soft, porta a complessi a geometria intermedia tra la bipiramide trigonale e la piramide a base quadrata (pseudo tbp).

Nei complessi di azoturo tecnezio è possibile produrre una distorsione progressiva dalla geometria piramidale a base quadrata a quella bipiramidale trigonale sostituendo una serie coordinante di quattro atomi identici con una serie specifica costituita da due atomi π-accettori neutri e *soft* (P) e due atomi π-donatori *hard* carichi negativamente (S^-, O^-). Questo riarrangiamento è fondamentale poiché permette la formazione di complessi dissimmetrici stabili (eterocomplessi), punto chiave per l'incorporazione di una molecola biologicamente attiva in un azoturo complesso di Tc(V) pentacoordinato (Figura 18).

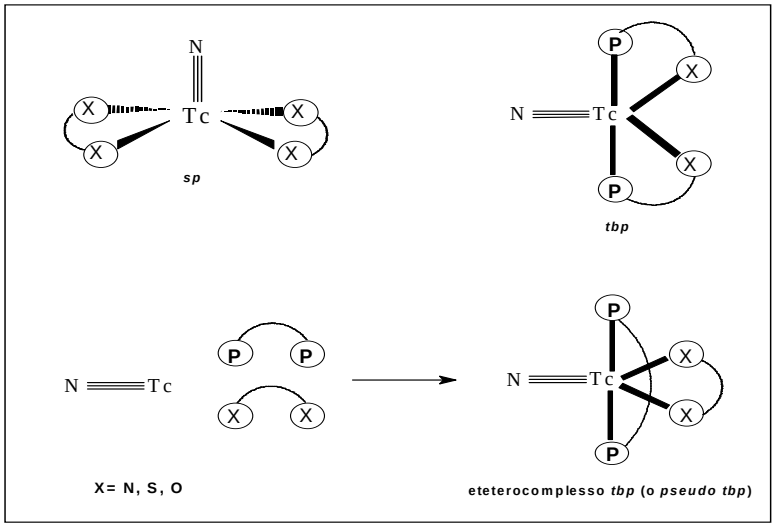


Figura 18. Differenti geometrie dei complessi di azoturo tecnezio indotte dai leganti.

Sperimentalmente si è osservato che il tipo di legante difosfinico in un frammento molecolare formato dal gruppo $[Tc^V(N)]^{2+}$ è in grado di influenzare la geometria del complesso. Infatti, se il ponte che separa gli atomi di fosforo del legante difosfinico è una catena etilenica si ha un complesso a geometria piramidale a base quadrata con gli atomi di fosforo sul piano equatoriale; se è una catena a cinque termini con un eteroatomo (azoto) si ottiene un complesso a geometria pseudo ottaedrica; ed infine un ulteriore aumento della catena (otto termini) con un eteroatomo (ossigeno) determina la formazione di una geometria bipiramidale trigonale.

L'inserimento di eteroatomi (X) nella catena carboniosa che separa gli atomi di fosforo (III)

del legante difosfinico permette, nella coordinazione al *core* azoturo, la formazione di complessi del tipo $[Tc(N)(PXP)Cl_2]$ di struttura non più trigonale bipiramidale ma pseudoottaedrica. Infatti, l'uso di difosfine bis(2-(dialchilfosfino)etil)-etere (POP) e bis(2-(dialchilfosfino)etil)-tioetere, (PSP) con i due atomi di fosforo distanziati da una catena a cinque termini e l'eteroatomo centrale, porta alla formazione di un complesso intermedio $[Tc(N)(PXP)]^{2+}$ in due distinte forme isomeriche *fac* o *mer*, in cui i due fosfori tendono a disporsi reciprocamente in *trans*, posizione termodinamicamente favorita. La presenza dell'eteroatomo influenza la cinetica di reazione: analoghi leganti difosfinici con solo catene carboniose a cinque termini tra gli atomi di P portano alla formazione dello stesso complesso con conformazione *trans,* ma in tempi molto più lunghi.

L'uso di amminodifosfine, come bis(2-(dialchilfosfino)etil)-alchilammina (PNP), determina, invece, una significativa variazione del comportamento coordinativo che risulta fortemente influenzato dal tipo di sostituente presente sull'azoto amminico. Infatti, se il sostituente è alchilico, nel complesso $[Tc(N)(PXP)Cl_2]$ il legante PNP si dispone *facialmente* con i fosfori in posizione reciproca *cis*. Se l'ammina è secondaria, PNP si dispone in posizione meridionale con i P in *trans* (Figura 19).

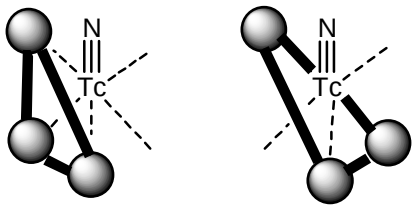


Figura 19. Disposizione *fac* e *mer* di $[Tc(N)(PXP)(L)_2]^n$

I frammenti metallici reattivi.

Con il termine di "frammenti metallici reattivi" viene indicata, a rigore impropriamente, una categoria di complessi che mostrano caratteristiche di reattività non convenzionali e le cui proprietà chimiche non erano mai state sfruttate in precedenza per la preparazione di radiofarmaci.

Un frammento metallico reattivo è costituito da uno ione metallico coordinato da due diversi leganti: uno forma un legame molto forte con il metallo, in grado di stabilizzarne lo stato ossidativo, dando così origine ad un aggregato stabile, mentre l'altro è associato all'atomo metallico attraverso un legame debole e, di conseguenza, può essere facilmente sostituito da specie coordinanti più efficaci.

Questo metodo è molto versatile in quanto può essere applicato con successo alla sintesi sia di radiofarmaci di perfusione che *target*-specifici. Esso permette infatti, mediante opportune modifiche apportabili ad uno o ad entrambi i tipi di leganti, di modulare le caratteristiche idro/lipofiliche dei complessi e così la loro farmacocinetica, particolarmente vantaggioso nei traccianti di perfusione, ma anche, attraverso sostituzione dei leganti labili con una biomolecola opportunamente derivatizzata, di ottenere complessi dotati di elevata attività specifica e selettività per uno specifico bersaglio.

Frammento metallico $[Tc^{I}(CO)_3]^+$.

Alberto *ed al.* per primi hanno riportato la sintesi *one step* del complesso di Tc(I) e Re(I) $[M(H_2O)_3(CO)_3]^+$ (M=Tc-99m, Re-188) già discusso a proposito dello stato di ossidativo I del Tc. [31]. Il complesso è ottenuto in soluzione acquosa con una resa superiore al 95% per riduzione diretta di pertecnetato o perrenato con sodioboroidruro in presenza di monoossido di carbonio. I tre carbonili costituiscono la parte stabile della molecola, mentre le tre molecole di acqua sono coordinate labilmente e pertanto possono essere facilmente sostituite da molti leganti diversi quali imidazoli, piridine, pirazoli, amidi, ammine, acidi carbossilici e loro combinazioni (Figura 20), che possono essere facilmente aggiunti ad una catena peptidica senza perturbarne drasticamente le caratteristiche biologiche originarie. Chelanti mono- e bidentati formano con Tc^{I}-tricarbonile complessi poco stabili in soluzione e con una bassa *clearance* plasmatica e pertanto non possiedono le caratteristiche per un'applicazione *in vivo*. Leganti tridentati, invece, formano con il frammento tricarbonile complessi molto stabili caratterizzati da una rapida *clearance* ematica e dai

tessuti non bersaglio.

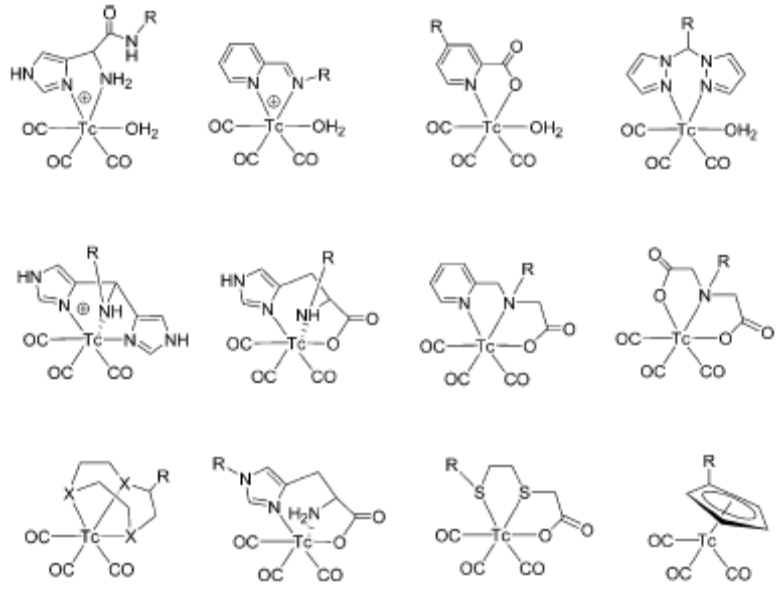


Figura 20. Esempi di leganti bi- e tridentati coordinati al frammento metallico $[^{99m}Tc(CO)_3]^+$. R può essere una biomolecola o un linker legato alla biomolecola.

Frammento metallico $[Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$.

Un analogo approccio sintetico, basato sulla produzione di azoturo complessi dissimmetrici di Tc(V) in alta resa, si basa sulle proprietà chimiche del frammento metallico $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ la cui geometria è stata precedentemente discussa [32, 33] (Figura 21).

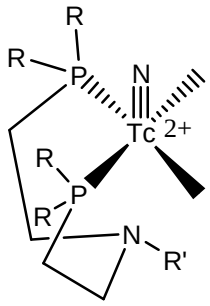


Figura 21. Rappresentazione del frammento metallico $[Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$.

A livello di tracciante la sfera coordinativa può essere variamente saturata da OH_2, Cl^-, OH^- che, essendo labilmente legati, vanno facilmente incontro a sostituzione. Infatti, la presenza degli atomi di fosforo, π-accettori, esalta la reattività delle posizioni elettrondeficienti della molecola, aumentandone il carattere elettrofilo e favorendone la

sostituzione con specie nucleofile π-donatrici come S,S$^-$ del legante ditiocarbammato, S$^-$,O$^-$ di N-acetil-cisteina o S$^-$, NH_2 di cisteina-O-etile. I complessi, misti e bisostituiti $[Tc^V(N)(DTC)(PNP)]^+$, $[Tc^V(N)(CysNAc)(PNP)]$ e $[Tc^V(N)(CysOEt)(PNP)]^+$, sono ottenuti in alta resa radiochimica (>95%), grande stabilità termodinamica ed inerzia cinetica *in vitro* ed *in vivo*. Come precedentemente esposto, le caratteristiche elettroniche del legante PNP giocano un ruolo chiave nella geometria e nella formazione del complesso finale, ostacolando la formazione di specie "simmetriche" bisostituite.

L'amminoacido cisteina può essere acetilato all'estremità amminica (CysNAc) oppure esterificato all'estremità carbossilica (CysOR) ed esprimere così come atomi coordinanti il metallo, rispettivamente, le coppie O$^-$ e S$^-$ oppure NH_2 e S$^-$, dando così origine a composti nell'ordine neutri o monocationici con elevata attività specifica (~70 GBq/μmol) [34] (Figura 22).

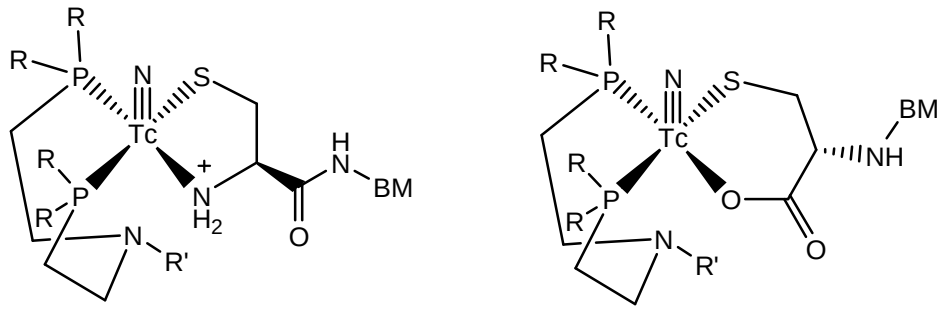


Figura 22. Coordinazione della Cisteina al frammento $[Tc^V(N)(PNP)]^{2+}$. BM=biomolecola.

La versatilità di questo sistema risiede nella possibilità di derivatizzare la cisteina, mediante la formazione di un legame carboamidico all'estremità non coinvolta nella coordinazione al metallo, direttamente o mediante interposizione di uno spaziatore, con una molecola bioattiva dotata di specificità recettoriale in grado di veicolare il complesso al sito di azione dove, grazie a interazioni specifiche, si localizza permettendo la visualizzazione e/o il trattamento del tessuto patologico esprimente il recettore.

GENERALITA' SUI LEGANTI FOSFINICI.

Vari studi hanno dimostrato che i leganti amminodifosfinici, PNP, rivestono un ruolo cruciale nella chimica di coordinazione di azoturo complessi di tecnezio.

I leganti fosfinici rivestono una grande importanza nella chimica di coordinazione anche di molti altri metalli, intervenendo, grazie ad una peculiare struttura elettronica, nella stabilizzazione di bassi stati di ossidazione.

Le fosfine sono composti formalmente analoghi alle ammine che, dal punto di vista delle proprietà coordinanti, possiedono proprietà σ-donatrici, cioè in grado di donare il doppietto elettronico disponibile del fosforo III (ibridizzato sp^3) al metallo attraverso orbitali di tipo σ, e π-accettrici, in quanto sono in grado di ricevere elettroni negli orbitali d dagli orbitali d pieni del metallo.

I leganti difosfinici possiedono orbitali 3d vacanti situati ad un livello energetico superiore a quello degli orbitali d del metallo, lo sdoppiamento del livello energetico degli orbitali d di non-legame innalza quello degli orbitali molecolari di antilegame π^* e abbassa quello degli orbitali molecolari di legame π, come indicato nel diagramma in Figura 23. Poiché gli orbitali utilizzati dai leganti fosfinici sono vuoti, rimangono disponibili per gli elettroni d del metallo i tre orbitali molecolari degeneri di legame di simmetria t_{2g} e i due orbitali molecolari degeneri di antilegame σ^* di simmetria e_g. La separazione Δ tra i livelli energetici di questi orbitali molecolari è quindi aumentata rispetto a quella che si aveva nel caso della formazione di soli legami σ: è pertanto assai probabile che essa sia superiore a quella necessaria per l'accoppiamento degli spin e che si formino quindi complessi a basso spin.

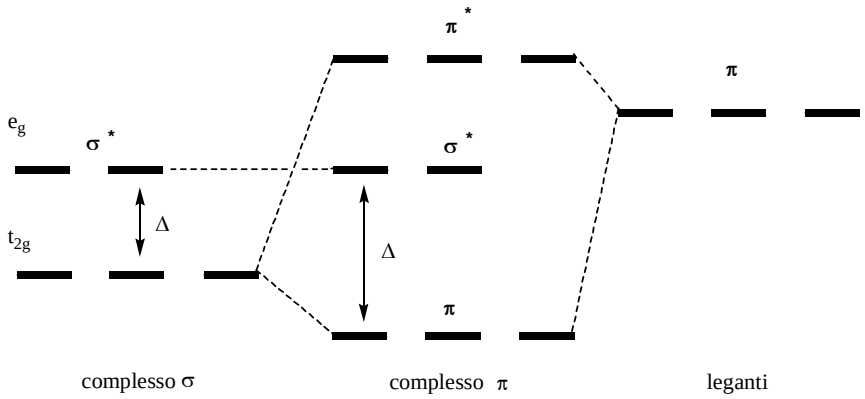


Figura 23. Diagrammi dei livelli energetici degli orbitali molecolari π in complessi ottaedrici.

Nel complesso la formazione degli orbitali molecolari σ permette la delocalizzazione degli elettroni, originariamente situati negli orbitali dei leganti, in orbitali molecolari alla cui formazione concorrono gli orbitali del metallo, il che equivale ad un parziale trasferimento della nuvola elettronica dal legante (datore σ) al metallo (accettore σ). La formazione degli orbitali molecolari π invece porta alla delocalizzazione degli elettroni, originariamente situati negli orbitali d del metallo, in orbitali molecolari alla cui formazione concorrono gli orbitali d o π^* del legante, il che equivale ad un parziale trasferimento della nuvola elettronica dal metallo (datore π) al legante (accettore π). Tale retrodonazione di elettroni tramite il legame π compensa in misura non trascurabile il trasferimento di carica negativa dal legante al metallo causato dalla formazione dei legami σ e contribuisce notevolmente alla stabilizzazione dei bassi stati di ossidazione dei metalli (Figura 24).

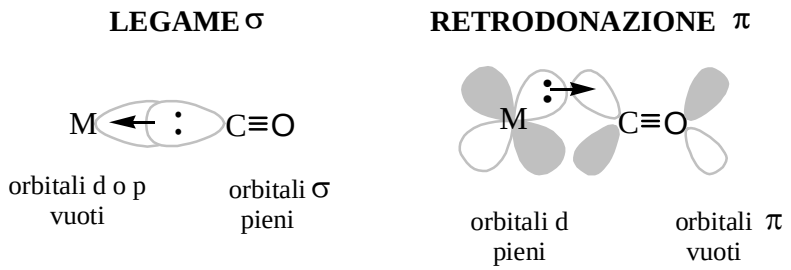


Figura 24. Raffigurazione dell'interazione tra orbitali nel fenomeno della retrodonazione.

Le fosfine sono, inoltre, basi di Lewis e, oltre a formare addotti con acidi di Lewis, hanno un potere riducente che si esplica, ad esempio, anche nei confronti di metalli, come Tecnezio e Renio, quando questi si trovano negli alti stati di ossidazione.

L'elettronegatività dei gruppi sostituenti associati agli atomi di fosforo (III) influenza il fenomeno della retrodonazione determinando una riduzione delle proprietà σ-donatrici ed un potenziamento delle proprietà π-accettrici del legante. Composti del tipo PX_3 dove X è un gruppo elettronegativo come –Ar, -OR, -Cl, -F sono leganti di tipo π, poiché la carica negativa in eccesso è smaltita attraverso il fenomeno della retrodonazione, mentre alchilfosfine PR_3 o alchile, arilfosfine PR_xAr_y sono leganti più efficaci σ-donatori.

Anche se meno importanti delle proprietà elettroniche, i fattori sterici rivestono un ruolo importante nella chimica di questi composti in quanto contribuiscono alla stabilizzazione del legame metallo-fosforo. Leganti fosfinici terziari che presentano nella loro struttura

sostituenti ingombranti, come gruppi t-butilici, tendono a favorire le configurazioni meno ingombranti e di conseguenza presiedono alla formazione di complessi con bassi numeri di coordinazione.

In generale, le fosfine alchiliche sono più riducenti e più basiche di quelle ariliche. Queste ultime, in termini di manipolazione, sono comunemente solide e quindi più stabili, mentre quelle alchiliche sono generalmente liquide e richiedono condizioni di lavoro anaerobiche, per evitare l'ossidazione del fosforo con la formazione di fosfinossido. Le stesse proprietà sono mantenute nel caso di fosfine funzionalizzate, le quali riducono il pertecnetato agli stati di ossidazione +3, +4 o +5 a seconda del tipo di fosfina, nella reazione catalizzata da acidi. Questa riduzione comporta l'ossidazione del P (III) a P (V) sotto forma di fosfinossido.

A2.3 SCINTIGRAFIA PERFUSIONALE DEL MIOCARDIO.

A2.3.1 DIAGNOSI DI CARDIOMIOPATIA.

Un recente studio condotto dal CDC (Centers of Disease Control and Prevention) ha evidenziato come le patologie cardiovascolari siano la principale causa di morte negli Stati Uniti, con 910˙000 morti all'anno ed interessino 70 milioni di persone con una qualità di vita seriamente compromessa e con costi di 403 bilioni di dollari [35].

Tra le patologie cardiache, la cardiopatia coronarica CAD (*Coronay Artery Diseases)* è la principale causa di disabilità prematura e permanente (Figura 25).

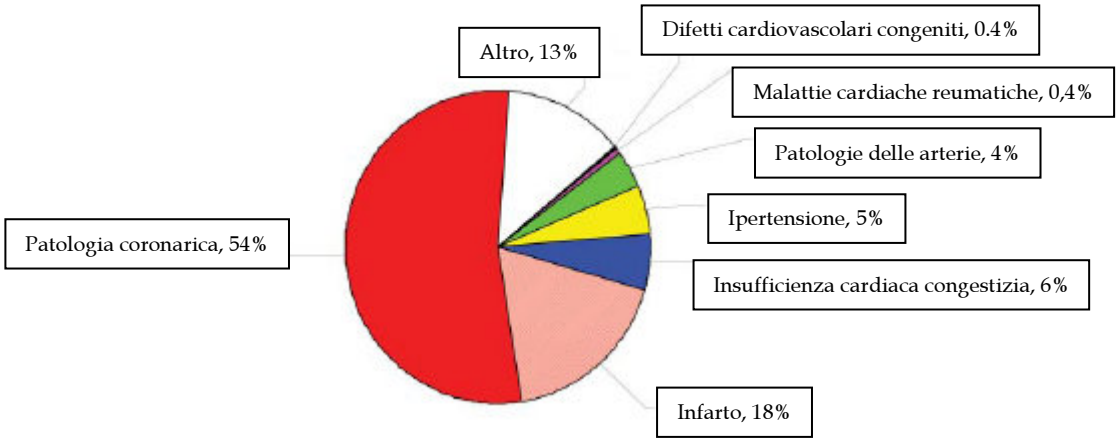


Figura 25. Patologie cardiovascolari negli Stati Uniti (fonte: CDC).

La stenosi delle arterie coronariche può predisporre il paziente all'ischemia del miocardio; essa è solitamente asintomatica fino a riduzioni del 50% del lume vasale e i sintomi clinici si manifestano quando il diametro si riduce del 70%, mentre per riduzioni maggiori la situazione evolve verso l'infarto con morte dei cardiomiociti. La prevenzione primaria e secondaria di cardiomiopatie assume pertanto un ruolo di vitale importanza, con lo scopo di identificare soggetti a rischio e di prevenire recidive sottoponendo i soggetti ad un'adeguata terapia e a più sani stili di vita [36].

Lo stato delle arterie coronariche può essere visualizzato con metodi invasivi e non. Tra i primi si annoverano cateteri che, immessi direttamente nel lume arterioso, permettono di:

- valutare la sezione del vaso mediante ecografia IVUS (*Intra Vascular UltraSound*) con ultrasuoni o elastografia IVUS con ultrasuoni e radiofrequenze;

- riconoscere i tessuti molli mediante angiografia con mezzo di contrasto;
- visualizzare i tessuti con angioscopia;
- rivelare lo stato infiammatorio tissutale mediante termografia;
- valutare la composizione delle placche ateromatose con spettroscopie Raman e NIRS nel vicino infrarosso (*Near InfraRed Spectorscopy*).

Metodiche non invasive, e meno pericolose per il paziente, sono:

- tomografia a fascio di elettroni EBCT (*Electron Beam Computed Tomography*), per valutare la quantità di calcio nelle placche;
- risonanza magnetica nucleare RMN, con mezzo di contrasto, che fornisce immagini con grande dettaglio anatomico e risoluzione (1 mm);
- tomografie ad emissione di fotoni SPET (*Single Photon Emission Tomography*) e a positroni PET (*Positron Emission Tomography*), le uniche in grado di fornire informazioni metabolico-funzionali.

Tra le possibili metodiche di diagnosi, la scintigrafia possiede un dettaglio morfo-funzionale decisamente superiore che consente una diagnosi ed una prognosi più accurata. La tecnica SPET, per il basso costo, la maneggevolezza ed il facile ottenimento dei radioisotopi di cui fa uso, rimane in assoluto la più applicata nella visualizzazione dello stato delle arterie coronariche, tanto che l'80% delle immagini sono ottenute in seguito a somministrazione di traccianti a base di Tc-99m. La tecnica PET, pur fornendo immagini intrinsecamente migliori (Tabella 5), è poco utilizzata in cardiologia nucleare perché presentando costi molto elevati non si presta a *screening* di massa per monitorare le forme silenti di cardiomiopatia ischemica e prevenire così infarti acuti del miocardio.

Modalità	Risoluzione spaziale (mm)	Concentrazione agente di *imaging* (M)	Radiazione al paziente	Saturazione e/o tossicità
CT	1	10^{-4}	Sì	Sì
MRI	≤1	10^{-5}	No	Sì
SPECT	8-20	10^{-6}	Sì	
PET	3-10	10^{-4} - 10^{-10}	Sì	

*La risoluzione spaziale indicata in tabella è approssimata è può variare significativamente con la strumentazione impiegata.

Tabella 5. Performance di varie modalità di *imaging*[37].

Un radiofarmaco ideale per l'esecuzione di scintigrafia perfusionale del miocardio (Tabella 6) deve raggiungere un'alta e persistente concentrazione cardiaca, pari circa al 4-5% dell'attività iniettata, con un'estrazione proporzionale al flusso ematico per un ampio

range di valori del flusso. La captazione polmonare ed epatica devono essere basse e la *clearance* ematica rapida, in modo da permettere l'acquisizione di immagini di buona qualità e in tempi brevi.

RADIONUCLIDE	E_γ~140 keV → limitato assorbimento dei tessuti profondi → ottimo per i rivelatori → dose assorbita accettabile FACILMENTE PRODUCIBILE PRONTAMENTE DISPONIBILE POCO COSTOSO BREVE $T_{½}$
RADIOFARMACO	COEFFICIENTE DI ESTRAZIONE ELEVATO DISTRIBUZIONE LINEARE E PROPORZIONALE AL FLUSSO BUONA STABILITA' NEL TESSUTO MIOCARDICO RAPIDA ESCREZIONE → riduzione dose → ripetibilità esami MINIMO *UPTAKE* POLMONARE ED EPATICO BASSO *UPTAKE* SPLENICO E RENALE

Tabella 6. Caratteristiche ideali dei radiotraccianti di perfusione miocardica nella SPECT imaging.

Altri parametri importanti da considerare sono la frazione di estrazione coronarica al primo passaggio e la ridistribuzione. Se il tracciante possiede un buon indice di estrazione coronarico al *first pass*, fissandosi istantaneamente al cuore, si può ottenere una immagine "istantanea" della perfusione cardiaca e coronarica, permettendo di valutare l'efficacia del cuore come pompa (angiografia di primo passaggio) e di ridurre i tempi di attesa per l'acquisizione delle immagini [38]. Un'angiografia di primo passaggio, però, non può avvalersi di semplici gamma-camere, ma sono necessarie apparecchiature a velocità di scansione elevata (almeno 200000 misurazioni/s) per rilevare il passaggio del bolo radioattivo attraverso il cuore [39].

La limitazione del flusso ematico causata da placche aterosclerotiche è spesso valutabile solo quando si è già sviluppato un danno organico ed è per questo che si sono messi a punto protocolli di immagini sotto sforzo (*stress*), fisico o farmacologico (indotto con un coronarodilatatore, come il dipiridamolo, o con un inotropo positivo, come la dobutamina) che permettono di valutare il comportamento del cuore nelle condizioni di massimo affaticamento [40]. Nelle condizioni di riposo (*rest*), tutto il miocardio risulta perfuso, ad esclusione delle zone non vitali, come gli esiti cicatriziali di infarti trascorsi. Nelle

condizioni di sforzo, il flusso, e quindi l'attività, vengono captati maggiormente nelle zone normoperfuse, ma non in quelle ipoperfuse e ischemiche, permettendone così la visualizzazione come aree di ipocaptazione. La valutazione di due stati così diversi di irrorazione cardiaca (*stress/rest*) rende spesso necessaria la somministrazione di due dosi di radiofarmaco e l'acquisizione di due distinte scintigrafie, sufficientemente lontane nel tempo.

Le informazioni raccolte con tecnica SPET forniscono dunque una serie di informazioni addizionali alle immagini di perfusione miocardica sia dello spessore che del movimento delle pareti delle camere cardiache.

Nella tecnica *gated*-SPET (gSPET) la sincronizzazione delle immagini scintigrafiche con un elettrocardiogramma permette la misura dell'attività nelle varie fasi del ciclo cardiaco e l'acquisizione di fondamentali parametri funzionali, quali il volume di eiezione ventricolare sinistro (LVEF, *Left Ventricular Ejection Fraction,* il più importante indice predittore di mortalità cardiaca), il volume telediastolico (EDV, *End Diastolic Volume*) e il volume telesistolico (ESV, *End Sistolic Volume*) (Figura 26).

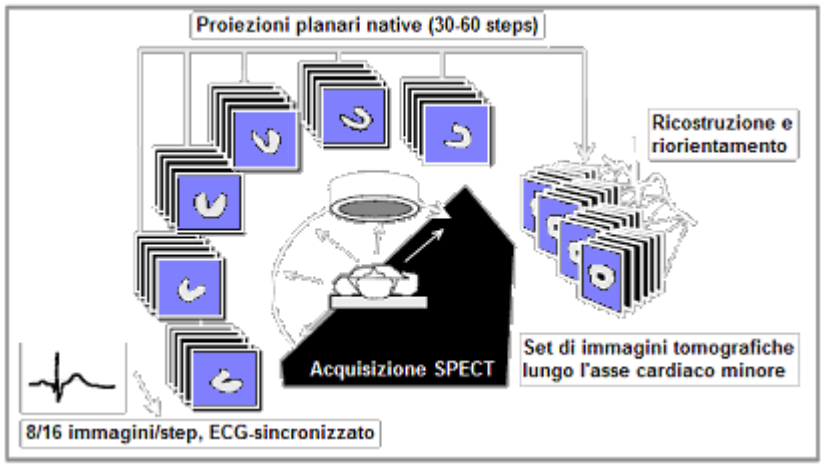


Figura 26. Rappresentazione schematica della modalità di acquisizione nella tecnica gSPET per immagini tridimensionali cardiache.

Inoltre, la tecnica gSPET, valutando contemporaneamente sia la perfusione che la funzione, aumenta l'accuratezza diagnostica, riducendo di un terzo le interpretazioni *borderline*, e permettendo un più facile confronto tra rilevazioni nel post-*stress* o nel post-*rest* e agevolando l'interpretazione nei casi di importanti aritmie, come nel blocco completo di branca sinistra [41].

Le immagini cardiache SPET e gSPET vengono acquisite ruotando la gamma-camera attorno al paziente, secondo un'orbita ellittica, dall'angolo anteriore obliquo destro al posteriore obliquo sinistro del torace, con il cuore posto sempre al centro della finestra di acquisizione. La visualizzazione in sequenza di tutte le immagini non rielaborate permette di osservare l'eventuale presenza di artefatti e di captazioni extracardiache anomale (masse neoplastiche, visibili con i composti tecneziati). Le immagini vengono poi riorientate secondo l'asse del miocardio e suddivise in quattro sezioni (basale, media, distale e apicale), ulteriormente divise in regioni, ciascuna delle quali è poi correlata ai rami coronarici che la irrorano.

La perfusione è espressa in funzione del grado di riduzione: normale (0); di poco ridotta (1); moderatamente ridotta (2); molto ridotta (3) oppure assente (4). Un difetto perfusivo di grado 3-4 corrisponde a una stenosi critica (≥ 90 %).

Con questa tecnica si possono osservare e descrivere molte anomalie non perfusive, come la dimensione e la dilatazione transitoria ischemica del ventricolo sinistro (che apparentemente risulta dilatato nel dopo sforzo rispetto al riposo), i profili di captazione e le dimensioni del ventricolo destro, le anomalie della captazione polmonare e della captazione extracardiaca.

Attualmente, la più importante applicazione della tecnica SPET e gSPET riguarda la stratificazione dei pazienti in base ai rischi di eventi cardiaci, mentre appare superato l'approccio focalizzato sulla semplice diagnosi non invasiva, in cui il paziente sospettato di malattia veniva sottoposto ad angiografia e frequentemente a rivascolarizzazione.

Gli agenti radiodiagnostici oggi utilizzati per l'esecuzione di queste indagini (indicati in Tabella 7), tuttavia, sono molto lontani dal possedere caratteristiche ideali. Uno dei problemi che maggiormente affligge i cardiologi nucleari è il basso rapporto di attività cuore/fegato, dovuto a un'elevata eliminazione e persistenza epatiche, evento che impedisce la visione nitida della parete inferoapicale del cuore.

Allo scopo di migliorare l'acquisizione, nella pratica clinica vengono spesso somministrati ai pazienti cibi, nel tentativo di stimolare l'escrezione epato-biliare e sono stati elaborati logaritmi in grado di elaborare le immagini. Nonostante questi utili stratagemmi, persiste la necessità di realizzare nuovi agenti di *imaging* cardiaco con caratteristiche che si avvicinino maggiormente a quelle ideali [42].

	SPET	PET
PERFUSIONE	^{201}Tl-cloruro ^{99m}Tc-sestamibi ^{99m}Tc-tetrofosmin ^{99m}Tc-teboroxime ^{99m}Tc-N-NOET ^{99m}Tc-micr.alb.	(^{15}O)-H_2O ^{13}N-ammonia ^{82}Rb
VITALITA'	^{201}Tl-Cloruro ^{99m}Tc-sestamibi ^{99m}Tc-tetrofosmin	^{18}F-FDG ^{13}N-L-glutamate
METABOLISMO	^{99m}Tc-acidi grassi ^{123}I-BMIPP A.G.	^{18}F-FDG ^{15}O ^{11}C-acetate

Tabella 7. Radiofarmaci per *imaging* cardiaco.

A2.3.2 RADIOFARMACI SPET
PER SCINTIGRAFIA PERFUSIONALE DEL MIOCARDIO.

1. Tallio.

$^{201}Tl^{+}$ stato il primo radiofarmaco a entrare nell'uso clinico in cardiologia nucleare.

Il radionuclide Tl-201 è prodotto dal decadimento, per cattura elettronica, di Pb-201, ottenuto in ciclotrone per bombardamento protonico di Tl-203.

Tl-201 ha emivita di 73 ore e il decadimento per cattura elettronica produce Hg-201 e l'emissione di radiazioni γ (E_{γ}: 69-83 keV, 95%; 167 keV, 10%). A causa di un'emivita biologica prolungata (10 giorni) e un lungo tempo di dimezzamento, il limite di dose di attività iniettata è di soli 3-4 mCi.

$^{201}Tl^{+}$ presenta molte limitazioni nell'uso; in particolare, la produzione richiede l'impiego di un ciclotrone e le immagini che si ottengono spesso non sono di buona qualità a causa di bassi valori di attività iniettabile e della bassa energia delle emissioni γ, che vengono attenuate dai tessuti profondi e non sono ottimali per la rivelazione con gamma-camere. Tuttavia, $^{201}Tl^{+}$ è utilizzabile come secondo isotopo, assieme a un composto tecneziato, per realizzare immagini sotto sforzo e a riposo nella stessa giornata, grazie ad energie di emissione γ molto diverse per i due radionuclidi.

Il tallio, avendo un raggio ionico uguale a quello dello ione potassio, attraversa la membrana cellulare utilizzando la Na^{+}/K^{+} ATPasi (per questo viene considerato un potassio-mimetico), e, mancando di fenomeni di *trapping* intracellulare, si mantiene in equilibrio dinamico con il *pool* extracellulare, secondo gradiente elettrochimico; questo libero scambio è alla base della redistribuzione di $^{201}Tl^{+}$. L'*uptake* al miocita è quindi strettamente correlato all'integrità della membrana e alla funzione metabolica.

$^{201}Tl^{+}$ ha eccellenti proprietà di captazione miocardica, con un indice di estrazione coronarico al *first pass* dell'88% che si mantiene proporzionale al flusso ematico fino a elevati valori di flusso (>3 ml/min/g), l'*uptake* è massimo già nei primi 30 minuti dall'iniezione (il sangue ha una *clearance* del 91% a 5 minuti p.i.), il 3-4% della dose somministrata si concentra nel miocardio e l'emivita cardiaca è di circa 4 ore.

La via preferenziale di escrezione è renale e la captazione degli organi addominali durante l'esercizio è minima [43].

Sotto sforzo il fenomeno della ridistribuzione permette di distinguere quattro diverse

situazioni, a seconda del quadro patologico, differenziando l'ischemia dalle zone necrotiche. Se il tessuto è sano e normoperfuso, dopo il picco di attività iniziale la concentrazione del tallio nei miociti scenderà in modo uniforme. Se il tessuto è reversibilmente ischemico, il picco di captazione miocardica sarà tardivo, perchè $^{201}Tl^{+}$ si concentra più lentamente nelle cellule ipoperfuse rispetto a quelle normoperfuse, mentre nella fase tardiva (a 4 ore) la concentrazione del radionuclide nelle aree ischemiche uguaglierà quella delle aree normoperfuse. Nel tessuto necrotico la concentrazione di $^{201}Tl^{+}$ sarà ridotta sia in fase di prima distribuzione, sia in fase tardiva, a quattro ore. Infine, nel caso di "miocardio ibernato" una regione miocardica ipofunzionante e ipoperfusa, ma metabolicamente attiva, presenta una concentrazione ridotta sia in fase precoce che tardiva (a 4 ore), e una lenta ridistribuzione a 24-38 ore.

La velocità con cui si instaura la redistribuzione è un indice del flusso coronarico, ridotto in presenza di stenosi.

Mentre l'iniziale distribuzione di $^{201}Tl^{+}$ è proporzionale al flusso regionale, l'equilibrio di distribuzione, che necessita di ore o anche di giorni per instaurarsi, è proporzionale al *pool* regionale dello ione potassio, indicando così la quantità di miocardio vitale e rendendo la diagnosi effettuata con $^{201}Tl^{+}$ una tecnica unica, eccellente nella valutazione perfusiva sotto sforzo, per la diagnosi di miocardio vitale, infarto miocardico e sua localizzazione, diagnosi di coronaropatia (CAD, *Coronary Artery Disease*). In passato era impiegato nella diagnosi e localizzazione di carcinomi paratiroidei, tiroidei, encefalici e mammari.

2. ^{99m}Tc-Sestamibi (Cardiolite®).

^{99m}Tc-Sestamibi è stato il primo complesso tecneziato introdotto in cardiologia nucleare, approvato dalla FDA nel 1990 con il nome commerciale di Cardiolite®. Da un punto di vista chimico è un complesso alchilisonitilico di ^{99m}Tc(I) a geometria ottaedrica, "simmetrico", esasostituito, monocationico e lipofilo. Complessi di questo tipo costituiscono il primo esempio di complessi organometallici prodotti in soluzione acquosa ed in alta resa (Figura 8 pag. 22).

Le immagini ottenute con ^{99m}Tc-Sestamibi sono di qualità superiore di quelle con $^{201}Tl^{+}$, grazie alle migliori proprietà nucleari del radionuclide Tc-99m [44] (Figura 27).

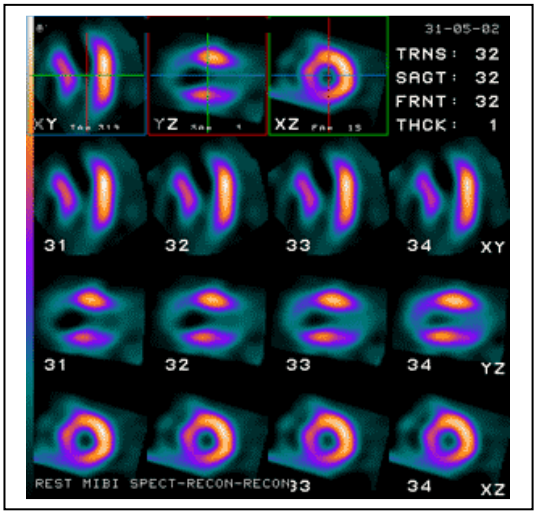


Figura 27. Immagini SPET ottenute con [^{99m}Tc]-Sestamibi. Il difetto di perfusione apicale, con ipoperfusione del setto e della parete inferiore è compatibile con un infarto del miocardio.

		Cuore/fegato		Cuore/polmone		Cuore/Milza	
		Riposo	Esercizio	Riposo	Esercizio	Riposo	Esercizio
[^{99m}Tc]-Sestamibi	5 min	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2.0 ± 0.4
	30 min	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.2 ± 0.4	2.3 ± 0.3
	60 min	0.6 ± 0.1	1.8 ± 0.3	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.2	1.3 ± 0.3	2.5 ± 0.3
	120 min	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.3	1.9 ± 0.5	3.0 ± 0.7
	180 min	1.4 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.7 ± 0.2	2.5 ± 0.3	1.9 ± 0.6	3.0 ± 0.9
^{201}Tl^{+}		1.4 ± 0.3	2.1 ± 0.3	1.9 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.4	2.9 ± 0.6

Tabella 8. Rapporti cuore/organo per [^{99m}Tc]-Sestamibi (minuti dopo l'iniezione) e per ^{201}Tl^{+} nell'uomo.

L'estrazione al *first pass* di [^{99m}Tc]-Sestamibi, valutata nel cuore isolato di coniglio, è buona, ma molto più bassa di quella di ^{201}Tl^{+} e dipende dal flusso (0.52 ml/min/g: [^{99m}Tc]-Sestamibi 21%, ^{201}Tl^{+} 58%; 3.19 ml/min/g: [^{99m}Tc]-Sestamibi 62%, ^{201}Tl^{+} 88%), mostrando una correlazione lineare tra dose iniettata e flusso coronarico fino a valori di flusso elevati (2~2.5 ml/min/g, corrispondente a esercizi di notevole sforzo, Tabella 8) [45]. L'indice di estrazione coronarico al *first pass* è il 50-65% e la *clearance* ematica è del 92% a 5 minuti. La captazione cardiaca è circa 1.4% della dose iniettata in condizioni di sforzo e 1.0% a riposo e tali valori si stabilizzano immediatamente dopo l'iniezione.

A riposo l'*uptake* polmonare iniziale è elevato, ma a 60 minuti il rapporto cuore/polmone è 1.5/1; la *clearance* polmonare mostra un andamento da cinetica bicompartimentale, inizialmente rapida con un tempo di dimezzamento di 10 minuti, poi lenta con un tempo di dimezzamento di 4 ore. Il 27 % dell'attività iniettata si ritrova, immodificato ,nelle urine, mentre il 37% nelle feci. L'accumulo nella cistifellea e nel fegato è particolarmente elevato,

soprattutto nel test di *stress,* e può essere diminuito per somministrazione al paziente di cibi grassi, migliorando la qualità dell'immagine. Ciononostante, [^{99m}Tc]-Sestamibi è l'agente per *imaging* cardiaca più utilizzato negli studi clinici, in particolare per la diagnosi e localizzazione di infarto miocardico, diagnosi di CAD associato ad uno studio di stress e diagnosi di miocardio vitale [46].

L'assenza di redistribuzione consente da un lato il monitoraggio *in situ* di operazioni cardiache, dall'altro costringe a una doppia somministrazione di radiofarmaco per ottenere immagini cardiache a riposo e sottosforzo. Generalmente, si pratica una prima iniezione di attività circa 8 mCi, seguita da una seconda, 4 ore più tardi, di 24 mCi.

Studi di captazione subcellulare hanno evidenziato come [^{99m}Tc]-Sestamibi, molecola lipofila e monocationica, attraversi la membrana cellulare principalmente per diffusione passiva e, una volta nel citoplasma, si concentri nei mitocondri secondo gradiente elettrochimico descritto dalla legge di Nernst, la cui sola componente elettrica è 150-170 mV (Figura 28).

Studi *in vitro* condotti inibendo lo scambiatore Na^+/H^+ (con amiloride), lo scambiatore K^+/H^+ (con nigericina) o la pompa Na^+/K^+ ATPasi (con ouabaina) hanno escluso che [^{99m}Tc]-Sestamibi sfruttasse questi sistemi di trasporto per attraversare la membrana plasmatica. Il fatto che, dopo circa 15 minuti, la concentrazione mitocondriale di [^{99m}Tc]-Sestamibi raggiunga lo stato stazionario fa presupporre che il movimento secondo gradiente sia solo una delle componenti in gioco, con altri attori, potenziale-indipendenti, che potrebbero contribuire alla localizzazione miocardica. L'*uptake* al miocita è dunque strettamente connesso all'integrità della membrana plasmatica e alla funzione metabolica cellulare[47].

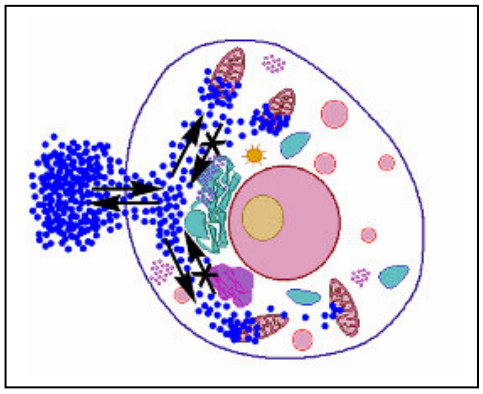


Figura 28. Meccanismo di accumulo intracellulare di [^{99m}Tc]-Sestamibi [●].

La captazione di [^{99m}Tc]-Sestamibi risulta particolarmente ridotta nelle forme ischemiche gravi a causa dell'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale dovuto ad ipossia. Anche in alcune forme tumorali si ha alterazione del potenziale di membrana mitocondriale (in particolare iperpolarizzazione) e pertanto esse possono essere identificate con [^{99m}Tc]-Sestamibi. Tuttavia, alcune forme neoplastiche si mostrano refrattarie alla diagnosi con traccianti tecneziati monocationici, a causa dell'espressione in queste cellule di P-glicoproteina (P-gp), da parte del gene MDR (*Multi Drug Resistance*), o di proteine MPR (*Multi drug Resistance associated Protein*) che, agendo da vere e proprie pompe, ne prevengono l'accumulo tumorale. L'identificazione di una neoplasia [^{99m}Tc]-Sestamibi-resistente, indicando l'espressione di P-gp o di MPR, permette quindi di prevedere la responsività al trattamento farmacologico.

Le indicazioni di utilizzo di [^{99m}Tc]-Sestamibi includono studio delle paratiroidi (in pazienti con paratiroidismo), mammoscintigrafia (diagnosi di malignità di cancro alla mammella), oncologia e miocardioscintigrafia di perfusione [48] (Figura 29).

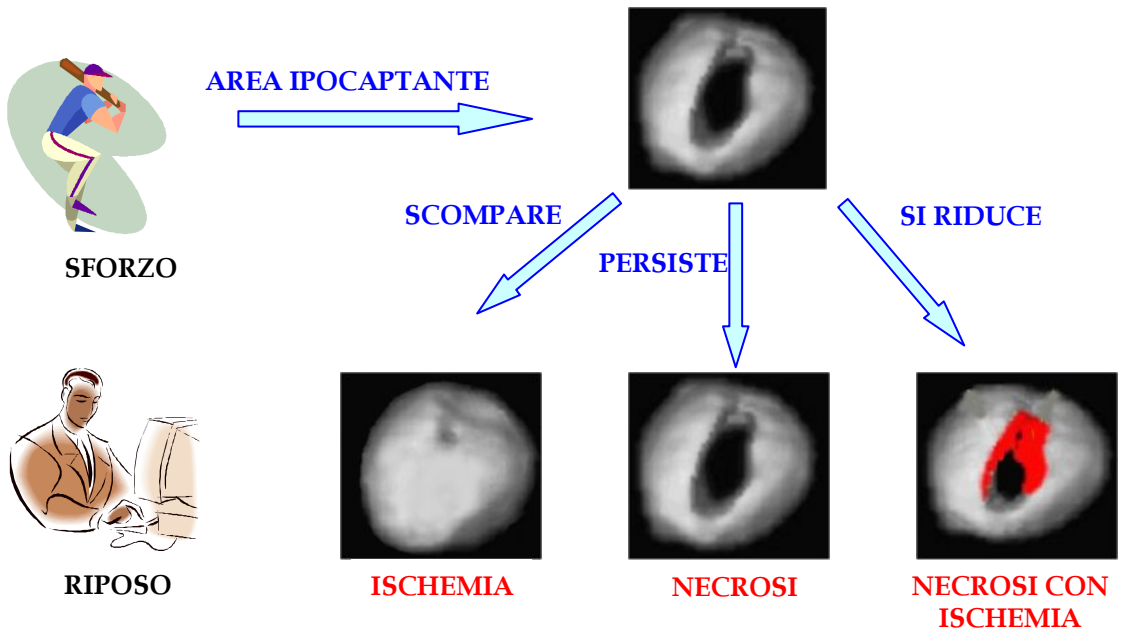


Figura 29. *Imaging* cardiaco con [^{99m}Tc]-Sestamibi

3. [^{99m}Tc]-Teborossima (Cardiotec®).

[^{99m}Tc]-teborossima (Cardiotec®, Figura 30), e gli altri membri della famiglia BATO (*Boronic acid Adducts of Technetium diOximes*) sono complessi neutri in cui il tecnezio (III) è eptacoordianto da sei azoti iminici di diossime vicinali e da un anione, Cl^- od OH^-. Le molecole diossimiche, che coordinano il metallo, formano un complesso esacoordinato che facilmente reagisce con un acido boronico, derivato organico dell'acido borico, incorporandolo nella molecola finale. Le tre molecole diossimiche sono unite a una estremità dall'esterificazione con l'acido boronico, all'altra da due ponti a idrogeno con i tre gruppi ossidrilici. La settima posizione di coordinazione è labilmente occupata da Cl^- od OH^- e costituisce un sito facilmente esposto all'interazione con strutture biologiche [49].

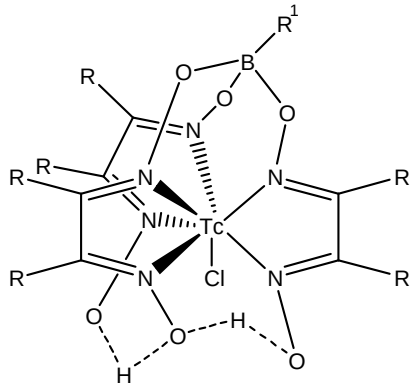


Figura 30. Complesso BATO.

In questa famiglia il derivato formato dalla 1,2-cicloesandiondiossima con l'acido metilboronico, [^{99m}Tc]-Teborossima, è risultato interessante per gli studi di perfusione cardiaca. L'*uptake* cardiaco è il 3.44 % della dose iniettata, con un'elevata estrazione di primo passaggio che diminuisce all'aumentare del flusso coronarico (Tabella 9). Nel cuore perfuso di coniglio l'attività viene estratta per il 72±9% ($^{201}Tl^+$: 57±10%) a un flusso di 1.15 ml/min/g, per il 55±18% ($^{201}Tl^+$: 46±17%) a un flusso di 2.44 ml/min/g; pur diminuendo percentualmente, la captazione dell'attività aumenta in valore assoluto all'aumentare del flusso [50].

	$^{201}Tl^+$	[^{99m}Tc]-Teborossima
1 min pi	3.03 ± 0.13	3.44 ± 0.32
5 min pi	3.30 ± 0.32	2.08 ± 0.29

Tabella 9. *Uptake* cardiaco in ratti Sprague-Dawley maschi.

[^{99m}Tc]-Teborossima ha un'estrazione migliore di quella di $^{201}Tl^{+}$ e, come $^{201}Tl^{+}$, risulta molto più influenzata dal flusso ematico rispetto a [^{99m}Tc]-Sestamibi [51]. La captazione polmonare è bassa e l'*uptake* epatico è inizialmente ridotto, per aumentare poi rapidamente nel tempo, essendo la via epatobiliare quella preferenziale.

Le cinetiche di [^{99m}Tc]-Teborossima sono però alterate *in vivo* dal metabolismo. Studi *in vitro* hanno dimostrato che, a valori di pH superiori a 5, anche in soluzione salina, si ha la sostituzione dello ione cloruro coordinante il metallo con un ossidrile, modificando la lipofilia, ma mantenendo inalterata la forma del complesso. Questa sostituzione potrebbe essere alla base del rallentato *washout* dai cardiomiociti [52]. *In vivo* nel plasma [^{99m}Tc]-Teborossima(Cl) diminuisce tra 5 e 60 minuti da 94 a 43%, mentre [^{99m}Tc]-Teborossima(OH) sale da 6 a 57% negli stessi tempi; nel sangue la forma nativa passa da 77 a 17%, quella ossidrilata da 16 a 46 % [53]. L'estremità non esterificata con il boronato delle tre molecole diossimiche può costituire un sito di interazione con proteine ed elementi figurati del sangue, ma può anche essere il sito che permette l'adesione superficiale ai miociti e il passaggio transmembrana; tali interazioni, deboli e poco numerose, permettono le elevate captazione ed estrazione di primo passaggio al miocardio. L'introduzione dell'ossidrile, invece, determina una riduzione del 50% dell'estrazione di primo passaggio, a causa di un'aumentata capacità di interazione con le proteine seriche. I valori di estrazione di [^{99m}Tc]-Teborossima(Cl) sono circa 96±1% mentre di [^{99m}Tc]-Teborossima(OH) sono 43±4 %, ma in ogni caso sono più elevati di quelli di [^{99m}Tc]-Sestamibi.

Il *washout* cardiaco è notevole, tanto che la pur elevata attività decade a bassi livelli già dopo 5 minuti. La cinetica ha un andamento biesponenziale, dapprima molto rapido ($t_{½}$ 5.2 min, 66% dell'attività), poi lento ($t_{½}$ 3.8 ore, 33% dell'attività) e dopo un'ora dall'iniezione, circa il 30% dell'attività inizialmente captata persiste nel miocardio.

Se l'iniezione è effettuata sotto sforzo, in presenza di zone ipoperfuse, la distribuzione del tracciante non risulta omogenea, per [^{99m}Tc]-Teborossima, come per $^{201}Tl^{+}$, al termine dell'esercizio, le zone normo-/iperperfuse subiscono un *washout*, mentre quelle ipoperfuse aumentano gradualmente la propria perfusione ematica, iniziando a captare. Questo fenomeno, che va sotto il nome di redistribuzione, si osserva nelle zone ischemiche del 50% dei pazienti indagati con [^{99m}Tc]-Teborossima e risulta maggiormente evidenziato dall'andamento biesponenziale della cinetica di *washout* [54].

Il limite principale all'utilizzo clinico di [^{99m}Tc]-Teborossima è il rapido *washout* cardiaco che richiede l'acquisizione dell'immagine entro un'ora dall'iniezione, con una velocità di acquisizione molto rapida, difficilmente realizzabile con la più vecchia strumentazione SPET a una o due teste, dotata di un'insufficiente risoluzione temporale. Principalmente per questo motivo tecnico l'impiego clinico di questo complesso è stato abolito.

4. [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

[^{99m}Tc]-Tetrofosmin è stato approvato per l'uso clinico come rafiofarmaco tecneziato di perfusione miocardica nel 1995 con il nome commericale di Myoview® (Figura 31). E' un complesso lipofilico, monocationico a geometria ottaedrica, costituito da un *core diosso* di Tc(V) coordinato da due leganti difosfinici, 1,2-bis(dietossietilfosfino)etano, con gli atomi di P(III) in posizione equatoriale e i due ossigeni nelle posizioni apicali.

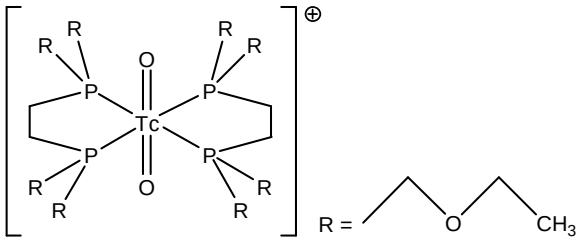


Figura 31. [^{99m}Tc]-Tetrofosmin (Myoview®).

Analogamente agli isonitrili di [^{99m}Tc]-Sestamibi, la scelta dei sostituenti alchilici sugli atomi di fosforo del legante difosfinico è stata cruciale per modulare le caratteristiche biodistributive del complesso [55].

Studi preclinici hanno dimostrato per [^{99m}Tc]-Tetrofosmin una buona e persistente captazione cardiaca che, assieme a una rapida *clearance* ematica (95% a 10 minuti), epatica e polmonare, si traduce in un rapporto cuore/fegato idoneo alla raccolta di immagini.

La lipofilia, la carica monocationica e il comportamento biodistributivo nell'uomo accomunano [^{99m}Tc]-Tetrofosmin a [^{99m}Tc]-Sestamibi.

La captazione cardiaca è rapida, elevata (invariata a riposo e sottosforzo, 0.6-1.8% e 0.6-1.7% rispettivamente) e persistente (a riposo: 0.5-1.5% e sotto sforzo: 0.7-1.3%) (Tabella 10). L'indice di estrazione coronarico al *first pass* è il 50-65%.

	Tempo dopo l'iniezione [min]			
	5	30	60	120
cuore/polmone				
a riposo	3.1 ± 1.8	4.5 ± 1-5	7.3 ± 4.4	-
sotto sforzo	4.0 ± 1.1	5.9 ± 2.2	5.9 ± 1.3	-
cuore/fegato				
a riposo	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.3	1.2 ± 0.8	3.4 ± 2.4
sotto sforzo	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.7	3.1 ± 3.0	5.0 ± 3.0

Tabella 10. Rapporti cuore/organo per [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

A livello epatico, a riposo, si accumula il 4.9-10.6% della dose somministrata che decade rapidamente a 1.6% dopo 2 ore e scompare dopo 8 ore; l'attività della cistifellea, in conseguenza del transito epatico, aumenta fino al 10.7 % dopo 2 ore, a riposo, e decade all'1% dopo 24 ore; sotto sforzo le captazioni e le *clearance* epatica e colecistica hanno lo stesso andamento delle condizioni di riposo, ma dimezzato in quantità.

A livello polmonare, a riposo, la captazione è moderata (0.7-3.0% della dose iniettata); essa decade fino a livelli non misurabili dopo 4 ore; mentre sotto sforzo si riduce di un terzo.

Per confronto con [^{99m}Tc]-Sestamibi, [^{99m}Tc]-Tetrofosmin, seppur con una frazione di estrazione minore, possiede simili captazione cardiaca e cinetiche ematiche di ritenzione e di eliminazione, ma mostra una più rapida *clearance* epatica e polmonare e, di conseguenza, nel tempo un più favorevole rapporto cuore/fegato offrendo la possibilità di acquisire immagini di qualità migliore ed in tempi comparabili [56]. Come per [^{99m}Tc]-Sestamibi, anche per [^{99m}Tc]-Tetrofosmin la lenta *clearance* nel miocardio e la redistribuzione, trascurabile dopo l'uptake iniziale, rendono necessarie due iniezioni separate, una a riposo e una sotto sforzo, e permettono l'acquisizione delle immagini fino a quattro ore dopo l'iniezione (Tabella 11).

Per questi motivi, [^{99m}Tc]-Tetrofosmin è il migliore radiofarmaco per *imaging* cardiaco attualmente in commercio, nonostante non sia il più utilizzato. Le indicazioni cardioscintigrafiche includono diagnosi e localizzazione di infarto miocardico, diagnosi di CAD associato ad uno studio sotto *stress* e diagnosi di miocardio vitale.

	[^{99m}Tc]-Tetrofosmin	[^{99m}Tc]-Sestamibi
***Uptake* miocardio**	≈	
Uptake epatico	<	>
$T_{½}$ biologico cuore	278±32 min	680±45 min
$T_{½}$ biologico fegato	67±16 min	136±18 min
cuore/polmone [5 min]	2.49±0.43	2.52±0.37
[60 min]	2.66±0.55	2.85±0.50
cuore/fegato [5 min]	1.04±0.24	0.83±0.16
[60 min]	1.51±0.44	1.08±0.27
Necessita di bollitura	No	Sì
Sensibilità e specificità nella diagnosi di coronaro-arteropatie	90%	80%
	Biodistribuzione migliore nel protocollo *rest/stress one day.*	

Tabella 11. Confronto [^{99m}Tc]-Tetrofosmin e [^{99m}Tc]-Sestamibi.

5. [^{99m}Tc(N)]-NOET.

[^{99m}Tc(N)]-NOET è un complesso neutro e lipofilico a geometria piramidale a base quadrata contenente il *core* azoturo coordinato da due leganti del tipo ditiocarbammati (NOET=N-etossi,N-etil-ditiocarbammato). L'azoto del core azoturo si trova in posizione apicale, mentre gli atomi di zolfo sono disposti ai vertici della base della piramide.

Questi complessi, neutri e lipofili, si localizzano *in vivo* nel miocardico, con una persistenza che varia a seconda della funzionalizzazione del legante ditiocarbammato. Sostituenti alifatici ingombranti aumentano la lipofilia del complesso e la captazione epatica, diminuendo quella caridaca (etile > n-propile > isopropile > n-butile > isobutile > t-butile). Si ha una maggiore captazione cardiaca per i complessi con i leganti dietil-ditiocarbammato ed etossietilditiocarbammato che presenta il gruppo etereo direttamente unito all'azoto (Figura 32). Se i gruppi eterei sono in β o in γ all'azoto si ha perdita del tropismo cardiaco, così come l'introduzione di derivati aliciclici come pirrolidina determina una riduzione della captazione miocardica [57].

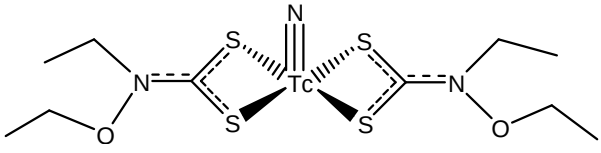


Figura 32. [^{99m}Tc(N)]-NOET.

Il *core* azoturo conferisce stabilità ai complessi e, paragonando il profilo farmacocinetico di analoghi complessi contenenti il *core osso,* ne modifica il profilo biodistributivo, favorendo la captazione cardiaca.

[^{99m}Tc(N)]-NOET (Tabella 12) mostra alta captazione cardiaca (circa il 4% dell'attività iniettata), elevato indice di estrazione coronarico di primo passaggio (80-90%), lento *washout* e un'emivita di circa 3 ore. La captazione è proporzionale al flusso cardiaco per un ampio *range* di velocità di flusso (fino a 3-3.5 volte il flusso basale), senza mostrare il *plateau* di captazione ai flussi più elevati, tipico degli agenti monocationici (per i quali la captazione si mantiene proporzionale fino a 2-2.5 volte il flusso basale). La *clearance* polmonare è rapida, mentre quella epatica è lenta e costituisce la principale via di escrezione del tracciante [58].

	5min pi	30 min pi	60 min pi	120 min pi
Cuore	4.28 ± 0.18	3.64 ± 0.17	2.62 ± 0.53	1.53 ± 0.06
Sangue	2.50 ± 0.06	3.12 ± 0.55	2.82 ± 0.44	2.93 ± 0.08
Muscolo	23.7 ± 1.80	23.7 ± 0.46	19.1 ± 3.20	16.8 ± 1.40
Polmone	4.66 ± 0.61	3.09 ± 0.10	1.89 ± 0.72	1.40 ± 0.06
Fegato	24.9 ± 1.70	25.8 ± 0.15	26.5 ± 2.60	23.6 ± 2.40
Rene	6.28 ± 0.52	6.00 ± 0.50	5.71 ± 0.51	6.42 ± 0.32

Tabella 12. Biodistribuzione in ratto femmina Sprague Dawley di [^{99m}Tc(N)]-NOET.

Studi cellulari *in vitro* su miociti isolati hanno mostrato che l'affinità del complesso per i canali Lenti del calcio è alla base del meccanismo di captazione [59].

[^{99m}Tc(N)]-NOET, se iniettato sotto sforzo, tende a localizzarsi nelle zone normoperfuse, risparmiando quelle ischemiche, ipoperfuse; al termine dell'esercizio il flusso coronarico tende a riequilibrarsi, perfondendo anche le zone ischemiche che captano l'attività liberata dal *washout* delle zone normoperfuse e soltanto le zone necrotiche, infartuate, non accumulano mai attività. Il comportamento biologico è analogo a quello di $^{201}Tl^{+}$, mostrando il fenomeno della redistribuzione e consentendo l'adozione di protocolli a singola iniezione (Figura 33). $^{201}Tl^{+}$ e [^{99m}Tc(N)]-NOET hanno però un diverso meccanismo di *trapping* intracellulare: il primo, per analogia con lo ione potassio, attraversa la membrana cellulare utilizzando la Na^{+}/K^{+} ATPasi e la frazione citosolica è quindi in costante equilibrio con la porzione di $^{201}Tl^{+}$ extracellulare; [^{99m}Tc(N)]-NOET, invece, si fissa a livello endoteliale con un equilibrio dipendente dalla composizione ematica quali- e

quantitativa, permettendo così la visualizzazione di alterazioni endoteliali.

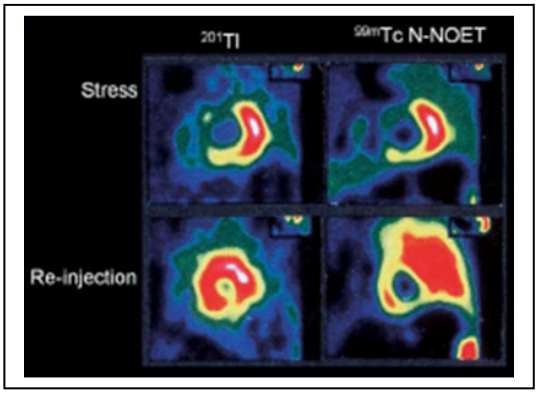


Figura 33. Immagini SPET ottenute con $^{201}Tl^{+}$ e [^{99m}Tc(N)]-NOET. Sotto sforzo: ipoperfusione estesa a livello anteriore e settale (prima riga). Dopo seconda iniezione, a riposo: normoperfusione (seconda riga).

[^{99m}Tc(N)]-NOET, rispetto a [^{99m}Tc]-Sestamibi, presenta una più elevata permanenza in circolo e più bassi rapporti cuore/polmone (vicini a quelli di $^{201}Tl^{+}$), che si traduce in una peggiore qualità delle immagini nel 18% dei casi, contro il 2% di $^{201}Tl^{+}$, diversamente dagli altri complessi tecneziati monocationici che si dimostrano sempre migliori di $^{201}Tl^{+}$.

6. [^{99m}Tc(N)]-DBODC5.

[^{99m}Tc(N)]-DBODC5 è un complesso dissimmetrico e monocationico a geometria pseudoottaedrica altamente distorta del tipo [Tc^{V}N(DTC)(PNP)]$^{+}$ con elevato tropismo cardiaco. Questi complessi, ottenuti in alta resa radiochimica, presentano un *core* azoturo coordinato da due diversi leganti: uno del tipo ditiocarbammato (DTC) e l'altro amminodifosfinico (PNP).

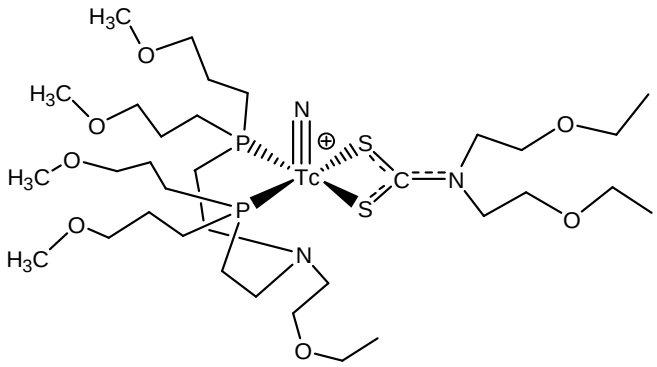


Figura 34. [^{99m}Tc(N)]-DBODC5.

Come [^{99m}Tc]-Sestamibi e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin, i complessi sono monocationici ed il legante

PNP presenta, sia sugli atomi di P(III) che sull'azoto, gruppi eterei. In particolare, le amminodifosfine più studiate sono siglate come PNP5 (N,N-bis-[di(metossipropil)fosfinoetil]etossietilammina) e PNP3 (N,N-bis-[di(metossipropil)fosfino etil]metossietilammina). La peculiare dissimmetria dei complessi $[Tc^{V}N(DTC)(PNP)]^{+}$ (Figura 34), consente di modulare finemente le caratteristiche chimico-fisiche e quindi quelle farmacocinetiche dei composti, mediante l'introduzione di variazioni sui sostituenti del legante PNP o DTC (Tabella 13).

	PNP		DTC		cuore/polmoni	cuore/fegato
	R(P)	R(N)	R^1(N)	R^2(N)	(60 min)	
$[^{99m}Tc(N)(PNP3)(NOME)]^{+}$	CH_3-	CH_3-	CH_3-	CH_3O-	6.24	10.92
$[^{99m}Tc(N)(PNP5)(NOME)]^{+}$		C_2H_5-			7.07	6.21
$[^{99m}Tc(N)(PNP3)(BOET)]^{+}$		CH_3-	C_2H_5-	$C_2H_5OC_2H_4$-	7.10	10.92
$[^{99m}Tc(N)(PNP5)(BOET)]^{+}$		C_2H_5-			6.73	5.72
$[^{99m}Tc(N)(PNP3)(ISOET)]^{+}$		CH_3-	$C_2H_5OC_2H_4$-	iC_3H_7-	7.10	10.28
$[^{99m}Tc(N)(PNP5)(ISOET)]^{+}$		C_2H_5-			7.83	6.37
$[^{99m}Tc(N)(PNP3)(DPODC)]^{+}$		C_2H_5-	$CH_3OC_2H_4$-	$CH_3OC_2H_4$-	8.37	5.38
$[^{99m}Tc(N)(PNP3)(DBODC)]^{+}$		CH_3-	$CH_3OC_2H_4$-	$CH_3OC_2H_4$-	**9.62**	**20.44**
$[^{99m}Tc(N)(PNP5)(DBODC)]^{+}$		C_2H_5-			**8.17**	**18.80**
$[^{99m}Tc(N)(PNP6)(DBODC)]^{+}$	C_2H_5-	C_2H_5-			2.29	0.31

Tabella 13. Rapporti cuore/organo di complessi del tipo $[^{99m}TcN(PNP)(DTC)]^{+}$.
DTC:dialchil-ditiocarbamato; PNP:N,N-bis-[di(alcossialchil)fosfinoetil]alcossialchilammina [60].

Le differenze biodistributive tra i complessi, più che sulla diversità dimensionale, sono giocate sui rapporti idrofilia/lipofilia delle singole parti della molecola. La presenza di soli gruppi alchilici esalta il carattere lipofilo della molecola e, preferendo la via di escrezione epatobiliare, aumenta l'*uptake* epatico che però è sempre (tranne che per i complessi con PNP6) minore che per $[^{99m}Tc]$-Sestamibi e $[^{99m}Tc(N)]$-NOET. Analogamente a $[^{99m}Tc]$-Sestamibi e a $[^{99m}Tc]$-Tetrofosmin, i sostituenti alchil-eterei sono da preferirsi: sull'azoto amminico appare più indicato il sostituente metossietilico rispetto a quello etossietilico, sui fosfori quello metossi-n-propilico rispetto a quello etossi-n-propilico (troppo lipofilo); a livello del ditiocarbammato appare ottimale la bisostituzione con residui etossi-etilici.
Tra i vari complessi $[^{99m}Tc(N)]$-DBODC5, contenente il legante amminodifosfinico PNP5 e il ditiocarbammato DBODC (N,N-bis-(etossi-2-etil)-amino ditiocarbammato), è stato selezionato come potenziale agente per scintigrafia perfusionale del miocardio. Esso, infatti, possiede caratteristiche farmacocinetiche che si avvicinano a quelle ideali, soprattutto se comparate con i traccianti attualmente in uso clinico.

	2 min	10 min	30 min	60 min	120 min
sangue	0.11 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
cuore	3.94 ± 0.32	3.69 ± 0.29	3.73 ± 0.48	3.76 ± 0.39	3.31 ± 0.06
polmone	0.99 ± 0.36	0.88 ± 0.03	0.64 ± 0.13	0.46 ± 0.07	0.25 ± 0.01
fegato	2.66 ± 0.88	1.61 ± 0.21	0.72 ± 0.06	0.20 ± 0.05	0.10 ± 0.03
rene	14.69 ± 2.30	9.16 ± 1.08	6.70 ± 0.98	5.73 ± 0.55	3.48 ± 0.14
intestino	7.97 ± 0.94	9.04 ± 1.71	6.70 ± 0.71	6.52 ± 7.65	6.57 ± 5.38
muscolo	0.20 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.06

Tabella 14. Biodistribuzione in ratti Sprague-Dawley di [^{99m}Tc(N)]-DBODC5; risultati espressi come %dose/g.

Studi di biodistribuzione *ex vivo* condotti su ratti femmina *Sprague Dawley* hanno dimostrato che [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 è rapidamente estratto dal tessuto cardiaco, dove permane per un tempo prolungato e presenta una rapida *clearance* ematica e polmonare (Tabella 14). La captazione epatica è transitoria e l'eliminazione da questo organo rapida e quantitativa (l'attività iniziale è completamente escreta, senza essere metabolizzata, nell'intestino dopo un'ora dall'iniezione). La captazione cardiaca è comparabile a quella di [^{99m}Tc]-Sestamibi e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin, mentre i rapporti cuore/polmone (Grafico 1) e cuore/fegato (Grafico 2) sono significativamente differenti (rispettivamente 18.80 e 8.17, a 60 minuti).

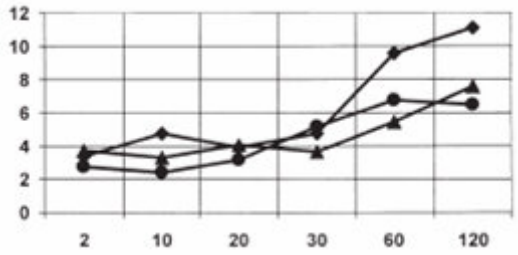


Grafico 1. Rapporti cuore/polmone in funzione del tempo, in minuti, per:
♦ [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, ● [^{99m}Tc]-Sestamibi, ▲ [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

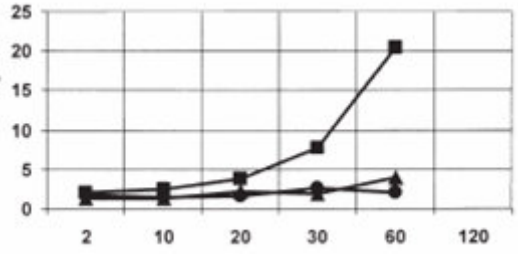


Grafico 2. Rapporti cuore/fegato in funzione del tempo, in minuti, per:
■ [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, ● [^{99m}Tc]- Sestamibi, ▲ [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

In particolare, i rapporti cuore/fegato per [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 aumentano in modo esponenziale nel tempo diventando molto elevati 60 minuti dopo l'iniezione. Ciò permette, ad un'ora dalla somministrazione, un'ottima visualizzazione dell'intero tessuto cardiaco, in particolar modo delle zone apicale e inferoapicale che risultano, anatomicamente, più prossime al fegato [61] (Figura 35).

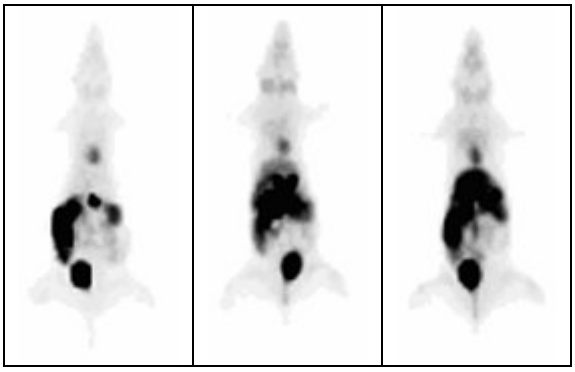


Figura 35. Immagini planari SPET *in vivo* di ratti Sprague Dawley, 60 minuti dopo l'iniezione, da sinistra a destra, di: [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, [^{99m}Tc]-Tetrofosmin,e [^{99m}Tc]-Sestamibi.

Studi di distribuzione sub-cellulare in miociti isolati hanno evidenziato che [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 e gli altri agenti monocationici condividono lo stesso meccanismo di *trapping* intracellulare, concentrandosi nella frazione mitocondriale [62].

Studi di biodistribuzione in modello canino [63] hanno confermato quanto precedentemente osservato in ratti (Figura 36). [^{99m}Tc]-Sestamibi, se paragonato con [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 mostra una rapida *clearance* epatica nei primi 60 minuti p.i., cui corrisponde un aumento della attività riscontrata in corrispondenza della cistifellea; per entrambi i traccianti la captazione cardiaca è alta, ma presenta una minima ridistribuzione nelle prime 3 ore p.i.; la captazione polmonare è bassa e mostra una rapida *clearance* (rapporti cuore/polmone: per [^{99m}Tc]-Sestamibi: 2.48 ± 0.16 a 5 minuti e 3.08 ± 0.13 a 180 minuti; per [^{99m}Tc(N)]-DBODC5: 2.77 ± 0.28 a 5 minuti e 3.55 ± 0.45 a 180 minuti).

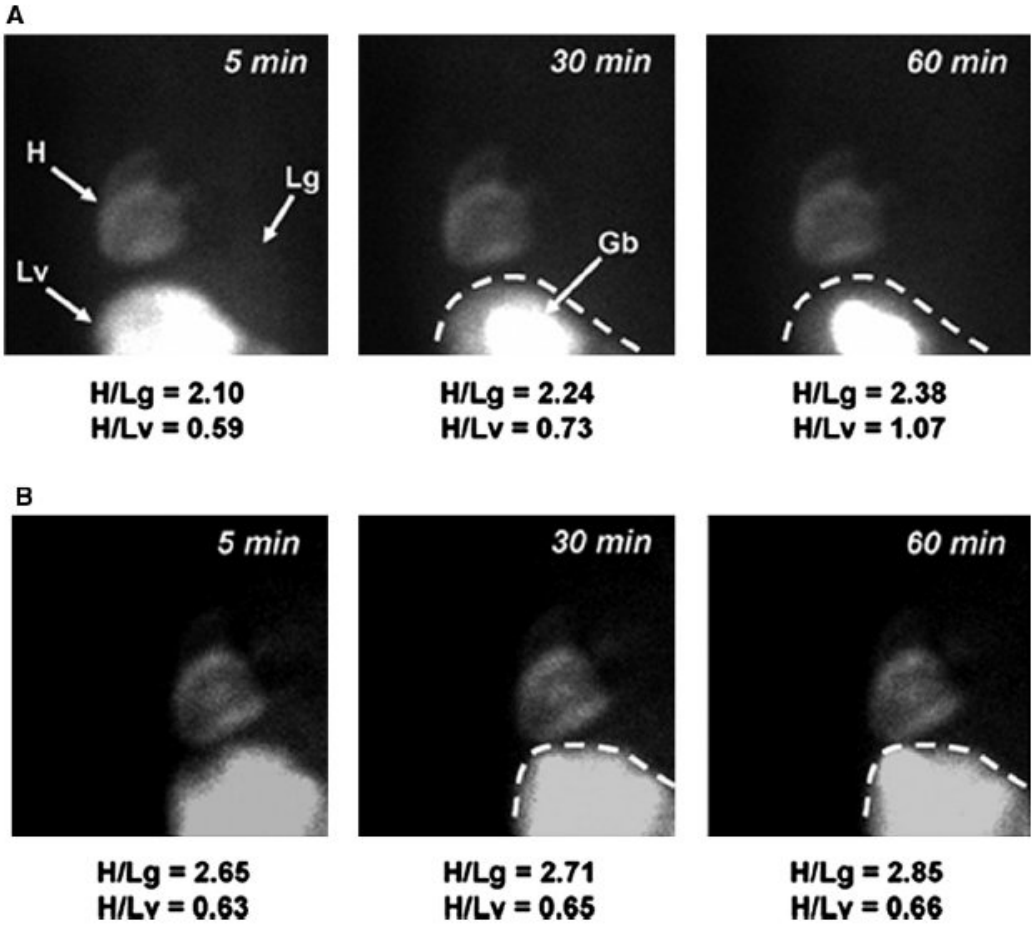


Figura 36. Immagini *in vivo* in cani *mongrel* adulti dopo somministrazione di [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 (A) e [^{99m}Tc]-Sestamibi (B). Si osserva per entrambi una persistente captazione cardiaca (H) e minimo *uptake* polmonare (Lg). La *clearance* epatica (Lv) di [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 è rapida, nonostante vi sia un aumento della attività in corrispondenza della cistifellea (Gb). [^{99m}Tc]-Sestamibi mostra invece una captazione epatica elevata e persistente.

La *clearance* ematica, infine, è rapida ed in linea con quella trovata per [^{99m}Tc]-Sestamibi. Infatti, a 10 minuti p.i. meno del 5% dell'attività inizialmente iniettata si ritrova nel *pool* ematico. (Figura 37).

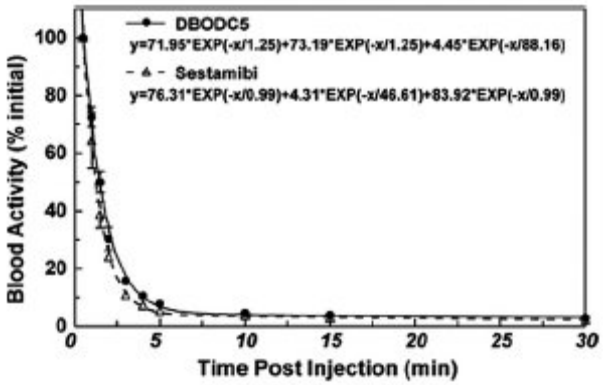


Figura 37. Cinetica di *clearance* ematica per [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 e [^{99m}Tc]-Sestamibi, nei primi 30 minuti p.i. in campioni di sangue venoso. L'attività è espressa come percentuale dell'attività iniziale (30 secondi p.i.) e normalizzata con quella realmente iniettata.

I rapporti cuore/fegato per [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 aumentano molto rapidamente nel tempo, 0.67 ± 0.05 a 5 minuti e 2.10 ± 0.21 a 180 minuti (Figura 38), mentre per [^{99m}Tc]-Sestamibi sono pressoché costanti nel tempo a causa di una prolungata captazione epatica, 0.52 ± 0.04 a 5 minuti e 0.71 ± 0.05 a 180 minuti. Il più alto valore del rapporto cuore/fegato si ha per [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 a 30 minuti p.i. Questo permetterebbe, nella pratica clinica, la riduzione dei protocolli di *imaging* e l'acquisizione di immagini in tempi più brevi.

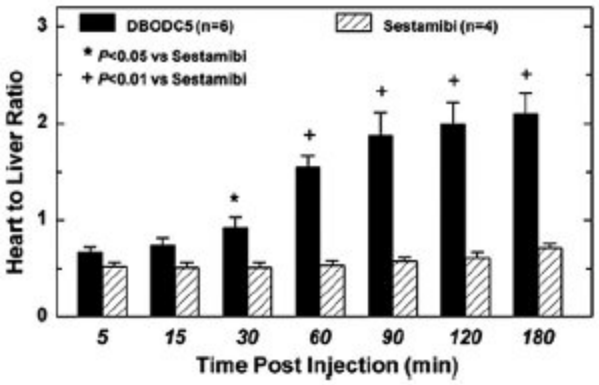


Figura 38. Comparazione dei rapporti cuore/fegato nel tempo per somministrazione di [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 e [^{99m}Tc]-Sestamibi in cani *mongrel* adulti. Si osserva come tale rapporto, per [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, aumenti notevolmente nelle tre ore p.i., mentre per [^{99m}Tc]-Sestamibi è praticamente costante.

La captazione di [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, pur essendo rapida, mostra un indice di estrazione coronarico di primo passaggio del 61%, basso se comparato con quello di $^{201}Tl^{+}$ (85%), ma intermedio tra quelli di [^{99m}Tc]-Sestamibi (65%) e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin (54%), valutati in modello canino [63]. Lo studio della concentrazione miocardica di $^{201}Tl^{+}$ e di [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 in funzione del flusso coronarico, in cani con una stenosi critica della arteria anteriore discendente sinistra (LAD, *Letf Anterior Descending Artery*), rivela che la captazione cardiaca per entrambi i traccianti raggiunge un *plateau* con l'aumentare del flusso coronarico, e questo rappresenta una limitazione alla diagnosi, in quanto può sottostimare la differenza di flusso in condizioni normali o di stenosi, impedendone la discriminazione. Ad alti valori di flusso, inoltre, la curva per [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 è più bassa di quella di $^{201}Tl^{+}$ (Figura 39).

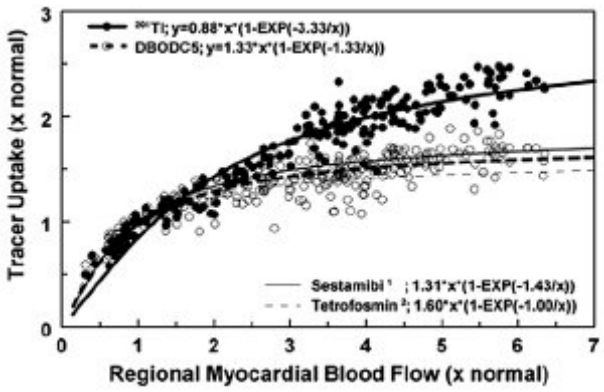


Figura 39. Studio della concentrazione miocardica di $^{201}Tl^{+}$ e di [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 in funzione del flusso coronarico in studi di *stress* in cani (n=7) con stenosi critica di LAD. Per comparazione, sono riportati anche i dati per [^{99m}Tc]-Sestamibi e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

Nel caso di stenosi media, la patologia è diagnosticata con maggiore precisione da $^{201}Tl^{+}$ (Figura 40). In conclusione, sebbene [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 non sia così efficiente come il $^{201}Tl^{+}$ nella misura del flusso, è in grado di rilevare difetti perfusivi indotti da *stress* farmacologico con precisione paragonabile a [^{99m}Tc]-Sestamibi.

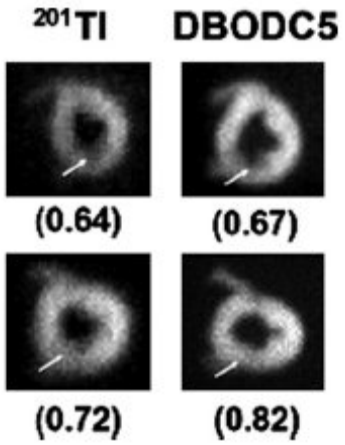


Figura 40. Immagini *ex vivo* ottenute con [^{99m}Tc(N)]-DBODC5 e $^{201}Tl^{+}$ in due gruppi di cani: con stenosi di LAD critica (sopra) e media (sotto). Le frecce indicano il difetto di perfusione anterosettale. Tra parentesi i rapporti LAD/LC_x (LC, *Left Circumflex Artery,* flusso del ramo circumflesso dell'arteria sinistra). Si osserva che ambedue gli agenti discriminano correttamente una situazione di stenosi critica, mentre solo $^{201}Tl^{+}$ permette la differenziazione tra stenosi media e critica.

Studi tossicologici preliminari condotti sui leganti PNP5 e DBODC hanno rivelato la mancanza di attività mutagenica e l'assenza di effetti avversi a dosi di 0.33 mg/kg (quantità 10 volte superiore alla dose realmente iniettata) per il legante PNP5 e a dosi di 3.3 mg/kg/giorno (quantità 100 volte superiore alla dose realmente iniettata) per il legante DBODC.

La valutazione del comportamento biologico di questa nuova classe di agenti sull'uomo è

attualmente in corso.

Molto recentemente, nel tentativo di aumentare ulteriormente i rapporti cuore/fegato e cuore/polmoni di [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, Liu *et al.* hanno proposto complessi analoghi, del tipo [Tc^{V}N(DTC)(PNP)]$^{+}$, dove l'azoto del legante amminodifosfinico oppure del ditiocarbammato è derivatizzato con eteri corona (Figura 41).

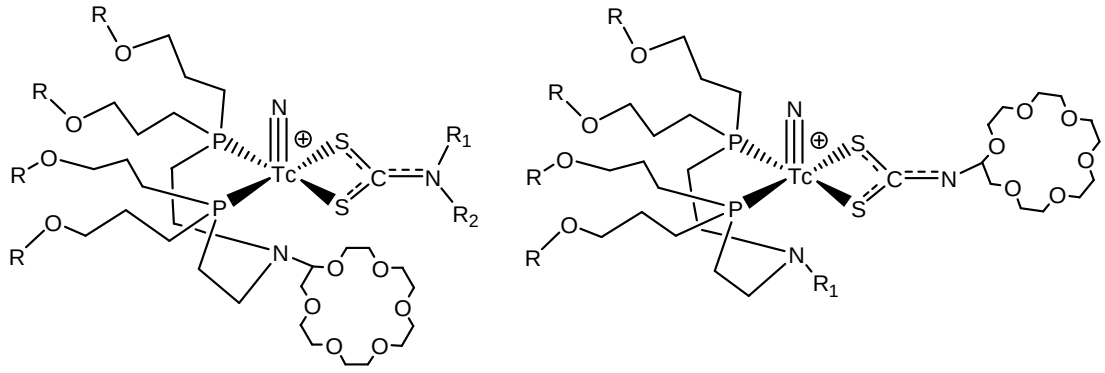


Figura 41. Struttura di complessi del tipo [Tc^{V}N(DTC)(PNP)]$^{+}$, con eteri corona.

Tali complessi mantengono un elevato e persistente tropismo cardiaco, ma si osserva un peggioramento dei rapporti cuore/fegato [64].

A2.3.3 RADIOFARMACI PET
PER SCINTIGRAFIA PERFUSIONALE DEL MIOCARDIO: CENNI.

1. [^{18}F]-FDG.

Nella metodica PET il F-18 è il più utilizzato agente emettitore di positroni, ha un'emivita di 110 minuti e decade con una emissione β^+ (97 %). Tra i numerosi metodi di produzione il preferito è il bombardamento protonico di [^{18}O]-H_2O; esso offre una resa più elevata rispetto alle altre metodologie sintetiche, ma necessita di protoni a bassa energia.

Il raggio di van der Waals dell'atomo di fluoro è simile a quello dell'idrogeno, per cui la sostituzione di H con F in una molecola biologica altera soltanto la distribuzione della carica, per la maggiore elettronegatività di F, ma non introduce alcuna sostanziale modificazione sterica. F-18 può pertanto essere inserito in molecole biologiche come agente nucleofilo (F^-) o elettrofilo (F_2) [65].

L'approccio nucleofilo è quello preferito nella sintesi di [^{18}F]-FDG, dove un atomo di idrogeno sul carbonio in posizione 2 del 2-desossiglusosio è sostituito con un F-18, senza notevoli variazioni della biospecificità verso trasportatori ed enzimi (Figura 42).

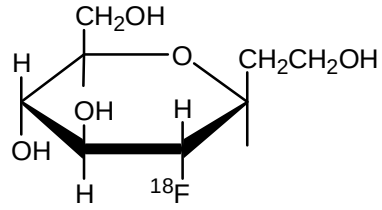


Figura 42. ^{18}F-FDG.

Il metabolismo energetico cardiaco è per lo più basato sugli acidi grassi, tranne in condizioni di ipossia o di intensa richiesta di diossigeno, quando la prima fonte energetica diviene il glucosio. L'esoso attraversa la membrana cellulare dei cardiomiociti tramite un trasportatore specifico e, una volta nel citoplasma, viene fosforilato da esochinasi o glucochinasi, impedendone così la retrodiffusione. Può essere metabolizzato in condizioni anaerobie, seppure con scarso rendimento energetico, e per questo è preferito dalle cellule ischemiche. [^{18}F]-FDG è dunque agente di prima scelta negli studi del metabolismo cardiaco, essendo il suo *uptake* influenzato dall'integrità della membrana e dalla funzione metabolica del miocita. In soggetti normali l'accumulo cardiaco di [^{18}F]-FDG è omogeneo

e ridotto; nelle regioni ischemiche l'*uptake* elevato è indice della vitalità delle cellule e della loro tendenza al metabolismo anaerobio; si possono effettuare anche misure di estrazione di primo passaggio e valutazione di LVEF. In seguito ad iniezione endovenosa, [^{18}F]-FDG segue il comportamento biologico del glucosio, accumulandosi nel cuore per l' 1-4 % con un indice di estrazione coronarico al *first pass* pari al 10% e con una *clearance* di circa 96 ore. La distribuzione è, in minima entità, dipendente dal flusso coronarico ed è proporzionale al livello di glucosio esogeno [66]. I rapporti cuore/fegato 10:1, cuore/polmone 20:1, cuore/sangue 14:1 sono eccellenti e consentono l'ottenimento di un elevato contrasto e di ottime immagini, anche grazie a maggiori sensibilità e risoluzione delle immagini, proprie della tecnica PET (Tabella 5). L'applicazione di tale tecnologia si rivela particolarmente interessante per la valutazione del metabolismo delle cellule cardiache, e della loro vitalità, più che del flusso coronarico. L'acquisizione delle immagini avviene generalmente entro 40 minuti dalla somministrazione.

La metodica PET con [^{18}F]-FDG si rivela un prezioso strumento diagnostico per la predizione precisa degli esiti di operazioni di rivascolarizzazione.

2. $^{13}NH_3$.

N-13 viene prodotto attraverso ciclotrone (reazione: $^{16}O(p, \alpha)^{13}N$) e decade a C-13 per emissione positronica ($E_{\beta max}$=1,19 MeV) con un tempo di emivita di 9.96 minuti che richiede l'acquisizione delle immagini subito dopo la somministrazione endovenosa del tracciante $^{13}NH_3$. Utilizzato per gli studi di perfusione in cardiologia nucleare, $^{13}NH_3$ si concentra nel cuore proporzionalmente al flusso coronarico, con un elevato indice di estrazione al *first pass* (~85%) e con un'emivita biologica nel miocardio di 2 minuti. $^{13}NH_3$ attraversa la membrana cellulare del cardiomiocita sia per diffusione passiva che per trasporto facilitato attraverso la pompa sodio-potassio; una volta nel citoplasma essa viene metabolizzata dal glutammato a glutammina e pertanto non presenta ridistribuzione. L'*uptake* dipende quindi dall'integrità della membrana del miocita e dalla sua funzione metabolica. Il tempo di emivita plasmatico è di 2.84 minuti.

La valutazione della perfusione coronarica non può avvalersi di [^{18}F]-FDG, indicatore di metabolismo, ma viene utilizzata $^{13}NH_3$ e, confrontando le misure di flusso con le misure del metabolismo cardiomiocitico, si possono ottenere dati sulla reale condizione cardiaca (Figura 43).

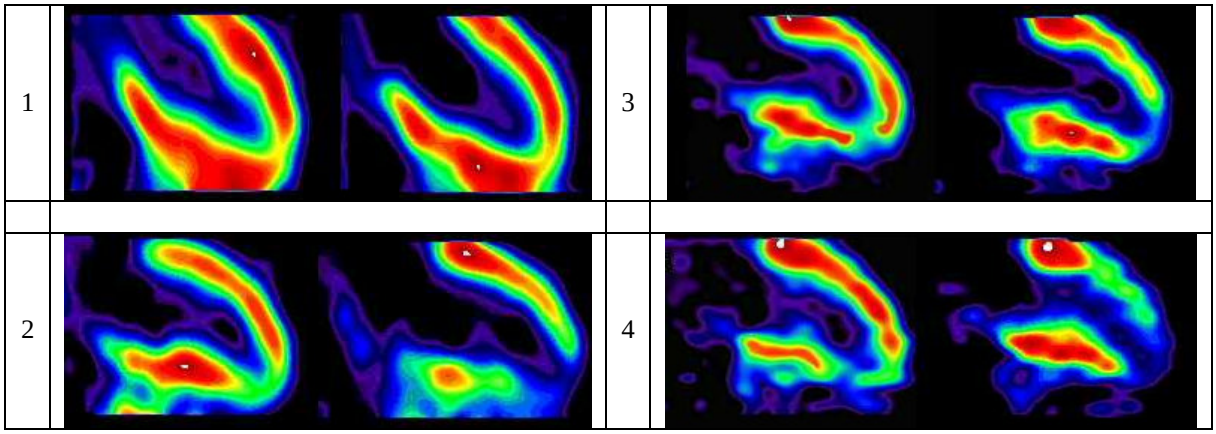


Figura 43. Coppie di immagini di perfusione miocardica PET, a riposo (a sinistra) e sotto sforzo (a destra), in forme aterosclerotiche a diversa gravità per dimensione della lesione.

I risultati sintonici di normocaptazione tra metabolismo e perfusione indicano una condizione di normalità; i risultati sintonici di ipocaptazione indicano una disfunzione miocardica, irreversibile, necrotica; i risultati distonici, con ipocaptazione nella perfusione e normo-/ipercaptazione nel metabolismo, indicano diversi gradi di sofferenza ischemica, potenzialmente reversibile (Figura 44).

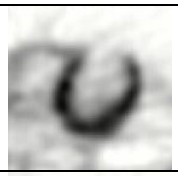
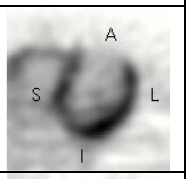
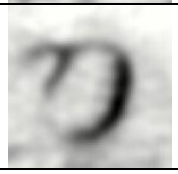
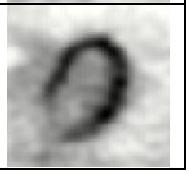
	Perfusione	Metabolismo
Accordo perfusione/metabolismo		
Disaccordo perfusione/metabolismo		

Figura 44. Immagini di perfusione (con $^{13}NH_3$) e di metabolismo (con ^{18}F-FDG) ottenute tramite PET.

$^{13}NH_3$ è indicata nella diagnosi e localizzazione di infarto miocardico, di CAD associato ad uno studio sottosforzo, nello studio quantitativo di perfusione tissutale e nella diagnosi di miocardio vitale associato a ^{18}F-FDG.

La valutazione della perfusione coronarica con tecnica PET può utilizzare, oltre a [^{13}N]-ammoniaca, anche [^{15}O]-acqua (reazione: ^{15}N(p, n)^{15}O) e ^{82}RbCl (prodotto dal generatore Sr-^{82}Rb), analogo dello ione potassio.

Il limite di questi radionculidi è la breve emivita, inferiore a 20 minuti, che rende necessario per il loro utilizzo la presenza di un ciclotrone nelle vicinanze della gamma-

camera.

La ricerca di nuovi agenti PET da utilizzare in cardiologia nucleare si sta quindi indirizzando verso emettitori di positroni con emivita sufficientemente lunga (^{18}F, ^{76}Br) in modo che sia possibile produrre e trasportare il radionuclide anche in reparti limitrofi di Medicina Nucleare [67].

A3. Parte Sperimentale.

A3.1 MATERIALI E METODI.

I solventi per HPLC sono forniti da Carlo Erba Reagenti, i reagenti sono stati acquistati da Sigma Aldrich.

Molti dei solventi e reagenti impiegati sono stati utilizzati come ricevuti dalla casa produttrice, senza ulteriori purificazioni. I solventi anidri sono stati ottenuti seguendo le procedure riportate in letteratura [68].

Na[$^{99m}TcO_4$] in soluzione fisiologica è stato ottenuto da un generatore ^{99}Mo / ^{99m}Tc a umido Elumatic III di Schering.

Il legante ditiocarbammato DBODC è stato sintetizzato secondo le metodiche riportate in letteratura [69].

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare ^{1}H, $^{31}P\{^{1}H\}$ e $^{13}C\{^{1}H\}$ sono stati raccolti con uno spettroscopio Bruker AMX 300, usando tetrametilsilano come riferimento interno per ^{1}H e una soluzione all'85% di H_3PO_4, come riferimento esterno per il P-31.

I campioni sottoposti ad analisi NMR sono di concentrazione 10mg $\cdot ml^{-1}$ in $CDCl_3$ e D_2O. I valori di *chemical shifts* sono espressi in ppm (δ) e sono riferiti al picco caratteristico del $CHCl_3$ (7,26 ppm) in $CDCl_3$.

Nell'analisi di sostanze radioattive si devono usare, per le bassissime concentrazioni di utilizzo, solamente metodi radiometrici, puramente quantitativi; questi sono accoppiabili ai comuni metodi cromatografici, permettendo una valutazione anche qualitativa delle specie sotto analisi.

La resa radiochimica (RCY) dei prodotti sintetizzati è stata valutata attraverso tecniche cromatografiche TLC e HPLC.

Le soluzioni utilizzate per le analisi HPLC sono state filtrate con filtri Millipore di diametro di 0.22 μm e degasate prima dell'uso.

La cromatografia su strato sottile (TLC, *thin layer chromatography*) viene effettuata su una fase stazionaria di silice pura (SiO_2 F_{254S} della Merck) o di silice funzionalizzata (C18 F_{254S} della Merck), supportata su una lamina di alluminio.

La radioattività sulle lastre cromatografiche sviluppate viene rilevata da uno schermo

radiosensibile al fosforo che, impressionato, viene analizzato da un lettore Cyclone®, equipaggiato con un sistema software (Packard, Meridian, CT), che restituisce delle immagini elaborate con dati quali- e quantitativi.

Lo strumento HPLC (*High Prestations Liquid Chromatography*) è costituito da due pompe Beckman System Gold ed equipaggiato con un miscelatore di solventi programmabile Beckman Modello 126; questo è corredato, in uscita dalla colonna, di un rivelatore UV-visibile a lunghezza d'onda selezionabile, Beckman Modello 166, cui è collegato in serie un rivelatore radiometrico Bioscan, Modello B-FC-3200.

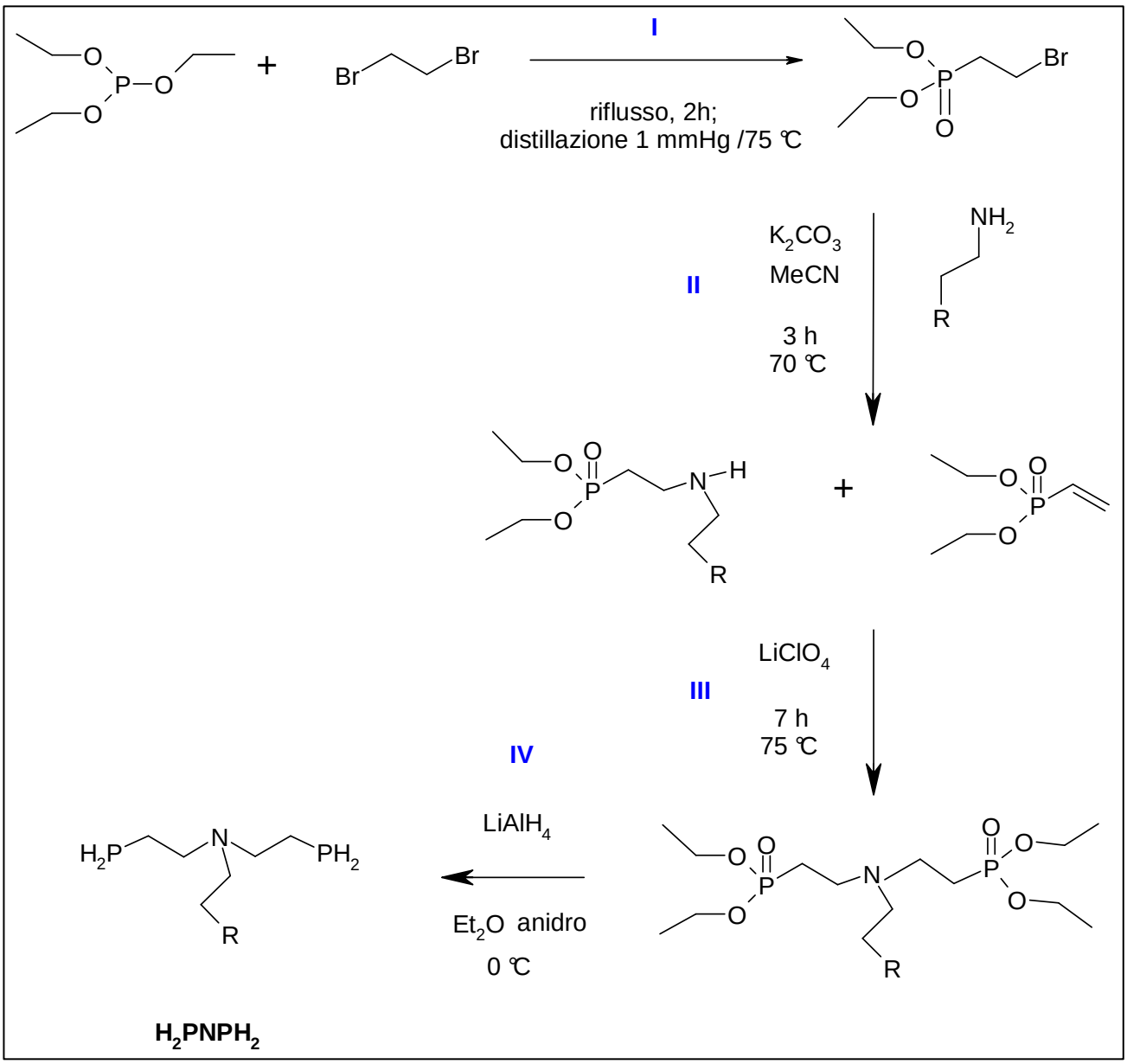
Le cartucce Sep-Pak RP-C18 Waters® permettono la separazione delle sostanze sulla base delle loro caratteristiche di lipofilia.

Le cartucce Sep-Pak CM Waters® permettono la separazione delle sostanze sulla base delle loro caratteristiche di lipofilia e carica cationica.

La radioattività viene valutata tramite un contatore gamma automatico a cristalli di NaI, modello Cobra II di Packard.

A3.2 SINTESI DEI LEGANTI AMMINODIFOSFINICI (PNP) [70].

A3.2.1. Sintesi di N,N-BIS-(2-FOSFANILETIL)R-ETILAMMINA (R=metossi, etossi), (H_2PNPH_2), (Schema 1).



Schema 1. Sintesi di N,N-bis-(2-fosfaniletil)R-etilammina.

I. Sintesi di 2-(dietilfosfonil)bromoetano

Reagenti

$(C_2H_5O)_3P$	PM=166.16	bp=156 °C	d=0,969 g/ml
$BrCH_2CH_2Br$	PM=187.87	bp=131-132 °C	d=2,180 g/ml

Procedimento

Trietilfosfito (0.2 mol) ed un eccesso di 1,2-dibromoetano (0.8 mol) vengono messi a riflusso per due ore; al termine si distilla 2-(dietilfosfonil)bromoetano alla pressione di 1 mmHg e alla temperatura di 75 °C.

Resa: 67.0 %.

Caratterizzazione.

$^{31}P\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): 26.40 ppm (s).

^{1}H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 4.00, CH_3CH_2OP, 4H (m); 3.43, $P(O)CH_2CH_2Br$, 2H (m); 2.26, $P(O)CH_2CH_2Br$, 2H (m); 1.22, CH_3CH_2OP, 6H (t).

II. Alchilazione in acetonitrile

Reagenti

$(CH_3CH_2O)_2P(O)CH_2CH_2Br$	PM = 245.06	d=1.348 g/ml
$NH_2CH_2CH_2R$		
con R=-OMe	PM = 75.11	d=0.864 g/ml
con R=-OEt	PM = 89.14	d=0.851 g/ml
K_2CO_3	PM = 138.21	

Procedimento

La miscela di 2-(dietilfosfonil)bromoetano (2.5 mmol), 2-R-etilammina (2.5 mmol), K_2CO_3 (2.5 mmol) e MeCN (10 ml), viene mantenuta in agitazione per tre ore a 70 °C in bagno di olio. Al termine si filtra con filtro G3, si lava il precipitato con MeCN (3 x 5 ml) e si concentra tramite evaporatore rotante.

Resa quantitativa.

Caratterizzazione

<u>R=-OMe</u>

$^{31}P\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): 31.10 ppm (s).

^{1}H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 4.11, CH_3CH_2OP, 4H (m); 3.50, NCH_2CH_2O, 2H (t); 3.36, $NCH_2CH_2OCH_3$, 3H (s); 2.92, $P(O)CH_2CH_2N$, 2H (m); 2.80, NCH_2CH_2O, 2H (t); 2.00, $P(O)CH_2CH_2N$, 2H (m); 1.33, CH_3CH_2OP, 6H (t).

<u>R=-OEt</u>

$^{31}P\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): 31.12 ppm (s).

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 4.11, CH_3CH_2OP, 4H (m); 3.53, NCH_2CH_2O, 2H

(t); 3.48, $NCH_2CH_2OC\mathit{H}_2CH_3$, 2H (m); 2.93, $P(O)CH_2C\mathit{H}_2N$, 2H (m); 2.79, $NC\mathit{H}_2CH_2O$, 2H (t); 2.00, $P(O)C\mathit{H}_2CH_2N$, 2H (m); 1.33, $C\mathit{H}_3CH_2OP$, 6H (t); 1.19, $NCH_2CH_2OCH_2C\mathit{H}_3$, 3H (t).

III. Reazione di Michael

Reagenti

$(EtO)_2P(O)CH=CH_2$	PM = 164.14	d=1.068 g/ml
$(EtO)_2P(O)CH_2CH_2NHCH_2CH_2R$		
R=-OMe	PM = 239.00	
R=-OEt	PM = 253.27	
$LiClO_4$	PM = 106.39	

Procedimento

In una vial si aggiungono N(2-dietilfosfoniletil)R-etilammina (0.625 mmol), dietilfosfonilvinile (0.625 mmol) e $LiClO_4$ (0.625 mmol), si degasa con N_2 e si immerge il tutto in bagno di olio alla temperatura di 75 °C per 7 ore. Si ottiene un prodotto oleoso, di colore giallo.

Si riprende il prodotto con $CHCl_3$ (3 x 2ml), estraendo con H_2O (2 x 6 ml). Le fasi organiche, riunite, si concentrano con flusso di N_2. L'eccesso di dietilfosfonilvinile viene eliminato per distillazione con pompa da vuoto a temperatura ambiente.

Il prodotto viene diluito con 0.5 ml di CH_2Cl_2 e purificato per via cromatografica su colonna di gel di silice SiO_2 60, di lunghezza 16 cm, diametro 2.6 cm. Fase mobile: CH_2Cl_2/MeOH = 20/1; flusso: 1ml/40 sec.

Dopo concentrazione si ottiene un olio giallo.

Resa: 87%.

Caratterizzazione

<u>R=-OMe</u>

$^{31}P\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): 31.24 ppm (s).

^1H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 4.08, $CH_3C\mathit{H}_2OP$, 8H (m); 3.44, $NCH_2C\mathit{H}_2O$, 2H (t); 3.33, $NCH_2CH_2OC\mathit{H}_3$, 3H (s); 2.82, $P(O)CH_2C\mathit{H}_2N$, 4H (m); 2.64, $NC\mathit{H}_2CH_2O$, 2H (t); 1.96, $P(O)C\mathit{H}_2CH_2N$, 4H (m); 1.31, $C\mathit{H}_3CH_2OP$, 12H (t).

<u>R=-OEt</u>

$^{31}P\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): 31.32 ppm (s).

^{1}H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 4.11, CH_3CH_2OP, 8H (m); 3.51, NCH_2CH_2O, 2H (t); 3.48, $NCH_2CH_2OCH_2CH_3$, 2H (m); 2.80, $P(O)CH_2CH_2N$, 4H (m); 2.65, NCH_2CH_2O, 2H (t); 1.96, $P(O)CH_2CH_2N$, 4H (m); 1.32, CH_3CH_2OP, 12H (t); 1.19, $NCH_2CH_2OCH_2CH_3$, 3H (t).

IV. Riduzione

Reagenti

$[(CH_3CH_2O)_2P(O)(CH_2)_2]_2NCH_2CH_2R$

con R=-OMe ($C_{15}H_{35}O_7P_2N$) PM = 403.4

con R=-OEt ($C_{16}H_{37}O_7P_2N$) PM = 417.00

$LiAlH_4$ (1M in Et_2O) PM = 37.95 d=0.716 g/ml

Procedimento

In un pallone a due colli essiccato in stufa in atmosfera controllata si pesa $[(CH_3CH_2O)_2P(O)(CH_2)_2]_2NCH_2CH_2R$ (1.44 mmol) e si solubilizza in Et_2O anidro (5 ml). Si raffredda il pallone in bagno di ghiaccio a 0 °C e attraverso un setto di gomma con una siringa a tenuta si aggiunge goccia a goccia una soluzione di $LiAlH_4$ 1.0 M in Et_2O (9 mmol). Durante l'aggiunta si osserva lo sviluppo di gas e diventa percepibile l'odore tipico delle fosfine. Al termine dell'aggiunta la soluzione è opalescente e il bagno viene riportato a temperatura ambiente. Dopo 60 minuti si riporta a 0 °C e si aggiunge, goccia a goccia, una soluzione degasata satura di Na_2SO_4 in H_2O (10 ml) e successivamente Na_2SO_4 anidro. Dopo 30 minuti si filtra su filtro G2 in atmosfera di N_2 e si lava il precipitato con Et_2O anidro (4 x 10 ml). Si raccoglie il filtrato etereo e si concentra mediante flusso di N_2 ed infine mediante pompa da vuoto per 30 minuti. Altro prodotto può essere estratto con CH_2Cl_2. Resa: 88.2%.

Caratterizzazione

<u>R=-OMe</u>

$^{31}P\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): -145.49 ppm (s);

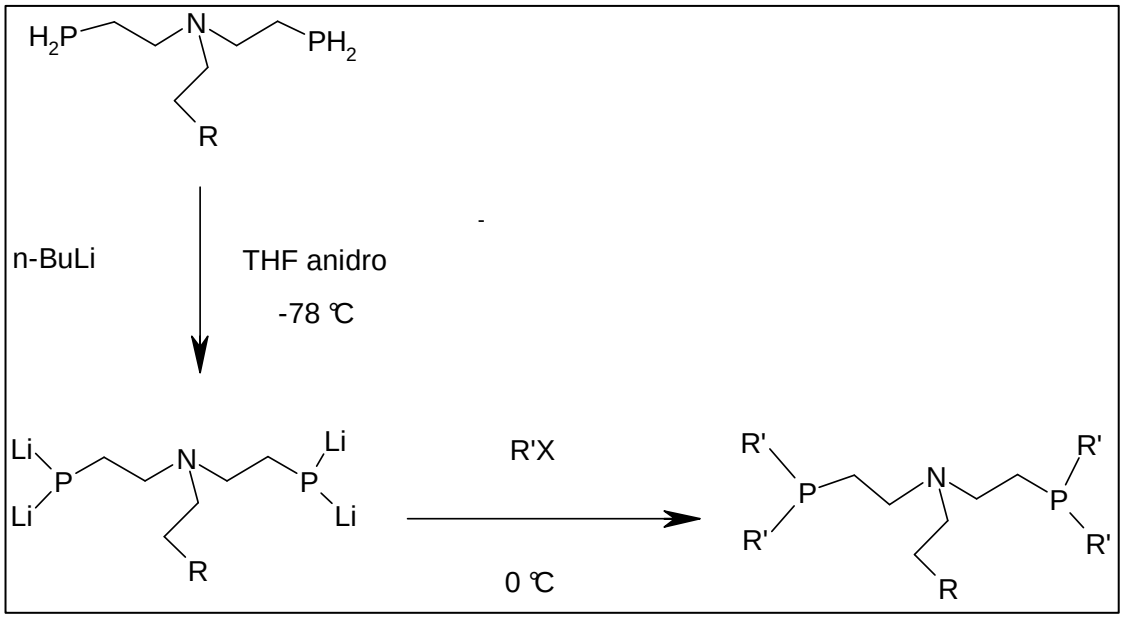
^{1}H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 3.45, $NCH_2CH_2OCH_3$, 2H (t); 3.34, $NCH_2CH_2OCH_3$, 3H (s); 2.93 + 2.28, PH_2, 4H (2t); 2.65, $CH_2NCH_2CH_2O$, 6H (2t); 1.63, $(PH_2CH_2CH_2)_2N$, 4H (2t).

<u>R=-OEt</u>

$^{31}P\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): -145.6 ppm (s);

^{1}H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 3.50, $NCH_2CH_2OCH_2CH_3$, 4H (2 t); 2.93 + 2.28, PH_2, 4H (2t); 2.66, $CH_2NCH_2CH_2O$, 6H (2t); 1.64, $(PH_2CH_2CH_2)_2N$, 4H (2t); 1.20, $NCH_2CH_2OCH_2CH_3$, 3H (t).

V. Alchilazione con alogenuro alchilico e preparazione di PNPX (Schema 2, Tabella 15).



Schema 2. Alchilazione di H_2PNPH_2 e sintesi di PNPX.

Reagenti

$[H_2P(CH_2)_2]_2NCH_2CH_2R$		(H_2PNPH_2)
con R= -OMe	$C_7H_{19}P_2ON$	PM=195.18
con R= -OEt	$C_8H_{21}P_2ON$	PM=209.21
n-BuLi (2.5 M in n-esano)		PM = 64.06
XR'	$ICH_2CH_2CH_2OCH_3$	PM= 200.02; d=1.67 g/ml
	$ClCH_2CH_2OCH_3$	PM= 94.54; d=1.035 g/ml
	ICH_3	PM= 141.94 d=2.28 g/ml

Procedimento

In atmosfera controllata, H_2PNPH_2 (1.16 mmol) è solubilizzato in 10 ml di THF anidro e raffreddato a -78 °C. Immergendo il pallone in bagno di acetone/azoto liquido, si aggiunge, mediante un setto di gomma, n-BuLi 2.5 M in esano (4.64 mmol). Al termine dell'aggiunta, la soluzione diventa giallo-verde, si toglie dal bagno e si lascia 45 minuti a temperatura ambiente. Successivamente il pallone viene raffreddato in bagno di

ghiaccio e si aggiunge, goccia a goccia, l'alogenuro alchilico RX (4.64 mmol). Si lascia ritornare lentamente il bagno a temperatura ambiente, la miscela rimane di colore giallo-verde. Si concentra con flusso di N_2 la soluzione a circa 1/3 del volume iniziale. Si raffredda con bagno di ghiaccio e si aggiunge, goccia a goccia, H_2O degasata (5 ml).

Si aggiungono 20 ml di Et_2O degasato e si porta in imbuto separatore a due colli mediante un ago flessibile si recupera lo strato acquoso sottostante in un altro imbuto separatore e lo si tratta con altri 20 ml di Et_2O.

Si riuniscono le fasi eteree e si anidrificano con Na_2SO_4 anidro, si filtra lavando il solido con Et_2O anidro (2 x 10 ml) ed infine si concentra prima con flusso di N_2 e poi in pompa da vuoto.

Resa: 50%.

Caratterizzazioni

PNP3=N,N-bis-[di(metossipropil)fosfinoetil]metossietilammina, (R=-OCH_3; R'=-$CH_2CH_2CH_2OCH_3$). *Nota sintetica: l'aggiunta dell'alogenuro alchilico avviene alla temperatura di -78 °C.*

$^{31}P\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): -39.10 ppm (s).

^1H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 3.42, $CH_3OC\mathit{H}_2CH_2CH_2P$, 8H + $NCH_2C\mathit{H}_2OCH_3$, 2H (m); 3.32, $C\mathit{H}_3OCH_2CH_2CH_2P$, 12H (s); 2.65, $(PCH_2C\mathit{H}_2)_2NC\mathit{H}_2CH_2O$, 6H (m); 1.70, $CH_3OCH_2C\mathit{H}_2CH_2P$, 8H (m); 1.56, $(PC\mathit{H}_2CH_2)_2N$, 4H (m); 1.44, $CH_3OCH_2CH_2C\mathit{H}_2P$, 8H (m).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)= 73.46, $CH_3OCH_2CH_2CH_2P$ (d, J^3_{PC}=12.02 Hz); 71.03, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 58.83, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 58.49, $CH_3OCH_2CH_2CH_2P$ (s); 52.45, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 50.91, PCH_2CH_2N (d, J^2_{PC}=21.46 Hz); 25.99, $CH_3OCH_2CH_2CH_2P$ (d, J^2_{PC}=12.88 Hz); 24.45, PCH_2CH_2N (d, J^1_{PC}=11.60 Hz); 23.43, $CH_3OCH_2CH_2CH_2P$ (d, J^1_{PC}=12.31 Hz).

PNP5=N,N-bis-[di(metossipropil)fosfinoetil]etossietilammina, (R=-OCH_2CH_3; R'=$CH_2CH_2CH_2OCH_3$).

$^{31}P\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): -31.68 ppm (s).

^1H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 3.51, $NCH_2C\mathit{H}_2OC\mathit{H}_2CH_3$, 4H (m); 3.40, $CH_3OC\mathit{H}_2CH_2CH_2P$, 8H (t); 3.33, $C\mathit{H}_3OCH_2CH_2CH_2P$, 12H (s); 2.63, $(PCH_2C\mathit{H}_2)_2$

NCH_2CH$_2$O, 6H (m); 1.67, CH$_3$OCH$_2$CH_2CH$_2$P, 8H (m); 1.56, (PCH_2CH$_2$)$_2$N, 4H (m); 1.42, CH$_3$OCH$_2$CH$_2$CH_2P, 8H (m); 1.17, NCH$_2$CH_2OCH$_2$CH_3, 3H (t).

^{13}C NMR (CDCl$_3$) δ (ppm)= 73.49, CH$_3$OCH$_2$CH$_2$CH$_2$P (d, J^3_{PC}=12.04 Hz); 69.07, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_3$ (s); 66.46, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_3$ (s); 58.49, CH$_3$OCH$_2$CH$_2$CH$_2$P (s); 53.94, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_3$ (s); 51.05, PCH$_2$CH$_2$N (d, J^2_{PC}=20.94 Hz); 26.01, CH$_3$OCH$_2$CH$_2$CH$_2$P (d, J^2_{PC}=13.11 Hz); 24.44, PCH$_2$CH$_2$N (d, J^1_{PC}=13.49 Hz); 23.47, CH$_3$OCH$_2$CH$_2$CH$_2$P (d, J^1_{PC}=12.32 Hz); 15.17, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_3$ (s).

PNP7=N,N-bis-[di(metossietil)fosfinoetil]etossietilammina, (R=-OCH$_2$CH$_3$; R'=-CH$_2$CH$_2$OCH$_3$).

^{31}P{^{1}H} NMR (CDCl$_3$): -39.12 ppm (s).

^{1}H NMR 300 MHz, (CDCl$_3$): δ (ppm)= 3.54, CH$_3$OCH_2CH$_2$P, 8H (t); 3.49, NCH$_2$CH_2OCH$_2$CH$_3$, 2H (t); 3.45, NCH$_2$CH$_2$OCH_2CH$_3$, 2H (t); 3.33, CH_3OCH$_2$CH$_2$P, 12H (s); 2.70, NCH_2CH$_2$O, 2H (t); 2.55, PCH$_2$CH_2N, 4H (t); 1.78, CH$_3$OCH$_2$CH_2P, 8H (t); 1.64, PCH_2CH$_2$N, 4H (m); 1.20, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH_3, 3H (t).

^{13}C NMR (CDCl$_3$) δ (ppm)= 70.37, OCH$_2$CH$_2$P (d, J^2_{PC}=19.34 Hz); 69.01, NCH$_2$CH$_2$O (s); 66.51, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_3$ (s); 58.50, CH$_3$OCH$_2$CH$_2$P (s); 52.60, NCH$_2$CH$_2$O (s); 50.95, PCH$_2$CH$_2$N (d, J^2_{PC}=21.61 Hz); 27.97, OCH$_2$CH$_2$P (d, J^1_{PC}=13.26 Hz); 24.64, PCH$_2$CH$_2$N (d, J^2_{PC}=13.26 Hz); 15.19, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_3$ (s).

PNP10=N,N-bis-[di(metossietil)fosfinoetil]metossietilammina, (R=-OCH$_3$; R'=-CH$_2$CH$_2$OCH$_3$).

^{31}P{^{1}H} NMR (CDCl$_3$): -39.04 ppm (s).

^{1}H NMR 300 MHz, (CDCl$_3$): δ (ppm)= 3.55, CH$_3$OCH_2CH$_2$P, 8H (t); 3.48, NCH$_2$CH_2OCH$_3$, 2H (t); 3.35, NCH$_2$CH$_2$OCH_3, 3H (s); 3.33, CH_3OCH$_2$CH$_2$P, 12H (s); 2.68, NCH_2CH$_2$O, 2H (t); 2.58, PCH$_2$CH_2N 4H (t); 1.77, CH$_3$OCH$_2$CH_2P, 8H (t); 1.64, PCH_2CH$_2$N, 4H (m).

^{13}C NMR (CDCl$_3$) δ (ppm)= 70.97, NCH$_2$CH$_2$O (s); 70.36, OCH$_2$CH$_2$P (d, J^2_{PC}=19.08 Hz); 58.87, NCH$_2$CH$_2$OCH$_3$ (s); 58.50, CH$_3$OCH$_2$CH$_2$P (s); 52.50, NCH$_2$CH$_2$O (s); 50.82, PCH$_2$CH$_2$N (d, J^2_{PC}=21.70 Hz); 27.95, OCH$_2$CH$_2$P (d, J^1_{PC}=13.44 Hz); 24.62, PCH$_2$CH$_2$N (d, J^2_{PC}=13.26 Hz).

PNP43=N,N-bis-[di(metil)fosfinoetil]metossietilammina, (R=-OCH_3; R'=-CH_3).

Nota sintetica: l'aggiunta dell'alogenuro alchilico avviene alla temperatura di -78 °C.

$^{31}P\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): -52.83 ppm (s).

^1H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 3.48, $NCH_2CH_2OCH_3$, 2H (t); 3.35, $NCH_2CH_2OCH_3$, 3H (s); 2.69, NCH_2CH_2O, 2H (t); 2.64, PCH_2CH_2N, 4H, (t); 1.53, PCH_2CH_2N, 4H (m); 1.04, $(CH_3)_2P$, 12H (d, J^3_{PH}=1.88 Hz).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)= 70.95, NCH_2CH_2O (s); 58.86, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 52.50, NCH_2CH_2O (s); 50.60, PCH_2CH_2N (d, J^2_{PC}=20.15 Hz); 28.77, PCH_2CH_2N (d, J^2_{PC}=10.06 Hz); 14.02, $(CH_3)_2P$ (d, J^1_{PC}=12.37 Hz).

A3.2.2. Sintesi di N,N-bis-[di(idrossimetil)fosfinoetil]metossietilammina (PNP3OH) (Schema 3).

VI. Alchilazione con formaldeide.

Reagenti

$[H_2P(CH_2)_2]_2NCH_2CH_2OCH_3$ PM=195.18

HCHO (soluzione acquosa al 40% m/v) PM=30.03; d=1.090 g/ml

Procedimento

In un pallone in atmosfera inerte contenente N,N-bis-(2-fosfaniletil)metossietilammina (530 mg, 1.31 mmol) si aggiungono EtOH degasato (6 ml), aldeide formica (0.59 ml, 7.86 mmol, 6 equivalenti) e HCl 3M (1.5 ml). Si lascia sotto flusso di N_2 a temperatura ambiente per 3 ore sotto agitazione. A termine la soluzione è limpida ed incolore.

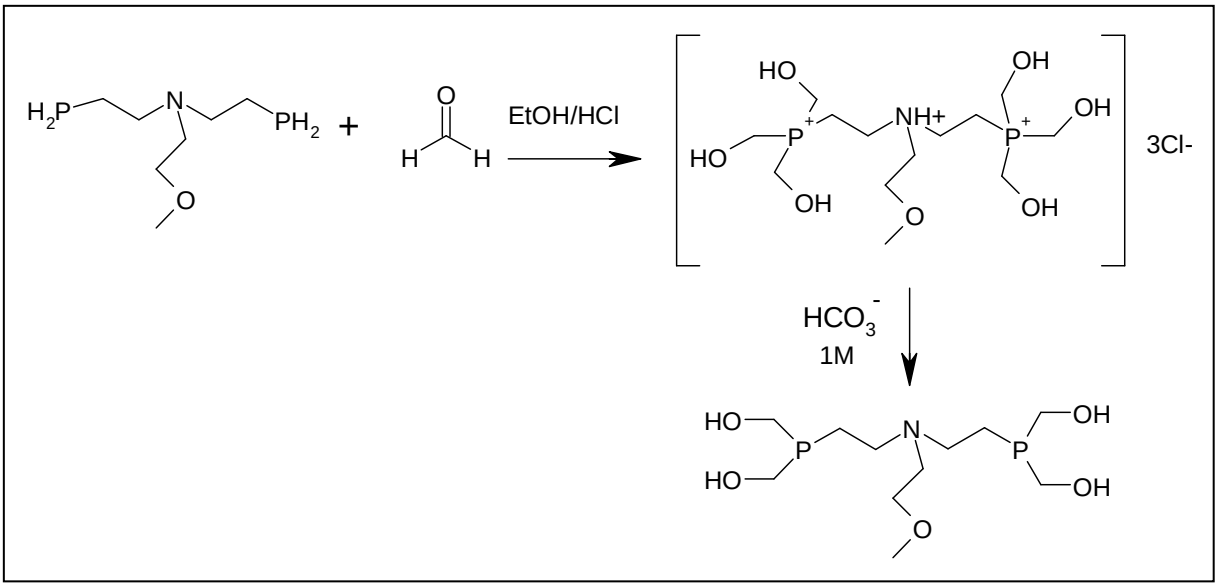
Il solvente viene eliminato con evaporatore rotante e la miscela concentrata in pompa da vuoto. Il prodotto è di colore bianco ed aspetto ceroso. Il sale di fosfonio-ammonio viene quindi convertito a fosfina con una soluzione acquosa degasata di bicarbonato di sodio 1M in atmosfera controllata.

Resa: 52%.

Caratterizzazione del sale di fosfonio

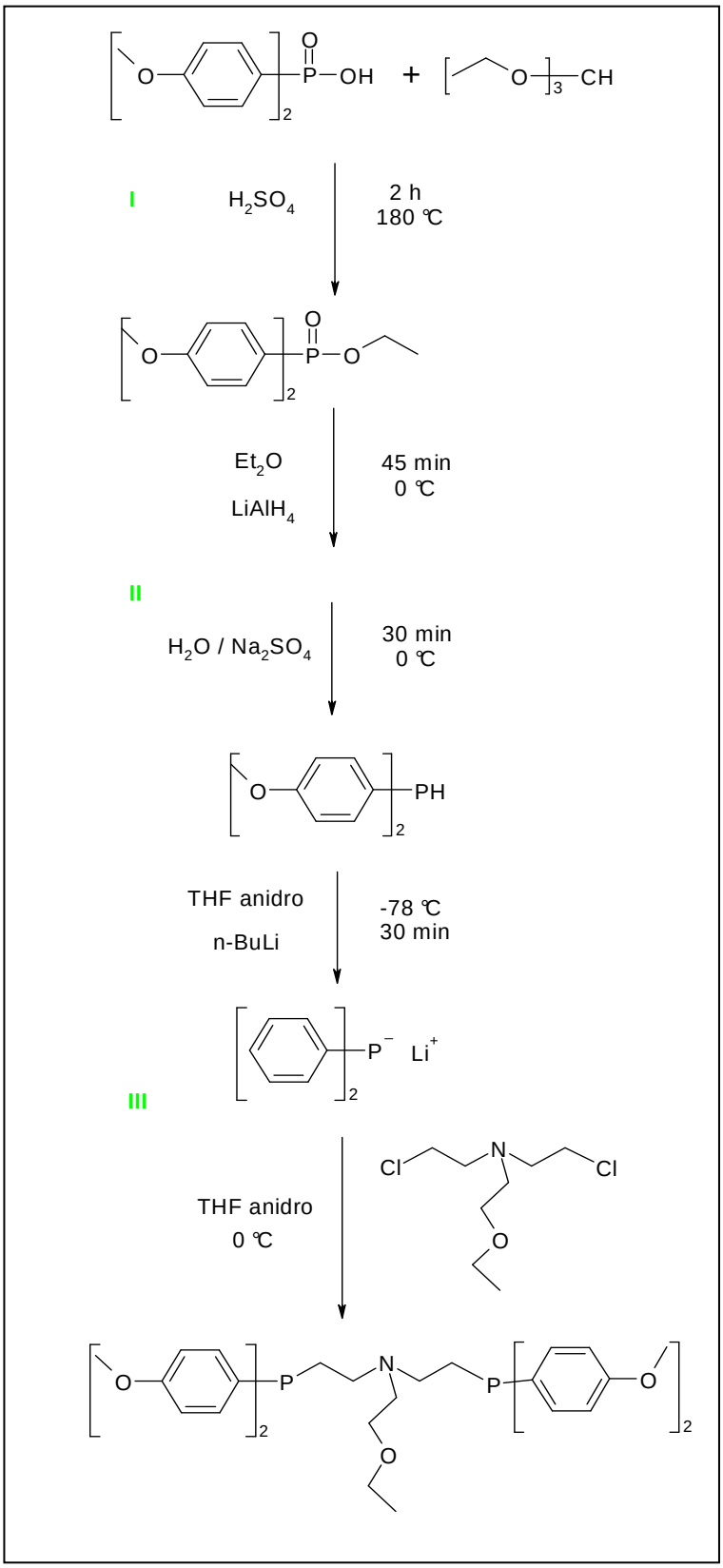
$^{31}P\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): 28.69 ppm (s).

^1H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 4.70, $(OHC\mathit{H}_2)_3P$, 12H (s); 3.67, $(PCH_2C\mathit{H}_2)_2NC\mathit{H}_2CH_2O$, 6H (m); 3.42, $NCH_2C\mathit{H}_2OCH_3$, 2H (m); 3.30, $NCH_2CH_2OC\mathit{H}_3$, 3H (s); 2.89, $PC\mathit{H}_2CH_2N$, 4H (m).



Schema 3. Sintesi del legante difosfinico PNP3OH.

A3.2.3.Sintesi di N,N-bis-[di(4-metossifenil)fosfinoetil]etossietilammina (PNP9) (Schema 4).



Schema 4. Sintesi del legante difosfinico PNP9.

I. Esterificazione dell'acido fosfinico

Reagenti

$C_{14}H_{15}O_4P$ PM=278.24

$C_7H_{16}O_3$ PM=148.2 bp=146 °C d=0.891 mg/ml

H_2SO_4

Procedimento

A 2 g (7.2 mmol) di acido bis(4-metossifenil)fosfinico, si aggiungono 20 ml di trietilortoformiato, alcuni setacci molecolari e 0.044 ml di H_2SO_4. Si porta la miscela a reflusso, a 160 °C per 2 ore sotto vigorosa agitazione. Dopo raffreddamento si filtra e si distilla in pompa da vuoto trietilortoformiato. Si ottiene un precipitato colore crema solubile in dietiletere che viene lavato con acqua e poi essiccato in pompa da vuoto.

RESA: 83%

Caratterizzazione

^{31}P {^1H} NMR ($CDCl_3$): 32.92 ppm (s).

^1H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 7.73 + 6.94, $(CH_3OC_6H_4)_2P$, 8H (2d); 4.05, P(O)O$CH_2$$CH_3$, 2 H (q); 3.83, $CH_3OC_6H_5$, 6H (s); 1.33, P(O)OCH$_2$$CH_3$, 3H (t).

Analisi elementare per $C_{16}H_{19}O_4P$ teorico: C%=62.67 ; H%=6.2; trovato: C%=62.4; H%=6.1

II. Riduzione dell'estere fosfinico

Reagenti

$C_{16}H_{19}O_4P$ PM=306.29

$LiAlH_4$ 1M in Et_2O PM=37.95 d=0.716 g/ml

Procedimento

In atmosfera di azoto si solubilizza bis(4-metossifenil) estere etilico 1 g (3.26 mmol) in Et_2O anidro (30 ml) e si mette il pallone in bagno di ghiaccio. Con una siringa a tenuta si aggiunge una soluzione di $LiAlH_4$ 1.0 M in Et_2O (7.2 ml, 7.2 mmol, 2 equivalenti). Durante l'aggiunta si osserva lo sviluppo di gas e lentamente la miscela diventa più limpida, si sente l'odore tipico delle fosfine, al termine la soluzione è limpida e giallina. Si lascia in agitazione per 45 minuti. Si anidrifica a 0 °C con una soluzione satura di Na_2SO_4 in H_2O (6 ml) degasata e con Na_2SO_4 anidro (300-500mg), infine si filtra con gooch G3 in atmosfera inerte.

Si raccoglie il filtrato lavandolo tre volte con Et_2O (10 ml), sempre in atmosfera di

diazoto. Si essicca con flusso di diazoto ed in pompa da vuoto.

Si ottiene un precipitato bianco.

Resa: 90%.

Caratterizzazione

^{31}P {^{1}H} NMR ($CDCl_3$): -43.97 ppm (s).

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 8.83, P*H*, 1H (d); 7.13, $CH_3OC_6H_4$, 8H (2d); 3.8, $CH_3OC_6H_4$, 3H (s);.

III. Alchilazione

Reagenti

$C_{14}H_{15}O_2P$ PM=246.24

$C_8H_{17}Cl_2NO$ PM=214.13

Procedimento

Al pallone contenente bis(4-metossifenil)fosfina (0.72 g, 2.92 mmol, 1 equivalente) immerso in bagno di acetone/azoto liquido a -78 °C si aggiungono 10 ml di THF anidro e mediante una siringa a tenuta si inietta n-BuLi 2.5 M in esano (1.17 ml, 2.92 mmol, 1 equivalente). La soluzione diviene arancione brillante. Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 30 minuti. In atmosfera di diazoto ed in bagno di ghiaccio si aggiunge goccia a goccia bis-N-(2-cloroetil)etossietilammina, 313 mg (1.46 mmol, 0.5 equivalenti) sciolti in 10 ml di THF anidro. La soluzione diventa giallo dorato.

Dopo 30 minuti si aggiunge H_2O degasata (5 ml) e si porta la miscela in imbuto separatore a due colli in atmosfera inerte mediante un ago flessibile per evitare il contatto con l'aria. Sempre in atmosfera di diazoto si recupera lo strato acquoso e lo si tratta per due volte con altri 20 ml di Et_2O.

Si riuniscono le fasi eteree in un unico pallone flussato e si anidrifica con Na_2SO_4 anidro, si filtra lavando il solido per tre volte con Et_2O anidro (10 ml). Si concentra con flusso di diazoto ed in pompa da vuoto. Si ottiene un prodotto oleoso giallo.

Resa: 89%.

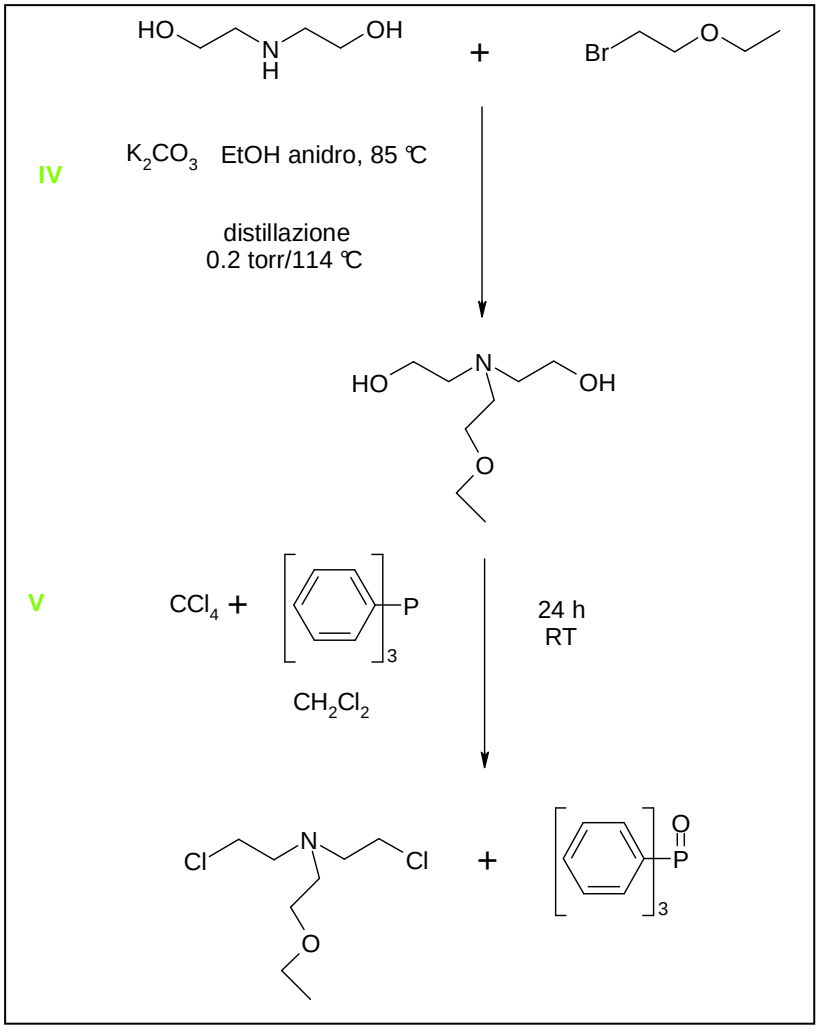
Caratterizzazione

^{31}P {^{1}H} NMR ($CDCl_3$): --22.64 ppm (s).

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 7.33 + 6.91, $CH_3OC_6H_4$, 16H (2d); 3.78,

CH$_3$OC$_6$H$_4$, 12H (s); 3.36, NCH$_2$*CH*$_2$O*CH*$_2$CH$_3$, 4H (m); 2.61, (PCH$_2$*CH*$_2$)$_2$N*CH*$_2$CH$_2$, 6H (m); 2.04, P*CH*$_2$CH$_2$N, 4H (m); 1.13, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$*CH*$_3$, 3 H (t).

^{13}C {^{1}H} 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 160.06, $CH_3OCCHCHCP$ (s); 129.54, $CH_3OCCHCHCP$ (d); 134, $CH_3OCCHCHCP$ (d); 144.10, $CH_3OCCHCHCP$ (d); 68.74 NCH$_2$*CH*$_2$OCH$_2$CH$_3$ (s); 66.41, NCH$_2$CH$_2$O*CH*$_2$CH$_3$ (s); 55.15, *CH*$_3$*O*C$_6$H$_5$ (s); 52.94, N*CH*$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_3$ (d); 50.43, PCH$_2$*CH*$_2$N (d); 25.6, P*CH*$_2$CH$_2$N (d); 15.12, NCH$_2$CH$_2$OCH$_2$*CH*$_3$ (s).



Schema 5. Sintesi di bis-N-(2-cloroetil)etossietilammina.

.

IV. Preparazione di N-(etossietil)dietanolammina (Schema 5).

Reagenti

$C_4H_{11}NO_2$	PM=105.14	bp=217 °C/ 150 mmHg	d=1.097 g/ml
C_4H_9BrO	PM=153.02	bp=149-150 °C	d=1.357 g/ml
K_2CO_3			

Procedimento

In atmosfera inerte 3.79 g (36 mmol, 1 equivalente) di dietanolammina vengono sciolti in 10 ml di EtOH anidro e si aggiungono 4.97 g (36 mmol,1 equivalente) di K_2CO_3 anidro. Si aggiungono goccia a goccia in 2 ore 6.09 ml di 2-bromoetiletiletere (8.26 g, 54 mmol, 1.5 equivalenti).

Alla fine dell'aggiunta si porta la miscela a reflusso per 36 ore.

Al termine si filtra su G3 lavando il precipitato due volte con EtOH anidro (4 ml), quindi si concentra in rotavapor a 30-40 °C ottenendo una miscela di colore giallino. Si distilla a 0.2 torr, raccogliendo N-etossietildietanolammina a 114 °C, come un liquido limpido, giallo pallido.

Caratterizzazione

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 3.58, $OHCH_2CH_2$, 4 H (t); 3.54, NCH_2CH_2O 2H (t); 3.49, $NCH_2CH_2OCH_2CH_3$ 2H (t); 2.78, NCH_2CH_2O, 2H (t); 2.74, $OHCH_2CH_2N$, 4H (t); 1.22, $NCH_2CH_2OCH_2CH_3$, 3H (t).

V. Preparazione di bis-N-(2-cloroetil)etossietilammina.

Reagenti

$C_8H_{19}NO_3$	PM=177.24	bp=114 °C / 0.2 torr	
$C_{18}H_{12}P$	PM=262.29		
CCl_4	PM=154.82	bp=76-77 °C	d=1.604 g/ml

Procedimento

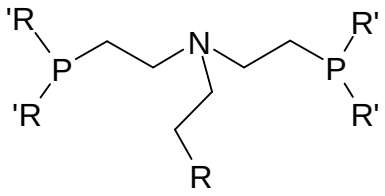
In pallone in atmosfera inerte 1.28 g (7.22 mmol, 1 equivalente) di N-(2-etossietil)dietanolammina vengono solubilizzati in 5 ml di CH_2Cl_2 anidro e, in atmosfera di N_2, si aggiunge goccia a goccia una sospensione di trifenilfosfina, 5.7 g (21.7 mmol, 3 equivalenti) e CCl_4, 8.71 ml (90.25 mmol, 12.5 equivalenti).

Si lascia 24 ore in agitazione e in atmosfera inerte. La miscela assume una colorazione arancione. Si concentra in rotavapor a 40 °C e si ottiene un solido colore arancione che si riprende con Et_2O anidro e con n-esano. Infine si concentra con N_2.

Resa: 53%

Caratterizzazione

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 3.54-3.45, $(ClCH_2CH_2)_2NCH_2CH_2OCH_2CH_3$, 4+2+2 H (3t); 2.95, $ClCH_2CH_2N$, 4H (t); 2.82, NCH_2CH_2O, 2H (t); 1.19, OCH_2CH_3, 3H (t).



Legante PNPX	**R**	**R′**	**PM**
PNP3	$-OCH_3$	$-CH_2CH_2CH_2OCH_3$	483.61
PNP3OH	$-OCH_3$	$-CH_2OH$	315.14
PNP5	$-OCH_2CH_3$	$-CH_2CH_2CH_2OCH_3$	497.64
PNP7	$-OCH_2CH_3$	$-CH_2CH_2OCH_3$	441.28
PNP9	$-OCH_2CH_3$	-Phe	633.28
PNP10	$-OCH_3$	$-CH_2CH_2OCH_3$	427.26
PNP43	$-OCH_3$	$-CH_3$	251.3

Tabella 15. Leganti PNPX sintetizzati ed utilizzati nel presente studio.

A3.3 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ [71].

I leganti amminodifosfinici, sintetizzati come descritto nella sezione precedente (Tabella 15), sono stati utilizzati con il legante ditiocarbammato DBODC N,N-(etossietil)ditiocarbammato, nella formazione di eterocomplessi dissimmetrici del tipo $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (Figura 45), applicando le strategie sintetiche di seguito riportate.

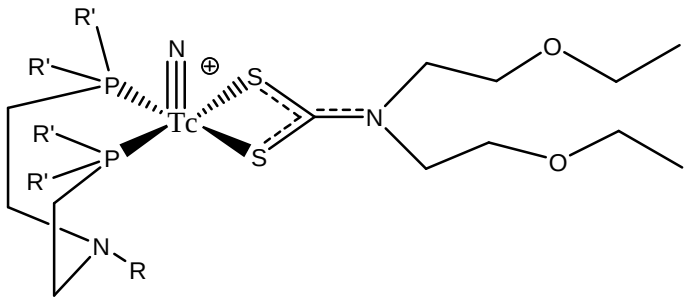


Figura 45. Complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$.

I. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (X=3,5,7,10): <u>reazione a due *steps*</u>.

In una *vial* contenente SDH (5.0 mg), EDTA (5.0 mg), $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (0.1 mg sospesi in 0.1 ml di soluzione acquosa NaCl 0.9%) ed EtOH degasato (1ml) si aggiunge $Na[^{99m}TcO_4]$ (50MBq-3GBq/0.250 ml). La miscela è incubata per 15 minuti a temperatura ambiente.
Si aggiungono quindi PNPX (1.0 mg solubilizzato in 0.1 ml di EtOH degasato) e DBODC sale sodico (2.0 mg solubilizzati in 0.2 ml di NaCl 0.9%). La miscela è incubata ad 80 °C per 20 minuti. La purezza radiochimica (RCP) del complesso finale è valutata per via cromatografica mediante TLC ed HPLC (Tabella 16).

II. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (X=3,5,7,10): <u>reazione *one pot*</u>.

In una *vial* contenente SDH (5.0 mg), EDTA (5.0 mg), $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (0.1 mg sospesi in 0.1 ml di soluzione acquosa NaCl 0.9%) ed EtOH degasato (1ml) si aggiungono in rapida successione $Na[^{99m}TcO_4]$ (50MBq-3GBq/0.250 ml), PNPX (1.0 mg sciolto in 0.1 ml di EtOH) e DBODC sale sodico (2.0 mg in 0.2 ml di soluzione fisiologica). La vial viene messa ad incubare ad 80 °C per 20 minuti. La RCP del complesso è valutata per via cromatografica

attraverso TLC e HPLC.

III. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$.

In una *vial* contenente SDH (5.0 mg), EDTA (5.0 mg), $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (0.1 mg sospesi in 0.1 ml di soluzione acquosa NaCl 0.9%) ed EtOH degasato (1ml) si aggiunge $Na[^{99m}TcO_4]$ (50MBq-3GBq/0.250 ml) e PNP9 (1.0 mg solubilizzato 0.1 ml di EtOH degasato). La miscela è incubata per 30 minuti a 80 °C.

Si aggiunge quindi DBODC sale sodico (2.0 mg solubilizzati in 0.2 ml di NaCl 0.9%) e si mantiene ad 80 °C per 20 minuti. La RCP del complesso finale è valutata per via cromatografica attraverso TLC e HPLC (Tabella 16).

PURIFICAZIONE DEI COMPLESSI $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (X=3,5,7,9,10)

La miscela di reazione contenente il complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ è diluita con 8 ml d'acqua e caricata su una SEP PAK C-18 (Waters), precedentemente lavata con 5 ml di EtOH e condizionata con 5 ml di H_2O deionizzata (circa il 90% dell'attività iniziale viene caricata). La colonna è quindi lavata in successione con H_2O (20 ml) ed EtOH 35% (5 ml).

Il complesso (per il 90% dell'attività caricata) è eluito con 1 ml di una miscela 9/1 di EtOH/NaCl 0.9% in H_2O. Dopo purificazione, la RCP dei complessi è >95%.

La soluzione idroalcolica contenente il complesso purificato prima degli studi *in vitro* ed *in vivo* viene concentrata con flusso di diazoto e diluita con soluzione acquosa di NaCl 0.9%.

IV. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$.

In una *vial* contenente SDH (5.0 mg), EDTA (5.0 mg), $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (0.1 mg) sospesi in soluzione acquosa NaCl 0.9% (1.0 ml) si aggiunge $Na[^{99m}TcO_4]$ (50MBq-3GBq/0.250 ml). La miscela è incubata per 15 minuti a temperatura ambiente.

Si aggiungono quindi PNP3OH (2.0 mg solubilizzato in tampone fosfato 0.1M pH 7.4) e DBODC sale sodico (2.0 mg solubilizzati in 0.2 ml di NaCl 0.9%). La miscela è incubata ad 80 °C per 30 minuti. La RCP del complesso finale è valutata per via cromatografica attraverso TLC e HPLC (Tabella 16).

PURIFICAZIONE DI $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$

La miscela di reazione contenente il complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$ è diluita con 8 ml d'acqua e caricata su una SEP PAK a scambio cationico (CM, Waters),

precedentemente lavata con 5 ml di H_2O deionizzata. La colonna è quindi lavata in successione con H_2O (10 ml), EtOH 35% (3 ml), EtOH 90% (1ml) e quindi eluita con una soluzione di EtOH/NBu_4Br 0.1 M 5/5 (1 ml).
Dopo purificazione, la RCP dei complessi determinata per via cromatografia è >95%.
La soluzione idroalcolica contenente il complesso purificato prima degli studi *in vitro* ed *in vivo* viene concentrata con flusso di diazoto e diluita con soluzione acquosa di NaCl 0.9%.

V. Preparazione di [$^{99m}Tc^{V}$(N)(DBODC)$_2$].

In una *vial* contenente SDH (5.0 mg), EDTA (5.0 mg), $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (0.1 mg sospesi in 0.1 ml di soluzione acquosa NaCl 0.9%) ed EtOH degasato (1ml) si aggiunge Na[$^{99m}TcO_4$] (50MBq-3GBq/0.250 ml). Dopo 30 min a RT si aggiungono DBODC sale sodico (2.0 mg sciolti in 0.2 ml di soluzione acquosa NaCl 0.9%). Dopo 30 min a 80 °C la RCP è 87%.

A3.4 CALCOLO DI Logk'$_0$.

I valori di Logk'$_0$ vengono determinati tramite HPLC tenendo come riferimento il valore di Logk'$_0$ dell'agente [^{99m}Tc]-Sestamibi, ottenuto nelle stesse condizioni.
Logk'$_0$ è estrapolato da Logk', dove k' è il fattore di capacità che misura la partizione del composto tra una fase stazionaria non polare e una fase mobile polare. I valori di Logk' vengono determinati tramite eluizioni isocratiche in HPLC, equipaggiato con precolonna a fase inversa C18 (Beckman Ultrasphere ODS, 4.6 x 45 mm) e colonna a fase inversa C18 (Beckman Ultrasphere ODS, 4.6 x 250 mm), utilizzando tampone fosfato $H_2PO_4^-$ / HPO_4^{2-} 0.02 M, pH 7.4, in MeOH a varie percentuali.
I tempi di ritenzione (t_r) dei composti vengono normalizzati rispetto al riferimento di Na[$^{99m}TcO_4$]$^-$ (non trattenuto):

$$Logk' = Log((t_r - t_0)/t_0)$$

Se la fase eluente ha una elevata percentuale di solvente organico, Logk' è funzione lineare della concentrazione di solvente organico, C:

$Logk' = a + bC$

La correlazione tra Logk' e la composizione della fase mobile permette di estrapolare il valore di Logk' corrispondente a una eluizione isocratica in assenza di solvente organico (C= 0%) ovvero $Logk'_0$:

$Logk'_0 = a$

Per ogni composto vengono effettuate almeno quattro esperimenti a differenti concentrazioni di solvente organico della fase mobile e ciascuno è ripetuto almeno tre volte. I risultati sono raccolti in Tabella 16.

A3.5 STUDI DI STABILITÀ.

A3.5.1. Studi di stabilità *in vitro*.

La stabilità dei complessi monocationici $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ è valutata incubando a 37 °C per 24 h 100 µl della soluzione del complesso purificato con 900 µl dei seguenti *media*:

a) soluzione fisiologica;
b) tampone fosfato 0.2 M, pH 7,4;
c) omogenato di fegato di ratto;
d) siero di ratto;
e) siero umano.

A tempi stabiliti (15 minuti, 1, 2, 3 e 24 h) si prelevano delle aliquote (50 µL) e si diluiscono con tampone fosfato (950 µL, 0.02 M, pH=7.4). Le preparazioni a), b), d) ed e) (100 µL), opportunamente diluite con 900 µL di tampone fosfato (0.02 M, pH 7.4), sono analizzate direttamente via HPLC. Condizioni di eluizione: precolonna Waters Symmetry 300 C4 (5 µm, 3.9 x 20 mm) e una colonna Waters Symmetry 300 C4 (5 µm, 4.6 x 150 mm), eluite con solvente A=H_2O (con 0.1 % di acido trifluoroacetico, pH 3) e solvente B=MeCN (con 0.1 % di acido trifluoroacetico), con un flusso di 1 ml/min. Metodo: 0-2 min, B=15%; 2-20 min, B=65%; 20-22 min, B=15%; 22-25 min, B=15%.

Il campione c) deve essere purificato, prima dell'analisi HPLC, tramite cartucce di estrazione OASIS HLB. Viene caricato su colonna, precedentemente lavata con 1 mL di MeOH e condizionata con 1 mL di H_2O, lavato con 3 mL di MeOH al 5% ed eluito in un'unica frazione con 1 mL di miscela di EtOH/NaCl 0.9% 90/10. Ogni singola frazione, compreso il filtro, viene contata in contatore gamma. Il 90% dell'attività iniziale viene raccolto nella frazione di eluizione che viene analizzata mediante TLC e HPLC (100 µL). La stabilità dei complessi è valutata via TLC, sia direttamente sui campioni incubati che sulla frazione purificata, senza sostanziali modifiche di resa in termini di RCP.

A3.5.2. Studi di transchelazione con L-cisteina e Glutatione.

Gli studi di stabilità cinetica dei complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ sono effettuati per incubazione a 37 °C per 24 ore di 100 µl della soluzione del complesso purificato con una miscela di tampone fosfato 0.2 M, pH 7.4 (250 µl), H_2O (100 µl) e 50 µl di L-cisteina solubilizzata in H_2O a diverse concentrazioni (10 mM, 1 mM).

Come controllo un ugual volume di acqua è aggiunto in sostituzione della soluzione di L-cisteina.

La RCP dei prodotti è valutata per via cromatografia (TLC e HPLC) a 15 minuti, 1, 2 e 24 ore.

Gli studi di transchelazione nei confronti del glutatione sono condotti applicando un protocollo analogo utilizzando 50 µl di soluzione acquosa di glutatione (10 mM).

La RCP dei prodotti è valutata per via cromatografia (TLC e HPLC) a 15 minuti, 1, 2 e 24 ore.

A3.6 STUDI DI BIODISTRIBUZIONE *EX VIVO*.

Studi di biodistribuzione dei complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ sono stati eseguiti sui prodotti purificati ed opportunamente diluiti con una soluzione fisiologica, in modo da ottenere una concentrazione di EtOH inferiore al 5% idonea all'iniezione *in vivo*.

Ratti femmine del tipo Sprague-Dawley del peso di 180-200 g vengono anestetizzati con una miscela di Zoletil (40 mg/kg) e Xilazina (2 mg/kg) somministrata per via intraperitoneale.

0.1 ml (contenenti 10 μCi) della soluzione contenente il complesso marcato e purificato sono iniettati attraverso la vena giugulare.

Gruppi di animali (n=3) sono sacrificati a tempi diversi. Immediatamente, dopo il sacrificio, sono prelevati un campione di sangue e di urine e gli organi di interesse. I campioni di tessuti, lavati e pesati sono misurati in un contatore gamma.

Come riferimento dell'attività realmente iniettata si conta l'attività di quattro soluzioni preparate al momento dell'iniezione. I valori, espressi come percentuale di attività iniettata per grammo di tessuto (%dose/g) sono ottenuti dall'applicazione della formula seguente, nella quale si tiene conto della dose realmente iniettata:

$$\%\,\text{dose/g} = \frac{(\text{cpm organo})}{(\text{cpm attivita' realmente iniettata})} \bullet \frac{1}{(\text{g del campione})} \bullet 100$$

I risultati ottenuti per i nuovi eterocomplessi sono raccolti nelle Tabelle 17, 18, 19, 20 del paragrafo A4.4 di discussione dei risultati.

A4. Risultati e discussione.

A4.1 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$.

Complessi di azoturotecnezio $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (X=3,5,7,10) sono stati preparati in alta resa seguendo due diverse strategie sintetiche.

Il primo metodo consiste in una reazione a due passaggi. Nella prima tappa, che avviene a temperatura ambiente, $SnCl_2$, agente riducente, e succinildiidrazide, SDH, donatore di gruppi azoturo, convertono $[^{99m}Tc^{VII}O_4]^{-}$ in una miscela di complessi contenenti il *core* $[^{99m}Tc^{V}(N)]^{2+}$. Studi precedentemente condotti sulla scelta del riducente più indicato hanno dimostrato che il cloruro di stagno (II) è il migliore in termini di solubilità in acqua, bassa tossicità ed elevata efficienza di riduzione, anche a temperatura ambiente, e che la diidrazide succinica, idrosolubile e poco tossica, è il migliore donatore di N^{3-}, a temperatura ambiente. Nel secondo passaggio, questa miscela di intermedi viene trasformata nell'eterocomplesso finale a seguito dell'aggiunta in rapida successione dei due leganti polidentati. La reazione giunge a completezza dopo 20 minuti di riscaldamento a 80 °C.

La presenza dell'acido etilendiamminotetraactico (EDTA) ha la funzione di complessare gli ioni Sn(II) sottraendone l'eccesso dall'ambiente di reazione, senza però ridurne il potenziale riducente. In questo modo viene mantenuta l'integrità del legante DBODC che potrebbe reagire con Sn(II) a formare complessi neutri del tipo $[Sn(DBODC)_2]$.

Il secondo metodo di sintesi, che avviene in un unico passaggio (*one pot*), prevede l'aggiunta di $[^{99m}Tc^{VII}O_4]^{-}$, PNPX e DBODC in rapida successione alla miscela idroalcolica di reazione contenente l'agente riducente, Sn(II), il donatore del gruppo azoturo, SDH, ed il complessante per gli ioni Sn^{2+}, EDTA. La miscela viene quindi incubata per 20 minuti di riscaldamento a 80 °C.

Dei complessi monocationici, ottenuti con i due metodi, si sono valutate la resa radiochimica e le proprietà cromatografiche tramite TLC ed HPLC (Tabella 16).

Tali studi hanno evidenziato come il complesso finale $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ (X=3,5,7,10) si ottenga, in alta resa, indipendentemente dalla strategia sintetica seguita.

La scoperta che la formazione dell'eterocomplesso avviene anche in una reazione costituita da un unico passaggio indica che la formazione del *core* $[^{99m}Tc^{V}(N)]^{2+}$ è seguita istantaneamente dalla sua coordinazione da parte del legante amminodifosfinico nella formazione del frammento metallico $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNPX)]^{2+}$.

PNP riveste dunque un ruolo essenziale nella stabilizzazione del *core* azoturo, promuovendone la reattività nella formazione del complesso misto finale. La formazione di orbitali molecolari di tipo π nel legame tra gli atomi di P(III) ed il metallo consente, infatti, mediante il fenomeno della retrodonazione π, di compensare il trasferimento di carica negativa dal legante (doppietto solitario degli atomi di P(III)) al metallo causato dalla formazione dei legami σ, stabilizzando lo stato di ossidazione del metallo. Una volta formato il frammento metallico, il fenomeno della retrodonazione π ne esalta il carattere elettrofilo e promuove la reattività di $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ verso specie nucleofile come ditiocarbammati.

Dal punto di vista della possibile applicazione clinica di tali agenti, la reazione *one pot*, riducendo i tempi di reazione, è molto interessante.

La formazione della specie disostituita "simmetrica" $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)_2]$ non si è mai ottenuta nelle condizioni di reazione sopra riportate ed è possibile solo quando DBODC è presente in forte eccesso ed è aggiunto in largo anticipo rispetto a PNP.

Diverse condizioni di reazione non hanno permesso di raggiungere un'ulteriore ottimizzazione in termini di resa e di tempi di reazione.

Nella preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$ l'uso del legante difosfinico PNP3OH, caratterizzato dalla presenza di quattro gruppi $-CH_2OH$ associati all'atomo di fosforo (III), determina un notevole aumento delle caratteristiche di solubilità del complesso in acqua tanto che la sintesi di questo è condotta, seguendo la procedura a due passaggi, in ambiente completamente acquoso, anziché idroalcolico, ed il legante PNP3OH viene solubilizzato in tampone fosfato 0.1M, pH 7.4.

Nella preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$ è stato necessario utilizzare una via di sintesi alternativa, che prevede in un primo passaggio la formazione del frammento metallico $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP9)]^{2+}$, ottenuto dopo 30 minuti a 80 °C, per aggiunta di $[^{99m}TcO_4]^{-}$ e di PNP9 alla miscela idroalcolica contenente il riducente, $SnCl_2$, il donatore del gruppo azoturo, SDH, ed EDTA. Nel secondo passaggio la reazione è completata per aggiunta di DBODC ed incubazione 20 minuti ad 80 °C. Se nella sintesi di questo complesso vengono

applicate la procedura a due *step*s oppure quella *one pot*, utilizzate per la formazione degli analoghi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DTC)(PNP)]^{+}$, si osserva che la specie cineticamente e termodinamicamente favorita è rappresentata dal complesso disostituito "simmetrico" $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)_2]$ e non da quello dissimetrico $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$. E' molto probabile che questa diversa cinetica sia dovuta sia a ragioni di ingombro sterico che di elettronegatività del legante PNP9, i cui due sostituenti p-metossifenilici su ciascuno dei due atomi di fosforo ne riducono le capacità π-accettrici, tipiche di questi leganti, e rendono PNP9 un legante più efficace σ-donatore. Questa caratteristica diminuisce la cinetica di formazione del frammento metallico la cui formazione necessita di tempi più lunghi, rispetto a quelli osservati per le altre amminodifosfine, per le quali è praticamente istantanea.

A4.2 CALCOLO DI Logk'$_0$.

I valori di Logk'$_0$ dei complessi, come misura relativa di lipofilia, sono stati calcolati tramite HPLC in fase inversa e confrontati con i valori di Logk'$_0$, ottenuto nelle stesse condizioni, dell'agente perfusivo cardiaco [^{99m}Tc]-Sestamibi (Tabella 16).

La partizione tra fase mobile acquosa/organica e fase inversa stazionaria HPLC non polare (spesso C18) legata ad un supporto inerte può essere usata come misura diretta della lipofilia. Composti chimici iniettati in questo tipo di colonna si muovono lungo la colonna ripartendosi tra il solvente e la fase stazionaria ed eluiscono in base alla loro idrofobicità (soluti più idrofobici esibiranno più lunghi tempi di ritenzione) [72-74].

Sperimentalmente si osserva che la variazione delle catene alcossi-alchiliche legate agli atomi di azoto e di fosforo determinano la modificazione dei valori di Logk'$_0$ dei complessi. In particolare, è interessante notare che l'allungamento con un metile della catena legata all'azoto, passando, ad esempio, da PNP3 a PNP5, sembra incidere maggiormente sull'aumento di Logk'$_0$ rispetto all'allungamento di un metile delle quattro catene ai fosfori, passando ad esempio da PNP10 a PNP3. I complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$ e $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$ presentano valori di Logk'$_0$ che sono rispettivamente il minore ed il maggiore della serie $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$.

Complesso	R_F		R_t	RCY	Logk'$_0$	LogP
	C18	SiO_2	[min]	[%]		
$[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$	0.76		[a]8.18 [b]18.32	58	1.10	
$[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7)]^{+}$	0.55	0.61	[a]14.90	79	3.38	1.26
$[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$	0.34	0.81	[a]59.95 [c]13.80	87	4.73	3.02
$[^{99m}Tc^{V}(N)(XY)(PNP9)]^{0/+}$	0.39, 0.49, 0.58	0.33, 0.71, 0.83	[a]5.200, 6.166, 14.716*	72*		
$[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP10)]^{+}$	0.57	0.59	[a]11.90	81	3.25	0.88
$[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]^{+}$	0.43	0.78	[a]16.06; [b]31.06	95	3.35	1.18
$[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$	0.61	0.79	[a]18.13	93	3.68	1.61
$[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)_2]$	0.34	0.90	[a]11.63	87		
$[^{99m}Tc]$-Sestamibi			[a]9.15		3.22	0.87
$[^{99m}Tc]$-Teboroxime						1.75
$[^{99m}Tc]$-Tetrofosmin						1.34

Tabella 16. Valori cromatografici TLC ed HPLC.

TLC: C_{18} sal/MeOH/THF/HAc_g 2/8/1/1
SiO_2 EtOH/$CHCl_3$/Tol/NH_4Ac 0.5 M 5/3/3/1

HPLC: a solventi A=tampone fosfato 0.02 M pH=7.4; B=MeOH, isocratica: A/B= 20:80. Flusso 1 ml/min, per 30 min;
b solventi A = NH_4Ac 0.05 M; B = CH_3CN, gradiente: 0–5 min, B=20%; 5-15 min, B=40%; 15-20 min, B=90%; 20-30 min, B=90%; 30-33 min, B=20%; 33-35 B=20%. Flusso 1 ml/min;
c solventi A = 0,1%TFA H_2O, B = 0,1% TFA MeCN, gradiente: 0-8 min, B=50%; 8-20 min B=100%. Flusso 0,9 ml/min

A4.3 STUDI DI STABILITÀ.

I complessi [$^{99m}Tc^{V}$(N)(DBODC)(PNPX)]$^{+}$, analizzati in soluzione fisiologica e in tampone fosfato 0.2 M, pH 7,4, risultano stabili.

I tracciati cromatografici ottenuti incubando i complessi a 37 °C in presenza di omogenato di fegato di ratto, siero di ratto, siero umano e, per confronto, con soluzione fisiologica, non rivelano alcuna variazione della purezza radiochimica dei complessi. In particolare, non si osserva la formazione di specie più idrofiliche, dovute ad una possibile metabolizzazione da parte di enzimi serici o epatici.

In presenza di un eccesso di glutatione (10 mM) o di L-cisteina (10 mM), essi non mostrano alcun segno di transchelazione, anche dopo 24 h di incubazione a 37 °C, risultando stabili ed inerti verso la sostituzione.

Questi complessi presentano quindi una grande stabilità termodinamica e una grande inerzia chimica.

A4.4 STUDI DI BIODISTRIBUZIONE *EX VIVO*.

Gli studi di biodistribuzione di composti monocationici dissimmetrici disostituiti sono stati condotti su femmine di ratti Sprague Dawley e in accordo alle vigenti leggi internazionali per la conduzione di esperimenti sugli animali. La procedura di purificazione esposta nel paragrafo A3.3, permette di ottenere il complesso puro in soluzione fisiologica, rispondente ai criteri per l'iniettabilità.

La purezza radiochimica e la stabilità dei radiocomposti vengono verificate mediante HPLC prima della somministrazione *in vivo* e nelle 24 h successive all'iniezione, al fine di garantire una purezza del composto marcato iniettato superiore al 90%.

I risultati biodistributivi ottenuti per i complessi [$^{99m}Tc^{V}$(N)(DBODC)(PNPX)]$^{+}$ (X=7, 10, 3OH, 9) sono riportati nelle Tabelle 17, 18, 19, 20.

	2min	10min	30min	60min
Sangue	0.29 ±0.04	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Cuore	3.12 ±0.39	3.45 ± 0.04	3.57 ± 0.21	3.31 ± 0.12
Polmoni	1.48 ± 0.24	1.26 ± 0.47	0.76 ± 0.07	0.63 ± 0.15
Fegato	2.58 ± 0.36	1.39 ± 0.33	0.50 ± 0.12	0.18 ± 0.01
Milza	4.22 ± 0.84	2.64 ± 0.15	1.77 ± 0.13	1.04 ± 0.18
Reni	15.65 ± 1.60	10.56 ± 2.11	7.32 ± 0.04	4.77 ± 0.43
Stomaco	0.98 ± 0.12	1.91 ± 1.72	1.21 ± 0.49	1.48 ± 0.63
Intestino tenue	2.89 ± 0.47	3.92 ± 0.75	5.56 ± 0.41	5.10 ± 0.24
Intestino crasso	0.62 ± 0.06	0.76 ± 0.20	0.70 ± 0.12	0.64 ± 0.09
Carcassa	0.20 ± 0.00	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01

Tabella 17. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7)]^{+}$ (in 3 ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).

	2min	10min	30min	60min
Sangue	0.35 ± 0.06	0.05 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Cuore	3.45 ± 0.31	3.50 ± 0.18	3.61 ± 0.26	3.33 ± 0.13
Polmoni	1.25 ± 0.13	0.96 ± 0.18	0.71 ± 0.06	0.54 ± 0.02
Fegato	2.14 ± 0.12	0.90 ± 0.31	0.40 ± 0.07	0.18 ± 0.03
Milza	3.06 ± 0.27	2.28 ± 0.45	1.66 ± 0.11	0.93 ± 0.03
Reni	16.15 ± 0.74	8.09 ± 0.55	6.37 ± 0.19	4.75 ± 0.50
Stomaco	0.93 ± 0.10	1.84 ± 0.85	2.67 ± 0.46	3.77 ± 0.80
Intestino tenue	3.22 ± 0.13	4.41 ± 0.63	5.83 ± 0.36	5.79 ± 0.25
Intestino crasso	0.61 ± 0.04	0.75 ± 0.01	0.84 ± 0.10	0.73 ± 0.11
Carcassa	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.02

Tabella 18. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP10)]^{+}$ (in 3 ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).

	2min	10min	30min	60min
Sangue	1.06 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Cuore	0.30 ± 0.04	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01
Polmoni	0.69 ± 0.04	0.21 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.05
Fegato	4.35 ± 0.36	1.39 ± 0.45	0.75 ± 0.14	0.89 ± 0.16
Reni	3.30 ± 0.53	1.33 ± 0.07	0.64 ± 0.02	0.99 ± 0.16
Intestino	16.63 ± 0.47	13.94 ± 3.81	30.05 ± 0.32	33.16 ± 0.67
Urine		39.58 ± 0.16	17.91 ± 1.41	19.09 ± 6.83
Carcassa	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.02

Tabella 19. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$ (in 3 ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).

	2min	10min	30min	60min
Sangue	2.06 ± 0.25	0.39 ± 0.04	0.30 ± 0.11	0.19 ± 0.05
Cuore	0.52 ± 0.07	0.35 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.28 ± 0.04
Polmoni	3.84 ± 0.97	3.10 ± 0.19	2.75 ± 0.40	2.23 ± 0.14
Fegato	9.96 ± 0.78	11.93 ± 0.88	12.34 ± 0.86	12.46 ± 0.49
Milza	7.53 ± 1.49	9.85 ± 1.21	9.01 ± 0.62	10.14 ± 0.56
Reni	1.13 ± 0.08	1.27 ± 0.06	1.27 ± 0.23	1.17 ± 0.24
Stomaco	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.08	0.36 ± 0.23
Intestino tenue	0.27 ± 0.02	0.49 ± 0.05	0.63 ± 0.08	0.86 ± 0.08
Intestino crasso	0.08 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
Carcassa	0.11 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01

Tabella 20. Biodistribuzione in ratti del complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$ (in 3 ratti, risultati espressi come %dose/g, media ± SD).

I complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ con X=7,10 presentano una elevata e persistente captazione cardiaca, superiore a quella ottenuta con i complessi analoghi di riferimento con X=3,5 e con [^{99m}Tc]-Sestamibi, [^{99m}Tc]-Tetrofosmin e [^{99m}Tc]-Teboroxime a 60 minuti (Grafico 3).

I valori di attività cardiaca raccolti a tempi brevi dalla somministrazione, come 2 minuti, rappresentano una buona approssimazione dell'indice di estrazione coronarico di primo passaggio. A tale proposito il complesso neutro e lipofilico [^{99m}Tc]-Teboroxime, per l'elevato *first pass* cardiaco (~88-91%), è scelto come composto di riferimento. L'accumulo di questo tracciante nel tessuto miocadico a 2 min è infatti di 5,21 %ID/g.

Una sostanziale variazione della captazione cardiaca iniziale risulta dipendente dalla natura del legante PNP. Infatti, essa diminuisce drasticamente e va incontro a *washout* sia in seguito alla somministrazione del complesso più idrofilico della serie, $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$, sia del complesso più lipofilico $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$.

A titolo comparativo sono riportati i dati riguardanti i complessi tecneziati attualmente in uso clinico (compreso [^{99m}Tc]-Teboroxime).

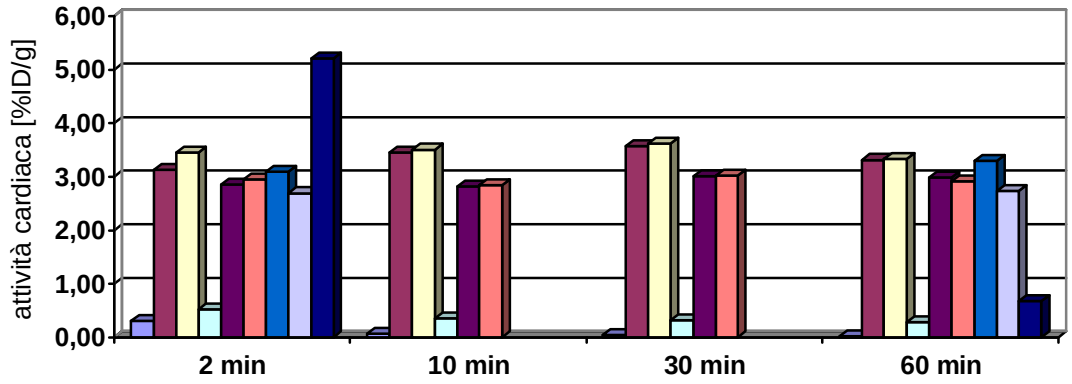


Grafico 3. Confronto di attività cardiaca in ratti Sprague Dawley femmine di complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$, in funzione del tempo: ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP10)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$; ■ [^{99m}Tc]-Sestamibi; ■ [^{99m}Tc]-Tetrofosmin e ■ [^{99m}Tc]-Teboroxime.

I complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ con X = 7, 10, 3OH mostrano una captazione polmonare bassa che si mantiene durante il periodo di osservazione, evidenziando una lenta cinetica di eliminazione (Grafico 4).

Rispetto ai riferimenti, l'*uptake* polmonare è lievemente più elevato e persistente e solo il più idrofilico della serie, $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$, ha una captazione minore.
I valori più alti si hanno per $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$, il più lipofilico tra i complessi in studio, per il quale l'eliminazione è estremamente lenta.

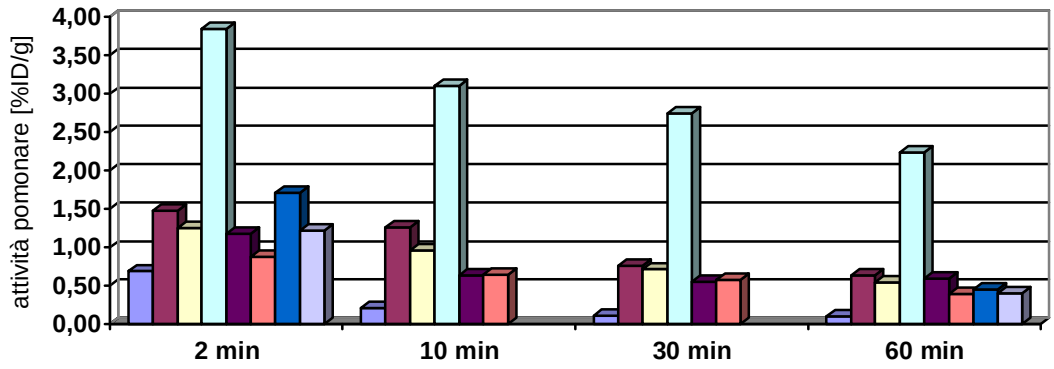


Grafico 4. Confronto di attività polmonare in ratti Sprague Dawley femmine di complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$, in funzione del tempo: ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP10)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$; ■ [^{99m}Tc]-Sestamibi e ■ [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

La *clearance* ematica è per tutti molto rapida ed il complesso che permane più a lungo in circolo è quello con la difosfina PNP9 (Grafico 5).

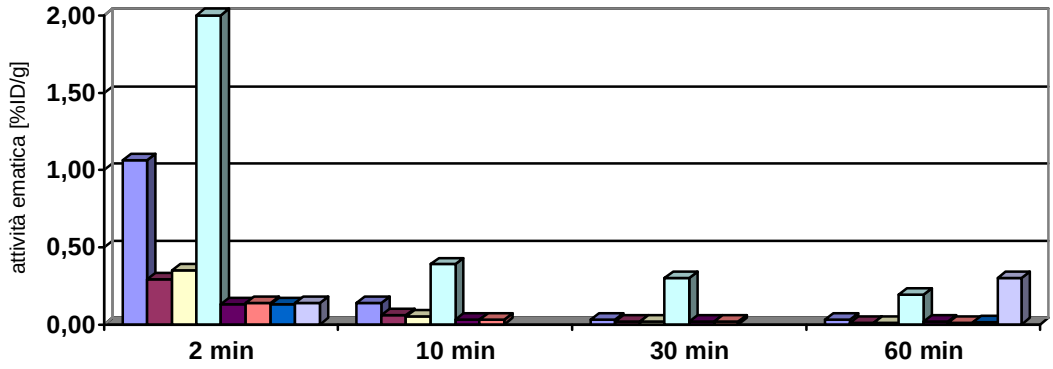


Grafico 5. Confronto di attività ematica in ratti Sprague Dawley femmine di complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$, in funzione del tempo: ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP10)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]^{+}$; ■ $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$; ■ [^{99m}Tc]-Sestamibi e ■ [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

Per $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$ con X = 7, 10, 3OH la captazione epatica è rapida e transitoria e l'eliminazione da questo organo è veloce e quantitativa.

Per X=7,10 l'*uptake* epatico è leggermente superiore a quello ottenuto per X=3 ed è paragonabile a quello con X=5, rimane comunque molto inferiore a quello riportato per [^{99m}Tc]-Sestamibi e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin (Grafico 6).

Dopo eliminazione, l'attività si ritrova nel lume intestinale.

Solo per il composto più lipofilico, [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]$^{+}$, la captazione epatica è molto elevata e duratura, mantenendosi a 12.46 ± 0.49 %ID/g dopo 60 minuti.

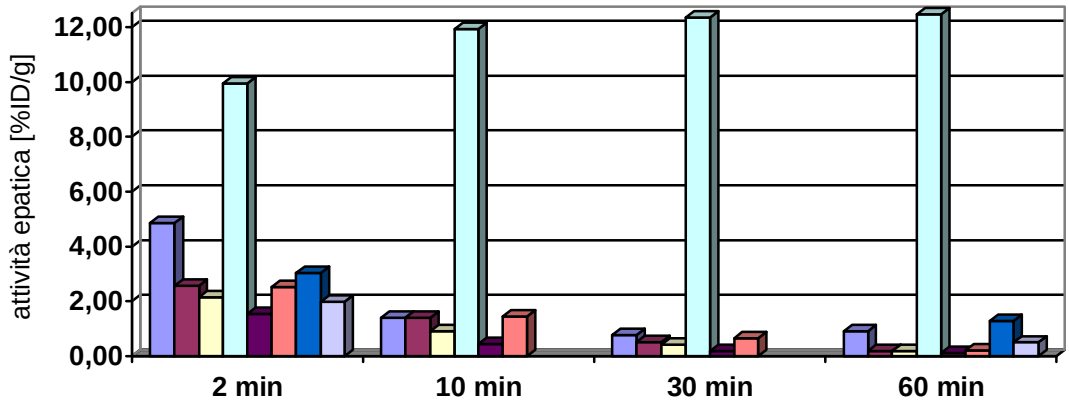


Grafico 6. Confronto di attività epatica in ratti Sprague Dawley femmine di complessi [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]$^{+}$, in funzione del tempo: [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]$^{+}$; [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7)]$^{+}$; [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP10)]$^{+}$; [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]$^{+}$; [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]$^{+}$; [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]$^{+}$; [^{99m}Tc]-Sestamibi e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

Le differenze del comportamento biodistributivo sono correlate ai diversi sostituenti sugli atomi di azoto e di fosforo del legante PNP. Tali sostituenti, per problemi di tipo sintetico (si veda il paragrafo A3.2 della Sezione A), sono tutti e quattro uguali tra loro ma possono essere diversi da quello dell'azoto.

I rapporti cuore/fegato di [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7,10)]$^{+}$ appaiono molto favorevoli se paragonati con quelli riportati per i traccianti attualmente in commercio [^{99m}Tc]-Sestamibi, e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin e per [^{99m}Tc]-Teboroxime, ma leggermente peggiorati rispetto ai complessi di azoturotecnezio di riferimento [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]$^{+}$ e [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]$^{+}$.

Tali rapporti sono invece molto bassi per [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]$^{+}$, il più idrofilico della serie, a causa di un bassissimo *uptake* cardiaco e per [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]$^{+}$, il più lipofilico, a causa di un'alta captazione epatica (Grafico 7).

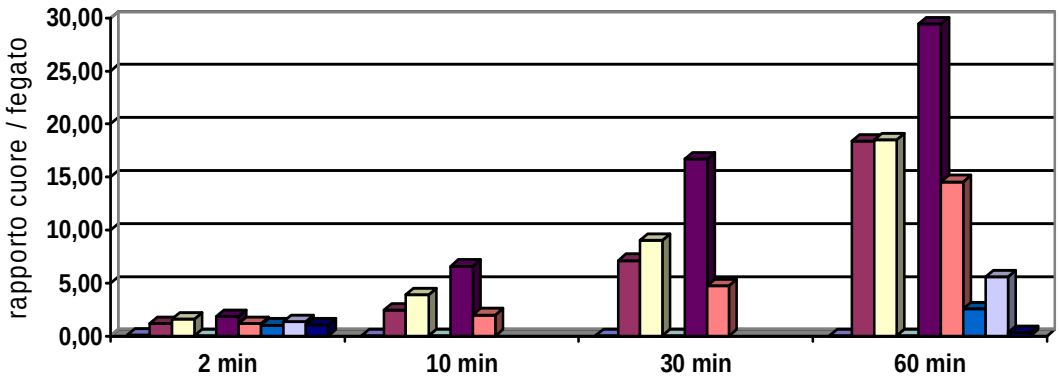


Grafico 7. Confronto di rapporti cuore/fegato in ratti Sprague Dawley femmine di complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$, in funzione del tempo: $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP10)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$; $[^{99m}Tc]$-Sestamibi; $[^{99m}Tc]$-Tetrofosmin e $[^{99m}Tc]$-Teboroxime.

A causa di una più elevata captazione polmonare, i rapporti cuore/polmone (Grafico 8) per $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7,10)]^{+}$ sono leggermente meno favorevoli rispetto a $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3,5)]^{+}$, ma molto maggiori di $[^{99m}Tc]$-Sestamibi, $[^{99m}Tc]$-Tetrofosmin e $[^{99m}Tc]$-Teboroxime. Per $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH,9)]^{+}$ tali rapporti sono peggiorati e valgono le considerazioni esposte sopra.

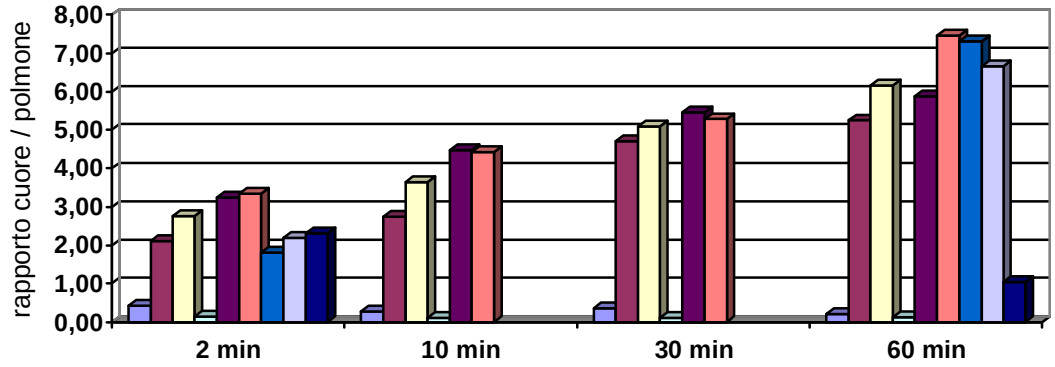


Grafico 8. Confronto di rapporti cuore/polmone in ratti Sprague Dawley femmine di complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]^{+}$, in funzione del tempo: $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP7)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP10)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP9)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3)]^{+}$; $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP5)]^{+}$; $[^{99m}Tc]$-Sestamibi; $[^{99m}Tc]$-Tetrofosmin e $[^{99m}Tc]$-Teboroxime.

L'estrazione ematica dell'attività effettuata dal fegato per $[^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3,5,7,10)]^{+}$, rapida e quantitativa, a favore di un accumulo finale a livello intestinale, è

il fattore chiave nella determinazione dei buoni rapporti cuore/fegato e cuore/polmone di questi composti. Mentre l'attività epatica, infatti, si riduce direttamente, aumentando il rapporto cuore/fegato, di converso l'attività a livello polmonare beneficia di riflesso di tale riduzione, non potendo aumentare a causa della diminuzione dell'attività circolante e mantenendo il rapporto cuore/polmoni a livelli bassi, fissati dalla rapida captazione iniziale e dalla lenta retrodiffusione al sangue.

A5. Conclusioni.

Nella prima Sezione di questo lavoro di tesi si è valutata la possibilità di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche, in particolare l'indice di estrazione coronarico di primo passaggio, del radiocomplesso [^{99m}Tc(N)]-DBODC5, le cui potenzialità sono state recentemente confermate anche da studi su volontari sani.

Recenti studi di metabolizzazione *in vivo* hanno dimostrato che il profilo farmacocinetico di tale agente di perfusione è correlato alle proprietà intrinseche della molecola, quali lipofilia, forma e carica elettronica. In particolare, indagini condotte sulla distribuzione subcellulare del complesso monocationico hanno dimostrato che, mentre lipofilia e forma della molecola modulano la diffusione attraverso le membrane biologiche, la carica positiva conferisce il carattere di persistenza nel tessuto miocardico, fissandosi il complesso alle strutture mitocondriali.

Nei complessi del tipo [^{99m}Tc^{V}(N)(DTC)(PNPX)]$^{+}$ il *core* azoturo è coordinato da due tipi di leganti polidentati: uno amminodifosfinico ed uno ditiocarbammico. Questo offre la possibilità di introdurre delle variazioni distintamente solo ad uno dei due diversi leganti, modulando così molto puntualmente il bilancio idro-lipofilico del radiocomplesso attraverso modifiche dei sostituenti all'azoto di DTC, oppure ai quattro atomi di fosforo o all'azoto di PNP. Quest'ultima possibilità è stata indagata mediante la sintesi di leganti PNPX (X = 3, 3OH, 7, 9, 10) con diversa lipofilia, applicando un metodo recentemente brevettato nei laboratori dove ho svolto il dottorato di ricerca [70]. Le amminodifosfine sono state utilizzate nella coordinazione del *core* azoturo, mantenendo inalterato il ditiocarbammato DBODC, per formare complessi monocationici, dissimmetrici e stabili del tipo [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNPX)]$^{+}$ caratterizzati da un diverso grado di lipofilia. Tali composti sono stati ottenuti in alta resa seguendo una via di sintesi semplificata (con l'eccezione di X=9), costituita da un unico passaggio, in cui la miscela di tutti i reagenti (il riducente, il donatore del *core* azoturo e i due diversi leganti polidentati) è messa ad incubare con il pertecnetato sodico eluito da generatore. Tale scoperta ha un importante risvolto nel potenziale utilizzo di tali complessi nella pratica clinica.

La possibile applicazione come agenti per scintigrafia perfusionale miocardica è stata indagata in modello di ratto. In particolare, il complesso [^{99m}Tc^{V}(N)(DBODC)(PNP3OH)]$^{+}$,

il più idrofilico della serie, e [$^{99m}Tc^{V}$(N)(DBODC)(PNP9)]$^{+}$, il più lipofilico, presentano una bassa captazione cardiaca cui segue *washout* e bassi valori dei rapporti cuore/fegato e cuore/polmone.

Gli eterocomplessi [$^{99m}Tc^{V}$(N)(DBODC)(PNP7)]$^{+}$ e [$^{99m}Tc^{V}$(N)(DBODC)(PNP10)]$^{+}$, di lipofilia intermedia, presentano, invece, una captazione cardiaca più rapida ed elevata rispetto agli agenti di riferimento con PNP3 e PNP5, ed a quelli attualmente in commercio. Questi risultati evidenziano la facilità con cui questi traccianti attraversano le membrane e si distribuiscono nei tessuti altamente irrorati come cuore, polmoni, fegato e reni. Per questi nuovi traccianti, i rapporti cuore/fegato e cuore/polmone risultano leggermente inferiori rispetto ai complessi con PNP3 e PNP5 riducendo, *in vivo*, la nitidezza dell'immagine scintigrafica. Tali valori si mantengono comunque nettamente superiori a quelli dei traccianti tecneziati monocationici attualmente in commercio, [^{99m}Tc]-Sestamibi e [^{99m}Tc]-Tetrofosmin.

Questo studio dimostra come la variazione delle funzionalizzazioni del legante amminodifosfinico determini una variazione delle caratteristiche chimico-fisiche e quindi biodistributive di traccianti per scintigrafia miocardica perfusionale del tipo [$^{99m}Tc^{V}$(N)(DTC)(PNP)]$^{+}$.

A6. Riferimenti bibliografici.

[1] S. Liu, "The role of coordination chemistry in the development of target specific radiopharmaceuticals", *Chem. Soc. Rev.*, **2004,** 33, 455-461.

[2] K. Schowochau, V. Plager, *Radiochimica Acta.*, **1993**, 63, 100.

[3] B. Wilcox, D. Ho, E. Deutsch, *Inorg. Chem.*, **1989**, 28, 1743.

[4] M. J. Abrams, A. Davison, A. G. Jones, C. E. Costello, H. Pang, *Inorg. Chem.*, **1983**, 22, 2798-2800.

[5] J. L. Vanderheyden, *J. Nucl. Med.*, **1983**, 24, 9.

[6] G. Bandoli, A. Dolmella, M. Porchia, F. Refosco, F. Tisato, *J. Coord. Chem Rev.*, **2001**, 214, 43-90.

[7] R. Alberto., R. Schibli, R. Waibel, U. Abram, A.P. Schubiger, "Basic aqueous chemistry of $[M(OH_2)_3(CO)_3]^+$ (M=Re, Tc) direct towards radiopharmaceutical application", *Coord. Chem. Rev.*, **1999,** 190-192, 901-919.

[8] K. Lisbon, E. Deutsch, D. L. Barnett, "Structural Characterization of a ^{99}Tc-Diphosphonate Complex. Implications for the Chemistry of ^{99m}Tc Skeletal Imaging Agents", *J. A. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 2476-2478.

[9] B. Johannsen, M. Scheunemann, H. Spies, P. Brust, J. Wober, R. Shyre, H. Pietzsch., *J. Nucl. Med. Biol.*, **1996**, 23, 429.

[10] R. D. Peacock, Comprehensive Inorganic Chemistry., *ed. Permagon Press,* Oxford**,** **1973**, 3, 877-903.

[11] A. Boschi, A. Duatti, L. Uccelli "Development of Technetium-99m and Rhenium-188 Radiopharmaceuticals Containing a Terminal Metal-Nitrido Multiple Bond for Diagnosis and Therapy", *Cur. Top. in Med. Chem.*, **2005**,252, 85-115.

[12] G. E. Boyd., *J. Chem. Educ.*, **1959,** 3, 36.

[13] T. Nicholson, N. de Vries, A. Davison, A. G. Jones, *Inorg Chem.*, **1989,** 28, 3813-3819.

[14] T.Nicholson, *Technetium, Rhenium and Other Metals in Chemistry and Nuclear Medicine*, 7, **2006**, SGE Editoriali.

[15] T. Nicholson, *Inorg. Chim. Acta,* **2006**, 359, 1296-1298.

[16] M.J. Abrams, M. Juweid, C.I. TenKate, D.A. Schwartz, M.M. Hauser, F. Gaul, A.J. Fuccello, R.H. Rubin, H.W. Strauss, A.J. Fischmann, *J. Nucl. Med.*, **1990**, 31**,** 2022.

[17] G. J. Kemerink, X. Liu, D. Kieffer, S. Ceyssens, L. Mortelmans,A. M. Verbruggen, N. Steinmetz, A. Green and K. Verbeke,*J. Nucl. Med.*, **2003**, 44, 947.

[18] J. W. Babich, H. Solomon, M. C. Pike, D. Kroon, W. Graham, M. J. Abrams, R. G. Tompkins, R. H. Rubin and A. J. Fischman, *J. Nucl. Med.*, **1993**, 34, 967.

[19] J. W. Babich, W. G. Coco, S. A. Barrow, A. J. Fischman,F. J. Femia and J. Zibieta, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 309, 123.

[20] C. Decristoforo, S. J. Mather, *Eur. J. Nucl. Med.*, **1999**, 26, 869.

[21] M. Bangard, M. Be´he´, S. Guhlke, R. Otte, H. Bender,H. R. Maecke and H. J. Birsack, *Eur. J. Nucl. Med.*, **2000**, 27, 628.

[22] P. Laverman, E. Th. M. Dams, W. J. G. Oyen, G. Storm, E. B. Koenders, R. Prevost, J. W. M. van der Meer, F. H. M. Corstens and O. C. Boerman, *J. Nucl. Med.*, **1999**, 40, 192.

[23] Y. M. Zhang, N. Liu, Z. H. Zhu, M. Rusckowski and D. Hnatowich, *Eur. J. Nucl. Med.*, **2000**, 27, 1700.

[24] W. Guo, G. H. Hinkle and R. J. Lee, *J. Nucl. Med.*, **1999**, 40, 1563.

[25] M. Ono, Y. Arano, T. Mukai, T. Uehara, Y. Fujioka, K. Ogawa, S. Namba, M. Nakayama, T. Saga, J. Konishi, K. Horiuchi, A. Yokoyama and H. Saji, *Nucl. Med. Biol.*, **2001**, 28, 155.

[26] D. S. Edwards, S. Liu, M. C. Ziegler, A. R. Harris, A. C. Crocker, S. J. Heminway, J. A. Barrett, G. J. Bridger, M. J. Abrams and J. D. Higgins III, *Bioconjugate Chem.*, **1999**, 10, 884.

[27] A. H. Brouwers, P. Laverman, O. C. Boerman, W. J. G. Oyen, J. A. Barrett, T. D. Harris, D. S. Edwards and F. H. M. Corstens, Nucl. Med. Commun., **2000**, 21, 1043.

[28] S. Liu, D. S. Edwards, M. C. Ziegler, A. R. Harris, S. J. Hemingway and J. A. Barrett, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 624.

[29] A. Purohit, S. Liu, D. Casebier, S. B. Haber and D. S. Edwards, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 728–734.

[30] A. Boschi, A. Duatti, L. Uccelli "Development of Technetium-99m and Rhenium-188 Radiopharmaceuticals Containing a Terminal Metal-Nitrido Multiple Bond for Diagnosis and Therapy", *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2005**, 252, 85-115.

[31] R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, A.P. Schubiger, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 7987.

[32] F. Refosco, C. Bolzati, A. Duatti, F. Tisato, L. Uccelli., *Recent Res. Devel. Inorg. Chem.*, **2000**, 2, 89.

[33] A. Boschi, C. Bolzati, L. Uccelli, A. Duatti, E. Benini, F. Refosco, F. Tisato, A. Piffanelli, *Nucl. Med. Commun.*, **2002**, 23, 689.

[34] A. Boschi, C. Bolzati, E. Benini, E. Malagò, L. Uccelli, A. Duatti, A. Piffanelli, F. Refosco, F. Tisato, "A Novel Approach to the High-Specific-Activity Labeling of Small Peptides with the Technetium-99m Fragment $[^{99m}Tc(N)(PXP)]^{2+}$ (PXP = Diphosphine Ligand)" *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 1035-1042.

[35] S. Liu, "Ether and crown ether-containing cationic 99mTc complexes useful as radiopharmaceuticals for heart imaging" *Dalton Trans.*, **2007**, 1183–1193.

[36] Foot, D. K.; Lewis, R. P.; Pearson, T. A.; Beller, G. A. Demographics and cardiology 1950-2050. *J. Am. Coll. Cardiol.,* **2000**, *35* (5 Suppl.B), 66B-80B.

[37] S.V. Smith, *Journal of Inorganic Biochemistry,* **2004**, 98, 1874-1901.

[38] M. Schwaiger, J. Melin, "Cardiological applications of nuclear medicine", *The Lancet*, **1999**, 354, 661-666.

[39] E.G. de Puey, "New applications of Myocardial Perfusion Imaging", *Texas Heart Institute Journal*, **1996**, 23, 122-127.

[40] D.S. Berman, S.W. Hayes, S.W. Shaw, G. Germano, "Recent Advances in Myocardial Perfusion Imaging", *Current Problems in Cardiology*, **2001**, 26, 1-140.

[41] M. Leoncini, R. Sciagrà, "Ruolo della scintigrafia miocardica di perfusione con tecnica gated SPECT nella valutazione diagnostica e prognostica dei pazienti con malattia coronarica cronica", *Italian Heart Journal*, Supplement, **2002**, 3, 309-318.

[42] K. Hatada, L.M. Riou, M. Ruiz, M. Y. Yamamichi, A. Duatti, R.L. Lima, A.R. Goode, D.D Watson, G.A. Beller, D.K. Glover, "^{99m}Tc-N-DBODC5, a New Myocardial Pefusion Imaging Agent with Rapid Liver Clearance: Comparison with ^{99m}Tc-Sestamibi and ^{99m}Tc-Tetrofosmin in Rats", *J. of Nuc. Med.*, **2004**, 45, 12, 2095-2101.

[43] G.B. Saha, R.T. Go, W.J. Macintyre, "Radiopharmaceuticals for Cardiovascular Imaging", *International Journal of Radiation Applications and Instrumentations. Part. B., Nuc. Med. and Bio.*, **1991**, 19, 1-20.

[44] F.J. Wachers, D.S. Berman, J. Maddhai, D.D. Watson, G.A. Beller, H.W. Strauss, C.A. Boucher, M. Picard, B. L. Holman, R. Fridrich, E. Inglese, B. Delaloye, A.Bischof-Delaloye, L. Camin, K. McKusik, "Technetium-99m Hesakis 2-Methoxyisobutyl Isonitrile: Human Biodistribution, Dosimetry, Safety and Preliminary Comparison to Thallium-201 for Myocardial Perfusion Imaging", *J. of Nuc. Med.*, **1989**, 30, 301-311.

[45] G.B. Saha, R.T. Go, W.J. Macintyre "Radiopharmaceuticals for Cardiovascular Imaging", *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part B,. Nuclear Medicine and Biology*, **1991**, 19, 1-20.

[46] B.L. Holman, A.G. Jones, J. Lister-James, A. Davion, M.J. Abrams, J.M. Kirshenbaum, S.S. Tumeh, R.J. English "A new Tc-99m-Labeled Myocardial Imaging Agent, Hesakis(t-Butylisonitrile)-Technetium(I) [Tc-99m TBI]: Initial Experience in the Human", *J. of Nuc. Med.*, **1984**, 25, 1350-1355.

[47] D. Piwica-Worms, J.F. Kronauge, M.L. Chiu, "Uptake and Retention of Hesakis (2-Methoxyisobutyl Isonitrile) Technetium (I) in Cultured Chick Myocardial Cells", *Circulation*, **1990**, 82, 1826-1838.

[48] D. Piwica-Worms, V.V. Rao, J.F. Kronauge, J.M. Croop, "Characterization of Multidrug Resistance P-glycoprotein Transport Function with an Organotechnetium Cation", *Inorg. Chem.*, **1995**, 29, 2428-2434.

[49] K.E. Linder, M.F. Malley, J.Z.Gougoutas, S.E.Unger, A.D. Nunn, "Neutral, Seven-Coordinate Dioxime Complexes of Technetium (III): Synthesis and Characterization", *Inorg. Chem.*, **1990**, 29, 2428-2434.

[50] R.K. Narra, A.D. Nunn, B.L. Kuczynski, T. Feld, P. Wedeking, W.C. Eckelman, "A Neutral Technetium-99m Complex for Myocarial Imaging", *J. Nuc. Med.*, **1989**, 30, 1830-1837.

[51] A.D.Nunn, "Is There Additional Useful Information in the Myocardial Washout Characteristics of Teboroxime?", *J. Nuc. Med.*, **1991**, 32, 1998-1991.

[52] R.E. Stewart, M. Schwaiger, G.D. Hutchins, P.C. Chiao, K.P. Gallagher, N. Nguyen, N.A. Petry, W.L. Rogers, "Myocardial Clearance Kinetics of Technetium-99m-SQ30217: A Marker of Regional Myocardial Blood Flow", *J. Nuc. Med.*, **1990**, 31, 1183-1190.

[53] W.L. Rumsey, K.C. Rosenspire, A.D. Nunn, "Myocaridal Extraction of teboroxime: Effects of Teboroxime Interaction with Blood", *J. Nuc. Med.*, **1992**, 33, 94-101.

[54] H. Weinstein, S.T. Dahlberg, B.A. McSherry, R.C. Hendel, J.A. Leppo, "Rapid Redistribution of Teboroxime", *Am. J. Card.*, **1993**, 71, 848-852.

[55] J.D. Kelly, B. Highley, C.M. Archer, L.R. Canning, K.W. Chiu, B. Edwards, A.M. Forster, H.K. Gill, I.A. Latham, R.D. Pichett, P. Webbon, P.G. Edwards, A. Imran, D.V. Griffiths, D.C. York, P.M. Mahoney, D.J. Tonkinson, J.R. Dilworth, A. Lahiri, "Technetium-99m complexes of functionalized diphosphines for myocaridal imaging" 405-412 "Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine", *Raven Press Cortina,* **1989**, 3rd Edition.

[56] B. Highley, F.W. Smith, T. Smith, H.G. Gemmell, P. Das Gupta, D.V. Gvozdanovic,

D. Graham, D. Hinge, J. Davidson, A. Lahiri, "Technetium-99m-1,2-bis[bis(2-Ethoxyethil)Phosphino]Ethane: Human Biodistribution, Dosimetry and Safety of a New Myocardial Perfusion Imagine Agent", *J. Nuc. Med.*, **1993**, 34, 30-38.

[57] R. Pasqualini, A. Duatti, E. Bellande, V. Comazzi, V. Brucato, D. Hoffschir, D. Fagret, M. Comet, "Bis(Dithiocarbamato) Nitrido Technetium-99m Radiofarmaceuticals: A Class of Neutral Myocardial Imaging Agents", *J. Nuc. Med.*, **1994**, 35, 334-341.

[58] D. Fagret, C. Ghezzi, G. Vanzetto, "^{99m}TcN-NOET and Tl-201 in the assessment of patient with known or suspected coronary atery disease.", *J. Nuc. Card.*, **2004**, 11, 664-672.

[59] L.M. Riou, S. Unger, M.C. Toufektsian, M. Ruiz, D.D. Watson, G.A. Beller, D.K. Glover, "Effects of Increased Lipid Concentration and Hyperemic Blood Flow on the Intrinsic Myocardial Washout Kinetics of ^{99m}Tc(N)-NOET", *J. Nuc. Med.*, **2003**, 44, 7, 1092-1098.

[60] A. Boschi, L. Uccelli, C. Bolzati, A. Duatti, N. Sabba, E. Moretti, G. Di Domenico, G. Zavattini, F. Refosco, M. Giganti, "Synthesis and Biological Evaluation of Monocationic Asymmetric ^{99m}Tc-Nitride Heterocomplexes Showing High Heart Uptake and Improved Imaging Properties", J. Nuc. Med., **2003**, 44, 5, 806-814.

[61] K. Hatada, L.M. Riou, M.Ruiz, Y. Yamamichi, A. Duatti, R. L. Lima, A.R. Goode, D.D Watson, G.A. Beller, D.K. Glover, "^{99m}Tc-N-DBODC5, a new Myocardial Perfusion Imaging Agent with Rapid Liver Clearance: Comparison with ^{99m}Tc-Sestamibi and ^{99m}Tc-Tetrofosmin in Rats", *J. Nuc. Med.*, **2004**, 45, 2095-2101.

[62] C. Bolzati, M. Cavazza-Ceccato, S. Agostini, S. Tokunaga, F. Refosco, F. Tisato, D. Casara, G. Bandoli, "Sub-cellular Distribution and Metabolism Studies of the Potential Myocardial Imaging Agent [^{99m}Tc(N)(DBODC)(PNP5)]$^{+}$", *manuscript in preparation.*

[63] K. Hatada, M. Ruiz, L.M. Riou, R.L. Lima, A.R. Goode, D. D. Watson, G.A. Beller, and D.K. Glover, "Organ biodistribution and myocardial uptake, washout, and redistribution kinetics of Tc-99mN-DBODC5 when injected during vasodilator stress in canine models of coronary stenoses", *J. Nuc. Card.*, **2006**.

[64] S. Liu, "Ether and crown ether-containing cationic 99mTc complexes useful as radiopharmaceuticals for heart imaging", *Dalton Trans.*, **2007**, 1183–1193.

[65] M.J. Welch, C. S. Redvandly, "Handbook of Radiofarmaceuticals, Radiochemistry and Applications", *John Wiley & Sons Ltd*, **2003**.

[66] G.B. Saha, R.T. Go, W.J. Macintyre, "Radiopharmaceuticals for Cardiovascular Imaging", *International Journal Radiation Applications and Instrumentation. Part B. Nuclear Medicine and Biology*, **1991**, 19, 1-20.

[67] H. Radeke, K. Hanson, P. Yalamanchili, M. Hayes, Z.-Q. Zhang, M. Azure, M. Yu, M. Guaraldi, M. Kagan, S. Robinson, D. Casebier, "Synthesis and Biological Evaluation of the Mitochondrial Complex 1 Inhibitor 2-[4-(4-Fluorobutyl)benzyl sulfanyl]-3-methylchromene-4-one as a Potential Cardiac Positron Emission Tomography Tracer", *J. Med. Chem.*, **2007**, 10.1021/jm0701831.

[68] D. Perrin, W. Aramarego, Purification of Laboratory Chemicals. *Pergamon Press*, **1980**.

[69] R. Pasqualini, A. Duatti, E. Bellande, V. Comazzi, V. Brucato, D. Hoffschir, D. Fagret, M. Comet "Bis(dithiocarbamato) Nitrido Technetium-99m Radiopharmaceuticals: A Class of Neutral Myocardial Imaging Agents", *J. Nuc. Med.*, **1994**, 35, 334-341.

[70] Inventors: S. Agostini, F. Tisato, F. Refosco, C. Bolzati, M. Cavazza-Ceccato, M. Porchia, Shinjii Tokunaga; **"**Intermediate Compound of Technetium Nitride Complex for Radiodiagnostic Imaging**"** PCT Application No PCT/JP2006/301260 PCT Application Date: January 20, **2006** Assignee: NIHON MEDI-PHYSICS CO., LTD. 9-8, Rokutanjicho, Nishinomiya-shi, Hygo, Japan.

[71] C. Bolzati, M. Cavazza-Ceccato, S.Agostini, "Biological *in vitro* and *in vivo* studies of a series of new dissymmetrical cationic $[^{99m}Tc(N)(DTC\text{-}L^{n})(PNP)]^{+}$ complex (DTC-L^{n} = alicyclic dithiocarbamate, PNP = bisphosphinoamine)", *Manuscript in preparation.*

[72] K.Valkò, *J. Chromatogr.*, **2004,** A 1037, 299-310.

[73] C. Hansch, T. Fujita, *J.Am.Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1616.

[74] C. Bolzati, E. Benini, M. Cavazza Ceccato, E. Cazzola, E. Malagò, F. Tisato, F. Refosco, G. Bandoli in "From Symmetrical to Asymmetrical Nitrido Phosphino-thiol Complexes: A New Class of Neutral Mixed-ligand ^{99m}Tc-Complexes as Potential Brain Imaging Agents", *Bioconj. Chem.*, **2006**, 17 (2), 419-428.

Sezione B

Sintesi e valutazione biologica di azoturo complessi di Tc-99m per *imaging target*-specifico di recettori CCK-B.

B1. Obiettivo.

In questa Sezione l'attività è stata rivolta alla dimostrazione dell'applicabilità del sistema $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ alla sintesi di radiofarmaci recettore-specifici utilizzabili in Medicina Nucleare molecolare per *imaging* tumorale.

L'*imaging* molecolare ha come scopo la visualizzazione non invasiva di processi cellulari e molecolari che sono alla base dell'insorgenza e dello sviluppo di processi patologici. Il bersaglio molecolare può essere costituito da molecole derivanti da attività fisiologiche della cellula (metabolismo, proliferazione, apoptosi), molecole prodotte in stati patologici come ipossia, risposta immunitaria, infiammazione, oppure recettori di cellule nervose o neoplastiche. I composti che veicolano il radiofarmaco al bersaglio sono in genere piccole molecole organiche, come peptidi o molecole peptido mimetiche, ma si possono usare anche macromolecole (anticorpi). La scelta di una di queste categorie di composti dipende dal tipo di tessuto bersaglio e dalla condizione che si vuole evidenziare nel corso dello studio.

I radiofarmaci recettore-specifici derivano quindi dalla marcatura di biomolecole (gruppi farmacofori, peptidi, anticorpi monoclonali o loro frammenti) che presentano alta affinità e selettività per siti recettoriali coinvolti in forme degenerative e che svolgono la funzione di molecola direzionale, in grado cioè di veicolare il radionuclide al sito bersaglio. I peptidi sono molecole recettore-specifiche che, essendo atte alla regolazione di numerosissime funzioni fisiologiche, rivestono un ruolo cruciale nella diagnosi e nella terapia di molte patologie, tra le quali neoplasie. Ciò ha generato nel settore della Medicina Nucleare una continua ricerca di nuovi metodi di marcatura di peptidi con diversi radionuclidi, tra i quali il Tecnezio-99m, per le sue peculiari caratteristiche chimico-fisiche, rappresenta il radionuclide ideale. In questo contesto, la ricerca di nuovi agenti a base di Tc-99m per la visualizzazione di tessuti neoplastici ha visto lo sviluppo di diverse tecnologie per la marcatura di peptidi quali HYNIC/colegante, $(CO)_3$/glicina e chelanti tetradentati (del tipo N_4). Questi complessi coniugati mantengono una buona affinità nei confronti del recettore, ma la loro stabilità e biodistribuzione *in vivo* è strettamente correlata alle caratteristiche chimiche del sistema chelante. Questo ha stimolato la ricerca di nuovi complessi metallici con caratteristiche biologiche e biodistributive superiori.

Considerando l'elevata stabilità *in vitro* ed *in vivo* di complessi del tipo $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\sim)(PNP)]^{+/0}$ e la loro versatilità chimica, nel presente lavoro si è valutata l'applicabilità di tale metodologia sintetica a peptidi.

Il sistema individuato come *target* è stato il recettore di tipo B delle colecistochinine (CCK-B), che risulta sovraespresso in molte forme neoplastiche quali tumore delle piccole cellule del polmone, tumori del tratto gastrointestinale e tumori midollari della tiroide.

L'analogo del peptide CCK8 (ottapeptide C-terminale amide) per la sua elevata affinità per i recettori CCK-B è stato selezionato quale molecola recettore-specifica ed opportunamente derivatizzato all'estremità N-terminale con il dipeptide glicina-cisteina. L'amminoacido glicina funge da spaziatore tra peptide e agente chelante per il Tc-99m rappresentato dall'amminoacido L-cisteina (Cys) che presenta gli atomi N ed S disponibili per la coordinazione al metallo.

I leganti amminodifosfinici utilizzati in questa parte del progetto sono indicati in Figura 1, preparati secondo le metodologie esposte nella Sezione A.

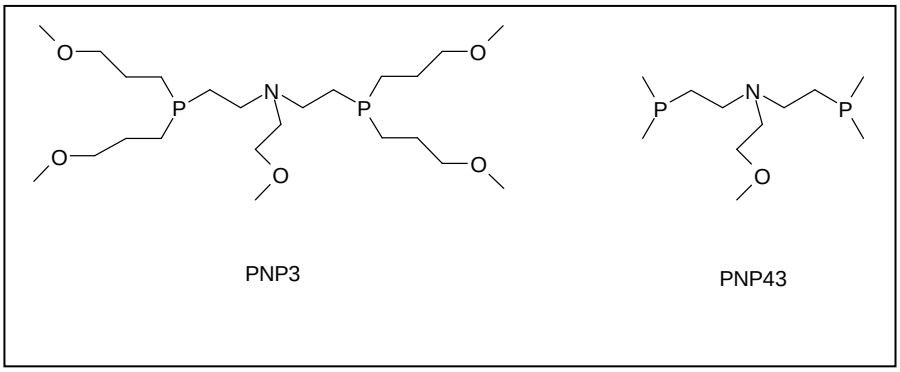


Figura 1. Leganti amminodifosfinici PNP3 e PNP43.

PNP43 è stato progettato e sintetizzato allo scopo di modulare la lipofilia e quindi il profilo farmacocinetico *in vivo* del complesso finale.

B2. Introduzione.

B2.1 *IMAGING* MOLECOLARE.

Il termine di *imaging molecolare* è usato per indicare la visualizzazione di processi biochimici e l'espressione genica in seguito all'interazione specifica di un tracciante con il sistema biologico in studio. Questa disciplina pone quindi l'attenzione sugli aspetti biologici e fisici di una patologia.

Nonostante il concetto di *imaging* molecolare sia un concetto sviluppatosi negli ultimi 20 anni, in realtà in linea di principio esso veniva già applicato alle scansioni tiroidee con I-131, le cui immagini forniscono indicazioni sul funzionamento del cotrasportatore sodio/iodio. Usando nuove sonde radiomarcate, molti processi biomolecolari sono stati recentemente investigati quali ipossia, MDR in tumori, apoptosi, espressione di metalloproteinasi di matrice (enzimi in grado di degradare la matrice extracellulare, frequentemente espressi nella fase di metastatizzazione di tumori), angiogenesi, trasporto di glucosio, trasporto di aminoacidi e trasporto di nucleotidi, solo per nominarne alcuni.

L'utilizzo di biotecnologie ha permesso di individuare nuovi bersagli molecolari per la diagnosi, di riconoscere e caratterizzare patologie (monitorando, ad esempio, l'espressione genica), di pianificare un appropriato trattamento farmacologico e monitorarne il responso, come nel caso della terapia genica. La transfezione del gene che codifica per il cotrasportatore sodio/iodio, a titolo eseplificativo, permette sia di creare un trasporto selettivo di I-131 o di At-211 in tumori non tiroidei sia per monitorare il *gene delivery* (come co-espressione del *gene reporter*) attraverso imaging con I-123 (SPET) o I-124 (PET).

Negli anni 80 la ricerca radiofarmaceutica era focalizzata primariamente allo sviluppo di traccianti di perfusione, la cui biodistribuzione era indice del flusso ematico regionale nelle aree di maggiore interesse quali cuore e cervello. Per esempio, complessi cationici di Tc-99m, come ^{99m}Tc-sestamibi $[^{99m}Tc(MIBI)_6]^+$ (MIBI= 2-metossi-2-metilpropilisonitrile) e ^{99m}Tc-Tetrofosmin $[^{99m}TcO_2(Tetrofosmin)_2]^+$ (Tetrofosmin=1,2-bis[bis(2-etossietil)fosfino] etano), sono ancora ampiamente utilizzati come agenti di perfusione miocardica, mentre i complessi di Tc-99m neutri, come ^{99m}Tc-Bicisate $^{99m}TcO(ECD)$, (ECD= L,L-etilendicisteina dietil estere), sono impiegati per la misura del flusso ematico cerebrale.

Con l'inizio del nuovo millennio, invece, la ricerca si è focalizzata sullo sviluppo di radiofarmaci *target*-specifici da utilizzare nella diagnosi e nella terapia di molte patologie.

B2.1.1 RADIOFARMACI *TARGET*-SPECIFICI.

Negli ultimi quindici anni la ricerca medico nucleare si è rivolta allo studio di radiofarmaci *target*-specifici, ovvero ligandi radiomarcati selettivi per il tessuto malato. Il ligando, spesso indicato come biomolecola (BM), costituisce il veicolo di trasporto del radionuclide al tessuto patologico, dove si trova un'alta concentrazione di molecole recettoriali (*target)*. La localizzazione specifica del ligando radiomarcato e il *binding* selettivo e con elevata affinità con i suoi recettori sono fattori cruciali che permettono di veicolare un'adeguata quantità di tracciante al tessuto bersaglio ed è proprio in questa alta specificità di legame che risiede l'enorme vantaggio dell'*imaging* recettoriale –detto anche *imaging* molecolare- rispetto alle scintigrafie tradizionali con semplici complessi di Tc-99m o ad altre modalità di *imaging* quali tomografia computerizzata a raggi X (CT), ultrasuoni (US), e risonanza magnetica nucleare (MRI).

Molte biomolecole, inclusi anticorpi monoclonali, frammenti di anticorpi e piccoli peptidi, sono stati studiati come veicoli di radionuclidi, alcuni dei quali sono stati approvati dalla FDA per la diagnosi o la terapia di diverse patologie. (Tabella 1). In particolare, l'approvazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 marcato con Y-90 (Zevalin®, IDEC Pharmaceuticals Corp.) per il trattamento di linfomi non-Hodgkin's costituisce l'esempio più importante di utilizzo di anticorpi monoclonali (MoAbs) in radioimmunoterapia (RAIT) del cancro.

Radiopharmaceutical	Trade name	Primary uses
Indium-111 capromab pendetide	ProstaScint®	Imaging of prostate cancer
Indium-111 pentetreotide	Octreoscan®	Imaging of neuroendocrine tumors
Indium-111 satumomab pendetide	OncoScint®	Imaging of metastatic disease associated with colorectal and ovarian cancer
Tc-99m Apcitide	AcuTect®	Synthetic peptide for imaging DVT (deep vein thrombosis)
Tc-99m Arcitumomab	CEA-Scan®	Monoclonal antibody for colorectal cancer
Tc-99m Depreotide	Neotect®	Somatostatin receptor-bearing pulmonary masses
Y-90 Ibitumomab tiuxetan	Zevalin®	Treatment of non-Hodgkin's lymphoma
I-131 Tositumomab	Bexxar®	Treatment of non-Hodgkin's lymphoma

Tabella 1. Radiofarmaci *target*-specifici in commercio e loro applicazioni [1].

L'applicazione di metodiche di biologia molecolare alle malattie tumorali ha portato

all'identificazione di numerosi marcatori molecolari che sono stati valutati sia come potenziali fattori prognostici che come bersaglio delle cosiddette terapie *target*-mirate.
I tumori più studiati sotto questo aspetto sono il carcinoma mammario e il carcinoma colonrettale. Infatti questi tumori, oltre ad essere tra i più frequenti, sono anche quelli di cui è possibile fare una diagnosi precoce. I nuovi marcatori molecolari, e la possibilità di studiare il profilo genico del singolo tumore, aprono la strada ad una sempre più precisa selezione dei pazienti effettivamente a rischio di recidiva, nonchè ad un più preciso utilizzo delle risorse terapeutiche, grazie ala identificazione di marcatori in grado di predire la sensibilità o resistenza a diversi farmaci.

B2.1.2 *IMAGING* RECETTORIALE CON PEPTIDI.

Il sogno di fisiologi ed oncologi in particolare, è l'identificazione di una molecola in grado di localizzarsi selettivamente in neoplasmi in fase precoce di sviluppo, permettendone l'individuazione e che sia in grado di esercitare anche un ruolo terapeutico.
Circa 20 anni fa, gli anticorpi monoclonali sembravano avere le potenzialità per costituire il futuro della diagnosi e della terapia del cancro. Tuttavia, nonostante il principio alla base fosse estremamente affascinante per la versatilità e semplicità, la loro applicazione si presentò molto più difficile soprattutto a causa dell'elevato peso molecolare (~150 kDa). Solo negli ultimi anni, infatti, sono entrati in commercio farmaci basati su anticorpi o loro frammenti per la diagnosi e la terapia del cancro, soprattutto di tumori ematopoietici.
Diciotto anni fa l'utilizzo di un piccolo peptide (1.5 kDa) radiomarcato, analogo della somatostatina, diede una grande svolta alla ricerca in questo settore. La scoperta che molti tumori neuroendocrini umani esprimono, con elevata densità, recettori della somatostatina rese possibile lo sviluppo di un metodo per individuare tali tumori e loro metastasi attraverso la somministrazione intravenosa di un analogo della somatostatina radiomarcato con il quale fosse possibile la visualizzazione di questi recettori *in vivo*. I tumori possono quindi essere identificati, dopo legame ligando radiomarcato-recettore ed eventuale internalizzazione dell'addotto formatosi, come "hot spots" nelle scansioni con gamma-camera. Questa tecnica presenta una sensibilità superiore a tutti gli altri strumenti diagnostici attualmente disponibili per la visualizzazione specifica di tumori neuroendocrini come gastrinomi. Da un punto di vista terapeutico, studi piloti usando alte

dosi di analoghi della somatostatina marcati con Y-90 hanno mostrato una riduzione o almeno una stabilizzazione della crescita tumorale.

Analoghi della somatostatina non radioattivi sono stati usati per il trattamento sintomatico di tumori neuroendocrini secernenti ormoni. Grazie allo straordinario effetto inibitorio della somatostatina sulla secrezione ormonale, si osserva generalmente un significativo miglioramento della qualità della vita, dovuto soprattutto alla normalizzazione della secrezione ormonale.

La base molecolare di tali applicazioni cliniche è la presenza di un'alta densità di recettori della somatostatina in questi tumori. La visualizzazione *in vitro* di recettori della somatostatina in campioni biopsinizzati di tumori umani, usando metodi come autoradiogafia *in vitro,* ha posto le basi della scintigrafia recettoriale *in vivo* e della terapia con Octreotide ed è stato un valido strumento per la selezione di tumori adatti a tali applicazioni cliniche.

Sebbene l'uso clinico della somatostatina sia molto promettente, esso rimane limitato ad una categoria di tumori che ne esprimono i recettori in quantità sufficientemente elevata, principalmente tumori neuroendocrini.

Con il fine di applicare una strategia analoga a quella usata con la somatostatina ad altri tumori umani di ampia diffusione (come polmonare, prostatico, al colon o pancreatico), negli ultimi dieci anni si è approfondito lo studio di recettori di peptidi regolatori sovraespressi in varie forme tumorali e il loro *targeting* è stato uno dei principali *trend* della Medicina Nucleare negli ultimi anni, tanto che lo stesso Wagner ha definito l'approccio con peptidi in oncologia nucleare "uno dei più promettenti per il futuro" [2].

Definizione di peptidi.

I peptidi sono molecole atte alla regolazione di numerosissime funzioni biologiche: molti ormoni, neurotrasmettitori, citochine e fattori di crescita appartengono a questa categoria. Essi sono molecole costituite da vari residui aminoacidici, legati mediante legame peptidico, di dimensioni variabili da due fino a 50 residui. Diversamente dalle proteine, generalmente non possiedono una struttura tridimensionale (terziaria) ben definita e non esistono solo come composti naturali, ma possono anche essere nuove molecole di sintesi e per questo il numero di peptidi esistente è molto grande.

Nel presente capitolo la trattazione riguarderà peptidi ormonali intestinali che

appartengono alla grande famiglia dei peptidi fisiologici "regolatori", a cui appartengono anche neuropeptidi cerebrali, peptidi vasoattivi e peptidi coinvolti nel sistema endocrino (Tabella 2).

Peptide	No. of amino acids	Receptors (including subtypes nomenclature)	Effects on tumor growth[a]
Somatostatin	14 or 28	sst_1, sst_{2A}, sst_{2B}, sst_3, sst_4, sst_5	↓
VIP	28	$VPAC_1$, $VPAC_2$	↑
PACAP	27 or 38	PAC_1	↑
CCK	8, 33, 39, or 58	CCK_1, CCK_2	↑
Gastrin	17 or 34	CCK_2	↑
Bombesin	14	BB_1 (NMB-R), BB_2 (GRP-R), BB_3, BB_4	↑
GRP	27	BB_2 (GRP-R)	↑
Neurotensin	13	NTR1, NTR2, NTR3	↑
NPY	36	Y_1, Y_2, Y_4, Y_5	?
Substance P	11	NK_1, NK_2, NK_3	↑
Oxytocin	9	OT-R	?
LHRH	10	LHRH-R	↓
GLP-1	36	GLP-1-R	?
Calcitonin	32	Calcitonin-R	?
Endothelin	21	ET_A, ET_B	↑
Atrial natriuretic factor	28	ANP_A, ANP_B	?
α-MSH	13	α-MSH-R	?

[a] Animal studies or cell lines; R, receptor.

Tabella 2. Peptidi regolatori correlati alle neoplasie: caratteristiche generali.

In generale, per peptidi regolatori si intendono molecole in grado di agire in vari distretti dell'organismo a concentrazioni molto basse, controllando e modulando la funzione di moltissimi organi chiave e processi metabolici. Bersaglio di questi peptidi infatti non sono solo cervello e tratto gastrointestinale, ma anche sistema endocrino, reni, polmoni e sistemi immunitario, vascolare e nervoso periferico. La loro azione è mediata da legami con specifici recettori di membrana, quasi tutti appartenenti al gruppo dei recettori accoppiati con proteine G e possono influenzare molti effettori intracellulari. Per quasi tutti i peptidi regolatori esistono sottotipi di recettori con i loro ligandi selettivi e sistemi di secondi messaggeri.

Tali molecole rivestono un ruolo importante non solo in condizioni fisiologiche ma anche nei processi patologici: possono infatti essere coinvolti nell'infiammazione e giocare un ruolo, recettore-mediato, nel cancro e nella sua progressione.

Iperespressione recettoriale come *target*.

La scoperta che molti tumori umani, sia primari che loro metastasi, presentano una iperespressione di recettori di peptidi e la possibilità di visualizzarli ha generato un grande interesse in questo settore. Si parla di iperespressione, o sovraespressione, in confronto alla densità recettoriale presente in tessuti sani adiacenti a neoplasmi o nel

tessuto di origine (prima della trasformazione a fenotipo tumorale).
Brevemente, questi recettori possono essere usati come molecole bersaglio in due modi:

1. siti di legame per radioligandi.

I recettori possono essere usati come bersaglio di analoghi peptidici, con scarsa attenzione alle loro funzioni biologiche. Questa strategia si basa essenzialmente sulla presenza, nei siti tumorali, di recettori in grado di legare con elevata affinità analoghi peptidici e non su un'azione fisiologica recettore-mediata. L'applicazione clinica di questa strategia è il *targeting* radiodiagnostico e radioterapeutico con peptidi od analoghi radiomarcati. Un grande vantaggio risiede nel fatto che questi recettori appartengono principalmente alla famiglia dei recettori transmembrana accoppiati a proteine G, in grado di internalizzare dopo legame specifico con il ligando. Ad esempio l'agente ^{111}In-DTPA-[D-Phe^{1}]-octreotide (Octreoscan®, Mallinckrodt) viene rapidamente internalizzato dopo legame specifico con il recettore in un processo temperatura-dipendente. Il processo di internalizzazione permette un elevato accumulo di radiotracciante nella cellula, aumentando così il segnale del sito bersaglio. La strategia può essere quindi applicata sia a peptidi legati a farmaci citotossici che a peptidi legati a radioisotopi: in ambedue i casi l'internalizzazione del ligando permette la distruzione selettiva delle cellule bersaglio.

2. mediatori di responsi funzionali.

I recettori possono essere bersaglio di analoghi peptidici, non citotossici e non radioattivi, in grado di stimolarne una risposta biologica. Un esempio è costituito dall'inibizione della secrezione ormonale ad opera della somatostatina e del suo analogo octreotide [3]. Altri peptidi hanno mostrato *in vitro* la capacità di regolare la crescita di molti tipi di cellule tumorali, suggerendone la possibile applicazione *in vivo* rivolta alla riduzione o blocco della crescita tumorale.

Peptidi e radiopeptidi come agenti *targets*.

La natura stessa dei peptidi, ed in particolare la struttura molecolare e le caratteristiche farmacocinetiche (Tabella 3), li rendono composti molto adatti da utilizzare per il *target* recettoriale. Passiamo ora in rapida rassegna alcune delle caratteristiche dei peptidi.

Vantaggi	Svantaggi
Piccole dimensioni (basso PM)	Degradati rapidamente da peptidasi
Elevata permeabilità tissutale	Attività farmacologica intrinseca
Scarsamente immunogenici	Bassa attività specifica
Bassa tossicità	Difficoltà di marcatura
Semplice sintesi chimica	
Facilità di introdurre modifiche per migliorare stabilità e/o farmacocinetica	
Facilità di derivatizzazione con agenti chelanti	
Buona resistenza a drastiche condizioni di marcatura (pH, T)	
Rapida *clearance* plasmatica	
Alta ritenzione tissutale	
Escrezione prevalentemente renale	
	Incapacità di attraversare BBB

Tabella 3. Caratteristiche dei peptidi.

1. Permeabilità tissutale.

I peptidi, essendo molecole piccole e generalmente molto idrofiliche, possiedono un'eccellente permeabilità tissutale che consente, dopo somministrazione sistemica, un semplice e rapido accesso alla sede tumorale (agevolato anche dall'aumentata permeabilità vasale, EPR). Dopo raggiungimento del sito bersaglio essi debbono permanervi, in modo da assicurare un adeguato rapporto bersaglio/tessuti circostanti. Generalmente essi non attraversano la barriera ematoencefalica (< 0.1% della dose iniettata) e questo è vantaggioso quando il bersaglio è rappresentato da organi periferici o tumori, in quanto nel cervello vi è un'alta densità di recettori peptidici e una loro stimolazione potrebbe indurre vari effetti collaterali. Essi potrebbero comunque penetrare la barriera emato-encefalica in condizioni in cui essa sia perturbata o non integra come nei gliomi.

Generalmente, i peptidi vengono espulsi rapidamente, seguendo una via di escrezione renale o epatobiliare o entrambe a seconda del tipo di peptide e delle modifiche attuate su di esso.

2. Effetti collaterali.

I peptidi sono composti fisiologici e, in quanto tali, intrinsecamente non tossici se comparati con i tradizionali farmaci chemioterapici. Gli effetti collaterali sono solitamente dovuti alle azioni fisiologiche del peptide e sono attesi dopo somministrazione di dosi farmacologiche di composto non radioattivo, ad esempio nel trattamento a lungo termine di tumori. Nel caso in cui si utilizzino peptidi radioattivi per la diagnosi o la radioterapia *in vivo* questi problemi non sussistono, viste le basse dosi di peptide iniettate (10^{-6}-10^{-8} M).

Inoltre, poiché i peptidi hanno un ruolo modulatorio in molti sistemi biologici, gli effetti potrebbero essere controbilanciati e annullati da altri ormoni, fattori di crescita o neurotrasmettitori che agiscono sugli stessi sistemi.

Altra importante caratteristica dei peptidi regolatori è l'assenza di antigenicità, grazie alle piccole dimensioni e lo stesso vale per i loro analoghi.

3. Stabilità.

I peptidi sono generalmente semplici da sintetizzare e da modificare e sono in grado di resistere a drastiche condizioni di reazione e di marcatura. Per la naturale conformazione, risultano tuttavia estremamente sensibili all'azione di peptidasi che sono espresse in molti tessuti. Lo sviluppo di analoghi metabolicamente stabili sarà quindi essenziale per l'applicazione clinica di tali peptidi, in particolare nei trattamenti a lungo termine. In questa ottica si inserisce lo sviluppo di octreotide, lanreotide e vapreotide, analoghi della somatostatina, che presentano rispetto a quest'ultima un'emivita plasmatica e tissutale, e quindi, una durata d'azione prolungata.

La struttura dei peptidi regolatori e della maggior parte dei loro recettori è nota e caratterizzata da tempo e questo consente un più razionale studio struttura-attività e quindi la progettazione, la sintesi e lo sviluppo di analoghi peptidici con lo scopo, ad esempio, di aumentarne la stabilità o di derivatizzarli con agenti chelanti per radionuclidi o con agenti tossici come doxorubicina.

4. Marcatura.

I piccoli peptidi (8-20 residui amminoacidici) presentano dimensioni generalmente sufficienti da consentire la coordinazione al radionuclide in una posizione che non perturbi i siti di riconoscimento e di legame recettoriale.

Gli agenti chelanti per radionuclidi più utilizzati sono acido dietilentriaminopentaacetico (DTPA) o acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA), ma l'elevato ingombro sterico può spesso alterare l'affinità recettoriale.

Applicazioni cliniche.

La presenza di recettori peptidici in tumori umani ha tre importanti applicazioni:

- diagnostica medico-nucleare,
- radioterapia tumorale con analoghi radioattivi,
- terapia a lungo termine con analoghi non citotossici.

L'identificazione di lesioni tumorali, sia primarie sia metastatiche, utilizzando peptidi radiomarcati con In-111, Tc-99m o Lu-177 o altri γ o β^+ emittenti, presenta ottima sensibilità (5-10 mm), ma richiede una adeguata densità recettoriale e un alto rapporto *target*/non-*target*. Il peptide radioattivo deve legare con alta affinità il recettore e possibilmente essere internalizzato.

Oltre alla sede anatomica della neoplasia, la scintigrafia dei recettori peptidici permette di ricavare utili informazioni biologiche e, in particolare, di identificare tumori che esprimono i recettori e in quale densità, in modo da selezionare la terapia più idonea (terapia a lungo termine con peptidi o radioterapia con peptidi marcati se la densità recettoriale è particolarmente elevata).

Un'applicazione particolarmente interessante è la visualizzazione del tumore *in situ* durante la resezione chirurgica della neoplasia utilizzando peptidi radioattivi che hanno grande affinità per il sito leso, così da recidere la zona malata con elevata precisione.

Conseguenza logica della diagnosi con peptidi radioattivi è la radioterapia recettoriale, basata sul medesimo principio. Anche in questo caso la densità recettoriale deve essere particolarmente elevata. Possono essere utilizzati radioisotopi con breve (β^- emittenti come Y-90, Re-188 o Lu-177) o brevissimo *range* tissutale (elettroni Auger, come In-111).

Punto chiave del successo della radioterapia recettoriale è la percentuale di internalizzazione del complesso ligando-recettore, fenomeno che si osserva in molti recettori e sottorecettori accoppiati con proteine G, sebbene con diversa efficienza. L'entità dell'internalizzazione è facilmente calcolabile in culture cellulari *in vitro,* ma non è altrettanto semplice *in vivo.*

Punto critico della radioterapia recettoriale è la distruzione di tessuti circostanti la

neoplasia o di tessuti, anatomicamente lontani, ma che esprimono il recettore, soprattutto se sono radiosensibili, come le cellule del sistema immunitario. Altri organi sensibili sono reni e fegato, non solo perché potrebbero esprimere il recettore, ma soprattutto in quanto coinvolti nell'escrezione del peptide non legato al tumore e per questo è necessario calibrare la dose cercando di limitare i danni a tali tessuti.

L'ultima possibile applicazione terapeutica dei peptidi è l'uso, a lungo termine, di analoghi non radioattivi, non citotossici in grado di stimolare una risposta biologica come ad esempio l'inibizione della secrezione ormonale in tumori neuroendocrini ad opera della somatostatina oppure la riduzione della crescita tumorale. A differenza della radioterapia, la quantità di peptide richiesto è di diversi ordini di grandezza maggiore e questo potrebbe indurre facilmente effetti collaterali, ad esempio vasomotori, dal momento che molti peptidi sono vasoattivi.

B2.1.3 RECETTORI DELLA COLECISTOCHININA (CCK).

La colecistochinina e la pancreozimina furono isolate nel 1940, e solo successivamente si scoprì che erano identiche e pertanto furono denominate insieme con l'acronimo CCK [4]. La colecistochinina fu isolata dapprima nel tratto gastrointestinale e solo successivamente nel sistema nervoso centrale. Essa è uno dei peptidi più abbondanti del SNC, dove agisce come neurotrasmettitore. Il peptide, inizialmente caratterizzato nella forma di 33 amminoacidi, è presente in molte strutture molecolari a partire dalla molecola precursore di 115 amminoacidi (prepro-CCK, Figura 2), come CCK58, CCK39, CCK33, CCK22, CCK8 solfatato [Asp-Tyr(SO_3H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2] e CCK7, CCK8 non solfatato, CCK7, CCK5 e CCK4 (Trp-Met-Asp-Phe-NH_2). I precursori biologici possono essere diversamente idrolizzati per ottenere peptidi di diversa lunghezza che, per esercitare l'azione fisiologica, possiedono tutti gli stessi cinque amminoacidi all'estremità carbossilica. Agiscono come neurotrasmettitori e nella regolazione di varie funzioni nel tratto gastrointestinale, soprattutto a livello di stomaco, pancreas e cistifellea; sono inoltre fattori di crescita nel tratto gastrointestinale e in neoplasmi cerebrali, gastrici e del colon.

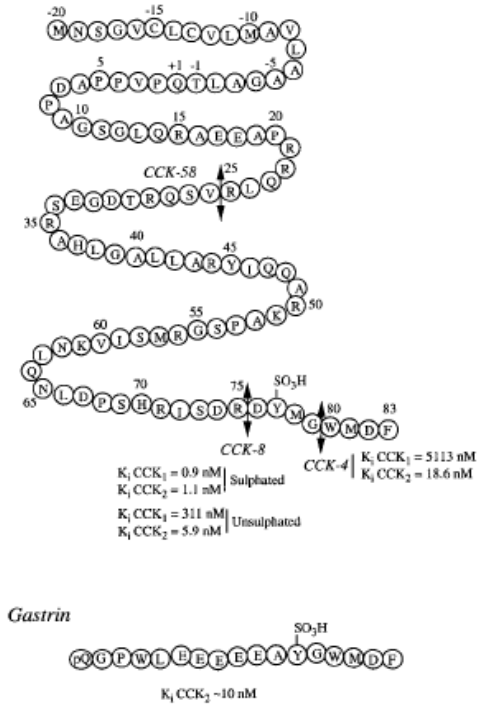


Figura 2. Struttura di preprocolecistochinina. Il peptide segnale è costituito dai residui da -20 a -1. La forma più abbondante nel cervello e nell'intestino, CCK-58, è costituito dai residui da 26 a 83. Altre molecole attive derivano da questo precursore.

Le funzioni di CCK e gastrina (ormone rilasciato all'estremità pilorica dello stomaco che sitmola la secrezione gastrica da parte delle ghiandole presenti nella parete gastrica) sono mediate da molti sottotipi recettoriali tra i quali CCK_1 o CCK-A e CCK_2 o CCK-B sono completamente caratterizzati. Essi sono classificati farmacologicamente sulla base della loro affinità per gli agonisti endogeni CCK e gastrina, i quali presentano gli stessi cinque amminoacidi terminali all'estremità carbossilica, ma presentano una diversa solfatazione sul residuo di tirosina (il sesto per la gastrina, il settimo per CCK) [5]. Si distinguono due diversi tipi di recettori CCK: tipo A, "alimentare" (o CCK-1) e tipo B, "cervello" (brain, o CCK-2), che differiscono oltre che per affinità verso i ligandi naturali (CCK-A bassa affinità per gastrina, CCK-B alta), localizzazione anatomica e struttura molecolare. Il primo caratterizzato è stato CCK-A, negli acini pancreatici di ratto, mentre CCK-B è stato isolato per la prima volta nel cervello. CCK-A mostra un'affinità per le forme solfatate di CCK da 500 a 1000 volte superiore rispetto alle forme solfatate di gastrina e non-solfatate di CCK. I recettori CCK-B, invece, hanno circa la stessa affinità per le forme solfatate o non degli analoghi di CCK.

CCK-A e CCK-B appartengono alla famiglia di recettori accoppiati a proteine G, possiedono sette eliche transmembrana e le estremità carbossilica intracellulare ed

amminica extracellulare (Figura 3). Dopo interazione del peptide (ligando) con il recettore si ha internalizzazione dell'addotto, una volta nel citoplasma il recettore si ricicla ed è riespresso sulla membrana cellulare, mentre il peptide libero viene degradato da enzimi proteolitici lisosomiali.

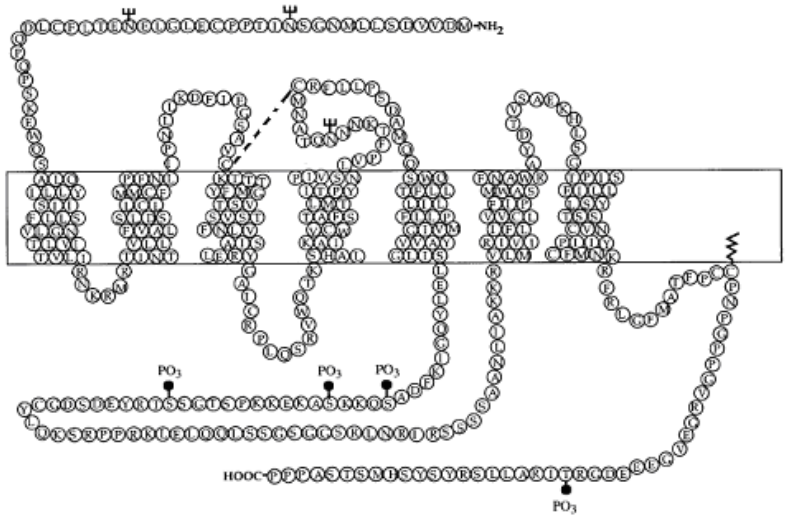


Figura 3. Rappresentazione schematica dei recettori CCK. Si apprezzano le sette eliche transmembrana, le porzioni glicosilate, i residui fosforilati e le estremità carbossilica intracellulare ed amminica extracellulare.

I recettori CCK sono localizzati in molti tessuti normali, nel SNC e a livello periferico nel tratto gastrointestinale ed in altri tessuti. Recettori CCK-A si trovano nelle cellule principali e cellule D della mucosa gastrica, nelle cellule muscolari lisce della cistifellea, nello sfintere pilorico, nello sfintere di Oddi, in alcune cellule muscolari lisce del tratto GI, in cellule neuronali enteriche e in cellule corticotrofiche dell'ipofisi anteriore.
Recettori CCK-B si trovano nelle cellule muscolari lisce del tratto GI, incluso cistifellea, in cellule parietali, D e principali della mucosa gastrica, nei neuroni del plesso mienterico, in monociti, linfociti T e nel cervello.

Implicazioni fisiologiche dei recettori CCK [18].

In linea con la sua ampia distribuzione a livello centrale, CCK è coinvolto nella modulazione di diverse funzioni centrali. In particolare, numerosi studi clinici hanno dimostrato chiaramente che CCK, sia attraverso CCK-A che CCK-B, partecipa alla neurobiologia di ansietà, depressione, psicosi, apprendimento e percezione dolorifica e sono di seguito riportati alcuni esempi.
CCK in attacchi di panico e ansietà: iniezioni di CCK4, agonista CCK-B, provoca attacchi di

panico, sedabili con antidepressivi. Il sistema endogeno CCK è alterato nel caso di disordini di panico e contribuisce alla patologia ansiosa, oltre che nel disordine ossessivo-compulsivo e nelle fobie sociali. Sebbene i recettori CCK-B appaiano la componente chiave nella genesi dei sintomi ansiosi, via stimolazione con CCK4, ci sono crescenti evidenze che essi esercitino il loro effetto per interazione con altri sistemi di neurotrasmettitori. Nell'uomo sono state dimostrate importanti interazioni tra CCK e serotonina, norepinefrina e il sistema benzodiazepine/acido gamma-amminobutirrico. Sono in studio antagonisti CCK-B per il trattamento di ansietà e altre patologie psichiche.

Gli effetti comportamentali di agonisti CCK-B nell'uomo sono accompagnati da marcate alterazioni biologiche, quali aumento della gittata cardiaca e della pressione sanguigna, diminuzione della ventilazione, aumento dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi e aumento dei livelli sierici di dopamina, norepinefrina, epinefrina e neuropeptide Y.

CCK e schizofrenia. La modificazione del sistema dopaminergico è una componente essenziale nel meccanismo patofisiologico della schizofrenia. Da tempo sono state dimostrate correlazioni tra sistema dopaminergico e CCK-ergico. CCK è correlato alla schizofrenia ed al sistema dopaminergico a livello della parte posteriore del nucleo accumbeo (già dimostrato implicato nella patofisiologia della schizofrenia). Le interazioni tra CCK e dopamina sono complesse e spesso bidirezionali: CCK potenzia o inibisce l'azione della dopamina, a seconda della regione cerebrale esaminata. Quindi il preciso ruolo del CCK nella schizofrenia non è completamente compreso. Tuttavia, nel complesso gli studi clinici sembrano concordi che la schizofrenia possa essere associata con una ridotta attività dei recettori CCK.

CCK e depressione. Una delle azioni fisiologiche del neuropeptide CCK sembra essere la modulazione del sistema dopaminergico nigrostriatale e mesolimbico. Studi clinici hanno dimostrato che la depressione può essere associata con un'iperreattività dei recettori CCK-B. Di conseguenza, loro antagonisti in *mice* hanno dimostrato proprietà antidepressive e in pazienti con severa depressione effettivamente si osserva un aumento nella concentrazione del livello di CCK nel fluido cerebrospinale.

*CCK e processo di memoria***.** CCK, essendo presente in regioni cerebrali ipotizzate sedi delle funzioni di memoria (ippocampo, nucleo dell'amigdala e corteccia cerebrale), potrebbe giocare un ruolo nei processi di memorizzazione. Sono stati dimostrati ruoli differenti nei processi di apprendimento e memorizzazione per CCK-A e CCK-B.

CCK nel controllo del dolore. CCK8 ha proprietà anti oppioidi e riduce l'effetto antinocicettivo prodotto dal rilascio di oppioidi endogeni. L'attivazione dei recettori CCK-B potrebbe modulare negativamente il sistema degli oppioidi. Antagonisti CCK-B sono stati proposti in concomitanza con inibitori nel trattamento delle sindromi da astinenza da oppioidi.

A livello periferico i recettori CCK-A [6] : nel pancreas agiscono sugli acini stimolando la secrezione di amilasi (enzimi pancreatici); a livello gastrico essi regolano la secrezione di pepsinogeno; stimolano la contrazione della cistifellea (preparati commerciali di CCK sono usati clinicamente per valutare la contrazione della cistifellea nel caso di disordini); determinano il rilascio sia di acetilcolina che di sostanza P; mediano la trasmissione di informazione sensoriali dall'intestino al cervello (somministrazione periferica di CCK inibisce il consumo di cibo, proposti agonisti per disordini alimentari, come obesità). In particolare, i recettori CCK-A regolano l'assunzione di cibo (CCK-A antagonisti aumentano il desiderio di consumo di cibo e ritardano il senso di sazietà trasmesso a livello cerebrale dal nervo vago).

I recettori CCK-B a livello periferico stimolano la secrezione gastrica acida; causano contrazione della muscolatura liscia pilorica; se bloccati da antagonisti essi inibiscono il senso di sazietà gastrico dopo un pasto ricco di lipidi (proposti per trattamento di ulcera gastrica); contraggono la muscolatura del plesso mienterico dell'ileo ed infine essi determinano rilascio di acetilcolina [7].

<u>Espressione di recettori CCK-A e CCK-B in tumori.</u>

I recettori CCK-B sono espressi con alta densità in carcinomi midollare tiroidei (92%), mentre sono assenti in altri tumori della tiroide, in tumori a piccole cellule del polmone (57%), ma non in tumori non a piccole cellule, si trovano frequentemente in astocitomi (65%), in tumori ovarici stromali (100%), in alcuni tumori neuroendocrini gastroenteropancreatici (soprattutto insulinomi), in adenocarcinomi mammari e endometriali, in meningiomi, neuroblastomi e in molti tumori dei tessuti molli, in particolare leiomiosarcomi (Tabella 4). Sono raramente espressi in schwannomi, glioblastomi, linfomi, tumori renali, prostatici, epatici e neuroendocrini come adenomi pituitari, feocromocitomi, paragangliomi o adenomi delle paratiroidi.

L'altro sottotipo principale dei recettori CCK, CCK-A, è invece espresso in poche linee

tumorali, ad eccezione di tumori neuroendocrini dei polmoni e gastroenteropancreatici (38%), meningiomi (30%), glioblastimi, insulinomi e alcuni neuroblastomi (19%) [6], nei quali si osserva la presenza, con elevata incidenza, di recettori della somatostatina, rilevabili con Octreoscan®. Pertanto, lo studio di analoghi peptidici aventi alta affinità e selettività per CCK-A riveste scarso interesse clinico.

Tumor type	Somatostatin-R[a]	VIP/PACAP-R[a]	GRP/bombesin-R[a]	NTR1	CCK_1/CCK_2[a]	NK_1	NPY-R[a]
GH-producing pituitary adenoma	+ (sst_2, sst_5)	+ (PAC_1)		−	−		
Nonfunctioning pituitary adenoma	+ (sst_3 > sst_2)	+ (PAC_1)		−	−		
Gut carcinoid	+ (sst_2 > sst_1, sst_5)	+	+ (NMB-R)	−	+ (CCK_1)		
Gastrinoma	+ (sst_2)	+	+ (GRP-R)	−			
Insulinoma	+	+		−	+ (CCK_2)		
Paraganglioma	+ (sst_2)	+ (PAC_1)		−	−		
Pheochromocytoma	+ (sst_2)	+ (PAC_1)			−		
Medullary thyroid carcinoma	+	−		+	+ (CCK_2)	+	
Small cell lung cancer	+ (sst_2)	+	+ (BB_3)	+	+ (CCK_2)	+	
Non-small cell lung cancer	−	+ ($VPAC_1$)		−	−	−	−
Meningioma	+ (sst_2)	+		+	+ (CCK_1)		
Neuroblastoma	+ (sst_2)	+ (PAC_1)		−	+ (CCK_1)	−	
Medulloblastoma	+ (sst_2)	+		+			
Astrocytoma	+	+ (PAC_1)		+	+ (CCK_2)	+	
Glioblastoma	−	+ (PAC_1)				+	
Exocrine pancreatic tumor	−	+ ($VPAC_1$)	−	+	−	−	
Colorectal carcinoma	−	+ ($VPAC_1$)		−	−	−	−
Gastric carcinoma	+	+ ($VPAC_1$)		−	−		
Hepatocellular carcinoma	+	+ ($VPAC_1$)		−	−		
Esophageal carcinoma	−	+ ($VPAC_1$)					
Renal cell carcinoma	+	+ ($VPAC_1$)	+ (GRP-R)	−	−		
Prostate carcinoma	+ (sst_1)	+ ($VPAC_1$)	+ (GRP-R)	−	−		−
Urinary bladder carcinoma	−	+ ($VPAC_1$)					
Breast carcinoma	+	+ ($VPAC_1$)	+ (GRP-R)	−	−	+	+ (Y_1)
Endometrial carcinoma	−	+					
Ovarian carcinoma	+	+ ($VPAC_1$)		−	−		
Lymphoma	+	+		−	−	−	
Ewing sarcoma	−	−		+			
Leiomyoma	+	+ ($VPAC_2$)					

Bold +, receptors with particularly high density and incidence.
[a] Subtype preferentially expressed is listed in parentheses, only when compelling evidence is available (immunohistochemistry or autoradiography).

Tabella 4. Recettori peptidici espressi in tumori umani.

B2.1.4 DIAGNOSI E TERAPIA CON PEPTIDI MARCATI.

Molti gruppi di ricerca si sono dedicati allo sviluppo di analoghi radioattivi di CCK selettivi per CCK-B. Sono stati indagati analoghi peptidici non solfatati ad otto residui (CCK8), derivatizzati con chelanti come DTPA o DOTA, utilizzando radionuclidi come In-111, ad esempio nel complesso ^{111}In-DTPA-[D-Asp^{26}, Nle^{28,31}]CCK(26-33) [8]; I-125 in ^{125}I[D-Tyr-Gly, Nle$^{28-31}$]-CCK(26-33); ^{131}I- o ^{111}In-DTPA-minigastrina [9]. Questi composti sono in grado di legare i recettori CCK-B con affinità nanomolare, mantenuta sia *in vitro* che *in vivo,* in cellule cancerose esprimenti CCK-B trapiantate in *nude* mice.

Negli ultimi venti anni sono stati sviluppati molti antagonisti dei recettori CCK-A e –B, soprattutto per disturbi gastrointestinali, che hanno dimostrato attraverso studi in modelli animali e in cellule tumorali un considerevole effetto di inibizione della crescita tumorale; tuttavia, non ci sono ancora studi clinici su uomo che stabiliscano inequivocabilmente il ruolo di tali recettori nel controllo della crescita neoplastica.

Il carcinoma midollare tiroideo è stato il primo tumore umano a mostrare una densità recettoriale di CCK-B sufficientemente elevata da consentire l'esecuzione di studi clinici pilota rivolti alla visualizzazione dei recettori utilizzando vari derivati e diversi radionuclidi, quali ^{111}In-DTPA-minigastrina. In tale linea tumorale l'incidenza di CCK-B è molto maggiore di sst_2 perciò la scintigrafia recettoriale con derivati di CCK ha molti vantaggi rispetto all'uso della somatostatina. In un altro studio, condotto da Kwekkeboom *et al*. [10] in pazienti con carcinoma midollare tiroideo in stadio avanzato si sono visualizzate con ^{111}In-DTPA-[D-Asp^{26}, Nle^{28,31}]CCK(26-33) le sedi neoplastiche, ma non tutte, probabilmente a causa di una bassa specificità del derivato peptidico *in vivo* (Figura 4). Tutti gli studi traggono giovamento dalla presenza di un controllo interno positivo non patologico, quale la mucosa gastrica (che, dopo il cervello, è il tessuto che presenta una maggiore incidenza di CCK-B).

Il radionuclide Tc-99m rimane il radionuclide di elezione da utilizzare nella diagnostica medico-nucleare grazie a caratteristiche nucleari particolarmente favorevoli. La marcatura deve ovviamente non interferire con il legame recettoriale e dare origine a complessi stabili ed escreti preferibilmente attraverso la via renale. Tra i vari approcci per la marcatura di gastrina ed analoghi di CCK, l'uso dell'acido idrazinonicotinico HYNIC (impiegato efficacemente nella marcatura di altri peptidi come somatostatina [11] o antagonisti GPIIb/IIIa [12]), e del *core* tricarbonile (applicato nella marcatura di molte

biomolecole, [13]), hanno permesso di ottenere complessi di Tc-99m in alta resa, con elevata attività specifica e in grado di mantenere la naturale affinità del peptide per CCK-B, ma che presentano un elevato *uptake* renale e sono instabili in quanto suscettibili di idrolisi ad opera di enzimi renali ed epatici [14].

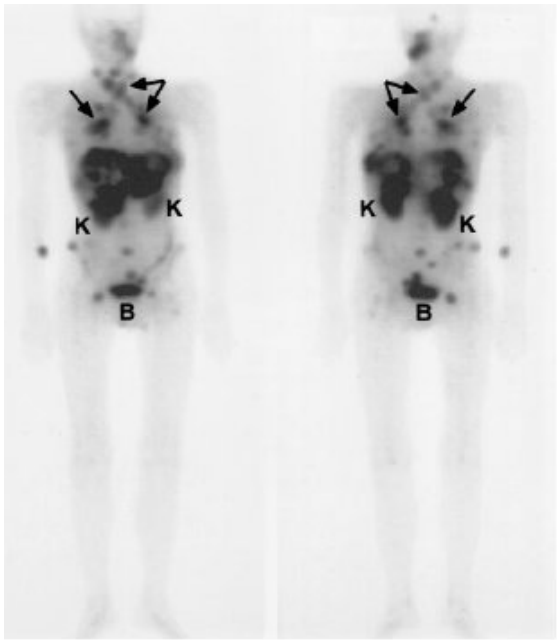


Figura 4. Scintigrafia *total body* di un paziente con carcinoma midollare tiroideo metastatizzato.

Laverman *et al.* [15], hanno riportato la marcatura di CCK8 con Tc-99m utilizzando, oltre ad HYNIC, altri coligandi, ottenendo con tricina dei complessi in alta resa, ma caratterizzati da una bassissima stabilità in soluzioni acquose (27% a 16h per il migliore) e con EDDA una bassissima attività specifica. Tutti i derivati presentano valori bassi di IC_{50} (~8 nM) e mantengono una buona affinità recettoriale *in vivo.*

Studi radioterapici preliminari condotti con minigastrina radiomarcata hanno permesso di ottenere una considerevole riduzione delle dimensioni di carcinomi midollare tiroidei [16].

Per molti di questi derivati il problema della tossicità renale è stato parzialmente risolto con la sintesi di nuovi derivati analoghi di CCK con basso *uptake* renale [17], prodotti inserendo un numero maggiore di residui di Acido Glutammico.

B3. Parte Sperimentale.

B3.1 MATERIALI E METODI.

I solventi per HPLC sono forniti da Carlo Erba Reagenti, i reagenti sono stati acquistati da Sigma Aldrich.

Molti dei solventi e reagenti impiegati sono stati utilizzati come ricevuti dalla casa produttrice, senza ulteriori purificazioni [19]. Le soluzioni utilizzate per le analisi HPLC sono state filtrate con filtri Millipore di diametro di 0.22 μm e degasate prima dell'uso.

Na[$^{99m}TcO_4$] in soluzione fisiologica è stato ottenuto da un generatore ^{99}Mo / ^{99m}Tc a umido Elumatic III di Schering.

Il peptide Cys-Gly-CCK8 è stato preparato per sintesi in fase solida, utilizzando la strategia F-moc, dal gruppo CIRPeB del Prof. G. Morelli dell'Università degli Studi di Napoli.

I leganti amminofosfinici PNP sono stati preparati secondo le metodiche esposte nella Sezione A. I gruppi fosfinici, in presenza di diossigeno atmosferico, vengono facilmente ossidati a fosfinossido; tutte le reazioni vengono, pertanto, condotte in atmosfera inerte di diazoto, con solventi dediossigenati prima dell'uso.

Nell'analisi di sostanze radioattive si devono usare, per le bassissime concentrazioni di utilizzo, solamente metodi radiometrici, puramente quantitativi; questi sono accoppiabili ai comuni metodi cromatografici, permettendo una valutazione anche qualitativa delle specie analizzate.

La resa radiochimica (RCY) dei prodotti sintetizzati è stata valutata attraverso tecniche cromatografiche mediante TLC e HPLC.

La cromatografia su strato sottile (TLC, *thin layer chromatography*) viene effettuata su una fase stazionaria di silice pura (SiO_2 F_{254S} della Merck) o di silice funzionalizzata (C18 F_{254S} della Merck), supportata su una lamina di alluminio.

La radioattività sulle lastre cromatografiche sviluppate viene rilevata da uno schermo radiosensibile al fosforo che, impressionato, viene analizzato da un lettore Cyclone®, equipaggiato con un sistema software (Packard, Meridian, CT), che restituisce delle immagini elaborate con dati quali- e quantitativi.

Lo strumento HPLC (*High Prestations Liquid Chromatography*) è costituito da due pompe Beckman System Gold ed equipaggiato con un miscelatore di solventi programmabile Beckman Modello 126; questo è corredato, in uscita dalla colonna, di un rivelatore UV-visibile a lunghezza d'onda selezionabile, Beckman Modello 166, cui è collegato in serie un rivelatore radiometrico Bioscan, Modello B-FC-3200.

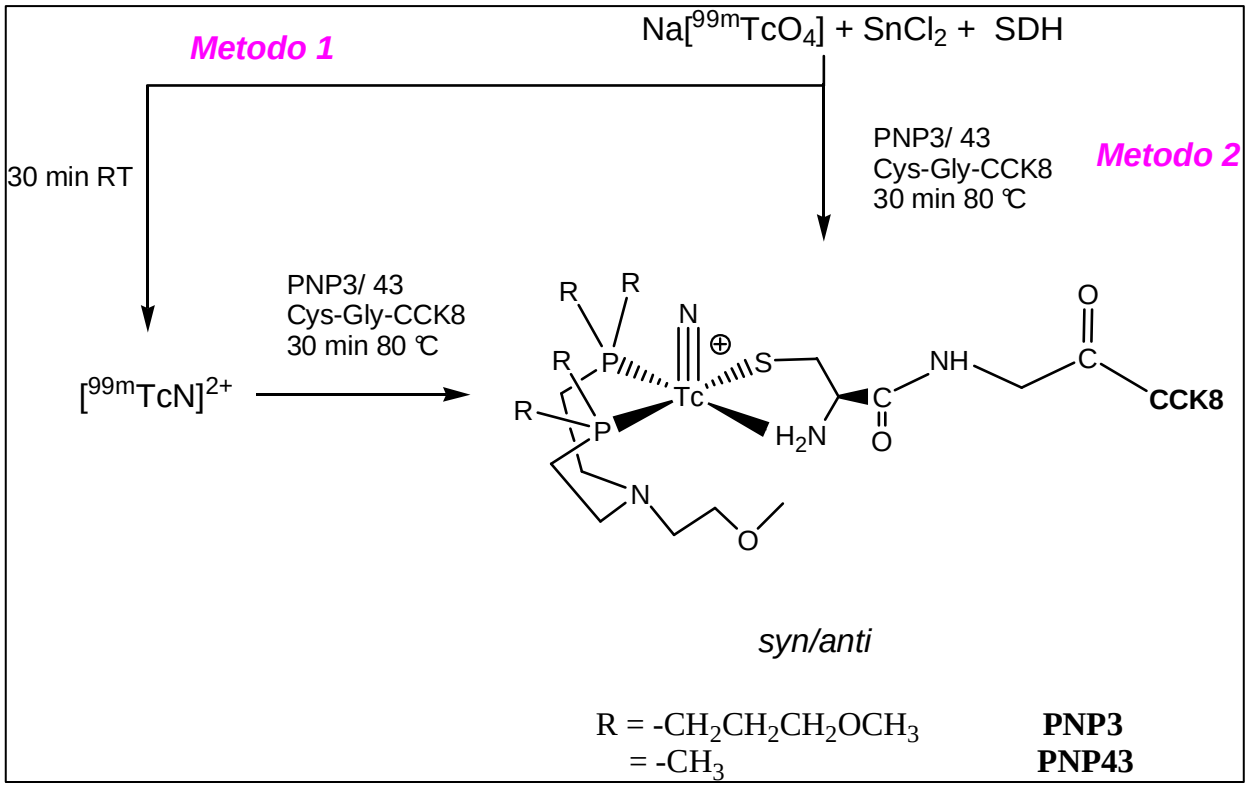
Le cartucce Sep-Pak RP-C18 Waters® permettono la separazione delle sostanze sulla base delle loro caratteristiche di lipofilia.

La radioattività viene valutata tramite un contatore gamma automatico a cristalli di NaI, modello Cobra II di Packard.

B3.2 SINTESI DEI COMPLESSI

syn/anti-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$ [20].

La preparazione degli eterocomplessi dissimetrici *syn,anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$ e *syn,anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP43)]$^{+}$ è condotta in soluzione idroalcolica seguendo due differenti vie sintetiche (Schema 1).



Schema 1. Vie di sinetsi (Metodo 1 e Metodo 2) di preparazione degli eterocomplessi *syn/anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(NS-Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$.

La prima via di sintesi, indicata come Metodo 1, prevede una procedura a due passaggi che richiede la preliminare formazione di una miscela di complessi intermedi, contenenti il core $[Tc{\equiv}N]^{2+}$, ottenuti dopo 30 minuti a temperatura ambiente in seguito a riduzione dello ione pertecnetato (0.5 ml, 50.0 MBq-3.0 GBq) ad opera di $SnCl_2$ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), in presenza di succinildiidrazide (SDH, 5.0 mg sospeso in 0.5 ml di EtOH) quale donatore di gruppi azoturo. Nel secondo passaggio sono contemporaneamente aggiunti alla miscela di azoturo-complessi il legante amminodifosfinico PNP3 (1.0 mg in 0.1 ml di EtOH) oppure PNP43 (0.5 mg in 0.1 ml di EtOH) ed il peptide Cys-Gly-CCK8 (0.20 mg in 0.250 ml di tampone fosfato 0.1 M,

pH=7.4). La miscela è posta ad incubare a 80 °C per 30 minuti. Il pH a fine reazione è 7.0 per la reazione con PNP3, 7.2 con PNP43. Dopo 30 minuti a 80 °C la RCY, valutata via HPLC e TLC, è 87.0% con PNP3 e 79.9% con PNP43.

La seconda via sintetica (Metodo 2) prevede un singolo passaggio, in cui una soluzione di Na[$^{99m}TcO_4$] (0.5 ml, 50.0 MBq-3.0 GBq) è aggiunta ad una *vial* contenente tutti i reagenti: SDH (5.0 mg sospeso in 0.5 ml di EtOH), $SnCl_2$ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), PNP3 (1.0 mg in 0.1 ml di EtOH) oppure PNP43 (0.5 mg in 0.1 ml di EtOH) e Cys-Gly-CCK8 (0.20 mg in 0.250 ml di tampone fosfato 0.1 M, pH = 7.4). Dopo 30 minuti a 80 °C la RCY è 87.4% con PNP3 e 87.0% con PNP43.

I risultati ottenuti mediante TLC ed HPLC, nonché le condizioni di analisi sono riassunti in Tabella 5 e comparati con i dati cromatografici degli analoghi complessi [$^{99m}Tc^{V}$(N)(CysOEt)(PNP3)]$^+$ e [$^{99m}Tc^{V}$(N)(CysOEt)(PNP43)]$^+$.

Complesso	**R_f C18**	**R_f SiO_2**	**Metodo 1 R_t [min]**	**Metodo 2 R_t [min]**	**RCY a + b [%]**
a- [$^{99m}Tc^{V}$(N)(CysOEt)(PNP3)]$^+$	[a]0.33		[a]26.03	[a]26.03	91.37
b- [$^{99m}Tc^{V}$(N)(CysOEt)(PNP3)]$^+$	[a]0.21		[a]29.03	[a]29.03	
a-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^+$	[b]0.65; [c]0.85	[d]0.67	[a]25.45; [b]29.89	[b]29.91	87.03
b-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^+$	[b]0.65; [c]0.85	[d]0.61	[a]25.45; [b]29.89	[b]29.91	
a,b-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP43)]$^+$	[a]0.67; [b]0.86 [c]0.96+0.87		[a]23.85; [b]24.87 [c]35.13 + 35.86	[b]24.73	87.03
a-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(CysOEt)(PNP43)]$^+$	[a]0.68		[a]20.74	[a]20.79; [c]22.93	67
b-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(CysOEt)(PNP43)]$^+$	[a]0.57		[a]22.10	[a]22.17; [c]27.12	

Tabella 5. Analisi cromatografiche dei complessi.

TLC: C18:	a	MeCN/ Et_3N 0,01 M (pH 3, H_3PO_4 1 M)	60/40;
	b	Sal/MeOH/THF/HAc(g),	2/8/1/1;
	c	MeOH/MeCN/THF/$HAc_{(g)}$	3/3/2/2/;
SiO_2:	d	EtOH/$CHCl_3$/ Tol/NH4Ac (0.5 M)	6/2/0.5/1.5.

HPLC: A = NEt_3 0.01 M pH 3 per H_3PO_4 1M, B = CH_3CN;

a gradiente: 0-5 min, B=0%; 5-15 min, B=30%; 15-20 min, B=45%; 20-35 min, B=45%, 35-37 min, B=0%.

b gradiente: 0-5 min, B=0%; 5-15 min, B=30%; 15-20 min, B=39%, 20-40 min, B=39%; 40-42 min, B=0%.

c gradiente: 0-5 min, B=0%; 5-15 min, B=25%; 15-20 min, B=25%; 20-30 min, B=30%, 30-31 min, B=60%; 31-39 min, B=60%; 39-40 min, B=0%.

B3.3 EFFICIENZA DI MARCATURA DEL LEGANTE Cys-Gly-CCK8.

L'efficienza di marcatura di Cys-Gly-CCK8 è stata valutata studiando l'influenza della concentrazione del peptide sulla resa radiochimica dell'eterocomplesso $[^{99m}Tc^{V}(N)$(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)$]^+$, preparato seguendo il Metodo 2 (1 mg di PNP3, 80 °C, 30 e 60 min) utilizzando concentrazioni decrescenti di peptide da 0.2 mg a 0.005 mg (1.64×10^{-4} mmol-4.08×10^{-6} mmol).

I risultati ottenuti, visualizzati in seguito nel Grafico 1, sono espressi come variazione della resa radiochimica del complesso finale in funzione della quantità di Cys-Gly-CCK8, espressa in mg.

B3.4 PURIFICAZIONE.

La miscela di reazione viene diluita con 8 ml di H_2O e caricata su una colonna Sep-Pak RP-C18 precedentemente attivata con 5 ml di EtOH 95% e condizionata con 5 ml di H_2O.

Per la purificazione della miscela di reazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)$(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)$]^+$ si lava

la Sep-Pak in successione con 20 ml H_2O e 5 ml di EtOH 30%. Il complesso viene eluito in due frazioni (1 x 0.25 ml, 1 x 0.75 ml) con una miscela EtOH/PBS 0.2 M, pH=7.4 in rapporto 80/20. Il 70 % dell'attività viene raccolto nella seconda frazione che è utilizzata per gli studi successivi. Dopo purificazione la purezza radiochimica, valutata mediante TLC e HPLC, è >90%.

Per la purificazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^{+}$ si lava la colonna in successione con 20 ml H_2O, 5 ml di EtOH 20% ed infine 1 ml di EtOH 25%. Il complesso viene eluito in due frazioni (1 x 0.25 ml, 1 x 0.75 ml) con una miscela EtOH/PBS 0.2 M, pH = 7.4 in rapporto 80/20. Il 70% dell'attività viene raccolto nella seconda frazione che è utilizzata, dopo opportuna diluizione, per gli studi successivi. Dopo purificazione la purezza radiochimica, valutata mediante TLC e HPLC, è >94% ed il complesso è stabile in questa miscela dopo 24 h a RT.

B3.5 STUDI *IN VITRO*.

B3.5.1 TRANSCHELAZIONE CON CISTEINA E GLUTATIONE.

Ad una provetta di propilene contenente tampone fosfato (250 µL, 0.2 M, pH = 7.4), H_2O (100 µL) e il complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^{+}$ o alternativamente $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^{+}$ purificato (100 µL) viene aggiunta una soluzione acquosa (50 µL) di Cisteina cloridrato a diverse concentrazioni (1 mM e 10 mM) oppure di Glutatione (10 mM). Le miscele vengono messe ad incubare a 37 °C per 24 ore. In parallelo viene analizzato un campione di controllo contenente un uguale volume di soluzione acquosa, in luogo della soluzione di Cisteina. Dopo 30 minuti, 1, 2, 3 e 24 ore vengono prelevate aliquote delle miscele di reazione ed analizzate mediante TLC ed HPLC.

I risultati ottenuti sono successivamente riportati nel Grafico 2 e 3, in fase di discussione.

B3.5.2 STUDI DI STABILITÀ IN SIERO UMANO, SIERO DI *MOUSE* E OMOGENATO DI FEGATO DI *MOUSE*.

Frazioni di complesso purificato $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^{+}$ (50 µL) o alternativamente $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^{+}$ vengono aggiunte a:

a) soluzione salina (950 µL);

b) siero umano (450 µL);
c) siero di mouse (450 µL);
d) omogenato di fegato di mouse (450 µL);
e) HEPES buffer 20 mM, pH=7.3.

Le miscele vengono incubate a 37 °C per 24 ore. A tempi stabiliti (15 minuti, 1, 2, 3 e 24 h) si prelevano delle aliquote (50 µL) e si diluiscono con tampone fosfato (950 µL, 0.02 M, pH=7.4). Le preparazioni a), b), c) ed e) (100 µL), opportunamente diluite con 900 µL di tampone fosfato (0.02 M, pH 7.4), sono analizzate direttamente via HPLC.

Condizioni di eluizione: precolonna C4 a fase inversa Simmetry 300 (5 µm 3.9 x 20 mm); colonna C4 Simmetry 300 (5 µm 4.6 x 150 mm).

Per $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^{+}$ fase mobile: A=0.05M DMGA (acido 3,3-dimetilglutarico) + NaOH 1M, pH=8; B=CH_3CN; gradiente: 0 min B=25%, 0-25 min B= 33%, 25-27 min B=25%; flusso :1 ml/min.

Per $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^{+}$ fase mobile: A = NEt_3 0.01M + H_3PO_4 1M pH=3; B = CH_3CN; gradiente: 0-5 min, B=0%; 5-15 min, B=20%; 15-30 min, B=35%; 30-33 min, B=35%, 33-35 min, B=0%; flusso:1 ml/min.

Il campione d) prima dell'analisi HPLC, deve essere purificato tramite cartucce di estrazione OASIS HLB. Viene caricato su colonna, precedentemente lavata con 1 ml di MeOH e condizionata con 1 ml di H_2O, lavato con 3 ml di MeOH al 5% ed eluito in un'unica frazione con 1 ml di miscela di EtOH/PBS (0.2 oppure 0.1M, pH=7.4) 80/20. Ogni singola frazione, compreso il filtro, viene contata in gamma-*counter*. Il 75-80% dell'attività iniziale viene raccolto nella frazione di eluizione che viene analizzata mediante TLC e HPLC (100 µL). La stabilità dei complessi è valutata via TLC, sia direttamente sui campioni incubati che sulla frazione purificata, senza sostanziali modifiche di resa in termini di RCP.

I risultati ottenuti sono visualizzati nei Grafici 4 e 5 in seguito presentati in fase di discussione dei risultati.

B3.6 *BINDING IN VITRO* DI CCK-B.

Per le prove di *binding in vitro* ai recettori CCK-B vengono utilizzate linee cellulari tumorali A431 sovraesprimenti il recettore CCK-B (A431-CCK-B) ottenute transfettando cellule A431 con il cDNA per il recettore.

Le cellule vengono messe in coltura in 12 piastre ad una densità di 10^5-$2 \cdot 10^5$ cellule per piastra, due o tre giorni prima degli esperimenti. La specificità di interazione viene valutata comparando l'attività associata alle cellule dopo incubazione di diluizioni seriali del peptide radiomarcato (0.05-50 nmol/l) con cellule A431-CCK-B, in presenza di un eccesso di peptide non marcato (10^2 a 10^3), per valutare il legame aspecifico, e con cellule di controllo A431. Le piastre sono incubate in triplo, a 37 °C, in presenza di una quantità nota di peptide radiomarcato. Dopo l'incubazione le cellule vengono lavate (PBS, pH = 7.4), al fine di rimuovere il radiocomplesso non legato, e successivamente si recuperano mediante tripsinizzazione. La radioattività cellulo-associata e la radioattività totale vengono quindi misurate mediante gamma-*counter*. La quantità di composto legato è normalizzata per numero di cellule in base al contenuto in proteine, determinato mediante un kit commerciale (Bio-Rad Laboratories).

Per valutare l'affinità di legame del composto le cellule vengono incubate a 4 °C in doppio, sempre in presenza di diluizioni seriali (0.05-50 nmol/l) del radiocomplesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^{+}$ o, alternativamente, di $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^{+}$ per un'ora. A questa temperatura viene inibito il processo di internalizzazione del complesso ligando-recettore e quindi viene misurato esclusivamente l'efficacia dell'interazione tra il ligando e il recettore CCK-B.

La radioattività cellulo-associata viene valutata dopo lavaggio con PBS e recupero per tripsinizzazione delle cellule, viene contata e normalizzata per numero di cellule e a questa si sottrae la percentuale di legame aspecifico.

Le curve di *binding* vengono ottenute tramite un software Kaleigraph (Abelbeck Software, Versione 3.0.5, distribuito da Synergy software, Reading, PA) e visualizzate nel Grafico 6 di seguito riportato. La costante di dissociazione (K_d) e il numero apparente di siti di legame per cellula (B_{max}) sono ottenuti applicando la seguente equazione [21]:

$$\text{Complesso legato} = \frac{B_{max} \cdot [^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP)]^{+}}{K_d + [^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP)]^{+}}$$

B3.7 STUDI DI BIODISTRIBUZIONE *EX VIVO*.

Studi di biodistribuzione *ex vivo* dell'eterocomplesso *syn,anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$ sono condotti in CD-1 *nude* mice (16 settimane di età, peso di 17-23 g) portatori di due allotrapianti: uno positivo per il recettore (A431 transfettate) e uno in cui il recettore non è espresso (A431 parentali). I tumori sono lasciati crescere per 10-14 giorni prima dell'esecuzione dell'esperimento.

50µCi/mouse di peptide radiomarcato sono iniettati attraverso la vena caudale. Dopo un'ora dall'iniezione sangue ed organi di interesse (milza, polmoni, reni, stomaco, intestino e campioni di cellule trapianate) vengono prelevati, pesati e l'attività presente viene contata mediante gamma-*counter*. Al fine di ottenere una accurata determinazione della dose iniettata vengono contate anche diluizioni del complesso iniettato.

I risultati ad 1 ora p.i. sono di seguito riportati nel Grafico 7, espressi come percentuale di dose iniettata per peso di tessuto espresso in grammi (% ID/g), calcolati applicando la seguente formula.

$$\%\ ID/g = \frac{\text{cpm (attività del campione di tessuto)}}{\text{cpm (attività realmente iniettata)} \cdot \text{g (peso del campione di tessuto)}} \cdot 100$$

B4. Risultati e discussione.

B4.1. FORMAZIONE DEL COMPLESSO $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3/43)]^{+}$.

L'octapeptide C-terminale amide non solfatato utilizzato nel presente studio (Cys-Gly-CCK8, schematizzato in Figura 5) è stato selezionato per la sua nota affinità e selettività per i recettori CCK di tipo B (grazie alla presenza del residuo di Tirosina non solfatato [22]) con lo scopo di dimostrare l'applicabilità del metodo del frammento metallico alla marcatura di molecole biologicamente attive (quali i peptidi), aventi un *target* recettoriale. Studi NMR ad alta risoluzione e studi di modellistica molecolare hanno indicato che modifiche chimiche indotte sulla porzione N-terminale di CCK8 per introduzione di un chelante bifunzionale non alterano l'interazione con il recettore [23]. Pertanto, la molecola è stata derivatizzata all'estremità amminica con il dipeptide Cisteina-Glicina. L'amminoacido Glicina è stato selezionato quale spaziatore tra agente chelante bifunzionale, la Cisteina, e il peptide, al fine di minimizzare possibili perturbazioni nel riconoscimento recettoriale. La Cisteina, avente i gruppi NH_2 ed SH liberi per coordinare il metallo, è stata scelta in quanto è nota la sua capacità di coordinare il frammento metallico con elevata attività specifica [24].

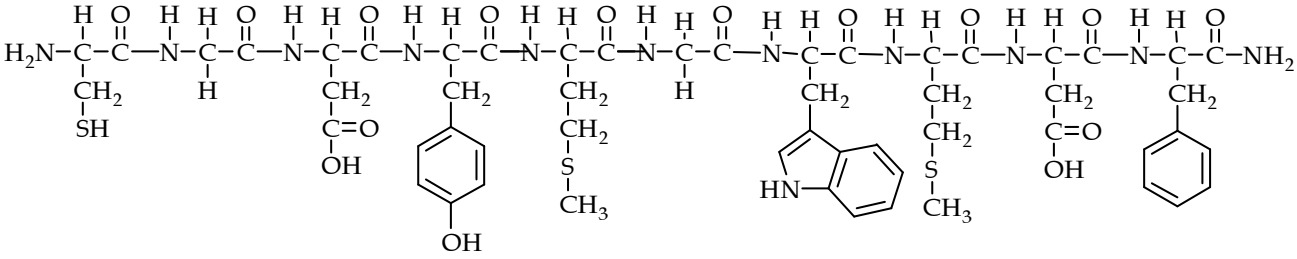
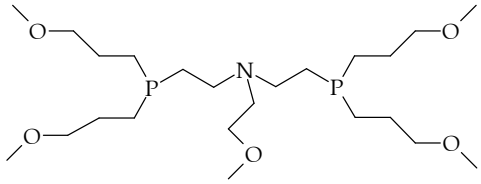
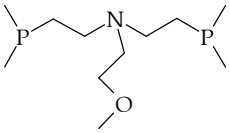


Figura 5. Peptide CCK8 impiegato negli studi.

I leganti amminodifosfinici utilizzati sono stati PNP3 e PNP43, quest'ultimo progettato e sintetizzato (per la sintesi si rimanda al paragrafo A3.2 della Sezione A) con lo scopo di aumentare l'idrofilia del complesso dissimmetrico finale e modularne quindi il profilo farmacocinetico *in vivo* (Figura 6).



PNP3



PNP43

Figura 6. Leganti amminodifosfinici PNP3 e PNP43.

Il complesso $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3/43)]^{+}$ è ottenuto applicando due diverse procedure di sintesi. Secondo un primo approccio, indicato come Metodo 1, l'eterocomplesso dissimmetrico è ottenuto, in alta resa, in due passaggi: una volta formato il *core* azoturo, dopo 30 minuti a temperatura ambiente, per riduzione del pertecnetato sodico con cloruro di stagno (II), in presenza di succinil di-idrazide quale donatore del *core* azoturo, si aggiungono contemporaneamente il legante amminodifosfinico solubilizzato in etanolo e l'analogo peptidico sospeso in tampone fosfato e si riscalda la miscela ad 80 °C per 30 minuti.

Una via di sintesi alternativa, indicata come Metodo 2, proposta per la prima volta in questo lavoro e di straordinaria importanza, soprattutto per i possibili risvolti applicativi, prevede la formazione dell'eterocomplesso nelle medesime concentrazioni di reagenti del Metodo 1, ma in un unico passaggio, con rese radiochimiche paragonabili.

Indipendentemente dal metodo applicato, analisi cromatografiche (TLC e HPLC, Figure 7 e 8) hanno dimostrato che si ottiene una specie dissimmetrica bisostituita del tipo $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3/43)]^{+}$, caratterizzata dalla presenza dei due diversi leganti, l'uno peptidico, l'altro amminodifosfinico, coordinanti il *core* azoturo, mentre non si osservano tracce delle specie simmetriche bisostituite $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)_2]$ e $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP43)_2]^{2+}$.

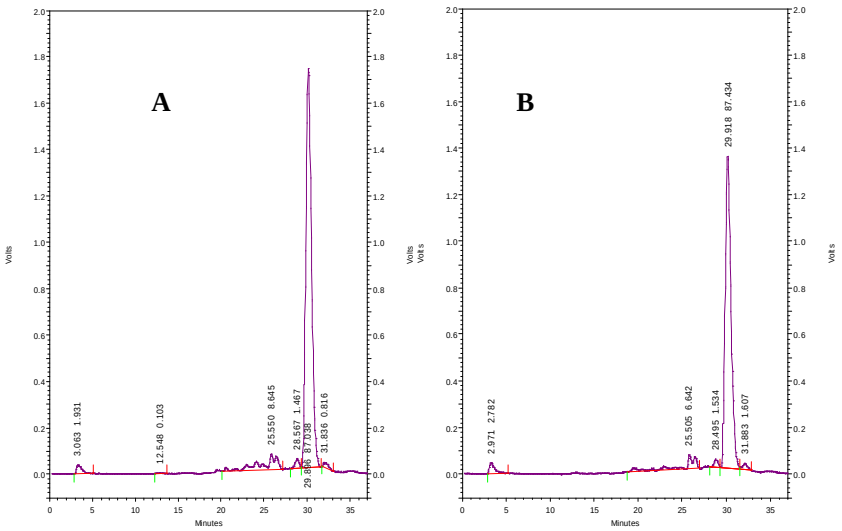


Figura 7. Comparazione HPLC dei complessi *syn/anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$ ottenuti dopo 60 min ad 80 °C con il Metodo 1 (A) e con il Metodo 2 (B).

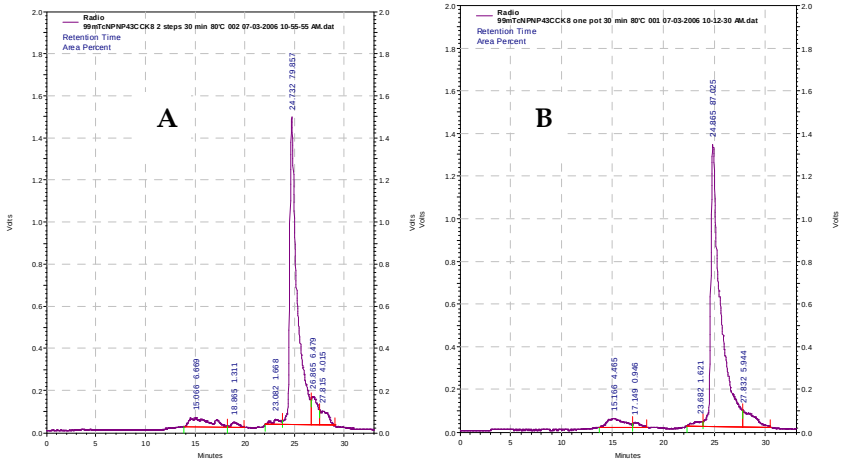


Figura 8. Comparazione HPLC dei complessi *syn/anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP43)]$^{+}$ ottenuti dopo 30 min ad 80 °C con il Metodo 1 (A) e con il Metodo 2 (B).

In entrambi i metodi non si osservano significative variazioni della resa radiochimica del complesso finale nel tempo (30 e 60 minuti), alla temperatura costante di 80 °C. Pertanto, la reazione può considerarsi completa dopo soli 30 minuti. Tempi di reazione più brevi e temperature più basse comportano una riduzione della resa radiochimica.

Con il legante amminodifosfinico PNP43, avente dei sostituenti metilici anzichè 3-metossipropilici su ambedue gli atomi di P(III), è stato possibile sintetizzare il complesso [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP43)]$^{+}$, dotato di una maggiore idrofilia, come dimostrato dal cromatogramma RP_{C18}-HPLC (Figura 9).

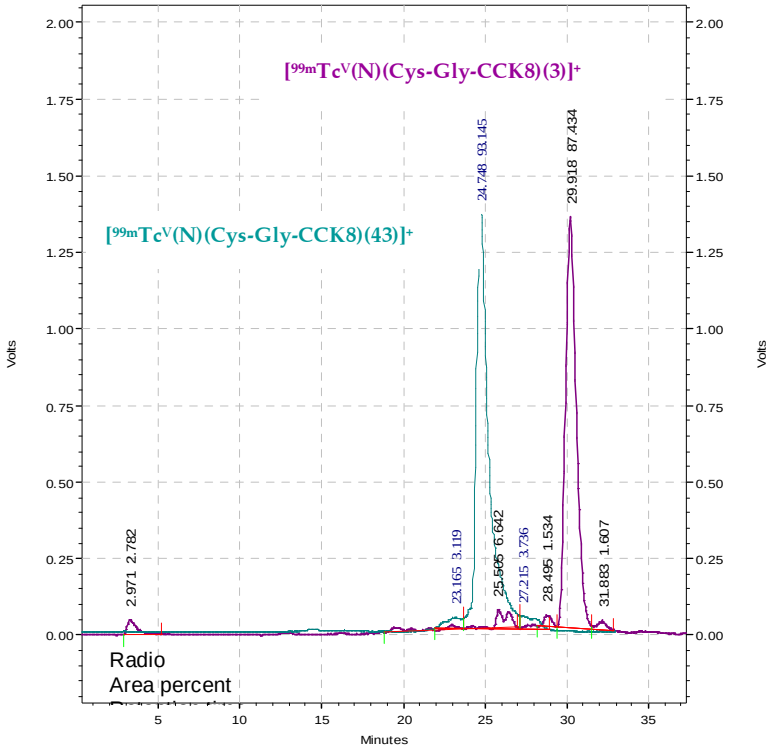


Figura 9. Cromatogramma radio HPLC-RP(C18) dei complessi *syn,anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(3/43)]$^{+}$.

Le tecniche TLC hanno rivelato, analogamente a quanto osservato per i complessi [$^{99m}Tc^{V}$(N)(CysOEt)(PNP3)]$^{+}$ e [$^{99m}Tc^{V}$(N)(CysOEt)(PNP43)]$^{+}$ (Tabella 5), l'esistenza di due distinti *spots* radioattivi in rapporto stechiometrico approssimativamente 60:40, che si ipotizza corrispondano alle forme isomeriche *syn* ed *anti* degli eterocomplessi [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$, generate dalla diversa orientazione del gruppo carbossilico della Cisteina rispetto al *core* azoturo.

La risoluzione dei due diastereoisomeri mediante HPLC non ha dato alcun risultato, nonostante siano state usate svariate condizioni cromatografiche. Pertanto, la miscela contenente entrambi gli isomeri, dopo purificazione, è stata utilizzata per effettuare gli studi successivi.

B4.2 EFFICIENZA DI MARCATURA DEL LEGANTE Cys-Gly-CCK8.

Un fattore cruciale nella preparazione di radiofarmaci recettore-specifici è sicuramente l'attività specifica, intesa come la concentrazione molare di molecola biologicamente attiva che si coordina al radionuclide. Una bassa attività specifica può infatti portare a saturazione dei siti recettoriali con conseguente riduzione della quantità di peptide radiomarcato che raggiunge il sito bersaglio oppure, poiché spesso i peptidi sono dotati di un'attività farmacologica intrinseca, potrebbe indurre tossicità in vari distretti dell'organismo. Pertanto, la concentrazione ideale di molecola biologicamente attiva è compresa tra 10^{-5} e 10^{-6} M.

Come visualizzato nel Grafico 1, la resa radiochimica rimane molto elevata (>85%) in un intervallo di concentrazioni dell'analogo peptidico di 0.2-0.05 mg ($1.13 \cdot 10^{-4}$ e $2.81 \cdot 10^{-5}$ mol), permettendo di concludere che la cisteina terminale mantiene una buona efficacia chelante per il frammento $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP3)]^{2+}$.

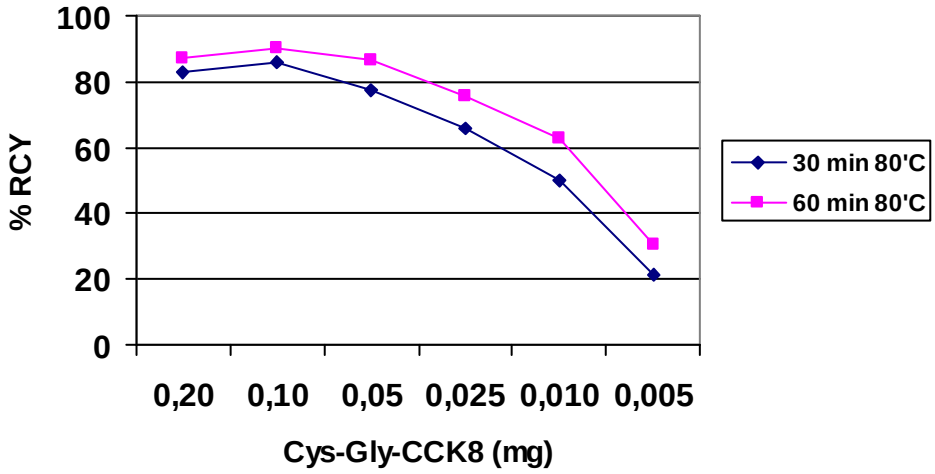


Grafico 1. Variazione di RCY (%) del complesso in funzione della quantità di analogo peptidico (mg).

B4.3 STUDI DI STABILITÀ *IN VITRO*.

Studi di stabilità cinetica *in vitro* hanno dimostrato che entrambi i complessi sono stabili in soluzione salina ed in tampone fosfato (0.02 M; pH=7.4) per 24 ore a 37 °C. $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^{+}$ è inerte nei confronti di reazioni di transchelazione in presenza di un eccesso di Cisteina o Glutatione (Grafico 2).

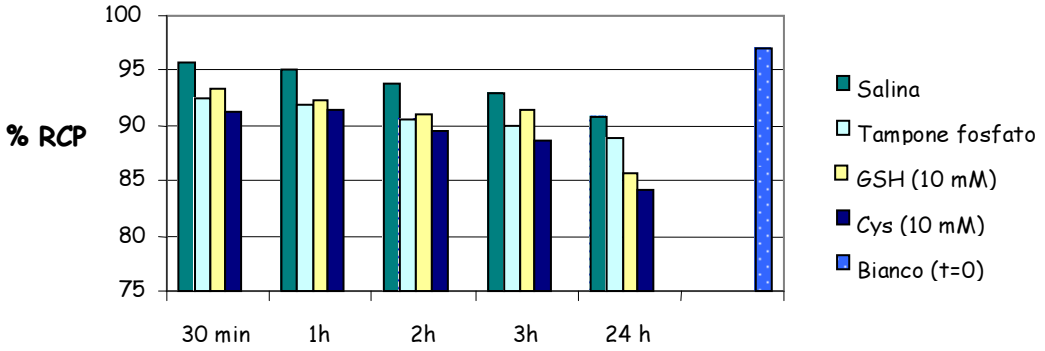


Grafico 2. Studi di transchelazione *in vitro* di *syn/anti*-$[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP3)]^{+}$ a 37 °C.

$[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^{+}$ è inerte a transchelazione in presenza di Cisteina 1 mM o di Glutatione 10 mM, mentre dopo 24 h di incubazione a 37 °C in presenza di Cys 10 mM si nota una riduzione del 48% della purezza radiochimica del campione, come conseguenza di transchelazione tra i leganti (Cys-Gly-CCK8 e Cys) (Grafico 3). Questo fatto dopo somministrazione *in vivo* potrebbe comportare una riduzione dell'attività libera circolante. Tuttavia, studi condotti in soluzione acquosa di Cys 1mM (concentrazione più vicina a quella fisiologica) evidenziano una riduzione della velocità di transchelazione del complesso, che risulta quindi più stabile (dopo 24 h di incubazione RCP~80%).

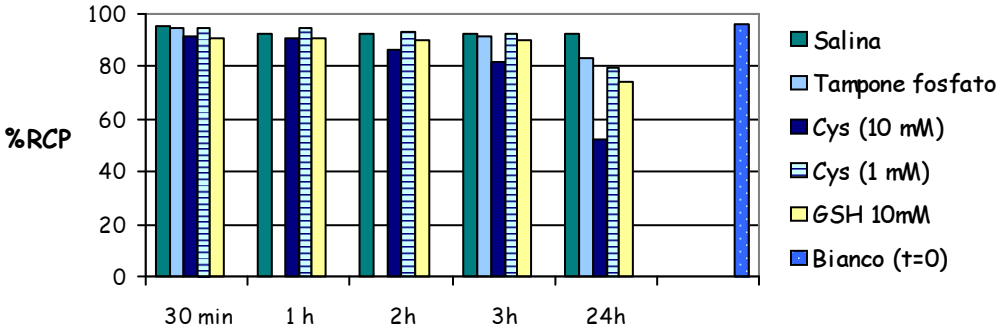


Grafico 3. Studi di transchelazione *in vitro* di *syn/anti*-$[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\text{-}Gly\text{-}CCK8)(PNP43)]^{+}$ a 37 °C.

Per quanto concerne la stabilità all'idrolisi enzimatica, [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$ è stabile nelle prime 3 ore; dopo 24 ore di incubazione a 37 °C è stabile in siero umano con una purezza radiochimica di circa 80%, che si riduce al 50% in siero di *mouse* (Grafico 4).

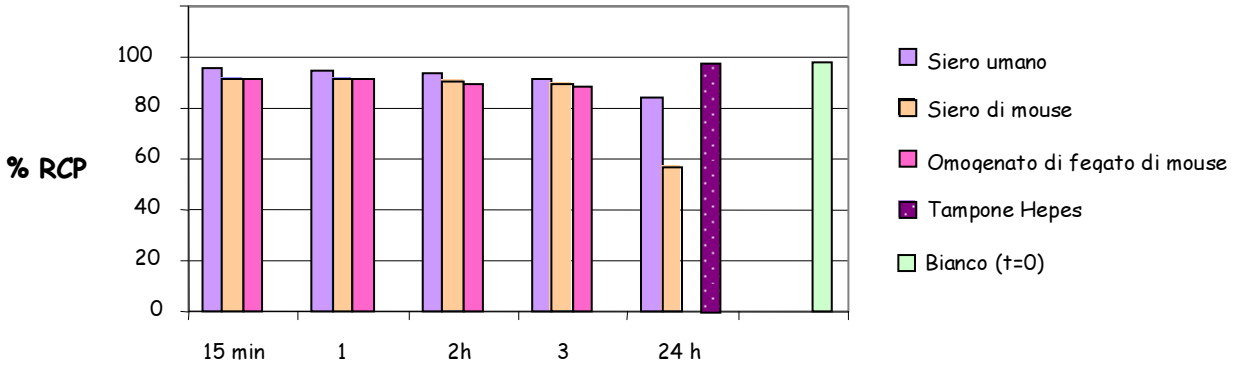


Grafico 4. Studi di stabilità *in vitro* di *syn/anti* [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$.

I risultati per [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP43)]$^{+}$, visualizzati nel Grafico 5, indicano che l'eterocomplesso mostra una buona stabilità in siero umano nelle prime tre ore con una RCP >74% che però decresce drasticamente alle 24 ore (RCP 30%).

Dopo incubazione in siero di *mouse* si osserva una progressiva degradazione del complesso con una riduzione della RCP che dopo 3 ore è solo del 50%.

L'eterocomplesso presenta una bassa stabilità dopo incubazione in omogenato di fegato di *mouse* (RCP 20% dopo 3 ore di incubazione a 37 °C). Molto probabilmente, ciò è il risultato di una degradazione enzimatica della catena peptidica, come confermato da analisi cromatografiche (HPLC e TLC), che mostrano la formazione di vari prodotti di degradazione più idrofili.

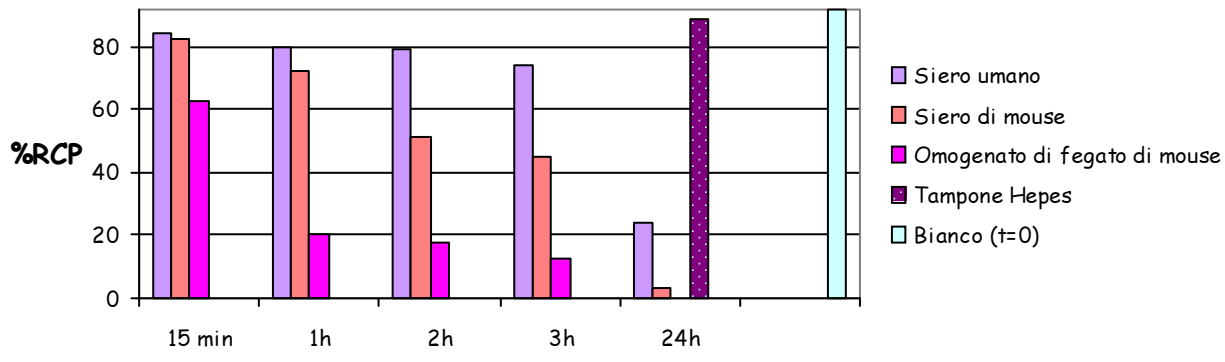


Grafico 5. Studi di stabilità *in vitro* di *syn/anti* [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP43)]$^{+}$.

B4.4 STUDI DI *BINDING IN VITRO* DI CCK-B.

Studi *in vitro* su cellule A431 iperesprimenti recettori CCK-B dimostrano che i complessi *syn,anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$ possiedono alta e specifica affinità di legame per i recettori CCK-B, con curve di saturazione dei siti di legame caratteristiche e costante di dissociazione (K_d) di 19.0 ± 4.6 nmol/l per [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$ e 26.8 ± 2.9 nmol/l per [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP43)]$^{+}$ con il numero di siti di legame per cellula (B_{max}) rispettivamente di 7.7 · 10^5 e 8.2 · 10^6 siti recettoriali/cellula (Grafico 6). Tali valori dimostrano che l'introduzione del dipeptide cisteina-glicina e del frammento metallico [$^{99m}Tc^{V}$(N)(PNP)]$^{2+}$ non perturba la naturale affinità del peptide nativo CCK8 per il suo recettore CCK-B.

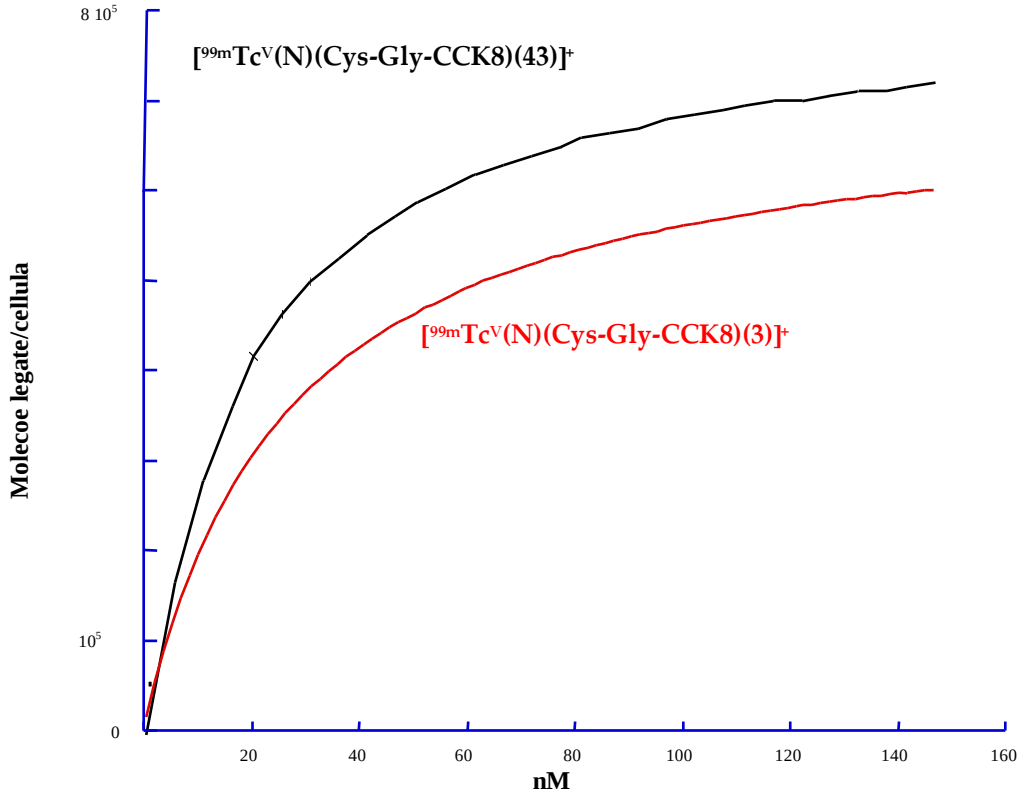


Grafico 6. Studi di *binding* per i complessi [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$ (*syn/anti*) eseguiti su cellule A341-CCK-B, alla temperatura di 4 °C.

B4.5 STUDI DI BIODISTRIBUZIONE *EX VIVO*.

I risultati di biodistribuzione ad un'ora dopo l'iniezione del complesso [$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$, condotti nel modello animale CD-1 *nude mice* portatore sia dell'allotrapianto esprimente il recettore CCK-B che del controllo, sono visualizzati nel Grafico 7.

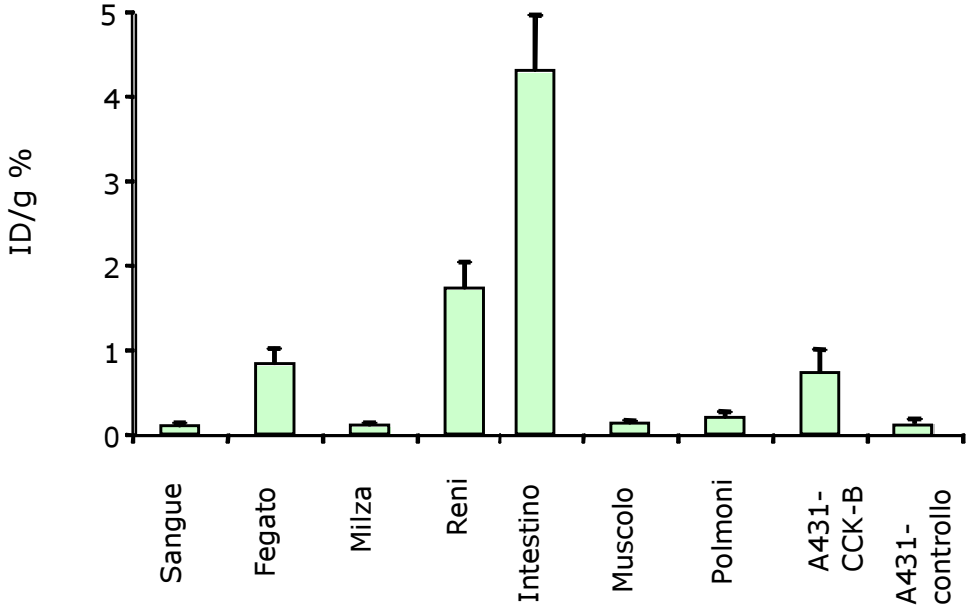


Grafico 7. Biodistribuzione ad un'ora p.i di *syn,anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$.
La radioattività è espressa come % ID per grammo di tessuto.

Il complesso presenta una rapida *clearance* ematica e dai tessuti non bersaglio, quali polmoni, milza, muscolo e tumore controllo. Analogamente a quanto già riportato per altri radiocomplessi di CCK8, si ha un parziale accumulo a livello renale.

L'attività nel fegato ed in corrispondenza del tratto gastro-intestinale è alta, ma compatibile con un'elevata espressione di recettori CCK-B a livello gastrico, e potrebbe anche essere ricondotta ad eliminazione epato-biliare del complesso.

Il dato tuttavia più interessante è che, ad un'ora dall'iniezione, si osserva una ritenzione specifica del complesso nelle cellule A431-CCK-B rispetto al tumore controllo con un rapporto di 4:1, indicando una buona selettività *in vivo* per i tessuti esprimenti il recettore.

Nonostante a livello cerebrale siano presenti innumerevoli recettori CCK-B, il complesso non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica.

B5. Conclusioni.

Nella seconda Sezione di questo lavoro di tesi si sono valutate le caratteristiche radiochimiche e le proprietà biologiche *in vitro* ed *ex vivo* di *syn/anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3)]$^{+}$ e del più idrofilico *syn/anti*-[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP43)]$^{+}$, quali possibili agenti *target*-specifici per la visualizzazione di cellule tumorali esprimenti il recettore delle colicistochinine di tipo B.

I radiocomplessi sono stati sintetizzati in alta resa, impiegando basse concentrazioni di peptide Cys-Gly-CCK8 ed applicando una strategia sintetica semplificata, pratica e veloce, costituita da un unico passaggio che si presta ad una possibile formulazione in *kit*, da poter utilizzare in qualsiasi centro di Medicina Nucleare provvisto di un generatore di Tc-99m.

[$^{99m}Tc^{V}$(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$ sono risultati inerti nei confronti di reazioni di transchelazione e studi condotti in liquidi biologici hanno rivelato una buona stabilità verso reazioni di idrolisi enzimatica.

Studi *in vitro* condotti su cellule A431 iperesprimenti recettori CCK-B hanno dimostrato che i complessi *syn,anti*-[^{99m}Tc(N)(Cys-Gly-CCK8)(PNP3/43)]$^{+}$ possiedono alta e specifica affinità di legame per i recettori CCK-B, dimostrando che l'introduzione dell'agente chelante e del frammento metallico [$^{99m}Tc^{V}$(N)(PNP3/43)]$^{2+}$ non perturba la naturale affinità del peptide nativo CCK8.

La specificità dell'interazione del ligando per il suo recettore è mantenuta nel modello *in vivo* di *nude mice*, mostrando alti livelli di accumulo specifico in cellule trapiantate esprimenti CCK-B, con un rapporto di 4:1 rispetto al tumore di controllo.

B6. Riferimenti bibliografici.

[1] S. Liu, "The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals" *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 45-461.

[2] H. N. Jr Wagner, "Nuclear medicine: 100 years in the making", *J Nucl Med,***1996**, 37:18N, 24N, 37N.

[3] P.U. Freda, "Somatostatin analogs in acromegaly", *J Clin Endocrinol Metab*, **2002**, 87:3013–3018.

[4] J. E. Jorpes, V. Mutt, "Cholecystokinin and pancreozymin: One single hormone?", *Acta Physiol Scand,* **1966**, 66:196.

[5] F. Noble, Florence Noble, Stephen A. Wank, Jacqueline N. Crawley, Jacques Bradwejn, Kim B. Seroogy, Michel Hamon, And Bernard P. Roques1 "Structure, Distribution, and Functions of Cholecystokinin Receptors", *Pharm. Rev.,* Vol. 51, No. 4 International Union of Pharmacology. XXI.

[6] S. Schulz, C. Rocken, C. Mawrin, S. Schulz, "Immunohistochemical Localization of CCK1 Cholecystokinin Receptors in Normal and Neoplastic Human Tissues", *J Clin Endocrinol Metab*, **2005**, 90(11):6149–6155.

[7] Maria Björkqvist, "Effects of CCK2 Receptor Blockade on Growth Parameters in Gastrointestinal Tract and Pancreas in Rats", *Pharmacology & Toxicology,* **2001**, 89, 208–213.

[8] J. C. Reubi, B. Waser, J. C. Schaer, U. Laederach, J. Erion, A. Srinivasan, M.A. Schmidt, J. E. Bugaj, "Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues *in vitro* and *in vivo*", *Eur J Nucl Med*, **1998**, 25:481–490.

[9] T. M. Behr, N. Jenner, S. Radetzky, M. Be´he´, S. Gratz, S. Yucekent, F. Raue, W. Becker, "Targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptors *in vivo*: preclinical and initial clinical evaluation of the diagnostic and therapeutic potential of radiolabelled gastrin", *Eur J Nucl Med*, **1998,** 25:424–430.

[10] D. J. Kwekkeboom, W. H. Bakker, P. P. Kooij, J. Erion, A. Srinivasan, M. de Jong, J. C. Reubi, E. P. Krenning, "Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma", *Eur J Nucl Med*, **2000**, 27:1312–1317.

[11] C. Decristoforo, L. Melendez-Alafort, J. K. Sosabowski, S. J. Mather, "99mTc-HYNIC-[Tyr3]-Octreotide for Imaging Somatostatin-Receptor-Positive Tumors: Preclinical Evaluation and Comparison with 111In-Octreotide", *J. Nucl. Med.*, **2000**, *41*, 1114-1119.

[12] J. A. Barrett, A. C. Crocker, D. J. Damphousse, S. J. Heminway, S. Liu, D. S. Edwards, J. L. Lazewatsky, M. Kagan, T. J. Mazaika, T. R. Carroll, "Biological Evaluation of Thrombus Imaging Agents Utilizing Water Soluble Phosphines and Tricine as Coligands When Used To Label a Hydrazinonicotinamide-Modified Cyclic Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonist with 99mTc.", *Bioconj. Chem.*, **1997**, *8*, 155-60.

[13] A. Egli, R. Alberto, L. Tannahill, R. Schibli, U. Abram, A. Schaffland, R. Waibel, D. Tourwe´, L. Jeannin, K. Iterbeke, P. A. Schubiger, "Organometallic 99mTc-Aquaion, Labels Peptide to an Unprecedented High Specific Activity", *J. Nucl. Med.*, **1999**, 40, 1913-1917.

[14] E. von Guggenberg, "99mTc-Labeling and in Vitro and in Vivo Evaluation of HYNIC- and (Nr-His)Acetic Acid-Modified [D-Glu1]-Minigastrin", *Bioconj. Chem.,* **2004,** *15,* 864-871.

[15] P. Laverman, "Two Technetium-99m-Labeled Cholecystokinin-8 (CCK8) Peptides for Scintigraphic Imaging of CCK Receptors", *Bioconj. Chem.,* **2004,** *15,* 561-568.

[16] T.M. Behr, M.P. Bèhè, C. Angerstein, M. Hufner, W. Becker, "Cholecystokinin (CCK)-B/gastrin-receptor binding peptides for diagnosis and therapy of metastatic medullary thyroid cancer", *J Nucl. Med.*, **2001**, 42(Suppl):157P (Abstract 587).

[17] B. F. Bernard, M. Bèhè, W. A. P. Breeman, B. Nock, H. R. Maecke, J. Schmitt, T. M. Behr, T. Maina, B. Waser, J. Reubi, E. P. Krenning, M de Jong, "Preclinical evaluation of minigastrin analogs for CCK-B receptor targeting", *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2003**, 18:281.

[18] Heidrun Fink, A. Rex, M. Voits, J.-P. Voigt, "Major biological actions of CCK - a critical evaluation of research findings", *Brain Res.*, **1998**, 123:77±83.

[19] D. Perrin, W. Aramarego, "Purification of Laboratory Chemicals", *Pergamon Press,* **1980**.

[20] S. Agostini, C. Bolzati, E. Didonè, M. Cavazza-Ceccato, F. Refosco, L. Aloj, C. Arra, M. Aurilio, A. Lucia Tornesello, D. Tesaurod, G. Morelli, "The [Tc(N)(PNP)]2+ metal fragment labeled cholecystokinin-8 (CCK8) peptide for CCK-2 receptors imaging: in vitro and in vivo studies", *J. Pept. Sci.,* **2007**, 13: 211–219.

[21] L. Aloj, C. Caracò, M. Panico, A. Zannetti, S. Del Vecchio, D. Tesauro, S. De Luca, C. Arra, C. Pedone, G. Morelli, M. Salvatore, "In Vitro and In Vivo Evaluation of ^{111}In-DTPAGlu-G-CCK8 for Cholecystokinin-B Receptor Imaging.", *J Nucl. Med.,* **2004**, 45: 485-494.

[22] J.C. Reubi, B. Waser, J. C. Schaer, U. Laederach, J. Erion, A. Srinivasan, M. A. Schmidt, J. E. Bugaj, "Unsulfated DTPA- and DOTA-CCK analogs as specific high

affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues *in vitro* and *in vivo*", *Eur J Nucl Med*, **1998**, 25:481–490.

[23] S. De Luca, R. Ragone, C. Bracco, G. Digilio, L. Aloj, D. Tesauro, M. Saviano, C. Pedone, G. Morelli, "A Cyclic CCK8 analogue selective for the Cholecystokinin type A r eceptor: design, synthesis, NMR structure and binding measurements", *Chem Bio Chem* **2003**, 4: 1176-1187.

[24] C. Bolzati, A. Boschi, L. Uccelli, F. Tisato, F. Refosco, A. Cagnolini, A. Duatti, S. Prakash, G. Bandoli, A. Vittadini, "Chemistry of the strong electrophilic metal fragment $[^{99}Tc(N)(PXP)]^{2+}$ (PXP = Diphosphine ligand). A novel tool for the selective labeling of small molecules", *J. Am. Chem. Soc.,* **2002**, *124*: 11468-11479.

Sezione C

Sintesi di azoturo complessi di Re-188 per radioterapia recettore-specifica.

C1. Obiettivo.

In questa Sezione è riportato il trasferimento del *know-how* acquisito nello sviluppo della tecnologia del frammento metallico $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ alla sintesi di analoghi radiocomplessi di Re-188, quali potenziali agenti ad azione terapeutica.

Nella pratica clinica radionuclidi che decadono attraverso l'emissione di particelle α e β^- o di elettroni Auger, di energia adatta a penetrare e distruggere tessuti anormali, trovano applicazione come radioterapici. Tra questi il renio, congenere chimico del tecnezio, nei suoi radionuclidi Re-186 e Re-188, ha assunto negli ultimi anni un notevole interesse dal punto di vista clinico.

Interessanti proprietà nucleari ($E_{\beta max}$=2.12 MeV, $t_{½}$=16.8 h; E_{γ}=155 keV, 15%) e la possibilità di disporre di una sorgente trasportabile (generatore) fanno del radionuclide Re-188 un potenziale candidato per la preparazione di radiofarmaci utilizzabili in radioterapia. La contemporanea emissione di radiazioni gamma può, infatti, essere sfruttata per monitorare il percorso *in vivo* del radiofarmaco e a fini dosimetrici attraverso l'applicazione di metodi scintigrafici.

I radiofarmaci che trovano maggiormente impiego in radioterapia metabolica sono quelli sito-specifici, caratterizzati dalla presenza di una molecola biologicamente attiva che ne determina la farmacocinetica e la farmacodinamica *in vivo*. La produzione di questi radiocomplessi richiede un metodo di marcatura efficiente, che non alteri le proprietà biologiche native della biomolecola, al fine di massimizzare la dose di radiazione citotossica in grado di raggiungere il tessuto bersaglio, erogando contemporaneamente la dose più bassa possibile ai tessuti sani circostanti. La somministrazione sistemica di radiofarmaci sito-specifici, idealmente progettati per localizzarsi in modo altamente specifico in siti tumorali la cui distribuzione nell'organismo sia sconosciuta, offre quindi la possibilità di intervenire nel trattamento di un'ampia gamma di patologie, a differenza dell'irradiamento radioterapico convenzionale o esterno (che gioca tuttavia un ruolo vitale nel trattamento dei tumori) che non è efficace nella cura di siti tumorali secondari o metastatici localizzati al di fuori dell'area irradiata.

La possibilità di sintetizzare complessi sito-specifici con Re-188, in grado di mantenere un'elevata specificità nei confronti del tumore o della lesione, potrebbe assumere un

importante significato dal punto di vista terapeutico, riassumendo in sè i vantaggi della radioterapia *target*-specifica e del radionuclide Re-188.

Obiettivo della ricerca presentata in questa Sezione è stato verificare la possibilità di trasferire la tecnologia del frammento metallico $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ alla preparazione di analoghi complessi dissimmetrici di Re-188 del tipo $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP)]^{+/0}$, aventi un *core* azoturo $Re^{V}(N)$ coordinato da due diversi leganti bidentati: un legante amminodifosfinico che stabilizza lo stato di ossidazione (V) e interviene nella modulazione della lipofilia del complesso, e un legante bidentato cisteinato derivato. La scelta dell'amminoacido cisteina è basata su studi condotti in precedenza con derivati cisteinati che ne hanno dimostrato l'efficacia chelante con elevata attività specifica per il frammento. Tale legante può essere modificato all'estremità amminica (come CysNAc) oppure all'estremità carbossilica (come CysOMe, CysOEt) ed esprimere così come atomi coordinanti il metallo rispettivamente le coppie O^- e S^- oppure NH_2 e S^-, dando così origine a composti nell'ordine neutri o monocationici.

Mediante formazione di un legame carboamidico all'estremità terminale libera, la cisteina può essere coniugata, direttamente o mediante uno spaziatore, ad una molecola bioattiva quale un peptide, dotata di specificità recettoriale, in grado quindi di veicolare il radiocomplesso al sito di azione dove si localizza, permettendo la visualizzazione scintigrafica e/o il trattamento radioterapeutico del tessuto patologico esprimente il recettore.

C2. Introduzione.

C2.1 RADIOTERAPIA.

La radioterapia prevede il trattamento delle masse neoplastiche mediante l'uso di radiazioni ionizzanti, causando nelle cellule tumorali un danno incompatibile con la loro sopravvivenza ed evitando il più possibile alterazioni gravi e irreversibili dei tessuti sani circostanti. Può essere effettuata secondo varie modalità.

I. RADIOTERAPIA ESTERNA

Nella radioterapia esterna il fascio di radiazioni, originato da un'apparecchiatura esterna al paziente, viene indirizzato sul tumore attraverso una o più regioni cutanee. Di prevalente impiego sono i raggi X (prodotti dagli apparecchi di roentgenterapia, dagli acceleratori e dai betatroni) e i raggi gamma, generati dalle unità di telecobaltoterapia e telecesioterapia. La roentgenterapia viene oggi impiegata nei tumori che interessano la cute e i tessuti sottocutanei. Le radiazioni ad alta energia sono particolarmente utili per l'irradiazione di masse tumorali localizzate in profondità, in quanto dotate di un elevato potere di penetrazione, risparmiando perciò sia la cute, sia i tessuti sani situati al di fuori del raggio d'azione del fascio di radiazioni. Il campo d'impiego comprende la cura dei linfomi, dei seminomi del testicolo e del carcinoma prostatico e, in genere, di voluminose masse neoplastiche viscerali.

II. RADIOTERAPIA INTERSTIZIALE ED ENDOCAVITARIA.

La radioterapia interstiziale (o curieterapia) prevede l'impianto di preparati radioattivi in forma di aghi, fili, o semi nello spessore del tessuto tumorale. Consente pertanto l'emissione di dosi elevate di radiazioni in un piccolo volume e in un tempo relativamente breve. Si ricorre a sorgenti radioattive naturali o artificiali emittenti raggi gamma (radio, cesio e soprattutto iridio). Trova indicazione nei tumori che si prestano all'applicazione locale di radiazioni (carcinomi del labbro, della bocca, della lingua, della pelle, della mammella, dell'ano). La curieterapia endocavitaria consiste nell'introduzione di preparati radioattivi contenuti in speciali applicatori o in apparecchi appositamente modellati per

essere adattati in cavità naturali dell'organismo (vagina, utero). Le fonti emittenti sono le stesse utilizzate per la radioterapia interstiziale.

III. RADIOTERAPIA PALLIATIVA E DI COMPLEMENTO CHIRURGICO.

La radioterapia dei tumori impiegata a scopo palliativo si propone di migliorare la qualità di vita del paziente agendo solo sul sintomo; sono comuni obiettivi terapeutici la riduzione di una massa o di un'infiltrazione tumorale responsabili di sintomi da compressione, occlusione o infiltrazione (per esempio, dispnea da ostruzione bronchiale o dolore da invasione di un nervo o da fratture ossee conseguenti a metastasi). Come per la chemioterapia oncologica, anche per la radioterapia dei tumori si può individuare un'area di utilizzazione a scopo precauzionale, col fine di eliminare focolai metastatici residuati dopo un primo intervento terapeutico. È il caso della radioterapia sulla mammella residua dopo interventi di tipo conservativo (tumorectomia o quadrantectomia); nelle stazioni linfatiche regionali, clinicamente sane, dopo trattamento del tumore primitivo (tumori di bocca, faringe, laringe, testicolo, prostata, ovaio, mammella o utero, linfomi maligni ai primi stadi). Complementare all'intervento chirurgico, la radioterapia dei tumori può precederlo o seguirlo. Nel primo caso il trattamento ha lo scopo di ridurre una massa tumorale così da renderla operabile; nel secondo viene utilizzata per eliminare appunto possibili focolai microscopici residui. In associazione alla chemioterapia, la radioterapia trova impiego nel consolidamento di risposte farmacologicamente complete nella cura dei linfomi. Una modalità di recente introduzione è data dalla radioterapia intraoperatoria, effettuata cioè durante l'intervento chirurgico, allo scopo di indirizzare le radiazioni solo sul tessuto tumorale senza l'interposizione della cute o degli organi vitali limitrofi. Messa a punto per migliorare le strategie terapeutiche di alcuni tumori addominali, si deve ancora considerare una tecnica sperimentale.

IV. RADIOTERAPIA METABOLICA.

La radioterapia metabolica prevede l'impiego di sorgenti radioattive artificiali introdotte per via orale o endovenosa [1]. Nella maggior parte dei casi si fa ricorso a radioisotopi per la cura delle metastasi da tumori della tiroide (iodio radioattivo): l'isotopo viene attivamente captato dal tessuto tumorale, esercitando l'azione terapeutica in modo costante anche sui focolai più inaccessibili. La somministrazione intraddominale di

radiooro o radiofosforo viene ancora utilizzata in qualche caso, dopo l'intervento chirurgico per tumori delle ovaie, allo scopo di eradicare residui tumorali a livello del peritoneo. Radiofosforo viene somministrato nei pazienti portatori di policitemia vera.
Obiettivo primario della radioterapia metabolica è il direzionamento della dose terapeutica ai tessuti patologici, sia primari che loro metastasi, con minimi effetti su organi critici, quali midollo osseo, pertanto la scelta di un opportuna molecola vettrice è essenziale (Figura 1).

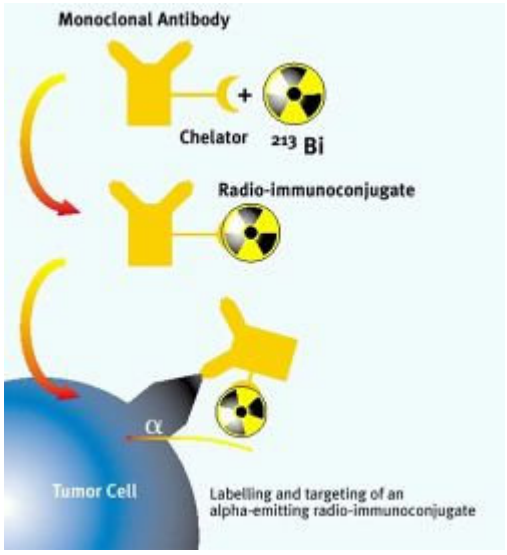


Figura 1. Esempio di radioterapia metabolica mediante anticorpi.

L'efficacia di un radiofarmaco dipende essenzialmente dalla dose assorbita e dalla porzione di questa in grado di raggiungere i tessuti neoplastici. Tali parametri, a loro volta, dipendono da dose somministrata, cinetica di captazione, eliminazione, permanenza del radiofarmaco nella sede della lesione, ed infine dalle proprietà chimico-fisiche del radionuclide (tipo di emissione radioattiva, *range* delle particelle emesse). Nella terapia tumorale si possono utilizzare radionuclidi emittenti particelle β, α o elettroni Auger. Questi tre tipi di emissioni sono in grado di trasferire e depositare la loro energia alla materia vivente con un'intensità che dipende da energia, carica e massa delle particelle. Il LET (*Linear Energy Transfer*) è l'energia depositata dalla radiazione (in keV) lungo un percorso rettilineo (espresso in micrometri) all'interno dei tessuti attraversati. Sono radiazioni a basso LET fotoni e particelle β (come quelle emesse da I-131 e Y-90), la cui azione radiobiologica è influenzata dalla presenza di ossigeno e che, dipendentemente dalla loro energia, sono in grado di effettuare percorsi nei tessuti di alcuni millimetri. Sono

radiazioni ad alto LET particelle α (sono α emittenti As-211, Bi-213), ed elettroni Auger (emessi da I-125), la cui azione radiobiologica non è influenzata dalla presenza di ossigeno ma è limitata al sito di decadimento in un raggio di alcuni nanometri (Tabella 1, Figura 2).

Decadimento	Particelle	Energia	*Range*
β	elettroni	medio-alta (0.5-2.3 MeV)	1-12 mm
α	nuclei di He	alta (alcuni MeV)	50-100 µm
EC/IC	elettroni Auger	molto bassa (eV-keV)	alcuni nm

Tabella 1. Caratteristiche fisiche di emissioni utilizzate in radioterapia. EC=cattura elettronica; IC=conversione interna.

Radiazioni a basso LET hanno bassa densità di ionizzazione e ne servono molte (centinaia) per indurre un effetto biologico visibile come la morte cellulare; per radiazioni ad alto LET la distanza tra decadimento e ionizzazione è minore, la densità di ionizzazione è pertanto maggiore e per questo sono molto più efficienti nel produrre effetti letali.

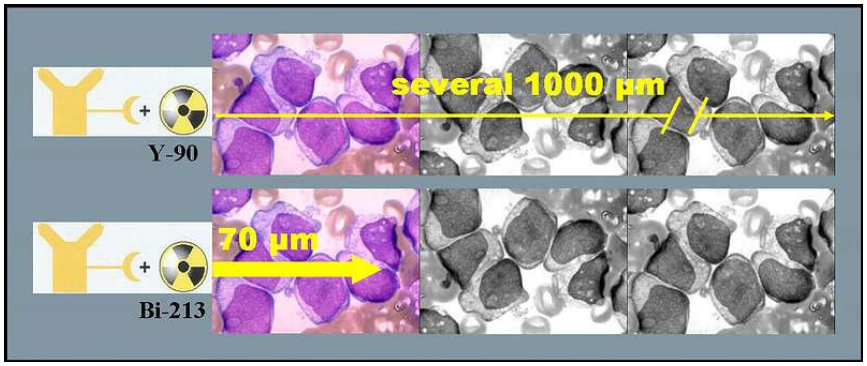


Figura 2. Confronto di cammino tissutale tra un β- emittente, Y-90, e un α emittente, Bi-213.

C2.1.1 SCELTA DEL RADIONUCLIDE.

Sebbene la scelta del radionuclide non possa essere indipendente da quella della molecola vettrice, si possono fare alcune considerazioni generali, inerenti il tipo di particelle emesse e la loro emivita fisica.

Particelle β.

Attualmente in radioterapia metabolica i radionuclidi che trovano maggiore impiego sono quelli che emettono particelle β, teoricamente possono essere utilizzate sia particelle β^+ che β^-, ma i β^- emittenti sono i più utilizzati. Gli elettroni emessi da un nucleo in decadimento hanno energie che si distribuiscono in un *range* fino ad un valore massimo (Tabella 2). Ogni particella emessa attraversa la materia e segue un cammino complesso, perdendo parte dell'energia cinetica ed infine si esaurisce. Poiché possiedono LET molto bassa (0.2 keV/µm), queste particelle sono scarsamente ionizzanti e inefficaci nel danneggiare il DNA e determinare morte cellulare. Di conseguenza, l'uso di isotopi β^- emittenti come agenti terapeutici prevede la presenza di un'alta concentrazione di radionuclide in prossimità dei tessuti patologici, in modo da avere migliaia di elettroni per nucleo.

Radionuclide	Emivita	$\bar{E}_{\beta^-}$ * [keV]	$\check{R}_{\beta^-}$ ** [mm]	$E_{\beta^-(max)}$ * [keV]	$R_{\beta^-(max)}$ ** [mm]
^{33}P	25.4 g	77	0.09	249	0.63
^{169}Er	9.4 g	99	0.14	350	1.1
^{177}Lu	6.7 g	133	0.23	497	1.8
^{67}Cu	61.9 h	141	0.26	575	2.1
^{131}I	8.0 g	182	0.39	610	2.3
^{153}Sm	46.8 h	224	0.54	805	3.3
^{198}Au	64.8 h	312	0.89	961	4.2
^{109}Pd	13.5 h	361	1.1	1028	4.5
^{186}Re	3.8 g	349	1.1	1077	4.8
^{165}Dy	2.3 h	440	1.5	1285	5.9
^{89}Sr	50.5 g	583	2.2	1491	7.0
^{32}P	14.3 g	695	2.8	1710	8.2
^{188}Re	17.0 h	764	3.1	2120	10.4
^{90}Y	64.1 h	935	4.0	2284	11.3

Tabella 2. Caratteristiche fisiche di alcuni radionuclidi beta emittenti.
* energia di particelle β emessa per disintegrazione (Kocher, 1981)
** *range* di particelle β in acqua (ICRU Report 37, 1984).

Un importante vantaggio del lungo *range* (mm) di ogni elettrone emesso è l'effetto *crossfire*, per il quale anche le cellule adiacenti a quella bersaglio del radiofarmaco vengono irradiate. Non è quindi necessaria, al fine terapeutico, la presenza del radionuclide in ogni cellula neoplastica né la sua internalizzazione (Figura 3). Questo effetto permette di superare i problemi legati all'eterogeneità di espressione di molecole bersaglio, quali antigeni o recettori.

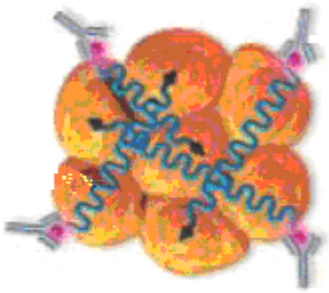


Figura 3. Effetto *crossfire* di radioisotopi β^- emittenti.

Radioisotopi emittenti particelle β^- con lungo *range* (come P-32) possono aumentare la probabilità di danno ai tessuti sani, ad esempio nel trattamento palliativo di metastasi ossee, determinando un significativo aumento di irradiamento del midollo osseo e perciò sono da preferirsi emittenti a corto *range* (come P-33) che veicolano una dose minore al midollo osseo (Figura 4).

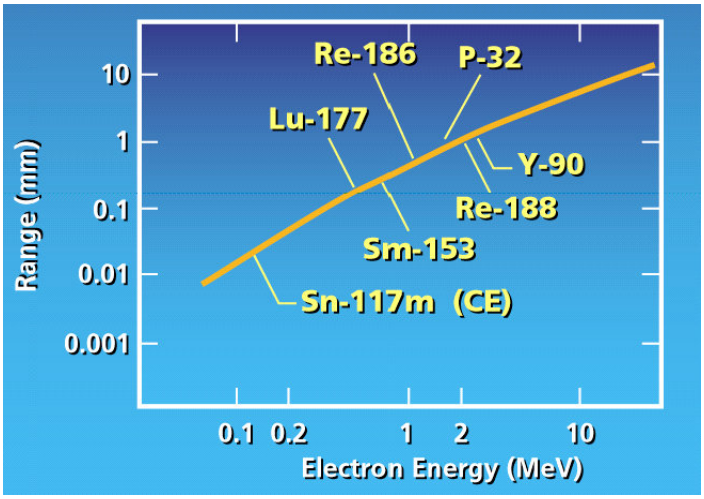


Figura 4. *Range* di elettroni in tessuti molli (per energia β massima).

La maggior parte dei radionuclidi β^- emittenti, che trovano applicazione in terapia sono

caratterizzati dall'emissione contemporanea di fotoni gamma, che non aumentano significativamente la dose veicolata ai tessuti patologici, ma contribuiscono considerevolmente ad aumentare la dose a cui è esposto l'intero organismo, eppur tuttavia possono essere convenientemente sfruttati nella visualizzazione del percorso *in vivo* del radiofarmaco.

Particelle α.

Le particelle α emesse da radionuclidi (Tabella 3) sono nuclei di elio con energie da 4 a 9 MeV, con i *ranges* tissutali corrispondenti compresi tra 40 e 100 µm. Tali emissioni viaggiano seguendo cammini rettilinei, inizialmente depositando la loro energia, di circa 80 keV/µm nei tessuti molli, ed aumentando l'energia ceduta prima di terminare il cammino. L'energia di deposito tipica di una particella α che attraversa una cellula è di circa 600 keV, che corrisponde a 0.14 Gy di dose assorbita dal nucleo cellulare per ogni colpo. Questi valori dipendono, tra le altre cose, dalle dimensioni del nucleo cellulare.

Radionuclide	**Emivita**	$\bar{E}_\alpha$ * **[MeV]**	$\check{R}_\alpha$ ** **[µm]**
^{211}At	7.2 h	6.79	60
^{212}Bi	60.6 min	7.80	75
^{213}Bi	45.7 min	8.32	84

Tabella 3. Caratteristiche fisiche di alcuni radionuclidi alfa emittenti.
* energia di particelle α emessa per disintegrazione (Kocher, 1981);
** *range* di particelle α calcolato usando l'equazione di regressione polinomiale (ICRU Report 49, 1993):
$R = 3.87E + 0.75E^2 - 0.45$, con R *range* (in µm) in unità di densità del materiale;
E energia delle particelle α (in MeV).

La natura stocastica della deposizione di energia di particelle β non è molto importante per dosi assorbite maggiori di 1 Gy, poiché ogni cellula subisce gli effetti di migliaia di cammini di particelle individuali; per cellule attraversate da alcune particelle α, invece, l'energia specifica *standard* depositata per unità di massa (ad esempio la dose assorbita) non rappresenta un parametro appropriato a fini dosimetrici. Per superare questo problema, molti autori hanno proposto approcci microdosimetrici per calcolare l'energia specifica depositata individualmente nelle cellule e per predire l'effetto cellulare dell'irradiazione con particelle α (Charlton & Sephton, 1991 e 1994; Roeske & Stinchcomb,

1999).

Nella valutazione di particelle α da utilizzare in terapia è importante valutare anche la portata dell'effetto di *cross-dose* (emissioni dalla sorgente radioattiva associata ad una cellula a quella adiacente), che varia considerevolmente con le dimensioni del vettore e con la frazione di cellule radiomarcate (Goddu, 1994).

Elettroni Auger.

Durante il decadimento di alcuni radioisotopi si forma una vacanza (comunemente nel guscio K) come conseguenza della cattura elettronica (EC), con l'emissione di un neutrino dal nucleo atomico, e/o di conversione interna (IC); tale vacanza è colmata rapidamente da un elettrone proveniente da un guscio superiore. Come risultato di riarrangiamenti nucleari, alcuni atomi emittenti elettroni Auger emettono anche un fotone gamma che a sua volta potrebbe essere convertito in vacanza nucleare risultando in una seconda emissione di elettroni Auger (come nel caso di I-125). Analogamente, alcuni nuclei metastabili, come Tc-99m o Br-80m, emettono un fotone gamma che può, oppure no, essere convertito in vacanza elettronica (solo il 3% dei fotoni gamma con 140 keV di Tc-99m sono convertiti). Questo processo di creazione di una vacanza elettronica in un guscio ed il suo successivo riempimento porta ad una cascata di spostamento di elettroni atomici che determina la transizione della vacanza verso gusci più esterni. Ciascuna transizione elettronica interna si accompagna ad emissioni di raggi X o elettroni Auger, Coster-Kronig, o super Coster-Kronig (collettivamente denominati elettroni Auger). Questi elettroni sono monoenergetici. Generalmente un atomo che decade per EC e/o per IC emette molti elettroni Auger, con energie comprese tra alcuni eV fino a circa 80 keV, perciò il percorso in acqua di elettroni Auger va da frazioni di nanometri fino a decine di micrometri. Alcuni radioisotopi, come I-125 o Pt-195m, emettono in media da 20 a 33 elettroni Auger per decadimento (Tabella 4). Oltre alla cascata elettronica, questo tipo di decadimento porta alla formazione di un radionuclide figlio con un'elevata carica positiva che successivamente subirà un processo di trasferimento di carica.

Per esercitare una qualche efficacia terapeutica, i radionuclidi emittenti elettroni Auger devono trovarsi nelle vicinanze del nucleo o incorporati nel DNA, essendo in grado di compiere solo un breve percorso attraverso le cellule, a differenza di particelle α e β, il cui *range* è maggiore del diametro delle cellule di mammifero (10-15 μm).

Radionuclide	Emivita	Elettroni per decadimento *	Energia standard (eV) depositata in sfere di 5-nm
^{51}Cr	27.7 g	6	210
^{67}Ga	3.3 g	5	260
^{75}Se	120 g	7	270
^{99m}Tc	6 h	4	280
^{77}Br	57 h	7	300
^{123}I	13.1 h	11	420
^{111}In	2.8 g	8	450
^{125}I	60.1 g	20	1000
^{201}Tl	73.1 h	20	1400
^{193m}Pt	4.3 g	26	1800
^{195m}Pt	4.0 g	33	2000

Tabella 4. Caratteristiche fisiche di alcuni radionuclidi emittenti elettroni Auger.
* Resa standard di elettroni Auger e Coster-Kronig.

Emivita.

Molti effetti dell'irradiazione, come sarà approfondito nei paragrafi successivi, sono sensibili alla frazione di dose ed alla dose totale e tali valori dipendono dall'emivita fisica dei radionuclidi impiegati e da quella biologica (intesa come tempo in cui il radionuclide permane nel tessuto bersaglio). In via teorica, un radiofarmaco con un tempo di permanenza infinito a livello della neoplasia, e che contiene un radionuclide con una lunga emivita fisica, sarà in grado di emettere un numero maggiore di radiazioni, se paragonato ad un altro a breve emivita fisica, a parità di radioattività iniziale. Inoltre tra i due ci può essere una differenza in termini di dose tempo-dipendente. Posto n il numero di atomi di radionuclide per unità di massa di tessuto, E energia emessa (ed assorbita) per decadimento e T emivita fisica, la quantità di dose assorbita sarà proporzionale a nE/T. Il rapporto E/T è un importante parametro che indica la potenza radioterapeutica di un radionuclide (O'Donoghue, 1994). Generalmente, per ragioni biologiche che saranno in seguito approfondite, alte dosi somministrate in tempi brevi sono più efficaci dell'esposizione a basse dosi per lunghi periodi. Da questa osservazione è possibile ricavare che un radionuclide con una emivita più corta sarà più efficace di uno con una analoga emissione, ma emivita più lunga.

Alcuni importanti radionuclidi utilizzati in radioterapia [4,5].

Yttrio-90.

Y-90, prodotto tramite generatore dal decadimento di Sr-90, è molto usato nel trattamento radioterapeutico per via sistemica di neoplasie perché decade a Sr-90 con un'emissione β^- pura e ad alta energia. Ha un'emivita di 2.7 giorni, sufficiente alla preparazione del radiofarmaco, al trasporto e, dopo somministrazione, alla localizzazione di una dose terapeutica nella sede della lesione. L'attività specifica di traccianti di Y-90 è generalmente molto alta e favorevole alla preparazione di radiofarmaci *target*-specifici. Spesso, per determinare la biodistribuzione e la dosimetria di agenti di Y-90, si sfruttano analoghi complessi di In-111.

Samario-153.

Sm-153 ha emivita di 1.95 giorni, tre emissioni β^- (0.64 MeV, 30%; 0.71 MeV, 50%; 0.81 MeV, 20%) ed emissioni γ (103 keV, 28%), utili per la visualizzazione del percorso del radiofarmaco *in vivo*. Viene prodotto con alta resa ed alta attività specifica per bombardamento neutronico di Sm-152 arricchito.

Olmio-166

L'isotopo Ho-166 ha buone caratteristiche per l'applicazione terapeutica, decade emettendo particelle β^- di energia massima di 1.85 MeV ed un *range* di penetrazione tissutale di 9mm; e raggi gamma (80.6 keV, 6.6%; 1.38 MeV, 0.9%) utili per la visualizzazione della biodistribuzione del tracciante dopo somministrazione *in vivo*. Ha emivita di 26.78 ore ed è prodotto con attività specifica relativamente alta mediante la seguente reazione nucleare: [$^{165}Ho(n,\gamma)^{166}Ho$].

Lutezio-177.

L'isotopo Lu-177 ha tre emissioni β^- (0.176 MeV, 12%; 0.384 MeV, 9%; 0.497 MeV, 79%) e due emissioni γ (113 keV, 6.4%; 208 keV, 11%), ed ha un'emivita di 6.75 giorni. Può essere prodotto in reattore per irradiazione di Lu-176 arricchito, si ottiene Lu-177 in alta resa, a basso costo e con attività specifica mediamente alta (~20 Ci/mg, Research Reactor of University of Missouri).

Rame-64.

Cu-64 ha emivita di 12.8 ore, decade emettendo β^+=0.655 MeV (19%) e β^-=0.573 (40%); può essere prodotto in larga quantità mediante un target di nickel arricchito dalla reazione nucleare $^{64}Ni(p,n)^{64}Cu$. L'emivita relativamente breve rende difficile la possibilità di

trasportarlo su lunghe distanze.

Indio-114m.

Il radionuclide In-114m è un radioisotopo a lunga emivita ($T_{½}$=49.5 giorni) e decade emettendo fotoni gamma di 190 keV ed elettroni Auger. Il principale prodotto di decadimento, In-114 decade con T½ di 72 secondi emettendo radiazioni β^- con E_{max}=777 keV.

Renio-186/188.

Le caratteristiche nucleari e chimico-fisiche di questo radionuclide, oggetto del lavoro esposto nella presente Sezione, saranno dettagliatamente esposte nei paragrafi successivi.

C2.1.2 SCELTA DELLA MOLECOLA VETTRICE.

La valutazione della molecola con funzione di *carrier* è di importanza cruciale, quanto la scelta del radionuclide. La selezione di una possibile molecola vettrice deve tenere in considerazione molti fattori, tra i quali specificità biologica e stabilità *in vivo*, farmacocinetica e farmacodinamica *in vivo* e stabilità del legame tra radiofarmaco e molecola bersaglio. Ovviamente, le proprietà chimiche del *carrier* devono permettere la coordinazione al radionuclide radioterapico senza alterare le caratteristiche intrinseche della molecola. Infine, l'emivita del radionuclide deve essere almeno uguale a quella del *carrier*.

Uno dei più semplici agenti *target* è rappresentato da radioiodio, somministrato per il trattamento di cancro funzionale della tiroide e cancro alla mammella esprimente il trasportatore per lo iodio. Come palliativi del dolore in metastasi ossee sono usati radiostronzio o complessi di fosfonati con radiorenio e radiosamario, per affinità con ioni calcio che si trovano sulle superfici ossee.

Piccoli peptidi, quali l'analogo della somatostatina octreotide, marcati con Y-90 sono stati usati per la visualizzazione di tumori neuroendocrini (Smith, 2000); Meta-[^{131}I]iodobenzilguanidina (M^{131}IBG), neurotrasmettitore iodinato, viene captato dalle cellule neoplastiche del sistema nervoso (Loh, 1997); colloidi di radioittrio e terre rare sono stati impiegati per il trattamento di stadi avanzati di artrite, essendo captati da macrofagi presenti negli spazi sinoviali (Shortkroff, 1993); radiocolloidi marcati con α-emittenti come As-211 hanno trovato applicazione nel trattamento di tumori ovarici (Bloomer, 1994).

Nella radioterapia di tumori ovarici, cerebrali, e spinali sono stati utilizzati nucleotidi marcati con radionuclidi emittenti elettroni Auger, in grado di incorporarsi nel DNA di cellule in divisione (Kassis, 2000).

Per la cura di linfomi e leucemie sono stati impiegati con successo anticorpi o loro frammenti marcati con radionuclidi α o β emittenti, diretti contro specifici antigeni localizzati sulla superficie di cellule neoplastiche; da circa due anni anche in Italia è entrato nella pratica clinica la specialità Zevalin® per il trattamento del linfoma non-Hodgkin's, in cui l'anticorpo monoclonale ibitumomab tiuxetan è marcato con Y-90.

ProstaScint è un anticorpo marcato con il radioisotopo In-111, per il trattamento del cancro prostatico [2-3].

C2.1.3 PROPRIETÀ DEL TESSUTO BERSAGLIO.

Il successo della radioterapia metabolica dipende ampiamente da alcuni fattori legati ad aspetti anatomo-fisiologici della neoplasia, quale accessibilità del tessuto patologico, numero di siti bersaglio e loro distribuzione, in particolare tra tessuti *target* e non-*target*, eventuali relazioni con il ciclo cellulare, vascolarizzazione, permeabilità vasale ed ossigenazione della neoplasia.

Anche la via di somministrazione (intravenosa, intralinfatica, intraperitoneale, intracerebrale, intravesciale, intratecale e intrasinoviale) deve essere attentamente valutata perchè influenza il legame al sito *target*.

Infine, altro parametro fondamentale è l'attività specifica del radiofarmaco, soprattutto quando il bersaglio è costituito da recettori che possono essere facilmente saturati oppure altri legami più deboli, aspecifici competono con il *target*; alcuni trattamenti costituiscono un'eccezione, come nel caso di anticorpi radiomarcati, che traggono vantaggio da un effetto massa e sono ottimizzati dall'aggiunta di immunoglobuline non marcate.

C2.1.4 EFFETTI BIOLOGICI DELLE RADIAZIONI.

L'INTERAZIONE DELLE RADIAZIONI IONIZZANTI CON LA MATERIA.

Le radiazioni gamma sono dotate di elevata energia –che può raggiungere anche i 10 MeV- e sono molto penetranti, in seguito ad interazioni con i nuclei e gli elettroni atomici cedono parte della loro energia alla materia che attraversano; mentre la radiazione corpuscolata (particelle α e β) agisce in uno spazio più ridotto ma in modo più concentrato.

Quando i fotoni interagiscono con la materia si ha il trasferimento dell'energia del fotone incidente ad un elettrone che viene espulso ed acquista un'energia cinetica pari alla differenza energetica tra fotone incidente ed energia di legame, tale fenomeno va sotto il nome di "effetto fotoelettrico" (Figura 5).

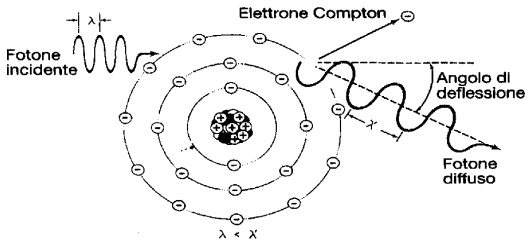


Figura 5. Effetto fotoelettrico di interazione di un fotone con un atomo.

L'effetto più importante nell'ambito della radioterapia è l' "effetto Compton": il fotone incidente urta elasticamente contro un elettrone delle orbite esterne, cedendogli parte dell'energia e deviando la propria traiettoria, l'energia acquisita dall'elettrone ne provoca l'espulsione dall'atomo (Figura 6).

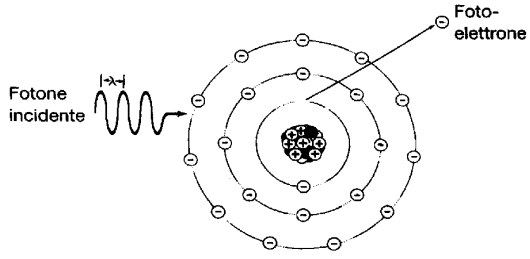


Figura 6. Effetto Compton di interazione di un fotone con un atomo.

Infine, per interazione di un fotone con la materia si può avere la "produzione di coppie" di particelle (elettrone e positrone), (Figura 7).

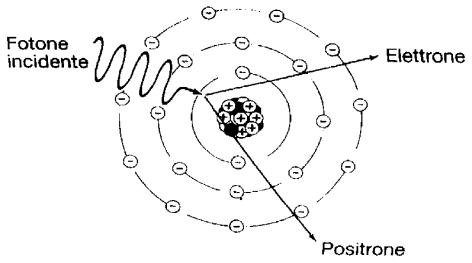


Figura 7. Produzione di coppie (positrone/elettrone) per interazione di un fotone con un atomo.

Gli elettroni espulsi, a loro volta, producono ionizzazione del mezzo.

L'acqua, per motivi di rappresentazione quantitativa (in quanto componente principale della materia biologica), costituisce la molecola con la quale interagiscono maggiormente le particelle ionizzanti. Le reazioni che si producono in seguito al rilascio di energia da parte di radiazioni possono essere così schematizzate:

- la radiazione ionizza la molecola di acqua con espulsione di un elettrone

$$H_2O + hv \rightarrow H_2O^+ + e^-$$

- l'elettrone può essere catturato da un'altra molecola di acqua

$$e^- + H_2O \rightarrow H_2O^-$$

- le molecole formate possono essere instabili e dissociarsi a formare un radicale libero

$$H_2O^+ \rightarrow H^+ + OH^\bullet$$

$$H_2O^- \rightarrow H^\bullet + OH^-$$

I radicali liberi, soprattutto lo ione ossidrile $OH^\bullet$, successivamente innescano reazioni a catena interagendo con le molecole biologiche e creando molecole potenzialmente dannose, effetto potenziato dalla presenza di ossigeno ("effetto ossigeno") con produzione di specie altamente reattive ed ossidanti. Nell'accrescimento di un focolaio tumorale la produzione di una rete vasale neoformata è solitamente insufficiente rispetto all'entità di neoproduzione di cellule tumorali che pertanto riceveranno, per diffusione, un insufficiente apporto di ossigeno e risulteranno ipossiche o anossiche e per questo poco radiosensibili.

Come conseguenza di queste reazioni si verificano nella cellula modificazioni che possono determinarne la morte o causare danni che la cellula riparerà in modo risolutivo o erroneo, causando difetti che potranno presentarsi in fase di duplicazione cellulare. Le alterazioni

cellulari potranno poi riflettersi in danno d'organo e dell'intero organismo. L'entità del danno provocato dalle radiazioni dipende dalla quantità di energia ceduta, misurata in Sievert (Sv) per massa unitaria di tessuto, e dal tipo di radiazione.

CURVE DI SOPRAVVIVENZA CELLULARE.

Studi *in vitro* su colonie cellulari irradiate, da una sorgente esterna oppure dalle emissioni di un radiofarmaco, hanno permesso di ricavare curve logaritmiche-lineari che descrivono la riduzione della sopravvivenza, espressa come logaritmo della frazione di sopravvivenza, in funzione della dose di radiazione (lineare). La forma della curva di sopravvivenza costruita attraverso tali punti di sopravvivenza varia e dipende da fattori biologici, fisici chimici. In generale, si distinguono due tipi di curve dose-sopravvivenza (Figura 8). Per la curva esponenziale di sopravvivenza la pendenza è sempre costante e può essere descritta dall'equazione:

$$S/S_0 = e^{-D/Do}$$

dove S/S_0 rappresenta la frazione di cellule sopravvissute dopo irradiamento, D è la dose somministrata, e D_0 è la dose necessaria per ridurre la sopravvivenza di 0.37. Questo è il tipo di curva che si ottiene quando le cellule sono esposte a radiazioni ad alto LET (particelle α o elettroni Auger incorporati nel DNA).

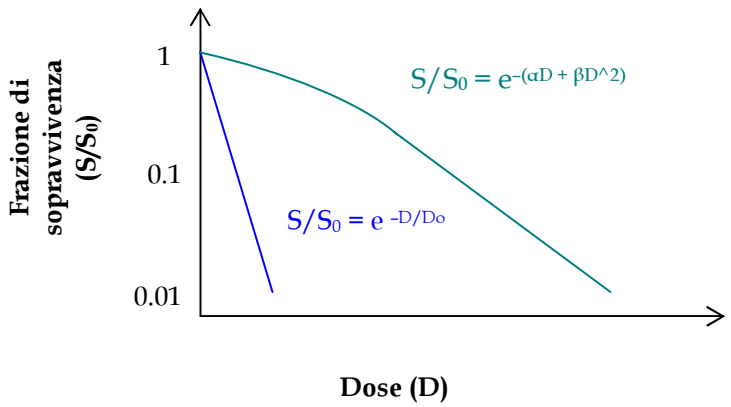


Figura 8. Curva di sopravvivenza dose-risposta per cellule di mammifero *in vitro*.

Il secondo tipo di relazione dose-risposta è espresso dalla curva sigmoidale (Figura 8) che mostra come l'efficienza di morte cellulare non sia costante. La curvatura ("spalla") corrispondente alle dosi più basse indica una minore efficienza di effetti letali e rappresenta l'accumulo del danno sub-letale riparabile in funzione della dose

somministrata e del tipo di tessuto. La porzione lineare del grafico o "pendenza esponenziale" indica come livelli progressivi di dose inducano una riduzione esponenziale della sopravvivenza per insufficiente capacità riparativa cellulare. La pendenza della curva dipende dalla radiosensibilità delle singole cellule e quindi dei tessuti, dallo stato biologico della cellula e dei tessuti, dalla modalità di somministrazione della dose e dal tipo di radiazione. Per ogni frazione di radiazioni viene quindi distrutta la stessa proporzione di cellule secondo un andamento esponenziale.
L'equazione lineare-quadratica che descrive la curva è

$$S/S_0 = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

Con α coefficiente di dose lineare, indica il danno cellulare subito con singolo meccanismo, D dose somministrata e β coefficiente del quadrato della dose, esprime il danno cellulare subito per doppio meccanismo. Questa curva descrive l'effetto dovuto all'esposizione di cellule di mammifero a radiazioni a basso LET (raggi X, particelle β, elettroni Auger extranucleari). Nel caso in cui l'esposizione alla radiazione sia protratta nel tempo o la porzione di dose sia bassa, come spesso accade con radionuclidi, il termine α sarà predominante.
E' chiaro che in radioterapia è preferito un radiofarmaco contenente un radionuclide il cui decadimento induca una diminuzione esponenziale nella sopravvivenza cellulare (equazione 1), ma la natura esponenziale di ambedue i tipi di curve indica che solo le dosi più alte riducono sensibilmente il numero di cellule in un tumore macroscopico e che nessuna dose è in grado di eradicare al 100% un clone neoplastico, soprattutto perché le dosi somministrate saranno sempre limitate dalla tolleranza dei tessuti sani. La selezione di opportuni *carriers* per il radionuclide e la scelta oculata della via di somministrazione sono alcuni dei fattori che incidono sulla riduzione dell'esposizione dei tessuti sani e sulla massimizzazione di dose veicolata al tessuto patologico.
Le curve di sopravvivenza cellulare sono in accordo con il modello matematico "a bersagli multipli e colpo unico", il che significa in termini biologici presenza nel contesto della cellula di più bersagli in ciascuno dei quali dovrà essere depositato, per produrre la morte riproduttiva della cellula, almeno un colpo. I fattori che influenzano il numero medio di bersagli per cellula sono le condizioni fisiologiche della cellula, la presenza o meno di ossigeno ed il *turnover* cellulare (elevato indice mitotico).

A parità di dose fisica somministrata in un volume corporeo macroscopico, l'effetto biologico indotto può essere diverso per i vari tipi di radiazione: quelle a bassa densità di ionizzazione (raggi X e γ, e^-), distribuiscono le ionizzazioni in forma sparsa mentre le radiazioni ad alta densità di ionizzazione (p^+, n, π^-) concentrano le ionizzazioni nello spazio. Si definisce efficacia biologica relativa il rapporto tra la dose della radiazione di riferimento (raggi X convenzionali) e la dose della radiazione in esame necessaria per produrre un determinato effetto in un certo tempo.

Il frazionamento della dose in radioterapia comporta un "guadagno terapeutico", esso infatti aumenta la tolleranza da parte dei tessuti normali (per i fenomeni di riparazione e ripopolamento) e nello stesso tempo consente di eliminare gli effetti radioprotettivi della ipossia sul tumore (per il fenomeno della riossigenazione). Il frazionamento standard prevede 5 frazioni alla settimana di circa 2 Gy ciascuna intervallata di 24 ore, per 5-6 settimane; l'iperfrazionamento prevede la riduzione dell'entità della dose nella singola frazione, somministrando 2-3 frazioni al giorno fino ad una dose totale maggiore nel tempo usuale (nel trattamento del melanoma); nei trattamenti palliativi il protocollo più seguito è quello dell'ipofrazionamento che prevede l'aumento dell'entità della dose nella singola frazione, con una riduzione del tempo totale.

Il frazionamento della dose può consentire la riparazione del danno subletale poiché tra una frazione e la successiva le cellule hanno la possibilità di riparare il danno indotto dalle radiazioni. Questo comporta che la dose totale di radiazione necessaria per ottenere uno stesso effetto (la dose "isoefficace") debba essere tanto maggiore quanto maggiore è il numero delle frazioni. Inoltre nell'intervallo tra le singole frazioni di dose si ha una certa riossigenazione delle aree ipossiche a seguito della morte ed eliminazione delle cellule ben ossigenate con conseguente decompressione di piccoli vasi, riduzione della distanza tra capillari e cellule ipossiche, minore discrepanza tra apporto e fabbisogno di ossigeno.

Le fasi G_2 ed M del ciclo cellulare sono le più sensibili all'effetto delle radiazioni. Ciò comporta la morte preferenziale delle cellule che si trovano in uno di questi stadi ed una conseguente semisincronizzazione della popolazione residua nelle fasi più radioresistenti; ma negli intervalli tra le singole frazioni di dose le cellule sopravvissute si desincronizzano, sicché le successive frazioni hanno minore probabilità di trovarsi di fronte a una popolazione resistente. In risposta allo spopolamento determinato dall'irradiazione, i tessuti sani e quelli tumorali aumentano l'attività proliferativa,

richiamando nel ciclo divisionale cellule prima in stato di riposo.
A seconda della radioresponsività si distinguono tessuti *late responders* che rispondono più lentamente, caratterizzati da un basso *turnover* cellulare e da una maggiore capacità di riparare il danno ("spalla" della curva più ampia); e tessuti *acute responders,* che rispondono più rapidamente, ad elevato *turnover* ed una minore capacità di riparare il danno ("spalla" della curva più stretta).
In radiobiologia è correntemente utilizzato il modello applicativo lineare-quadratico, con il quale viene quantizzata la sensibilità al frazionamento dei tessuti radiotrattati, ovvero quanto l'uso di dosi elevate per frazione influisca sull'effetto biologico, concetto espresso come rapporto β/α, con α coefficiente di dose lineare, indica il danno cellulare subito alla dose somministrata e β coefficiente del quadrato della dose, questo termine esprime il danno cellulare subito dalla sommatoria delle dosi somministrate. Tale parametro teoricamente dovrebbe consentire di valutare per ogni situazione clinica la sopravvivenza delle cellule radiotrattate in relazione alla dose somministrata e la tossicità tissutale. Il rapporto β/α ha valori bassi per i tessuti *late responders* che sono più sensibili al frazionamento (il frazionamento di alte dosi porta ad elevata tossicità tardiva mentre per una piccola dose porta a bassa tossicità tardiva); ed alti valori per i tessuti *acute responders,* meno sensibili al frazionamento (la tossicità acuta si manifesta nel frazionamento sia di grandi che di piccole dosi). Le neoplasie, essendo costituite da tessuti ad elevato *turnover* cellulare (*acute responders*), presenteranno un maggiore effetto radiobiologico dopo somministrazione di una bassa dose per frazione.
In base al comportamento radiobiologico dei diversi tessuti tumorali ed alla previsione che il rapporto β/α è in grado di fornirci su di esso, si prescrivono i diversi frazionamenti della dose. Ad esempio per il tessuto connettivo, caratterizzato da basso turnover cellulare (*late responder*) la dose radioterapeutica è di 300 cGy/die per dieci frazioni; per l'intestino tenue (*acute responder*) è di 180 cGy/die con dose totale di 50 Gy.
Il controllo tumorale è un evento probabilistico. Di conseguenza, livelli diversi di dose radiante producono un controllo tumorale diverso. Il successo o il fallimento del trattamento di una neoplasia dipendono dalla distruzione di tutte le cellule clonogeniche sopravviventi, il cui numero è proporzionale al numero iniziale di cellule poiché ogni frazione di dose produce la distruzione di una uguale proporzione (e non di un uguale numero) di cellule. La relazione tra la probabilità di controllo tumorale e la dose al di

sopra di una certa soglia è descritta da una curva sigmoidale (Figura 9).

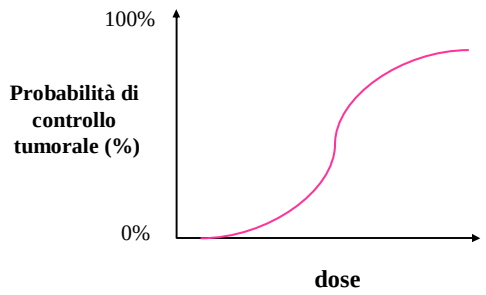


Figura 9. Controllo della crescita tumorale in fuzione della dose radiante.

La dose ottimale di radiazioni da utilizzare è quella in grado di produrre la massima probabilità di controllo tumorale con la minima (ragionevolmente accettabile) frequenza di complicazioni. Per ottenere un buon guadagno terapeutico è quindi possibile manipolare la relazione dose-tempo attraverso il frazionamento della dose, sfruttando il diverso inizio e decorso dei fenomeni biologici in tessuti sani e neoplastici, ad esempio impiegando un trattamento accelerato nei tumori a rapido accrescimento ed un trattamento iperfrazionato nei tumori a crescita più lenta che necessitano di dosaggi totali più elevati.

Per cercare di ridurre i danni ai tessuti sani è possibile "manipolare" il tessuto bersaglio, restringendo progressivamente i campi di irradiazione in modo da somministrare dosi progressivamente più elevate al tumore macroscopico e dosi minori alla periferia del tumore dove la malattia è subclinica.

In radioterapia metabolica il radiofarmaco deve possedere delle caratteristiche chimico-fisiche e biologiche tali da irradiare in modo molto selettivo il tessuto bersaglio e ridurre, quindi, la dose al volume di transito o ai tessuti adiacenti**.** La possibilità di controllare il tumore localmente rappresenta un importante passo per la guarigione e deve essere, pertanto, perseguita prima o contemporaneamente ad altri trattamenti, con lo scopo di controllare la diffusione metastatica.

I. Effetti delle radiazioni sulla cellula.

Nel fenomeno di interazione della radiazione con la materia si possono distinguere due fasi: una "iniziale" ed una del "danno biologico". Nella "fase iniziale" le radiazioni ionizzanti producono nella materia alterazioni fisiche e chimico-fisiche quali rotture dei legami molecolari che, verificandosi nelle strutture biologiche, sono alla base della fase successiva di "danno biologico" che si manifesterà prima a livello cellulare, per poi estendersi a tessuti ed organi.

Le alterazioni più importanti che avvengono in una cellula irradiata concernono le modificazioni a carico delle macromolecole. I meccanismi coinvolti riguardano la rottura di legami interatomici, la formazione di radicali liberi in soluzione e le successive polimerizzazioni ($R^{\bullet} + R^{\bullet} = R\text{-}R$) e reticolazioni con la formazione di nuovi legami intra- ed inter-molecolari ed il trasferimento per addizione di ossigeno ($R^{\bullet} + O_2 = RO_2^{\bullet}$) e $HO_2^{\bullet}$ ($R + HO_2^{\bullet} = RO\text{-}OH$). Queste alterazioni e degradazioni portano a variazioni dello stato chimico-fisico a livello di peso molecolare, viscosità, tensione superficiale, conducibilità elettrica, punto di ebollizione e congelamento. L'effetto biologico finale può essere correlato a fattori fisici quali la concentrazione di ossigeno e la temperatura dell'ambiente in cui si verifica l'irradiazione, nonché l'importanza funzionale del sistema danneggiato.

L'azione delle radiazioni su proteine ed enzimi si manifesta con alterazioni della struttura primaria, con formazione di legami tra molecole diverse o all'interno delle stesse, e della struttura secondaria. Queste modificazioni, alterando la struttura tridimensionale della proteina, spesso portano ad una perdita di funzionalità. Nel caso di proteine con attività enzimatica, questa può ridursi, cessare, oppure aumentare non per azione diretta sull'enzima ma per interazione con attivatori o inibitori enzimatici, o in seguito a processi che, alterando la permeabilità delle membrane citoplasmatiche, portano ad un aumento della liberazione di enzima.

La principale azione delle radiazioni sui lipidi consiste in fenomeni di decarbossilazione e perossidazione degli acidi grassi insaturi, con formazione di perossidi organici e radicali liberi che, a loro volta, svolgono azione lesiva sulle altre molecole di interesse biologico. L'alterazione dei lipidi di membrana produce inoltre modificazioni del trasporto degli ioni.

Le lesioni del DNA possono riguardare tutti i suoi componenti (Figura 10). Tra le alterazioni chimiche possono verificarsi deaminazione delle basi azotate, ossidazione degli zuccheri, rottura del legame tra pentoso e base azotata e con il gruppo fosfato. Dalla

rottura delle catene nucleotidiche possono derivare frammenti che, ricombinandosi, originano molecole ramificate. La rottura può riguardare una sola o ambedue le eliche del DNA.

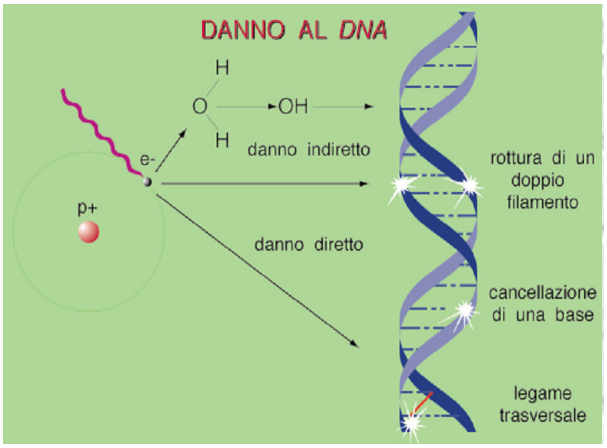


Figura 10. Lesioni al DNA in seguito ad irragiamento.

Il DNA è in grado di riparare il danno radioindotto. Il meccanismo più accettato è quello della riparazione mediante asportazione. Si svolge con una iniziale eliminazione della porzione di DNA alterata per l'azione di endonucleasi che idrolizzano il legame fosfodiesterico nella parte del segmento alterato; glicosilasi che scindono il legame tra base alterata e desossiribosio; esonucleasi che idrolizzano il legame tra la porzione di DNA danneggiata e quella sana; polimerasi che sintetizzano un nuovo segmento sullo stampo della catena complementare ed infine ligasi legano i nuovi frammenti ai segmenti pre-esistenti. La riparazione è molto rapida se non sono state permanentemente alterate ambedue le eliche in uno stesso segmento e se non si verificano ripetute irradiazioni che consolidano il danno e creano nuove lesioni.

La riparazione del DNA può essere completa ed efficace oppure avvenire con anomalie. Le lesioni del DNA possono divenire osservabili al momento della formazione dei cromosomi. Se la lesione si è verificata prima della fase di sintesi si osservano aberrazioni cromosomiche (fasi G_0-G_1 e parte della fase S), altrimenti si osservano aberrazioni cromatidiche (fasi S-G_2). Una anomala riparazione delle rotture cromosomiche può portare a: ripristino della condizione originale; ricongiungimento con inversione; traslocazione intra ed inter cromosomica; cromosoma ad anello.

II. Effetti delle radiazioni sulle strutture cellulari.

Irradiazioni con micro-fasci hanno permesso di ricavare utili informazioni sulla sensibilità di ciascun organello intracellulare. In particolare, il nucleo è più sensibile del citoplasma, compatibilmente con una maggiore complessità di struttura degli acidi nucleici e la difficoltà di riparazione del danno radioindotto. La rottura delle catene del DNA infatti può portare alla perdita di intere sequenze oppure alla loro modificazione. Mentre l'irradiazione del citoplasma determina fenomeni reversibili, l'irradiazione del nucleo può causare la morte cellulare.

I danni cellulari si producono anche per dosi molto basse (0,25 Gy) nei tessuti radiosensibili e graduarsi in rapporto all'entità della dose di esposizione. L'alterazione degli elementi costitutivi delle membrane cellulari, proteine e lipidi, è alla base del danno delle stesse che si ripercuote in variazioni della permeabilità per ioni ed acqua e conseguenti squilibri elettrolitici. Secondo la funzione di ciascuna cellula possono verificarsi alterazioni di meccanismi fini, quali la conduzione degli impulsi nervosi, o talmente gravi da comportare la morte cellulare. Il danno a livello citoplasmatico è per lo più correlato alle alterazioni delle membrane degli organelli citoplasmatici: mitocondri, lisosomi, reticolo endoplasmatico. I mitocondri sono molto radiosensibili, con evidenziazione precoce del danno sotto forma di rigonfiamento e formazione di vacuoli tra le creste mitocondriali, con conseguenti variazioni dei processi biochimici. Il danneggiamento dei lisosomi determina la liberazione di enzimi catabolici che danneggiano proteine, acidi nucleici e altri componenti essenziali della cellula. Le alterazioni del reticolo endoplasmatico si traducono invece in danno di funzioni enzimatiche e alterazioni della sintesi proteica mediata dall'RNA (Figura 11).

Una dose elevata di radiazioni può causare la morte cellulare immediata, dosi inferiori a quella letale possono determinare necrosi differite dovute al blocco del ciclo cellulare o alla comparsa di mitosi abortive. In questo caso le cellule possono conservare una certa attività metabolica, ma non riprodursi per alterazione dei cromosomi. Nei tessuti a lento rinnovamento le lesioni latenti spesso non appaiono fino al momento della mitosi.

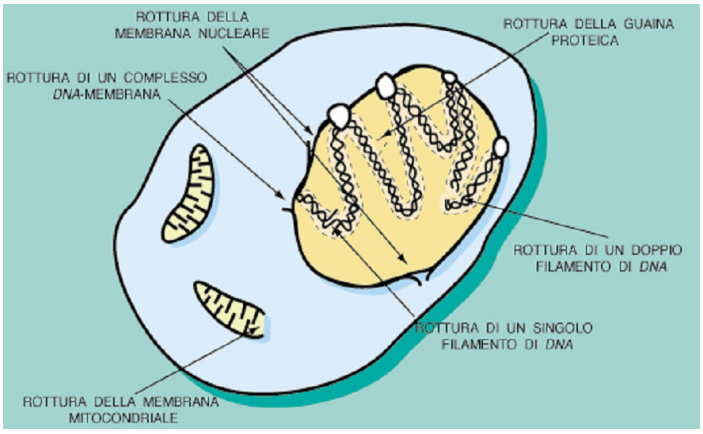


Figura 11. Tipi fondamentali di danni prodotti alle strutture cellulari.

III. Effetti delle radiazioni sulle popolazioni cellulari.

Le cellule ed i tessuti esposti a radiazioni ionizzanti subiscono lesioni che possono essere temporanee o permanenti. L'entità del danno è in rapporto alla dose somministrata e al tempo in cui è stata somministrata (l'esposizione a dosi di radiazioni insufficienti a causare la distruzione immediata delle cellule può comunque portare lesioni rilevabili a distanza di anni), alla natura e all'energia della radiazione, alla sede ed estensione della superficie corporea irradiata (un irragiamento globale con 600 Rad è letale nel 100% degli individui, la stessa dose irradiata su una piccola parte della superficie corporea causa un modesto eritema cutaneo), alla via di esposizione della radiazione assorbita (irraggiamento esterno, inalazione, ingestione), alla sensibilità del tessuto irradiato (i tessuti più sensibili alle radiazioni sono quelli ad elevato *turn-over* cellulare come il midollo osseo, la pelle, le mucose, gli spermatozoi) e a pregressi traumi chirurgici e radioterapici. Per quanto riguarda la dose, l'esposizione protratta, a parità di dose di radiazioni ionizzanti, è meglio tollerata dai tessuti rispetto alla stessa dose assorbita in tempi brevi. Alcuni danni, infatti, possono essere riparati mentre l'esposizione è ancora in corso, tuttavia se la dose di radiazioni assorbita è sufficiente a provocare gravi lesioni, i meccanismi di riparazione diventano insufficienti. Per dosi di esposizione alle radiazioni superiori a 5-6 Gy la sopravvivenza è impossibile, la morte interviene nel 100% dei casi in pochi giorni, per diarrea emorragica grave e disidratazione o perché viene colpito in maniera rilevante il sistema nervoso centrale. Tra i 2 e i 4.5 Gy la mortalità rimane elevata per il manifestarsi di gravi danni al midollo osseo e alle cellule ematiche, causando

emorragie, infezioni, anemia e danni all'apparato gastrointestinale con vomito, diarrea, perdita di peso, lesioni alla pelle e ad altri tessuti, sterilità e danni fetali. Tra 1 e 2 Gy i sintomi sono attenuati e la mortalità è bassa, mentre per dosi inferiori ad 1 Gy i disturbi acuti sono reversibili e la mortalità quasi nulla.

Oltre alla dose, deve poi essere tenuto in considerazione anche la diversa natura e la sensibilità del tessuto irradiato, in particolare le cellule staminali, quelle meno differenziate e in stato attivo di suddivisione subiscono i maggiori danni, infatti la "radiosensibilità" è tanto maggiore quanto più la cellula è vicina al compartimento staminale, ossia quanto più basso è il grado di differenziazione e più rapida la proliferazione (legge di Bergonie e Tribondesu). Si riscontra allora che il midollo osseo rosso, i tessuti linfoidi, la mucosa gastroenterica, gli oogoni e gli spermatogoni, sono i tessuti più radiosensibili.

Si definisce "radiosensibilità cellulare" la capacità delle radiazioni ionizzanti di provocare alterazioni biologiche significative (morte cellulare o arresto della proliferazione), nelle cellule di un tessuto neoplastico o normale, mentre per "radioresponsività cellulare" si intende la velocità con cui si manifestano clinicamente alterazioni biologiche radioindotte (Tabella 5).

Interazioni iniziali	
Radiazioni indirettamente ionizzanti *(raggi X, raggi γ)*	10^{-24} - 10^{-4} s
Radiazioni direttamente ionizzanti *(elettroni, protoni)*	10^{-16} - 10^{-14} s
Stadio fisico-chimico	10^{-12} - 10^{-8} s
Danno chimico *(radicali liberi)*	10^{-7} s - ore
Danno biomolecolare *(proteine, acidi nucleici)*	ms - ore
Effetti biologici precoci *(morte cellulare)*	ore - settimane
Effetti biologici tardivi *(induzione di neoplasie, effetti genetici)*	anni, secoli

Tabella 5. Radioresponsività cellulare per i diversi effetti.

Nella maggior parte dei tessuti (es. midollo osseo o epitelio intestinale, vescicale, cutaneo), le cellule si trovano in una delle seguenti condizioni:

- ✓ cellule staminali quiescenti in grado di dividersi e trasformarsi in cellule differenziate
- ✓ cellule in corso di maturazione e moltiplicazione

- ✓ cellule differenziate in attività incapaci di dividersi

Altri tessuti (derma, tiroide, fegato) non possiedono questo tipo di organizzazione e non vi è una differenza significativa tra cellule staminali e differenziate; il tessuto nervoso, per contro, è costituito essenzialmente da cellule altamente differenziate.

Ciascuna popolazione cellulare è caratterizzata da un proprio indice mitotico:

INDICE MITOTICO (%)= durata delle mitosi/tempo di generazione globale

Tra i fattori di radiosensibilità cellulare si annoverano fattori di tipo biologico:

- radiosensibilità intrinseca (in ordine decrescente: spermatogoni, linfociti, eritroblasti, granulociti, mieloblasti, cellule basali e delle cripte intestinali, stomaco, colon, cellule ovariche, cutanee, alveolari polmonari, endoteliali, connettivali, tubulari renali, ossee, nervose e muscolari);
- radioresistenza, proprietà stabile di alcune linee cellulari tumorali. Sembra legata all'espressione di alcuni oncogeni, quali il ras, il c-raf-1 e il v-mos. Altri geni, appartenenti alla famiglia di proteine cicline, sembrano responsabili di una induzione della radioresistenza attraverso la regolazione del ciclo cellulare;
- capacità di riparazione del danno radioindotto: esistono sistemi enzimatici (quali DNA-polimerasi) adibiti a questa funzione. L'espressione di questa capacità può differire molto tra le diverse linee cellulari ed è una delle basi dei frazionamenti della dose in radioterapia oncologica;
- grado di organizzazione biologica del sistema irradiato: maggiore il livello di organizzazione del sistema irradiato, minore sarà il danno;
- caratteristiche dell'ambiente locale e generale: grado di vascolarizzazione (presenza di ossigeno), farmaci radiosensibilizzanti e farmaci radioprotettori;
- cinetica cellulare: le cellule staminali intestinali e dell'epidermide hanno un analogo grado di radiosensibilità, tuttavia il tessuto intestinale è apparentemente più radiosensibile in quanto il tempo di rinnovamento intestinale è di 3 giorni mentre quello dell'epidermide è di 14 giorni.

Fattori fisici di radiosensibilità cellulare:

- dose somministrata;
- volume irradiato;
- natura delle radiazioni;
- modalità di somministrazione della dose.

IV. Effetti dell'irradiazione: deterministici e stocastici.

I danni prodotti dalle radiazioni ionizzanti sull'uomo possono essere distinti in tre categorie principali (Tabella 6):

- somatici deterministici (immediati);
- somatici stocastici (a lungo termine);
- genetici stocastici (a lungo termine).

Effetti	Dose Soglia	Proporzionale alla dose	Entità del danno	Rapporto causa /effetto
DETERMINISTICI	sì	il danno	specifico, proporzionale alla dose	generalmente certo
STOCASTICI	no	il rischio	aspecifico: tutto o nulla	sempre incerto

Tabella 6. Effetti dell'irradiazione.

Gli effetti deterministici hanno frequenza e gravità che aumenta con l'aumentare della dose, per essi è possibile individuare una dose-soglia caratteristica ed hanno un periodo di latenza solitamente breve (alcuni giorni o settimane); comprendono:

- complicanze: sono danni che compromettono seriamente la salute del paziente e richiedono una terapia medica e/o chirurgica impegnativa. Possono essere precoci o tardive quali fistola rettale o leucemia;
- effetti collaterali: sono danni relativamente lievi che si verificano e si manifestano nel corso del trattamento, e successivamente regrediscono in modo completo, come eritema, nausea, cistite;
- sequele e postumi: sono danni relativamente modesti, ma generalmente permanenti, che conseguono inevitabilmente, o con grande frequenza, ad un trattamento medico, quale menopausa dopo trattamento chirurgico o radioterapico di un tumore pelvico femminile.

Gli effetti stocastici non richiedono il superamento di un valore soglia di dose per la comparsa e la probabilità che si presentino è proporzionale alla dose. Sono dimostrati dalla sperimentazione radiobiologica e dall'evidenza epidemiologica (associazione causale statistica). Si manifestano dopo anni, decenni dall'irradiazione.

Si distinguono:

- danni genetici: si intende per danno genetico un danno al fenotipo (cioè un danno clinicamente evidente) di un individuo, causato da un'alterazione del patrimonio genetico verificatosi nei suoi ascendenti
- danni somatici (carcinogenesi): secondo la teoria della predisposizione individuale un portatore di neoplasia è un soggetto a rischio di sviluppare un secondo tumore, indipendentemente dal tipo di terapia cui viene sottoposto per il primo. Vi è incertezza riguardo al periodo di latenza tra irradiazione e comparsa del tumore radioindotto, generalmente stimato in 3-7 anni per la leucemia e 10-30 anni per i tumori solidi. E' importante notare che per un portatore di una neoplasia il rischio di contrarre un secondo tumore a causa della radioterapia è talmente piccolo in confronto al rischio di soccombere per il primo che questa eventualità non deve dissuadere dall'esecuzione della radioterapia.

C2.2 RENIO-186 E RENIO-188.

Il Renio è uno dei metalli più rari sulla crosta terrestre, ha colore argenteo, numero atomico 75 e, come il Mn e il Tc, appartiene al gruppo 7 della Tavola Periodica. Fu scoperto nel 1925 dai coniugi tedeschi Noddack, che lo isolarono dai minerali tantalite, wolframite e columbite; in seguito, ne furono scoperte elevate quantità nella molibdenite. Dopo il tungsteno (3400 °C), è l'elemento più alto fondente (3180 °C) ed in natura è presente come miscela di due isotopi non radioattivi: Re-185 e Re-187, con abbondanza isotopica rispettivamente del 37.4 e 62.6 %.

I due isotopi artificiali radioattivi del Renio, Re-186 e Re-188, sono considerati i candidati principali per lo sviluppo di radiofarmaci utilizzabili in Medicina Nucleare come agenti per la terapia di neoplasie (Tabella 6).

Nuclide	$T_{1/2}$	Decadimenti	Penetrazione in tessuto molle
^{186}Re	90.7 h	γ, E_γ=137 keV β^-, E_β=1.07, 0.93 MeV	5 mm
^{188}Re	16.98 h	γ, E_γ=155 keV β^-, E_β=2.12 MeV	11 mm

Tabella 6: Proprietà nucleari degli isotopi di Re di interesse in Medicina Nucleare.

Re-186 decade emettendo particelle β^- di E_{max}=1.07 MeV con abbondanza 91% e un fotone γ, con E_γ=137 keV, abbondanza 9%. Ha emivita di 90.7 ore e trova applicazione nella cura di piccoli tumori. L'emissione di fotoni γ, di energia simile al Tc-99m, permette di monitorare la localizzazione del radiofarmaco nell'organismo ed è quindi sfruttabile per *imaging,* utilizzando la stessa strumentazione usata per i radiofarmaci contenenti Tc-99m.

Re-186 viene prodotto mediante reattore per irradiazione di Re-185 con neutroni: [$^{185}Re(n,\gamma)^{186}Re$]. La resa della reazione dipende dalla concentrazione di renio nel *target*, dall'energia e dal reflusso dei neutroni. Re-186 è prodotto con bassa-media attività specifica ed attualmente non è possibile ottenere un prodotto *carrier-free* (la contaminazione con Re-185 è inevitabile).

L'isotopo Re-188 è dotato di caratteristiche nucleari ottimali per la radioterapia, superiori a quelle del Re-186. Decade emettendo particelle β^- di alta energia (E_{max}= 2.12 MeV), con abbondanza 85%, in grado di trasferire in alcuni mm di tessuto un'elevata dose di

radiazioni ionizzanti ad alta energia; e fotoni gamma di energia di 155 keV con abbondanza 15%, trascurabili dal punto di vista della radioprotezione, ma utile per gli studi dosimetrici e diagnostici sul paziente. La breve emivita (16.98 ore) consente di avere una attività specifica più alta e quindi maggiore efficacia terapeutica rispetto al radioisotopo Re-186 con conseguente minore dose totale di attività assorbita dal paziente ed infine permette ripetute somministrazioni del radiofarmaco in tempi ravvicinati.

Re-188 può essere prodotto sia attraverso reazione nucleare [$^{187}Re(n,\gamma)^{188}Re$] sia mediante generatore $^{188}W/^{188}Re$ a base di allumina e resine a scambio ionico. Tale generatore, simile a quello $^{99}Mo/^{99m}Tc$, permette di ottenere Re-188 nella forma chimica di anione tetraossigenato $[^{188}ReO_4]^-$ (perrenato), che ne costituisce la specie più stabile in soluzione acquosa, a partire dal radionuclide padre tungsteno-188 (ottenuto a sua volta per doppia irradiazione neutronica del tungsteno-186) (Figura 12).

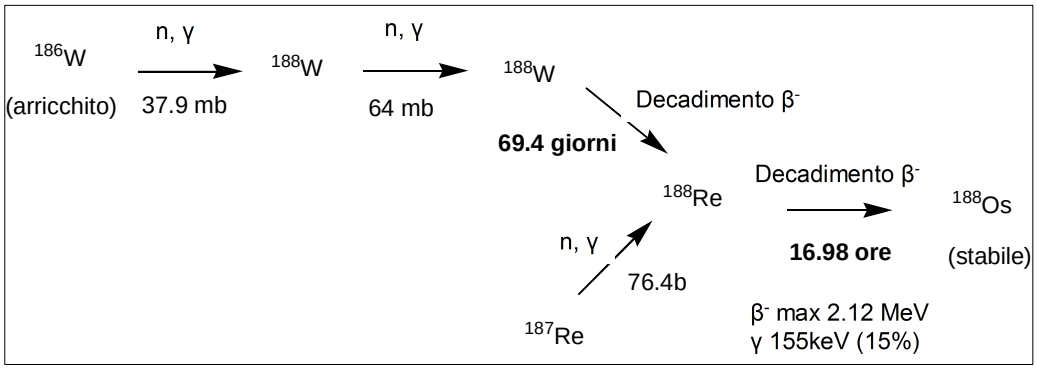


Figura 12. Produzione e schema di decadimento di W-188.

La possibilità di disporre di una sorgente trasportabile di Re-188 permette di ottenere il radionuclide *carrier-free* a basso costo (un generatore di 0.5 Ci di W-188 è potenzialmente in grado di provvedere al trattamento terapeutico di centinaia di pazienti per un periodo di tempo abbastanza lungo, compreso tra 2 e 6 mesi), in modo semplice e rapido e soprattutto con elevata attività specifica (Figura 13).

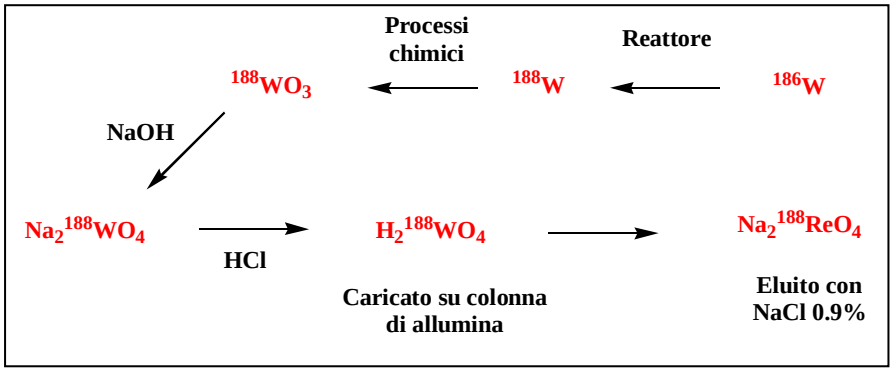


Figura 13. Schema di ottenimento di Re-188 a partire dal padre W-188 [6].

Questi vantaggi, unitamente alle interessanti proprietà nucleari, fanno dell'isotopo Re-188 un potenziale candidato per la preparazione di radiofarmaci radioterapici.

Emettendo radiazioni β con penetrazione nel tessuto per 11 mm, può essere utilizzato nel trattamento loco-regionale di diversi tipi di tumori maligni, somministrando il radiofarmaco mediante una selettiva iniezione intrarteriosa nel vaso che nutre il tumore, nel caso di neoplasie epatiche, oppure con un'iniezione di una soluzione colloidale direttamente nel tessuto tumorale.

La somministrazione sistemica di Re-188 trova impiego nell'ablazione del midollo spinale, nella radioterapia recettore-specifica e nel trattamento palliativo del dolore associato a metastasi ossee.

Un importante fattore che aggiunge importanza ai farmaci marcati con Re-186 e Re-188 è rappresentato dal fatto che il Renio è un congenere chimico del Tecnezio. Questi due elementi, appartenendo al medesimo gruppo (7) della Tavola Periodica, presentano infatti una chimica qualitativamente affine. La somiglianza chimica di questi due elementi è legata al fenomeno della "contrazione lantanidica": il riempimento dei 7 orbitali 4f (nei 14 elementi dei lantanidi) avviene tra il riempimento dei 5 orbitali 4d (nei 10 metalli di transizione della seconda serie) ed i 5 orbitali 5d (nei 10 metalli di transizione della terza serie). I 14 elettroni 4f, per la forma degli orbitali stessi, non sono efficientemente schermati dalle corrispondenti cariche positive nucleari e per questo gli elettroni 5d risentono maggiormente dell'attrazione nucleare e si trovano più vicini al nucleo rispetto a quanto atteso. Ciò fa sì che i raggi atomici dei metalli della terza serie di transizione siano simili a quello dei rispettivi congeneri appartenenti al secondo periodo: il raggio di Re(0) e Tc(0) nei metalli è identico. Considerando, ad esempio, le misure del raggio dei cristalli di complessi tetra-coordinati di Mn(VII), Tc(VII) e Re(VII), sperimentalmente esse risultano di 0.39, 0.51 e 0.52 Å rispettivamente. La lunghezza del legame metallo-cloruro in complessi $[Tc^{IV}Cl_6]^{2-}$ e $[Re^{IV}Cl_6]^{2-}$ è 2.35±0.01 Å.

In generale, è quindi possibile anticipare che analoghi complessi di renio e tecnezio possono presentare stessa forma, dimensione, carica formale, momento dipolare, mobilità ionica e lipofilia, e quindi le stesse caratteristiche fisiche. Nelle applicazioni medico nucleari questo diventa estremamente importante. Infatti, in termini di *proprietà fisiche* dipendenti da forma, dimensione e carica, analoghi complessi di renio e tecnezio sono identici, e non possono essere discriminati dagli ambienti biologici, fluidi o sistemi

recettoriali che siano.

Complessi di Tc-99m in grado di accumularsi selettivamente in tessuti anormali o tumorali che trovano impiego in Medicina Nucleare come agenti diagnostici, possono quindi essere utilizzati come *matched pair* per lo sviluppo di analoghi complessi radioterapici di Re-186 o Re-188. Un esempio può essere rappresentato da ^{186}Re-HEDP (idrossietilenedifosfonato) che, localizzandosi nel tessuto osseo grazie al legame con l'idrossiapatite, viene usato per il trattamento di metastasi ossee, o da anticorpi monoclonali radiomarcati con Re-188 selettivi per alcune specie di tumori.

Nonostante la somiglianza nelle proprietà chimiche possa indurre a ritenere realizzabile il semplice trasferimento delle procedure di sintesi dei radiofarmaci del Tc-99m alla preparazione di analoghi complessi di Re-186/188 esiste, tuttavia, una discrepanza sostanziale tra le proprietà chimiche dei due elementi dovuta a significative differenze in termini di potenziale standard di riduzione E° associato alle semireazioni di ossido-riduzione dell'anione perrenato e pertecnetato (Tabella 7). Per le reazioni di riduzione da Re(VII) a Re(III), E° è più basso di circa 200-400 mV rispetto a quello delle reazioni di riduzione del Tc(VII) a Tc(III), a parità di tipo di complesso.

Semireazione	*E °(V)*
$ReO_4^- + 2\ H_2O + 3\ e^- = ReO_2 + 4\ OH^-$	- 0.594
$ReO_4^- + 4\ H_2O + 7\ e^- = Re + 8\ OH^-$	- 0.584
$ReO_4^- + 8\ H^+ + 7\ e^- = Re + 4\ H_2O$	+ 0.362
$ReO_4^- + 4\ H^+ + 3\ e^- = ReO_2 + 2\ H_2O$	+ 0.510
$TcO_4^- + 4\ H^+ + 3\ e^- = TcO_2 + 2\ H_2O$	+ 0.7

Tabella 7. Potenziali standard di riduzione, E°,
di alcune coppie red-ox ottenute da $[ReO_4]^-$ e $[TcO_4]^-$.

Appare evidente come in condizioni standard risulti molto più difficile ridurre l'anione perrenato, $[^{188}ReO_4]^-$, rispetto al corrispondente anione del Tecnezio, $[^{99m}TcO_4]^-$. Questo comportamento è spiegato dal fatto che gli elettroni 4d e 5s del Tc sono praticamente isoenergetici, mentre ciò non si può dire per il Re, in cui gli elettroni 6s hanno un'energia superiore ai 5d. Nelle applicazioni *in vivo*, una manifestazione di questo fenomeno fa sì che radiofarmaci del renio ridotto tendono ad essere ossidati a perrenato molto più

rapidamente degli omologhi tecneziati, cui ne consegue un'alterazione del comportamento biologico.

Nella preparazione di radiocomplessi, utilizzando una stessa procedura sintetica, risulta quindi molto più difficile ottenere un complesso di renio ridotto rispetto al corrispondente di tecnezio, rendendo necessarie condizioni di riduzione più drastiche, quali una maggiore concentrazione di riducente, alta temperatura di reazione, bassi valori di pH, nonché la presenza di opportuni sistemi chelanti in grado di stabilizzare il metallo, anche solo temporaneamente, allo stato ridotto.

C2.2.1 CHIMICA DI COORDINAZIONE DEL RENIO [7].

Per il renio, come per il tecnezio, risultano sperimentalmente accertati tutti gli stati di ossidazione da +7 (d^0) a –1 (d^8), e le forme più stabili in acqua sono lo ione perrenato $[Re^{VII}O_4]^-$ ed il diossido $Re^{IV}O_2$, insolubile. L'ampia varietà di stati di ossidazione deriva dall'elevata disponibilità degli elettroni contenuti negli orbitali d che, non essendo completamente vincolati in una struttura elettronica inerte, possono intervenire nella formazione di complessi in cui il metallo si trova in alti stati di ossidazione e facilitare la retrodonazione di elettroni dal metallo al legante con conseguente stabilizzazione dei bassi stati di ossidazione.

Nello stato di ossidazione VII il Renio forma uno ione tetraedrico molto stabile $[ReO_4]^-$, base coniugata dell'acido perrenico ($HReO_4$). Lo ione $[ReO_4]^-$ rappresenta il materiale di partenza per tutte le preparazioni che utilizzano questo metallo, sia nella sintesi macroscopica, sia in Medicina Nucleare, eluito direttamente dal generatore ed è molto utilizzato anche in catalisi e nei processi commerciali. Il perrenato in soluzione acquosa è un ossidante più debole del pertecnetato e in assenza di agenti complessanti origina ossidi di composizione non ben definita.

Gli stati di ossidazione V e VI dismutano facilmente, tuttavia il Re(V) è stabilizzato da numerosi leganti. La tendenza a formare legami multipli con ossigeno e azoto è forte nell'intervallo di stati di ossidazione compresi tra VII e V, diminuisce per il IV[8].

Il legame tra due atomi di renio appare nei complessi di Re(IV) ed è importante per il Re(III). Re(II) si trova soprattutto in complessi di direnio con triplo legame.

Gli stati di ossidazione +1, 0 e -1 sono soprattutto presenti in chimica organometallica nei complessi carbonilici e con leganti fosfinici. Questi ultimi, grazie a peculiari proprietà

coordinanti (sono leganti π–accettori e σ-donatori), che permettono di stabilizzare stati di ossidazione intermedi del metallo, sono molto presenti anche nella chimica di coordinazione del renio, come in quella del tecnezio.

La ricchezza di stati di ossidazione permette di ottenere vari complessi utilizzando condizioni attentamente controllate ed opportuni leganti coordinanti (Tabella 8).

Stato di Ossidazione	Momento magnetico	Numero di coordinazione	Caratteristiche
VII (d^0)	Diamagnetico	9	$[ReH_9]^{2-}$
		8	$[ReF_8]^-$
		7	$[ReOF_6]^-$
		6	geometria ottaedrica $[ReO_3Cl(2,2\text{-bipyridine})]$ trigonale $[Re(NHSC_6H_4)_3]^+$
		5	geometria piramidale a base quadrata $[Re(NPPh_3)(SPh)_4]$
		4	geometria tetraedrica $[ReO_4]^-$, molto stabile, si ottiene dall'idrolisi di altre specie in ambiente ossidante, debolmente ossidante
VI (d^1)	1,2-1,7 MB	8	geometria ad antiprisma a base quadrata $[ReF_8]^{2-}$
		7	geometria bipiramidale a base pentagonale $[ReF_7]^-$
		6	geometria ottaedrica del tipo$[ReOX_4L]$ quale $[ReOCl_4H_2O]$ trigonale $[Re(S_2C_2Ph_3)_3]$
		5	geometria piramidale a base quadrata $[ReNCl_4]^-$, $[ReO_5]^-$
		4	geometria tetraedrica $[ReO_4]^{2-}$ instabile, dismuta in Re(VII) e Re(IV)
V (d^2)	Diamagnetico	6	geometria ottaedrica $[ReF_6]^-$, del tipo $[ReOX_5]^{2-}$, $[ReOX_3L_2]$, $[ReO_2L_4]^+$, $[Re(NR)X_3L_2]$
		5	geometria piramidale a base quadrata $[ReOBr_4]^-$ complessi stabili, *cori* Re=O, Re≡N
IV (d^3)	3,1-3,8 MB	6	geometria ottaedrica complessi del tipo $[MX_6]^{2-}$, $[MX_5L]^-$, $[MX_4L_2]$, esempi: $[K_2ReCl_6]$ ReO_2, ReS_2, qualche esempio di legame Re-Re
III (d^4)	1,5-2,1 MB	7	geometria a bipiramide pentagonale $[K_4Re(CN)_7 \cdot 2H_2O]$, $[ReX_2L_4]^+$, $[ReX_3L_3]$, $[ReX_4L_2]$
		6	geometria ottaedrica $[Re(acac)_2Cl_2]^-$
		5	geometria trigonale bipiramidale $[Re(SAr)_3(NCMe)(PPh_3)]$ - dimeri con legame Re-Re: $[Re_2X_8]^{2-}$, $[Re_2X_6L_2]$ - *clusters* trinucleari: $[Re_2X_{12}]^{3-}$, $[Re_3X_{11}]^{2-}$, $[Re_3X_{10}]^-$, $[Re_3X_9L_2]$

II (d^5)		6	geometria ottaedrica, complessi molto rari, del tipo $[ReX_2L_4]$, $[MXL_5]^+$, esempio: $[ReClN_2(PMe_2Ph)_4]^+$.
I (d^6)	Diamagnetico	6	geometria ottaedrica $[K_5Re(CN)_6]$ trigonale bipiramidale $[ReCl(dppe)_2]$ leganti: CO, σ-alchili ed arili, π-areni, idruri, isonitrili, piridine.
0 (d^7)			Derivati mono e binucleari del $Re_2(CO)_{10}$
-1 (d^8)	Diamagnetico		$[Re(CO)_6]^-$ e derivati polinucleari

Tabella 8. Caratteristiche dei complessi di renio a vari stati di ossidazione[9].

.

REATTIVITÀ DEI COMPLESSI DI RENIO.

Generalmente i complessi di renio sono meno reattivi degli analoghi del tecnezio. Questa proprietà è comune a tutti i metalli di transizione della terza serie, se paragonati con i metalli dello stesso gruppo della prima e della seconda. La difficoltà di riduzione del perrenato legata all'inerzia chimica rendono difficile la sintesi diretta di complessi in cui il metallo si trovi in più bassi stati di ossidazione. A questo scopo è, quindi, necessario utilizzare reazioni di scambio a partire da complessi precursori contenenti renio ridotto, quali $[ReOCl_3(PPh_3)_2]$, $[ReOX_4]^-$ per il Re(V), e $[ReCl_3(MeCN)(PPh_3)_2]$ per i complessi di Re(III).

E' stata proposta una classificazione di reattività basata sulla teoria degli orbitali di valenza: i complessi ottaedrici, con utilizzo di orbitali atomici ibridi d^2sp^3, che possiedono almeno un orbitale d vuoto, quali complessi di Re(V) d^2, Re(VI) d^1, Re(VII) d^0 presentano nelle reazioni di scambio una elevata reattività nei confronti di agenti nucleofili. Complessi ottaedrici con orditali d maggiormente occupati, quindi Re(I) d^6, Re(II) d^5, Re(III) d^4, Re(IV) d^3 sono invece chimicamente inerti.

La conoscenza della chimica dei metalli di transizione del II e III periodo permette di prevedere che la velocità di sostituzione del centro metallico Re è minore rispetto a quella osservata per il Tc e questa differenza è stata determinata sperimentalmente.

Sono disponibili dati cinetici per la reazione di racemizzazione dei complessi [Me(V)

penicillammina]: il rapporto tra le costanti di velocità k^{Tc}/k^{Re}, misurate a temperatura ambiente, è circa 60, a favore del Tc. Per reazioni bimolecolari, di maggiore interesse per la Medicina Nucleare, i valori del rapporto, determinati per diverse coppie di complessi, sono maggiori. Studi condotti su reazioni bimolecolari hanno infatti evidenziato che per un sistema in cui il metallo si trova allo stato d'ossidazione V le sostituzioni al Tc avvengono con una velocità di 10^3-10^4 volte superiore a quella osservata per il renio, indipendentemente dal fatto che il legante sostituito si trovi in posizione *cis* o *trans* rispetto al *core* $[M=O]^{3+}$, che il complesso sia anionico o cationico e che la reazione sia condotta in un mezzo acquoso o no.

Questo trova serie implicazioni in Medicina Nucleare e nello sviluppo di radiofarmaci: il trasferimento della strategia di sintesi di radiofarmaci, applicata con successo al Tc-99m, che prevede reazioni di scambio dei leganti in intermedi contenenti il metallo preridotto, richiede l'utilizzo di condizioni di reazione più drastiche per l'ottenimento di analoghi complessi con radioisotopi di renio.

C2.2.2 STRATEGIE SINTETICHE DI MARCATURA DI BIOMOLECOLE CON Re-186/188.

Negli ultimi anni, mimando i sistemi sviluppati per la marcatura con Tc-99m di molecole biologicamente attive, si sono estese tali strategie sintetiche al Re-186/188. Due sono gli approcci utilizzabili: la marcatura diretta di molecole sito-specifiche, generalmente rappresentate da una sostanza di natura proteica quali peptidi, anticorpi o loro frammenti[10, 11], e l'approccio bifunzionale in cui il metallo è stabilizzato da leganti, aventi un opportuno set di atomi, uno dei quali (legante bifunzionale) risulta derivatizzato con una molecola biologicamente attiva che ne determina le proprietà di *targeting* [12-14].

La marcatura diretta è una strategia sintetica che presenta numerosi inconvenienti, da imputare sia all'instabilità delle interazioni tra il metallo e la proteina, sia alla rapida tendenza del renio a riossidarsi. Indipendentemente da questo, marcature di anticorpi con Re-186/188 sono state ottenute in alta resa, e studi di stabilità (*in vitro* e *in vivo*) non hanno evidenziato alterazione del prodotto finale.

La strategia bifunzionale permette, invece, di legare in modo stabile e specifico il renio ridotto ad una molecola biologicamente attiva. La scelta del legante bifunzionale dipende dallo stato di ossidazione del radionuclide, esso deve stabilizzarlo e permettere il legame con la biomolecola. La possibile presenza di siti di legame aspecifici nella struttura della biomolecola rende necessario l'utilizzo di sistemi chelanti con una spiccata affinità nei confronti del renio ridotto in modo da minimizzare eventuali interazioni secondarie.

Il *core* più rappresentato nella chimica di coordinazione del renio è l'*osso* $[Re^{V}=O]^{3+}$, ottenuto per riduzione del perrenato con agenti riducenti, quali sali di Sn(II), in quantità maggiore rispetto a quella utilizzata per la riduzione del pertecnetato. La procedura sintetica generalmente prevede due passaggi successivi: nel primo si ha la riduzione del metallo con la formazione del *core osso* che viene stabilizzato dalla coordinazione con opportuni leganti, quali gluconato, glucoeptonato e tartrato, nella formazione di un complesso labile; nel secondo passaggio dopo l'aggiunta del legante bifunzionale per transchelazione si ottiene il complesso finale, stabile.

Negli ultimi venti anni sono stati sviluppati molti leganti bifunzionali [15-19], la maggior parte dei quali presentano, nei confronti del renio, un *set* di atomi coordinanti del tipo $N_xS_{(4-x)}$, (Figura 14) quali:

- N_2S_2 come diamminotioli (DADT), diamidetioli (DADS) e

monoamidemonoamminoditiolo (MAMA),

- N_3S triamidetioli e mercaptoacetilglicina (MAG_3),
- N_4 propilenammina-ossima (PnAO).

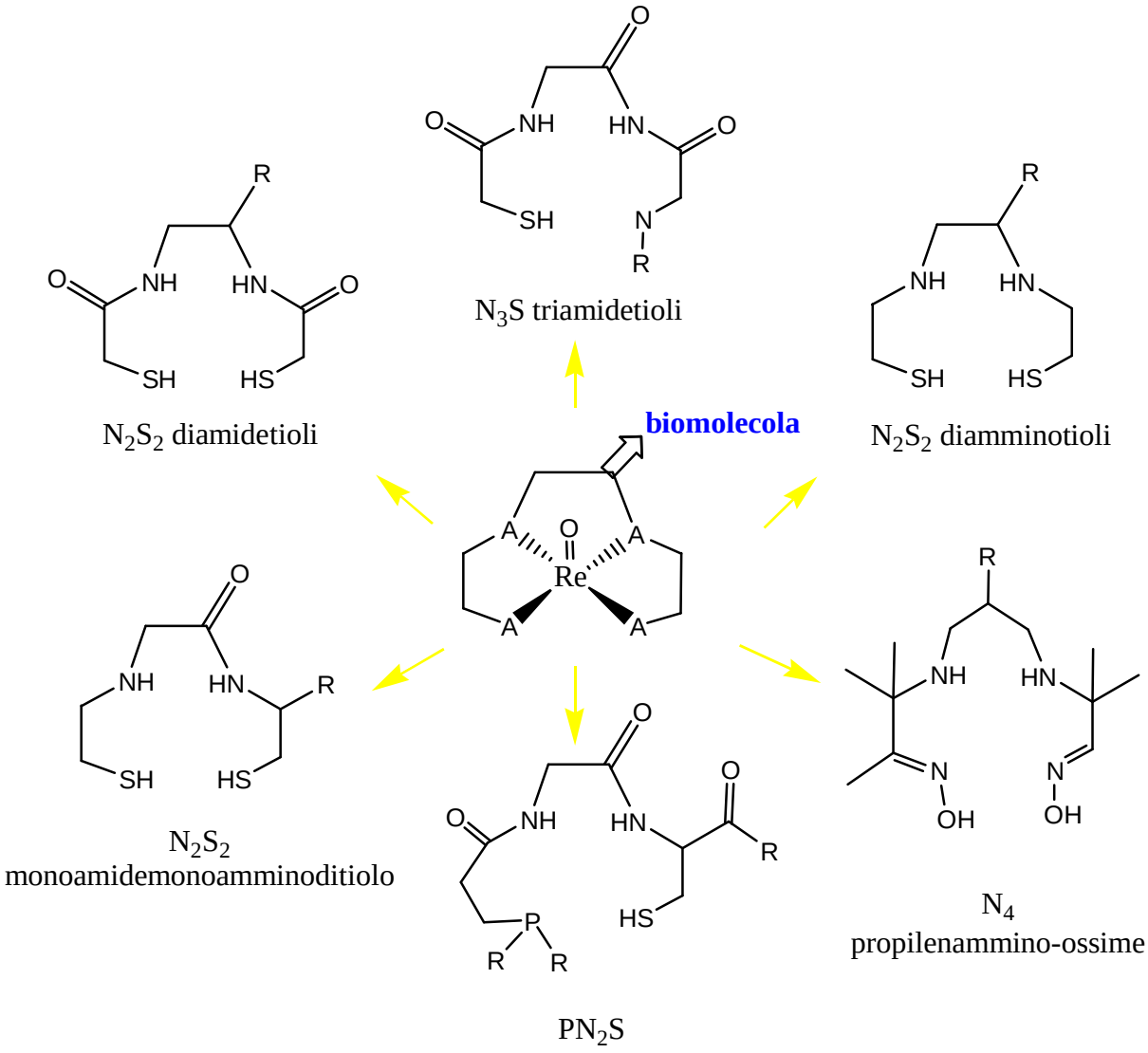


Figura 14. Leganti bifunzionali disponibili per la coordinazione del *core* $[Re^{V}=O]^{3+}$.

Sebbene questi sistemi chelanti siano in grado di formare con il metallo complessi stabili caratterizzati da un'elevata attività specifica che possono essere utilizzati nella marcatura di biomolecole, quali piccoli peptidi o molecole biologicamente attive come steroidi, essi però presentano numerose limitazioni. Essi possono, infatti, aumentare la captazione epatica e favorire la via di escrezione epato-biliare del complesso finale (il radiofarmaco) per aumento di dimensioni, lipofilia e diminuzione della flessibilità della biomolecola.

Inoltre, molti di questi chelanti sono asimmetrici e portano alla produzione di due o più diastereoismeri rispetto al *core osso*, che possono avere *in vivo* un diverso comportamento biodistributivo.

Appare evidente che lo sviluppo di molecole bioconiugate sito-specifiche marcate con Re-186/188 deve garantire elevata resa di marcatura, elevata attività specifica ed il metallo deve essere coordinato al sistema coniugato in un modo ben definito e, se possibile, unico. Inoltre, il complesso coniugato deve presentare appropriate caratteristiche fisiche, tali da permetterne una rapida *clearance* dai tessuti sani e dal sangue ed essere eliminato preferenzialmente per via renale, in modo da minimizzare la dose di radiazione ceduta ai tessuti non-bersaglio. Si sono quindi sviluppati nuovi leganti tetradentati, del tipo N_xP_y, S_xP_y e $N_xS_yP_z$, tra i quali, in particolare, PN_2S ha mostrato una buona stabilità *in vivo* ed *in vitro,* anche se rimane la limitazione applicativa legata alla formazione di due diastereoisomeri [20], leganti P_2S_2 contenenti gruppi idrossimetil-fosfinici (HMP, -$P(CH_2OH)_2$), in grado di formare con il metallo in soluzione acquosa complessi stabili ed in alta resa del tipo $[ReO_2(P_2S_2)]^+$, caratterizzati da una spiccata polarità e solubilità nel mezzo acquoso [21-24].

L'introduzione nello scheletro carbonioso del sistema chelante di un gruppo carbossilico ($(CH_2)_4COOH$) (Figura 15) permette l'introduzione, di una biomolecola mediante formazione di un legame carboamidico. Un primo esempio è rappresentato dai complessi [$^{186/188}ReO_2(P_2S_2)$]-bombesina (BBN) che mostrano un'elevata affinità e specificità di legame nei confronti di cellule cancerogene che esprimono i recettori della BBN e una rapida *clearance* ematica ed eliminazione prevalentemente attraverso la via renale [25].

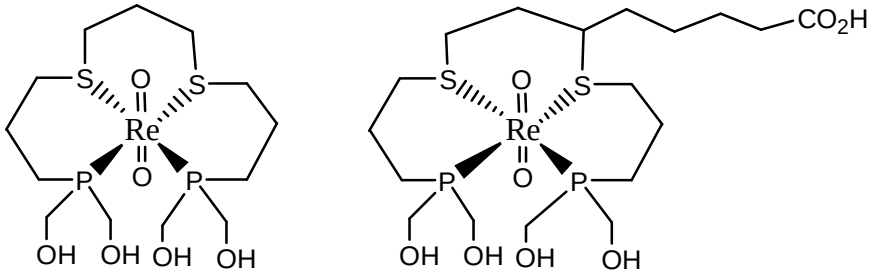


Figura 15. Complessi del tipo $[ReO_2(P_2S_2)]^+$.

Una strategia alternativa di stabilizzazione del core $[Re^{V}=O]^{3+}$ consiste nell'approccio "3+1" in cui il metallo è coordinato da un legante tiolato tridentato $[S\text{-}X\text{-}S]^{2-}$ (X=O, S, NR) e

da un legante tiolico monodentato, approccio tuttavia poco utilizzato perché quest'ultimo chelante è legato solo labilmente e viene facilmente sostituito [26].

La sintesi di Re-186/188 tricarbonile, proposta nel 2001 da Alberto e collaboratori, appare essere un promettente approccio nella formulazione di questi radiofarmaci [27,28].

Il sintone di partenza per la marcatura di biomolecole, *fac*-[$^{186/188}$Re$(OH_2)_3(CO)_3$]$^+$ è ottenuto in alta resa per riduzione e carbonilazione di [$^{186/188}$$ReO_4$]$^-$ in presenza di Na[H_3BCO_2H] e $NH_3 \cdot BH_3$, in soluzione salina. Caratteristica peculiare di tale frammento metallico è l'elevata stabilità alla sostituzione dei tre leganti CO e la notevole labilità dei legami delle molecole d'acqua coordinate, attribuibile alla configurazione elettronica d^6 del metallo nello stato di ossidazione (I) in un campo ottaedrico. Studi condotti sulla reattività di *fac*-[$^{186/188}$Re$(OH_2)_3(CO)_3$]$^+$ hanno mostrato che la velocità di sostituzione delle molecole d'acqua è strettamente dipendente dalle caratteristiche elettroniche dei leganti entranti [29]. Questi sistemi includono ammine alifatiche, gruppi ammidici e carbossilici, naturalmente presenti nelle proteine e nei peptidi, in particolare le ammine aromatiche, contenenti il gruppo imidazolico (un componente dell'istidina) sono in grado di reagire in modo rapido e specifico con il sintone[30-34] anche in concentrazione inferiore a 10^{-5}M (Figura 16).

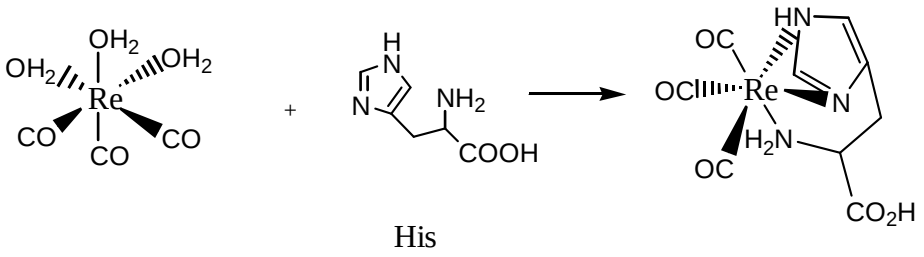


Figura 16.: Acqua complesso di Re(I) tricarbonile. Il legante CO risulta stabile alla sostituzione mentre il gruppo H_2O risulta labile dando facilmente reazione di sostituzione.

Buoni risultati sono stati ottenuti anche con altri amminoacidi naturali o derivati di sintesi di cisteina, metionina e con triammine (PDA), utilizzati per la marcatura di biomolecole, quali neurotensina, encefaline, vitamina B12 e sequenze nucleotidiche (NLS) [35, 36].

I vantaggi dell'utilizzo del frammento metallico tricarbonilico risiedono nelle limitate dimensioni del complesso finale, nelle minime perturbazioni alla struttura e funzione della biomolecola e nella biocompatibilità del legante bifunzionale, che può essere metabolizzato seguendo le normali vie di catalisi di amminoacidi.

Questi risultati suggeriscono che il sintone può essere utilizzato per marcare selettivamente biomolecole coniugate al fine di ottenere potenziali radioterapici caratterizzati da un'elevata attività specifica.

Un limite di tale approccio risiede nella possibile transchelazione *in vivo* che questi complessi possono subire dovuta alla coordinazione competitiva con amminoacidi biologici presenti nell'organismo e nel *pool* ematico in particolare. Questo problema è stato superato mediante la sostituzione di leganti mono- e bidentati con altri tridentati, in grado di saturare completamente la sfera di coordinazione del metallo, riducendo *in vivo* le interazioni con chelanti organici ed aumentandone la stabilità [37]. I leganti più utilizzati sono tridentati, in grado di formare complessi tricarbonilici neutri e termodinamicamente stabili. Gli svantaggi legati alla loro applicazione sono la necessità di proteggere gli atomi coordinanti durante la formazione del legame con la biomolecola e l'ottenimento, con leganti asimmetrici, del complesso come miscela di due diastereoisomeri dotati di diverse caratteristiche in termini di stabilità ed affinità per il sito bersaglio.

Nell'approccio "2+1" si ricorre all'utilizzo di un legante bidentato, L_2, legato covalentemente alla biomolecola (BAM) ed uno monodentato, L_1 quali imidazolo o isocianide nell'ottenimento, in alta resa, del complesso [$^{186/188}$Re(L_2-BAM)L_1(CO)$_3$] [38].

Altri chelanti in grado di reagire efficacemente con il sintone tricarbonile sono molecole non amminoacidiche quali ciclopentadienilici, utilizzati per la marcatura di derivati dell'ormone estradiolo [39], poli(pirazolil)borati e difenilfosfine, ma portano alla formazione di complessi dotati di un'eccessiva lipofilia.

Nonostante le strategie di sintesi riportate siano promettenti per lo sviluppo di radiofarmaci di Re-186/188, le loro preparazioni richiedono spesso l'uso di energiche condizioni di riduzione quali elevate quantità di Sn(II) o riducenti forti come il $NaBH_4$, ed elevate temperature. Per questo motivo la riduzione del perrenato e la stabilizzazione di questo metallo nei suoi bassi stati di ossidazione continuano ad essere un problema chiave nello sviluppo di radiofarmaci.

C2.2.3 RADIOFARMACI DI Re-188.

Re-188 è un ottimo candidato per lo sviluppo di una grande varietà di radiofarmaci con differenti applicazioni terapeutiche, come dimostrato dal fatto che attualmente vari radiocomplessi sono in fase di studio in più di 60 centri di ricerca nel mondo. Il maggiore campo di applicazione rimane la terapia oncologica.

Vari *trials* clinici hanno dimostrato l'efficacia come palliativi di complessi ^{188}Re-HEDP (idrossietilidendifosfonato) [40] e ^{188}Re-DMSA (acido dimercaptosuccinico) [41] nel trattamento del dolore associato a metastasi ossee con remissione del dolore nell'80% dei casi.

La maggior parte dei radiofarmaci contenenti radioisotopi del renio sono *target*-specifici, in grado di localizzarsi selettivamente nella sede neoplastica, con meccanismo di *uptake* dipendente principalmente dalle caratteristiche della molecola vettrice, la cui biodistribuzione è influenzata anche dai leganti che coordinano il metallo, in quanto essi intervengono nella modulazione delle caratteristiche chimico-fisiche del complesso, come dimensioni, carica e lipofilia.

Negli ultimi anni sono entrati in fase di studio clinico radiofarmaci recettore-specifici di Re-188 che, iniettati per via sistemica, sono in grado di raggiungere e distruggere selettivamente il tessuto neoplastico. Alcuni esempi sono: il peptide ciclico CCMSH, analogo dell'α-melanotropina che coordina il *core* renio *osso* con gli atomi NS_3 (T.P. Quinn, PNAS, 95, 1998; University of Missouri), (Figura 17); il peptide P2045 che coordina il renio, sempre con atomi N_3S, nella formazione del complesso [^{188}Re(O)(N_3S-P2045)] Neotide, in grado di legare con elevata affinità e specificità i recetttori della somatostatina sstr2 e sstr5, in Fase I di sperimentazione clinica per la terapia del tumore polmonare a piccole cellule e non [42].

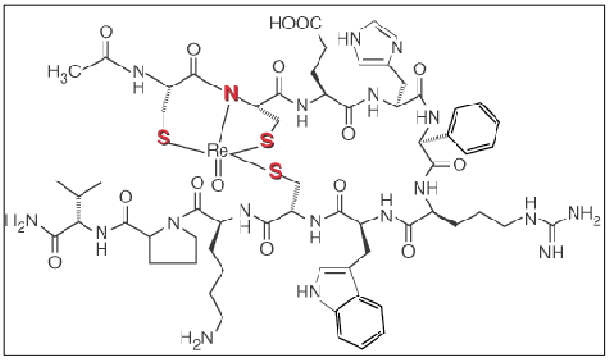


Figura 17. Complesso di [Re(O)-(NS_3-CCMSH)].

Nella radioimmunoterapia i pazienti ad alto rischio di leucemia mioloide o sindrome mioloidoplastica vengono pretrattati, prima del trapianto di cellule staminali, con immunomodulatori al fine di diminuire la risposta immunitaria e prevenire il rigetto. In questo settore trovano applicazione, e sono attualmente in fase II, alcuni radiocomplessi di Re-188 recettore-specifici, quali BW-250/183, anti-CD 66 (Ulm/Hannover) che hanno mostrato una captazione selettiva da parte del midollo osseo, con risparmio dei tessuti sani e quindi minori effetti collaterali [43, 44].

La radioterapia di tipo invasivo, che prevede iniezioni attraverso vie non convenzionali o mediante particolari strumenti ausiliari come piccoli cateteri, è molto utilizzata per localizzare nella sede anatomica l'agente terapeutico. Attualmente in fase I nel trattamento di tumori epatici il complesso di Re-188(V), ^{188}ReN-DEDC [bis(dietilditiocarbamato)], avente un *core* azoturo coordinato da due leganti del tipo ditiocarbammato (Figura 18), somministrato per iniezione arteriosa intraepatica con una miscela di acidi grassi di derivazione vegetale (lipiodol) [45, 46].

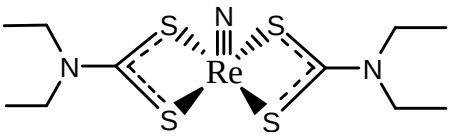


Figura 18. Struttura di ^{188}ReN-DEDC.

La terapia invasiva con Re-188 è stata applicata con successo anche nel trattamento del tumore epatico e nelle metastasi di carcinoma colonrettale mediante marcatura di microsfere B-20 (di dimensioni tra 20 e 30 micrometri) (J. Kropp, et al., Dresden, Germany).

Nella sinovectomia e nel trattamento dell'artrite sono utilizzati complessi stabili di colloidi di Re-188 con stagno, con dimensioni nel range 1-10 micron, la cui efficacia e sicurezza è stata recentemente dimostrata da studi clinici [47].

La terapia invasiva con Re-188 viene utilizzata nella prevenzione di "re-stenosi" di coronarie. In seguito ad un intervento di angioplastica spesso si ha nuovamente una riduzione del lume vasale che può portare nuovamente ad occlusione, decretando l'insuccesso della terapia. Questo inconveniente può essere superato mediante irradiazione del vaso con β-emittenti, quale $[^{188}ReO_4]^-$, dopo angioplastica, ottenendo una

riduzione della restenosi del 40% (Figura 19) [48].

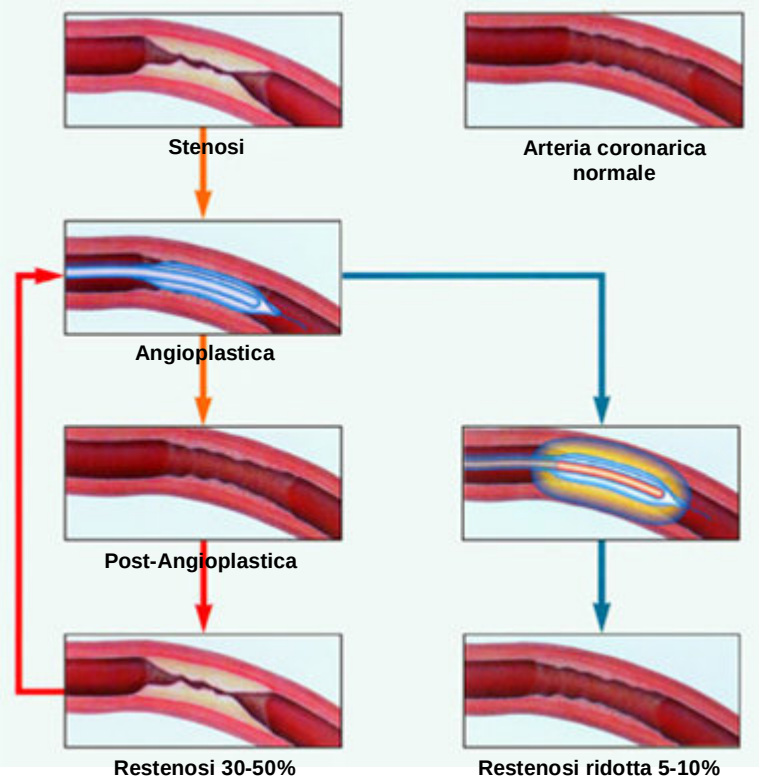


Figura 19. Fenomeno di restenosi dopo angioplastica
e sua prevenzione con utilizzo di radioisotopi β-emittenti.

Tc-99m E Re-186/188: DIVERSO COMPORTAMENTO DEI RADIOFARMACI *IN VIVO*.

In seguito a somministrazione in *vivo*, analoghi complessi di Tc-99m e Re-186/188 dovrebbero presentare, in assenza di reazioni ossidoriduttive, un identico comportamento biologico. Questo è stato osservato, ad esempio, per complessi del tipo $[M(DMPE)_3]^+$ con DMPE 1,2-bis-(dimetilfosfino)etano e M= Tc-99m o Re-186/188 [49].

In realtà nei sistemi biologici avvengono numerose reazioni ossidoriduttive e quindi la distribuzione dei due radiocomplessi in uno stesso organismo è, in alcuni casi, diversa. Questo è stato osservato per complessi del tipo *trans*-$[M^{(III)}(DMPE)_2Cl_2]^+$, inizialmente studiati come traccianti cardiaci. In seguito a riduzione, la trasformazione in vivo del complesso monocationico in una specie neutra *trans*-$[Tc^{(II)}(DMPE)_2Cl_2]$ sembra essere responsabile dell'eliminazione dello stesso dal tessuto cardiaco. Al contrario, l'analogo complesso di renio, non essendo sensibile alla riduzione, rimane nella forma *trans*-$[Re^{(III)}(DMPE)_2Cl_2]^+$all'interno del miocardio.

Quindi, alla facilità di riduzione dei complessi di Tc, si oppone la maggior stabilità dei complessi di Re nello stato di ossidazione più alto.

Molti radiofarmaci rimangono scarsamente caratterizzati, nonostante siano in uso clinico routinario da molti anni. Un esempio è costituito dall'uso di complessi di Tc-99m e di isotopi di renio con 1,1-difosfonati, in grado di localizzarsi selettivamente in lesioni osteoblastiche quali metastasi di cancro prostatico. L'agente di *imaging* più utilizzato è rappresentato dal complesso di Tc-99m con idrossimetilendifosfonato (Figura 20) la cui struttura è all'oggi sconosciuta e probabilmente disomogenea.

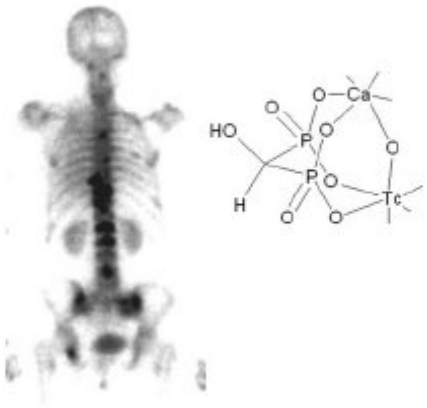


Figura 20. Paziente con metastasi ossee di carcinoma prostatico visualizzate con ^{99m}Tc-HDP. Si osserva un basso *uptake* nel tessuto osseo sano, alto nel tessuto malato (spinale, pelvico, femorale). A destra ipotetico *binding* attraverso il legante difosonato del Tc-99m agli ioni calcio di idrossiapatite nel tessuto osseo.

In base alle analogie tra i due metalli questa tecnologia è stata trasferita alla terapia mediante la formazione di analoghi complessi di Re-186 e Re-188 con idrossietilidendifosfonato (HEDP) da utilizzare come palliativi. Nonostante le ottime premesse, ^{188}Re-HEDP e ^{186}ReHEDP sono non omogenei e instabili *in vivo,* inoltre hanno bassi rapporti *target/background,* dove per *background* si intende sia tessuto sano che tessuti molli. Questo esempio nega l'assunto che complessi di difosfonati con tecnezio e renio sono chimicamente e biologicamente affini. A differenza di ^{99m}Tc-difosfonati, al fine di conferire tropismo osseo ad analoghi di Re-188 è richiesta l'aggiunta di "*carrier*" perrenato. Le preparazioni probabilmente contengono una varietà di specie oligomeriche che hanno differenti selettività per le lesioni, stabilità e rapidità di ossidazione a perrenato *in vivo*. Da un punto di vista chimico è inaccettabile, nonostante il successo clinico, pensare che non sia possibile produrre radiofarmaci di Re-188 con selettività uguale o migliore di ^{99m}Tc-HDP. Un recente e promettente approccio al problema consiste nell'assolvere il gruppo

bifosfonato dalla funzione chelante per Tc/Re che viene svolta in modo insufficiente come testimoniato dall'instabilità mostrata *in vivo* e utilizzare un gruppo chelante in grado di produrre un coniugato omogeneo dal punto di vista radiochimico, più stabile *in vivo* (Figura 21) e con maggiori somiglianze sia chimiche che biologiche tra tecnezio e renio [50].

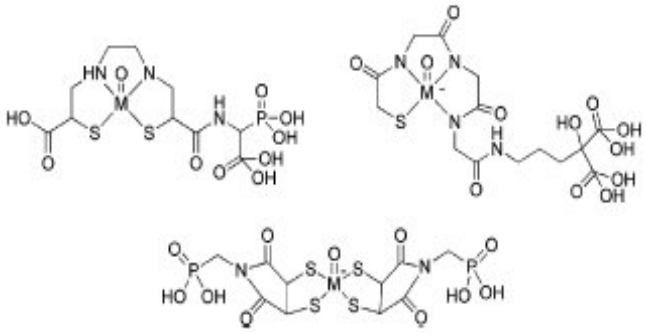


Figura 21. Bifosfonati contenenti chelanti bifounzionali per migliorare *imaging* e terapia di metastasi ossee quando coniugati con Tc-99m o Re-186/Re-188.

Studi biologici condotti con [$^{186/188}$Re(Sn)-HEDP] hanno tuttavia evidenziato che il processo di ossidazione del radiofarmaco risulta essenziale per la sua azione terapeutica al fine di ottenere un elevato rapporto tumore/midollo osseo. Tale complesso viene, infatti, eliminato più velocemente dalle cellule normali del tessuto scheletrico, rispetto a quelle tumorali e il rapporto, dose assorbita dal tessuto tumorale/dose assorbita dal tessuto normale, cresce nel tempo. La rapida eliminazione di questo complesso dai tessuti normali può essere facilmente attribuita all'ossidazione del [$^{186/188}$Re(Sn)-HEDP] a perrenato che si ritrova nelle urine dei pazienti trattati, mentre non vi è traccia di pertecnetato nei pazienti trattati con l'analogo tecneziato.

Questi risultati sono perfettamente coerenti con l'ipotesi di ossidazione in vivo dei complessi di Re-186/188, in misura minore dei complessi di Tc-99m.

La conoscenza e, soprattutto, il controllo dei processi ossidoriduttivi *in vivo* dei complessi di renio sono estremamente importanti per la determinazione dei processi di biodistribuzione di questi radiofarmaci ed, in ultima analisi, per lo sviluppo di agenti terapeutici del Re-186/188.

C3. Parte Sperimentale.

C3.1 MATERIALI E METODI.

I solventi e reagenti impiegati sono stati acquistati dalla Aldrich Chemicals e, se non specificato, sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

I solventi per HPLC sono forniti da Carlo Erba Reagenti.

Le soluzioni utilizzate per le analisi HPLC sono state filtrate con filtri Millipore di diametro di 0.22 μm e degasate prima dell'uso.

I solventi anidri sono stati ottenuti seguendo le procedure riportate in letteratura [51].

Tutte le manipolazioni con Tc-99m e Re-188 sono state eseguite in laboratori idonei all'uso di radionuclidi utilizzando schermature idonee. In particolare, i complessi di Re-188 sono stati preparati presso il "*Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, Institut fur Radiopharmazie*", sito in Rossendorf, Dresda (Germania), in collaborazione con il Prof. H.-J. Pietzsch e con il Dr. B. Noll.

Na[$^{99m}TcO_4$] in soluzione fisiologica è stato ottenuto da un generatore ^{99}Mo / ^{99m}Tc a umido Elumatic III di Schering.

Na[$^{188}ReO_4$] è eluito con soluzione 0.9% NaCl da un generatore $^{188}W/^{188}Re$ (Oak Ridge National Laboratories, Oak Ridge, TN).

Il Re metallico in polvere fine è stato donato dalla H.C. Starck GmbH (Germania), trifenilfosfina è fornita da Strem. *S*-metil-*N*-metilditiocarbazato e L-cisteina-N-Acetile sono stati preparati secondo le metodiche riportate in letteratura [52].

Le cartucce Sep-Pak RP-C18 Waters® permettono la separazione delle sostanze sulla base delle loro caratteristiche di lipofilia.

Le cartucce Sep-Pak CM Waters® permettono la separazione delle sostanze sulla base delle loro caratteristiche di lipofilia e carica cationica.

I leganti amminodifosfinici PNP sono stati preparati secondo le metodiche esposte nella Sezione A. I gruppi fosfinici, in presenza di diossigeno atmosferico, vengono facilmente ossidati a fosfinossido; tutte le reazioni vengono, pertanto, condotte in atmosfera inerte di diazoto, con solventi dediossigenati prima dell'uso.

Per la cromatografia su strato sottile (TLC) sono state utilizzate lastrine di SiO_2 F_{254S} e C_{18}

F_{254S} (Merck). I composti non radioattivi sono stati rivelati mediante lampada UV e/o mediante reazione con I_2. La radioattività presente sulle lastrine TLC è stata rivelata con tecniche autoradiografiche, e misurata utilizzando uno scanner Cyclone® Storage Phosphor System (Perkin Elmer) con software di analisi dell'immagine OptiQuant (Packard, Meridian, CT).

La resa radiochimica (RCY) e la purezza radiochimica (RCP) dei composti radioattivi sono state valutate mediante TLC e HPLC ed espresse come percentuale.

Le analisi HPLC sui complessi di Tc-99m sono state condotte utilizzando uno strumento Beckman System Gold dotato di un sistema a doppia pompa programmabile Model 126, un iniettore a valvola semplice 210A, un rivelatore UV Module 166 (λ = 215 nm) e un detector radioattivo Model 3200 Bioscan; precolonna a fase inversa ODS C_{18} Beckman (4.6 x 45 mm, 5 µm), colonna ODS C_{18} (Beckman, 4,6 x 250 mm, 5 µm).

Le analisi HPLC sui complessi di Re-188 sono state condotte utilizzando uno strumento Perkin Elmer (back pressure: 180 bar), colonna Eurospher-100 C18 (250 x 4.0 mm, 5 µm), dotato di un detector radioattivo DAD LA-480, λ = 254 nm.

L'identità chimica dei complessi purificati è stata confermata mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione mediante uno spettrometro Mariner (PerSeptive Biosystems, Stafford, TX) con il metodo ESI-TOF (tipologia di ionizzazione per elettro-spray, analizzatore di massa a tempo di volo); potenziale di ionizzazione 4200 V, potenziale di accelerazione 100 V. Le analisi sono ottenute per infusione diretta del campione in soluzione metanolica e gli spettri vengono raccolti in un range di scansione tra 50 e 4000 m/z per ioni positivi.

Gli spettri NMR sono stati registrati a 298 K con uno spettrometro Brucker AMX 300, utilizzando Me_4Si come riferimento interno per ^1H ed una soluzione all'85% di H_3PO_4 come riferimento esterno per il ^{31}P. I valori di chemical shifts sono espressi in ppm (δ) e sono riferiti al picco caratteristico del $CHCl_3$ (7.26 ppm) in $CDCl_3$.

Gli spettri IR sono stati eseguiti allo stato solido in pastiglie di KBr (1% di campione) con uno spettrofotometro 1700 FT-IR Perkin Elmer utilizzando per la derivatizzazione dei dati il programma Spectrum versione 5.0.1 (Perkin Elmer).

Le analisi elementari (C, H, N, S) sono state ottenute con un analizzatore elementare Carlo Erba 1108.

La radioattività viene valutata tramite un contatore gamma automatico a cristalli di NaI,

modello Cobra II di Packard.

C3.2 SINTESI DEI PRODOTTI DI PARTENZA DI Re-185/187.

I. Preparazione di $(NBu_4)[ReO_4]$ [53].

Reagenti

Re	PM=186.2
H_2O_2	30% p/v
NH_3	30% p/v
$(NBu_4)Br$	PM=322.37

Procedimento

In un pallone a due colli immerso in bagno di ghiaccio si aggiungono 3 g (16.11 mmol) di Re metallico in polvere. Si bagna la polvere con H_2O distillata (2 ml), quindi si aggiungono lentamente e a più porzioni 150 ml di H_2O_2 30% p/v, controllando il pH per aggiunta di NH_3 (per evitare la formazione di vapori giallo-arancio di Re_2O_5). Dopo 1h a RT la soluzione è limpida di colore grigio, si aggiunge H_2O_2 (300 ml), controllando il pH. Al termine dell'aggiunta si concentra la soluzione fino ad 1/3 e si aggiunge goccia a goccia un eccesso di NBu_4Br (6.4 g in acqua distillata). Si ottiene così la precipitazione del sale bianco di perrenato di tetrabutilammonio, solubile in MeOH e insolubile in H_2O. Si filtra il precipitato su gooch G3 lavando con le acque madri, si ottiene un precipitato grigio che viene lavato con H_2O distillata (2 x 20 ml), e con la minima quantità di MeOH. Si precipita quindi nuovamente $(NBu_4)[ReO_4]$ con Et_2O (400 ml).

Terminata l'aggiunta si filtra e si asciuga il precipitato bianco.

Si ottengono 14.14 mmol di $(NBu_4)[ReO_4]$. RESA: 87.8%.

Caratterizzazione

Analisi elementare calcolata per $C_{16}H_{36}NO_4Re$: C 38.9%, H 3.2%, N 2.8%; trovata: C 38.7%, H 3.3%, N 2.7%.

IR (KBr): □ (Re=O) 906 cm^{-1}.

II. Preparazione di $(NBu_4)[Re^{VI}NCl_4]$.

Reagenti

$(NBu_4)[ReO_4]$ PM=492.69

NaN_3 PM=65.01

Procedimento

137.3 mg (0.28 mmol) di $(NBu_4)[ReO_4]$ vengono solubilizzati in 50 ml di EtOH in un pallone a tre colli immerso in bagno di acqua (controllo della temperatura < 20 °C per evitare la formazione di Re(IV)), collegato ad una trappola di NaOH e mantenuto in atmosfera di diazoto. Si fa gorgogliare nella soluzione HCl anidro in corrente di diazoto (ottenuto da percolazione di H_2SO_4 su NH_4Cl). Dopo circa 15 minuti si aggiungono rapidamente 24.2 mg di NaN_3 solubilizzato nel minimo volume d'acqua. La soluzione inizialmente incolore diventa immediatamente violetta e poi vira al giallo. Dopo 1 h si introducono 26 mg di NaN_3, sciolti nel minimo volume di acqua e non si osservano variazioni cromatiche. Si lascia sotto agitazione a RT. Dopo 12 h si satura la miscela con HCl, quindi si aggiungono altri 34.4 mg di NaN_3 sciolti nel minimo volume d'acqua.

Dopo 30 min si pone il pallone in frigorifero a -4° per circa 5 h; quindi, si filtra il solido bianco (NH_4Cl, NaCl e NaN_3). Le acque madri giallo-verde vengono concentrate e poi poste in freezer a –20 °C per almeno una notte. Il giorno seguente si filtra il precipitato giallo limone di tetrabutilammonio di tetracloronitridorenato (VI).

Si ottengono 157.5 mg (0.27 mmol) di $(NBu_4)[ReNCl_4]$. RESA: 96.4%.

Caratterizzazione

Analisi elementare calcolata per $C_{16}H_{36}Cl_4NRe$: C 32.8%, H 6.2%, N 4.8%, Cl 24.3%; trovata: C 32.4%, H 6.4%, N 4.5%, Cl 23.4%.

IR(KBr): □ (ReN) 1103; □ (ReCl) 329 cm^{-1}.

III. Preparazione di $[Re(N)Cl_2(PPh_3)_2]$ [54, 55].

Reagenti

$(NBu_4)[Re^{VI}NCl_4]$ PM= 584.47

PPh_3 PM= 260

Procedimento

1,80 g (3.08 mmol) di $(NBu_4)[Re^{VI}NCl_4]$ vengono solubilizzati in MeCN (85 ml), la soluzione è rosso-rame; quindi si aggiungono goccia a goccia 8,03 g di PPh_3 (30.9 mmol), sospesa in MeCN (100 ml). Al termine dell'aggiunta la soluzione appare color mattone. Dopo 2 h a riflusso si osserva la presenza di un precipitato arancione mattone, mentre il supernatante è giallo. Si filtra su G3 lavando il precipitato con le acque madri che poi sono concentrate in rotavapor. Il residuo mostra due precipitati: uno di colore giallo ed uno mattone. Si riprende il residuo delle acque madri con MeCN (3 ml) in cui il precipitato giallo si solubilizza ($NBu_4[Re^{VI}NCl_4]$), si filtra con G4. Ambedue i precipitati ottenuti vengono lavati nell'ordine con: H_2O (4 x 5 ml), in cui il precipitato è insolubile, le madri raccolte sono torbide; MeOH (3 x 5 ml), in cui il precipitato è insolubile, discioglie l'eccesso di trifenilfosfina e trifenilfosfinossido; infine Et_2O (5 x 5 ml).

Dopo secchezza si ottengono 2,22 g (2.8 mmol). RESA: 90.91%

Caratterizzazione

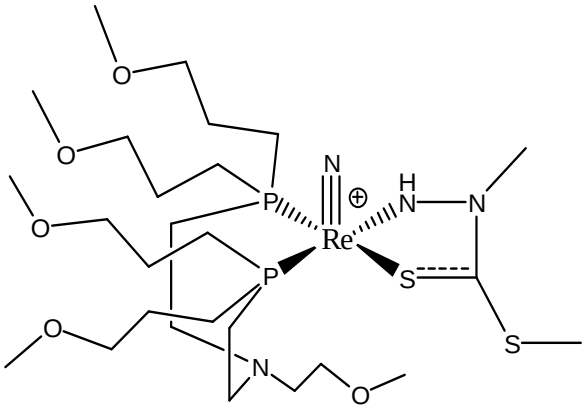
IR: □(ReN) 1097 cm^{-1}, C=C e C-H aromatici a 744, 693, 522, 507 cm^{-1}.

$^{31}P\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): 24.63 ppm (s);

^1H NMR 300 MHz, ($CDCl_3$): δ (ppm)= 7.39-7.41 + 7.54-7.62, $(C_6H_5)_3P$ (2 m).

C3.3 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI $[^{185/187}Re^{V}(N)(XY)(PNP3)]^{0/+}$.

I. Preparazione di $[Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.



Reagenti

$[Re(N)Cl_2(PPh_3)_2]$	PM= 795.69
PNP3	PM= 483.32
DTCZ	PM= 36.3

Procedimento

In un pallone a due colli si sospende $[Re(N)Cl_2(PPh_3)_2]$ (25.1 mg, 0.032 mmol) in CH_2Cl_2 (7 ml) degasato con flusso di N_2, la miscela è arancione mattone. In atmosfera controllata si aggiungono 1.3 equivalenti di PNP3 (20 mg, 0.041 mmol) solubilizzato in 3 ml di EtOH degasato. Si mette la miscela a riflusso e si segue il decorso della reazione via TLC. La sospensione arancione mattone vira al giallo pallido e dopo 40 min diventa giallo brillante.

In TLC si apprezza la formazione dell'intermedio $[Re(N)(PNP3)]^{2+}$. Dopo 1h e 20 min si aggiungono 1.3 equivalenti di DTCZ (5.59 mg, 0.041 mmol) sciolto in EtOH degasato (2 ml). Non si osservano variazioni cromatiche. La reazione viene seguita via TLC e lasciata a riflusso per 12 ore. Si concentra quindi con flusso di diazoto ottenendo un residuo giallo viscoso contenente un precipitato bianco all'interno. Si lava con n-esano (3 x 3 ml) e successivamente con Et_2O (3 x 5ml). Si riprende il residuo con EtOH (5 ml), si ottiene una soluzione giallo oro contenente un precipitato bianco che viene filtrato su G4. La soluzione appare limpida. Analisi TLC e $^{31}P\{^{1}H\}$ NMR condotte sulla miscela di reazione confermano la formazione del complesso $[Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$. Si purifica

il prodotto per via cromatografica su gel di silice. Si solubilizza il residuo nel minimo volume di $CHCl_3$ e si filtra su G3 un eventuale precipitato bianco in modo da ottenere una soluzione limpida, giallo oro. La colonna cromatografica ha lunghezza 30 cm, diametro 1.4 cm, silice SiO_2 60 (Merck) sospesa in $CHCl_3$. Eluente: 400 ml $CHCl_3$/MeOH 95/5, poi 300 ml di $CHCl_3$/MeOH 93/7. Tutte le 60 frazioni raccolte vengono controllate via TLC. Le frazioni di interesse si uniscono e concentrano in rotavapor. Si ottiene un prodotto oleoso, giallo oro analizzato via TLC, HPLC (Figura 22) e completamente caratterizzato via spettroscopia NMR mono- e bidimensionale $^{31}P\{^1H\}$, ^1H, ^{13}C, ^1H-^1H COSY90 e spettrometria di massa.

Si ottengono 30 mg (0.035 mmol) di $[Re(N)(DTCZ)(PNP3)]^+$ (massa calcolata per $C_{26}H_{58}N_4O_5P_2ReS_2$ = 819.29 g/mol). RESA=91.4%.

Caratterizzazione

$^{31}P\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): 15.65 ppm (d, $^2J_{PP}$=12.1 Hz); 7.69 ppm (d, $^2J_{PP}$=12.1 Hz).

^1H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 9.03, N*H*, 1H (s); 4.29, NCH_3, 3H (s); 3.7, S*CH*N, 1H (m); 3.48, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$, 8H (m); 3.33-3.38, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$, 12H (4 s); 3.17, $NCH_2CH_2OCH_3$, 3H (s); 2.85-3.15, $NCH_2CH_2OCH_3$, 2H (m); 2.80, SCH_3, 3H (s); 2.48-2.70, NCH_2CH_2P, 4H (m); 2.10-2.40, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$, 8H (m); 2.01-2.30, NCH_2CH_2P, 4H (m); 2.01-2.15 e 2.30-2.50, $NCH_2CH_2OCH_3$, 2H disastereotopici (m); 1.75, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$, 8H (m).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)= 76.2, NCS (s); 72.29-72.70, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$ (4d); 68.04, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 58.72, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 58.52-58.73, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$ (4 s); 51.99, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 47.92, NCH_2CH_2P (s); 46.62, SCH_3 (s); 45.77, NCH_3 (s); 23.87-27.2, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$ + $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$ + NCH_2CH_2P (3d + 2s).

Nello spettro di massa ESI/TOF si osserva un unico sistema (intensità 100%), con pattern caratteristico di complessi di Renio, il picco principale presenta m/z $[M]^+$= 819.23 dalton.

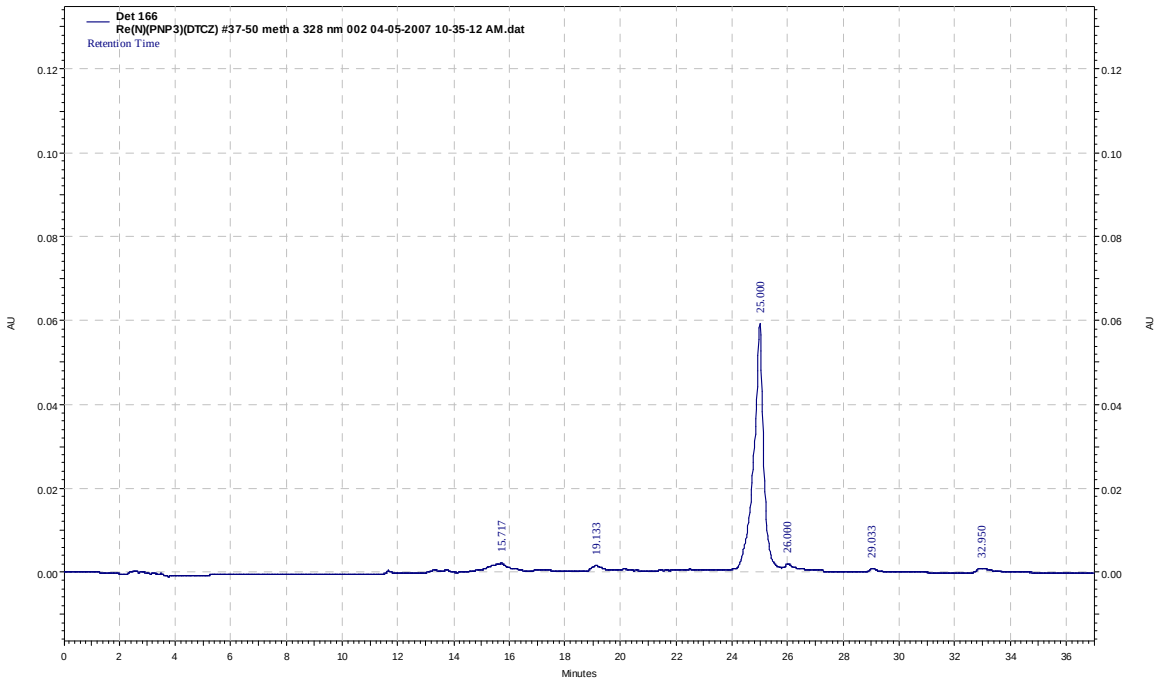
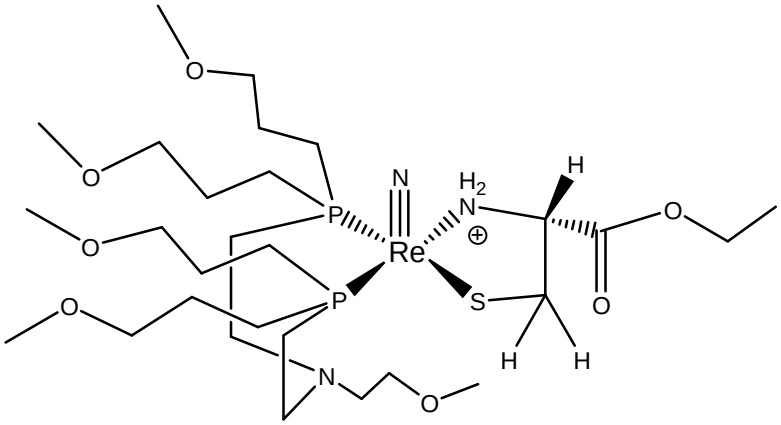


Figura 22. Cromatogramma UV-HPLC di $[Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.

II. Preparazione di *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysOEt)(PNP3)]$^{+}$.



Reagenti

$[Re(N)(Cl)_2(PPh_3)_2]$	PM=795.69
PNP3	PM=483.32
L-CysOEt	PM=185.67

Procedimento

In un pallone a due colli si sospendono 26.3 mg (0.033 mmol) di $[Re(N)Cl_2(PPh_3)_2]$ in CH_2Cl_2 (7 ml); in atmosfera di diazoto si aggiungono 20 mg (0.041 mmol, 1.3 equivalenti) di PNP3 solubilizzato in EtOH degasato (3 ml). La miscela è messa a riflusso per 2h e controllata via TLC, essa lentamente vira al giallo pallido fino a giallo brillante. In atmosfera controllata si aggiunge NEt_3 (6 gocce) e 9.1 mg di CysOEt (0.049 mmol, 1.5 equivalenti) solubilizzata in EtOH degasato (1 ml). Controlli TLC ogni 30 min. Dopo 3 h si aggiungono NEt_3 (6 gocce) e CysOEt (9.5 mg, 0.051 mmol) e si lascia a riflusso per 12 ore. Dopo raffreddamento la miscela è di colore giallo bruno, si filtra un eventuale precipitato cristallino su G4 lavando con EtOH (2 ml) e con CH_2Cl_2 (2 ml). Dopo concentrazione rimane un residuo marrone, oleoso che viene trattato con n-esano (3 x 3 ml) e successivamente con Et_2O (4 x 5 ml) ed infine con EtOH (3 ml). Si filtra su G4 e si concentrano le madri. Si riprende con la minima quantità di $CHCl_3$ (4 ml) e si filtra con G4 per rimuovere un eventuale precipitato marrone. Si purifica la miscela mediante colonna cromatografica di gel di silice SiO_2 60 (Merck) sospesa in $CHCl_3$ di lunghezza 32 cm, diametro 1.4 cm. Fase mobile: MeOH/$CHCl_3$ 7/93 (50 ml), poi MeOH/$CHCl_3$ 1/9 (100 ml). Si raccolgono 32 frazioni controllate tutte via TLC. Si isolano i due diastereoisomeri come prodotti di consistenza oleosa, colore giallo oro, analizzati via TLC, HPLC (Figura 25) e completamente caratterizzati via spettroscopica

NMR mono- e bidimensionale ^{31}P {^{1}H}, ^{1}H, ^{13}C, ^{1}H-^{1}H COSY90 e spettrometria di massa. Si ottengono 26 mg (0.030 mmol) dei due diastereoisomeri. RESA: 91%.

Caratterizzazione

Isomero *a: anti*

^{31}P {^{1}H} NMR ($CDCl_3$): 11.90 ppm (d, $^{2}J_{PP}$= 9.72 Hz); 11.61 ppm (d, $^{2}J_{PP}$= 9.72 Hz).

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 8.17 e 5.36, N*H*$_2$, 2H (2d, $^{2}J_{HH}$=12Hz); 4.34, C(O)*CH*NH, 1H (m); 4.28, C(O)O*CH*$_2$CH$_3$, 2 H (m); 3.49, PCH$_2$CH$_2$*CH*$_2$OCH$_3$, 8H (m); 3.40-3.50, NCH$_2$*CH*$_2$OCH$_3$, 2H (m); 3.35-3.36, PCH$_2$CH$_2$CH$_2$O*CH*$_3$, 12H (2 s); 3.22, NCH$_2$CH$_2$*OCH*$_3$, 3H, (s); 3.18+2.78-2.80, S*CH*$_2$CH, 2H protoni diastereotopici (2m); 2.61+2.85, N*CH*$_2$CH$_2$OCH$_3$, 2H diastereotopici (m); 2.56-2.92, N*CH*$_2$CH$_2$P, 4H (m); 2.37-1.95, NCH$_2$*CH*$_2$P, 4H (m); 1.98-2.20, P*CH*$_2$CH$_2$CH$_2$OCH$_3$, 8H (m); 2.20-1.55, PCH$_2$*CH*$_2$CH$_2$OCH$_3$, 8H (m); 1.30, C(O)OCH$_2$*CH*$_3$, 3H (t).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)= 170.55, *C(O)*OCH$_2$CH$_3$ (s); 77.2, C(O)*CH*NH (s); 72.16-72.58, PCH$_2$CH$_2$*CH*$_2$OCH$_3$ (3d); 68.13, NCH$_2$*CH*$_2$OCH$_3$ (s); 62.27, C(O)O*CH*$_2$CH$_3$ (s); 58.55-58.90, PCH$_2$CH$_2$CH$_2$O*CH*$_3$ + NCH$_2$CH$_2$*OCH*$_3$ (4 s); 51.82, N*CH*$_2$CH$_2$OCH$_3$ (s); 48.25, N*CH*$_2$CH$_2$P (s); 47.31, S*CH*$_2$CH (s); 27.25-23.77, P*CH*$_2$CH$_2$CH$_2$OCH$_3$ + PCH$_2$*CH*$_2$CH$_2$OCH$_3$ + NCH$_2$*CH*$_2$P (5s + 3d); 13.79, C(O)OCH$_2$*CH*$_3$ (s).

Isomero *b:syn*.

^{31}P {^{1}H} NMR ($CDCl_3$): 13.31 ppm (d, $^{2}J_{PP}$= 9.72 Hz); 9.93 ppm (d, $^{2}J_{PP}$= 9.72 Hz).

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm) caratteristici = 6.00 e 6.58, N*H*$_2$, 2H (2d, $^{2}J_{HH}$=12 Hz); 3.8, C(O)*CH*NH, 1H (m).

Gli spettri di massa ESI-TOF dei campioni solubilizzati in metanolo mostrano un sistema con pattern caratteristico del Re ed abbondanza pari al 100% avente m/z= $[M]^+$=832.25 compatibile con la massa calcolata per $C_{28}H_{61}N_3O_7P_2ReS$ (Figure 23 e 24).

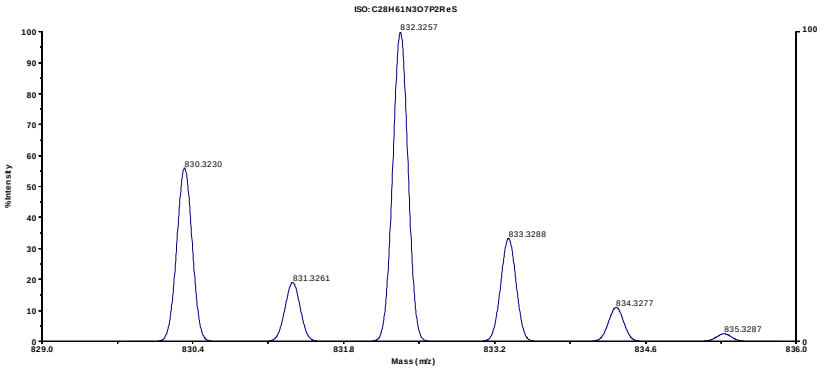
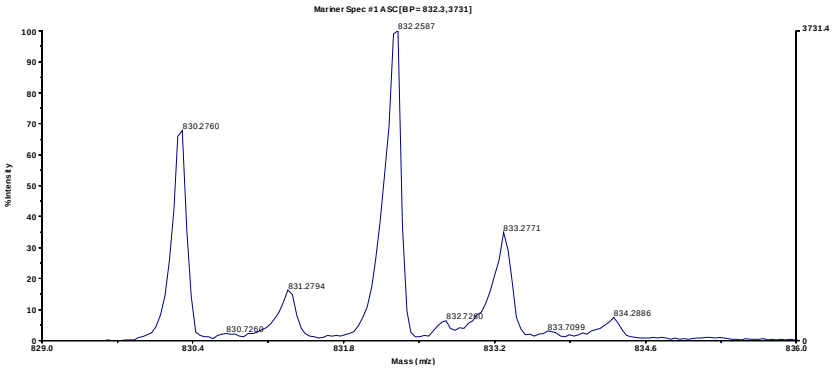


Figura 23. Spettro calcolato per [Re^{V}(N)(CysOEt)(PNP3)]$^{+}$



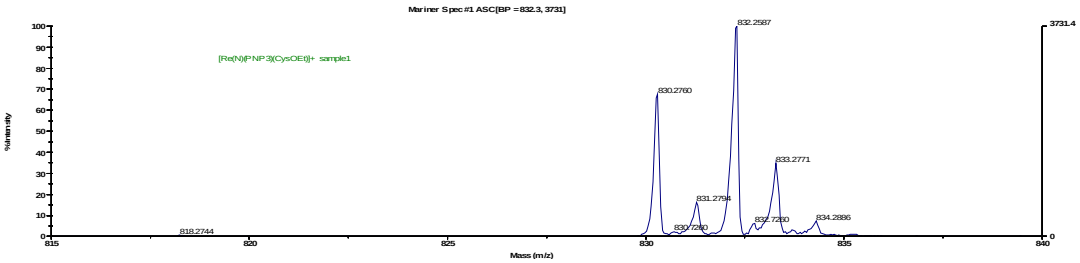


Figura 24. Spettro di massa ESI-TOF del campione solubilizzato in metanolo.

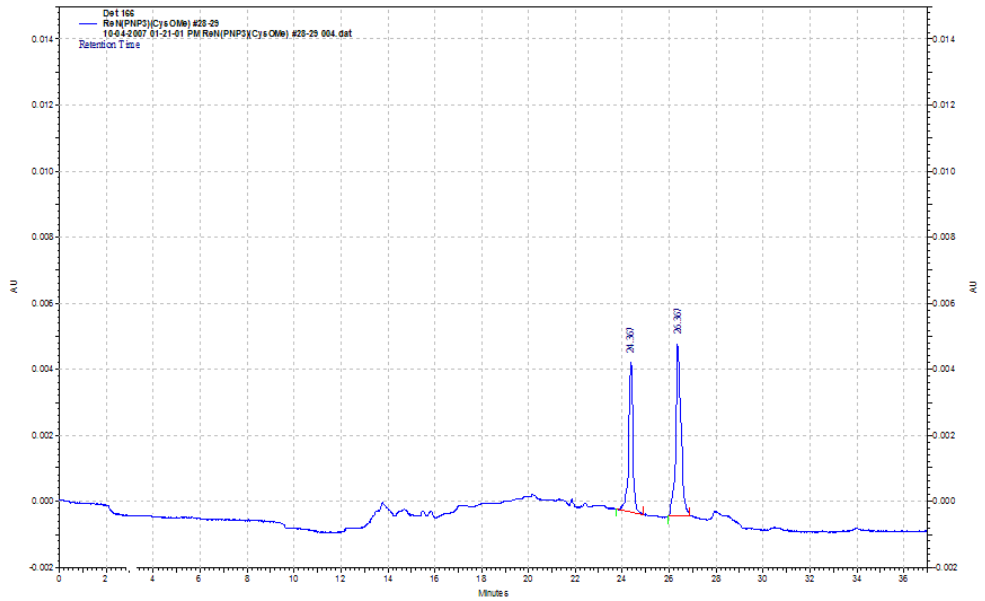
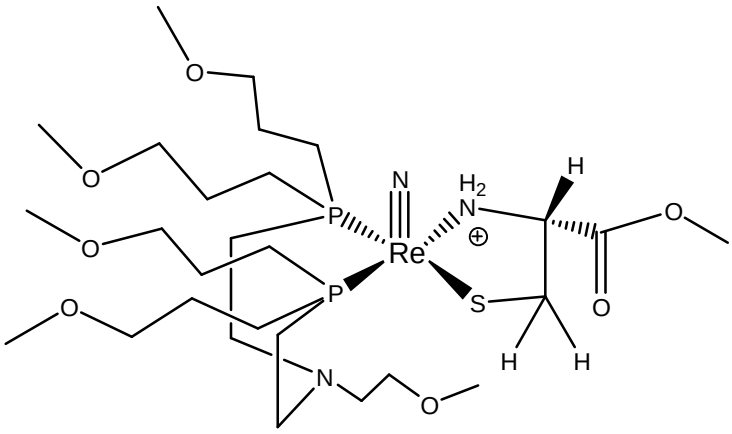


Figura 25. Cromatogramma UV-HPLC di *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysOEt)(PNP3)]$^{+}$

III. Preparazione di *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]$^{+}$.



Reagenti

[Re(N)Cl_2(PPh_3)$_2$]	PM=795.69
PNP3	PM=483.32
L-CysOMe	PM=171.65

Procedimento

In un pallone a due colli si sospendono 26.0 mg (0.033 mmol) di [Re(N)Cl_2(PPh_3)$_2$] in CH_2Cl_2 (7 ml); in atmosfera di diazoto si aggiungono 20 mg (0.041 mmol, 1.3 equivalenti) di PNP3 solubilizzato in MeOH degasato (3 ml). La miscela è messa a riflusso per 2h e controllata via TLC. Essa lentamente decolora e vira al giallo pallido fino a giallo brillante. In atmosfera controllata si aggiunge NEt_3 (150 μl) e 8.4 mg di CysOMe (0.049 mmol, 1.5 equivalenti) solubilizzata in MeOH degasato (1 ml). I controlli TLC sono effettuati ogni 30 min. Dopo 3 h si aggiungono NEt_3 (20 μl) e CysOMe (9.5 mg, 0.051 mmol). Dopo raffreddamento la soluzione è di colore giallo pallido. Si concentra in rotavapor a 20 °C e si ottiene un residuo marrone, oleoso che viene trattato con n-esano (4 x 4 ml) e successivamente con etere dietilico (4 x 5 ml). Si solubilizza in MeOH (3 ml) e si ottiene una soluzione giallo scuro, limpida. Si concentra in rotavapor a 20 °C e si solubilizza in $CHCl_3$ ottenendo una soluzione colore rame. Si purifica la miscela mediante colonna cromatografica di gel di silice SiO_2 60 (Merck) sospesa in $CHCl_3$ di lunghezza 36 cm, diametro 1.4 cm. Fase mobile: MeOH/$CHCl_3$ 7/93, 50 ml; poi MeOH/$CHCl_3$ 1/9., 170 ml. Si raccolgono 33 frazioni controllate tutte via TLC. Si isolano i due diastereoisomeri come prodotti di consistenza oleosa, colore giallo oro, analizzati mediante TLC, HPLC (Figura 28) e completamente

caratterizzati attraverso spettroscopia NMR monodimensionale ^{31}P $\{^{1}H\}$, ^{1}H, ^{1}H-^{1}H COSY90 e spettrometria di massa.

Si ottengono 23.5 mg (0.029 mmol) dei due diastereoisomeri. RESA: 87%.

Caratterizzazione

Isomero *anti*

^{31}P $\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): 12.83 ppm (d, $^{2}J_{PP}$=11.66 Hz); 11.43 ppm (d, $^{2}J_{PP}$=11.66 Hz).

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 8.33+5.31, N*H*$_2$, 2H (2m); 4.32, C(O)*CH*NH, 1H (m); 3.82, C(O)OCH$_3$, 3H, (s); 3.46, PCH$_2$CH$_2$*CH*$_2$OCH$_3$, 8H (m); 3.44-3.42 NCH$_2$*CH*$_2$OCH$_3$, 2H (m); 3.40-3.33, PCH$_2$CH$_2$CH$_2$O*CH*$_3$, 12H (4 s); 3.21, NCH$_2$CH$_2$*OCH*$_3$, 3H (s); 3.16+2.76, S*CH*$_2$CH, 2H, protoni diastereotopici (2m); 2.85, N*CH*$_2$CH$_2$P, 4H (m); 2.74 +2.85, N*CH*$_2$CH$_2$OCH$_3$ 2H diastereotopici (m); 2.13, NCH$_2$*CH*$_2$P, 4H (m); 2.00, P*CH*$_2$CH$_2$CH$_2$OCH$_3$, 8H (m); 2.00-1.70, PCH$_2$*CH*$_2$CH$_2$OCH$_3$, 8H (m).

Isomero*:syn*

^{31}P $\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): 13.23 ppm (d, $^{2}J_{PP}$=9.36 Hz); 9.81 ppm (d, $^{2}J_{PP}$=9.36 Hz).

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm) caratteristici = 6.63+6.00, N*H*$_2$, 2H (2m); 3.71, C(O)*CH*NH, 1H (m).

Gli spettri di massa ESI-TOF dei campioni solubilizzati in MeOH mostrano un sistema con pattern caratteristico del Re ed abbondanza pari al 100% avente m/z= $[M]^+$=818.31, compatibile con la massa calcolata per $C_{27}H_{59}N_3O_7P_2ReS$ (Figure 26 e 27).

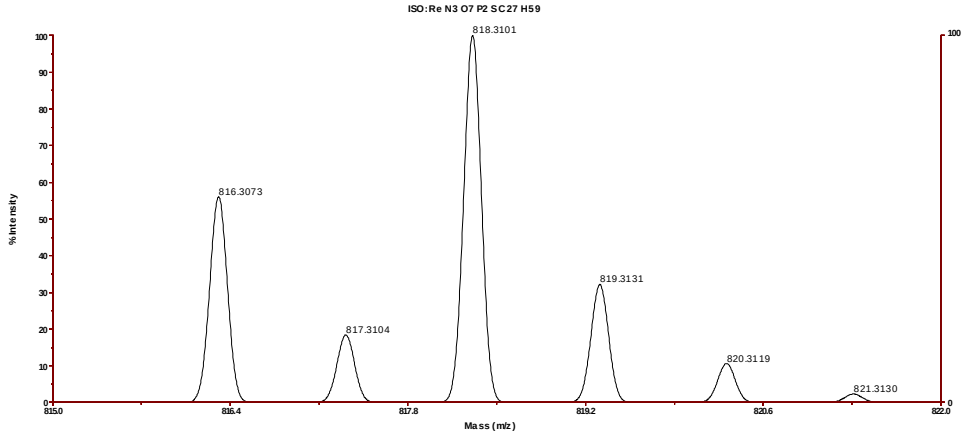


Figura 26. Spettro calcolato per $[Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]^+$

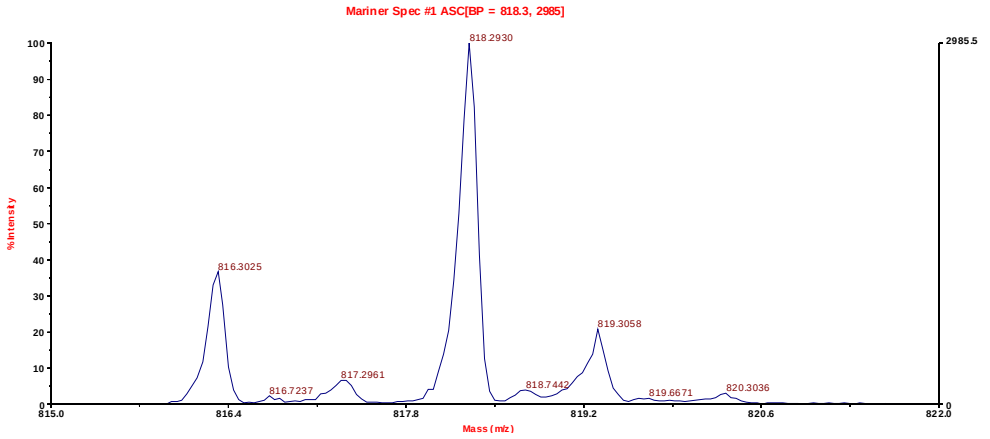


Figura 27 Spettro di massa ESI-TOF del campione solubilizzato in metanolo.

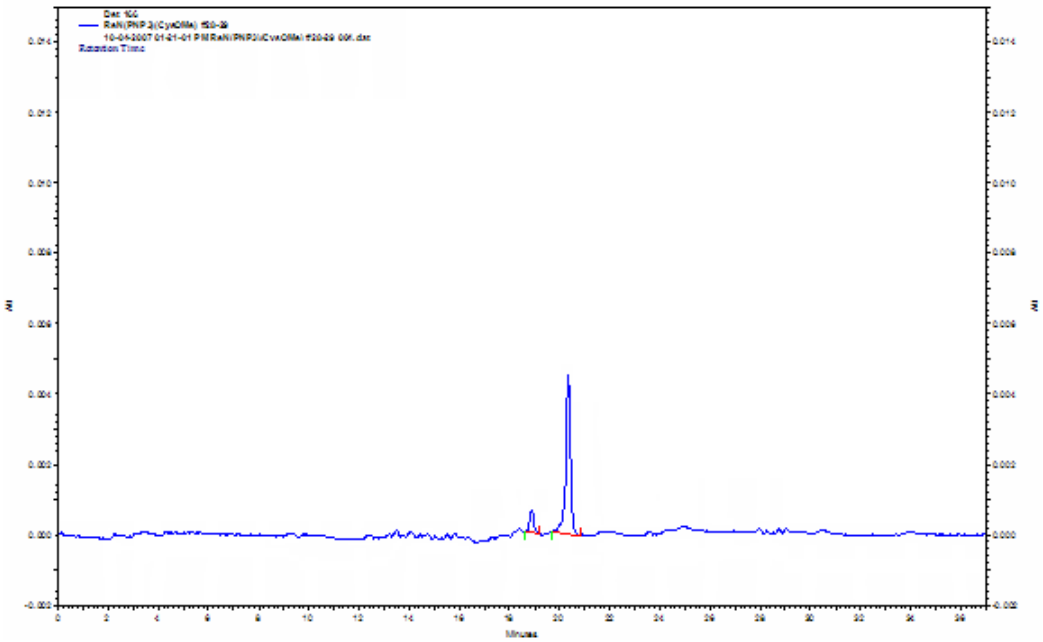
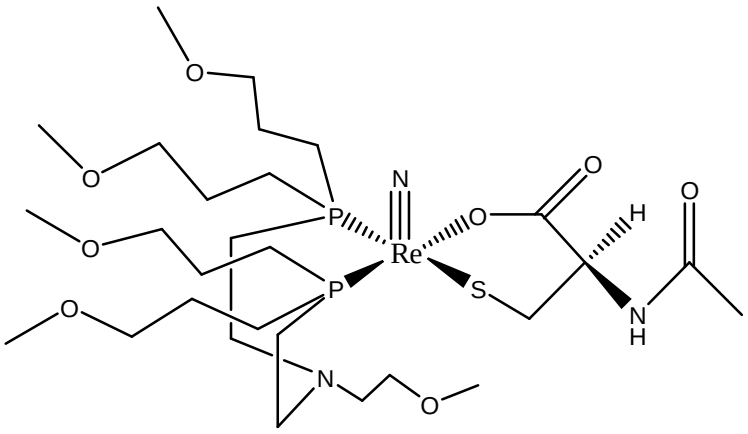


Figura 28. Profilo cromatografico UV-HPLC di *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]$^{+}$.

IV. Preparazione di *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)].



Reagenti

[$Re(N)(Cl)_2(PPh_3)_2$]	PM=795.69
PNP3	PM=483.32
L-CysNAc	PM=163.2

Procedimento

In un pallone a due colli si sospendono 26 mg (0.033 mmol) di [$Re(N)Cl_2(PPh_3)_2$] in CH_2Cl_2 degasato (7 ml); sotto flusso di diazoto si aggiungono 20 mg di PNP3 (0.041 mmol, 1.3 equivalenti) solubilizzato in EtOH degasato (3 ml) e si mette a riflusso per 1.5 h. La sospensione arancione mattone decolora e vira al giallo pallido e dopo 40 min è giallo brillante. Sempre in atmosfera inerte si aggiungono NEt_3 (6 gocce) e 9.1 mg di CysNAc (0.056 mmol, 1.7 equivalenti), solubilizzata in EtOH degasato (1 ml). Non si osservano variazioni cromatiche. Controlli TLC rivelano che dopo 2 h è ancora presente del complesso intermedio; pertanto, si aggiungono NEt_3 (6 gocce) e 9.2 mg (0.056 mmol) di CysNAc in 1 ml di EtOH. Si lascia a riflusso e sotto diazoto per 12 h. Concentrando con flusso di diazoto si ottiene un residuo oleoso marrone che viene purificato con n-esano (2 x 3 ml) e successivamente con Et_2O (4 x 5 ml). Si concentra e si riprende il residuo con EtOH, si filtra su G4 e si ottiene una soluzione limpida colore rame che viene concentrata in rotavapor. Il residuo oleoso viene trattato con $CHCl_3$ e si filtra su G4 un precipitato marrone. Si ottiene una soluzione limpida, colore arancione rame che viene concentrata, ripresa con la minima quantità di $CHCl_3$ e purificata su colonna cromatografica di gel di silice SiO_2 60 (Merck) sospesa in $CHCl_3$, lunghezza 30 cm, diametro 1.4 cm. Fase mobile: EtOH/$CHCl_3$/Tol: 1.5/2/1.

Si raccolgono circa 20 frazioni che vengono controllate attraverso TLC e unite in modo

da isolare i due diastereoisomeri. Si ottengono due prodotti di consistenza oleosa, colore giallo oro, analizzati via TLC, HPLC (Figura 30) e completamente caratterizzati via spettroscopia NMR mono- e bidimensionale $^{31}P\{^{1}H\}$, ^{1}H, ^{13}C, ^{1}H-^{1}H COSY90 e spettrometria di massa.

Ottenuti 0.0203 mmol. RESA: 61.5%

Caratterizzazione

Isomero *syn* (isomero maggioritario).

$^{31}P\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): 17.74 ppm (d) $^{2}J_{PP}$ =9.36 Hz, 11.55 ppm (d) $^{2}J_{PP}$=9.36 Hz.

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm)= 6.88, C(O)CH*NH*, 1H (d, $^{3}J_{HH}$=5.79 Hz); 4.94, C(O)*CH*NH, 1H (m); 3.65-3.32, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$, 8H (m); 3.57+2.35, SCH_2CH, 2H diastereotopici (2m); 3.40, $NCH_2CH_2OCH_3$, 2H (m); 3.37-3.33, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$, 12H (4 s); 3.20, $NCH_2CH_2OCH_3$, 3H (s); 2.98-2.60, NCH_2CH_2P, 4H (m); 2.88+2.47, $NCH_2CH_2OCH_3$, 2H diastereotopici (m); 2.35-2.12, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$, 8H (m); 2.25-1.85, NCH_2CH_2P, 4H (m); 2.12-1.54, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$, 8H (m); 2.01, $NHC(O)CH_3$, 3H (s).

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm)= 177.38, $OC(O)CH$ (s); 168.77, $NHC(O)CH_3$ (s); 77.2, C(O)*CH*NH (s); 73.06-72.29, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$ (4d); 68.16, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 58.67-58.56, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$ (3 s); 55.92, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 51.60, $NCH_2CH_2OCH_3$ (s); 48.08, NCH_2CH_2P (s); 47.32, SCH_2CH (s); 25.77-23.34, $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$ + $PCH_2CH_2CH_2OCH_3$ + NCH_2CH_2P (4s+3d); 17.25, 16.84, $CH_3C(O)NH$ (2s, uno per ciascun isomero);

Isomero *anti* (isomero minoritario).

$^{31}P\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$): 18.61 ppm (d, $^{2}J_{PP}$=9.48 Hz); 11.90 ppm (d, $^{2}J_{PP}$=9.36 Hz).

^{1}H NMR 300 MHz ($CDCl_3$): δ (ppm) caratteristici = 7.90, C(O)CH*NH*, 1H (d, $^{3}J_{HH}$=5.79 Hz); 5.01, C(O)*CH*NH, 1H (m).

Gli spettri di massa ESI-TOF dei campioni solubilizzati in metanolo mostrano due sistemi con pattern caratteristico del Re avente m/z = $[M + H^+]$ =846.28; $[M + Na^+]$ = 868.27 (massa calcolata per $C_{28}H_{58}N_3O_8P_2ReS$= 845.29 g/mol) (Figura 29).

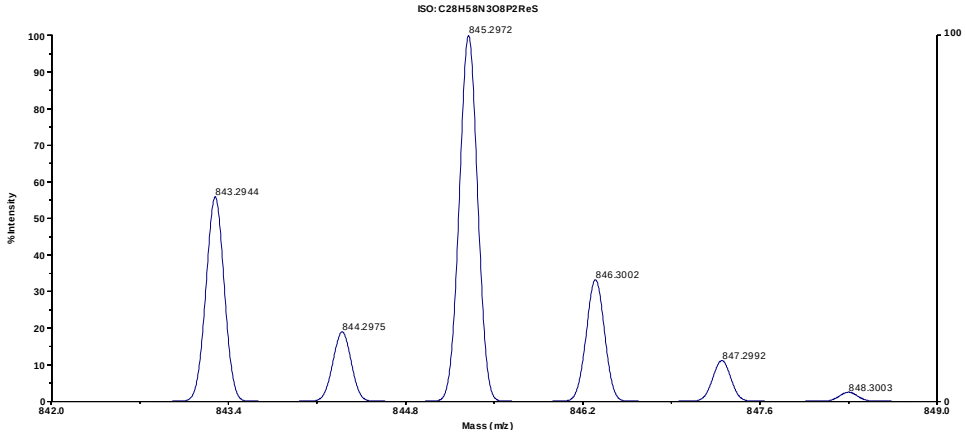


Figura 29. Spettro di massa calcolato per [Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)].

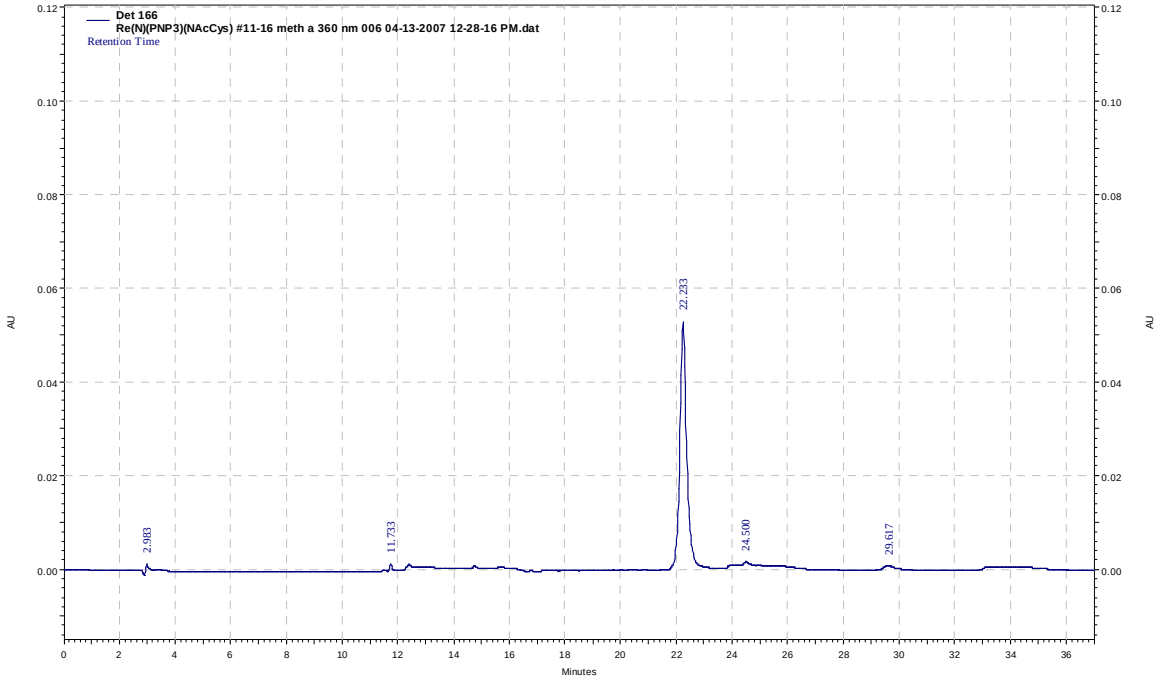


Figura 30. Cromatogramma UV-HPLC di [Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)].

C3.4 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI $[^{188}Re^{V}(N)(XY)(PNP3)]^{0/+}$.

I. Preparazione di $[^{188}Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.

In una vial degasata contentente EDTA (5 mg), $SnCl_2$ (1 mg solublizzato in 0.1 ml HCl O.1 M), DTCZ (2 mg solubilizzato in 0.2 ml EtOH), HCl 0.1 M (0.6 ml) viene aggiunta una soluzione di $Na[ReO_4]$ (0.150 GBq, 0.5 ml), eluita da generatore, e PNP3 (1 mg solubilizzato in 0.1 ml EtOH). La miscela viene incubata ad 80 °C per 30 minuti. A fine reazione il pH è 1.5. Il complesso risulta stabile dopo 3 ore (RT) sia a pH 7.4 che a pH 10 per NaOH (0.1 e 1.0 M).

RCY valutata attraverso TLC ed HPLC: 99%.

Il cromatogramma HPLC del complesso è riportato in Figura 31.

$[^{188}Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$ è stato caratterizzato per comparazione dei profili cromatografici HPLC e TLC ottenuti con l'analogo complesso preparato a livello macroscopico, come illustrato in Figura 32.

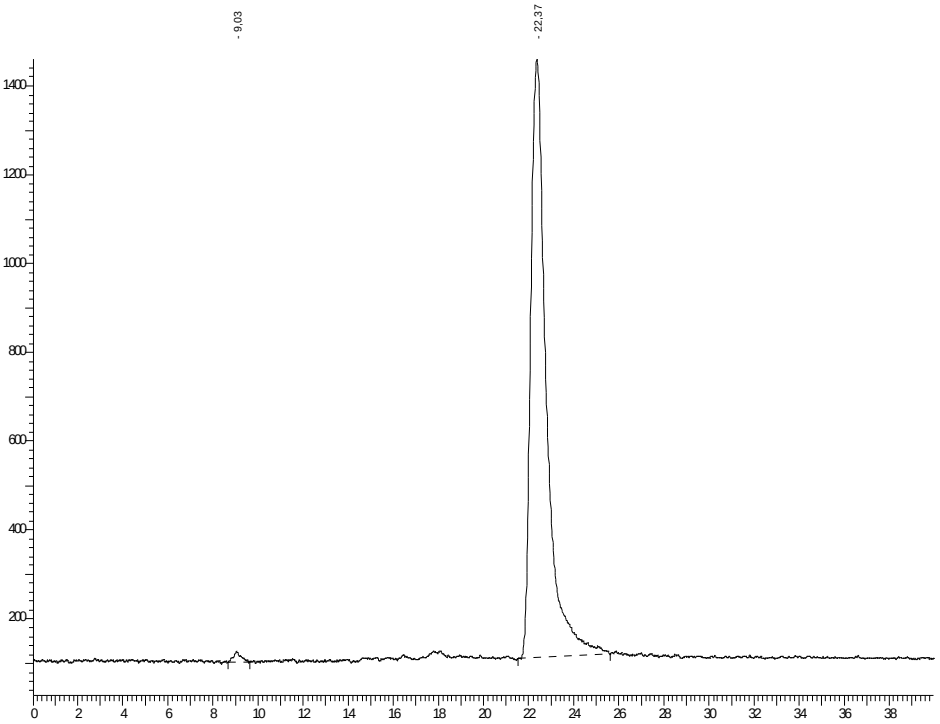


Figura 31. Cromatogramma radio-HPLC di $[^{188}Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.

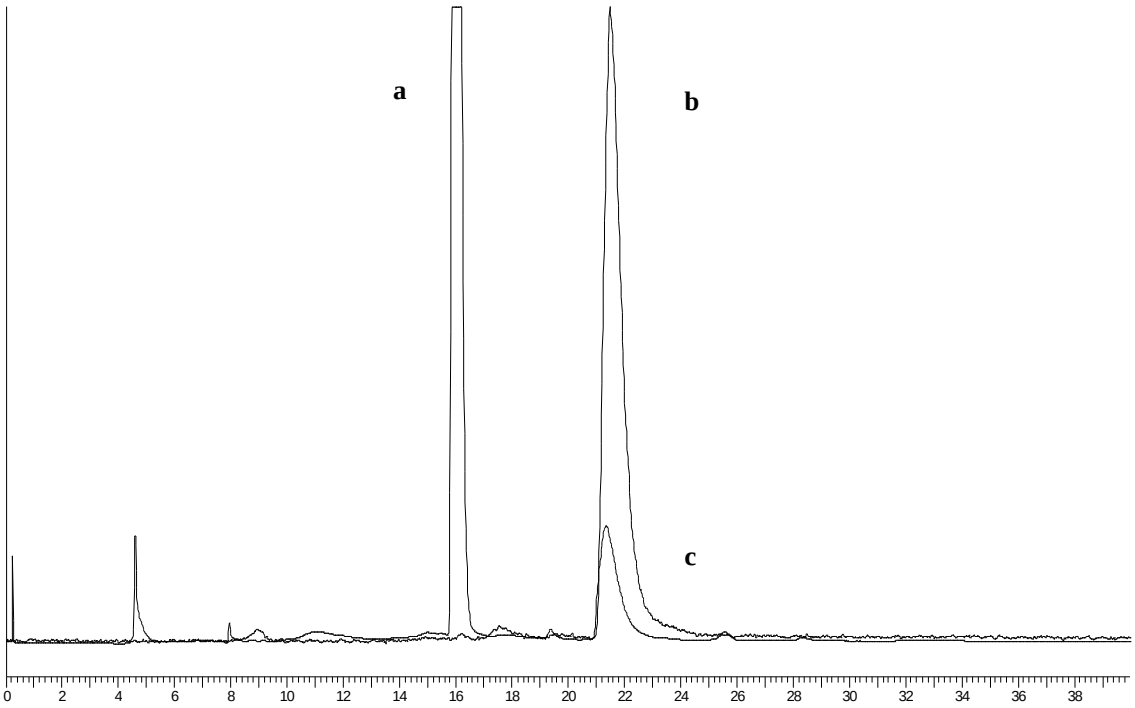


Figura 32. Sovrapposizione dei cromatogrammi: radio-HPLC [$^{188}Re^{V}$(N)(DTCZ)(PNP3)]$^{+}$ (**b**); UV-HPLC: DTCZ (**a**) e [Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]$^{+}$ (**c**).

II. Preparazione di *syn,anti*-[$^{188}Re^{V}$(N)(CysOMe)(PNP3)]$^{+}$.

Ad una vial degasta contenente EDTA (5 mg), $SnCl_2$ (1 mg dissolto in 0.1 ml HCl O.1 M degasato), DTCZ (0.1 mg solubilizzato in 0.01 ml di EtOH degasato), HCl 0.1 M degasato (0.6 ml) viene aggiunta una soluzione di Na[ReO_4] (0.150 GBq, 0.5 ml), eluito da generatore. Dopo 15 min a RT si aggiungono, in rapida successione, tampone fosfato 0.125 M, pH=7.7 (1ml), CysOMe (5mg solubilizzati in 0.2 ml di una soluzione di NaCl 0.9%), e PNP3 (2mg in 0.2 ml EtOH). La vial è incubata a 100 °C per 30 minuti. Il pH misurato a fine reazione è 3.6. RCY valutata mediante HPLC e TLC: 78%. Il complesso è stato caratterizzato per comparazione dei cromatogrammi HPLC e TLC ottenuti con l'analogo complesso preparato a livello macroscopico, come illustrato in Figura 33.

Per la purificazione, dopo raffreddamento la miscela di reazione viene diluita con H_2O (8 ml) e caricata su una Sep Pack C18 plus (lavata con 5 ml di EtOH ed equilibrata con 5 ml di H_2O). Si lava, in successione, con H_2O (20 ml) ed EtOH 25% (3 ml). Il complesso viene eluito con una miscela EtOH/sal 9/1 (2 ml). Circa il 70% dell'attività caricata viene raccolto in questa frazione. Dopo purificazione RCP valutata mediante HPLC è 92%. Il profilo cromatografico è riportato in Figura 34.

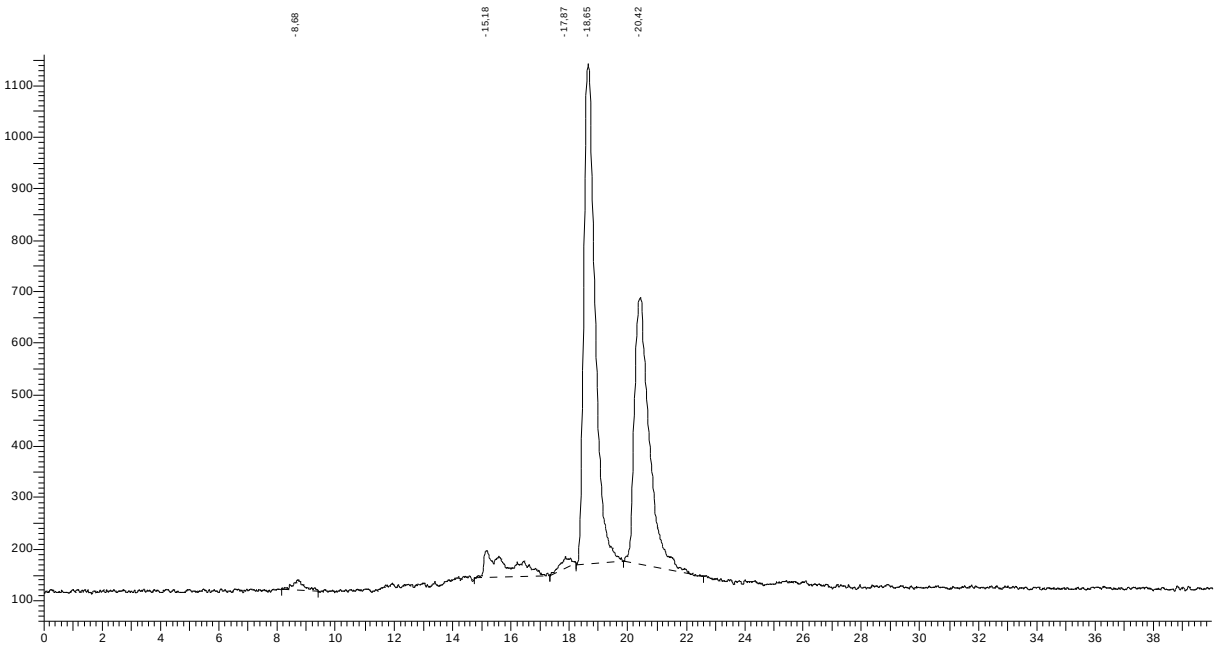


Figura 33. Cromatogramma radio-HPLC di *syn,anti*-[$^{188}Re^{V}$(N)(CysOMe)(PNP3)]$^{+}$

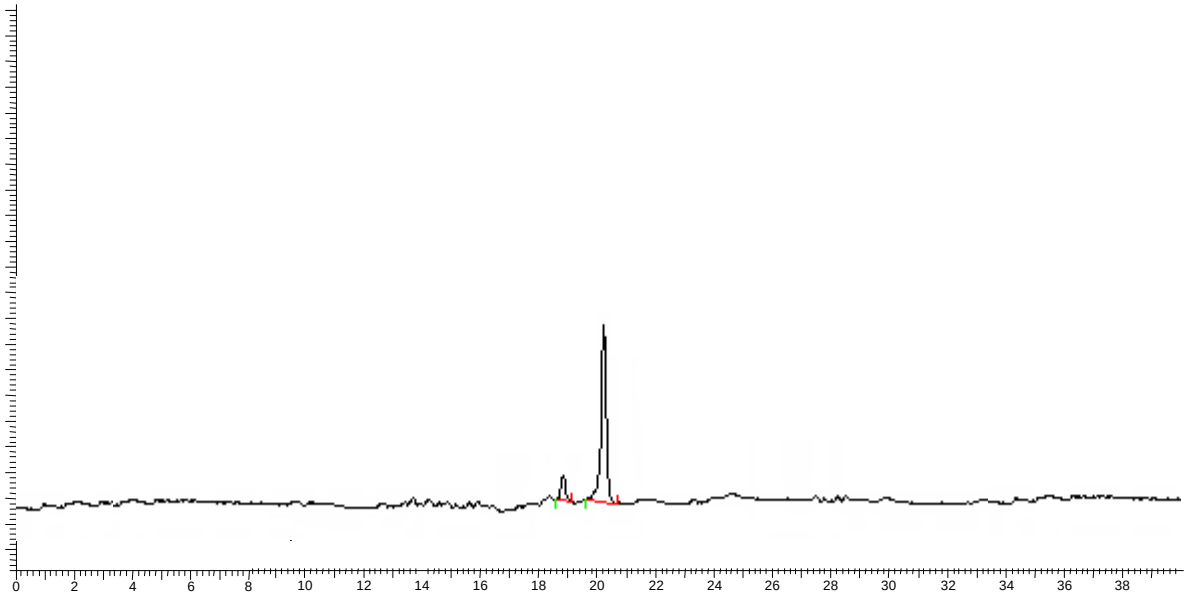


Figura 34. Cromatogramma UV di *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]$^{+}$.

III. Preparazione di *syn,anti*-[$^{188}Re^{V}$(N)(CysNAc)(PNP3)].

Ad una vial degasta contenente EDTA (5 mg), $SnCl_2$ (1 mg dissolto in 0.1 ml HCl O.1 M degasato), DTCZ (0.1 mg solubilizzato in 0.01 ml di EtOH degasato), HCl 0.1 M degasato (0.6 ml) viene aggiunta una soluzione di Na[ReO_4] (0.150 GBq, 0.5 ml), eluito da generatore. Dopo 15 min a RT si aggiungono, in rapida successione, tampone fosfato (0.125 M, pH=7.7, 1ml) e CysNAc (5mg solubilizzati in 0.2 ml di una soluzione di NaCl 0.9%), e PNP3 (2mg in 0.2 ml EtOH degasato). La vial è incubata a 100 °C per 30 minuti. RCY valutata mediante TLC dopo 15 e 30 min dimostrano che la reazione si può ritenere conclusa dopo 15 min. RCY valutato con HPLC: 94.3%.

Il pH misurato a fine reazione è di 3.4.

Il complesso è stato caratterizzato per comparazione dei cromatogrammi HPLC e TLC ottenuti con l'analogo complesso preparato a livello macroscopico, come illustrato nelle Figure 35 e 36.

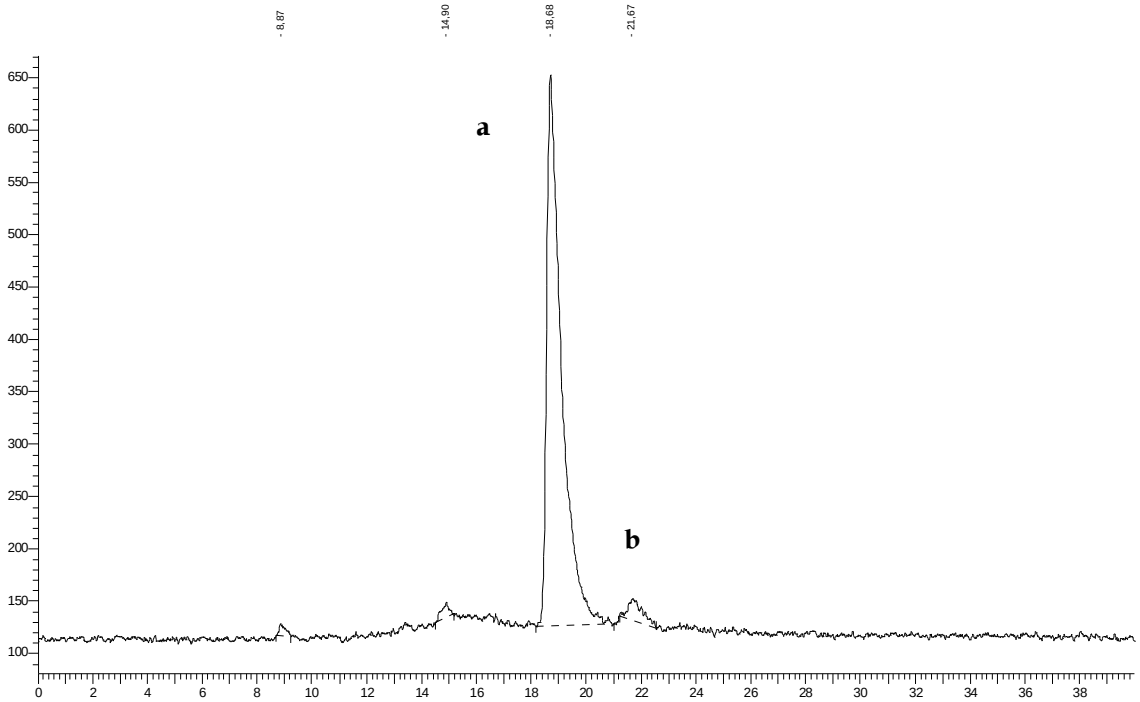


Figura 35. Tracciati cromatografici radio-HPLC della miscela di reazione: *syn*+*anti*-[$^{188}Re^{V}$(N)(CysNAc)(PNP3)] (**a**) e [$^{188}Re^{V}$(N)(DTCZ)(PNP3)]$^{+}$ (**b**).

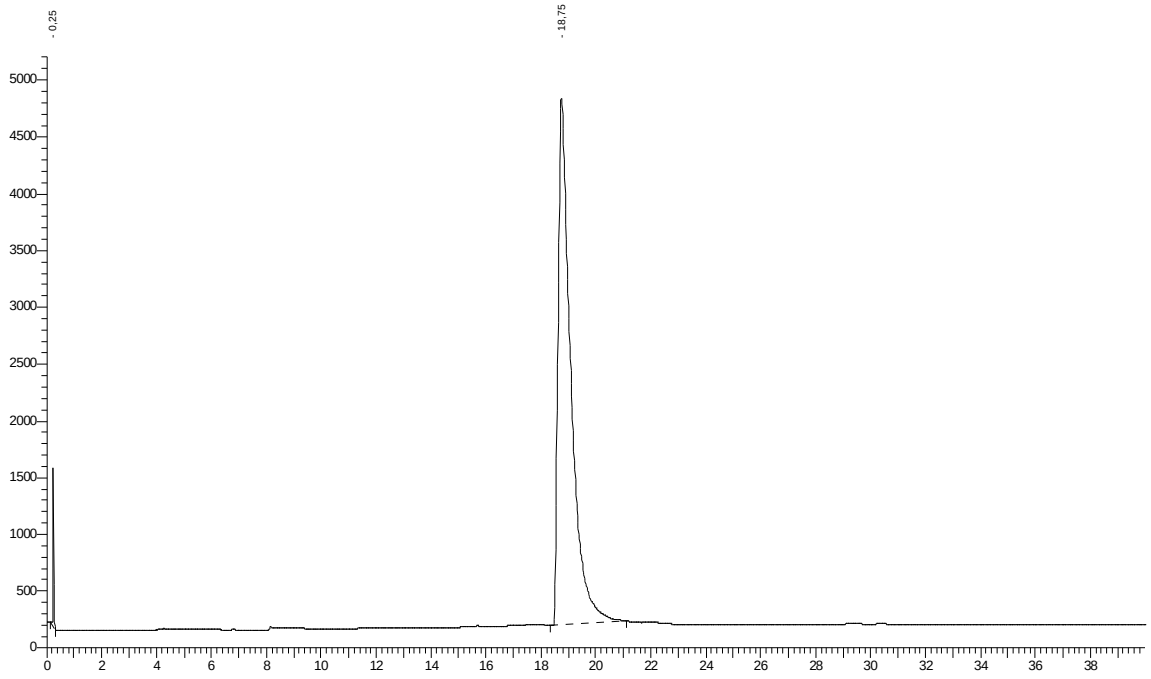


Figura 36. Tracciato cromatografico UV-HPLC di [Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)].

C3.5 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI $[^{99m}Tc^{V}(N)(XY)(PNP3)]^{0/+}$.

I. Preparazione di $[^{99m}Tc^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.

Ad una vial, contentente $SnCl_2$ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), DTCZ (2 mg), EDTA (5 mg sospeso in 1 ml di EtOH), si aggiunge Na[$^{99m}TcO_4$] (50 MBq-3 GBq, 0.25 ml) e PNP3 (1 mg solubilizzato in 0.1 ml di EtOH), si incuba per 30 minuti ad 80 °C.

RCY valutata mediante TLC e HPLC: 96%.

II. Preparazione di *syn,anti*-$[^{99m}Tc^{V}(N)(CysOMe/CysOEt)(PNP3)]^{+}$.

1) Ad una vial, contentente SDH (5 mg), $SnCl_2$ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), si aggiunge Na[$^{99m}TcO_4$] (50 MBq-3 GBq, 0.25 ml). Dopo 30 minuti a RT si aggiungono simultaneamente PNP3 (1 mg solubilizzato in 0.1 ml di EtOH) e CysOMe/CysOEt (2 mg solubilizzata in 0.2 ml di salina) e si incuba per 60 minuti ad 80 °C.

RCY dei due isomeri valutata mediante TLC ed HPLC è 92% (a/b = 50/50).

2) Ad una vial, contenente DTCZ (2 mg solubilizzato in 1 ml di EtOH), $SnCl_2$ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), EDTA (5 mg), si aggiunge Na[$^{99m}TcO_4$] (50 MBq-3 GBq, 0.25 ml). Dopo 30 minuti a RT si aggiunge CysOMe/CysOEt (5 mg solubilizzata in 0.25 ml di tampone fosfato 0.1M, pH=7.4) e si mette la miscela ad incubare a 100 °C per 30 minuti. Si aggiunge quindi PNP3 (1 mg solubilizzato in 0.1 ml di EtOH) e si riscalda a 100 °C per 30 minuti.

RCY dei due isomeri valutata attraverso HPLC è 90% (a/b = 50/50).

III. Preparazione di *syn,anti*-$[^{99m}Tc^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)]$.

1) Ad una vial, contenente SDH (5 mg sospeso in 1 ml di EtOH), $SnCl_2$ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), CysNAc (2 mg solubilizzata in 0.2 ml di salina), PNP3 (1 mg solubilizzato in 0.1 ml di EtOH) si aggiunge Na[$^{99m}TcO_4$] (50 MBq-3 GBq, 0.25 ml) e si mette ad incubare ad 80 °C per 30 minuti.

RCY dei due isomeri valutata mediante HPLC è 92% (a/b = 80/20).

2) Ad una vial, contenente SDH (5 mg sospeso in 1 ml di EtOH), $SnCl_2$ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), EDTA (5 mg sospeso in 1 ml di EtOH), si aggiunge Na[$^{99m}TcO_4$] (50 MBq-3 GBq, 0.25 ml). Dopo 30 minuti a RT si aggiungono simultaneamente PNP3 (1 mg solubilizzato in 0.1 ml di EtOH) e CysNAc (2 mg solubilizzata in 0.2 ml di salina) e si mette la vial ad incubare per 15 minuti ad 80 °C.
RCY dei due isomeri valutata attraverso HPLC è 96% (a/b = 80/20).

3) Ad una vial, contentente DTCZ (2 mg solubilizzato in 1 ml di EtOH), $SnCl_2$ (0.1 mg sospeso in 0.1 ml di soluzione salina), EDTA (5 mg), si aggiunge Na[$^{99m}TcO_4$] (50 MBq-3 GBq, 0.25 ml). Dopo 30 minuti a RT si aggiunge CysNAc (5 mg solubilizzata in 0.25 ml di tampone fosfato 0.1M, pH=7.4) e si incuba a 100 °C per 30 minuti. Infine si aggiunge PNP3 (1 mg solubilizzato in 0.1 ml di EtOH) e si prolunga il riscaldamento a 100 °C per 30 minuti. RCY dei due isomeri valutata mediante HPLC è 76% (a/b = 80/20).

Complesso	TLC [R_f] C_{18}	TLC [R_f] SiO_2	HPLC [min]
$[Re(N)(Cl)_2(PPh_3)_2]$	0.1 [1]	0.78 [1]	
$[Re(N)(PNP3)]^{2+}$	0.59 [1]	0.01 [2]	
$[^{188}Re\ O_4]^-$	0.92 [1] 0.88 [2]		8.8 [ii]
$[^{99m}TcO_4]^-$	0.88 [1]	0.42 [2]	13.99 [i]
$[^{99m}Tc(N)(PNP3)]^{2+}$	0.16-0.27 [1]	0.1-0.27 [2]	21+22.55+24.24 [i]
$[^{99m}Tc(N)(DTCZ)]^+$	0.45+0.67[1]	0.15+0.31[2]	15.9+19.65+22.16[i]
$[Re(N)(DTCZ)(PNP3)]^+$	0.16 [1] 0.46 [2]	0.13 [2]	25.1 [i] 22.37 [ii]
$[^{188}Re(N)(DTCZ)(PNP3)]^+$	0.14 [1] 0.44 [2]		22.37 [ii]
$[^{99m}Tc(N)(DTCZ)(PNP3)\ ]^+$	0.20 [1]	0.18 [2]	28.5 [i]
anti-$[Re(N)(CysOEt)(PNP3)]^+$	0.47 [1] 0.5 [2]	0.37 [1]	24.42 [i] 20.05 [ii]
syn-$[Re(N)(CysOEt)(PNP3)]^+$	0.36 [1] 0.39 [2]	0.6 [1]	26.42 [i] 22.27 [ii]
anti-$[^{99m}Tc(N)(CysOEt)(PNP3)]^+$	0.43 [1]	0.21 [2]	26.03 [i]
syn-$[^{99m}Tc(N)(CysOEt)(PNP3)]^+$	0.30 [1]	0.21 [2]	29.03 [i]
anti-$[Re(N)(CysOMe)(PNP3)]^+$	0.49 [2]	0.39 [1]	22.85 [i] 18.73 [ii]
syn-$[Re(N)(CysOMe)(PNP3)]^+$	0.36 [2]	0.51 [1]	24.37 [i] 20.62 [ii]
anti-$[^{188}Re(N)(PNP3)(CysOMe)]^+$	0.16 [1] 0.48 [2]		18.73 [ii]
syn-$[^{188}Re(N)(PNP3)(CysOMe)]^+$	0.10 [1] 0.38 [2]		20.62 [ii]
anti-$[^{99m}Tc(N)(CysOMe)(PNP3)]^+$	0.36 [1]	0.14 [2]	24.26 [i]
syn-$[^{99m}Tc(N)(CysOMe)(PNP3)]^+$	0.23 [1]	0.14 [2]	25.91 [i]
anti-$[Re(N)(PNP3)(CysNAc)]$	0.35 [1] 0.70 [2]	0.53 [2] 0.34 [1]	23.5 [i] 18.75 [ii]
syn-$[Re(N)(PNP3)(CysNAc)]$	0.45 [1] 0.70 [2]	0.60 [2] 0.41 [1]	22.2 [i] 18.75 [ii]
anti-$[^{188}Re(N)(PNP3)(CysNAc)]$	0.32 [1] 0.71 [2]		18.68 [ii]
syn-$[^{188}Re(N)(PNP3)(CysNAc)]$	0.40 [1] 0.71 [2]		18.68 [ii]
anti-$[^{99m}Tc(N)(PNP3)(CysNAc)]$	0.31 [1]	0.57 [2]	23.16 [i]
syn-$[^{99m}Tc(N)(PNP3)(CysNAc)]$	0.43 [1]	0.49 [2]	23.16 [i]

Tabella 9. Valori cromatografici TLC e HPLC dei complessi $[M^V(N)(XY)(PNP3)]^+$.

TLC:

C18	[1] =	CH_3CN/NEt_3 0.01M, pH=3	6/4
	[2] =	MeOH/MeCN/THF/NH_4Ac 0.5 M	2/2/1/2
SiO_2	[1] =	EtOH/$CHCl_3$/Tol/NH_4Ac 0.5M	5/3/3/0.5
	[2] =	EtOH/$CHCl_3$/Tol	1.5/2/1

HPLC:

[i] = HPLC Beckman, eluenti: A=NEt_3 0.01 M pH=3 per H_3PO_4 1M; B=MeCN; flusso :1 ml/min; λ=328 nm; metodo: 0-5 min, B=0%; 5-20 min, B=45%; 20-35 min, B=45%; 35-37 min, B=0%.

[ii] = HPLC Perkin Elmer, eluenti: A=NEt_3 0.01 M, pH=3 per H_3PO_4 1M; B= MeCN; flusso: 1ml/min; λ= 254 nm; metodo: 0 min, B=0%; 0-15 min, B=45%; 15-30 min, B=45%; 30-35 min, B=0%.

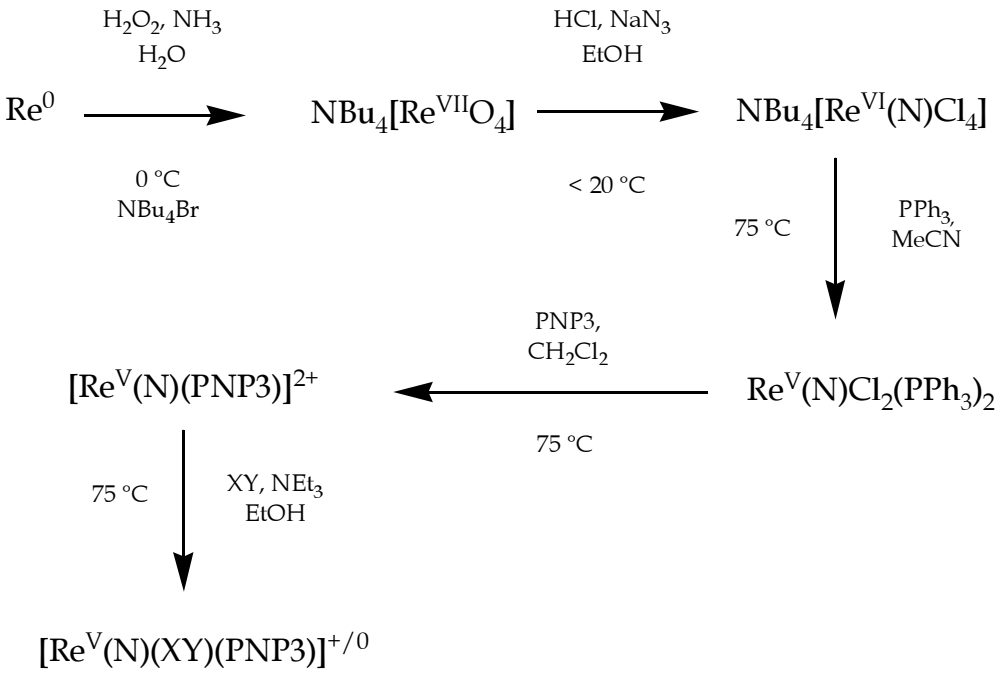
C4. Risultati e discussione.

C4.1 AZOTURO COMPLESSI DI Re-185/187.

Il *core* azoturo $[^{185/187}Re^{V}(N)]^{2+}$ è ottenuto utilizzando come composto di partenza $NBu_4[Re^{VII}O_4]$, prodotto dall'ossidazione del renio metallico con perossido di idrogeno (Schema 1). La reazione è condotta in ambiente alcolico per EtOH anidro in cui viene fatto gorgogliare in corrente di diazoto HCl, riducente, e per aggiunta di sodio azide, NaN_3, quale donatore del gruppo azoturo, si ottiene il complesso pentacoordinato $NBu_4[Re^{VI}(N)Cl_4]$, in cui il metallo si trova nello stato di ossidazione VI. Lo spettro IR mostra lo *stretching* caratteristico di Re(N) a 1103 cm^{-1}. La successiva riduzione a Re(V) nella formazione del precursore $[Re^{V}(N)Cl_2(PPh_3)_2]$ avviene in MeCN utilizzando trifenilfosfina, come riducente e coordinante, in eccesso. Lo spettro $^{31}P\{^{1}H\}$ NMR ($CDCl_3$) di questo complesso mostra un unico singoletto a 24.63 ppm, indicando che i due fosfori coordinano il metallo e sono magneticamente equivalenti, quindi hanno un identico intorno chimico. Nello spettro NMR protonico si individuano i segnali relativi ai protoni aromatici, *shiftati* a campi più bassi rispetto al legante libero, come avviene anche nello spettro del fosforo e che conferma l'avvenuta coordinazione al metallo. Il complesso mostra una geometria piramidale a base quadrata in cui le due molecole di trifenilfosfina si dispongono in reciproca posizione *cis*.

La formazione del frammento metallico avviene in atmosfera controllata per reazione a caldo di $[Re^{V}(N)Cl_2(PPh_3)_2]$ con PNP3, in miscela $EtOH/CH_2Cl_2$ degasati. Il legante polidentato PNP3 si sostituisce efficacemente alle due molecole di trifenilfosfina, monodentate, e promuove la successiva reattività, in ambiente basico, di $[Re^{V}(N)(PNP3)]^{2+}$ verso leganti bidentati XY aventi atomi coordinanti π-donatori, quali NH,S^- come S-metil-2-metilditiocarbazato (DTCZ), O^-,S^- come L-cisteina-N-acetile (CysNAc) oppure NH_2,S^- come L-cisteina-O-metile/-etile (CysOMe/CysOEt), formando specie dissimetriche, neutre o monocationiche, del tipo $[Re^{V}(N)(XY)(PNP3)]^{0/+}$ (Schema 1). L'ambiente basico per trietilammina promuove la deprotonazione degli atomi coordinanti del legante XY. L'amminoacido cisteina è stato scelto per l'efficacia con cui coordina $[Tc^{V}(N)(PNP3)]^{2+}$ e per la capacità di formare complessi neutri o monocationici dipendentemente dal tipo di

atomi coordinanti che presenta nei confronti del metallo. Inoltre, essa può essere facilmente coniugata ad una molecola bioattiva dotata di specificità recettoriale.



Schema 1. Sintesi di $[Re^{V}(N)(XY)(PNP3)]^{0/+}$ a partire da Re^{0}.

I complessi ottenuti sono stati completamente caratterizzati mediante spettrometria di massa e spettroscopia NMR mono e bidimensionale. I dati cromatografici (TLC ed HPLC), sono riportati in Tabella 10.

Complesso	**M**		
	Tc-99m	**Re-187/185**	**Re-188**
$[MO_4]^-$	13.99 [i]		8.8 [ii]
$[M(N)(PNP3)(DTCZ)]^+$	28.5 [i]	25.1 [i] ; 22.37 [ii]	22.37 [ii]
anti-$[M^{V}(N)(PNP3)(CysOEt)]^+$	26.03 [i]	24.42 [i] ; 20.05 [ii]	
syn-$[M^{V}(N)(PNP3)(CysOEt)]^+$	29.03 [i]	26.42 [i] ; 22.27 [ii]	
anti-$[M^{V}(N)(PNP3)(CysOMe)]^+$	24.26 [i]	22.85 [i] ; 18.73 [ii]	18.73 [ii]
syn -$[M^{V}(N)(PNP3)(CysOMe)]^+$	25.91 [i]	24.37 [i] ; 20.62 [ii]	20.62 [ii]
anti-$[M^{V}(N)(PNP3)(CysNAc)]$	23.16 [i]	23.5 [i] ; 18.75 [ii]	18.68 [ii]
syn-$[M^{V}(N)(PNP3)(CysNAc)]$	23.16 [i]	22.2 [i] ; 18.75 [ii]	18.68 [ii]

Tabella 10. Comparazione dei dati cromatografici HPLC dei complessi in studio.
(Fasi cromatografiche riportate a pag. 239).

Gli spettri NMR monodimensionali del protone e del fosforo di tutti i complessi considerati mostrano i segnali dell'amminodifosfina e del legante bidentato mediamente deschermati rispetto ai corrispondenti segnali nei leganti non coordinati.

Lo spettro ^{31}P $\{^{1}H\}$ NMR (in $CDCl_3$) del complesso $[Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$ mostra due doppietti (15.65 ppm, $^{2}J_{PP}$=12.1 Hz; 7.69 ppm, $^{2}J_{PP}$=12.1 Hz), dovuti all'accoppiamento dei due atomi di fosforo, la presenza di due segnali è dovuta al diverso intorno chimico, e quindi magnetico, dei due atomi di P che sono coordinati sul piano equatoriale rispettivamente, in *trans* rispetto ad un atomo S e ad N, come riportato in Figura 37. Questo tipo di coordinazione è stata riscontrata in analoghi azoturo complessi di Tc-99 [56].

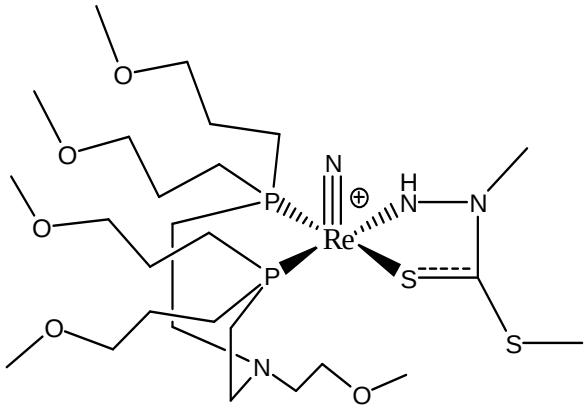


Figura 37. $[Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$.

Con ciascuno dei leganti cisteinati, CysOMe, CysOEt e CysNAc si osserva la formazione di due diversi prodotti, separati mediante cromatografia su colonna. L'analisi degli spettri di massa e NMR, ^{31}P $\{^{1}H\}$ e ^{1}H, ha permesso di identificare le due specie come isomeri strutturali, contenendo qualitativamente gli stessi sistemi di segnali, e di identificarli come diastereoisomeri di Renio (V), del tipo *syn-* ed *anti-*, originati dalla diversa orientazione assunta dal sostituente N- od O- laterale della cisteina rispetto al *core* $[Re^{V}(N)]^{2+}$, che origina un centro chirale sul piano di coordinazione.

La reazione di $[Re^{V}(N)(PNP3)]^{2+}$ con CysOMe per la preparazione di *syn,anti-* $[Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]^{+}$ deve essere condotta utilizzando come solvente MeOH. Impiegando EtOH, infatti, l'ambiente basico promuove la transesterificazione del legante cisteinato e si ottiene una miscela di prodotti corrispondenti ai complessi dissimmetrici con CysOMe, *syn,anti-*$[Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]^{+}$, e a quelli con CysOEt, *syn,anti-* $[Re^{V}(N)(CysOEt)(PNP3)]^{+}$, come confermato dai cromatogrammi HPLC (Figura 38), e da spettri di massa ESI-TOF (Figura 39).

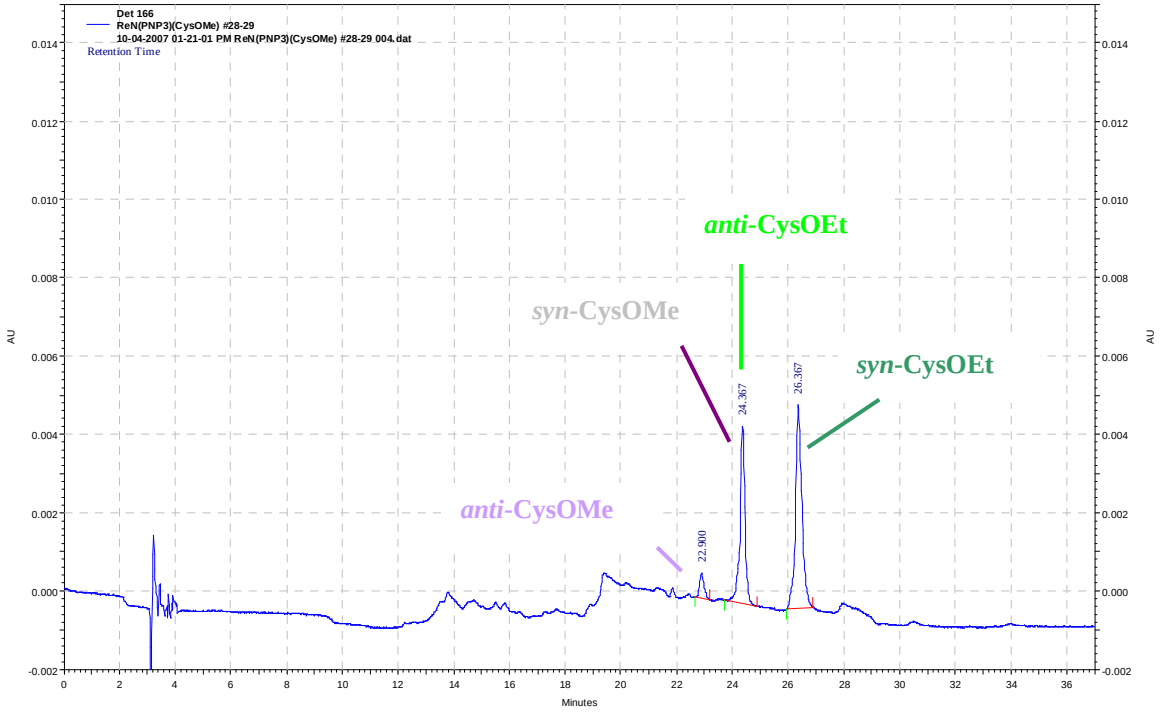


Figura 38. Cromatogramma HPLC dei prodotti della reazione di $[Re^{V}(N)(PNP3)]^{2+}$ con CysOMe, in EtOH.

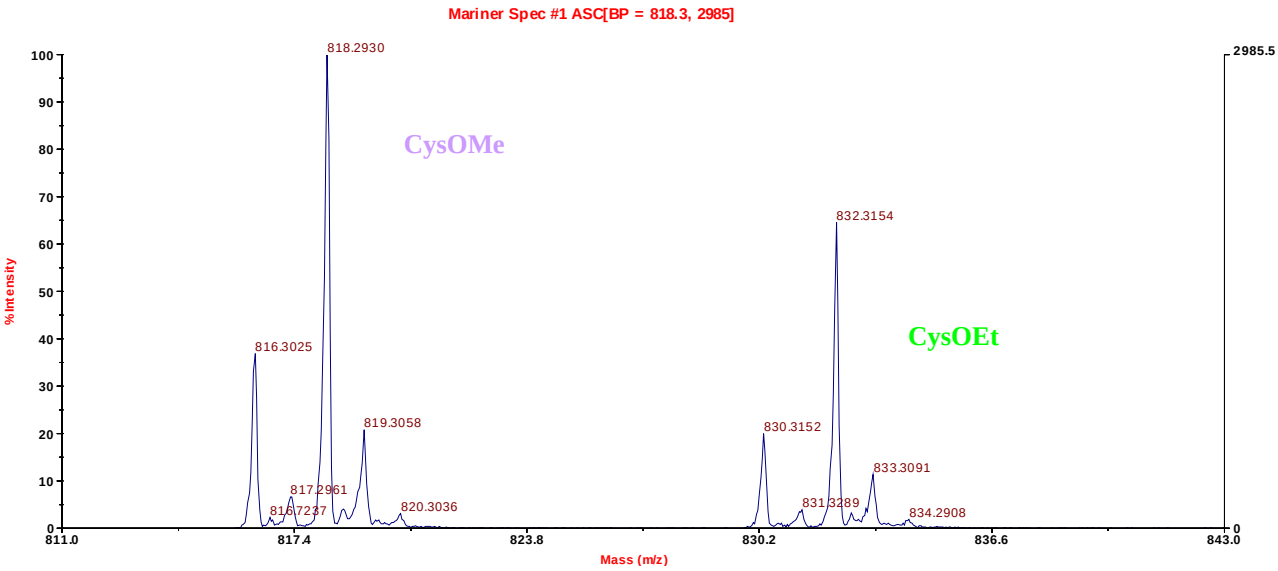


Figura 39. Spettro di massa ESI-TOF dei prodotti della reazione di $[Re^{V}(N)(PNP3)]^{2+}$ con CysOMe, in EtOH.

Nel caso dei complessi *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysOMe)(PNP3)]$^{+}$ e *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysOEt)(PNP3)]$^{+}$ la catena laterale metossi/etossi-carbossilica del legante può trovarsi in *syn* oppure in *anti* rispetto al *core* azoturo (Figura 40).

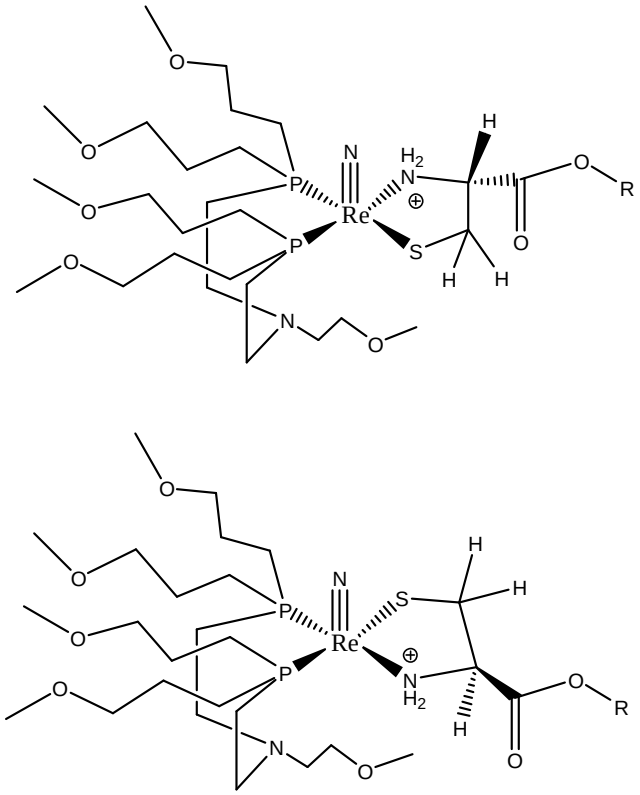


Figura 40. *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysOR)(PNP3)]$^{+}$
R=CH_3 per CysOMe; R=CH_2CH_3 per CysOEt.

I due diastereoisomeri sono stati isolati attraverso cromatografia su colonna di silice e quindi caratterizzati singolarmente, mediante spettroscopia protonica NMR che ha permesso di identificare dei segnali peculiari e diagnostici per ciascuno. L'analisi degli spettri ^{1}H-NMR ha rivelato per i due isomeri significative variazioni di *chemical shift* nei segnali del protone H_α e dei protoni NH_2 del legante cisteinato che coordinano il metallo.
In particolare, nel caso del protone H_α, nell'isomero *anti* esso si trova in *syn* rispetto al core Re(N) pertanto esso è più deschermato (rispetto allo stesso dell'isomero *syn*) ed il segnale si sposta *downfield* presentando così più alti valori di *chemical shift*, per effetto elettronico del gruppo azoturo terminale. Tale isomero presenta un tempo di ritenzione minore rispetto all'isomero *syn* (Tabella 10).
Lo spettro ^{31}P {^{1}H} NMR ($CDCl_3$) mostra per ciascun diastereoisomero di [Re^{V}(N)(CysOMe/OEt)(PNP3)]$^{+}$ due doppietti (per <u>CysOMe</u> *anti*: 11.43 ppm, $^{2}J_{PP}$=11.66

Hz; 12.83 ppm, $^2J_{PP}$=11.66 Hz; *syn*: 13.23 ppm, $^2J_{PP}$=9.36 Hz; 9.81 ppm, $^2J_{PP}$=9.36 Hz; per CysOEt *anti*: 11.90 ppm, $^2J_{PP}$= 9.72 Hz; 11.61 ppm, $^2J_{PP}$= 9.72; *syn*: 13.31 ppm, $^2J_{PP}$= 9.72 Hz; 9.93 ppm, $^2J_{PP}$= 9.72 Hz;), dovuti all'accoppiamento dei due atomi di fosforo. La presenza di due segnali è dovuta al diverso intorno chimico, e quindi magnetico, dei due atomi di P che sono coordinati, rispettivamente, in *trans* rispetto ad un atomo S o in *trans* rispetto ad un atomo N.

Analogamente a quanto esposto per [Re^V(N)(CysOR)(PNP3)]$^+$, anche per il complesso [Re^V(N)(CysNAc)(PNP3)] si osserva la formazione di due diastereoisomeri *syn, anti* di Renio (V), in base alla reciproca posizione della catena laterale di CysNAc rispetto al *core* azoturo (Figura 41).

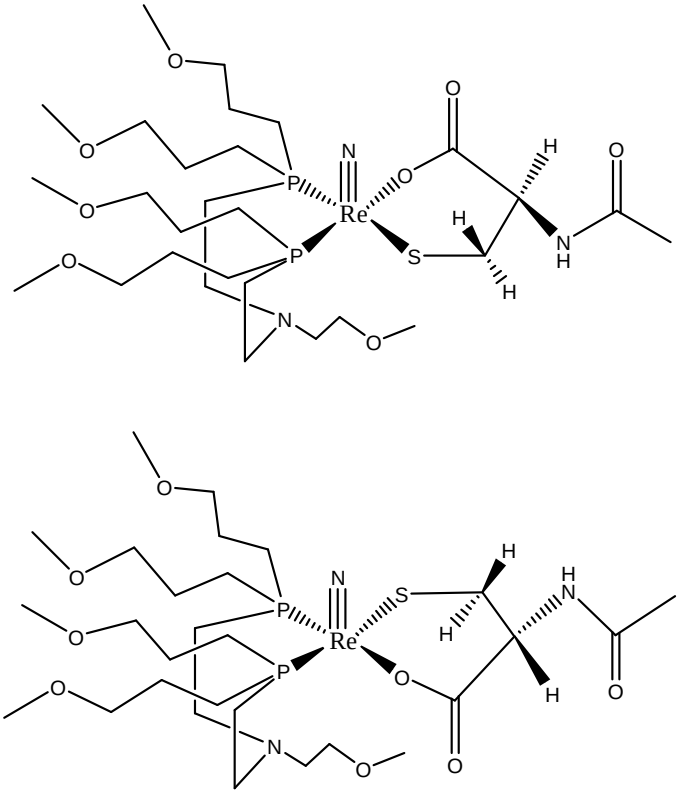


Figura 41. Complessi *syn,anti*-[Re^V(N)(CysNAc)(PNP3)]$^+$.

La purificazione della miscela di reazione attraverso cromatografia su colonna di silice ha permesso la separazione e la caratterizzazione dei due diastereoisomeri. Anche in questo caso è stato possibile identificare dei segnali utilizzabili come diagnostici che in ciascuno spettro ^{1}H-NMR dei due isomeri presentano delle caratteristiche variazioni di *chemical shift*. Tali segnali sono relativi al protone H_α e al protone N*H* di CysNAc. In particolare, il protone H_α della CysNAc nell'isomero *anti* si trova in *syn* rispetto al *core* azoturo, pertanto

esso è leggermente più deschermato (rispetto allo stesso dell'isomero *syn*) ed il segnale si sposta *downfield* presentando così più alti valori di *chemical shift*. Per visualizzare quanto descritto, si riporta lo spettro NMR protonico di una miscela arricchita nell'isomero *syn* (Figura 42).

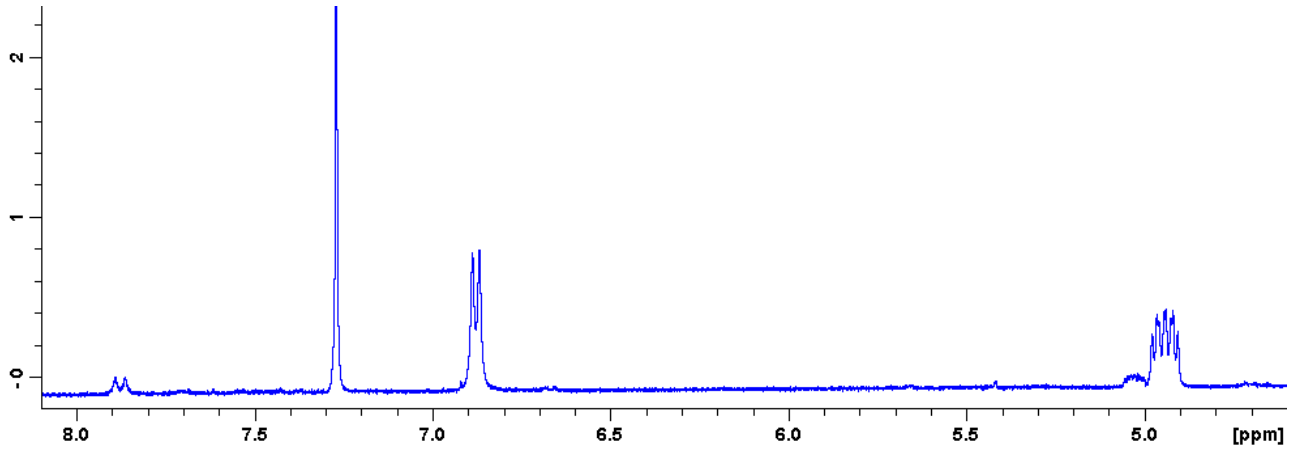


Figura 42. Spettro ^{1}H NMR nell'intervallo "diagnostico" 8.1-4.6 ppm, di *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)].

Lo spettro ^{31}P {^{1}H} NMR ($CDCl_3$) mostra per ciascun diastereoisomero di [Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)] due doppietti dovuti all'accoppiamento dei due atomi di fosforo (*anti*: 18.61 ppm; $^{2}J_{PP}$=9.48 Hz; 11.90 ppm; $^{2}J_{PP}$=9.36 Hz; *syn*: 17.74 ppm, $^{2}J_{PP}$=9.36 Hz; 11.55 ppm, $^{2}J_{PP}$=9.36 Hz). Si osservano due segnali per il diverso intorno chimico dei due atomi di P che sono coordinati in *trans* rispetto ad un atomo S o ad un O. (Figura 43).

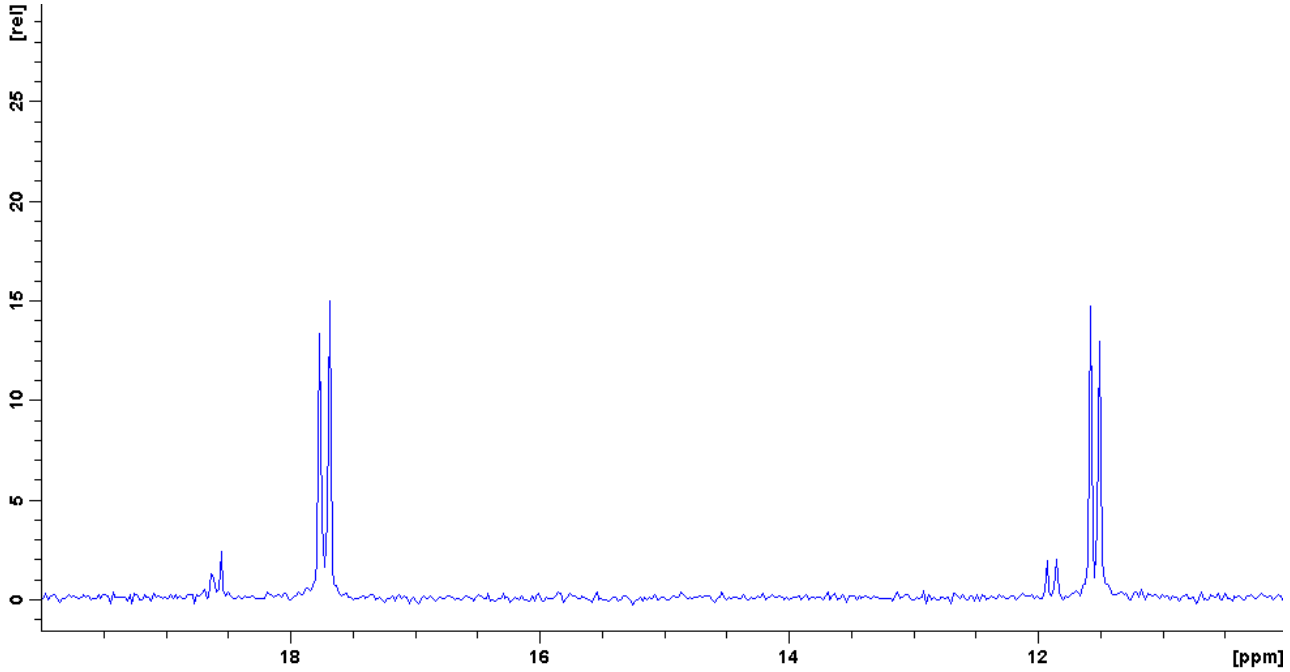


Figura 43. Spettro ^{31}H NMR di *syn,anti*-[Re^{V}(N)(CysNAc)(PNP3)].

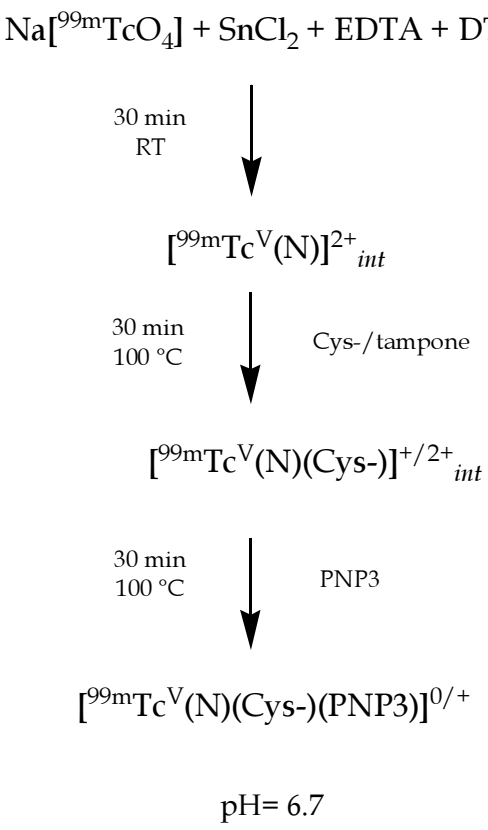
C4.2 AZOTURO COMPLESSI DI Re-188.

Nello studio della preparazione di complessi $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP3)]^{+/0}$ si sono sfruttate le conoscenze sulla chimica del Tc-99m.

A livello di Tc-99m, i complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\sim)(PNP3)]^{+/0}$ con Cys~=CysOR, CysNAc, sono ottenuti in alta resa utilizzando come donatore SDH e seguendo due possibili strategie sintetiche. La prima è quella a due *steps* in cui si forma inizialmente il *core* azoturo, convertito nel secondo passaggio nel complesso misto finale per aggiunta contemporanea dei due leganti; la seconda è quella *one pot* che consta di un unico passaggio e che dimostra come il legante amminodifosfinico intervenga nella stabilizzazione del *core* azoturo e ne promuova la reattività verso specie π-donatrici.

Applicando queste strategie di sintesi ma sostituendo SDH con DTCZ, eccellente donatore del *core* azoturo, si ottiene, per coordinazione al metallo dell'eccesso di DTCZ, il complesso dissimetrico $[^{99m}Tc^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$ in alta resa. Questo rappresenta la specie cineticamente favorita, termodinamicamente stabile ed inerte a transchelazione con Cys~ non formando il complesso misto $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\sim)(PNP3)]^{+/0}$.

Conseguentemente, l'unica possibilità di ottenere in alta resa il complesso contenente il cisteinato derivato è di applicare una via di sintesi costituita da tre passaggi: nel primo DTCZ forma a temperatura ambiente il *core* $[^{99m}Tc^{V}(N)]^{2+}$, successivamente si aggiunge il legante Cys~ incubando la miscela ad alta temperatura, infine, nell'ultimo passaggio, si aggiunge PNP3 e si prolunga il riscaldamento altri 30 minuti (Schema 2)



Schema 2. Sintesi di $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\sim)(PNP3)]^{+/0}$ con DTCZ.

I complessi $[^{99m}Tc^{V}(N)(Cys\sim)(PNP3)]^{+/0}$ così ottenuti sono stati caratterizzati per comparazione dei cromatogrammi HPLC di analoghi, preparati con Re-185/187 come esposto nel precedente paragrafo, e sono ottenuti come miscela dei due diatereoisomeri *syn/anti,* in rapporto 50/50 per CysOR e 20/80 per CysNAc (Tabella 10).

Nella sintesi dei complessi di Re-188 si sono valutati vari parametri inerenti alla cinetica e alle condizioni di complessazione, quali la scelta della molecola donatrice del terminale azoturo (SDH o DTCZ), il pH e la temperatura.

Dati riportati in letteratura [57] indicano che nella sintesi di azoturo complessi di Re-186/188, DTCZ rappresenta la molecola che più efficacemente è in grado di donare gruppi N_3^- nella formazione del *core* $[^{186/188}Re^{V}(N)]^{2+}$.

Utilizzando SDH come donatore, infatti, i complessi $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP3)]^{+/0}$ sono ottenuti con rese bassissime (RCY~40%), se confrontati con gli analoghi ottenuti con Tc-99m, e questo conferma la bassa efficacia della succininil-diidrazide come agente azoturo donatore per Re-188; per questo motivo si è scelto DTCZ. Applicando la stessa strategia sintetica utilizzata per SDH, in uno o due passaggi, la specie cineticamente e termodinamicamente favorita è, analogamente a quanto avviene con Tc-99m, il complesso

dissimetrico $[^{188}Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$. Come dimostrato dal fatto che può essere ottenuto, in resa quantitativa, attraverso una reazione che avviene in un unico passaggio. $[^{188}Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$ è stabile a diversi valori di pH, nell'intervallo compreso tra 1 e 10 e ad alta temperatura per tempi prolungati, ed è inerte a transchelazione per aggiunta di Cys~.

Nella preparazione di azoturo complessi di Re-188 la quantità di DTCZ richiesta è molto bassa, ad ulteriore conferma delle sue ottime capacità di donatore del gruppo N_3^-.

Le quantità di Sn, agente riducente, e le condizioni di riduzione sono, per il Re-188, più drastiche di quelle utilizzate per il suo congenere Tc-99m, come atteso in ragione delle differenze nei potenziali standard di riduzione dei due metalli. In particolare, per Re-188, l'ambiente riducente è ottenuto utilizzando una quantità di $SnCl_2$ 10 volte superiore ed il pH è di 1.5 per HCl 0.1 N. La prima difficoltà sintetica è stata la necessità di avere un pH più vicino alla neutralità, tale da consentire la deprotonazione degli atomi coordinanti dei leganti Cys~ ma che non permetta la ri-ossidazione di $[^{188}Re^{V}(N)]^{2+}$a $[Re^{VII}O_4]^-$. Sperimentalmente si è osservato che per valori di pH finale inferiori a 3,2 si osserva principalmente la formazione del complesso misto $[^{188}Re^{V}(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$, mentre per pH > 3,6 si ha ri-ossidazione a Re(VII). Il pH deve pertanto avere valori compresi tra 3,2-3,6 e deve essere controllato mediante l'introduzione di adeguate quantità di un opportuno sistema tampone di molarità idonea (Figura 44).

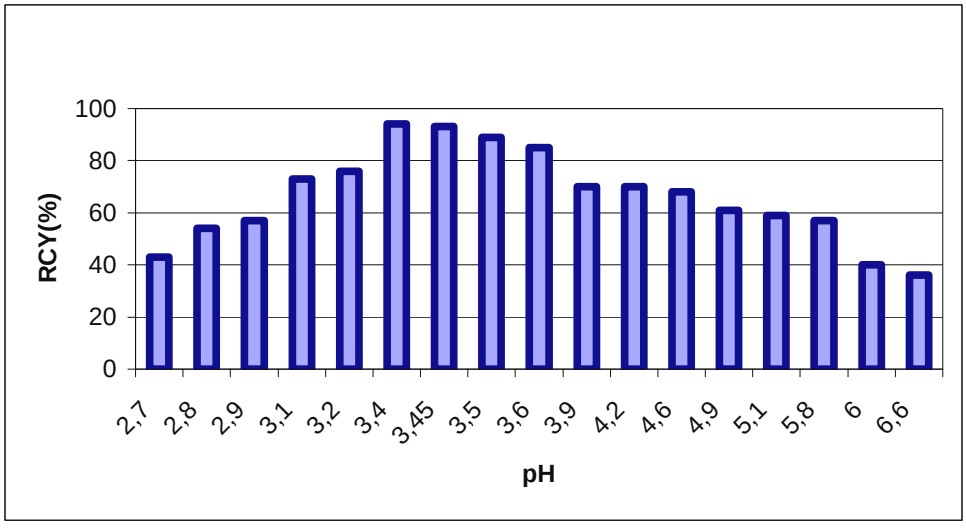


Figura 44. Studio della variazione di RCY(%) di $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP3)]^{+/0}$ in funzione del pH finale.

Questo studio ha permesso di mettere a punto una efficiente via di sintesi che prevede la preliminare formazione del *core* $[^{188}Re^{V}(N)]^{2+}$, dopo soli 15 minuti a temperatura ambiente

e la successiva aggiunta dei leganti: PNP3, Cys~ e tampone fosfato 0.125 M, a pH=7.7. La amminodifosfina stabilizza lo stato di ossidazione del Re(V) nel *core* $[^{188}Re^{V}(N)]^{2+}$ e, originando il frammento metallico $[^{188}Re^{V}(N)(PNP3)]^{2+}$ ne promuove la reattività nei confronti dei leganti bidentati Cys~ (Schema 3).

La presenza del tampone di molarità e pH idoneo permette la deprotonazione degli atomi donatori di Cys~ (S^{-},NH_2 per CysOMe; S^{-},O^{-} per CysNAc) rendendoli disponibili alla coordinazione, sfavorendo la formazione di $[^{188}Re(N)(DTCZ)(PNP3)]^{+}$, e, alle basse concentrazioni usate, non promuove l'ossidazione a Re(VII).

$$Na[^{188}ReO_4] + SnCl_2 + EDTA + DTCZ + HCl$$

15 min
RT

$$[^{188}Re^{V}(N)]^{2+}{}_{int}$$

15 min
100 °C

Cys-, *tampone*,
PNP3

$$[^{188}Re^{V}(N)(Cys\text{-})(PNP)]^{0/+}$$

Schema 3. Sintesi di di $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP3)]^{+/0}$.

Si sono quindi preparati, in alta resa, i complessi *syn,anti*-$[^{188}Re(N)(CysOMe)(PNP3)]^{+}$, e *syn,anti*-$[^{188}Re(N)(CysNAc)(PNP3)]$, caratterizzati per comparazione radio/UV dei tracciati cromatografici, ottenuti mediante TLC ed HPLC, degli analoghi complessi preparati a livello macroscopico (Tabella 10).

C5. Conclusioni.

Lo studio raccolto in questa Sezione ha permesso il trasferimento della tecnologia del frammento metallico $[^{99m}Tc^{V}(N)(PNP)]^{2+}$ alla sintesi di analoghi azoturo complessi dissimetrici di Re-188, del tipo $[^{188}Re^{V}(N)(Cys\sim)(PNP)]^{+/0}$. Questi composti presentano un *core* azoturo $Re^{V}(N)$ coordinato da due diversi leganti: uno amminodifosfinico che stabilizza lo stato di ossidazione (V) e interviene nella modulazione della lipofilia ed uno cisteinato derivato che, per derivatizzazione con una biomolecola, fornisce il meccanismo di *targeting* tissutale. Tale metodo potrebbe dunque essere applicato alla produzione di complessi recettore-specifici da utilizzare in radioterapia *target*-specifica, usando anticorpi o peptidi (quali Cys-Gly-CCK8) come substrati di recettori iperespressi in particolari condizioni patologiche.

Tenendo in considerazione le differenze chimiche tra Tc-99m e Re-188 non era ipotizzabile un automatico trasferimento del metodo, conseguentemente sono state necessarie indagini accurate che hanno permesso di ottenere i complessi in studio in alta resa, in soli due passaggi ed in condizioni di reazione che richiedono bassi valori di pH (3.4-3.6) ed alta temperatura (100 °C).

Nelle sintesi dei composti contenenti leganti cisteinato derivati, contrariamente a quanto finora osservato per Tc-99m, la scelta della molecola donatrice del gruppo azoturo (DTCZ) e il controllo del pH di reazione rappresentano punti estremamente critici.

Si rendono tuttavia necessari ulteriori studi al fine di indagare la stabilità dei nuovi composti nei liquidi biologici *in vitro*, nonché il profilo farmacocinetico e farmacodinamico *in vivo*.

C6. Riferimenti bibliografici.

[1] A. I. Kassis, S. J. Adelstein, *Handbook of Radiopharmaceuticals*, Edited by M.J.Welch and C.S. Redvanl. **2003**, John Wiley & Sons, Ltd. Pagg. 767-793.

[2] J. C. Quintana, M. J. Blend., "The dual-isotope ProstaScint imaging procedure: clinical experience and staging results in 145 patients", *Clin Nucl Med*, **2000**; 25:33-40.

[3] T. J. Polascik, M. J. Manyak, M. K. Haseman, R. T. Gurganus, B. Rogers, R. T. Maguire, A. W. Partin, "Comparison of clinical staging algorithms and ^{111}indium-capromab pendetide immunoscintigrafy in he predictiono of lmph node involvement in high risk prostate carcinoma patients", *Cancer*, **1999**, 85: 1586-92.

[4] F. F. Knapp Jr., S. Mirzadeh, A. L. Beets, M. O'Doherty, P. J. Blower, E. Verdera, J. S. Gaudiano, J. Kropp, J. Guhlke, H. Palmedo, H. J. Biersack, *Appl. Radiat. Isot.,* **1998**, 49, 309.

[5] S. Liu, "The role of coordination chemistry in the development of targetspecific radiopharmaceuticals", *Chem. Soc. Rev.,* **2004**, 33, 445–461.

[6] F. F. (Russ) Knapp, **"**Set-up, general use and quality control of the *ornl* tungsten-188/rhenium-188 generator system and methods for concentration of rhenium-188 to high specific volume solutions"**,** April, **2005**, DE-AC05-00OR22725.

[7] J. C. Vites, M. M. Lynam, "Rhenium 1996", *Coord., Chem., Rev.,* 172, **1998**, 357-388.

[8] H. Beladj-Tahar, G. Cros, M. Dartiguenave, "Chimie du Rhénium. Radiopharmaceutiques", *Presses Universitaires de Grenoble*, **1988.**

[9] K. A. Conner, R. A. Walton, "43 – Rhenium", *Compr. coord. Chem.*, Vol 4.

[10] G. L. Griffiths, "Cancer therapy with Radiolabeled Antibodies", Ed. D. M. Goldnberg, CRC Press: Boca Raton, FL, **1995**, Cap. 5, p. 47.

[11] B. F. Bernard, E. P. Krening, W. A. P. Breeman, E. J. Rolleman, W. H. Bakker, T. J. Visser, H. Macke, de Jong M., *J. Nucl. Med.,* **1997**, 38, 1929.

[12] A. R. Fritzberg, D. S. Wilbur, "Targeted Delivery of Imaging Agents", V. P., Ed.; CRC Press: Boca Raton F. L., **1995**, cap. 6, p. 83.

[13] R. K. Hom, J. A. Katzenellenbogen, *Nucl. Med. Biol.*, **1997**, 24, 485.

[14] F. M. Su, D. B. Axworthy, P. L. Beaumier, A. R. Fritzberg, *J. Nucl. Med.*, **1992**, 32, 910.

[15] H. Breitz, B. Ratliff, R. Schroff, J. L. Vanderheyden, A. R. Frtzberg, J. Applebaum,

D. R. Fisher, P. Abrams, *J. Nucl. Med.*, **1990**, 31, 725.

[16] C. J. Smith, T. J. Hoffman, C. Higginbotham, E. Wong, D. Esihmia, J. R. Thornback, W. A. Volkert, *J. Nucl. Med*, **1988**, 39, 215.

[17] E. Wong, T. Fauconnier, S. Bennett, J. Valliant, T. Nguyen, F. Lau, L. Lu., A. Pollak, A. Bell, J.R. Thornback, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 5799.

[18] Y. Sugano, J. A. Katzenellenbogen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 361.

[19] T. N. Rao, J. L. Vanderheyden, S. Kasina, P. Beaumier, R. Berninger, A. R. Fritzberg, *J. Nucl. Med.*, **1988**, 29, 815.

[20] R. Visentin, M. C. Giron, M. Bello, U. Mazzi, *Nucl. Med. Biol,* **2004**, 31, 655-662.

[21] D. B. Berning, K.V. Katti, P. R. Singh, C. Higginbotham, V. S. Reddy, W. A. Volkert *Nucl. Med. Biol.,* **1996**, 23, 617.

[22] C. J. Smith, N. Li, K. V. Katti, C. Higginbotham, W. A. Volkert, *Nucl. Med. Biol.*, **1997**, 24, 685.

[23] V. S. Reddy, D. B. Berning, K. V. Katti, C. L. Barnes, W. A. Volkert, A. R. Ketring, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35,1753.

[24] D. B. Berning, V. S. Reddy, K. V. Katti, P. R. Singh, T. J. Hoffman, W. A. Volkert, A. R. Ketring, *J. Labeled Compd. Radiopharm.*, **1995,** 37, 459.

[25] S. R. Karra, R. Schibli, H. Gali, K. V. Katti, T. J. Hoffman, C. Higginbotham, G. Sieckman, W. A. Volkert, *Bioconj. Chem.,* **1999**, 10, 254.

[26] R. Syre, S. Seifert, H. Spies, A. Gupta, B. Johannsen, *Eur J Nucl Med,* **1998**, 25, 793-796.

[27] R. Alberto, K. Ortner, N. Wheatley, R. Schibli, A. P. Schubiger, *J Am Chem Soc.*, **2001**, 123, 3135-3136.

[28] R. Schibli, R. Schwarzbach, R. Alberto, K. Ortner, H. Schmalle, C. Dumas, A. Egli, P.A. Schubiger, *Bioconj. Chem.*, **2002**, 13, 750-756.

[29] R. Alberto, R. Schibli, R. Waibel, U. Abram, A. P. Schubiger, *Coordin Chem Rev.*, **1999**, 190-192, 901-919.

[30] J. K. Pak, P. Benny, B. Spingler, K. Ortner, R. Alberto, *Chem Eur J.*, **2003**, 9, 2053-2061.

[31] R. Schibli, K. V. Katti, C. Higginbotham, W.A. Volkert, R. Alberto, *J. Nucl. Med. Biol.*, **1999**, 26, 711-716.

[32] J. Bernard, K. Ortner, B. Spingler, H.J. Pietzsch, R. Alberto, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 1014-1022.

[33] R. Alberto, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2003**, 30, 1299-1302.

[34] R. Waibei, R. Alberto, J, Willude, R. Finnern, R. Schibli, A. Stichelberger, *Nat., Biotechnol.*, **1999**, 17, 897-901.

[35] A. Egli, R. Alberto, L. Tannahill, R. Schibli, U. Abram, A. Schaffland, R. Waibel, D. Tourwe, L. Jeannin, K. Iterbeke, P.A. Schubiger, *J Nucl Med*, **1999**, 40, 1913-1917.

[36] R. LaBella, E. Garcia-Garagyoa, M. Bahler, P. Blauenstein, R. Schibli, P. Conrath, D. Tourwe, P. A. Schubiger, *Bioconj. Chem.*, **2002**, 13, 599-604.

[37] R. Schibli, R. LaBella, R. Alberto, E. Garcia-Garagyoa, K. Ortner, U. Abram, *Bioconj. Chem.*, **2000**, 11, 345-351.

[38] R. Alberto, J. K. Pak, D. van Staveren, S. Mundwiler, P. Benny, *Biopolymers*, **2004**, 76, 324-333.

[39] M. B. Skaddam, F. R. Wust, S. Jonson, R. Syhre, M. J. Welch, H. Spies, *Nucl Med Biol*, **2000**, 27,269-278.

[40] H Palmedo, A Manka-Waluch, P Albers, *Journal of Clinical Oncology.*, **2003**, 21(15):2869-2875.

[41] P J Blower, A S Lam, M J O'Doherty, A G Kettle, A J Coakley, F F Knapp, *Eur. J. Nucl. Med.*, **1998**, 25(6): 613-21.

[42] M. J. Edelman, G. Clamon, D. Kahn, M. Magram, B. R. Line, *Journal of Clinical Oncology*, **2007**, ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement).

[43] S. N. Reske, *Eur. J. Nucl. Med.*, October **1999**.

[44] D. Bunjes, I. Buchmann, C. Duncker, U. Seitz, J. Kotzerke, M. Wiesneth, D. Dohr, M. Stefanic, A. Buck, S. V. Harsdorf, G. Glatting, W. Grimminger, T. Karakas, G. Munzert, H. Döhner, L. Bergmann, S. N. Reske, *Blood*, **2001**, Vol. 98, No. 3, pp. 565-572.

[45] *Biomed Imaging Interv*. J, **2006**; 2(3):e40.

[46] S. J Wang, W. Y. Lin, M. N. Chen, B. T. Hsieh, L. H. Shen, Z. T. Tsai, G. Ting, F. F. Jr. Knapp, *Eur J Nucl Med.*, **1996**, 23(1):13-7.

[47] S. Lee, *Nucl. Med. Commun.*, **2003**, 24, 689.

[48] *Science and Medicine*, March-April, **1996**.

[49] E. Deutsch, K. Libson, J. L Vanderheyden, "The inorganic chemistry of technetium and rhenium as relevant to nuclear medicine", *Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine 3*, Eds. M.Nicolini, U.Mazzi, **1990**, p 13-22.

[50] P. Blower, "Towards molecular imaging and treatment of disease with radionuclides: the role of inorganic chemistry", *Dalton Trans.*, **2006**, 1705–1711.

[51] D. Perrin, W. Aramarego, "Purification of Laboratory Chemicals", Pergamon Press **1980**.

[52] A. Duatti, A. Marchi, R. Pasqualini, "Formation of the Tc≡N multiple bond from ammonium pertechnetate with S-methildithiocarbazate and its application to the preparation of technetium-99m radiopharmaceuticals", *J. of Chem. Soc.*, Dalton Transaction, **1990**, 3729-3733.

[53] U. Abram, *J. Chem. Soc.*, Dalton Trans., **1998**, 231-238.

[54] C. Baldas, *Inorg. Chem.*, **1986**, vol 25 no 2.

[55] U. Abram, *Polyhedron*, **1988**, vol 7, no 4 285-289.

[56] C. Bolzati, A. Boschi, L. Uccelli, A. Cagnolini, G. Bandoli, A. Vitadini, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002,** 124, 11468-11479.

[57] E. Bellande, M. Charmoille, R. Pasqualini, "Synthesis of ^{186}Re Nitrido Complexes", *Technetium, Rhenium and Other Metals in Chemistry and Nuclear Medicine*, **1999**, SGE Editoriali.

SIGLE ED ABBREVIAZIONI

CCK-8	analogo peptidico della colicistochinina ad otto temini C-terminale amide (struttura primaria: Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2)
CCK-B	recettore delle colecistochinine di tipo B
Cys	L-Cisteina
Cys-Gly-CCK8	decapeptide analogo della colicistochinina (sequenza primaria: Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-Gly-Cys[NH_2,SH])
CysNAc	L-Cisteina N-acetile
$CysNH_2$	cisteammina (2-amminoetantiolo)
CysOEt	L-Cisteina etil estere
CysOMe	L-Cisteina metil estere
CysOR	L-Cisteina estere
DBODC	N,N-(etossietil)ditiocarbammato
DMGA	acido 3,3-dimetilglucarico
DTC	generico legante bidentato con atomi coordianti ditiocarbammici
DTCZ	S-metil-2-metilditiocarbazato
EDTA	acido etilendiamminotetracetico
Gly	glicina
GSH	glutatione
HEPES	acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico
H_2PNPH_2	N,N-bis(2-fosfaniletil)R-etilammina (R=metossi, etossi)
PBS	tampone fosfato 0.2 M pH 7.4 in soluzione acquosa NaCl 0.9%
p.i.	*post injection*
PNP	generico legante amminodifosfinico
PNP3	N,N-bis-[di(metossipropil)fosfinoetil]metossietilammina
PNP5	N,N-bis-[di(metossipropil)fosfinoetil]etossietilammina
PNP7	N,N-bis-[di(metossietil)fosfinoetil]etossietilammina
PNP9	N,N-bis-[di(4-metossifenil)fosfinoetil]etossietilammina
PNP10	N,N-bis-[di(metossietil)fosfinoetil]metossietilammina
PNP43	N,N-bis-[di(metil)fosfinoetil]metossietilammina
PNP3OH	N,N-bis-[di(idrossimetil)fosfinoetil]metossietilammina

RCP	purezza radiochimica
RCY	resa radiochimica
SDH	succinil di-idrazide
NaCl 0.9%	soluzione fisiologica, [NaCl]=0.9%